

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES  
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES  
DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING IN  
GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH AND  
ENVIRONMENTAL SCIENCES

RESEARCH AND DOCTORATE TRAINING  
UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

**Laboratoire de Recherche en Tuberculose et Pharmacologie**  
*Laboratory for Tuberculosis Research and Pharmacology*  
(BTC/UIYI)

**Criblage antibactérien de six plantes médicinales du Cameroun vis-à-vis des bactéries Gram Négatif multirésistantes : Identification des principes actifs de *Acacia polyacantha* (Euphorbiaceae) et leur mode d'action**

Thèse de Doctorat/Ph.D en Biochimie  
Spécialité Pharmacologie

Soutenu par :  
**MAMBE TAMEGHE Flora**  
Matricule 08R0465



Le 06 Décembre 2021 devant le jury constitué de:

Président :

**MOUNDIPA FEWOU Paul,**

Professeur,

Université de Yaoundé I

Rapporteurs :

**PENLAP NINTCHOM Véronique,**

Professeur,

Université de Yaoundé I

**KUETE Victor,**

Professeur,

Université de Dschang

Membres :

**FEK AM BOYOM Fabrice,**

Professeur,

Université de Yaoundé I

**KORO KORO Francioli,**

Maître de Conférences,

Université de Douala

**EYANGO Sarah Irène,**

Directeur de Recherche,

Centre Pasteur de Yaoundé

Année 2021/2022

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES  
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES  
DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING IN  
GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH AND  
ENVIRONMENTAL SCIENCES

RESEARCH AND DOCTORATE TRAINING  
UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

## ATTESTATION DE CORRECTION

Nous, membres du jury de Thèse de Doctorat/Ph.D en Biochimie, spécialité Pharmacologie, soutenue par Madame **MAMBE TAMEGHE Flora** (Matricule **08R0465**) le Lundi 06 Décembre 2021 à 14 heures dans la S01/S02 de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, sous le thème : « Criblage antibactérien de six plantes médicinales du Cameroun vis-à-vis des bactéries Gram négatif multirésistantes : Identification des principes actifs de *Acacia polyacantha* (Euphorbiaceae) et leur mode d'action », attestons que la candidate a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

En foi de quoi, la présente attestation lui est établie pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le **04 AVR 2022**

Examineur

*Fabrice H. Boyom, Sc.D.*  
Professor of Biochemistry

*Dr. Sara Gyangoh*  
Directeur Scientifique  
du Centre Pasteur du Cameroun


Président du jury

*Moundipa Fawou Paul*  
Professeur  
Enzymologie - Toxicologie

Chef de Département

*Moundipa Fawou Paul*  
Professor  
Enzymology-Toxicology

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
Département de Biochimie  
Department of Biochemistry  
Le Chef de Département  
The Head of Department  
FACULTÉ DE SCIENCES  
FACULTY OF SCIENCES

<b>UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I</b> <b>Faculté des Sciences</b> Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		<b>THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I</b> <b>Faculty of Science</b> Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b>		<b>LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF</b>

**ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION 22 septembre 2021**

**ADMINISTRATION**

**DOYEN :** TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA :** ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DSSE :** NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC :** ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*

**Chef Division Administrative et Financière :** NDOYE FOE Marie C. F., *Maître de Conférences*

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR :**  
 AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

**1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)**

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste

8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	EWANE Cécile Anne	Maître de Conférences	En poste
17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste

25	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
25	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
26	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
27	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
32	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
33	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste

35	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
36	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
37	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

## 2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (46)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>

7	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
9	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
10	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
11	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
12	NOLA Moïse	Professeur	En poste
13	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
14	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
15	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>

16	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
19	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
21	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
22	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
23	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

24	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
25	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
26	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
27	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
28	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste

30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
32	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
33	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
34	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
35	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
36	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
37	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
38	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
39	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
40	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste

42	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
43	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
44	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
45	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
46	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

### **3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)**

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste

4	MBOLO Marie	Professeur	En poste
5	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
6	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
7	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

8	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
9	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
10	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
11	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
12	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste

18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste



22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste

27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHOU Louis-Paul- Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

#### 4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (33)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ.</i>

			<i>Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UD</i> s
10	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>

11	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
12	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
13	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
14	KAMGANG YOUNBI Georges	Maître de Conférences	En poste
15	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
16	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
19	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
20	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste

21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste

25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste

31	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
32	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
33	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

#### 5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (34)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/FSE/UIYI
2	GHOOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
5	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/</i> <i>MINESUP/</i> Chef de Département
6	WANDJI Jean	Professeur	En poste

7	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
8	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste

9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<b>C.E/ MINESUP</b>
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	C.S/ MINESUP
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>

25	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
26	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
27	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

28	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
29	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
30	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
31	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
32	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste

33	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
34	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

#### 6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
---	------------------------	-----------------	----------

5	AMINOOU Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
6	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
7	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
8	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
10	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
11	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
12	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	Directeur adjoint Enset. Ebolowa
14	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
15	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
16	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

18	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

**7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)**

1	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
2	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>

3	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
4	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
7	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
8	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes &amp; Diplômes/FS/UYI</i>
9	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
10	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

11	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
12	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste

15	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
16	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
19	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
20	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
22	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
23	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste

26	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
27	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

<b>8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)</b>
---

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
3	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste



4	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

**9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)**

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. UN</i>
4	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste

5	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
6	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
9	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
12	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen FS Univ/Bda
13	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste

16	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
17	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
22	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
23	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste

25	SAIDOU	Maître de Conférences	MINRESI
26	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYY</i>

30	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
32	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
33	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
34	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
35	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
36	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
37	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
38	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

39	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

**10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)**

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
12	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
13	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
14	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
15	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
16	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
17	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance &amp; du</i>

			<i>Matériel/UYII</i>
18	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste

38	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

41	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
42	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

**Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I**

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (01)	14 (10)	13 (05)	3 (02)	<b>38 (18)</b>
BPA	15 (01)	8 (06)	18 (05)	05 (02)	<b>46 (14)</b>
BPV	07 (01)	10 (01)	9 (06)	07 (01)	<b>33 (9)</b>
CI	10 (01)	10 (02)	10 (02)	03 (0)	<b>33 (5)</b>
CO	6 (0)	21 (05)	05 (02)	02 (0)	<b>34(7)</b>
IN	2 (0)	1 (0)	14 (01)	08 (01)	<b>25 (2)</b>
MAT	2 (0)	8 (0)	15 (01)	05 (02)	<b>30 (3)</b>
MIB	3 (0)	4 (02)	05 (01)	06 (02)	<b>18 (5)</b>
PHY	15 (0)	14 (02)	09 (03)	02 (0)	<b>40 (5)</b>
ST	7 (1)	15 (01)	18 (05)	02 (0)	<b>42(7)</b>
<b>Total</b>	<b>75 (5)</b>	<b>105 (29)</b>	<b>116 (31)</b>	<b>43 (10)</b>	<b>339 (75)</b>
Soit un total de		<b>339 (75) dont :</b>			
-	Professeurs	<b>75 (5)</b>			
-	Maîtres de Conférences	<b>105 (29)</b>			
-	Chargés de Cours	<b>116 (31)</b>			
-	Assistants	<b>43 (10)</b>			
	( ) = Nombre de Femmes	<b>75</b>			



# DEDICACES

*A l'éternel Dieu tout puissant*

*A mon mari M. TAKOUTEU TEMBOU LAZARE*

*A mes enfants*

*A ma maman et mon feu Papa*

*A la famille TAMEGHE*

# REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail a été possible grâce à la générosité et au soutien indéfectible de nombreuses personnes que j'ai l'honneur et le plaisir de remercier ici. Je pense notamment :

Au Professeur **KUETE Victor**, qui a encadré ce travail en mettant à ma disposition le matériel biologique et en suivant de bout en bout sa réalisation. Ses qualités scientifiques et humaines m'ont été d'une aide très précieuse ;

Au Professeur **PENLAP BENG Véronique**, qui a bien voulu superviser ce travail et a mis à ma disposition son énergie, sa rigueur, ses connaissances et son expérience dans le domaine de la recherche ;

Au Professeur **MOUNDIPA FEWOU Paul** Chef de Département de Biochimie pour l'encadrement académique qu'il nous a assuré ;

A tous les enseignants du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I, pour toutes les connaissances que j'ai acquises au cours de leurs enseignements ;

Au Professeur **MBAVENG Armelle** pour tous ces encouragements, conseils et donc l'exemple m'a permis de comprendre combien c'était possible malgré les multiples difficultés ;

A mon aîné le Dr **VOUKENG Kenfack Igor** qui m'a fait bénéficier de son expertise et pour tous ses encouragements, ses conseils, son soutien, pour m'avoir fait découvrir les joies de la paillasse ;

Au **Dr Na-Iya Jean** ainsi qu'au Pr **NGADJUI Bonaventure** (Chef du Laboratoire d'Etude Chimique des Endophytes et Plantes Médicinales, Département de Chimie Organique de l'Université de Yaounde I), pour la purification de la plante ;

A mes cadets de laboratoires tout particulièrement **WAMBA Elvis**, **NAYIM Paul** et **ASHU fred** dont les échanges scientifiques et les aides multiformes apportées ont permis l'accomplissement de ce travail ;



A l'Unité de Recherche de Microbiologie et des Substances Antimicrobiennes de l'Université de Dschang ;

Au Laboratoire de Microbiologie et des Substances Antimicrobiennes de l'Université de Dschang ;

Au Ministère de la Recherche Scientifique et de l'Innovation pour avoir autorisé la réalisation de ce travail ;

A toute l'équipe de recherche du Pr KUETE Victor de l'Université de Dschang ;

A mes papas **TAMEGHE SADEUH Roger, FOSSO Moïse et FENOU GILBERT** qui ont toujours cru en moi, qui m'ont appris la rigueur du travail et qui m'ont encouragé dans tout mon parcours ;

A ma maman chérie **NAMBA Pauline**, mon pilier qui a toujours été là pour me soutenir dans tous les moments même quand c'était très dur et qui m'a aidé de bout en bout pour que notre rêve soit une réalité : maman tu es un ange ;

A mon oncle : feu papa **FONGAN FOPA Pierre** qui a attendu cette thèse avec impatience et qui malheureusement n'a pas pu être là pour voir la réalisation du rêve de son tuteur papa **ROGER TAMEGHE**, car Dieu l'a rappelé au près de lui avant l'aboutissement de ce travail;

A mes sœurs **MABE Natacha, Fosso Sonia, TOUKAM POKA Fritz** pour leurs conseils et leurs soutiens multiformes ;

A ma belle-mère **TOUHOUE Marie** qui m'a toujours soutenue et a gardé mes enfants pour me permettre de réaliser ce travail ;

A toute ma famille précisément mes frères et sœurs notamment **SADEUH TAMEGHE Ludovic Christian, DJOUMESSI TAMEGHE Mireille, THEUBOU TAMEGHE Tommy Andy, KANDJE TAMEGHE Danielle, EMAC Lionel, NDE TAMEGHE Edmond brice** que j'aime tant et qui n'ont ménagé aucun effort afin de m'aider dans la réalisation de ce document ;

A Mme **DJIAHA Mirabelle** pour son assistance, ses encouragements et qui a encadré mes enfants sur le plan scolaire pendant que je finalisais ce travail;

A mes amis **TCHINDA FOSSI Cedric, DJOMOU Philicia, LIENOU Doriane, Miamdjo Grâce, KUAGNY Blaise, KAOBARA Sedic, SIMO Brice, NGNAMEKO Corine, KEMOE Rodrigue, TAKUISSOU, EBOGO Thiéry**, pour l'ambiance conviviale durant ce parcours et dont les différents aides et échanges ont permis d'édifier ce travail ;

A mes collègues de Fouban : **KAMENI Patricia linda, TONFACK Achille, Takom Boris, NDJOUOKOU Salifou, SULEM Nina** pour la bonne ambiance, leurs encouragements et dont les échanges m'ont été d'une aide sans pareils.

A tous ceux qui me sont chers et qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# TABLE DE MATIERES

<b>DEDICACES</b>	<b>xxi</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>xxii</b>
<b>TABLE DE MATIERES</b>	<b>xxv</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>xxxii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>xxxii</b>
<b>LISTE DES ANNEXES</b>	<b>xxxiv</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS, ACRONYMES ET SIGLES</b>	<b>xxxv</b>
<b>RESUME</b>	<b>xxxix</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xli</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE</b>	<b>4</b>
I.1. Généralités sur les maladies infectieuses et les infections bactériennes	5
I.2. Anatomie fonctionnelle des bactéries	5
I.2.1. Eléments constants	6
I.2.1.1. Paroi	6
I.2.1.2. Membrane cytoplasmique	7
I.2.1.3. Cytoplasme	7
I.2.2. Eléments inconstants	8
I.2.2.1. Capsule	8
I.2.2.2. Glycocalyx	8
I.2.2.3. Flagelles	9
I.2.2.4. Pilis (fimbriae)	9
I.3. Généralités sur les souches bactériennes utilisées	9
I.3.1. <i>Escherichia coli</i>	9
I.3.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
I.3.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
I.3.4. <i>Providencia stuartii</i>	11

I.3.5. <i>Enterobacter aerogenes</i> -----	11
I.4. Les antibiotiques et leur classification -----	12
I.4.1. Classification et mode d'action des antibiotiques -----	12
I.4.1.1. Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane (paroi) -----	13
I.4.1.1.1. $\beta$ lactamines-----	13
I.4.1.1.2. Glycopeptides-----	13
I.4.1.1.3. Fosfomycines -----	13
I.4.1.2. Antibiotiques actifs sur la membrane plasmique -----	13
I.4.1.3. Inhibiteurs de la synthèse des protéines -----	14
I.4.1.3.1. Aminosides -----	14
I.4.1.3.2. Phénicolés-----	14
I.4.1.3.3. Tétracyclines-----	14
I.4.1.3.4. Macrolides, Lincosamides et Streptogramines (MLS) -----	14
I.4.1.3.5. Acide fusidique-----	15
I.4.1.3.6. Oxazolidinones -----	15
I.4.1.4. Inhibiteurs des acides nucléiques -----	15
I.4.1.5. Inhibiteurs de la synthèse des folates -----	15
I.4.1.5.1. Les sulfamides-----	15
I.4.1.5.2. Diaminoptéridine (trimethoprime) -----	16
I.5. Résistance bactérienne aux antibiotiques-----	16
I.5.1. Résistance naturelle-----	17
I.5.2. Résistance acquise -----	18
I.5.3. Mécanisme biochimique de la résistance bactérienne aux antibiotiques-----	19
I.5.3.1. Production d'enzymes dégradant ou inactivant l'antibiotique -----	19
I.5.3.2. Modification de la cible-----	19
I.5.3.3. Production des biofilms -----	19
I.5.3.4. Réduction de la concentration intracellulaire d'antibiotique -----	20
I.5.4. Résistance par efflux -----	21
I.5.4.1. Classification des pompes à efflux -----	21

I.5.4.1.1. Pompes de la famille ABC-----	22
I.5.4.1.2. Pompes de la famille MFS-----	22
I.5.4.1.3. Pompes de la famille MATE-----	23
I.5.4.1.4. Pompes de la famille SMR-----	23
I.5.4.1.5. Pompes de la famille des RND-----	23
I.6. Méthode d'étude de l'activité des substances antimicrobiennes-----	24
I.6.1. Méthode de dilution-----	24
I.6.1.1 Méthode de dilution en milieu liquide-----	24
I.6.1.2. Méthode de dilution en milieu solide-----	24
I.6.2. Méthode de diffusion-----	25
I.6.2.1. Méthode de diffusion par la technique des disques de papier filtre-----	25
I.6.2.2. Méthode de diffusion par la technique des puits-----	26
I.6.3. « E-TEST »-----	26
I.6.4. Etude des associations antibiotiques – substances naturelles-----	26
I.7. Plantes médicinales et activités pharmacologiques-----	27
I.7.1. Alcaloïdes-----	27
I.7.2. Composés phénoliques (aromatiques)-----	28
I.7.3. Composés terpéniques-----	29
I.8. Activités antibactériennes des plantes médicinales-----	30
I-9. Induction de la résistance par les plantes médicinales-----	31
I-10 Généralités sur les plantes utilisées dans ce travail-----	31
I-11. Innocuité des plantes médicinales et toxicité aiguë-----	35
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES-----</b>	<b>37</b>
II.1. Matériel-----	38
II.1.1. Matériel végétal-----	38
II.1.2. Illustration visuelle des images des plantes utilisées dans ce travail-----	39
II.1.3. Microorganismes utilisés-----	41
II.1.4. Réactifs chimiques et molécules de référence utilisées-----	43
II.1.5. Milieux de culture-----	43

II.2. Méthodes -----	44
II.2.1. Schéma général de travail-----	44
II.2.2. Etude phytochimique des plantes testées -----	46
II.2.2.1. Extraction au méthanol des échantillons de plantes-----	46
II.2.2.2. Criblage phytochimiques des extraits bruts de plantes étudiées -----	46
II.2.2.2.1 Mise en évidence des phénols -----	46
II.2.2.2.2 Mise en évidence des alcaloïdes-----	46
II.2.2.2.3. Mise en évidence des flavonoïdes : test de shinoda-----	47
II.2.2.2.4. Mise en évidence des saponines -----	47
II.2.2.2.5. Mise en évidence des triterpènes et stéroïdes : test de Liberman- Burchard -----	47
II.2.2.3. Fractionnement et isolement des composés issus de l'extrait des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> -----	47
II.2.2.3.1. Procédure générale-----	47
II.2.2.3 .2. Isolement des constituants des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> . -----	48
II.2.3. Etude de l'activité antibactérienne des différents échantillons -----	51
II.2.3.1. préparation des milieux de culture-----	51
II.2.3.2. Préparation des solutions d'extrait et d'antibiotiques à tester -----	51
II.2.3.3. Activation des souches et préparation de l'inoculum bactérien -----	51
II.2.3.4. Détermination in vitro des CMI et CMB : test colorimétrique à l'INT -----	52
II.2.4. Etude des mécanismes d'action des échantillons sélectionnés et de résistance des souches étudiées vis-à-vis de ces derniers -----	53
II.2.4.1. Rôle des pompes à efflux sur l'activité de l'extrait brut et des produits de <i>Acacia polyacantha</i> . -----	53
II.2.4.2. Mécanismes d'action des composés issus de <i>Acacia polyacantha</i> -----	54
II.2.4.2.1. Etude de l'association entre les substances d'intérêt et les molécules de référence -----	54
II.2.4.2.1.1. Détermination des concentrations sub-inhibitrices des substances d'intérêt à utiliser lors des associations avec les antibiotiques -----	54

II.2.4.2.1.2. Détermination des CMI des associations entre les substances d'intérêt et les antibiotiques de référence -----	54
II.2.4.2.2. Evaluation de l'effet de l'extrait brut des feuilles et du composé <b>8</b> de <i>Acacia polyacantha</i> sur la croissance bactérienne-----	55
II.2.4.2.3. Evaluation de l'effet de l'extrait brut des feuilles et du composé <b>8</b> de <i>Acacia polyacantha</i> sur la membrane bactérienne-----	56
II.2.4.2.4. Evaluation de l'effet de l'extrait brut des feuilles et du composé <b>8</b> de <i>Acacia polyacantha</i> sur les pompes à proton H <sup>+</sup> -ATPases bactériennes -----	56
II.2.5. Toxicité aiguë de l'extrait brut des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> -----	57
II.2.5.1. Acclimatation, sexe et nutrition des animaux expérimentaux -----	57
II.2.5.2. Détermination de la DL <sub>50</sub> -----	58
II.2.5.3. Sacrifice des animaux et prélèvements du sang et des organes -----	58
II.2.5.4. Evaluation du gain de poids et le poids relatif des organes -----	58
II.2.5.5. Effet de l'extrait des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> sur les paramètres biochimiques des animaux -----	59
II.2.5.5.1. Dosage des protéines sériques -----	59
II.2.5.5.2. Dosage des transaminases -----	60
II.2.5.5.2.1. L'alanine aminotransférase (ALAT)-----	60
II.2.5.5.2.2. L'aspartate aminotransférase-----	62
II.2.6. Analyse des résultats -----	63
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION-----</b>	<b>65</b>
III.1. RESULTATS-----	66
III.1.1. Rendement d'extraction et composition phytochimique des extraits de plantes étudiés -----	66
III.1.2. Fractionnement bioguidé de l'extrait des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> et isolement des composés bioactifs-----	71
III.1.3. Activité antibactérienne des plantes étudiées, fractions et produits de <i>A. polyacantha</i> -----	68
III.1.3.1. Activité antibactérienne des extraits bruts de plantes -----	68
III.1.3.2. Activités antibactériennes des fractions et produits de <i>Acacia polyacantha</i> ----	71

III.1.3. Mécanisme de résistance: Implication de l'efflux dans la multirésistance bactérienne de l'extrait brut des feuilles et des produits de <i>Acacia polyacantha</i> . -----	75
III.1.4. Mécanismes d'action -----	77
III.1.4.1. Concentration sub-inhibitrice et effets des associations antibiotiques-extrait des feuilles et composés (7, 8) de <i>Acacia polyacantha</i> .-----	77
III.1.4.2. Effet de l'extrait brut des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> et de son composé <b>8</b> sur la croissance bactérienne-----	90
III.1.4.3. Effet de l'extrait brut des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> et de son composé <b>8</b> sur la membrane bactérienne -----	93
III.1.4.4. Effet de l'extrait brut des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> et de son composé <b>8</b> sur les pompes à protons H <sup>+</sup> -ATPases bactériennes-----	95
III.1.5. Toxicité aigüe de <i>Acacia polyacantha</i> -----	97
III.1.5.1. Symptômes physiques de la toxicité aigüe des animaux traités ou non avec l'extrait brut des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> -----	97
III.1.5.2. Gain de poids et poids relatif des organes des animaux traités ou non avec l'extrait brut des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> . -----	99
III.1.5.3. Effet de l'extrait brut des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> sur l'activité des protéines et des transaminases sériques -----	100
III.2. DISCUSSION -----	101
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> -----	<b>109</b>
<b>CONCLUSION</b> -----	<b>110</b>
<b>PERSPECTIVES</b> -----	<b>112</b>
<b>REFERENCES</b> -----	<b>113</b>
<b>ANNEXES</b> -----	<b>131</b>
<b>PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE</b> -----	<b>161</b>



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b>	Principaux site d'actions des antibiotiques _____	16
<b>Figure 2:</b>	Schéma représentant les 5 familles de pompe d'efflux chez les procaryotes ainsi que les substrats généralement transportés _____	22
<b>Figure 3:</b>	Image des plantes étudiées _____	39
<b>Figure 4:</b>	Schéma général du travail _____	45
<b>Figure 5:</b>	Protocole d'extraction et d'isolement des composés des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> . _____	50
<b>Figure 6:</b>	Réaction catalysée par l'ALAT et la LDH. _____	61
<b>Figure 7:</b>	Réaction catalysée par l'ASAT et la MDH _____	62
<b>Figure 8:</b>	Structure chimique des composés isolés de <i>Acacia polyacantha</i> . _____	72
<b>Figure 9:</b>	Effet de l'extrait brut des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> sur la cinétique de croissance de <i>Providencia stuartii</i> ATCC29916 _____	91
<b>Figure 10:</b>	Effet du composé <b>8</b> (acide 3-O-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oléanolique) de <i>Acacia polyacantha</i> sur la cinétique de croissance de <i>Providencia stuartii</i> ATCC29916 _____	92
<b>Figure 11:</b>	Effet de l'extrait brut des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> sur la membrane plasmique de <i>Providencia stuartii</i> ATCC29916 _____	94
<b>Figure 12:</b>	Effet du composé <b>8</b> de <i>Acacia polyacantha</i> sur la membrane plasmique de <i>Providencia stuartii</i> ATCC29916 _____	94
<b>Figure 13:</b>	Effet de la polymixine sur la membrane plasmique de <i>Providencia stuartii</i> ATCC29916. _____	95
<b>Figure 14:</b>	Effet de l'extrait brut des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> sur les pompes à protons de <i>Providencia stuartii</i> ATCC29916 _____	96
<b>Figure 15:</b>	Effet du composé <b>8</b> de <i>Acacia polyacantha</i> sur les pompes à protons de <i>Providencia stuartii</i> ATCC29916 _____	97

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I:</b>	Informations sur les plantes étudiées .....	32
<b>Tableau II:</b>	Plantes étudiées et lieux de récolte .....	38
<b>Tableau III:</b>	Caractéristiques des souches bactériennes utilisées.....	42
<b>Tableau IV:</b>	Composition phytochimique des extraits bruts de plantes utilisées.....	67
<b>Tableau V:</b>	Activités antibactériennes des plantes étudiées .....	70
<b>Tableau VI:</b>	Activité antibactérienne en µg/ml des fractions et produits de <i>Acacia polyacantha</i> (APF) sur un panel de bactéries testées.....	74
<b>Tableau VII:</b>	Concentration Minimale Inhibitrice (en µg/ml) de l'extrait brut des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> (APF), fractions actives (APFa et APFd), l'acide 3- <i>O</i> -[β-galactopyranosyl-(1→4)-β- <sub>D</sub> -galactopyranosyl]-oleanolique ( <b>8</b> ) issus de l'extrait brut des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> et le chloramphénicol en présence du PABN contre un panel de bactéries Gram négatif sélectionnées.....	76
<b>Tableau VIII:</b>	Évaluation préliminaire de l'activité modulatrice de la résistance aux antibiotiques des échantillons sélectionnés à des concentrations sub-inhibitrices contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA124 .....	79
<b>Tableau IX:</b>	Activité modulatrice de la résistance aux antibiotiques de l'extrait brut des feuilles de <i>Acacia polyacantha</i> (APF) contre les bactéries Gram négatif multirésistantes .....	84
<b>Tableau X:</b>	Activité modulatrice de la résistance aux antibiotiques de l'acide 3- <i>O</i> - [β- <sub>D</sub> -xylopyranosyl-(1→4)-β- <sub>D</sub> -galactopyranosyl] oleanolique ( <b>7</b> ) contre les bactéries Gram négatif multirésistantes .....	86
<b>Tableau XI:</b>	Activité modulatrice de la résistance aux antibiotiques de l'acide 3- <i>O</i> -[β-galactopyranosyl-(1→4)-β- <sub>D</sub> -galactopyranosyl]-oléanolique ( <b>8</b> ) contre les bactéries Gram-négatif multirésistantes.....	88

<b>Tableau XII:</b>	Evaluation des symptômes physiques de la toxicité pendant les 4 premières heures, 24 h et 14 jours après administration de la dose de l'extrait brut de <i>Acacia polyacantha</i> .....	98
<b>Tableau XIII:</b>	Poids des animaux et gain de poids durant l'expérience .....	99
<b>Tableau XIV:</b>	Effets de l'administration aigue de l'extrait au méthanol de <i>Acacia polyacantha</i> sur le poids relatif des organes des rates .....	99
<b>Tableau XV:</b>	Effets de l'administration aigue de l'extrait au méthanol de <i>Acacia polyacantha</i> sur la concentration sérique en protéines totales et les transaminases sériques (ALAT , ASAT) .....	100

# LISTE DES ANNEXES

<b>Annexe 1:</b>	Structure de la bactérie et de la paroi bactérienne -----	132
<b>Annexe 2:</b>	Résumé des différents mécanismes d'action des antibiotiques -----	134
<b>Annexe 3:</b>	Echelle de toxicité d'une substance chimique en fonction de la DL <sub>50</sub> et de la voie d'administration de Hodge et Stener -----	135
<b>Annexe 4:</b>	Gavage des rates, sacrifice, prélèvement et nettoyage des différents organes ----	136
<b>Annexe 5:</b>	Toxicité aigüe « photos des organes des rates après administration d'extrait brut des feuilles d' <i>Acacia polyacantha</i> »-----	138
<b>Annexe 6:</b>	Quelques solutions-----	140
<b>Annexe 7:</b>	Composition des milieux de culture et de l'aliment des rats -----	141
<b>Annexe 8:</b>	Equipements -----	143
<b>Annexe 9:</b>	Photos des plaques lors des tests antibactériens et des associations-----	144
<b>Annexe 10:</b>	Structures des antibiotiques -----	144
<b>Annexe 11:</b>	Structures des métabolites secondaires -----	147
<b>Annexe 12:</b>	RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C et déplacements chimiques majeurs des composés étudiés -----	148

# LISTE DES ABREVIATIONS, ACRONYMES ET SIGLES

ABC : *ATP Binding Cassette*

AcOEt : Acetate d'éthyl

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

ARN : Acide Ribo-Nucléique

ARNt : Acide Ribo-Nucléique de transfert

ATCC : *American Type Culture Collection*

APE : Ecorce d'*Acacia polyacantha*

APF : Feuille d'*Acacia polyacantha*

*A. polyacantha* : *Acacia polyacantha*

*A. cordifolia* : *Alchornea cordifolia*

APFa-d : Fractions de l'extrait des feuilles d'*Acacia polyacantha*

ATP : Adénosine Triphosphate

BLSE : Béta-Lactamases à Spectre Elargie

*Bs* : *Bacillus subtilis*

*Ca* : *Candida albicans*

*Ce* : *Caenorhabditis elegans*

*C. freudii* : *Candida freudii*

*C. frutescens* : *Capsicum frutescens*

CC : Chromatographie sur Colonne

CIP : Ciprofloxacine

CHCl<sub>3</sub> : Chloroforme

CHL : Chloramphenicol

CLX : Cloxacilline

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CDC : *Center for Disease Control*

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO : Diméthyle Sulfoxyde

DOX : Doxycycline

*E. aerogenes* : *Enterobacter aerogenes*

*E. cloacae* : *Enterobacter cloacae*

*E. coli* : *Escherichia coli*

*E. speciosa* : *Eremomastax speciosa*

FAA : Facteur d'Amélioration de l'Activité

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

*F. tessmannii* : *Fagara tessmannii*

*G. quartinianus* : *Gladiolus quartinianus*

HNC : Herbar National du Cameroun

*H. pylori* : *Helicobacter pylori*

*K. pneumoniae* : *Klebsiella pneumoniae*

INT : p-iodonitrotétrazolium

INSPQ : Institut National de Santé Publique du Quebec

IPP : Isopentyl diphosphate

*L. aestuans* : *Laportea aestuans*

MATE : *Multidrug And Toxic compound Extrusion*

MDR : *Multidrug Resistance*

MTR : Médecine Traditionnelle

MFP : *Membrane Fusion Protein*

MFS : *Major Facilitator super-family*

MHA : *Mueller Hinton Agar*

MHB : *Mueller Hinton Broth*

OMF : *Outer Membrane Factor*

OMS : Organisation Mondiale de la santé

*O. subscorpioidea* : *Otax subscorpioidea*

PAB : Para-Amino-Benzène

PAβN : Phénylalanine Arginine-β- Naphtylamide

P.f : Point de fusion

PLP : Protéines Liant la Pénicilline

*P. stuartii* : *Providencia stuartii*

*P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*

*P. purpureum* : *Pennisetum purpureum*

PSB : Pourcentage de Souche Bactérienne

*Pv* : *Proteus vulgaris*

RND : *Resistance Nodulation cell Division*

*Sa* : *Staphylocoque aureus*

*St* : *Salmonella typhi*

*Se* : *Salmonella enterica*

*S. flexneri* : *Salmonella flexneri*

*S. nigrum* : *Solanum nigrum*

*S. paratyphi* : *Salmonella paratyphi*

*S. enteritidis* : *Salmonella enteritidis*

*S. assacharolyticus* : *Staphylococcus assacharolyticus*

*S. campanulata* : *Spathodea campanulata*

SMR : *Small Multidrug Resistance*

SFR/Cam : Société des réserves forestières du Cameroun

UFC : Unité Formantrice de Colonies

UMVF : Université Médicale Virtuelle Francophone

*V. amydalina* : *Vernonia amygdalina*

WHO : World Health Organisation

1 : Stigmasterol

2 :  $\beta$ -amyrine

3 : Stigmasterol-3-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl

4 : 3-*O*-methyl- $\beta$ -D-chiro-inositol

5 : Epicatechine

6 : Quercetin-3-*O*-glucoside

7 : Acide 3-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolique

8 : Acide 3-*O*-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolique



## RESUME

Les infections bactériennes, particulièrement celles causées par les bactéries Gram négatif multirésistantes sont un véritable problème de santé publique à travers le monde. Face à ce fléau, les substances naturelles issues des plantes médicinales pourraient constituer une alternative aux antibiotiques, ceci au regard de la riche biodiversité du monde végétal. La présente étude a pour but d'évaluer l'activité antibactérienne de six plantes médicinales du Cameroun (*Acacia polyacantha*, *Alchornea cordifolia*, *Eremomastax speciosa*, *Laportea aestuans*, *Pennisetum purpureum* et *Spathodea campanulata*), vis-à-vis des bactéries Gram négatif multirésistantes ainsi que l'identification des principes actifs de *Acacia polyacantha* (Euphorbiaceae) et leur mode d'action.

Les extraits bruts des plantes ont été obtenus par macération au méthanol. Les méthodes phytochimiques standards nous ont permis de déterminer les principaux groupes de métabolites secondaires présents dans les extraits de plante. La méthode de microdilution en milieu liquide nous a permis de déterminer les paramètres d'inhibition notamment les concentrations minimale inhibitrice (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) sur 15 souches bactériennes Gram négatif à savoir : *Escherichia coli* (ATCC8739 ; AG102 ; AG100A<sub>Tet</sub> ; ATCC10536), *Providencia stuartii* (ATCC29916 ; NEA16), *Pseudomonas aeruginosa* (PA01 ; PA124), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC11296 ; KP55 ; KP63) et *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048 ; EA-CM64 ; EA27 ; EA289). A l'issue du criblage antibactérien, l'extrait brut des feuilles de *Acacia polyacantha* ayant montré les meilleures activités antibactériennes sur les souches problématiques à été soumis à une succession de chromatographie sur colonne de gel de silice. En outre, l'effet du constituant le plus actif (l'acide 3-O-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolique: composé **8**) a été évalué sur la membrane plasmique, les pompes ATPases et la cinétique de croissance bactérienne sur la souche *P. stuartii* ATCC 29916. L'activité *in vitro* en présence et en absence d'inhibiteur des pompes à efflux, la Phénylalanine Arginine- $\beta$ -Naphtylamide (PA $\beta$ N) a été déterminée. La toxicité aigüe par voie orale a été évaluée suivant la méthode d'essai limite décrite par l'OCDE code 425.

L'analyse phytochimique a montré la présence des polyphénols, des tanins, des triterpènes et des stérols dans tous les extraits étudiés. La purification bioguidée des feuilles de *A. polyacantha* a permis d'isoler le stigmastérol (**1**), la  $\beta$ -amyrine (**2**), le 3-O- $\beta$ -D-

glucopyranosylstigmastérol (**3**), le 3-*O* méthyl- $\beta$ -D-chiro-inositol (**4**), l'épicatéchine (**5**), la quercétine-3-*O*-glucoside (**6**), l'acide 3-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oléanolique (**7**) et l'acide 3-*O*-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oléanolique (**8**). Les extraits bruts de plantes testés individuellement avaient un large spectre d'activité antibactérienne sur l'ensemble des souches étudiées. Les meilleures activités antibactériennes (CMI variant entre 64 et 1024  $\mu$ g/ml) ont été obtenues avec : l'extrait des feuilles (73,3%) de *A. polyacantha* ; les extraits des feuilles (93,3%), des écorces (86,7%) et des racines (80%) de *Alchornea cordifolia* ainsi que les extraits de *Laportea aestuans* (86,7%) et de *Pennisetum purpureum* (66,7%). La plus faible valeur de CMI (8  $\mu$ g/ml) a été obtenue avec les extraits des feuilles et écorces de *A. Polyacantha* contre *E. aerogene* ATCC13048 et *P. Stuartii* ATCC29916. Les fractions de *A. polyacantha* (APFb et APFd) étaient actives sur 88,9% des espèces bactériennes testées. Le composé **8** a inhibé la croissance de 88,9% des bactéries testées. Le PA $\beta$ N a fortement amélioré l'activité de l'extrait des feuilles de *A. polyacantha* (APF), des fractions (APFb, APFd) et du composé **8** sur toutes les bactéries testées. Des effets synergiques ont été obtenus lorsque l'extrait des feuilles de *A. polyacantha* de même que les composés **7** et **8** ont été combinés avec l'érythromycine (ERY), la gentamycine (GEN), la ciprofloxacine (CIP) et la norfloxacine (NOR). L'extrait des feuilles de *A. polyacantha* et le composé **8** agissent sur la cinétique bactérienne de *P. stuartii* au niveau de la phase de latence. Ces derniers bloquent les pompes à protons de cette bactérie et détruisent la membrane plasmique. La LD<sub>50</sub> de l'extrait des feuilles de *A. polyacantha* est supérieure à 5000 mg/kg.

La présente étude fournit des informations approfondies dans l'utilisation possible des plantes étudiées, en particulier *A. polyacantha* et ses composés pour lutter contre les infections dues aux bactéries Gram négatif multirésistantes.

**Mots clés :** Plantes médicinales, *Acacia polyacantha*, composés phytochimiques, activité antibactérienne, multirésistance bactérienne, mécanisme d'action, bactéries Gram négative.

## ABSTRACT

Bacterial infections, especially those caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria are a real public health problem around the world. Faced with this scourge, natural substances derived from medicinal plants could constitute an alternative to antibiotics, given the rich biodiversity of the plant world. The purpose of the present study is to evaluate the antibacterial activity of six medicinal plants from Cameroon (*Acacia polyacantha*, *Alchornea cordifolia*, *Eremomastax speciosa*, *Laportea aestuans*, *Pennisetum purpureum* and *Spathodea campanulata*), against multi-resistant Gram-negative bacteria as well as the identification of the active ingredients of *Acacia polyacantha* (Euphorbiaceae) and their mode of action.

The crude extracts of the plants were obtained by maceration in methanol. Standard phytochemical methods enabled us to determine the main groups of secondary metabolites present in plant extracts. The microdilution method in liquid medium allowed us to determine the inhibition parameters including minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (CMB) on 15 Gram negative bacterial strains namely: *Escherichia coli* (ATCC8739; AG102; AG100ATet ; ATCC10536), *Providencia stuartii* (ATCC29916; NEA16), *Pseudomonas aeruginosa* (PA01; PA124), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC11296; KP55; KP63) and *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048; EA-CM64; EA27; EA289). At the end of antibacterial screening, the crude extract of *Acacia polyacantha* leaves which showed the best antibacterial activities on the strains was subjected to column chromatography. In addition, the effect of the most active constituent (3-*O*-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolic acid: compound **8**) was evaluated on the plasma membrane, ATPase pumps and bacterial growth kinetics on the *P. stuartii* ATCC29916 strain (because the crude extract of the leaves of *A. polyacantha* and its most active constituent simultaneously showed good antibacterial activity). The in vitro activity in the presence and absence of an efflux pump inhibitor, Phenylalanine Arginine- $\beta$ -Naphthylamide (PA $\beta$ N) was determined. Acute oral toxicity was assessed according to the limit test method described by OECD code 425.

Phytochemical analysis showed the presence of polyphenols, tannins, triterpenes and sterols in all the extracts studied. The bioguided purification of the leaves of *A. polyacantha* made it possible to isolate stigmasterol (**1**),  $\beta$ -amyrin (**2**), 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylstigmasterol (**3**), 3-*O* methyl-D-chiro-inositol (**4**), epicatechin (**5**), quercetin-3-

*O*-glucoside (**6**), 3-*O*- [ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl] oleanolic acid (**7**) and 3-*O*-[ $\beta$ -galactopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl] oleanolic acid (**8**). The crude plant extracts tested individually had a broad spectrum of antibacterial activity on all the strains studied. The best antibacterial activities (MIC varying between 64 and 1024  $\mu$ g/ml) were obtained with: the extract of the leaves (73.3%) of *A. polyacantha*; extracts of the leaves (93.3%), bark (86.7%) and roots (80%) of *Alchornea cordifolia* as well as extracts of *Laportea aestuans* (86.7%) and of *Pennisetum purpureum* (66.7 %). The lowest MIC value (8  $\mu$ g/ml) was obtained with extracts of the leaves and bark of *A. Polyacantha* against *E. aerogene* ATCC13048 and *P. Stuartii* ATCC29916. The fractions of *A. polyacantha* (APFb and APFd) were active on 88.9% of the bacterial species tested. Compound **8** inhibited the growth of 88.9% of the bacteria tested. PA $\beta$ N markedly enhanced the activity of *A. polyacantha* leaf extract (APF), fractions (APFb, APFd) and compound **8** on all bacteria tested. Synergistic effects were obtained when the leaf extract of *A. polyacantha* and compounds **7** and **8** were combined with erythromycin (ERY), gentamycin (GEN), ciprofloxacin (CIP) and norfloxacin (NOR). The extract of the leaves of *A. polyacantha* and compound **8** act on the bacterial kinetics of *P. stuartii* in the latency phase. These block the bacteria's proton pumps and destroy the plasma membrane. The LD50 of *A. polyacantha* leaf extract is greater than 5000 mg/kg.

The present study provides in-depth information on the possible use of the plants studied, in particular *A. polyacantha* and its compounds to fight infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria.

**Key words:** Medicinal plants, *Acacia polyacantha*, phytochemicals, antibacterial activity, multidrug resistance, action mechanism.

# INTRODUCTION

Les maladies infectieuses sont les maladies causées par les microorganismes pathogènes tels que les virus, les champignons, les parasites et les bactéries. Elles sont responsables de 17 millions de décès par an, sur un total de 62 millions de cas observés (Biomereux, 2017). Soixante-dix pourcent de ces décès sont imputés aux infections bactériennes, hissant ces dernières au rang de l'un des problèmes majeurs de santé publique. Les pneumocoques, les salmonelloses et les campylobactérioses sont responsables respectivement de 900, 1500 et 7500 cas d'hospitalisation dans le monde (OFSP, 2020). Dans les pays en développement La situation est plus alarmante avec 45% de décès (OMS, 2017).

L'automédication et l'utilisation anarchique des antibiotiques en thérapie anti-infectieuse ont conduit à l'antibiorésistance qui est source de dissémination accrue des bactéries multirésistantes. Ces bactéries causent plusieurs types d'infections notamment les infections urinaires, les pneumonies, les gastroentériques, les infections des plaies, les méningites qui sont à l'origine de la plus part des cas d'hospitalisation dans le monde. Ces infections sont responsables de plus de 700.000 décès chaque année à travers le monde soit 33 000 en Europe et pourrait faire 10 millions de morts supplémentaires par an d'ici 2050 (Ducruet, 2017 ; Inserm, 2016). La situation est très inquiétante dans les pays tropicaux. Au Cameroun, des études ont montré une nette augmentation du taux de résistance des souches d'entérobactéries, face aux antibiotiques appartenant à la famille des bêta-lactamines dans les villes de Yaoundé et Ngaoundéré (Lonchel *et al.*, 2012; Gangoué *et al.*, 2005). De plus depuis 2005, on observe une augmentation du taux de résistance des souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* face aux antibiotiques les plus utilisés à l'hôpital générale de Douala (Cécile *et al.*, 2015). En outre, Marbou et Kuete ont mis en exergues l'émergence des souches de *Staphylococcus aureus* chez les patients atteints des maladies métaboliques dans la ville de Mbouda (Marbou et Kuete, 2020).

Ces bactéries appartiennent pour la plus part au groupe des bactéries Gram négatif. La contamination se fait généralement en milieu hospitalier et ces infections sont connues sous le nom d'infection nosocomiale (OMS, 2011; Song, 2008 ; Kamicker *et al.*, 2007). Afin de résister à l'action toxique des antibiotiques, les bactéries ont développé plusieurs mécanismes de résistances à savoir : l'imperméabilité membranaire, la modification de la cible, la production d'enzymes inactivant les antibiotiques et l'efflux actif (OMS, 2015, OMS, 2014).

Le mécanisme d'efflux est utilisé par plus de quinze espèces de bactéries Gram négatif pathogènes *via* la pompe du type <*Resistance Nodulation cell Division*> (RND) (Kamicker *et al.*, 2007). Ce type de résistance affecte simultanément plusieurs classes d'antibiotiques et conduit à des résistances à haut niveau lors de son expression simultanée avec les autres mécanismes de résistances. Si des mesures d'urgence ne sont pas prises, nous entrerons bientôt dans une ère post-antibiotique dans laquelle les infections courantes et de petites blessures seront à nouveau mortelles (OMS, 2017).

Pour lutter contre le phénomène de résistance, les chercheurs de l'Institut national de santé et recherche médical (Inserm), ont mis sur le marché depuis 2016, deux nouvelles molécules à savoir le Ceftolozane et le Tazobactam. Ces molécules sont des Céphalosporines associés à un inhibiteur des bêta-lactamases. Elles inhibent la croissance des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi en inactivant les bêta-lactamases produites par ces derniers (Inserm, 2016). Cependant, les inconvénients de ces molécules sont : leur spectre d'action réduit aux entérobactéries productrices de bêta-lactamases, leur coût très élevé et leur inaccessibilité pour les populations des pays pauvres. Il apparaît donc nécessaire de rechercher en permanence de nouvelles molécules à large spectre et accessible à tous.

L'OMS à travers son partenariat mondial pour la recherche-développement, encourage la mise sur le marché de nouveaux médicaments (OMS, 2017). Les plantes médicinales sont une grande source de molécules potentiellement actives largement inexploitées. Elles constituent une alternative pour cette recherche dans la mesure où, celles-ci regorgent des composés bioactifs doués de propriétés antibactériennes et potentialisatrices. On estime à 80% la population africaine qui utilise les plantes pour résoudre leurs problèmes de santé primaire (OMS, 2000). De plus, 30% des médicaments vendus dans le monde contiennent des substances qui dérivent des plantes médicinales (FAO 2004).

Au cours de ces dernières années, les études se sont intensifiées dans la recherche de composés phytochimiques provenant des plantes Africaines. Plusieurs Composés bioactifs ont été isolés de ces plantes et ont montré une activité antibactérienne et potentialisatrice des antibiotiques considérables contre les bactéries Gram négatifs multirésistantes (Kuate *et al.*, 2010 ; Kuate *et al.*, 2011; Noumedem *et al.*, 2013 ; Fankam *et al.*, 2014 ; Touani *et al.*, 2014 ; Tankeo *et al.*, 2015 ). Il est important d'améliorer notre bibliothèque de substances naturelles au potentiel antibactérien prometteur, afin d'avoir plus de chance à l'avenir de mettre au point un ou plusieurs médicaments antibactériens. Les plantes médicinales sélectionnées dans ce travail notamment : *A. polyacantha*, *A. cordifolia*, *E. speciosa*, *L. aestuans*, *P. purpureum* et *S.*

*campanulata* sont des plantes de pharmacopée camerounaise utilisées pour soigner les maladies infectieuses (infections bactériennes, parasitaires, fongiques) (Njoku *et al.*, 2004 ; Oben *et al.*, 2006 ; Essiet *et al.*, 2011 ; Zahid *et al.*, 2011 ; Adeney *et al.*, 2014 ; Koudoro *et al.*, 2015). Quelques études *in vitro* sur l'activité antibactériennes de ces plantes vis-à-vis des souches sensibles ont été rapportés (Okeke *et al.*, 1999 ; Adeleye *et al.*, 2008 ; Oloyede *et al.*, 2014). Cependant aucun travail dans la revue de littérature ne présente les activités des extraits au méthanol de ces plantes ainsi que leurs produits dérivés sur les bactéries Gram négatifs multirésistantes. De même que l'étude de leurs toxicité aigüe, d'où la raison d'être de cette étude. Au vue de tout ceci, nous nous sommes posés la question à savoir dans quelles mesures les propriétés biologiques et chimiques de ces plantes peuvent être exploités pour lutter contre les maladies dues aux bactéries Gram négatif multirésistantes ? C'est dans l'optique de répondre à cette question que nous avons émis les hypothèses selon lesquelles les plantes sélectionnées dans ce travail possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries Gram négatif multirésistantes. Elles inhibent la croissance des bactéries gram négatifs mutirésistantes en désintégrant la membrane plasmique, en bloquant les pompes à efflux et les pompes à protons. Ces dernières sont sans dangers pour la santé humaine.

C'est dans l'optique de rechercher de nouvelles substances antibactériennes pouvant permettre de lutter contre les maladies infectieuses dues aux bactéries Gram négative multirésistantes et de valoriser la pharmacopée camerounaise, que nous avons entrepris dans ce travail comme objectif général « d'Identifier les substances antibactériennes intéressantes à partir des plantes médicinales du Cameroun, pouvant permettre de lutter contre les bactéries Gram négatifs multirésistantes ». D'une manière spécifique, il était question pour nous :

- ❖ De sélectionner sur la base d'un criblage antibactérien, un extrait de plante médicinale ayant la meilleure activité antibactérienne pour une étude plus approfondie ;
- ❖ D'isoler par fractionnement bioguidé les potentiels principes actifs de l'extrait méthanolique sélectionné ;
- ❖ D'élucider quelques mécanismes d'action de l'extrait méthanolique et des constituants les plus actifs de la plante sélectionnée ;
- ❖ D'évaluer la toxicité aigüe de l'extrait méthanolique de la plante sélectionnée.

# **CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE**



## **I.1. Généralités sur les maladies infectieuses et les infections bactériennes**

Les maladies infectieuses sont des dysfonctionnements physiologiques causées par des microorganismes pathogènes tels que les bactéries, les virus, les parasites ou les champignons. Ces maladies peuvent se transmettre directement ou indirectement d'une personne à l'autre. Elles peuvent être d'origine endogène (microorganismes opportunistes) ou exogène. D'après l'étude de la charge des maladies dans le monde entier (*Global burden of disease study GBD 2010*), elles sont responsables de 17 millions sur 58,8 millions de décès sur notre planète (Lozano *et al.*, 2013). La situation est très alarmante dans les pays en développement avec 45% de décès (Lozano *et al.*, 2013; WHO, 2009). Les infections les plus répandues sont : les infections respiratoires et le sida qui sont responsables de 3 millions de décès dans le monde ; les maladies diarrhéiques, la tuberculose, le paludisme et la rougeole tuent respectivement 2,5 millions, 2 million, 1 millions et 900 000 personnes (Epillytrop, 2016; OMS, 2009 ; OMS, 2006). Dans les pays en développement, les infections d'origine bactérienne représentent 90% de ces décès (OMS, 2006). En effet, sur les 1407 microorganismes pathogènes pour l'homme, les bactéries représentent le plus grand nombre avec 538 espèces (woolhouse et gowtage-sequeria, 2005). En 2010, le tiers des décès enregistrés était dû à 20 espèces de microorganismes pathogènes principalement les bactéries et les virus (Dye, 2014). Cette situation devient de plus en plus compliquée avec l'émergence et la réémergence des souches multirésistantes qui entravent la maîtrise des infections, augmentant ainsi le taux de mortalité.

## **I.2. Anatomie fonctionnelle des bactéries**

Les bactéries sont des êtres vivants ubiquitaires microscopiques (1 à 10  $\mu\text{m}$ ), unicellulaires procaryotes, possédant un noyau diffus et se reproduisant par scissiparité. Ces derniers possèdent 70% d'eau. Rapporté au poids sec, une bactérie est constituée de : protéines (55%), lipides (10%), lipopolysaccharides (3%), peptidoglycane (3%), ribosomes (40%), d'ARN (20%) et d'ADN (3%) (UMVF, 2014). Les différentes parties d'une bactérie sont regroupées en éléments constants et inconstants. Bien que certaines bactéries soient importantes pour l'homme, on dénombre aujourd'hui environ 7300 espèces dont 538 pathogènes responsables de plusieurs maladies (woolhouse et gowtage-sequeria, 2005). Elles peuvent entraîner des troubles respiratoires ou intestinaux et sont également responsables de l'infection des blessures. Les maladies bactériennes les plus mortelles sont les infections respiratoires (OMS, 2006 ; Epillytrop, 2016).

## **I.2.1. Eléments constants**

### **I.2.1.1. Paroi**

La paroi est une enveloppe rigide qui assure l'intégrité de la bactérie et est responsable de la forme de cette dernière. Elle permet à la bactérie de résister à la pression osmotique (5-20 atmosphère). La paroi bactérienne est principalement constituée de peptidoglycane qui est un hétéropolymère composé de chaînes glucidiques reliées les unes aux autres par des chaînons pentapeptidique. Cette macromolécule réticulée tridimensionnelle est constituée de 03 éléments à savoir : une épine dorsale alternant des chaînons N-acétyl glucosamine-acide N-acétyl muramique ; des chaînes latérales peptidiques formées au minimum de quatre aminoacides (L-alanine-D-glycine-L-lysine-D-alanine) toujours fixées sur l'acide muramique et des ponts inter-peptidiques (UMVF, 2014).

La biosynthèse du peptidoglycane s'effectue par sous-unités dans le cytoplasme jusqu'à l'assemblage du disaccharide-pentapeptide (N-acétyl glucosamine-acide N-acétyl muramique-L-alanine-D- glycine- L- lysine-D-alanine-D-alanine). Ce dernier traverse la membrane cytoplasmique fixé sur un transporteur phospholipidique puis est attaché à la chaîne glucidique de la paroi pré-existante. Certaines étapes de la biosynthèse du peptidoglycane peuvent être entravées par les antibiotiques telles que les  $\beta$ -lactamines et les glycopeptides (UMVF, 2014 ; Hugo et Russel, 1998). La composition de la paroi bactérienne diffère selon le groupe de bactérie. La coloration Gram a permis d'identifier 02 groupes à savoir les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif.

Chez les bactéries Gram positif, la paroi est essentiellement constituée de peptidoglycane (90%). On y rencontre les acides teichoïques (polymères de glycérol et de ribitol reliés à des groupes phosphates), les acides lipoteichoïques qui s'enchâssent dans la membrane cytoplasmique et peu ou pas de protéines (UMVF, 2014).

Chez les bactéries Gram négatif, la paroi est beaucoup plus complexe. Le peptidoglycane est une couche mince peu dense (< 15%) du poids sec). L'autre constituant essentiel est le lipide complexe (lipide A) couplé à la glucosamine et à des résidus de phosphore. Sur les résidus de glucosamine, des polysaccharides complexes sont fixés et forment la partie la plus externe de la paroi. Ils sont essentiels pour la physiologie bactérienne dans les processus de pénétration de nutriments ou de toxiques. Ils comportent des sucres originaux appelés antigènes O. La paroi des bactéries Gram négatif possède également des

phospholipides. Les protéines enchâssées assurent la cohésion de la membrane, une liaison avec le peptidoglycane et les fonctions diverses de perméabilités sélectives ou non. Ces porines, seules structures de transport des composés hydrophiles, sont essentielles à la vie de la bactérie mais aussi à l'action de certains antibiotiques. D'autres protéines servent à la captation d'ions (fer) et de vitamines (facteurs de croissance). La membrane externe a de nombreux sites de contact avec la membrane interne. Elle empêche ou diminue l'entrée des sels et des antibiotiques ce qui confère aux bactéries Gram négatif une résistance naturelle à plusieurs familles d'antibiotiques. La lipoprotéine de Braun est la protéine la plus abondante et est fortement liée au peptidoglycane. Le LPS est constitué du lipide A, du polysaccharide central et de la chaîne latérale O. les chaînes latérales O peuvent changer rapidement pour échapper à la détection (UMVF, 2014). Les bactéries Gram négatif sont fréquemment rencontrées en clinique comme agents pathogènes dans de nombreuses infections (INSPQ, 2015).

### **I.2.1.2. Membrane cytoplasmique**

La membrane plasmique est une membrane trilamellaire dépourvue de stérol et formée d'une double couche de phospholipides dont les pôles hydrophobes sont face à face, associés à des protéines. Elle possède plusieurs protéines jouant des rôles variés. Certaines sont des perméases responsables des échanges ; d'autres jouent un rôle dans la synthèse du peptidoglycane et sont des protéines de liaison aux pénicillines (PLP) ; d'autres protéines sont des enzymes respiratoires ou impliquées dans la production d'énergie (ATPase) (Hugo et Russel, 1998). La membrane plasmique a un rôle métabolique majeur dans la cellule bactérienne (UMVF, 2014). On y trouve la plupart des activités associées aux mitochondries dans la cellule supérieure. On peut citer entre autre : la perméabilité sélective ainsi que le transport des substances solubles vers l'intérieur de la bactérie ; la fonction respiratoire par la chaîne de transport d'électrons (phosphorylation oxydative) pour les bactéries aérobies et l'excrétion des enzymes hydrolytiques (Hugo et Russel, 1998).

### **I.2.1.3. Cytoplasme**

On y rencontre :

- Le nucléoïde ou l'appareil nucléaire qui contient le chromosome bactérien. C'est un fragment d'ADN bicaténaire circulaire constitué uniquement de séquences codantes (Hugo et Russel, 1998) ;

- Le plasmide. C'est un ADN bicaténaire circulaire avec une réplication indépendante de celle du chromosome. Il possède des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques (Marty, 2001) ; de caractère de fertilité (facteur F). Le plasmide peut donner un caractère sélectif à la bactérie ;

- Les éléments transposables. Ce sont des fragments d'ADN qui se déplacent dans le génome de la bactérie par transposition d'où le nom transposom. Ces derniers sont incapables de se répliquer (UMVF, 2014) ;

- Les ribosomes. Ils sont constitués d'ARN et de protéines. Les ribosomes bactériens comprennent deux sous-unités (30S, 50S). Fonctionnellement, il y'a deux sites essentiels pour la synthèse des protéines : le site aminoacyl qui accueille l'acyl-tARN et le site peptidyl qui accueille la chaîne d'acides aminés en cours de constitution. Ils sont particulièrement présents à proximité de la membrane cytoplasmique, site de synthèse de la paroi et des protéines exportées (UMVF, 2014).

## **I.2.2. Eléments inconstants**

### **I.2.2.1. Capsule**

La capsule est le constituant le plus superficiel et inconstant de la bactérie. Constituée de polysaccharides acides, ce composant est lié à certains pouvoirs pathogènes, car empêche la phagocytose. Elle peut se trouver à l'état soluble dans les liquides de l'organisme (UMVF, 2014 ; Gillepsie et Banford, 2012).

### **I.2.2.2. Glycocalyx**

Ils sont des polymères polysaccharidiques extrêmement fréquents entourant la bactérie. Ce dernier est difficile à visualiser, sauf au microscope électronique. Le feutrage des fibres de glycocalyx est constant dans le cas des bactéries vivant en biofilm dans les conditions naturelles. Il est responsable de l'attachement des bactéries aux cellules (cellules buccales, respiratoires), à des supports inertes (biofilms sur des cathéters, plaque dentaire sur l'émail). Il protège les bactéries du biofilm de la dessiccation, sert à concentrer ou à modifier les éléments nutritifs exogènes et les rend résistantes à diverses substances (antibiotiques, antiseptiques et désinfectants) (UMVF, 2014 ; Gillepsie et Banford, 2012).

### **I.2.2.3. Flagelles**

Ils assurent la locomotion de la bactérie et sont de nature protéique. Ces derniers sont ancrés dans le cytoplasme par une structure complexe. Ils possèdent plusieurs antigènes utilisés pour différencier les espèces bactériennes (UMVF, 2014).

### **I.2.2.4. Pilis (fimbriae)**

Les pilis sont responsables de l'adhésion à certaines muqueuses, de leur attachement lors de la conjugaison et sont des récepteurs des bactériophages (Marty, 2001). Ils sont plus fins que les flagelles. Ces derniers sont issus de la polymérisation d'une sous-unité polypeptidique (piline) assemblée à des polypeptides mineurs comme l'adhésine (UMVF, 2014). Ils sont subdivisés en :

- les pilis communs qui attachent spécifiquement les bactéries à la surface des cellules eucaryotes (phase essentielle dans certains pouvoirs pathogènes). C'est le cas d'*Escherichia coli* au cours de certaines infections urinaires et *vibrio cholerae* sur les entérocytes (UMVF, 2014 ; Murray *et al.*, 2013).

- les pilis sexuels qui sont plus longs et codés par les plasmides (facteur F). Ils jouent un rôle dans l'attachement des bactéries entre elles (conjugaison) et sont des récepteurs de virus bactériens (bactériophage). Chez les bactéries Gram négatif, certaines protéines de surface associées aux fimbriae jouent un rôle dans l'adhérence bactérienne. C'est le cas de la protéine M de *Staphylocoque pyogène* et la protéine A de *Staphylocoque aureus* (UMVF, 2014 ; Murray *et al.*, 2013). La structure de la paroi bactérienne et la bactérie sont représentées à l'annexe.

## **I.3. Généralités sur les souches bactériennes utilisées**

### **I.3.1. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* est une bactérie Gram négatif saprophyte non encapsulée, mobile par ciliature péritriche qui dans certaines conditions peut devenir virulente. Elle peut causer des infections graves notamment : urinaires (80%), les gastroentériques qui sont responsables de près de 775 000 décès annuels dans les pays du tiers monde. Cette alarme devient de plus en plus inquiétante car dans les milieux hospitaliers, on note l'émergence des souches multirésistantes. Depuis une vingtaine d'années on assiste à une augmentation de souches

productrices de céphalosporinases conduisant à une diminution de la sensibilité aux céphalosporines de première génération et aux amino pénicillines. On estime à 0,5 % des souches produisant des bêtalactamases à spectre élargi à toutes les bêtalactamines à l'exception de céphamycines et imipénème (Wladimir et David, 2003).

### **I.3.2. *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* est un saprophyte du tube digestif et des voies aériennes supérieures qui peut être également rencontré dans la nature. C'est un bacille immobile souvent encapsulé qui fermente la plupart des hydrates de carbone avec production abondante de gaz (Wladimir et David, 2003). Ce germe constitue un défi permanent pour les cliniciens hospitaliers car il est responsable de nombreuses infections nosocomiales et est d'autant plus dangereux qu'il est multirésistant (résistance plasmidique) (Wladimir et David, 2003). *K. pneumoniae* représente 83% des souches productrices de bêtalactamases à spectre élargi.

### **I.3.3. *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie Gram négatif aérobie stricte vivant à l'état saprophyte dans l'eau, les sols humides et les végétaux. Elle peut aussi vivre en commensale sur la peau ou à l'intérieur du système digestif de divers animaux (Sabin, 2006). Elle utilise l'alcool et les protéines comme sources de carbone et sa température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C (Potvin, 2007). Lors de sa croissance, elle sécrète de nombreux pigments à l'instar de la pyocyanine (bleu-vert), la fluorescéine (jaune vert fluorescent), la pyorubine (brun-rouge) (Khalilzadeh, 2009). Cette dernière présente un niveau de résistance très élevée à plusieurs classes d'antibiotiques principalement aux Bêta-lactamines à travers divers mécanismes de résistance, notamment l'imperméabilité, la sécrétion d'enzyme, l'efflux actif au moyen de sa principale pompe de type MexAB-OPrM (Cattoir, 2004). *P. aeruginosa* est à l'origine de 16 % d'infections pulmonaires, de 12% d'infections du tractus urinaire, de 8% d'infections touchant les grands brûlés et de 10% d'infections du sang (bactériémie et/ou septicémie). Cette bactérie est également une des causes majeures de mortalité et de morbidité chez les personnes atteintes de mucoviscidose (Rossignol, 2007).

### **I.3.4. *Providencia stuartii***

*Providencia stuartii* est une bactérie Gram négatif ubiquitaire du groupe de *Proteus* généralement rencontrée dans le sol et dans l'eau. C'est un pathogène opportuniste responsable des infections nosocomiales qui deviennent de plus en plus graves dues à l'apparition des souches multirésistantes qui compliquent la thérapie. Il est généralement isolé des infections urinaires, respiratoires et de la peau. C'est l'espèce la plus résistante de la famille des Entérobactéries spécialement vis-à-vis de la majorité des classes d'antibiotiques utilisée en thérapie. Ce dernier produit des céphalosporinases chromosomiques Ampe qui lui confèrent une résistance naturelle aux aminopénicillines et aux céphalosporines. Il produit également les bêtalactamases à spectre élargi et les métallos-lactamases. *P. stuartii* est également résistant aux aminosides, aux macrolides par synthèse des acétyl aminotransférases et l'érythromycine esterase respectivement. La mutation du gène *gyrA* conduit à une résistance aux fluoroquinolones (Anne *et al.*, 2010).

### **I.3.5. *Enterobacter aerogenes***

*Enterobacter aerogenes* est une bactérie Gram négatif anaérobie facultative de la famille des Enterobacteriaceae catalase et citrate positif. Cette dernière est à l'origine de 8,6 % de cas d'infections nosocomiales et respiratoires selon le *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) des Etats-Unis (Boyce *et al.*, 2004). Elle peut causer de nombreux types d'infections, y compris les abcès cérébraux, la pneumonie, la méningite, la septicémie, l'infection de plaies, l'infection des voies urinaires et les infections de la cavité abdominale ou des intestins (Farmer *et al.*, 2007 ; Russo *et al.*, 2008). Les souches isolées en clinique appartiennent à un même clone et peuvent déployer plusieurs mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines. Les mécanismes les plus efficaces et les plus fréquents sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) de type TEM-24 et les céphalosporinases chromosomiques. Ces enzymes sont responsables de la résistance des souches à toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipénème. Certaines souches ont la capacité, en plus des mécanismes de résistance précédemment décrits, de développer un phénotype de multirésistance (MDR). Ce phénotype est caractérisé par la surexpression de systèmes d'efflux actifs associés ou non à la perte des porines de la membrane externe. Ces 2 mécanismes sont régulés par des systèmes génétiques communs. L'opéron *marRAB* et le gène *ram* sont actuellement les 2 systèmes qui ont été identifiés chez *E. aerogenes* comme étant impliqués dans la régulation de la MDR. Ainsi

dotée de tels mécanismes, *E. aerogenes* est capable de devenir résistante à l'ensemble des antibiotiques (Davin-Regli *et al.*, 2004).

#### **I.4. Les antibiotiques et leur classification**

Les antibiotiques sont des substances sélectives naturelles, synthétiques ou semi-synthétiques qui ont pour rôle d'empêcher la multiplication des bactéries (bactériostatique), ou d'entraîner leur destruction (bactéricides) ayant un site d'action bien défini et un mécanisme précis (Faure, 2009). Ils agissent à faible dose au niveau d'une ou plusieurs étapes métaboliques indispensables à leur vie. Les antibiotiques possèdent des spectres d'activités variés (large et étroit). Les preuves de l'efficacité des antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses ont été largement établies, depuis l'utilisation historique de la sulfanilamide, puis de la pénicilline chez l'homme au cours de la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle. Ces derniers ont incontestablement réduit la mortalité liée aux maladies infectieuses (Pasteur, 2008). Toutefois, leur utilisation anarchique en thérapie anti-infectieuse et en agriculture a conduit à l'émergence des bactéries multirésistantes, les quelles constituent un problème de santé publique majeur. La fréquence et l'ampleur des infections causées par les microorganismes ont considérablement augmenté ces dernières années en milieu hospitalier et communautaire (OMS, 2011).

##### **I.4.1. Classification et mode d'action des antibiotiques**

Les antibiotiques sont définis par leur spectre d'activité, leur toxicité sélective (mode d'action), leur pharmacocinétique (activité en milieu organique), leur bonne absorption et leur diffusion dans l'organisme. Ils ont la propriété d'interférer directement avec la prolifération des microorganismes à des concentrations tolérées par l'hôte. Ces derniers peuvent aussi être classés selon l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. Ainsi, selon le mode d'action, on peut avoir les antibiotiques qui agissent au niveau de la paroi, de la membrane cytoplasmique, de la synthèse des protéines et des acides nucléiques (Yala *et al.*, 2001 ; Mohammedi, 2010).



### **I.4.1.1. Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane (paroi)**

#### **I.4.1.1.1. $\beta$ lactamines**

Leur structure de base est le noyau  $\beta$  lactame. Cette famille est constituée d'antibiotiques bactéricides. Elles agissent au niveau de la paroi bactérienne en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane, entraînant par conséquent une lyse bactérienne. C'est une grande famille d'antibiotiques composée de 5 groupes majeurs à savoir : les pénames, les pénèmes, les oxapénames, les céphèmes et les monobactames (Yala *et al.*, 2001 ; Mohammedi, 2010).

#### **I.4.1.1.2. Glycopeptides**

Ils sont des antibiotiques à spectre étroit, actifs principalement sur les bactéries Gram positif. Ils agissent au niveau de la paroi bactérienne en bloquant la polymérisation du peptidoglycane par un mécanisme complexe (Decoster, 2004, Mohammedi, 2010).

#### **I.4.1.1.3. Fosfomycines**

Les fosfomycines sont des antibiotiques à large spectre actifs sur les cocci et les bacilles (Gram positif et négatif). Ces derniers agissent sur la paroi bactérienne à un stade précoce lors de sa synthèse (Decoster, 2004, Mohammedi, 2010).

### **I.4.1.2. Antibiotiques actifs sur la membrane plasmique**

On y retrouve les polymixines actives sur les bacilles Gram négatif sauf les *Proteus*, *Providentia*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii* et *Edwardsiella tarda*. Les bactéries Gram positif et les mycobactéries sont naturellement résistantes. Ces antibiotiques possèdent une charge positive et agissent comme des agents tensio-actifs. Les polymixines se fixent sur les phospholipides membranaires entraînant la rupture de la barrière osmotique (Mohammedi, 2010).

### **I.4.1.3. Inhibiteurs de la synthèse des protéines**

#### **I.4.1.3.1. Aminosides**

Les aminosides sont souvent utilisés en association avec d'autres antibiotiques ( $\beta$  lactamines). Ce sont des hétérosides naturels bactéricides formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Ils sont classés par Umezawa en 1979 puis Bryskier en 1995 en fonction de la structure chimique centrale en trois classes : la streptamine, la 2-déoxystreptamine et la streptidine. Ils perturbent la synthèse des protéines au niveau de la sous unité 30S du ribosome entraînant une erreur de lecture du code génétique lors de la traduction des protéines. Ce sont des antibiotiques à large spectre d'activité agissant sur les bactéries Gram négatif aérobies notamment les entérobactéries et sur les bactéries Gram positif (Yala *et al.*, 2001 ; Decoster, 2004 ; Mohammedi, 2010 ).

#### **I.4.1.3.2. Phénicolés**

Ils s'agit de la famille renfermant les chloramphénicols et les thiamphénicols qui sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre englobant les bacilles Gram positif, Gram négatif, les cocci Gram négatif et Gram positif. Ils agissent au niveau de la sous unité 50S du ribosome (inhibition de la polymérase) entraînant l'inhibition de la synthèse des protéines (Yala *et al.*, 2001 ; Mohammedi, 2010).

#### **I.4.1.3.3. Tétracyclines**

Les tétracyclines sont des molécules bactéricides à large spectre possédant une grande homogénéité et à cible intracellulaire. Elles inhibent la synthèse des protéines au niveau de la sous unité 30S du ribosome. Elles bloquent la phase d'élongation de la chaîne polypeptidique et empêchent la fixation de l'aminocyl-ARNt (Yala *et al.*, 2001 ; Mohammedi, 2010). On distingue les tétracyclines naturelles et Les tétracyclines semi-synthétiques.

#### **I.4.1.3.4. Macrolides, Lincosamides et Streptogramines (MLS)**

Les MLS sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines. Ils agissent au niveau de la sous unité 50S du ribosome en inhibant la croissance de la chaîne polypeptidique en formation. Ce sont des antibiotiques bactériostatiques, fréquemment utilisés à spectre étroit, parfaitement actifs sur des germes intracellulaires. Ces derniers possèdent un noyau lactone

central qui est à la base de leur classification selon le nombre d'atomes de carbone (Yala *et al.*, 2001 ; Mohammedi, 2010).

#### **I.4.1.3.5. Acide fusidique**

L'acide fusidique est un antibiotique stéroïdien à spectre limité actif sur les staphylocoques méthycilline résistants. C'est un inhibiteur de la synthèse protéique interférant avec le facteur d'élongation G (EF-G) (Yala *et al.*, 2001 ; Mohammedi, 2010).

#### **I.4.1.3.6. Oxazolidinones**

Ils sont actifs sur les bactéries Gram positif résistantes aux traitements habituels, y compris les multirésistantes. Ils interagissent avec l'unité ribosomale 50S et ont un mécanisme d'action non encore élucidé (Mohammedi, 2010).

#### **I.4.1.4. Inhibiteurs des acides nucléiques**

Les inhibiteurs des acides nucléiques regroupent : les quinolones qui inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe "ADN-ADN gyrase" empêchant par conséquent la réplication et la transcription de l'ADN bactérien. Les rifamycines bloquent la transcription par inhibition de l'ARN polymérase. Les nitrofuranes perturbent la réplication de l'ADN en agissant directement sur l'ADN provoquant diverses lésions (coupures et substitution de bases). Les novobiocines inhibent la réplication de l'ADN (Yala *et al.*, 2001 ; Mohammedi, 2010).

#### **I.4.1.5. Inhibiteurs de la synthèse des folates**

##### **I.4.1.5.1. Les sulfamides**

Les sulfamides sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre ayant pour structure de base le noyau para-aminobenzène sulfonamide avec un radical R déterminant leur pharmacocinétique. Ils sont actifs sur les bactéries Gram négatif mais il existe beaucoup de résistances vis-à-vis de ces antibiotiques. Ils inhibent la synthèse des folates, acides puriques et acides nucléiques en se fixant sur la dihydroptéroate synthétase (DHPS) (Yala *et al.*, 2001 ; Mohammedi, 2010).

### I.4.1.5.2. Diaminoptéridine (triméthoprime)

Il s'agit des antibactériens et antiparasitaires. Ils sont utilisés en association avec les sulfamides. Cette famille inhibe la synthèse des folates, acides puriques et acides nucléiques en se fixant sur la dihydrofolate réductase (Yala *et al.*, 2001 ; Mohammadi, 2010). Le schéma résumant les différents modes d'action des antibiotiques sont résumé dans la figure 1 ci-dessous.

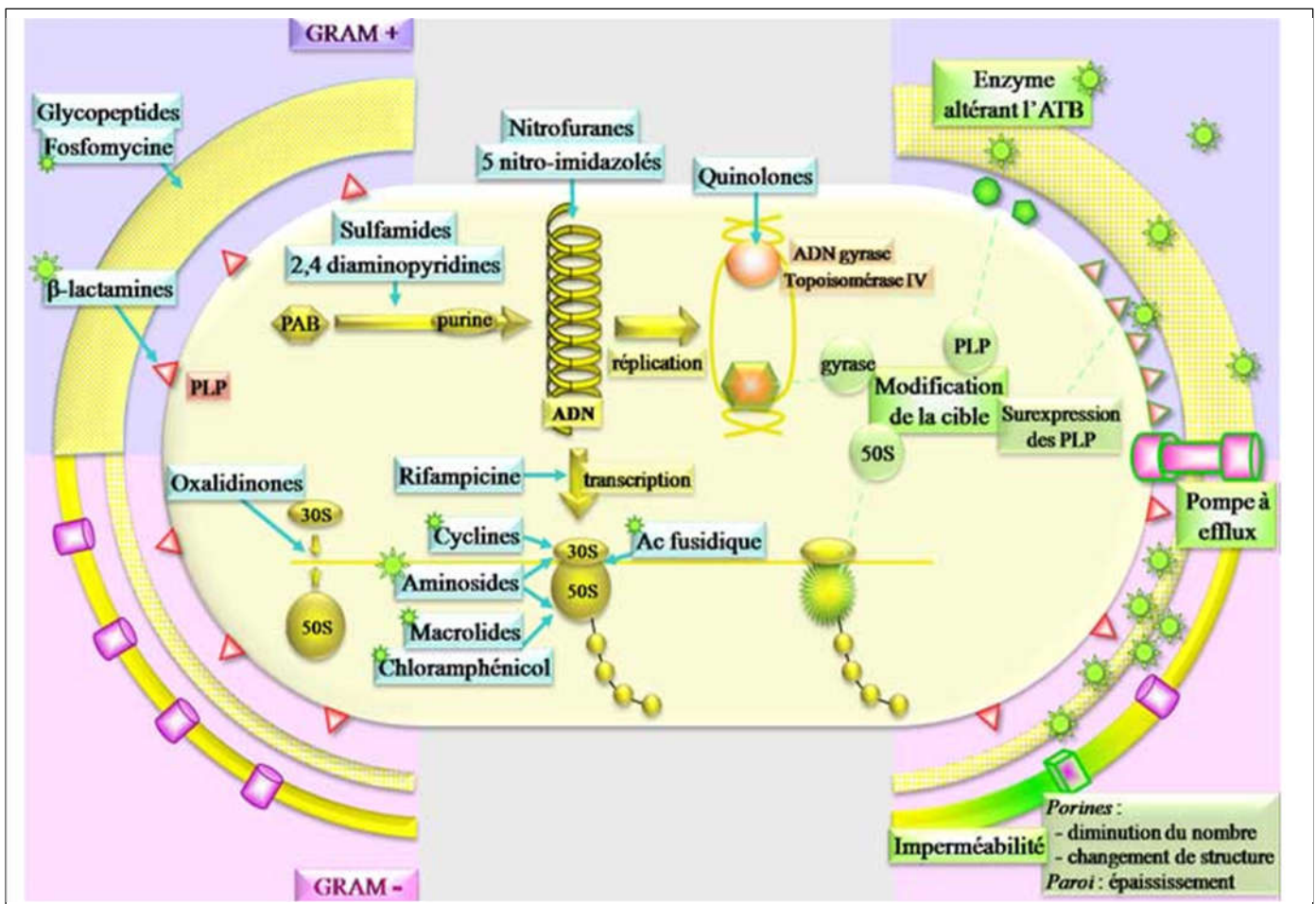


Figure 1: Principaux site d'actions des antibiotiques (Memobio, 2020).

## I.5. Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques est la capacité que possèdent les bactéries à se développer en présence d'une dose élevée de substances toxiques (antibiotique), supérieure à la dose létale. En effet, la découverte de l'antibiothérapie a été rapidement suivie d'un

mécanisme d'adaptation des bactéries lequel constitue un facteur majeur compliquant le traitement des infections. Ce phénomène avait été prédit par Alexandre Fléming en 1945 (Pasteur, 2008). En 1946 un hôpital du Royaume-Uni signala 14% de cas des souches de *Staphylococcus aureus* (bactérie la plus pathogène) résistantes à la pénicilline G. Ces souches se sont ensuite propagées au point d'atteindre dès les années 1990, 80% dans la population et 95% dans la majorité des hôpitaux (Pasteur, 2008). D'après le Dr Marie-Paule Kieny, la résistance aux antibiotiques augmente et les options thérapeutiques sont en cours d'épuisement (OMS, 2017). Le 27 février 2017, l'OMS a publié sa première liste d'agents pathogènes prioritaires résistants aux antibiotiques, énumérant 12 familles de bactéries les plus menaçantes pour la santé humaine. Elle met en exergue les bactéries Gram négatif résistantes à de nombreux antibiotiques. Ces dernières ont des capacités intégrées de trouver de nouveaux moyens de résister aux traitements et peuvent transmettre le matériel génétique permettant à d'autres bactéries de devenir elles aussi résistantes (OMS, 2017). Le groupe le plus critique comporte des bactéries multirésistantes telles que les *Acinetobacter*, les *Pseudomonas* et diverses entérobactéries (dont *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia*, et *Proteus*) qui représentent une menace particulière dans les hôpitaux. Elles peuvent provoquer des infections sévères, souvent mortelles, telles que des infections sanguines et des pneumonies. Ces bactéries sont devenues résistantes à un grand nombre d'antibiotiques, qui sont : les carbapénèmes, les céphalosporines de troisième génération et les meilleurs produits disponibles pour traiter les bactéries multirésistantes. Dans les pays en développement en général la situation est très inquiétante. Au Cameroun en particulier une étude a démontré des taux de résistance élevés aux principales classes d'antibiotiques ainsi qu'une augmentation entre 2005 et 2012 de 29,1% à 51,6% pour les céphalosporines de troisième génération, de 29,2% à 44% pour la ciprofloxacine. L'imipénème, l'amikacine et la fosfomycine étaient les molécules les plus actives avec respectivement 1,3%, 12,9% et 13,4% des souches d'entérobactéries résistantes (Cécile et *al.*, 2012).

### **I.5.1. Résistance naturelle**

Les bactéries n'étant pas suicidaires, les premières ont appris à synthétiser des antibiotiques et ont développé en même temps les moyens de s'en protéger. Il s'agit là de la résistance naturelle aux antibiotiques. La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée (toutes les souches appartenant à la même espèce). Elle est stable, transmise à la descendance et a pour support génétique le

chromosome bactérien. Elle fait partie du patrimoine génétique normal du germe et est transmise à la descendance (Lozniewski *et al.*, 2010). On peut citer l'exemple de :

- *Klebsiella spp.* qui produit naturellement des bêta-lactamases dans l'espace périplasmique de la bactérie et conduit à la destruction d'antibiotiques comme les pénicillines A, avant que ceux-ci ne puissent atteindre leur cible;
- Les bactéries anaérobies qui sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage des aminosides à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies (Lozniewski *et al.*, 2010).
- La présence de la membrane externe chez les bactéries Gram négatif leur confère une résistance naturelle à plusieurs classes de molécules telles que les glycopeptides, les macrolides, les lincosamides, les streptogramines, par imperméabilité (Phan, 2008).

### **I.5.2. Résistance acquise**

La résistance acquise est l'acquisition de nouveaux gènes de résistance capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques aux quels elle était sensible initialement. Ce nouveau gène de résistance peut être obtenu par mutation au niveau du chromosome qui est un phénomène rare ou le transfert d'ADN de plasmides conjugatifs et de transposons (mécanisme le plus fréquent) (Yala *et al.*, 2001). La résistance acquise ne concerne que quelques souches d'une espèce donnée et se propage de façon importante dans le monde bactérien. Elle résulte d'une modification du patrimoine génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce. La résistance acquise a été observée dès le début de l'antibiothérapie, mais sa fréquence était initialement faible. La généralisation de l'utilisation des antibiotiques a conduit à une sélection des souches résistantes. Ce phénomène a atteint une telle ampleur que la seule identification bactérienne ne permet plus de prédire le comportement d'une souche isolée vis-à-vis des antibiotiques, d'où l'intérêt et la nécessité de réaliser des antibiogrammes (Lozniewski *et al.*, 2010).

### **I.5.3. Mécanisme biochimique de la résistance bactérienne aux antibiotiques**

Pour se défendre contre l'effet toxique des substances, les bactéries ont développé trois mécanismes de résistance. Il s'agit entre autres de la production d'enzymes dégradant ou inactivant l'antibiotique, de la modification de la cible et de la réduction de la concentration intracellulaire d'antibiotique (Phan 2008).

#### **I.5.3.1. Production d'enzymes dégradant ou inactivant l'antibiotique**

La production d'enzyme inactivant les antibiotiques est le mécanisme de résistance le plus varié, important et très fréquent (Lavigne 2007). L'exemple typique est celui des  $\beta$ -lactamases codés par des gènes plasmidiques principalement rencontrés chez les bactéries Gram négatif (Philippon, 2013 ; Lozniewski *et al.*, 2010 ; Philippon *et al.*, 2009). Ces enzymes sécrétées dans l'espace périplasmique hydrolysent le pont amide du cycle  $\beta$ -lactame pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif (Barrial *et al.*, 2006).

#### **I.5.3.2. Modification de la cible**

La cible étant majoritairement de nature protéique, sa mutation peut entraîner une perte de la reconnaissance de l'antibiotique qui devient ainsi inactif. Tel est le cas des PLP (Protéines de Liaison à la Pénicilline) dont la mutation provoque une diminution de l'affinité des  $\beta$ -lactamines vis-à-vis d'elles. Dans le cas des fluoroquinolones, la résistance est liée à la mutation des topoisomérases au niveau des gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* diminuant l'affinité des quinolones pour leur cible (Phan 2008). La modification du ribosome confère une résistance aux tétracyclines et aux macrolides (Chopra et Roberts, 2001 ; Phan, 2008).

#### **I.5.3.3. Production des biofilms**

Le biofilm est une communauté de microorganismes (bactéries, champignons...) fixée à une surface et maintenue par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice (exopolysaccharides). C'est une structure vivante, dynamique, en perpétuelle remaniement. En effet, les microorganismes qui vivent dans un biofilms peuvent devenir 10 à 1000 fois plus résistants aux effets des agents antimicrobiens comparativement aux microorganismes planctoniques (Mah et O'Toole, 2001). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour élucider cette augmentation de la résistance des biofilms aux antibiotiques (Beoletto *et al.*, 2016).

➤ La matrice d'exopolysaccharidiques : c'est une membrane qui permet de retarder l'entrée des antibiotiques ou alors permettre une pénétration incomplète dans le biofilm. C'est le cas des aminoglycosides qui, chargés positivement, se lient à des polymères chargés négativement dans le biofilm, et ceci aboutit à une pénétration lente ;

➤ Composition chimique du microenvironnement : au cours de la croissance des biofilms, les bactéries induisent la synthèse du facteur sigma ; ce qui conduit à une augmentation de la densité cellulaire et à une activation du quorum-sensing. Les conditions environnementales (diminution du taux d'oxygène et nutriments) dans le biofilm vont induire une sélection des cellules qui sont phénotypiquement résistants à de fortes concentrations d'antimicrobiens. L'oxygène disponible est consommé par les cellules situées dans les couches superficielles du biofilm, créant des zones anaérobies dans les couches profondes. Cette situation est défavorable pour les aminoglycosides, car ils ne sont actifs qu'en aérobie. Par ailleurs il va aussi se produire une baisse du PH en raison de l'accumulation locale des déchets acides qui interfèrent directement avec l'action des antibiotiques. En raison du manque d'oxygène et de l'altération du PH, certaines bactéries cessent de se reproduire et pénètrent dans un état non reproductif dans lequel elles sont protégées contre la mort.

#### **I.5.3.4. Réduction de la concentration intracellulaire d'antibiotique**

La résistance innée des bactéries aux antibiotiques est en partie liée à l'imperméabilité naturelle de la paroi cellulaire. Cela est particulièrement vrai chez les bactéries Gram négatif dont la paroi cellulaire est constituée de deux membranes lipidiques : l'une interne et l'autre externe, séparées par un espace périplasmique (Phan, 2008). La concentration intracellulaire d'antibiotique peut être significativement réduite par la synergie de deux événements à savoir :

- la modification (ou l'absence) des porines par mutation affectant ainsi la structure des porines ou diminuant la synthèse des porines à travers lesquelles l'antibiotique peut pénétrer dans la bactérie ;

- et le transport actif vers l'extérieur de la cellule via les pompes à efflux. Il repose sur une pompe insérée dans la membrane et capable d'éjecter l'antibiotique hors de la bactérie grâce à un canal (Li et Nikaido, 2004 ; Lozniewski *et al.*, 2010).

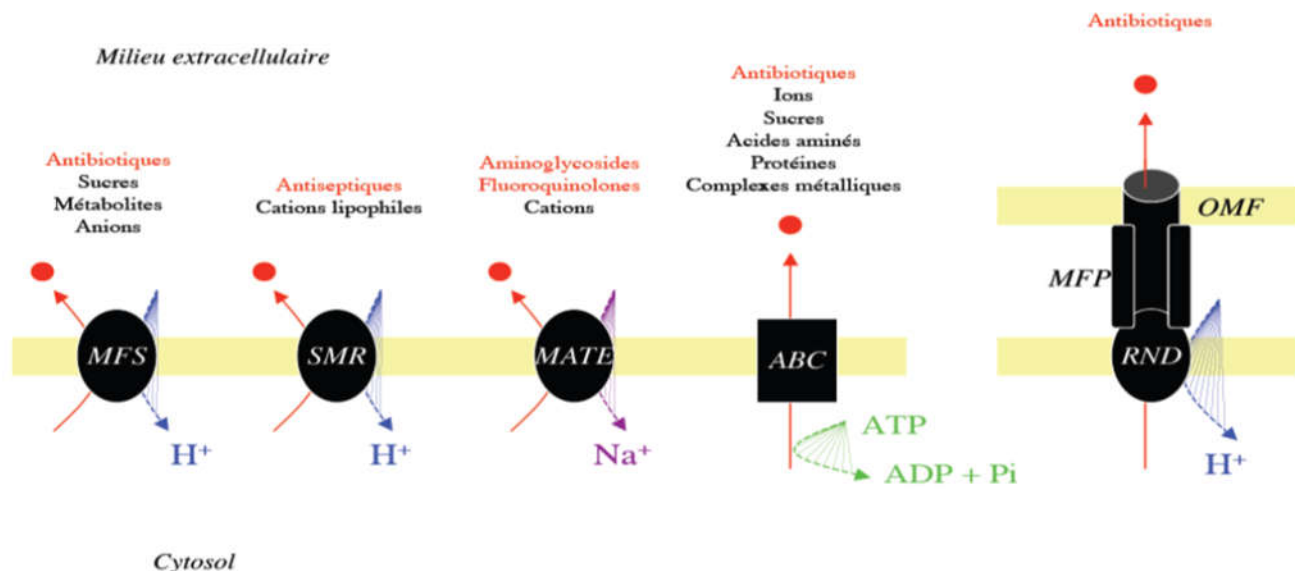


#### **I.5.4. Résistance par efflux**

L'efflux est un mécanisme de transport membranaire universellement répandu chez les organismes vivants ayant un rôle clé dans la physiologie bactérienne et permettant de préserver l'équilibre physico-chimique du milieu intracellulaire. Il s'oppose à l'accumulation de substances naturelles ou synthétiques toxiques (transport de substances nutritives et évacuation de substances toxiques). Les pompes à efflux font partie des systèmes de sécrétion de type I chez les bactéries Gram négatif et ont été mises en évidence pour la première fois en 1978 sur la capacité d'*E. coli* à expulser la tétracycline (levy et Murry, 1978 ; Phan, 2008). Les pompes contenues dans ce système sont constituées de 14, 12 ou 4 segments peptidiques transmembranaires hydrophobes. Ils sont impliqués dans la reconnaissance, la fixation et l'expulsion des molécules d'antibiotiques dans le milieu extracellulaire (putman *et al.*, 2000). Cependant, ce mécanisme de résistance est d'une importance croissante en clinique. Il peut affecter simultanément plusieurs classes d'antibiotiques, pouvant conduire à des résistances de haut niveau lors de l'expression simultanée des pompes avec d'autres mécanismes de résistance (Mesaros, 2005).

##### **I.5.4.1. Classification des pompes à efflux**

Les pompes à efflux sont des transporteurs actifs qui peuvent être spécifiques à un type de substrat et conférer une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotiques (pompes à efflux des tétracyclines et des macrolides). Mais la plupart des transporteurs (transporteurs non spécifiques) peuvent prendre en charge des molécules de structures très différentes et contribuer de manière significative à la multirésistance aux antibiotiques MDR (*multidrug-resistance*) (Poole, 2004). La figure 2 illustre les différentes pompes ainsi que les substrats généralement transportés. Les pompes à efflux peuvent être classées selon la source d'énergie nécessaire à leur fonctionnement (gradient électrochimique ou hydrolyse de l'ATP) et leur structure second-tertiaire. On distingue 5 familles de pompe à efflux qui sont : la famille ABC (*ATP binding cassette*) ; MFS (*major facilitator super family*); MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) ; SMR (*small multidrug resistance*) ; RND (*resistance nodulation cell division*).



MFS: *major facilitator super family*; SMR: *small multidrug resistance*; MATE: *multidrug and toxic compound extrusion*; ABC: *ATP binding cassette*; RND: *resistance nodulation cell division*.

**Figure 2:** Schéma représentant les 5 familles de pompe d'efflux chez les procaryotes ainsi que les substrats généralement transportés (Li et Nikaido, 2004).

#### I.5.4.1.1. Pompes de la famille ABC

Utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie, les pompes de la famille ABC constituent la plus vaste famille de protéines (Phan, 2008). Elles sont surtout connues pour leur implication dans la résistance multiple des cellules cancéreuses (glycoprotéine-p ; Ishikawa *et al.*, 2010). Chez les bactéries, ces protéines transporteuses ABC sont généralement organisées en homodimères et chaque monomère est constitué d'un domaine transmembranaire de 6 hélices  $\alpha$  impliquées dans la reconnaissance du substrat et d'un domaine ABC composé de 215 acides aminés, très conservés, impliqués dans la liaison à l'ATP (Li et Nikaido, 2004).

#### I.5.4.1.2. Pompes de la famille MFS

Les pompes ou transporteurs de la famille MFS sont des symports ou des antiports membranaires d'environ 400 résidus, utilisant la force proto-motrice. Cette famille est divisée en deux sous-familles, l'une constituée de 12 segments transmembranaires et l'autre constituée de 14 segments (lactose perméase LacY d'*E. coli*). Le transporteur fonctionne généralement seul, mais il peut également s'associer à d'autres protéines de la membrane externe, comme la porine TolC (Phan, 2008).

#### **I.5.4.1.3. Pompes de la famille MATE**

La famille de pompe dont il est question adopte la même topologie que les transporteurs MFS et leur source d'énergie est le flux de gradient de sodium (Brown *et al.*, 1999). Elle permet aux bactéries d'être résistantes aux aminoglycosides et aux fluoroquinolones (Phan, 2008).

#### **I.5.4.1.4. Pompes de la famille SMR**

Retrouvées exclusivement chez les procaryotes, les pompes de la famille SMR se caractérisent par une petite taille d'environ 110 résidus avec 4 segments transmembranaires (EmrE chez *E. coli* Phan, 2008 ; Putman *et al.*, 2000). Ces pompes sont des antiports utilisant le gradient de protons comme source d'énergie et sont responsables de l'efflux d'antiseptiques ou de désinfectants comme les ammoniums quaternaires (Phan, 2008 ; Li et Nikaido, 2004).

#### **I.5.4.1.5. Pompes de la famille des RND**

Les pompes de la famille des RND forment une vaste famille de transporteurs ubiquitaires, où l'on trouve au moins 7 sous-familles (Phan, 2008). Essentiellement présents chez les bactéries Gram négatif, les transporteurs RND sont essentiellement des antiports dépendants du gradient de proton. Ils jouent un rôle significatif dans la résistance naturelle ou acquise vis-à-vis de nombreux antibiotiques, souvent en synergie avec l'imperméabilité de la paroi cellulaire (Poole, 2004 ; Li et Nikaido, 2004 ; Zgurskaya, 2000). Ils sont constitués d'environ 1000 résidus d'acides aminés et présentent 12 segments transmembranaires avec deux grandes boucles périplasmiques impliquées dans la reconnaissance du substrat (Putman *et al.*, 2000). Afin d'assurer le transport de substrat à travers le périplasme et la membrane externe de la bactérie Gram négatif, les transporteurs RND s'associent en un complexe tripartite. Ce complexe est constitué de la pompe, d'une protéine périplasmique MFP (*Membrane Fusion Protein*) et d'une porine de la membrane externe OMF (*Outer Membrane Factor*). Cette famille de pompes peut effluer plusieurs substrats différents à l'instar des colorants, des solvants organiques ou des détergents, mais participe surtout à la résistance multiple aux antibiotiques (Li et Nikaido, 2004). C'est ce qui explique le fait que ce soit le système le plus important dans la résistance aux agents microbiens (Poole, 2004).

## **I.6. Méthode d'étude de l'activité des substances antimicrobiennes**

La détermination de l'activité antibactérienne peut se faire soit par la méthode qualitative qui renseigne sur l'activité d'une substance, soit par la méthode quantitative qui permet de déterminer la CMI et la CMB. Selon l'OMS depuis 1961, la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'une substance antibactérienne considérée est mesurée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ou la concentration minimale bactéricide (CMB). Cette dernière permet de déceler les souches sensibles, les souches résistantes et les souches intermédiaires.

### **I.6.1. Méthode de dilution**

La méthode de dilution est une méthode quantitative possédant plusieurs variantes et qui peut se dérouler en milieu liquide ou solide. Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques selon une progression géométrique de raison 2.

#### **I.6.1.1 Méthode de dilution en milieu liquide**

La technique de dilution en milieu liquide est de 2 types à savoir la macrodilution (utilisant les tubes à essais) et la microdilution (utilisant les microplaques). En milieu liquide, l'inoculum bactérien standardisé est distribué soit dans une série de tubes (macrodilution), soit dans des cupules (microdilution) contenant la substance d'intérêt à des concentrations croissantes. Après incubation pendant 18 à 24 h à 37°C, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration de substance testée où aucune croissance bactérienne n'est observée (Cos *et al.*, 2006). Ces dernières permettent de déterminer directement les CMI et les CMB. La macrodilution est longue, très coûteuse et requiert au moins 10 tubes par antibiotique. La microdilution quant à elle est la méthode de référence moins fastidieuse et peu coûteuse.

#### **I.6.1.2. Méthode de dilution en milieu solide**

En milieu solide, on réalise une gamme de concentration de la substance test incorporée du milieu gélosé préalablement fondue à 40°C et coulée dans des boîtes de Pétri. La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum des souches à étudier. Après

incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration de substance test. Cette méthode est utilisée pour mesurer l'activité des substances hydrophobes et des microorganismes sporulants (Hadacek et Greger, 2000). Elle est longue, fastidieuse et peu pratique. Les substances impures (possédant plusieurs composés à l'exemple des extraits bruts) ne se répartissent pas de façon uniforme dans la gélose.

## **I.6.2. Méthode de diffusion**

Les méthodes de diffusion en milieu solide sont simples, reproductibles, peu coûteuses avec des résultats faciles à interpréter. Cependant elles ne sont pas automatisées (ne permettent pas de déterminer directement la CMI) et certaines bactéries fastidieuses ou à faible croissance ne sont pas testées avec sûreté. De plus, la faible diffusion de certains extraits en milieu hydrophile limite l'évaluation de l'activité de certains extraits (Hadacek et Greger, 2000).

### **I.6.2.1. Méthode de diffusion par la technique des disques de papier filtre**

Il s'agit d'une méthode qualitative (renseignant sur l'activité d'une substance antibactérienne) utilisée en pratique courante, car elle est plus aisée. Cette technique utilise des disques de papier buvard, imprégnés d'une concentration donnée de la substance test, déposés délicatement à la surface d'une gélose spécifique préalablement coulée dans une boîte de pétri et uniformément ensemencée d'une suspension de la bactérie étudiée (Amhis *et al.*, 2001). A la limite des zones d'inhibition mesurées à l'aide d'un pied à coulisse, il existe dans la gélose des concentrations d'antibiotiques égales aux CMI. Les méthodes de diffusion ne permettent pas de chiffrer directement ces valeurs. Toutefois, il existe une relation simple entre les diamètres des zones d'inhibition et les  $\log_2$  des CMI mesurée par les techniques de dilution. Ces relations, appelées droites de concordance ou droites de régression ont été établies par des laboratoires spécialisés travaillant dans des conditions standardisées. A condition de respecter un protocole identique, ces courbes sont utilisables par un laboratoire de diagnostic (Coyle, 2005).

### **I.6.2.2. Méthode de diffusion par la technique des puits**

Elle est une variante de la précédente car dans cette méthode des puits de 6 à 8 mm de diamètre sont creusés à l'intérieur d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de pétri, puis la substance à tester de concentration précise est introduite dans le puits. Après incubation, les zones d'inhibition sont observées autour des puits (Kareem *et al.*, 2008; Coyle, 2005).

### **I.6.3. « E-TEST »**

Mis au point par un laboratoire suédois (AB BIODISK), il est caractérisé par sa facilité et sa rapidité de réalisation mais surtout par sa précision dans la détermination de la CMI. Son principal inconvénient est son coût élevé (Amhis *et al.*, 2001). Le E-test permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester. Les bandelettes (supports inertes, hydrophobes, de 5 mm de largeur et de 50 mm de longueur) sont appliquées sur la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé d'un inoculum bactérien. Après incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI.

### **I.6.4. Etude des associations antibiotiques – substances naturelles**

La résistance bactérienne et la dissémination des souches de plus en plus résistantes sont à l'origine de la mortalité et de la morbidité croissante dans nos formations sanitaires. Dans le souci de palier à tout ceci et parallèlement à la recherche de nouvelles molécules bioactives, des associations d'antibiotiques sont réalisées et prescrites dans le but d'élargir le spectre d'action, de limiter la dissémination des mutants résistants et de réduire la dose de chaque principe actif lors de l'association (Miaillhes *et al.*, 1992 ; Coutinho, 2009). Selon l'OMS, les méthodes d'étude de l'association des antibiotiques sont des variantes des méthodes utilisées pour la détermination des CMI des antibiotiques seuls. Lors de l'association des antibiotiques et des substances naturelles, il peut en résulter quatre effets différents :

- Synergie : où l'effet de la somme de deux produits est supérieur à la somme des effets de chaque substance prise séparément ;
- Additif : où l'action de l'association de deux substances est supérieure à l'action de chaque substance prise séparément, et équivalente à la somme des deux produits ;

➤ Indifférent : où l'action de la somme de deux substances est égale à l'action de chaque substance prise séparément ;

➤ Antagoniste : où l'effet de l'association est inférieur à l'action de chaque substance prise séparément (lors de l'association de deux substances, l'effet d'une substance inhibe l'effet de l'autre).

## **I.7. Plantes médicinales et activités pharmacologiques**

Les plantes médicinales sont des plantes utilisées pour ses propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine et animale. Elles sont utilisées depuis les premières civilisations (utilisation d'écorce de saule dès l'Antiquité) et 80% de la population mondiale aujourd'hui dépend de la médecine traditionnelle pour le traitement des infections. La flore africaine regorge une grande réserve de plantes médicinales qui occupent une place importante dans la pharmacopée traditionnelle. Environ 300 000 espèces sont connues dans le règne végétal, bien que certains auteurs pensent que le nombre total d'espèces est beaucoup plus élevé. Ainsi, seul un nombre relativement petit d'espèces de plantes (1%) ont été étudiées pour d'éventuelles applications médicales (composition chimique et utilisation thérapeutique). Il existe encore un énorme potentiel pour la découverte de molécules bioactives (Beoletto *et al.*, 2016). Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments. Environ 30% de médicaments vendus dans le monde contiennent des composés dérivés de ces dernières (FAO, 2004). La phytothérapie repose sur les molécules produites lors du métabolisme secondaire des plantes (métabolites secondaires). Ce sont des molécules spécifiques, sans action sur la croissance et la reproduction des plantes. Elles sont synthétisées par les plantes dans le but de se défendre contre les stress environnementaux (agression par les insectes, animaux, prédateurs) et pour assurer leur pollinisation (Audrey, 2011).

### **I.7.1. Alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont des composés azotés, basiques, qui s'extraient soit dans l'eau acide soit dans des solvants comme le chloroforme après alcalinisation. Ils sont stockés au niveau des vacuoles de la plante. Ils précipitent généralement avec des réactifs iodométriques (réactif de Dragendorff) et sont très souvent biologiquement actifs. Les alcaloïdes renferment les molécules antibactériennes comme la tomatidine (alcaloïde stéroïdien), la berbérine (antibactérien à large spectre). On y rencontre également la quinine, les drogues (cocaïne), les

anticancéreux (la vincristine et le taxol), les molécules utilisées comme poisons (strychnine) et des stimulants (caféine) (Gérad, 2016). La plupart des alcaloïdes naturels sont d'origine végétale (il existe des exceptions dans le monde animal), on les retrouve essentiellement chez les angiospermes, avec encore des exceptions (lycopodine du lycopode, palustrine chez *Equisetum*). L'amertume (caractéristique anti-nutritionnelle) est une caractéristique générale des alcaloïdes.

### **I.7.2. Composés phénoliques (aromatiques)**

Les composés phénoliques sont des molécules aromatiques constituées d'un groupement phényle (C6) et d'un hydroxyle (-OH) dérivant d'acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine). Elles sont le plus souvent solubles dans l'eau et présents sous forme de glycoconjugués (Lattanzio, 2013). C'est une vaste famille constituée de molécules telles que :

➤ Les coumarines, qui sont synthétisées en réponse à des attaques pathogènes lors de la cyclisation du résidu C3 de dérivés du cinnamate. Plusieurs coumarines ont des propriétés bactériostatiques telle que le 2H-1-benzopyran-2-one (Pretsch *et al.*, 1989). C'est une molécule aromatique (au sens olfactif). Elle est présente sous forme glycoconjuguée chez certaines graminées, mais lorsque les tissus sont endommagés par la coupe les glycosidases libèrent la coumarine libre à l'origine de l'odeur de foin coupé. La coumarine est utilisée dans la composition de nombreux parfums et pour aromatiser des alcools (Zubrowka, une vodka polonaise) (Cowan, 1999).

➤ Les flavonoïdes sont des dérivés phénylpropanoïdes solubles dans l'eau, souvent incolores ou jaunes (sauf les anthocyanes). Ces composés sont des dérivés de la naringénine-chalcone qui est issue de la condensation de trois résidus malonyl-CoA avec une molécule d'acide cinnamique (phénylpropanoïdes). La structure de base comporte deux cycles aromatiques à 6 atomes de carbones joints par un hétérocycle à oxygène. Les flavonoïdes constituent en eux même une famille de composés extrêmement vaste, jouant des rôles physiologiques importants (interactions Légumineuses/Rhizobium, filtres UV...). La variété des composés est essentiellement liée au degré d'hydroxylation/méthylation/glycosylation de chacun des trois cycles des molécules de base (Nishino *et al.*, 1987). On peut citer :



- Les anthocyanes qui, contrairement aux autres flavonoïdes, absorbent en général dans le spectre ultraviolet, les anthocyanes sont des composés colorés (orange, pourpre à bleu). Ils sont largement impliqués dans la coloration des pétales mais on les retrouve également dans de nombreux tissus (exemple du chou rouge). Leur synthèse dans les organes foliaires est souvent activée par des stress (froid, carences, sénescence...). Ces composés sont beaucoup utilisés comme colorants alimentaires et présentent des propriétés anti-oxydantes (Cowan, 1999).

- Les isoflavones qui sont des composés particuliers retrouvés chez les légumineuses et pour lesquels le cycle B est relié au carbone 3 du cycle C. Certains dérivés d'isoflavones sont bactériostatiques et sont spécifiquement induits lors d'infections par des organismes phytopathogènes. On retrouve en particulier de nombreuses phytoalexines des légumineuses (phaseolline du haricot, glyceolline du soja) (Cowan, 1999).

- Les flavan-3-ols quant à eux sont des composés ayant la propriété de faire précipiter les protéines et impliqués dans la défense contre les pathogènes et phytophages (Cowan, 1999).

- Les tanins sont des polymères des composés phénoliques de haut poids moléculaire (500 à 3000Da) et ayant des propriétés astringentes. Ils sont largement distribués dans le règne végétal et sont regroupés en 2 classes : les tanins catéchiques (tanins non hydrolysables ou proanthocyanidines) et les tanins galliques ou hydrolysables (Cowan, 1999).

### **I.7.3. Composés terpéniques**

Les composés terpéniques sont des molécules hydrophobes à nombre de carbones multiple de 5 et dont le précurseur est l'isopentényl diphosphate ou IPP. Etant des anti-herbivores, de nombreux terpénoïdes ont la particularité de dégager de fortes odeurs à l'exemple du menthol et du limonène permettant la fabrication d'huiles essentielles. Ils sont également utilisés comme antibactériens à l'instar de : l'humulène ou  $\alpha$ -caryophyllène (actif sur *Staphylococcus aureus*), le pinène, le limonène, le myrcène (Cassandre, 2019). Les isoprénoides regroupent à la fois des molécules de faibles poids moléculaires, volatiles, composants principaux d'huiles essentielles et des molécules hautement polymérisées comme le caoutchouc. Cette voie de biosynthèse participe à la synthèse de composés comme le  $\beta$ -carotène, les chlorophylles, l'ubiquinone ou la plastoquinone, qu'on ne positionne généralement pas dans le métabolisme secondaire (Cowan, 1999).

## I.8. Activités antibactériennes des plantes médicinales

L'utilisation thérapeutique des vertus extraordinaires des plantes pour le traitement des maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité. La recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening des plantes naturelles a conduit à la découverte de nombreux médicaments qui jouent un rôle majeur dans le traitement de plusieurs infections (Gurib-fakim, 2006). En médecine traditionnelle, les extraits de plantes et les composés d'origine végétale sont des sources précieuses pour le traitement et la prévention de plusieurs maladies infectieuses (Al-bayati, 2007). Dans les pays en développement, ils représentent la principale source de traitement des populations locales. Au Cameroun, l'Institut de Recherche Médicale et étude de Plantes Médicinales (IMPM) a été mise en place à cet effet. Ce dernier propose des Médicaments Traditionnels Améliorés (MTA) à partir des plantes de la pharmacopée Camerounaise.

La multirésistance bactérienne a conduit à la recherche active de nouvelles molécules à partir des plantes médicinales. L'exploration de ces dernières représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances antimicrobiennes (Teuscher *et al.*, 2005). Ces huit dernières années, la recherche de nouvelles molécules actives sur les bactéries multirésistantes s'est intensifiée. Plusieurs plantes ont montré une activité antibactérienne significative contre ces phénotypes multirésistants. On peut citer entre autre : *Paullinia pinnata*, *Cassia obtusifolia*, *Alchornea laxiflora*, *Dortstenia psilurus*, *Treulia obvoidea*, *Vismia laurentii*, *Artocarpus communis*, *Piper nigrum*, *Vermonia amygdalina*, *Cyperrus esculentus*, *Beilschmieda obsura*, *Moringa oleifera*, *Combretum molle*, *Xanthosoma mafaffa*, *Passiflora edulis*, *Rubus fellatae*, *Manihot esculenta*, *Harungana madagascariensis*, *Beilschmieda cinnamomea*, *Fagara xanthoxyloïdes*, *Olox subscorpioïdea*, *Solanum nigrum*, *Vernomia amygdalina*, *Peperomia fernandopoiana*, *Capsicum frutescens*, *Allanblackia gabonensis*, *Combretum molle*, *Gladiolus quartinianis* et *fagara tesmannii* (Tchinda *et al.*, 2016 ; Voukeng *et al.*, 2016 ; Fankam *et al.*, 2015 ; Tankeo *et al.*, 2015 ; Fankam *et al.*, 2014 ; Touani *et al.*, 2014 ; Djeussi *et al.*, 2013 ; Noumedem *et al.*, 2013 ; Seukep *et al.*, 2013 ; Voukeng *et al.*, 2012 ; Kuete *et al.*, 2011 ; Fankam *et al.*, 2011 ; Kuete *et al.*, 2007). Dans la recherche continue de nouvelles molécules antibactériennes, il est important d'agrandir notre bibliothèque de composés phytochimiques, ceci dans le but d'augmenter notre chance d'avoir à l'avenir (après d'autres investigations) un nouveau médicament sur le marché.

## **I-9. Induction de la résistance par les plantes médicinales**

Bien que les plantes médicinales soient considérées de nos jours comme un réservoir important de métabolites secondaires à propriétés anti-infectieuses (Kuate, 2010), ces derniers tous comme les antibiotiques utilisés en médecine moderne dans le traitement des infections bactériennes sont capables d'induire des résistances bactériennes chez certaines souches auxquelles elles sont exposées. L'acquisition de la résistance chez une souche bactérienne peut être due à plusieurs facteurs mais les plus importants sont le temps d'exposition de l'agent antibactérien au microorganisme, l'augmentation de la concentration de la substance antibactérienne tant qu'elle reste sous-létale et la nature de la molécule à laquelle le microorganisme est exposé (Michael *et al.*, 2011). Ainsi, plusieurs auteurs ont mis en évidence le phénomène d'induction de la résistance bactérienne par les plantes médicinales du Cameroun vis-à-vis des microorganismes aux quels elles ont été exposées. A titre d'illustration, nous avons les travaux de Ezo'o *et al.* (2018) qui ont démontré que, l'exposition de *Salmonella Typhi* et de *Staphylococcus aureus* à certains des extraits de plantes traditionnellement utilisées au Cameroun dans le traitement de la typhoïde et des maladies de la peau a montré une réduction de la sensibilité de ces souches aux antibiotiques prescrits dans la lutte contre ces infections. En outre, ces auteurs révèlent que l'exposition de certaines bactéries aux extraits de plantes entraîne la diminution de leur sensibilité et augmente le risque de résistance aux antibiotiques.

## **I-10 Généralités sur les plantes utilisées dans ce travail**

Les informations concernant les plantes utilisées dans ce travail sont consignées dans le tableau I ci-dessous. Nous constatons que les dysfonctionnements physiologiques pour lesquels ces plantes sont utilisées en médecine traditionnelle pourraient être dus à certaines espèces de microorganismes utilisées dans cette étude. Certaines plantes de ce panel ont déjà fait l'objet d'une étude antimicrobienne antérieure. Toutefois, il est important de mentionner que les bactéries utilisées étaient des phénotypes sensibles bien qu'appartenant à certaines espèces étudiées dans ce travail.

**Tableau I:** Informations sur les plantes étudiées

Famille	Nom de la plante	Usage en médecine traditionnelle	Parties utilisées	Composés bioactifs isolés	Bioactivités démontrées
Euphorbiacée	<i>Alchornea cordifolia</i> (Shum. & Thonn.) Müll.-Arg.	Utilisé pour soigner les problèmes de rhumatisme, la diarrhée, les convulsions, l'ulcer gastrique, la gonorrhée, les troubles bronchiques, les blessures, la toux (Ogungbamila et al., 1990 ; Adeney et al., 2014).	Feuilles, graines, écorces et racines	Alchornine, Alchorneinone, acide gentismique et Yohimbine (Ogungbamila et al., 1990).	Activités : anti-inflammatoire (Manga et al., 2004) ; anti-diarrhéique (Tona et al., 2000) ; spasmolytique (Ogungbamila et al., 1990) ; analgésique (Osabede et al., 2003).
Fabacée	<i>Acacia polyacantha</i> Willd.	Utilisé pour traiter les infections gastro-intestinales, les blessures (Koudoro et al., 2015).	Feuilles, écorces	polyacanthoside A, acide oleanolique, stigmaterol, stigmaterol-3-O- $\beta$ -glucopyranosyl, epicatechin quercetin-3-O-glucoside, acide 3-O-methyl-D-Chiro-inositol, 3-O-[ $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolic (Fotso et al., 2018).	Activité anti-helminthique contre les souches résistantes de nematodes <i>Ce</i> (Waterman et al., 2010).

HNC : Herbar National du Cameroun ; SFR/Cam : Société des Réserves Forestières du Cameroun ; Q : activité qualitative basé sur les zones d'inhibitions ; *Sa* : *Staphylococcus aureus* ; *Ec* : *Escherichia coli* ; *Bs* : *Bacillus subtilis* ; *Kp* : *Klebsiella pneumoniae* ; *St* : *Salmonella typhi* ; *Pa* : *Pseudomonas aeruginosa* ; *Se* : *Salmonella enterica* ; *Pv* : *Proteus vulgaris* ; *Ca* : *Candida albicans* ; *Ce* : *Caenorhabditis elegans*.

**Tableau I** : Informations sur les plantes étudiées (suite)

Famille	Nom de la plante	Usage en médecine traditionnelle	Parties utilisées	Composés bioactifs isolés	Bioactivités démontrées
Acanthacée	<i>Eremomastax speciosa</i> (Hochst.) Cuford.	Utilisé pour traiter les infections urinaires, les fractures, l'anémie, la diarrhée, l'ulcère gastrique, la dysenterie, les hémorroïdes, l'infertilité féminine, les règles irrégulières (Oben et al., 2006 ; Kuete et al., 2013).	Plante entière	Non reporté	Activités : antimicrobienne de l'extrait brut (Q) contre <i>Ec</i> , <i>Sa</i> , <i>Ca</i> (Okokom et al., 2007).
Urticacée	<i>Laportea aestuans</i> (Linn.) Chew.	Utilisé pour traiter les maux de tête, la diarrhée, la syphilis, la fièvre, la gonorrhée, le rhumatisme, la ménopause, l'asthme, l'hypertension, l'ulcère gastrique, comme antidote, anti-helminthique (Essiet et al., 2011).	Feuilles, racines	acide Vanilique, acide gallique, acide ferulique , (6)-gingerole, capsaicin, acide rosemamique, acide tannique, acide p-coumarique, acide cafeique, scopoletine, catéchine, resveratrol, genisteine, apigénine, kaempferol, epicatéchine, epigallocatechine, acide ellagique, acide myricitine, quercétine-3, 7, 4-triméthyle ether, quercétine3,7,30,4'- triméthyle ether, artemétine, kaempferolearabinoside, quercitrine, isoquercitrine, naringine, rutine, hesperidine, limonène, alpha pinène, betapinène, cis- ocimène, myrcene, citronellole, acetate de neryle, malvidine, lycopène, carotène, lutein, hispogénine, diosgénine, neochlorogénine, hecogénine (Oloyede et al., 2013 ; Okereke et al., 2014).	Activité antimicrobienne de l'extrait brut (Q) contre : <i>K</i> , <i>Ec</i> , <i>Sa</i> , <i>Bs</i> , <i>St</i> , <i>Pa</i> , <i>Ca</i> (Oloyede et al., 2013 ; Oloyede et al., 2014).

HNC : Herbarium National du Cameroun ; SFR/Cam : Société des Réserves Forestières du Cameroun ; Q : activité qualitative basé sur les zones d'inhibitions ; *Sa* : *Staphylococcus aureus* ; *Ec* : *Escherichia coli* ; *Bs* : *Bacillus subtilis* ; *Kp* : *Klebsiella pneumoniae* ; *St* : *Salmonella typhi* ; *Pa* : *Pseudomonas aeruginosa* ; *Se* : *Salmonella enterica* ; *Pv* : *Proteus vulgaris* ; *Ca* : *Candida albicans* ; *Ce* : *Caenorhabditis elegans*.

**Tableau I** : Informations sur les plantes étudiées (suite et fin)

Famille	Nom de la plante	Usage en médecine traditionnelle	Parties utilisées	Composés bioactifs isolés	Bioactivités démontrées
Poacée	<i>Pennisetum purpureum</i> Schumach.	Utilisé comme antidiurétique, antivenimeux, cicatrisant, pour lutter contre la rubéole (Njoku et al., 2004).	Plante entière	Non reporté	Activité antimicrobienne de l'huile essentiel contre (Q) <i>Ec</i> , <i>Pa</i> (Njoku et al., 2004).
Bignoniacée	<i>Spathodea campanulata</i> P. Beauv.	Utilisé pour résoudre les problèmes de désordres mentales, paludismes, hémorroïdes, infections bactérienne, HIV, mauvaise circulation sanguine, infections gastro-intestinales et urinaires (Zahid et al., 2011).	Fleurs, feuilles, écorces	Carbohydrates, alcaloïdes, tanins, glucoside iridoïde, acide phydroxybenzoïque, methyl p-hydroxybenzoate (Zahid et al., 2011 ; Soyanya et al., 2013).	Activité antimicrobienne de l'extrait brut (Q) contre <i>Pv</i> , <i>Ec</i> , <i>Kp</i> (Rajesh et al., 2010).

HNC : Herbar National du Cameroun ; SFR/Cam : Société des Réserves Forestières du Cameroun ; Q : activité qualitative basé sur les zones d'inhibitions ; *Sa* : *Staphylococcus aureus* ; *Ec* : *Escherichia coli* ; *Bs* : *Bacillus subtilis* ; *Kp* : *Klebsiella pneumoniae* ; *St* : *Salmonella typhi* ; *Pa* : *Pseudomonas aeruginosa* ; *Se* : *Salmonella enterica* ; *Pv* : *Proteus vulgaris* ; *Ca* : *Candida albicans* ; *Ce* : *Caenorhabditis elegans*.

## **I-11. Innocuité des plantes médicinales et toxicité aiguë**

La toxicité est un processus complexe de dommages cellulaires avec des effets physiologiques néfastes, dont le principal est l'inflammation, accompagnés d'autres effets systémiques. Les plantes médicinales constituent une voie de nouvelles molécules à explorer, car ces dernières disposent d'une grande diversité de métabolites secondaires doués de propriétés pharmacologiques (Oussou *et al.*, 2010). Cependant, les études effectuées ces 20 dernières années ont montré que toutes les substances naturelles ne sont pas systématiquement bonnes pour la santé (Cheng et Zheng, 2004). Quoique la fréquence des intoxications par les plantes soit mal connue en zones tropicales et intertropicales, du fait de l'inexistence de centres anti-poisons, l'incidence de la mortalité liée à l'empoisonnement par consommation des plantes est de 1,5% en France, 5% en Belgique, 6% en Turquie, 6,5% en Italie et 7,2% en Suisse (Rahman *et al.*, 2010). L'urgence se signale donc quant à l'étude préalable des risques éventuels qu'entraîneraient les extraits de plantes médicinales sur l'hôte qui les consomme afin d'accroître la sécurité de leur utilisation. Toute substance destinée à être mise sur le marché (médicament ou autre produit chimique) doit subir des essais de trois types de toxicité pour bien évaluer sa nocivité. On distingue cliniquement trois formes essentielles de toxicité : la toxicité aiguë, la toxicité subaiguë ou subchronique (à court terme) et la toxicité chronique (ou à long terme).

La toxicité aiguë est une forme de toxicité qui résulte d'une exposition de courte durée suite à une absorption rapide du toxique par dose unique ou multiple ne dépassant pas 24 heures, jusqu'à une limite de 5000 mg/kg (OCDE, 2008). Les manifestations cliniques se développent rapidement en général et la mort ou la guérison survient sans retard. La toxicité aiguë permet la détermination de la  $DL_{50}$  qui est la dose causant la mort de 50% du groupe d'animaux testé. L'évaluation de la toxicité aiguë par voie orale est généralement une première étape de dépistage dans l'évaluation des caractéristiques toxiques de tous les composés (Akhila *et al.*, 2007). Elle a pour objectif d'identifier une dose provoquant des effets indésirables majeurs et une estimation de la dose minimale causant la létalité (Robinson *et al.*, 2007). Ainsi, pour Bhardwaj *et al.* (2012), les données de la toxicité aiguë peuvent :

- Servir à connaître le potentiel toxique d'une substance d'essai afin de la classer,
- Fournir une information de base sur le mode d'action d'une substance,
- Aider dans la détermination de nouvelles doses pour une espèce animale.

Cette étude présente également l'intérêt de permettre la détermination du Degré de toxicité d'une substance ( $DL_{50}$ ). Elle s'exprime en poids de la substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (mg/kg) (OCDE, 2008). Les animaux les plus utilisés sont les rats et les souris. Cette  $DL_{50}$  peut être mesurée par diverses voies d'administration, les plus courantes étant la voie cutanée et celle orale. La mesure de la  $DL_{50}$  permet de comparer le potentiel toxique de différents produits chimiques. En général, plus la  $DL_{50}$  est petite, plus le produit chimique est toxique. L'échelle de toxicité d'une substance chimique en fonction de la  $DL_{50}$  et de la voie d'administration de Hodge est représentée à l'annexe.



# **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

## II.1. Matériel

### II.1.1. Matériel végétal

Après une enquête ethnobotanique auprès des tradi-praticiens nous avons répertorié 26 plantes médicinales. Six plantes ont été sélectionnées sur la base de leurs utilisations communes par les tradi-praticiens. Les feuilles, écorces, racines et plantes entière des végétaux étudiés ont été récoltées dans la région du Centre (Mont Kala et Obala) et à l'Extrême-nord du Cameroun (Kaélé) entre Janvier 2014 et Février 2016. Chacune de ces plantes a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun (HNC, Yaoundé) par comparaison avec les échantillons disponibles. Le tableau II ci-dessous précise pour chaque plante les parties utilisées, les codes d'identification ainsi que leurs lieux de récolte.

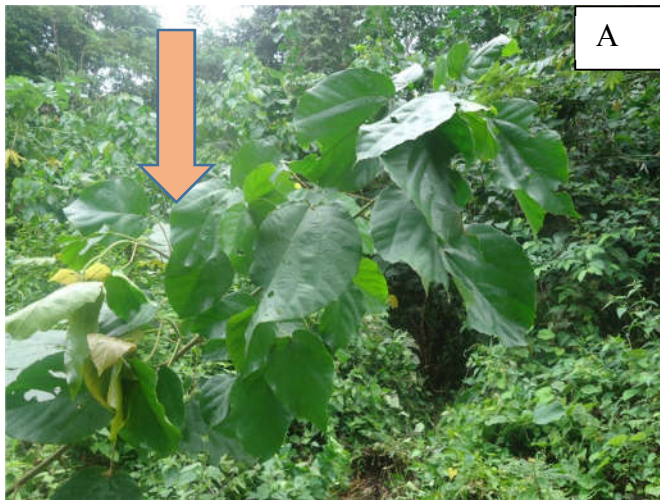
**Tableau II:** Plantes étudiées et lieux de récolte

Nom de la plante	Code d'identification	Partie utilisée	Lieu de récolte
<i>Acacia polyacantha</i> Willd.	58985/SRF/Cam	Feuilles, écorces	Kaélé
<i>Alchornea cordifolia</i> (Shum. & Thonn.) Müll.-Arg	9657/ SRF/Cam	Feuilles, écorces, racines	Mont Kala
<i>Eremomastax speciosa</i> (Hochst.) Cuford	24165/SRF/Cam	Plante entière	Obala
<i>Laportea aestuans</i> (Linn.) Chew.	34812/HNC	Plante entière	Mont Kala
<i>Pennisetum purpureum</i> Schumach.	12525/SRF/Cam	Plante entière	Mont Kala
<i>Spathodea campanulata</i> P. Beauv.	22791/SRF/Cam	Feuilles, écorces, racines	Mont Kala

HNC : Herbier National du Cameroun ; SRF/Cam : Société des Réserves Forestières du Cameroun.

## II.1.2. Illustration visuelle des images des plantes utilisées dans ce travail

La figure 2 ci-dessous matérialisée par A, B, C, D, E, F, G, H, J et K représentent les feuilles, les écorces et les plantes entières de *Alchornea cordifolia*, de *Acacia polyacantha*, de *Sphatodea campanulata*, de *Eremomastax speciosa* et de *Laportea aestuans* à leur lieu de récolte dans la région du Centre (mont Kala et Obala) et à l'Extrême-nord du Cameroun (Kaélé).



A et B: feuilles et tiges de *Alchornea cordifolia* ; C et D : feuilles et tronc d'arbre de *Acacia polyacantha*.

**Figure 3:** Image des plantes étudiées (source : photo Mambé flora)





E



F



G

E, F et G : tron d'arbre, feuilles et écorces de *Spathodea campanulata* ; H : *Pennisetum purpureum*.



H



J



K

J: *Eremomastax speciosa* ; K: *Laportea aestuans*.

**Figure 3:** Image des plantes étudiées (source : photo Mambé flora) (suite et fin):

### II.1.3. Microorganismes utilisés

Dans ce travail, 15 souches de bactéries Gram négatif regroupant les souches de références (ATCC : *American Type Culture Collection*) et les souches cliniques multirésistantes ont été utilisées. Elles sont constituées d'espèces d'*Escherichia coli* (ATCC8739; ATCC10536, AG102; AG100A<sub>Tet</sub>), *Providencia stuartii* (NEA16 ; ATCC29916), *Pseudomonas aeruginosa* (PA01; PA124), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC11296; KP55; KP63) et *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048; EA-CM64; EA27; EA289). Après acquisition auprès de l'Université de la Méditerranée Aix-Marseille en France, ces microorganismes ont été maintenus à – 20°C dans du glycerol et à 4 °C sur milieu gélosé pour des conservations de longue et moyenne durée respectivement. Les caractéristiques particulières de ces souches sont résumées dans le tableau III ci-dessous.

**Tableau III:** Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

Espèces	Souches	Caractéristiques	Références
<i>Escherichia coli</i>	ATTC8739	Souche de référence	
	AG100	Souche sauvage d' <i>E. coli</i> K-12 surexprimant les pompes à efflux <i>Acr</i> CLX <sup>R</sup> , AMP <sup>R</sup> , ERY <sup>R</sup> , CEF <sup>R</sup> , STRE <sup>R</sup> et NOR <sup>R</sup>	(Viveiros <i>et al.</i> , 2005; Fankam <i>et al.</i> , 2011)
	AG100A <sub>Tet</sub>	mutant AG100A $\Delta$ acrAB surexprimant le gène <i>acrF</i> <sup>-</sup> , TET <sup>R</sup>	(Viveiros <i>et al.</i> , 2005)
	AG102	mutant AG100 surexprimant les pompes <i>AcrAB</i> CHL <sup>R</sup> , KAN <sup>R</sup> , CEF <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> et ERY <sup>R</sup>	(Elkins et Mullis, 2007; Fankam <i>et al.</i> , 2011)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC13048	Souche de référence	
	EA27	Souche Clinique présentant un efflux énergie-dépendant au chloramphénicol et à la norfloxacine et KAN <sup>R</sup> , AMP <sup>R</sup> , NAL <sup>R</sup> , STR <sup>R</sup> et TET <sup>R</sup>	(Mallea <i>et al.</i> , 1998; Mallea <i>et al.</i> , 2003)
	EA289	dérivée d'EA27 sensible à la KAN	(Ghisalberti <i>et al.</i> , 2005)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC11296	Souche de référence	
	Kp55	Souche clinique multi-résistante, TET <sup>R</sup> , AMP <sup>R</sup> , ATM <sup>R</sup> et CEF <sup>R</sup>	(Chevalier <i>et al.</i> , 2000)
	Kp63	Souche Clinique multi-résistante, TET <sup>R</sup> , CHL <sup>R</sup> , AMP <sup>R</sup> et ATM <sup>R</sup>	(Chevalier <i>et al.</i> , 2000)
<i>Providencia stuartii</i>	ATCC29916	Souche de référence	
	NEA16	Souche Clinique multi-résistante de <i>Providencia stuartii</i> surexprimant les pompes <i>AcrAB-TolC</i> , CHL <sup>R</sup> , KAN <sup>R</sup> , CEF <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> et ERY <sup>R</sup>	(Tran <i>et al.</i> , 2010, Fankam <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA01	Souche de référence	
	PA124	Isolat clinique multi-résistant surexprimant les pompes <i>MexAB-OprM</i> , CHL <sup>R</sup> , CLX <sup>R</sup> , AMP <sup>R</sup> , ERY <sup>R</sup> , KAN <sup>R</sup> , CEF <sup>R</sup> , STR <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> et NOR <sup>R</sup>	(Lorenzi <i>et al.</i> , 2009; Fankam <i>et al.</i> , 2011)

AMP<sup>r</sup>, ATM<sup>r</sup>, CEF<sup>r</sup>, CHL<sup>r</sup>, KAN<sup>r</sup>, NAL<sup>r</sup>, NOR<sup>r</sup>, STR<sup>r</sup>, CLX<sup>r</sup>, ERY<sup>r</sup>, CIP<sup>r</sup> et TET<sup>r</sup>, résistance à: l'ampicilline, l'aztreonam, la céfépime, le chloramphenicol, la kanamycine, l'acide nalidixique, la norfloxacine, la streptomycine, la Cloxacilline, l'Erythromycine, la Ciprofloxacine et la tétracycline respectivement; *AcrAB-TolC*, *MexAB-OprM* : pompes à efflux.

#### II.1.4. Réactifs chimiques et antibiotiques de référence utilisés

Les réactifs chimiques et les molécules de références étaient constitués :

- D'un révélateur de la présence des bactéries métaboliquement actives l'Iodonitrotétrazolium (INT) ;
- D'un inhibiteur des pompes à efflux la Phenylalanine Arginine  $\beta$ -Naphthil amide (PA $\beta$ N) ;
- De huit (08) antibiotiques de référence : céfixime (CEF), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), cloxacilline (CLX), erythromycine (ERY), amoxicilline (AMX), norfloxacine (NOR), tétracycline (TET).

Ces antibiotiques de références ont été obtenues auprès de la société Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

#### II.1.5. Milieux de culture

Dans ce travail, les milieux de culture utilisés étaient constitués de :

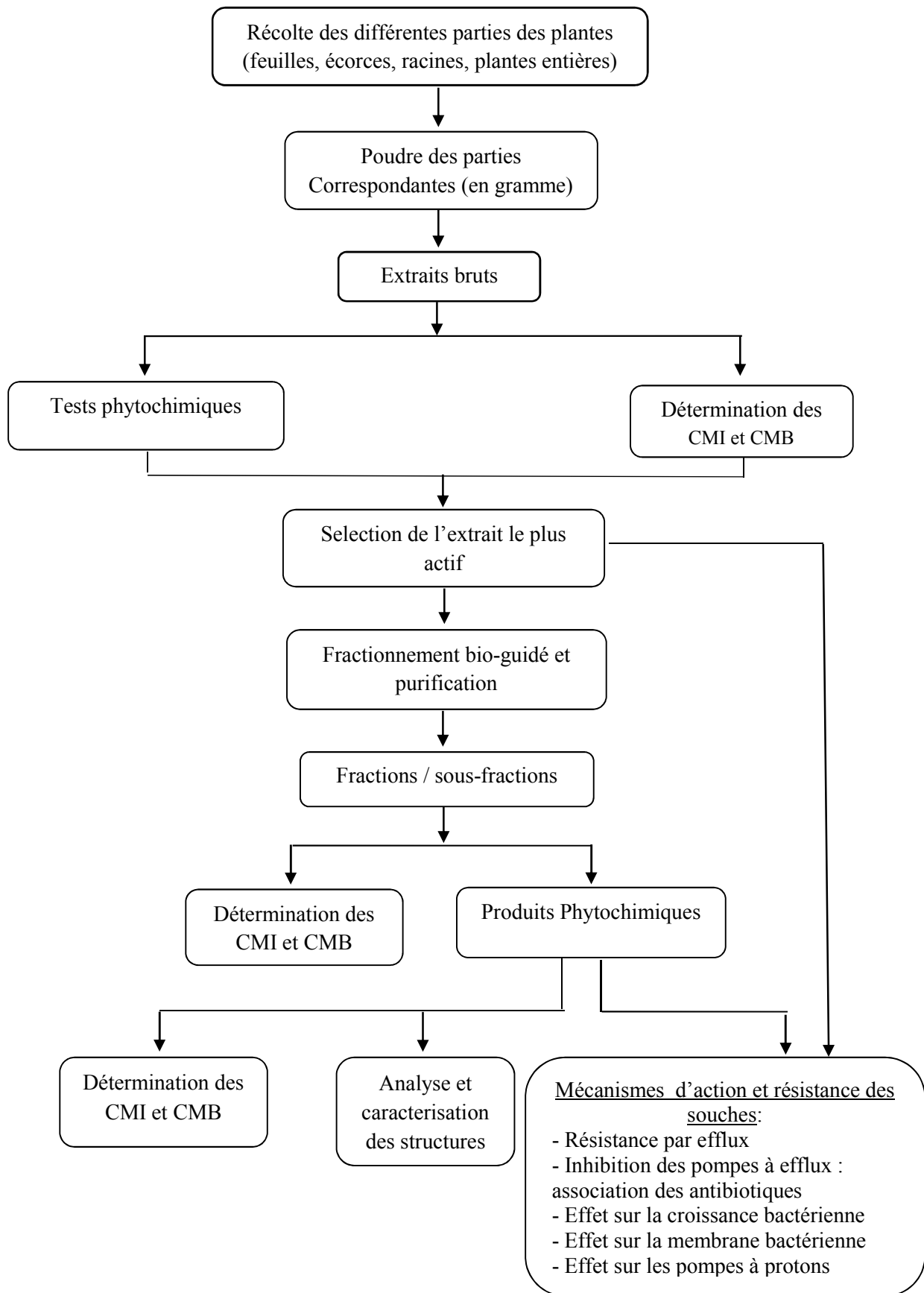
- La gélose *Mueller Hinton* (MHA ou *Mueller Hinton Agar*) pour l'activation et le renouvellement des souches bactériennes
- Le bouillon nutritif *Mueller Hinton* (MHB ou *Mueller Hinton Broth*) pour la détermination des paramètres d'inhibition des échantillons testés sur les bactéries, notamment les concentrations minimales inhibitrices (CMI), les concentrations minimales bactéricides (CMB) et l'étude des mécanismes d'action.

## **II.2. Méthodes**

### **II.2.1. Schéma général de travail**

De façon globale, les différentes étapes de ce travail sont représentées selon le schéma ci-dessous (Figure 4). Les différentes parties des six plantes (feuilles, écorces, racines et plantes entières) ont été récoltées. Après découpage, séchage et broyage, les poudres de chaque partie de plante ont été macérées au méthanol pendant 48 h puis les solutions obtenues ont été filtrées et évaporées sous pression réduite à 50°C. Les extraits bruts obtenus ont été utilisés d'une part pour les tests phytochimiques et d'autre part pour la détermination de l'activité antibactérienne (CMI et CMB), afin de sélectionner la plante à purifier. L'extrait le plus actif a été soumis à une succession de chromatographie sous colonne afin d'isoler et de déterminer la structure des différents composés responsables de l'activité de ce dernier. Cet extrait brut, ainsi que son composé le plus actif ont été utilisés afin d'élucider leurs mécanismes d'action et d'évaluer la capacité des souches bactériennes étudiées à résister à l'action toxique des extraits bruts. Enfin, la toxicité aigüe de l'extrait brut sélectionné a été évaluée.





**Figure 4:** Schéma général du travail

## **II.2.2. Etude phytochimique des plantes testées**

### **II.2.2.1. Extraction au méthanol des échantillons de plantes**

Les différentes parties des plantes récoltées ont été séchées à température ambiante pendant deux semaines. Elles ont été ensuite moulues jusqu'à obtention des poudres fines. Cent grammes de poudre de chaque partie ont été macérés et agités de temps en temps à température ambiante pendant 48 h dans 500 ml de méthanol. Après filtration à l'aide du papier Whatman no.1, les filtrats ont été concentrés dans un évaporateur rotatif (BUCHI R-200) à 65°C. Les extraits obtenus ont été complètement séchés dans une étuve puis pesés et les rendements d'extraction (Rd) calculés d'après la formule suivante.

$$Rd = \frac{\text{Masse de l'extrait obtenu}}{\text{Masse de poudre initiale}} \times 100$$

### **II.2.2.2. Criblage phytochimiques des extraits bruts de plantes étudiées**

L'identification des principaux groupes de métabolites secondaires présents dans les extraits bruts de plantes a été effectuée selon les méthodes énoncées par Harbone (1976).

#### **II.2.2.2.1 Mise en évidence des phénols**

Cinq milligrammes de chaque extrait brut ont été dissouts dans 3 ml de méthanol, puis 3 gouttes d'une solution de FeCl<sub>3</sub> 10% y ont été ajoutées. L'apparition d'une coloration bleu-violacé ou verdâtre a traduit la présence des phénols.

#### **II.2.2.2.2 Mise en évidence des alcaloïdes**

Cette classe de métabolite secondaire a été mise en évidence par le test de Dragendoff. A cet effet, nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince (CCM) de gel de silice de chaque extrait. Après développement, les diverses tâches obtenues ont été pulvérisées avec le réactif de Dragendoff. Les tâches présentant une coloration jaune orangée indiquaient la présence des alcaloïdes.

#### **II.2.2.2.3. Mise en évidence des flavonoïdes : test de shinoda**

Cinq milligramme de chaque extrait brut ont été dissouts dans 1 ml de méthanol. Ensuite, nous avons introduit 0,05 g de copeaux de magnésium et 3 gouttes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. Les colorations jaune, rouge et rose traduisaient la présence des flavones, flavonols et flavonones respectivement.

#### **II.2.2.2.4. Mise en évidence des saponines**

Un tube à essai contenant 5 mg d'extrait et 15 ml d'eau distillée a été porté à chaud au bain-marie bouillant pendant 5 min. la solution obtenue a été refroidie à température ambiante et agitée pendant 10 secondes. La présence d'une mousse persistante de plus de 1cm de hauteur a révélé la présence des saponines.

#### **II.2.2.2.5. Mise en évidence des triterpènes et stéroïdes : test de Liberman-Burchard**

Dans un tube à essai contenant 1 ml de dichlorométhane, nous avons dissout 5 mg d'extrait et ajouté 0,2 ml de chacun des réactifs suivants : chloroforme, anhydride acétique glacial, acide sulfurique concentré. L'apparition de la coloration violette ou verdâtre a été caractéristique de la présence des triterpènes et stéroïdes respectivement.

### **II.2.2.3. Fractionnement et isolement des composés issus de l'extrait des feuilles de *Acacia polyacantha***

#### **II.2.2.3.1. Procédure générale**

La détermination structurale a été réalisée par l'équipe du Professeur Ngadjui Bonaventure du Département de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I, notamment à travers le Dr Na-Iya Jean. Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à température ambiante sur un polarimètre automatique Horiba SEPA-300 (HORIBA, Kyoto, Japan). Les points de fusion ont été mesurés à l'aide de l'appareil Büchi B 545 et Büchi SMP-20. Les masses des matériels, des extraits et des produits ont été prises sur balance électronique MELTER PC 2000. Les spectres de masse en impact électronique ont été enregistrés sur un spectromètre de marque FINNIGAN. MAT 95 (70 eV) avec le perfluorokérosène comme substance de

référence alors que les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre de masse de marque Q 98. Les expériences de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été effectuées dans différents solvants deutérés ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ , Acétone- $\text{d}_6$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ ) sur un spectromètre de type BRÜKER DMX 600 MHz, 400 MHz, 300 MHz pour le  $^1\text{H}$  ; 150 MHz, 100 MHz, 75 MHz pour le  $^{13}\text{C}$  (transformée de Fourier pour les expériences 1D et 2D). Les déplacements chimiques des  $^1\text{H}$  ( $\delta_{\text{H}}$ ) et  $^{13}\text{C}$  ( $\delta_{\text{C}}$ ) sont exprimés en ppm et les constantes de couplages J en Hz. Pour les différents types de chromatographie, plusieurs matériels ont été utilisés : La CCM a nécessité des plaques de silice sur feuilles d'aluminium (plaques préfabriquées de type MERCK de dimension 20X20 cm et d'épaisseur 0,2 mm recouverte de Kieselgel F<sub>254</sub>). Ces plaques ont été développées dans les cuves contenant les systèmes de solvants tels que : Hex-AcOEt ;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH ; AcOEt-MeOH avec différentes proportions. Les révélations des taches ont été faites soit en utilisant la lampe UV (254 et 366 nm), ou par pulvérisation à l' $\text{H}_2\text{SO}_4$  dilué à 20% suivi du chauffage à l'étuve à environ 110 °C ou encore révélé à l'iode. Les chromatographies sur colonne ont été réalisées sur les colonnes de diamètre variable en utilisant d'une part comme phase stationnaire le gel de silice de type 60 MERCK et de granulométrie comprise entre 0,063-0,200 mm et d'autre part en utilisant le séphadex LH-20.

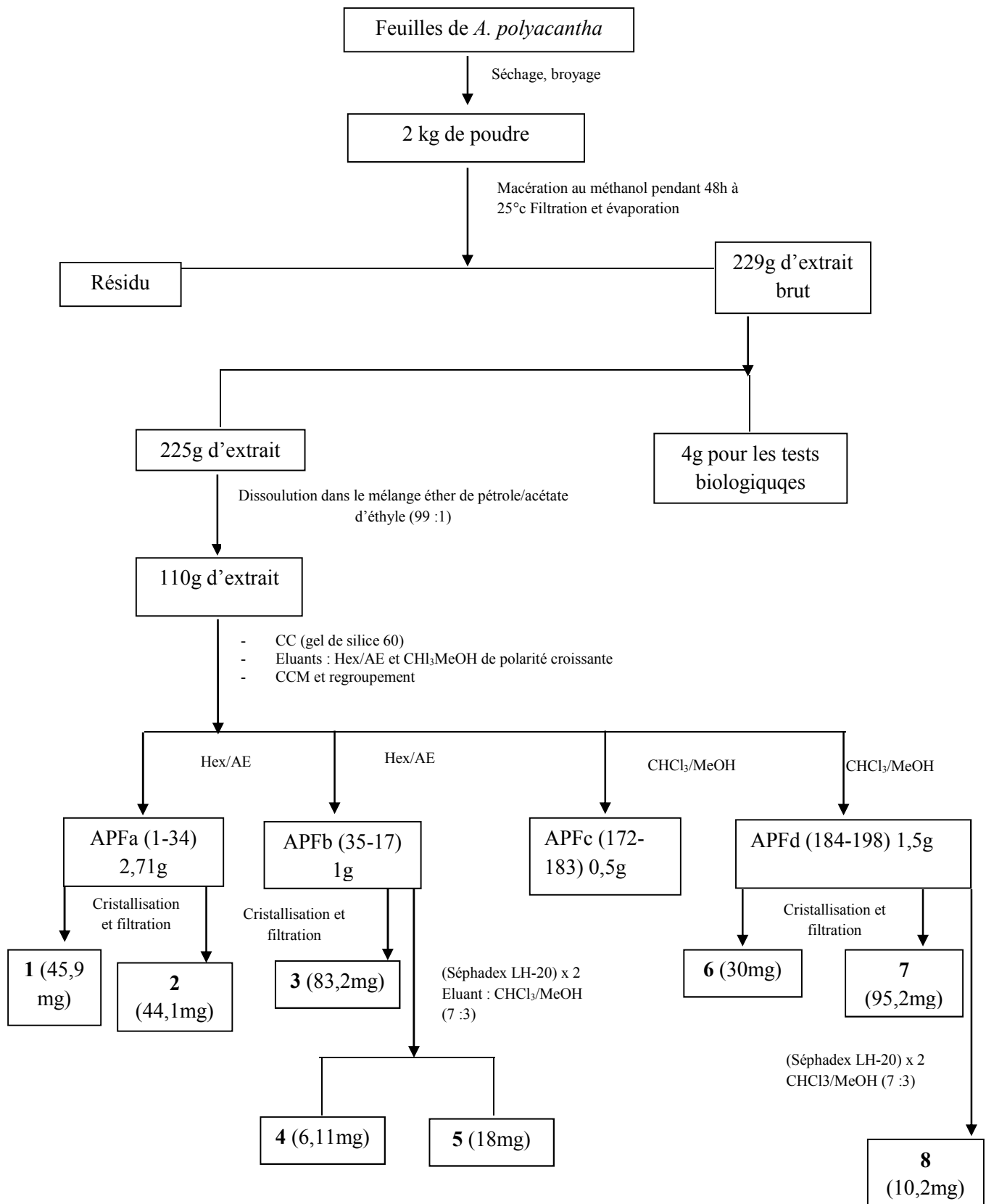
#### **II.2.2.3.2. Isolement des constituants des feuilles de *Acacia polyacantha*.**

Une masse de 225 g d'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* (APF) a été dissoute dans un mélange d'éther de pétrole/acétate d'éthyle (99:1 v/v) et secouée dans le but d'éliminer les composés peu polaires dont la chlorophylle. Le résidu obtenu (110 g) a été soumis à une chromatographie sur colonne (CC) de gel de silice et élué avec un mélange de solvants de polarité croissante: hexane-acétate d'éthyle (Hex-AcOEt) et du chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH). Cent quatre-vingt-dix fractions (frs) de 300 ml chacune ont été collectés comme suit: frs 1-13 (Hex: AcOEt, 95:5), frs 14-29 (Hex: AcOEt, 90:10), frs 30-63 (Hex: AcOEt, 85:15), frs 64-117 (Hex: AcOEt, 80:20), frs 118-122 (Hex: AcOEt, 70:30), frs 123-129 (Hex: AcOEt, 60:40), frs 130- 140 ( $\text{CHCl}_3$ : MeOH, 97,5: ,5), frs 141-152 ( $\text{CHCl}_3$ : MeOH, 95:5), frs 153-166 ( $\text{CHCl}_3$ : MeOH, 90:10), frs 167- 182 ( $\text{CHCl}_3$ : MeOH, 85:15), frs 183-190 ( $\text{CHCl}_3$ : MeOH, 80:20) et frs 191-198 ( $\text{CHCl}_3$ : MeOH, 75:25). Celles-ci ont été ensuite regroupées en quatre fractions en APFa (frs 1-34); APFb (frs 35-171); APFc (frs 172-183); et APFd (frs 184-198). Sur la base de tests antibactériens, les fractions APFa, APFb et APFd ont été sélectionnées pour une purification supplémentaire.

La fraction APFa a été soumise à la CC sur gel de silice en utilisant comme éluant Hex: AcOEt de polarité croissante. Cent-cinq sous-fractions de 100 ml chacune ont été collectées comme suit: sous-frs 1-39 (Hex: AcOEt, 95:5), sous-frs 40-87 (Hex: AcOEt, 90:10) et sous-frs 88-105 (Hex: AcOEt, 85:15). Les composés **1** (45,9 mg) et **2** (44,1 mg) ont été obtenus sous forme de poudre blanche après filtration à partir des sous-frs 15-40 et sous-frs 41-90 respectivement.

La fraction APFb a été également soumise à la CC sur gel de silice en utilisant un mélange de solvant Hex: AcOEt, et CHCl<sub>3</sub>: MeOH de polarité croissante. Deux cent trente-cinq sous-fractions de 200 ml chacune ont été collectées comme suit: sous-frs 1-56 (Hex: AcOEt, 85:15), sous-frs 57-133 (Hex: AcOEt, 80:20), sous-frs 134-142 (Hex: AcOEt, 70:30), sous-frs 143-155 (Hex: AcOEt, 60:40), sous-frs 156-176 (CHCl<sub>3</sub>: MeOH, 97,5:2,5), sous-frs 177-199 (CHCl<sub>3</sub>: MeOH, 95:5), sous-frs 200-226 (CHCl<sub>3</sub>: MeOH, 90:10) et sous-frs 227-235 (CHCl<sub>3</sub>: MeOH, 85:15). Le composé **3** de masse 83,2 mg a été obtenu sous forme d'une poudre blanche après filtration des sous-frs 1-30. Les sous-fractions 31-235 ont été regroupés et purifiés sur Sephadex LH-20 utilisant comme éluant le CHCl<sub>3</sub>: MeOH isocratique, (7:3). Des sous-frs de 5 ml ont été collectées. Les sous-frs 6-11 ont donné le composé **4** (6,11 mg) sous forme d'une poudre blanche tandis que le composé **5** (18 mg) a été isolé des sous-frs 35-50 sous forme d'une poudre rouge.

La fraction APFd a été soumise à la CC sur gel de silice avec comme éluant CHCl<sub>3</sub>: MeOH de polarité croissante. Quarante-cinq sous-frs de 100 ml chacune ont été collectées comme suit: sous-frs 1-21 (CHCl<sub>3</sub>: MeOH, 80:20) et sous-frs 22-45 (CHCl<sub>3</sub>: MeOH, 75:25). Le composé **6** (30 mg) a été obtenu sous forme d'une poudre jaune après filtration des sous-frs 1-13. Les sous-frs 14-34 ont été encore purifiées deux fois sur Sephadex LH-20 en utilisant CHCl<sub>3</sub>: MeOH isocratique, (7: 3) pour donner le composé **7** (95,2 mg) sous forme de cristaux beiges. Les sous-frs 35-42 ont également été purifiées de la même manière que les sous-frs 14-34 pour donner le composé **8** (10,2 mg) sous forme de poudre blanche. Le schéma (figure 5 ) ci-dessous résume les différentes étapes suivies pour purifier et isoler les constituants des feuilles de *A. polyacantha*.



**Figure 5:** Protocole d'extraction et d'isolement des composés des feuilles de *Acacia polyacantha*.

## **II.2.3. Etude de l'activité antibactérienne des différents échantillons**

### **II.2.3.1. préparation des milieux de culture**

Les milieux de culture MHA et MHB ont été préparés tel qu'indiqué par le fabricant (Sigma-Aldrich). Dans un litre d'eau chaude distillée, 38 g et 21 g de MHA et MHB respectivement de chaque poudre ont été dissouts. Les préparations réalisées ont été stérilisées dans l'autoclave pendant 15 minutes à 121°C. Le milieu de culture MHA a été refroidi jusqu'à 45°C, puis coulé dans des boîtes de pétri.

### **II.2.3.2. Préparation des solutions d'extrait et d'antibiotiques à tester**

Les solutions d'extrait de plante de concentration 4096 µg/ml ont été préparées en dissolvant 20,48 mg d'extrait dans 500 µl de DMSO pur, puis l'ensemble a été complété à 5000 µl (4500 µl + 500 µl) avec du bouillon de culture MHB et homogénéisé au vortex. Les solutions d'antibiotiques ont été préparées en suivant le même procédé à la concentration finale de 1024 µg/ml.

### **II.2.3.3. Activation des souches et préparation de l'inoculum bactérien**

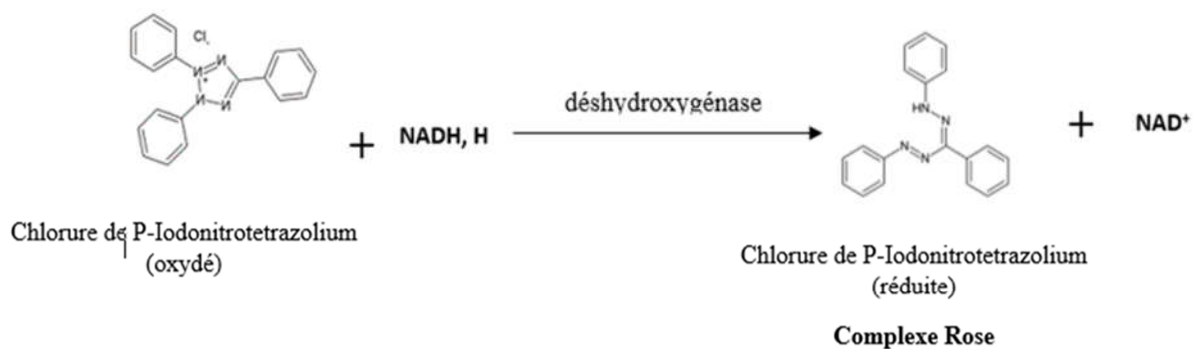
A l'aide d'une anse de platine, une colonie pure de microorganisme a été prélevée et a été ensemencée par stries sur milieu gélosé MHA préalablement coulé dans des boîtes de Pétri. Les boîtes ainsi ensemencées ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 h (Carbonnelle *et al.*, 1987).

Les inocula ont été préparés en prélevant à l'aide d'une anse de platine quelques colonies de bactéries préalablement activées sur MHA et homogénéisées dans de l'eau distillée stérile jusqu'à l'obtention d'une turbidité semblable à celle du point 0,5 de l'échelle de McFarland. Cette turbidité correspond à la concentration  $1,5 \times 10^8$  unités formant colonies/ml (UFC/ml). Dans le but d'obtenir la concentration ( $2 \times 10^6$  UFC/ml) nécessaire à la manipulation, 147 µl de la suspension précédente ont été prélevés et introduits dans 10,853 ml de MHB.

#### II.2.3.4. Détermination *in vitro* des CMI et CMB : test colorimétrique à l'INT

##### ➤ Principe

Une même charge microbienne a été mise en contact avec différentes concentrations de l'extrait ou de l'antibiotique à tester. L'ensemble a été incubé et la croissance bactérienne traduite par une apparition d'une coloration rose (sel de formazan) suite à l'action de la déshydroxygénase membranaire des bactéries métaboliquement actives sur l'iodonitrotétrazolium (INT)



##### ➤ Procédure

La capacité de nos extraits de plante à inhiber la croissance microbienne ou à entraîner la mort des bactéries a été déterminée par le protocole décrit par Matvandlela *et al.* (2006) avec quelques modifications. Dans les puits de la microplaque, 100 µl de bouillon nutritif des sub-culture bactérienne ont été introduits. Ensuite, dans les puits de la première ligne uniquement, 100 µl de solution mère de chaque extrait (4096 µg/ml) et antibiotique (1024 µg/ml) ont été ajoutés.

La série de dilution de raison 2 nous a permis d'obtenir une gamme de concentration de premier terme 2048 µg/ml s'étalant jusqu'à 16 µg/ml pour chaque extrait brut de plante et une gamme de 512 à 4 µg/ml pour le CHL. Cent microlitres d'inoculum de charge  $2 \times 10^6$  UFC/ml préparés ci-dessus ont été ensemencés pour obtenir les concentrations finales de 1024 à 8 µg/ml pour les extraits de plante et 256 à 2 µg/ml pour l'antibiotique. Pour chaque extrait, deux témoins ont été réalisés : un témoin positif (bouillon nutritif + microorganisme + chloramphénicol) et un témoin négatif (bouillon nutritif MHB + microorganismes ; MHB + microorganisme + DMSO). Les microplaques ont été soigneusement recouvertes et



scellées à l'aide d'un papier parafilm puis incubées pendant 18 à 24 h à 37 °C. Chaque test a été réalisé en trois séries puis répété 2 fois.

Après incubation, la révélation de la croissance microbienne s'est faite par introduction de 40 µl de l'iodonitrotétrazolium (INT) 2% dans les puits des microplaques permettant de déterminer la CMI. Les plaques ont été ré-incubées pendant 30 minutes à 37°C. Les puits correspondant aux plus petites concentrations où il n'y a pas eu apparition de coloration rose ont été notés et ces concentrations considérées comme des CMI.

Pour la détermination de la CMB, 50 µl du contenu des cupules tests des plaques précédentes (où il n'y a pas eu ajout d'INT) de concentration supérieure ou égale à la CMI ont étéensemencés dans les puits d'une nouvelle microplaque contenant 150 µl de MHB. L'ensemble a été porté à l'incubation pendant 48 h à 37 °C. Après incubation, la révélation de la croissance s'est faite à l'aide de l'INT 2% (40 µl) comme précédemment et les puits correspondant à la plus petite concentration où il n'y a pas eu de coloration rose ayant permis d'évaluer la CMB (Kuetze *et al.*, 2007).

Le rapport CMB/CMI a ensuite permis de déterminer l'effet bactéricide ( $CMB/CMI < 4$ ) ou bactériostatique ( $CMB/CMI \geq 4$ ) des substances testées (Oussou *et al.*, 2008).

#### **II.2.4. Etude des mécanismes d'action des échantillons sélectionnés et de résistance des souches étudiées vis-à-vis de ces derniers**

L'extrait brut des feuilles et les composés issus de la purification bioguidée de *A. polyacantha* ont été utilisés pour évaluer l'implication du mécanisme d'efflux des souches utilisées sur l'activité des échantillons testés, ainsi que les modes d'action.

##### **II.2.4.1. Rôle des pompes à efflux sur l'activité de l'extrait brut et des produits de *Acacia polyacantha*.**

Après dilution de raison 2 des substances d'intérêts (extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* ; fractions APFb et APFd ; composé **8** et CHL) de façon similaire à celle effectuée précédemment dans le cadre de la détermination des CMI, nous avons introduit 50 µl de PAβN (pour une concentration finale de 20 µg/ml) dans chaque puits. Cinquante microlitres d'inoculum bactérien de charge  $4 \times 10^6$  UFC/ml ont été ajoutés. L'ensemble a été incubé et révélé à l'INT comme précédemment décrit. La plus petite concentration où il n'y a

pas eu apparition d'une coloration rose a été notée comme CMI et le facteur d'amélioration de l'activité (FAA) calculé d'après la formule ci-dessous.

$$\text{FAA} = \frac{\text{CMI de la substance seule}}{\text{CMI de la substance +inhibiteur}}$$

## **II.2.4.2. Mécanismes d'action des composés issus de *Acacia polyacantha***

### **II.2.4.2.1. Etude de l'association entre les substances d'intérêt et les molécules de référence**

#### **II.2.4.2.1.1. Détermination des concentrations sub-inhibitrices des substances d'intérêt à utiliser lors des associations avec les antibiotiques**

Dans l'optique de déterminer les concentrations adéquates des extraits et des composés à associer aux antibiotiques afin de potentialiser leur activité, nous avons réalisé les dilutions en série de huit antibiotiques de référence pour un volume de 100 µl. Cinquante microlitre de solution de chaque extrait ainsi que les composés et 50 µl d'inoculum bactérien ont été ajoutés dans chaque puits. Quatre concentrations d'extrait ont été testées et sont toutes inférieures à la CMI sur *P. aeruginosa* PA 124 qui servira de souche modèle pour ce test. Ces concentrations sont les quotients du rapport des CMI de ces échantillons (extraits bruts des feuilles et écorces de *A. polyacantha* ; composés **1** à **8**) sur la souche la plus résistante *P. aeruginosa* PA124 par les facteurs 2, 4, 8 et 16. L'ensemble a été incubé et révélé à l'INT comme précédemment décrit. Les concentrations de chaque extrait à effet potentialisateur ont été notées comme celles baissant la CMI des antibiotiques testés seuls.

#### **II.2.4.2.1.2. Détermination des CMI des associations entre les substances d'intérêt et les antibiotiques de référence**

Après avoir réalisé des dilutions en série de raison géométrique d'ordre 2 des antibiotiques de référence comme précédemment décrit, nous avons introduit pour chaque concentration d'antibiotique, 50 µl de substance test (extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* APF, les composés **7** et **8**) aux concentrations sub-inhibitrices CMI/2 et de CMI/4, puis 50 µl d'inoculum. Les plaques ont été incubées pendant 18 à 24 h à 37°C. Après

ajout de l'INT et ré-incubation pendant 30 min, les plus petites concentrations où il n'y a pas eu apparition d'une coloration rose ont été notées comme CMI et le facteur d'amélioration de l'activité (FAA) a été calculé comme suit :

$$\text{FAA} = \frac{\text{CMI de l'antibiotique seul}}{\text{CMI de l'antibiotique + substance test}}$$

#### **II.2.4.2.2. Evaluation de l'effet de l'extrait brut des feuilles et du composé 8 de *Acacia polyacantha* sur la croissance bactérienne**

L'effet de l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* et du composé 8 sur le cycle cellulaire bactérien a été évalué de manière spectrophotométrique à travers la lecture des densités optiques à 600 nm suivant le protocole décrit par Carson *et al.* (2002) avec quelques modifications (Carson *et al.*, 2002). Nous avons utilisé la souche *P. stuartii* ATCC29916 car ces échantillons y ont montré simultanément les bonnes activités antibactériennes. Les suspensions bactériennes ont été préparées comme précédemment décrit afin d'obtenir une concentration de  $10^8$  UFC/ml, pour un volume de 22 ml dans les flacons correspondants. Ces dernières ont été traitées avec les substances d'intérêt aux concentrations équivalentes à CMI/2, CMI et 2CMI. Les flacons ont été incubés à 37°C sous un agitateur orbital (200 tr/min). Les témoins négatifs et positifs étaient constitués respectivement des flacons contenant du CHL à CMI/2, CMI et 2CMI de même que celui contenant le MHB et la suspension bactérienne. Après des temps d'incubation correspondant à t égale à 0 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 18 h ; 500 µl ont été retirés dans chaque flacon et introduits dans la cuve spectrophotométrique pour lecture des densités optiques (DO) à 600 nm . Chaque essai a été répété 3 fois. Les valeurs des densités optiques ont permis de tracer les courbes de DO en fonction du temps (Hanif *et al.*, 2015).

#### **II.2.4.2.3. Evaluation de l'effet de l'extrait brut des feuilles et du composé 8 de *Acacia polyacantha* sur la membrane bactérienne**

L'évaluation de l'effet de l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* et du composé le plus actif (composé **8**) sur la membrane a été effectuée par la méthode décrite par Leejae *et al.*, (2013). Brièvement, une suspension bactérienne de densité optique (DO<sub>600</sub>) égale à 2 a été préparée à partir d'une culture de bactérie activée comme précédemment décrit. Les cellules bactériennes ont été séparées du milieu par centrifugation à 400 g pendant 15 min. Ces dernières ont été lavées deux fois par le tampon PBS (pH 7.4) et resuspendues dans le même tampon. Les suspensions ont été traitées par l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* et le composé **8** aux concentrations CMI/2, CMI et 2 CMI. La culture a été incubée à 37°C pendant 60 min, sous agitation. Les échantillons prélevés aux temps 0, 30 et 60 min de l'expérience ont été centrifugés à 13400 g pendant 15 min. Pour chaque temps et pour chaque concentration, la densité optique a été mesurée à 260 nm au spectrophotomètre. La Polymyxine B a été utilisée comme contrôle positif (Leejae *et al.*, 2013).

#### **II.2.4.2.4. Evaluation de l'effet de l'extrait brut des feuilles et du composé 8 de *Acacia polyacantha* sur les pompes à proton H<sup>+</sup>-ATPases bactériennes**

L'évaluation de l'effet de l'extrait brut des feuilles de *A. polyacanyha* et le composé **8** sur les pompes ATPases a été faite par suivi de l'acidification du milieu extérieur des bactéries grâce à une électrode à PH. Pour ce faire, une colonie bactérienne de 18 h a été prélevée et introduite dans 20 ml de MHB contenus dans un Erlen-Meyer. La pré-culture a été préparée en maintenant l'ensemble à 37°C pendant 18 h sous agitation à la vitesse de 130 tr/min à l'aide d'un agitateur magnétique. Des aliquotes de cette pré-culture bactérienne ont été ensuite prélevées et introduites dans des Erlen-Meyers contenant du MHB à la dilution 1/100 v/v. Après 18 h d'incubation à 37°C (sous agitation), 100 ml de cellules bactériennes ont été centrifugés à 4000 tr/min pendant 30 min. Le culot a été lavé à l'eau distillée, puis au KCl 50 mM et ré-suspendu dans 50 ml de KCl 50 mM. La suspension a été ensuite conservée à 4 °C pendant 18 h (pour la privation du glucose) et le pH sera ajusté à 6,4 par ajout de HCl et/ou NaOH.

A 4 ml de cette solution, 0,5 ml d'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* et le composé **8** dissout dans le DMSO a été ajouté pour obtention d'une concentration de CMI/2, CMI et 2CMI. Après 10 min de pré- incubation à 37°C, l'acidification du milieu a été

déclenchée par ajout de 0,5 ml d'une solution de glucose 20% dont le catabolisme rapide s'accompagnera de la libération des protons dans le milieu. Par la suite, le pH du milieu a été mesuré toutes les 10 min pendant 1 h. Pour le contrôle négatif, l'extrait a été remplacé par le DMSO. Les valeurs de pH notées ont permis le tracé des courbes de variation du pH en fonction du temps. Toute inhibition de l'acidification du milieu en présence d'un extrait de plante a été attribué à un effet inhibiteur du fonctionnement des pompes ATPases-H<sup>+</sup> par ces extraits (Noumedem *et al.*, 2013).

### **II.2.5. Toxicité aigüe de l'extrait brut des feuilles de *Acacia polyacantha***

Afin de valoriser l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* en vue de mettre sur pied un Médicament Traditionel Amélioré (MTA) nous avons évalué la toxicité aigüe de ce dernier. La toxicité d'une substance est appréciée par la détermination de la DL<sub>50</sub>. La dose létale 50 % (DL<sub>50</sub>) correspond à la dose capable de tuer dans des conditions déterminées, la moitié des animaux mis en expérience au sein d'une même espèce animale. Cette dernière est déterminée dans un délai généralement court fixé au minimum à sept jours et au maximum à quatorze jours. Cette détermination est fondée sur l'évaluation des réponses de tout ou rien (mort ou survie des animaux). Cette étude sera réalisée suivant la méthodologie décrite par la ligne directrice Européenne de l'OCDE code 425 (OCDE, 2008).

#### **II.2.5.1. Acclimatation, sexe et nutrition des animaux expérimentaux**

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé des jeunes rates femelles nullipares (qui n'ont jamais mis bas) et non gravides (qui ne portent pas d'embryons), âgées de 8 à 12 semaines. Ces rates ont été choisies au hasard, marquées individuellement à dessein d'identification (1 à 5) et gardées dans leurs cages au moins cinq jours avant l'administration de l'extrait des feuilles de *A. polyacantha*, afin qu'elles s'acclimatent aux conditions du laboratoire. La température du local était maintenue à 22°C (±3°C) ; l'éclairage artificiel était dispensé faisant alterner des séquences de 12 h d'obscurité. Les animaux ont été hébergés dans des cages individuelles et ont été nourris des préparations standards (composition disponible à l'annexe) pour rongeurs avec de l'eau potable à disposition (Telefo, 1998). La veille du test, les rates ont été mises à jeûne. Après cette période de jeûne, ces dernières ont été pesées et la dose à administrer aux différentes rates a été calculée en fonction du poids corporel à jeûne de chaque animal.

### **II.2.5.2. Détermination de la DL<sub>50</sub>**

Selon la ligne directrice 425 de l'OCDE, l'essai est séquentiel et requiert un maximum de cinq animaux. Dix rates de  $189,4 \pm 21,9$  g ont été réparties en deux groupes de 5 rates chacun numéroté de 1 à 5 et mis à jeûne comme précédemment décrit. A l'aide d'une sonde gastrique, une dose unique de 5000 mg/kg d'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* a été administrée par gavage à un groupe de 5 rates. Au groupe témoin constitué de 5 autres rates, nous avons administré de l'eau potable. Les animaux ont été maintenus à jeûne pendant 4 h. Pendant les 4 premières heures, les rates ont été observées individuellement avec une attention particulière, puis régulièrement durant les premières 24 h et quotidiennement pendant 14 jours. La sensibilité à la douleur (pincement de la queue), l'activité motrice (observation des mouvements au sein de la cage), la sensibilité au bruit, le grincement de dents, l'aspect des fèces, l'état de la queue, les tremblements, la somnolence et les cas de convulsions ont été observés. Après 14 jours d'observation, chaque animal a fait l'objet d'une autopsie afin de relever d'éventuels changements pathologiques macroscopiques sur les organes comme le foie, les reins, les poumons, la rate et le cœur. Les organes des animaux qui ont reçu l'extrait ont été comparés à ceux des animaux témoins (OCDE, 2008).

### **II.2.5.3. Sacrifice des animaux et prélèvements du sang et des organes**

Quatorze jours après le test, les animaux ont été anesthésiés au vapeur du chloroforme. Ils ont été placés en décubitus dorsal sur une planche et les quatre membres ont été immobilisés pour laisser accès facile à l'abdomen. Une dissection a été réalisée sur l'abdomen. Le sang a été recueilli par ponction cardiaque puis introduit dans un tube à essai préalablement stérilisé et sans anticoagulant pour la préparation du sérum, lequel a été obtenu par centrifugation à 3000 tr/min pendant 15 min. Certains organes tels que le cœur, les reins, le foie, les poumons et la rate ont été prélevés.

### **II.2.5.4. Evaluation du gain de poids et le poids relatif des organes**

Le poids corporel des animaux déterminé avant et à la fin de l'expérience nous a permis d'évaluer le gain de poids par soustraction du poids corporel obtenu à la fin de l'expérience de celui déterminé au début du test. Après le sacrifice des animaux, chaque organe a été pesé et le poids relatif des organes calculé selon la formule ci-dessous :

$$\text{Poids relatif de l'organe} = \frac{\text{poids de l'organe}}{\text{poids de chaque animal}} \times 100$$

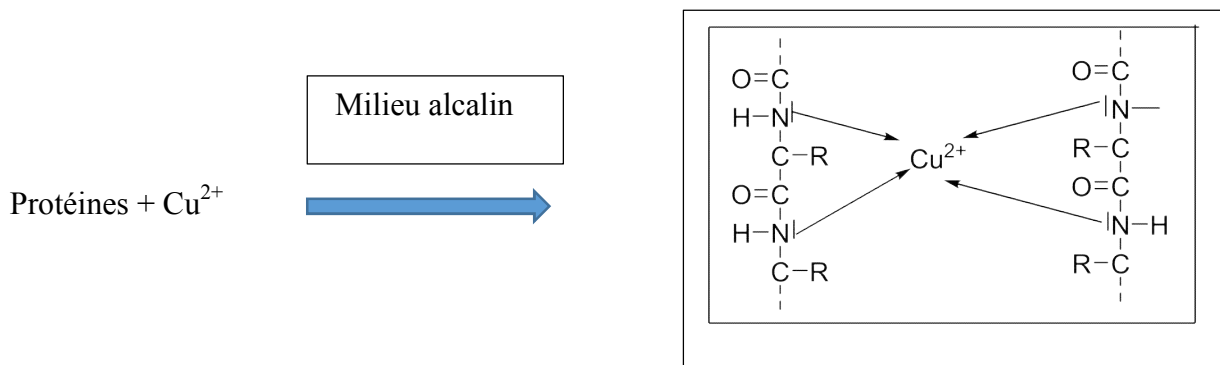
## II.2.5.5. Effet de l'extrait des feuilles de *Acacia polyacantha* sur les paramètres biochimiques des animaux

### II.2.5.5.1. Dosage des protéines sériques

La méthode de Biuret décrite par Gornall *et al.* (1949) nous a permis de déterminer la quantité totale des protéines sériques.

#### ➤ Principe

Les protéines possèdent au moins 3 à 4 liaisons peptidiques et forment avec les ions cuivriques ( $\text{Cu}^{2+}$ ) un complexe de couleur variant du rose violet au bleu violet en fonction du nombre de liaisons. Ce complexe absorbe à une longueur d'onde de 540 nm et l'absorbance est proportionnelle à la quantité de protéine présente dans le milieu.



➤ Méthode

Le dosage a été réalisé suivant les instructions du kit SGMitalia (Italie)

Dans une série de 3 tubes à essais (échantillon, standard et témoin), nous avons introduit 1000 µl de réactif R1. Ensuite, nous avons ajouté 10 µl d'échantillon (serum), de standard et d'eau distillé dans chaque tubes à essaie respectivement. Les mélanges obtenus ont été incubés pendant 10 min à 37°C. Les absorbances des échantillons (EC) et du standard (ES) contre celle du témoin ont été lues à 540 nm. La teneur en protéine a été obtenue à partir de la formule suivante :

$$\text{Protéines totales (g/dl)} = (\text{EC/ES}) \times \text{conc STD}$$

EC= absorbance de l'échantillon

ES= absorbance du standard

STD= concentration du standard

### II.2.5.5.2. Dosage des transaminases

Le foie est l'organe central du métabolisme. Afin de vérifier l'hépatotoxicité du foie, nous avons procédé à la détermination de l'activité des transaminases sériques (ALAT, ASAT).

Les activités des transaminases enzymes ont été déterminées par la méthode cinétique décrite par Reitman et Frankel (1957) ainsi que celle de Bergmeyer (1986).

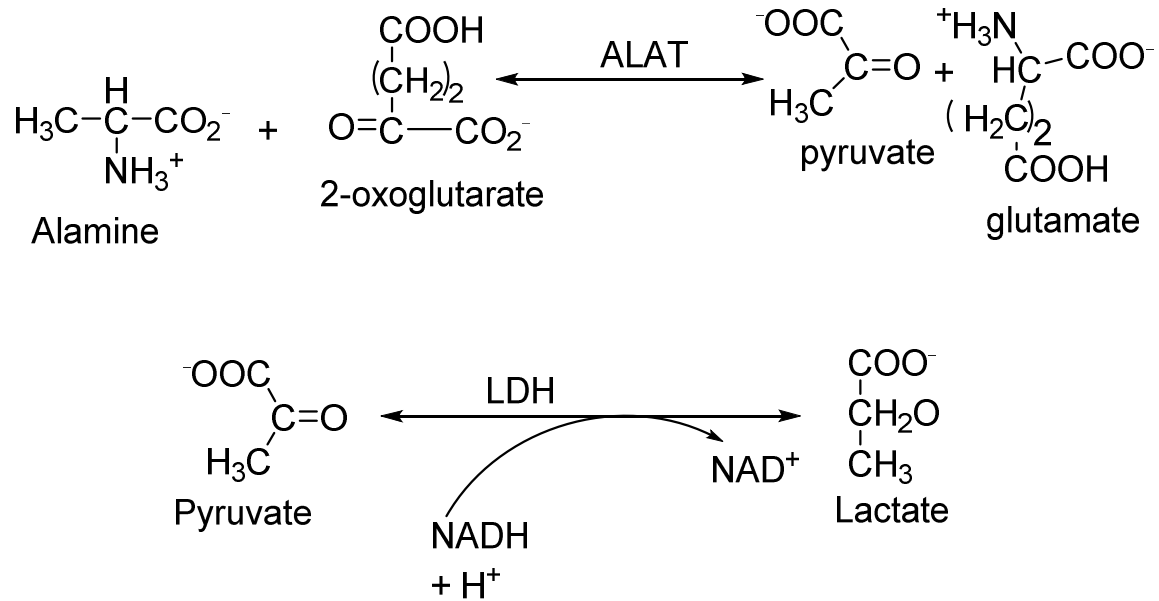
#### II.2.5.5.2.1. L'alanine aminotransférase (ALAT)

➤ Principe

Encore appelée glutamate pyruvate transaminase (GPT), l'ALAT catalyse le transfert du groupement aminé de l'alanine sur l' $\alpha$ - cétooglutarate pour former le pyruvate et le glutamate. Le pyruvate formé est transformé en L-lactate par action de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH). Cette réaction s'accompagne d'une oxydation du NADH en NAD<sup>+</sup>



qui absorbe à 340 nm. La densité optique mesurée à cette longueur d'onde est proportionnelle à la concentration du  $\text{NAD}^+$  qui est par conséquent proportionnelle à l'activité de l'ALAT.



**Figure 6:** Réaction catalysée par l'ALAT et la LDH.

#### ➤ Méthode

Le dosage a été effectué suivant les instructions du kit SGMitalia (Italie). Dans deux tubes à essais (échantillon et témoin), nous avons introduit 1000  $\mu\text{l}$  de réactif suivis de l'ajout de 100  $\mu\text{l}$  d'eau distillée et du serum de chaque rate respectivement. Les tubes ont été homogénéisés au vortex, puis incubés à  $37^\circ\text{C}$  pendant 1 min. Les densités optiques ont été lues à 340 nm après 90 s puis 3 fois dans l'intervalle d'une minute. L'activité de la transaminase ALAT a été obtenue à partir de la formule suivante :

$$\text{ALT (UI/l)} = \Delta\text{Abs}/\text{min} \times 1746$$

ALT = activité de l'enzyme

$\Delta\text{Abs}/\text{min}$  = variation de l'absorbance entre trois intervalles de temps

1746 = facteur de multiplication donné par le fabricant du kit

### II.2.5.5.2.2. L'aspartate aminotransférase

➤ Principe

Egalement connue sous le nom de glutamate oxaloacétate transaminase (GOT), l'ASAT catalyse le transfert du groupement aminé de l'aspartate vers l' $\alpha$ -cétoglutarate pour former l'oxaloacétate et le glutamate. L'oxaloacétate formé est transformé en L-malate par l'enzyme malate déshydrogénase (MDH). Cette réaction s'accompagne d'une oxydation du NADH en  $\text{NAD}^+$  qui absorbe à 340 nm. La densité optique mesurée à cette longueur d'onde est proportionnelle à la concentration du  $\text{NAD}^+$  qui est ainsi proportionnelle à l'activité de l'ASAT.

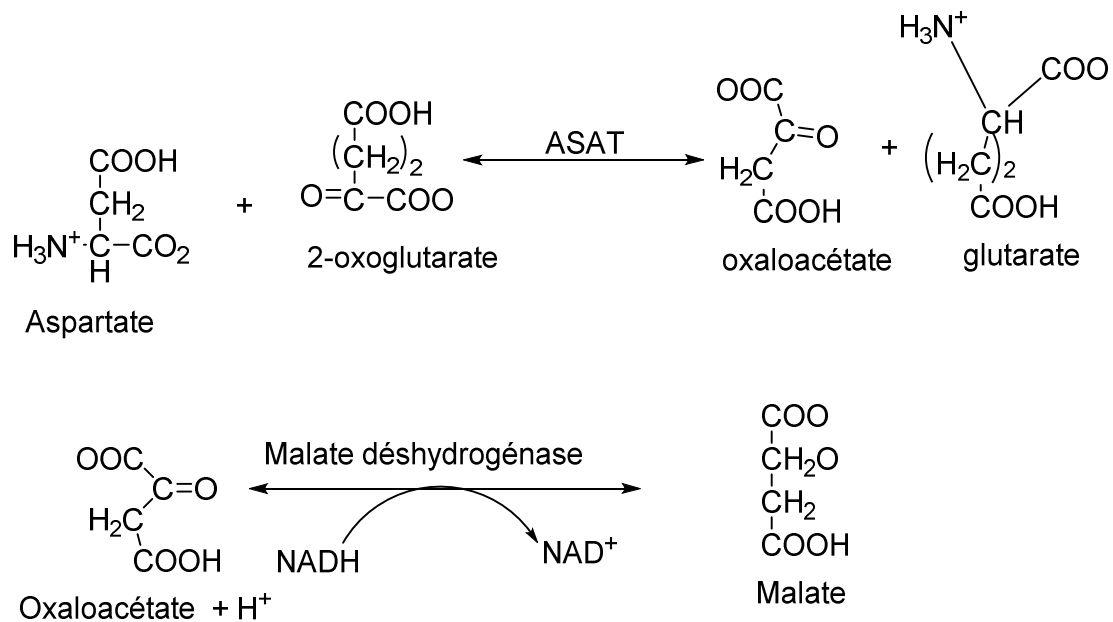


Figure 7: Réaction catalysée par l'ASAT et la MDH

## ➤ Méthode

Le dosage a été effectué suivant les instructions du kit SGMitalia (Italie). Dans deux tubes à essais (échantillon et témoin), nous avons introduit 1000 µl de réactif suivis de l'ajout de 100 µl d'eau distillée et du serum de chaque rate respectivement. Les tubes à essais ont été homogénéisés au vortex, puis incubés à 37°C pendant 1 min. Les densités optiques ont été lues à 340 nm après 90 s puis 3 fois dans l'intervalle d'une minute. L'activité de chaque enzyme (ASAT et ALAT) a été obtenue à partir de la formule suivante :

$$\text{ALT (UI/l)} = \Delta\text{Abs/min} \times 1746$$

ALT = activité de l'enzyme

$\Delta\text{Abs/min}$  = variation de l'absorbance entre trois intervalles de temps

1746 = facteur de multiplication donné par le fabricant du kit

## II.2.6. Analyse des résultats

Les activités antibactériennes des extraits bruts de plantes étudiées, des fractions et produits de *A. polyacantha* ont été évaluées selon l'échelle d'activité de Kuete *et al.* (2010). L'activité des extraits de plantes étaient considérés comme significative lorsque les valeurs de CMI étaient inférieures à 100 µg/ml, moyenne lorsqu'elles étaient comprises entre 100 et 625 µg/ml et faible lorsqu'elles étaient supérieures à 625 µg/ml. Par ailleurs, selon cette échelle d'activité, un composé est dit significativement actif lorsque la CMI est inférieure à 10 µg/ml, modérément actif lorsque la CMI est comprise entre 10 et 100 µg/ml et faiblement actif si la CMI est supérieure à 100 µg/ml (Kuete *et al.*, 2010).

Lors des associations des molécules d'intérêts (extrait des feuilles et des composés de *A. polyacantha*) et les antibiotiques de références, l'effet synergique était observé lorsque le facteur d'amélioration de l'activité (FAA) était supérieur ou égal à 2, indifférent lorsque la FAA était compris entre 0,25 et 2 et antagoniste lorsque la FAA était inférieur à 0,25 (Fankam *et al.*, 2011). Le pourcentage de souches bactériennes pour les quelles une synergie a été observée (PBS) nous a permis d'évaluer les possibles inhibiteurs des pompes à efflux bactériens. Si une substance antibactérienne améliore l'activité d'au moins 70% des

antibiotiques testés sur plus de 70% de souches bactériennes testées, elle pourrait être considérée comme un inhibiteur potentiel des pompes à efflux (Braga *et al.*, 2005).

Dans le cas échéant, Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard sur la moyenne (ESM). Les différences étaient significatives au seuil de probabilité 5% ( $P < 0.05$ ) et le degré de significativité noté comme \* valeurs  $p < 0,05$ ; \*\* valeurs  $p < 0,01$ ; \*\*\* valeurs  $p < 0,001$  et \*\*\*\* valeurs  $p < 0,0001$ . À l'aide du logiciel GraphPad Prisme version 5.01, les données ont été analysées en utilisant l'analyse des variances (*one-way ANOVA*) suivie du test de Dunnett's pour les comparaisons multiples.

# **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

### III.1. RESULTATS

#### III.1.1. Rendement d'extraction et composition phytochimique des extraits de plantes étudiés

Les différentes plantes utilisées dans cette étude ont été extraites au méthanol. Le rendement d'extraction le plus élevé est de 16,13% obtenu avec l'extrait brut des feuilles de *S. campanulata* et le rendement le plus faible est de 5,42% obtenu avec l'extrait brut des écorces de *A. polyacantha* (Tableau IV). Le criblage phytochimique des extraits obtenus a permis de déceler les principaux groupes de métabolites secondaires présents. Les résultats regroupés dans le tableau IV montrent que les polyphénols, les tanins, les triterpènes et les stérols sont présent dans tous les extraits bruts. Les saponines, les flavonoïdes et les coumarines sont sélectivement distribués. Les anthraquinones sont absentes dans les extraits bruts de plante. Il en ressort également que les alcaloïdes sont présent dans tous les extraits bruts sauf ceux de *L. aestuant* (plante entière) et des racines de *S. campanulata*.

**Tableau IV:** Composition phytochimique des extraits bruts de plantes utilisées

classes	Plantes étudiées (rendements d'extractions)* et composition										
	<i>Acacia polyacantha</i>		<i>Alchornea cordifolia</i>			<i>Eremomastax speciosa</i>	<i>Laportea aestuans</i>	<i>Pennisetum purpureum</i>	<i>Spathodea campanulata</i>		
	Feuilles (11,45%)	Ecorces (5,42%)	Feuilles (7,84%)	Ecorces (11,32%)	Racines (6,23%)	Plante entière (14,69%)	Plante entière (8,82%)	Plante entière (9,05%)	Feuilles (16,13%)	Ecorces (15,27%)	Racines (11,42%)
<b>Polyphénols</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Coumarines</b>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<b>Tanins</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>alcaloïdes</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<b>Flavonoïdes</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<b>Saponines</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<b>Triterpènes</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Stérols</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Anthraquinones</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : présent ; - : absent

### III.1.2. Activité antibactérienne des plantes étudiées, fractions et produits de *A. polyacantha*

#### III.1.3.1. Activité antibactérienne des extraits bruts de plantes

L'activité antibactérienne des extraits bruts a été réalisée sur 15 bactéries Gram négatif regroupant les souches cliniques multirésistantes et les souches de référence. Les CMI et les CMB sont consignées dans le tableau V ci-après. Il ressort de ce tableau que tous les extraits bruts testés ont une activité bactériostatique sur l'ensemble des souches étudiées. Les extraits des feuilles et des écorces de *A. polyacantha* ont été actifs sur 73,3% (*E. coli* ATCC8739, ATCC10536, AG102A<sub>tet</sub>, AG102 ; *E. aerogène* ATCC13048, EA27 ; *K. pneumoniae* ATCC11296 ; *P. stuartii* ATCC29916, NEA16 ; *P.aeruginosa* PA01, PA124) et 46,6% (*E. coli* ATCC8739 ; *E. aerogène* ATCC13048, EA27 ; *K. pneumoniae* KP55 ; *P. stuartii* ATCC29916 ; *P.aeruginosa* PA01, PA124) des souches étudiées respectivement. Ces derniers possèdent les meilleures valeurs de CMI (64 µg/ml et 8 µg/ml) sur les souches les plus résistantes qui sont entre autre *P. aeruginosa* (PA01), *P. stuartii* (ATCC29916) et *E. aerogene* (ATCC13048). Comparativement à l'antibiotique de référence, nous notons que les valeurs de CMI de ces extraits sont semblables à ceux du CHL, voir plus petites sur ces souches. L'extrait des feuilles de *A. cordifolia* a été actif sur 93,3% des souches (*E. coli* ATCC8739, ATCC10536, AG102A<sub>tet</sub>, AG102 ; *E. aerogène* ATCC13048,CM64, EA27, EA289 ; *K. pneumoniae* ATCC11296, KP55, KP63 ; *P. stuartii* ATCC29916, NEA16 ; *P.aeruginosa* PA01). Les valeurs de CMI varient de 128 µg/ml à 1024 µg/ml. Les extraits des écorces, des racines de cette dernière ont été actifs sur 86,7% (*E. coli* ATCC8739, ATCC10536, AG102A<sub>tet</sub>, AG102 ; *E. aerogène* ATCC13048,CM64, EA289 ; *K. pneumoniae* ATCC11296, KP55, KP63 ; *P. stuartii* ATCC29916, NEA16 ; *P.aeruginosa* PA01) et 80% (*E. coli* ATCC8739, ATCC10536, AG102A<sub>tet</sub>, AG102 ; *E. aerogène* ATCC13048,CM64, EA27, EA289 ; *K. pneumoniae* ATCC11296, KP55 ; *P. stuartii* ATCC29916, NEA16) respectivement des souches. Les extraits de *L. aestuans*, *P. purpureum* ont été actifs sur 66,7% (*E. coli* ATCC8739, ATCC10536, AG102A<sub>tet</sub>, AG102 ; *E. aerogène* ATCC13048,CM64, EA27, EA289 ; *K. pneumoniae* KP55, KP63 ; *P. stuartii* ATCC29916, NEA16 ; *P.aeruginosa* PA01) et 53,33% (*E. coli* ATCC8739, ATCC10536, AG102A<sub>tet</sub>, AG102 ; *E. aerogène* ATCC13048,CM64, EA289 ; *K. pneumoniae* ATCC11296, KP63 ; *P.aeruginosa* PA01) des souches testées. L'extrait d'*E. speciosa* (40%) ainsi que les feuilles et écorces de *S. campanulata* (20%) ont été faiblement actifs sur l'ensemble des souches



testées (*E. coli* ATCC8739, ATCC10536; *E. aerogène* ATCC13048, EA289 ; *P. stuartii* ATCC29916; *P.aeruginosa* PA01) et (*E. coli* ATCC8739; *E. aerogène* EA289 ; *K. pneumoniae* ATCC11296; *P. stuartii* NEA16) respectivement. Les valeurs de CMI du chloramphénicol varient de 2 µg/ml à 256 µg/ml.

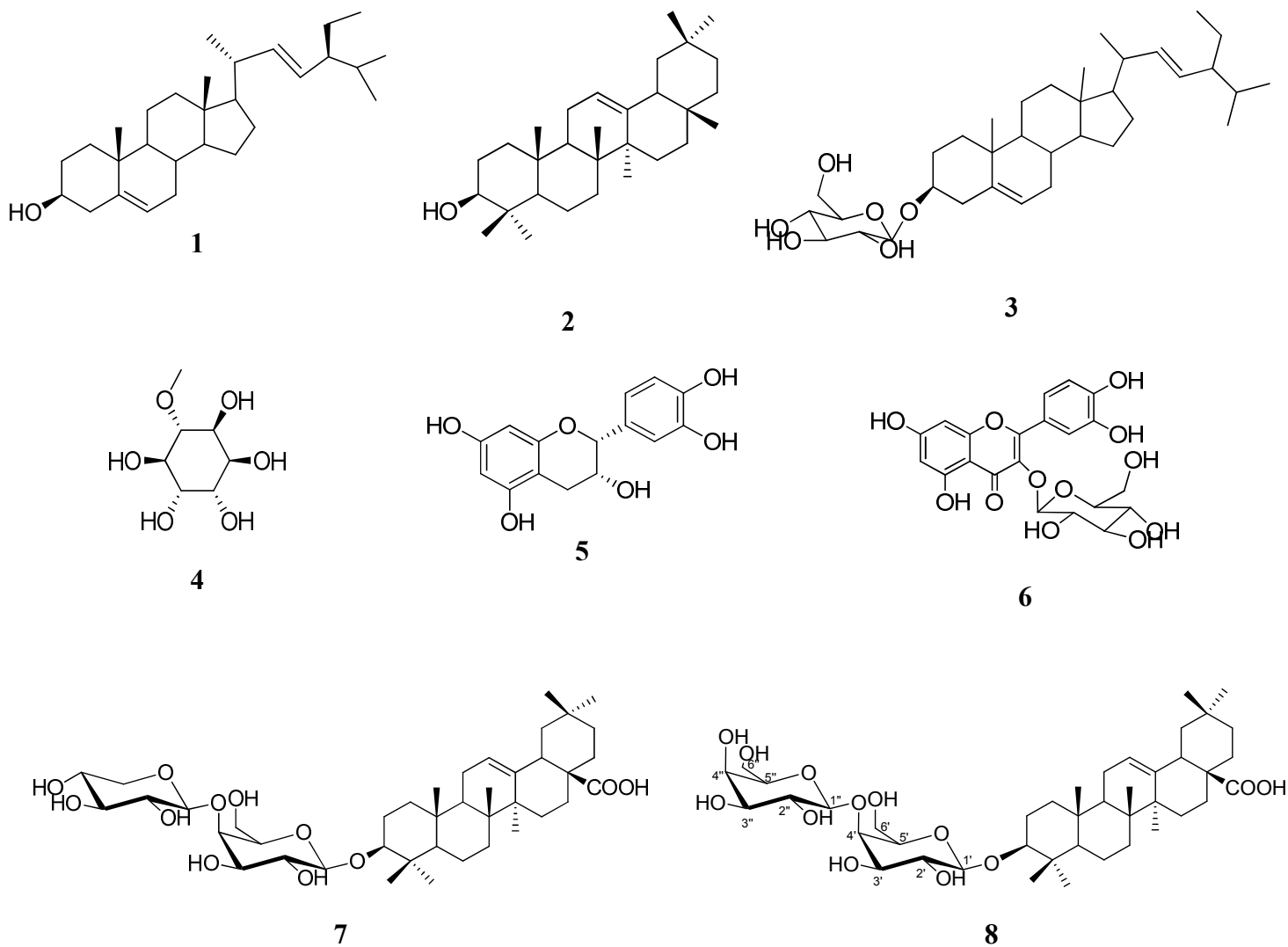
**Tableau V:** Activités antibactériennes des plantes étudiées

Souches bactériennes	CMI des extraits bruts testés (CMB) µg/ml											CHL
	<i>Acacia polyacantha</i>		<i>Alchornea cordifolia</i>			<i>Eremomastax speciosa</i>	<i>Laportea aestuans</i>	<i>Pennisetum purpureum</i>	<i>Spathodea campanulata</i>			
	feuilles	écorces	feuilles	écorces	racines	Plante entière	Plante entière	Plante entière	feuilles	écorces	racines	
<b><i>Escherichia coli</i></b>												
<b>ATCC8739</b>	1024 (-)	512 (-)	512 (-)	256 (-)	1024 (-)	1024 (-)	1024 (-)	512 (-)	512 (-)	-	-	2 (64)
<b>ATCC10536</b>	1024 (-)	-	512 (-)	256 (-)	1024 (-)	1024 (-)	1024 (-)	1024 (-)	-	-	-	2 (32)
<b>AG100A<sub>Tet</sub></b>	512 (-)	-	1024 (-)	1024 (-)	1024 (-)	-	256 (-)	1024 (-)	-	512 (-)	-	32 (256)
<b>AG102</b>	512 (-)	-	512 (-)	1024 (-)	1024 (-)	-	512 (-)	512 (-)	512 (-)	512 (-)	-	32 (256)
<b><i>Enterobacter aerogène</i></b>												
<b>ATCC13048</b>	256 (-)	<b>8</b> (-)	512 (-)	1024 (-)	1024 (-)	1024 (-)	512 (-)	512 (-)	-	1024 (-)	-	16 (128)
<b>CM64</b>	-	-	256 (-)	512 (-)	512 (-)	-	512 (-)	512 (-)	512 (-)	1024 (-)	-	256 (-)
<b>EA27</b>	1024 (-)	256 (-)	512 (-)	-	1024 (-)	-	512 (-)	-	-	-	-	32 (256)
<b>EA289</b>	-	-	128 (-)	512 (-)	128 (-)	1024 (-)	256 (-)	128 (512)	1024 (-)	1024 (-)	512 (-)	32 (256)
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>												
<b>ATCC11296</b>	1024 (-)	-	512 (-)	128 (-)	1024 (-)	-	-	512 (-)	1024 (-)	1024 (-)	1024 (-)	32 (256)
<b>KP55</b>	-	128 (-)	1024 (-)	512 (-)	1024 (-)	-	512 (-)	-	-	-	-	64 (256)
<b>KP63</b>	-	-	512 (-)	128 (-)	-	-	256 (-)	512 (-)	-	-	-	32 (256)
<b><i>Providencia stuartii</i></b>												
<b>ATCC29916</b>	<b>8</b> (-)	256 (-)	512 (-)	512 (-)	512 (-)	1024 (-)	256 (-)	-	-	-	-	64 (256)
<b>NEA16</b>	1024 (-)	-	512 (-)	256 (-)	512 (-)	-	512 (-)	-	512 (-)	-	1024 (-)	64 (256)
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>												
<b>PA01</b>	<b>64</b> (-)	256 (-)	512 (-)	64 (-)	-	1024 (-)	1024 (-)	512 (-)	-	-	-	64 (-)
<b>PA124</b>	256 (-)	512 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	256 (-)

- : CMI > 1024 µg/ml ou non déterminé ; CHL : Chloramphénicol

### III.1.3. Fractionnement bioguidé de l'extrait des feuilles de *Acacia polyacantha* et isolement des composés bioactifs

Les structures chimiques des composés isolés des feuilles de *A. polyacantha* ont été déterminées en utilisant des données RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ), en comparaison avec la littérature (Figure 8). Les composés identifiés sont : le stigmastérol  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$  (**1**; point de fusion (p.f): 134-135°C; m/z 414) (Chatuverdula et Prakash, 2012), la  $\beta$ -amyrine  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$  (**2**; p.f:187-190°C; m/z 426) (Mahato et Kundu, 1994), le 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylstigmastérol  $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_6$  (**3**; p.f : 272- 274°C; m/z 412) (Freire et *al.*, 2005), le 3-*O*-méthyl-D-chiro-inositol  $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_6$  (**4**; p.f : 181°C; m/z 217;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : +60,00) (Sharma *et al.*, 2016), l'épicatéchine  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$  (**5**; p.f : 345-350°C; m/z 270) (Adnyana *et al.*, 2000), la quercétine-3-*O*-glucoside  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$  (**6**; p. f : 230-232°C; m/z 464) (Xu *et al.*, 2012), l'acide 3-*O*- [ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl] -oléanolique  $\text{C}_{41}\text{H}_{66}\text{O}_{12}$  (**7**; p.f : 216-217°C; m/z 773;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :+ 23,2° (c 1,25; MeOH)) (Fotso *et al.*, 2018) et l'acide 3-*O*-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oléanolique  $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$  (**8**; poudre amorphe; m/z 803) (Chatuverdula et Prakash, 2012). Les spectres de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  et les déplacements chimiques majeurs sont disponibles à l'annexe.



1: stigmasterol; 2:  $\beta$ -amyrine; 3: 3- $O$ - $\beta$ -D-glucopyranosylstigmasterol; 4: 3- $O$ -methyl-D-chiro-inositol; 5: epicatechine; 6: quercetin-3- $O$ -glucoside; 7: acide 3- $O$ -[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oléanolique; 8: acide 3- $O$ -[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oléanolique.

**Figure 8:** Structure chimique des composés isolés de *Acacia polyacantha*.

### III.1.3.2. Activités antibactériennes des fractions et produits de *Acacia polyacantha*

Les fractions et les composés isolés de *A. polyacantha* ont été testés pour leur activité antimicrobienne contre 09 bactéries Gram négatif. Les résultats sont présentés dans le tableau VI. De ce tableau, il ressort que les fractions ou produits testées présentent une activité bactériostatique vis-à-vis des souches étudiées, car les rapports de CMB/CMI était généralement supérieurs à 4, aucune valeur de CMB  $\leq$  1024  $\mu\text{g/ml}$  n'a été enregistrée pour les fractions et les composés. La fraction APFc ainsi que les composés **1** (Stigmastérol), **2** ( $\beta$ -amyrine) et **3** (le 3-*O*- $\beta$ -D-glucoopyranosylstigmastérol) n'étaient pas actifs. Les valeurs de CMI  $\leq$  512  $\mu\text{g/ml}$  pour les fractions et  $\leq$  256  $\mu\text{g/ml}$  pour les composés ont été obtenues contre 8 bactéries sur 9 testées (88,9%) pour APFb, APFd et contre 7/9 (77,8%) pour le composé **8** (Tableau VI).

**Tableau VI:** Activité antibactérienne en µg/ml des fractions et produits de *Acacia polyacantha* (APF) sur un panel de bactéries testées

Souches bactériennes	CMI et (CMB) en µg/ml								Antibiotiques de référence chloramphenicol
	Fractions d'APF			Composés isolés					
	APFa	APFb	APFd	4	5	6	7	8	
<i>Escherichia coli</i>									
ATCC8739	-	16 (-)	16 (-)	-	-	-	-	32 (-)	2 (64)
AG102	-	128 (-)	64 (-)	256 (-)	-	128 (-)	-	32 (-)	32 (256)
<i>Enterobacter aerogenes</i>									
ATCC13048	-	256 (-)	8 (-)	128 (-)	64 (-)	-	-	32 (-)	16 (128)
EA27	-	-	128 (-)	256 (-)	256 (-)	-	-	-	32 (256)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>									
ATCC11229	16 (-)	64 (-)	16 (-)	64 (-)	32 (-)	-	-	32 (-)	32 (256)
KP55	-	16 (-)	64 (-)	128 (-)	256 (-)	-	128 (-)	32 (-)	64 (256)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>									
PA01	-	128 (-)	64 (-)	-	-	-	-	-	64 (-)
PA124	-	256 (-)	64 (-)	256 (-)	128 (-)	-	-	32 (-)	256 (-)
<i>Providencia stuartii</i>									
ATCC29916	-	128 (-)	-	-	-	-	-	64 (-)	64 (256)

(-): CMI > 512 µg/ml pour les fractions ou >256 µg/ml pour les composés; APF: extrait des feuilles; APFa, APFb et APFd sont des fractions de APF; **1**: stigmastérol, **2**: β-amyrine, **3**: 3-*O*-β-D-glucopyranosylstigmastérol, **4**: 3-*O*-méthyl-D-chiro-inositol, **5**: épicatechine, **6**: quercétine-3-*O*-glucoside, **7**: acide 3-*O*- [β-D-xylopyranosyl-(1→4)-β-D-galactopyranosyl] oléanolique, **8**: acide 3-*O*- [β-galactopyranosyl-(1→4)-β-D-galactopyranosyl]-oléanolique; Valeurs CMI en gras: effet antibactérien significatif (Xu *et al.*, 2012). Notes: Les CMI de la fraction APFc étaient > 512 µg/ml (inactif) et les CMI des composés **1**, **2**, **3** étaient > 256 µg/ml (inactif) sur toutes les bactéries testées.

### III.1.3. Mécanisme de résistance: Implication de l'efflux dans la multirésistance bactérienne de l'extrait brut des feuilles et des produits de *Acacia polyacantha*.

L'extrait brut, les fractions, le composé isolé (le plus actif) des feuilles de *A. polyacantha* et l'antibiotique de référence (APF, APFb, APFd, composé **8**: acide 3-O- [ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D- galactopyranosyl]-oleanolique, CHL) ont été testés en présence de l'inhibiteur des pompes à efflux contre 9 souches bactériennes à phénotypes multirésistants (TableauVII). Les résultats ont montré que le PA $\beta$ N améliore l'activité des APF, APFb, APFd et du composé **8** sur toutes les bactéries testées, en diminuant leurs valeurs de CMI avec des facteurs d'amélioration de l'activité (FAA) variant de 2 à  $\geq$  à **128**. En présence du PA $\beta$ N, la fraction APFd et le composé **8** exerce une activité remarquable sur les souches multirésistantes *E. aerogene* EA27 et *P. aeruginosa* PA01 avec des FAA allant jusqu'à  $\geq$  à **128**. En présence du PA $\beta$ N, ces derniers (APFd et composé **8**) exerce une grande activité antibactérienne sur les souches testées que celle de l'antibiotique de référence (CHL).

**Tableau VII:** Concentration Minimale Inhibitrice (en µg/ml) de l'extrait brut des feuilles de *Acacia polyacantha* (APF), fractions actives (APFa et APFd), l'acide 3-*O*-[β-galactopyranosyl-(1→4)-β-D-galactopyranosyl]-oleanolique (**8**) issus de l'extrait brut des feuilles de *Acacia polyacantha* et le chloramphénicol en présence du PABN contre un panel de bactéries Gram négatif sélectionnées.

Souches bactérienne	CMI en µg/ml des échantillons testés en présence du PABN et facteur d'amélioration de l'activité entre parenthèse									
	Extrait des feuilles		Fractions d'APF				Composés isolés		Antibiotique de référence	
	APF		APFb		APFd		<b>8</b>		Chloramphenicol	
	CMI	CMI + I	CMI	CMI + I	CMI	CMI + I	CMI	CMI + I	CMI	CMI + I
<i>Escherichia coli</i>										
ATCC8739	1024	256 (4)	16	4 (4)	16	2 (8)	32	≤ 2 (≥ 16)	2	≤ 2 (≥ 1)
AG102	512	64 (8)	128	32 (2)	64	8 (16)	32	≤ 2 (≥ 16)	32	4 (8)
<i>Enterobacter aerogenes</i>										
ATCC13048	256	64 (4)	256	4 (2)	8	≤ 4 (≥ 64)	32	≤ 2 (≥ 16)	16	2 (8)
EA27	1024	16 (64)	-	64 (2)	128	4 (128)	-	64 (4)	32	4 (8)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>										
ATCC11229	1024	128 (8)	64	≤ 4 (≥ 4)	16	≤ 4 (≥ 16)	32	≤ 2 (≥ 16)	32	4 (8)
KP55	-	128 (8)	16	32 (2)	64	4 (4)	32	≤ 2 (≥ 16)	64	16 (4)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>										
PA01	64	128 (0.5)	128	32 (2)	64	32 (4)	-	≤ 2 (≥ 128)	64	8 (8)
PA124	256	128 (2)	256	32 (2)	64	128 (2)	32	16 (2)	256	64 (4)
<i>Providencia stuartii</i>										
ATCC29916	8	≤ 4 (≥ 2)	128	32 (16)	-	32 (4)	64	16 (4)	64	16 (4)

(-): CMI > 1024 µg/ml pour l'extrait brut APF, > 512 µg/ml pour les fractions APFb et APFd, > 256 µg/mL pour l'acide 3-*O*- [β-galactopyranosyl-(1→ 4)-β-D-galactopyranosyl]-oléanolique (**8**); I : inhibiteur des pompes à efflux (PABN) ; () : facteur d'amélioration de l'activité en présence du PABN à 30 µg/ml; valeur en gras: effets antibactériens significatifs (Chen *et al.*, 2012) pour la CMI et augmentation significative de l'activité en présence du PABN (Gavaric *et al.*, 2014 ; Chaturvela *et al.*, 2014); L'augmentation de l'activité = CMI de l'échantillon testé seul par rapport à la CMI de l'échantillon en présence du PABN.



### III.1.4. Mécanismes d'action

#### III.1.4.1. Concentration sub-inhibitrice et effets des associations antibiotiques-extrait des feuilles et composés (7, 8) de *Acacia polyacantha*.

Une étude préliminaire réalisée sur *P. aeruginosa* (PA124) a permis de choisir les concentrations sub-inhibitrices appropriées des échantillons pour continuer les associations sur les autres souches. Les résultats sont consignés dans le Tableau VIII ci-après. Il ressort de ce tableau que l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* (APF) ainsi que les composés **7** (acide 3-*O*- [ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]) et **8** (acide 3-*O*- [ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolique) potentialisent modérément l'activité de 50% (4/8) des antibiotiques testés (NFX, CIP, DOX et GEN) aux concentrations CMI/2 et CMI/4, en diminuant leurs valeurs de CMI avec un facteur d'amélioration de l'activité (FAA) variant de 2 à 4. L'extrait brut des écorces de *A. polyacantha* (APE) potentialise modérément l'activité de la DOX et l'ERY en diminuant les valeurs de CMI de 2 à 4 fois (FAA 2 à 4) aux concentrations CMI/2 et CMI/4 (Tableau VIII début et Tableau VIII suite et fin). Le composé **1** (Stigmasterol) améliore l'activité de la CLX et de la DOX en abaissant leurs valeurs de CMI de  $> 1$  à 2 (FAA  $> 1$  à 2) à toutes les concentrations (Tableau VIII suite 1). Le composé **3** (3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylstigmastérol) potentialise l'activité de la NFX et de la CIP avec un facteur d'amélioration de l'activité (FAA) de 2 à toutes les concentrations. A la CMI/2, le composé **4** (3-*O*-méthyl-D-chiro-inositol) potentialise l'ERY avec un FAA de 2 (Tableau VIII suite 2). Les composés **5** (epicatechine) et **6** (quercétin-3-*O*-glucoside) potentialisent l'activité de la NFX, la DOX et la GEN avec un FAA de 2 (Tableau VIII suite 3). Le composé **2** ( $\beta$ -amyrine) a été indifférent à tous les antibiotiques testés (Tableau VIII suite 1). Les concentrations sub-inhibitrices de CMI/2 et CMI/4 des feuilles de *A. polyacantha* (APF) ainsi que les composés **7** et **8** ont été choisis pour continuer les associations avec les antibiotiques sur huit souches bactériennes multirésistantes (Tableau IX) car ces composés ont montrés les effets synergiques les plus élevés comparés aux autres échantillons aux concentrations CMI/2 et CMI/4.

L'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* et les composés (**7** et **8**) ont été combinés à huit antibiotiques pour évaluer leurs effets synergiques possibles. Les résultats résumés dans les tableaux IX, X et XI ont montré que les effets synergiques étaient observés avec tous les échantillons testés et plusieurs antibiotiques. Les activités potentialisatrices significatives les plus importantes ont été observées avec le composé **7**, qui a considérablement augmenté

l'activité de tous les antibiotiques avec un pourcentage de souche bactérienne pour les quels une synergie a été observée (PBS) variant de 12% (1/8) à 87% (7/8). Les valeurs de CMI des antibiotiques (ERY, CLX, KAN, GEN, DOX, CHL, NOR et CIP) diminuent avec un facteur FAA variant de 2 à 8 aux concentrations CMI/2 et CMI/4 (Tableau XI début ; Tableau XI suite et fin). A la CMI/2, le composé **8** potentialise significativement l'ERY avec un PBS de 75% (6/8). Les facteurs FAA varient de 2 à 4. Ce composé potentialise également l'activité de la DOX (PSB 62%, 5/8) avec des facteurs FAA variant entre 2 à > 4 (Tableau X début ; Tableau X suite et fin). L'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* potentialise l'activité de l'ERY, la GEN et la CIP avec un PSB de 50% (4/8). Cet extrait diminue les valeurs des CMI avec des facteurs FAA variant de 2 à 8 (Tableau IX début ; Tableau IX suite et fin).

A la CMI/2, le pourcentage de souches bactériennes pour lequel l'effet synergique a été observé (PSB  $\geq$  50%) était lorsque l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* était associé à l'ERY et la CIP (Tableau IX), lorsque le composé **7** était associé à l'ERY, la KAN et la GEN (Tableau X), lorsque le composé **8** était combiné avec l'ERY et la DOX (Tableau XI).

À la CMI/4, le PSB  $\geq$  50% a été obtenu en combinant l'extrait d'APF avec la GEN et la CIP (tableau IX), en combinant le composé **7** avec l'ERY et la GEN (Tableau X) ; en combinant le composé **8** avec ERY et NOR (Tableau XI).

**Tableau VIII:** Évaluation préliminaire de l'activité modulatrice de la résistance aux antibiotiques des échantillons sélectionnés à des concentrations sub-inhibitrices contre *Pseudomonas aeruginosa* PA124 (debut)

Extrait de plante	Concentration d'extrait	CMI de l'antibiotique seul ( $\mu\text{g/ml}$ ) et en association avec les extraits (facteur d'amélioration de l'activité)							
		KAN	NFX	CIP	CLX	DOX	ERY	CHL	GEN
APF	0	8	64	64	> 1024	64	256	256	128
	CMI/2	8 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>16 (4)<sup>S</sup></b>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	> 256 (> 1) <sup>a</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>64 (2)<sup>S</sup></b>
	CMI/4	8 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>16 (4)<sup>S</sup></b>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>64 (2)<sup>S</sup></b>
	CMI/8	8 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	64 (1)	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 256 (> 1) <sup>a</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
	CMI/16	8 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
APC	CMI/2	>256 (< 0.031) <sup>a</sup>	> 128 (<0.5) <sup>a</sup>	> 64 (< 1) <sup>a</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>64 (4)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	> 256 (> 1) <sup>a</sup>
	CMI/4	16 (0.5) <sup>a</sup>	> 128 (<0.5) <sup>a</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>64 (4)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	> 256 (> 0.5) <sup>a</sup>
	CMI/8	8 (1) <sup>I</sup>	> 128 (<0.5) <sup>a</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 256 (> 1) <sup>a</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	> 256 (> 0.5) <sup>a</sup>
	CMI/16	8 (1) <sup>I</sup>	> 128 (<0.5) <sup>a</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 256 (> 1) <sup>a</sup>	256 (1)	128 (1) <sup>I</sup>

( ) : facteur d'amélioration de l'activité ; a : antagoniste ; I : indifférence ; s : synergy ; CMI= > 1024 $\mu\text{g/ml}$  pour les feuilles et les écorces, > 256  $\mu\text{g/mL}$  pour les composés **1**, **2** et **3**; CHL: chloramphenicol, CIP: ciprofloxacine; ERY: erythromycine, KAN: kanamycine, GEN: Gentamycine, NFX: norfloxacine; DOX: doxycycline; CLX : cloxacilline.

**Tableau VIII :** Évaluation préliminaire de l'activité modulatrice de la résistance aux antibiotiques des échantillons sélectionnés à des concentrations sub-inhibitrices contre *Pseudomonas aeruginosa* PA124 (suite 1)

Extrait de plante	Concentration d'extrait	CMI de l'antibiotique seul ( $\mu\text{g/ml}$ ) et en association avec les extraits (facteur d'amélioration de l'activité)							
		KAN	NFX	CIP	CLX	DOX	ERY	CHL	GEN
<b>Composé 1</b>	0	8	64	64	> 1024	64	256	256	128
	CMI/2	8 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 64 (< 1) <sup>a</sup>	<b>1024 (1)<sup>S</sup></b>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
	CMI/4	8 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	<b>1024 (1)<sup>S</sup></b>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (0.5) <sup>a</sup>
	CMI/8	8 (1) <sup>II</sup>	64 (0.5) <sup>a</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	<b>1024 (1)<sup>S</sup></b>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
	CMI/16	8 (1) <sup>I</sup>	64 (0.5) <sup>a</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	<b>1024 (1)<sup>S</sup></b>	64 (1) <sup>I</sup>	> 256 (> 1) <sup>a</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>64 (2)<sup>S</sup></b>
	<b>Composé 2</b>	CMI/2	64 (0.25) <sup>a</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>
CMI/4		8 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
CMI/8		8 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
CMI/16		8 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>

( ) : facteur d'amélioration de l'activité ; a : antagoniste ; I : indifférence ; s : synergy ; CMI= > 1024 $\mu\text{g/ml}$  pour les feuilles et les écorces, > 256  $\mu\text{g/mL}$  pour les composés **1, 2 et 3**; CHL: chloramphenicol, CIP: ciprofloxacine; ERY: erythromycine, KAN: kanamycine, GEN: Gentamycine, NFX: norfloxacine; DOX: doxycycline; CLX : cloxacilline.

**Tableau VIII :** Évaluation préliminaire de l'activité modulatrice de la résistance aux antibiotiques des échantillons sélectionnés à des concentrations sub-inhibitrices contre *Pseudomonas aeruginosa* PA124 (suite 2)

Extrait de plante	Concentration d'extrait	CMI de l'antibiotique seul ( $\mu\text{g/ml}$ ) et en association avec les extraits (facteur d'amélioration de l'activité)							
		KAN	NFX	CIP	CLX	DOX	ERY	CHL	GEN
<b>Composé 3</b>	0	8	64	64	> 1024	64	256	256	128
	CMI/2	8 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	>1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
	CMI/4	8 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
	CMI/8	8 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
	CMI/16	8 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
	<b>Composé 4</b>	CMI/2	8 (1) <sup>I</sup>	128 (0.5) <sup>a</sup>	<b>8 (4)<sup>S</sup></b>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>
CMI/4		8 (1) <sup>I</sup>	128 (0.5) <sup>a</sup>	<b>8 (4)<sup>S</sup></b>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	128 (0.5) <sup>a</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
CMI/8		8 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	>1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
CMI/16		8 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>

( ) : facteur d'amélioration de l'activité ; a : antagoniste ; I : indifférence ; s : synergy ; CMI= > 1024 $\mu\text{g/ml}$  pour les feuilles et les écorces, > 256  $\mu\text{g/mL}$  pour les composés **1, 2 et 3**; CHL: chloramphenicol, CIP: ciprofloxacine; ERY: erythromycine, KAN: kanamycine, GEN: Gentamycine, NFX: norfloxacine; DOX: doxycycline; CLX : cloxacilline.

**Tableau VIII :** Évaluation préliminaire de l'activité modulatrice de la résistance aux antibiotiques des échantillons sélectionnés à des concentrations sub-inhibitrices contre *Pseudomonas aeruginosa* PA124 (suite 3)

Extrait de plante	Concentration d'extrait	CMI de l'antibiotique seul ( $\mu\text{g/ml}$ ) et en association avec les extraits (facteur d'amélioration de l'activité)							
		KAN	NFX	CIP	CLX	DOX	ERY	CHL	GEN
<b>Composé 5</b>	0	8	64	64	> 1024	64	256	256	128
	CMI/2	8 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	>1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
	CMI/4	8 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	>1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
	CMI/8	8 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	>1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
	CMI/16	8 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	>1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
	<b>Composé 6</b>	CMI/2	128 (0.062) <sup>a</sup>	128 (0.5) <sup>a</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	>1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	> 256 (< 1) <sup>a</sup>	256 (1) <sup>I</sup>
CMI/4		128 (0.062) <sup>a</sup>	128 (0.5) <sup>a</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	> 256 (< 1) <sup>a</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
CMI/8		128 (0.062) <sup>a</sup>	128 (0.5) <sup>a</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 256 (< 1) <sup>a</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (0.5) <sup>a</sup>
CMI/16		128 (0.062) <sup>a</sup>	128 (0.5) <sup>a</sup>	> 64 (> 0.5) <sup>a</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	>256 (<1) <sup>a</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>

( ) : facteur d'amélioration de l'activité ; a : antagoniste ; I : indifférence ; s : synergy ; CMI= > 1024 $\mu\text{g/ml}$  pour les feuilles et les écorces, > 256  $\mu\text{g/mL}$  pour les composés **1, 2 et 3**; CHL: chloramphenicol, CIP: ciprofloxacine; ERY: erythromycine, KAN: kanamycine, GEN: Gentamycine, NFX: norfloxacine; DOX: doxycycline; CLX : cloxacilline.

**Tableau VIII :** Évaluation préliminaire de l'activité modulatrice de la résistance aux antibiotiques des échantillons sélectionnés à des concentrations sub-inhibitrices contre *Pseudomonas aeruginosa* PA124 (suite et fin)

Extrait de plante	Concentration d'extrait	CMI de l'antibiotique seul ( $\mu\text{g/ml}$ ) et en association avec les extraits (facteur d'amélioration de l'activité)							
		KAN	NFX	CIP	CLX	DOX	ERY	CHL	GEN
Composé 7	0	8	64	64	> 1024	64	256	256	128
	CMI/2	16 (0.5) <sup>a</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	>1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>64 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (0.5) <sup>a</sup>
	CMI/4	16 (0.5) <sup>a</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	>1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>64 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (0.5) <sup>a</sup>
	CMI/8	16 (0.5) <sup>a</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	>1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (0.5) <sup>a</sup>
	CMI/16	16 (0.5) <sup>a</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	>1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (0.5) <sup>a</sup>
Composé 8	CMI/2	8 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	64 (1) <sup>I</sup>	>1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>64 (4)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>64 (2)<sup>S</sup></b>
	CMI/4	8 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	64 (1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	128 (1) <sup>I</sup>
	CMI/8	8 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>64 (4)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (0.5) <sup>a</sup>
	CMI/16	8 (1) <sup>I</sup>	>128 (<0.5) <sup>a</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq 1$ ) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (0.5) <sup>a</sup>

( ) : facteur d'amélioration de l'activité ; a : antagoniste ; I : indifférence ; s : synergy ; CMI= > 1024 $\mu\text{g/ml}$  pour les feuilles et les écorces, > 256  $\mu\text{g/mL}$  pour les composés **1, 2 et 3**; CHL: chloramphenicol, CIP: ciprofloxacine; ERY: erythromycine, KAN: kanamycine, GEN: Gentamycine, NFX: norfloxacine; DOX: doxycycline; CLX : cloxacilline.

**Tableau IX:** Activité modulatrice de la résistance aux antibiotiques de l'extrait brut des feuilles de *Acacia polyacantha* (APF) contre les bactéries Gram négatif multirésistantes (debut).

Antibiotiques	Concentrations	Bactéries, CMI (µg/ml) et facteur d'amélioration de l'activité de l'extrait des feuilles entre parenthèse								
		ATCC8739	AG102	ATCC13048	CM64	KP55	KP63	PA124	NEA16	PSB (%)
ERY	0	128	256	256	256	256	256	256	256	
	CMI/2	256 (0.5) <sup>a</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (8)<sup>S</sup></b>	> 256 (> 1) <sup>a</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	50
	CMI/4	256 (0.5) <sup>a</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	37.5
CLX	0	256	1024	> 1024	> 1024	1024	512	> 1024	> 1024	
	CMI/2	> 1024 (> 0.25) <sup>a</sup>	> 1024 (> 1) <sup>a</sup>	> 1024 (≥ 1) <sup>I</sup>	> 1024 (≥ 1) <sup>I</sup>	> 1024 (> 1) <sup>a</sup>	> 1024 (> 0.5) <sup>a</sup>	> 1024 (≥ 1) <sup>I</sup>	> 1024 (≥ 1) <sup>I</sup>	0
	CMI/4	> 1024 (> 0.25) <sup>a</sup>	> 1024 (> 1) <sup>a</sup>	> 1024 (≥ 1) <sup>I</sup>	> 1024 (≥ 1) <sup>I</sup>	> 1024 (> 1) <sup>a</sup>	> 1024 (> 0.5) <sup>a</sup>	> 1024 (≥ 1) <sup>I</sup>	<b>1024 (1)<sup>S</sup></b>	12.5
KAN	0	16	16	< 2	16	4	64	8	64	
	CMI/2	128(0.125) <sup>a</sup>	64 (0.25) <sup>a</sup>	4 (0.5) <sup>a</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	< 2 (2) <sup>S</sup>	128 (0.5) <sup>a</sup>	8(1) <sup>I</sup>	< 2 (32) <sup>S</sup>	25
	CMI/4	128(0.125) <sup>a</sup>	32 (0.5) <sup>a</sup>	8 (0.25) <sup>a</sup>	<b>8 (2)<sup>S</sup></b>	< 2 (2) <sup>S</sup>	128 (0.5) <sup>a</sup>	8(1) <sup>I</sup>	<b>16 (4)<sup>S</sup></b>	37.5
GEN	0	32	16	16	16	256	32	128	256	
	CMI/2	> 256 (> 0.125) <sup>a</sup>	> 256 (> 0.062) <sup>a</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	> 256 (> 0.125) <sup>a</sup>	<b>64 (2)<sup>S</sup></b>	<b>16 (16)<sup>S</sup></b>	25
	CMI/4	> 256 (> 0.125) <sup>a</sup>	< 2(8) <sup>S</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	< 2 (128) <sup>S</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>64 (2)<sup>S</sup></b>	<b>16 (16)<sup>S</sup></b>	50

ERY: érythromycine; CLX: cloxacilline; KAN: kanamycine; GEN: gentamycine; souches bactériennes: *Escherichia coli* (AG102, ATCC8739); *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048, CM64); *Klebsiella pneumoniae* (KP55, KP63); *P. aeruginosa* PA124; *Providencia stuartii* NEA16; PSB: pourcentage de souche bactérienne sur laquelle une synergie a été observée. ( ): facteur d'améliorant de l'activité des antibiotiques après association avec APF; S: Synergie; I: Indifférence; a: Antagoniste; valeurs en gras: cas de synergie (Gavaric *et al.*, 2014 ; Chaturvela *et al.*, 2012).



**Tableau IX** : Activité modulatrice de la résistance aux antibiotiques de l'extrait brut des feuilles de *Acacia polyacantha* (APF) contre les bactéries Gram négatif multirésistantes (suite et fin).

Antibiotiques	Concentrations	Bactéries, CMI (µg/ml) et facteur d'amélioration de l'activité de l'extrait des feuilles entre parenthèse								
		ATCC8739	AG102	ATCC13048	CM64	KP55	KP63	PA124	NEA16	PSB (%)
DOX	0	< 1	4	16	16	4	8	64	32	
	CMI/2	2 (0.5) <sup>a</sup>	8 (0.5) <sup>a</sup>	32 (0.5) <sup>a</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	4 (1)	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	> 128 (> 25)	025) <sup>a</sup>
	CMI/4	< 1 (≤ 1) <sup>I</sup>	8 (0.5) <sup>a</sup>	32 (0.5) <sup>a</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	< 1 (> 4) <sup>S</sup>	8 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 128 (> 14.28)	025) <sup>a</sup>
CHL	0	2	32	16	256	64	32	256	64	
	CMI/2	2 (1) <sup>I</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	> 16 (> 1) <sup>a</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	0
	CMI/4	2 (1) <sup>I</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	> 16 (> 1) <sup>a</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	6 (1) <sup>I</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	0
NOR	0	4	8	32	32	8	8	64	32	
	CMI/2	32 (0.125) <sup>a</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	<b>16 (2)<sup>S</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	25
	CMI/4	> 128 (> 0.031) <sup>a</sup>	> 128 (> 0.062) <sup>a</sup>	<b>16 (2)<sup>S</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	> 128 (> 0.062) <sup>a</sup>	> 128 (> 0.062) <sup>a</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	25
CIP	0	< 0.5	1	8	8	< 0.5	1	64	8	
	CMI/2	16 (0.031) <sup>a</sup>	16 (0.0625) <sup>a</sup>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	16 (0.031) <sup>a</sup>	8 (0.125) <sup>a</sup>	<b>16 (4)<sup>S</sup></b>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	50
	CMI/4	16 (0.031) <sup>a</sup>	16 (0.0625) <sup>a</sup>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	16 (0.031) <sup>a</sup>	8 (0.125) <sup>a</sup>	<b>16 (4)<sup>S</sup></b>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	50

DOX: doxycycline; CHL: chloramphénicol; NOR: norfloxacine; CIP: ciprofloxacine; souches bactériennes: *Escherichia coli* (AG102, ATCC8739); *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048, CM64); *Klebsiella pneumoniae* (KP55, KP63); *P. aeruginosa* PA124; *Providencia stuartii* NEA16; PBS: pourcentage de souche bactérienne sur laquelle une synergie a été observée. ( ): facteur d'améliorant de l'activité des antibiotiques après association avec APF; S: Synergie; I: Indifférence; a: Antagoniste; valeurs en gras: cas de synergie (Gavaric *et al.*, 2014 ; Chaturvela *et al.*, 2012)

**Tableau X:** Activité modulatrice de la résistance aux antibiotiques de l'acide 3-*O*- [ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl] oleanolique (**7**) contre les bactéries Gram négatif multirésistantes (début)

Antibiotiques	Concentrations	Bactéries, CMI ( $\mu$ g/ml) et facteur d'amélioration de l'activité du composé 7 entre parenthèse								
		ATCC8739	AG102	ATCC13048	CM64	KP55	KP63	PA124	NEA16	PSB (%)
ERY	0	128	256	256	256	256	256	256	256	
	CMI/2	256 (0.5) <sup>a</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	<b>64 (4)<sup>S</sup></b>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	64 (2) <sup>S</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>75</b>
	CMI/4	256 (0.5) <sup>a</sup>	<b>64 (4)<sup>S</sup></b>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	64 (2) <sup>S</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	<b>87.5</b>
CLX	0	256	1024	> 1024	> 1024	1024	512	> 1024	> 1024	
	CMI/2	512 (0.5) <sup>a</sup>	> 1024 (> 1) <sup>a</sup>	<b>1024 (1)<sup>S</sup></b>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>I</sup>	<b>512 (2)<sup>S</sup></b>	<b>128 (4)<sup>S</sup></b>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>I</sup>	37.5
	CMI/4	512 (0.5) <sup>a</sup>	1024 (1) <sup>I</sup>	<b>1024 (1)<sup>S</sup></b>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>I</sup>	<b>128 (8)<sup>S</sup></b>	> 1024 (> 0.5) <sup>a</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>I</sup>	<b>1024 (1)<sup>S</sup></b>	37.5
KAN	0	16	16	< 2	16	4	64	8	64	
	CMI/2	128 (0.125) <sup>a</sup>	128 (0.125) <sup>a</sup>	< 2 ( $\leq$ 1) <sup>I</sup>	< 2 (> 8) <sup>S</sup>	< 2 (> 2) <sup>S</sup>	16 (4) <sup>S</sup>	16 (0.5) <sup>a</sup>	<b>16 (4)<sup>S</sup></b>	50
	CMI/4	128 (0.125) <sup>a</sup>	64 (0.25) <sup>a</sup>	< 2 ( $\leq$ 1) <sup>I</sup>	< 2 (> 8) <sup>S</sup>	< 2 (> 2) <sup>S</sup>	256 (0.25) <sup>a</sup>	16 (0.5) <sup>a</sup>	<b>4 (16)<sup>S</sup></b>	37.5
GEN	0	32	16	16	16	256	32	128	256	
	CMI/2	64 (0.5) <sup>a</sup>	> 256 (> 0.062) <sup>a</sup>	<b>4 (4)<sup>S</sup></b>	< 2 (> 8) <sup>S</sup>	< 2 ( <b>128</b> ) <sup>S</sup>	<b>16 (2)<sup>S</sup></b>	256 (0.5) <sup>a</sup>	<b>4 (64)<sup>S</sup></b>	62.5
	CMI/4	256 (0.125) <sup>a</sup>	> 256 (0.062) <sup>a</sup>	<b>4 (4)<sup>S</sup></b>	< 2 (> 8) <sup>S</sup>	< 2 ( <b>128</b> ) <sup>S</sup>	256 (0.125) <sup>a</sup>	256 (0.5) <sup>a</sup>	<b>4 (64)<sup>S</sup></b>	50

ERY: érythromycine; CLX: cloxacilline; KAN: kanamycine; GEN: gentamycine; souches bactériennes: *Escherichia coli* (AG102, ATCC8739); *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048, CM64); *Klebsiella pneumoniae* (KP55, KP63); *P. aeruginosa* PA124; *Providencia stuartii* NEA16 ; PBS: pourcentage de souche bactérienne sur laquelle une synergie a été observée. ( ): facteur d'améliorant de l'activité des antibiotiques après association avec le composé 7 ; S: Synergie; I: Indifférence; a: Antagoniste; valeurs en gras: cas de synergie (Gavaric *et al.*, 2014 ; Chaturvela *et al.*, 2012).

**Tableau X** : Activité modulatrice de la résistance aux antibiotiques de l'acide 3-*O*- [ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl] oleanolique (7) contre les bactéries Gram négatif multirésistantes (suite et fin).

Antibiotiques	Concentrations	Bactéries, CMI ( $\mu$ g/ml) et facteur d'amélioration de l'activité du composé 7 entre parenthèse								
		ATCC8739	AG102	ATCC13048	CM64	KP55	KP63	PA124	NEA16	PSB (%)
DOX	0	< 1	4	16	16	4	8	64	32	
	CMI/2	< 1 ( $\leq$ 1) <sup>I</sup>	8 (0.5) <sup>a</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	4 (1) <sup>I</sup>	<b>2 (4)<sup>S</sup></b>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>16 (2)<sup>S</sup></b>	37.5
	CMI/4	4 (0.25) <sup>a</sup>	4 (1) <sup>I</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	4 (1) <sup>I</sup>	<b>2 (4)<sup>S</sup></b>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>16 (2)<sup>S</sup></b>	37.5
CHL	0	2	32	16	256	64	32	256	64	
	CMI/2	2 (1) <sup>I</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	0
	CMI/4	2 (1) <sup>I</sup>	<b>16 (2)<sup>S</sup></b>	16 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	<b>16 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	25
NOR	0	4	8	32	32	8	8	64	32	
	CMI/2	64 (0.062) <sup>a</sup>	32 (0.25) <sup>a</sup>	<b>16 (2)<sup>S</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	8 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	25
	CMI/4	64 (0.062) <sup>a</sup>	32 (0.25) <sup>a</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	32 (0.25) <sup>a</sup>	8 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	12.5
CIP	0	< 0.5	1	8	8	< 0.5	1	64	8	
	CMI/2	2 (0.25) <sup>a</sup>	8 (0.125) <sup>a</sup>	<b>1 (8)<sup>S</sup></b>	8 (1) <sup>I</sup>	8 (0.062) <sup>a</sup>	4 (0.25) <sup>a</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	37.5
	CMI/4	8 (0.062) <sup>a</sup>	4 (0.25) <sup>a</sup>	<b>2 (4)<sup>S</sup></b>	8 (1) <sup>I</sup>	2 (0.25) <sup>a</sup>	4 (0.25) <sup>a</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	37.5

DOX: doxycycline; CHL: chloramphénicol; NOR: norfloxacine; CIP: ciprofloxacine; souches bactériennes: *Escherichia coli* (AG102, ATCC8739); *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048, CM64); *Klebsiella pneumoniae* (KP55, KP63); *P. aeruginosa* PA124; *Providencia stuartii* NEA16; PBS: pourcentage de souche bactérienne sur laquelle une synergie a été observée. (I): facteur d'améliorant de l'activité des antibiotiques après association avec le composé 7 ; S: Synergie; I: Indifférence; a: Antagoniste; valeurs en gras: cas de synergie (Gavaric *et al.*, 2014 ; Chaturvela *et al.*, 2012).

**Tableau XI:** Activité modulatrice de la résistance aux antibiotiques de l'acide 3-*O*-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oléanolique (**8**) contre les bactéries Gram-négatif multirésistantes (début).

Antibiotiques	Concentrations	Bactéries, CMI ( $\mu$ g/ml) et facteur d'amélioration de l'activité du composé <b>8</b> entre parenthèse								
		ATCC8739	AG102	ATCC13048	CM64	KP55	KP63	PA124	NEA16	PSB (%)
ERY	0	128	256	256	256	256	256	256	256	
	MIC/2	256 (0.5) <sup>a</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	<b>64 (4)<sup>S</sup></b>	<b>64 (4)<sup>S</sup></b>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	<b>75</b>
	MIC/4	128 (1) <sup>I</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>64 (4)<sup>S</sup></b>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	50
CLX	0	256	1024	> 1024	> 1024	1024	512	> 1024	> 1024	
	MIC/2	1024 (0.25) <sup>a</sup>	> 1024 (> 1) <sup>a</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>I</sup>	1024 (1) <sup>I</sup>	1024 (0.5) <sup>a</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>I</sup>	0
	MIC/4	> 1024 (> 0.25) <sup>a</sup>	> 1024 (> 1) <sup>a</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>I</sup>	1024 (1) <sup>I</sup>	> 1024 (> 0.5) <sup>a</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>I</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>I</sup>	0
KAN	0	16	16	< 2	16	4	64	8	64	
	MIC/2	<b>4 (4)<sup>S</sup></b>	64 (0.25) <sup>a</sup>	128 (0.015) <sup>a</sup>	128 (0.125) <sup>a</sup>	<b>&lt; 2 (2)<sup>S</sup></b>	256 (0.25) <sup>a</sup>	8 (1) <sup>I</sup>	128 (0.5) <sup>a</sup>	25
	MIC/4	128 (0.125) <sup>a</sup>	32 (0.25) <sup>a</sup>	128 (0.015) <sup>a</sup>	128 (0.125) <sup>a</sup>	<b>&lt; 2 (2)<sup>S</sup></b>	256 (0.25) <sup>a</sup>	8 (1) <sup>I</sup>	128 (0.5) <sup>a</sup>	12.5
GEN	0	32	16	16	16	256	32	128	256	
	MIC/2	256 (0.125) <sup>a</sup>	64 (0.25) <sup>a</sup>	128 (0.125) <sup>a</sup>	<b>8 (2)<sup>S</sup></b>	<b>64 (4)<sup>S</sup></b>	256 (0.125) <sup>a</sup>	<b>64 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	37.5
	MIC/4	256 (0.125) <sup>a</sup>	> 256 (> 0.062) <sup>a</sup>	128 (0.125) <sup>a</sup>	128 (0.125) <sup>a</sup>	<b>128(2)<sup>S</sup></b>	> 256 (>0.125) <sup>a</sup>	128 (1) <sup>I</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	25

ERY: érythromycine; CLX: cloxacilline; KAN: kanamycine; GEN: gentamycine; souches bactériennes: *Escherichia coli* (AG102, ATCC8739); *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048, CM64); *Klebsiella pneumoniae* (KP55, KP63); *P. aeruginosa* PA124; *Providencia stuartii* NEA16; PBS: pourcentage de souche bactérienne sur laquelle une synergie a été observée. (I): facteur d'améliorant de l'activité des antibiotiques après association avec le composé **8** ; S: Synergie; I: Indifférence; a: Antagoniste; valeurs en gras: cas de synergie (Gavaric *et al.*, 2014 ; Chaturvela *et al.*, 2012).

**Tableau XI** : Activité modulatrice de la résistance aux antibiotiques de l'acide 3-*O*-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oléanolique (**8**) contre les bactéries Gram négatif multirésistantes (suite et fin).

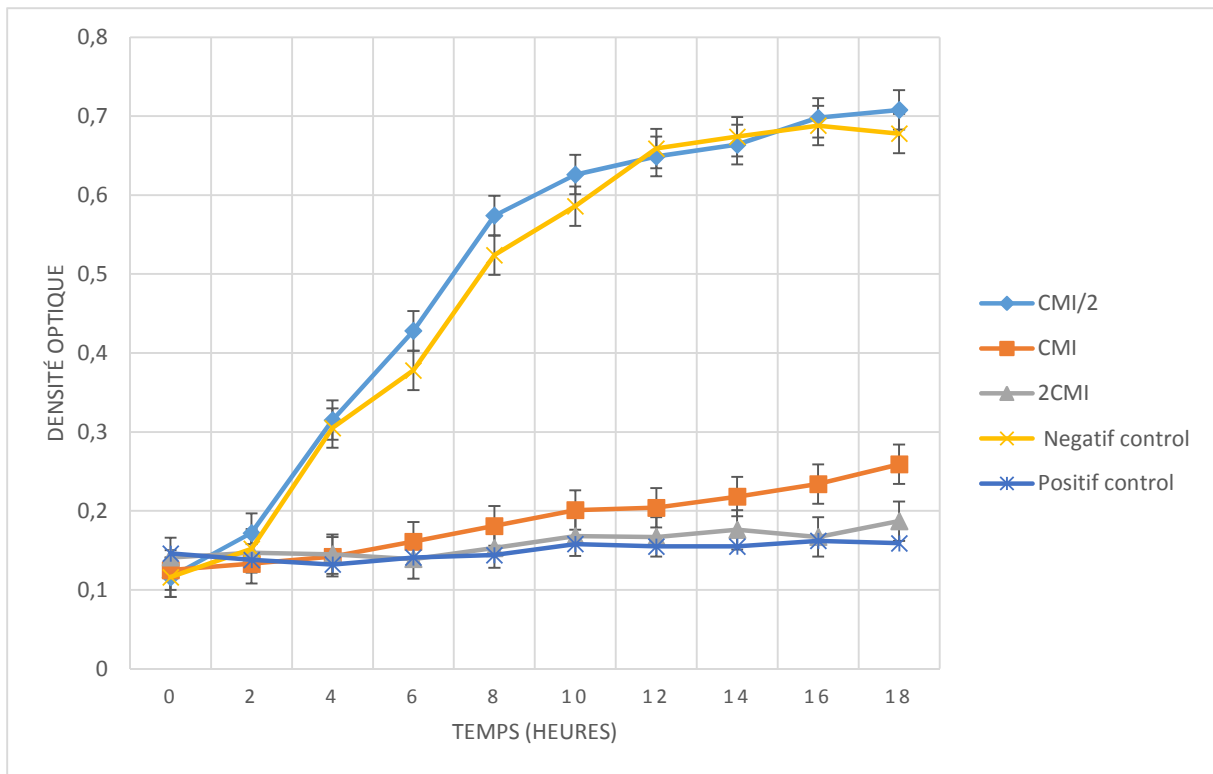
Antibiotiques	Concentrations	Bactéries, CMI ( $\mu$ g/ml) et facteur d'amélioration de l'activité du composé <b>8</b> entre parenthèse								
		ATCC8739	AG102	ATCC13048	CM64	KP55	KP63	PA124	NEA16	PSB (%)
<b>DOX</b>	0	< 1	4	16	16	4	8	64	32	
	CMI/2	< 1 ( $\leq$ 1) <sup>I</sup>	<b>2 (2)<sup>S</sup></b>	16 (1) <sup>I</sup>	32 (0.5) <sup>a</sup>	< 1 (> 4) <sup>S</sup>	<b>2 (4)<sup>S</sup></b>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>16 (2)<sup>S</sup></b>	62.5
	CMI/4	< 1 ( $\leq$ 1) <sup>I</sup>	4 (1) <sup>I</sup>	32 (0.5) <sup>a</sup>	32 (0.5) <sup>a</sup>	< 1 (> 4) <sup>S</sup>	<b>2 (4)<sup>S</sup></b>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	37.5
<b>CHL</b>	0	2	32	16	256	64	32	256	64	
	CMI/2	2 (1) <sup>I</sup>	<b>16 (2)<sup>S</sup></b>	16 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	25
	CMI/4	<b>1 (2)<sup>S</sup></b>	32(1) <sup>I</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	<b>16 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	37.5
<b>NOR</b>	0	4	8	32	32	8	8	64	32	
	CMI/2	<b>2 (2)<sup>S</sup></b>	8 (1) <sup>I</sup>	> 128 (> 0.25) <sup>a</sup>	64 (0.5) <sup>a</sup>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	8 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	128 (0.125) <sup>a</sup>	37.5
	CMI/4	< 1 (> 4) <sup>S</sup>	<b>2 (4)<sup>S</sup></b>	128 (0.25) <sup>a</sup>	64 (0.5) <sup>a</sup>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	128 (0.125) <sup>a</sup>	62.5
<b>CIP</b>	0	< 0.5	1	8	8	< 0.5	1	64	8	
	CMI/2	< 0.5 ( $\leq$ 1) <sup>I</sup>	< <b>0.5 (&gt; 2)<sup>S</sup></b>	64 (0.125) <sup>a</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	< 0.5 ( $\leq$ 1) <sup>I</sup>	4 (0.25) <sup>a</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	12.5
	CMI/4	2 (0.25) <sup>a</sup>	< <b>0.5 (&gt; 2)<sup>S</sup></b>	64 (0.125) <sup>a</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	1 (2) <sup>a</sup>	2 (0.5) <sup>a</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	12.5

DOX: doxycycline; CHL: chloramphénicol; NOR: norfloxacin; CIP: ciprofloxacine; souches bactériennes: *Escherichia coli* (AG102, ATCC8739); *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048, CM64); *Klebsiella pneumoniae* (KP55, KP63); *P. aeruginosa* PA124; *Providencia stuartii* NEA16; PBS: pourcentage de souche bactérienne sur laquelle une synergie a été observée. (I): facteur d'améliorant de l'activité des antibiotiques après association avec le composé **8**; S: Synergie; I: Indifférence; a: Antagoniste; valeurs en gras: cas de synergie (Gavaric *et al.*, 2014 ; Chaturvela *et al.*, 2012).

### III.1.4.2. Effet de l'extrait brut des feuilles de *Acacia polyacantha* et de son composé **8** sur la croissance bactérienne

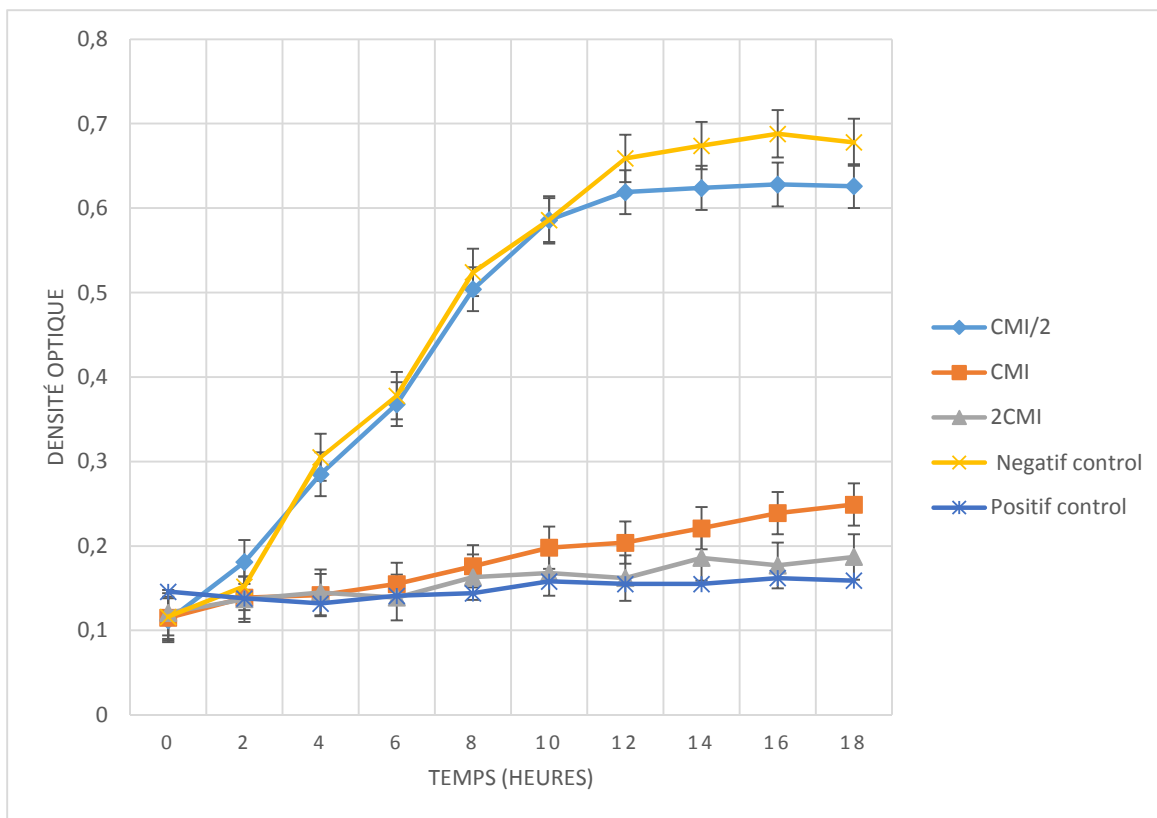
L'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* et le composé **8** ayant montré simultanément les meilleures activités antibactériennes sur la souche de référence *P. stuartii* ATCC29916, nous a permis de sélectionner ce dernier dans le but d'élucider les différents mécanismes d'actions.

L'action de l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* et du composé **8** sur la croissance bactérienne de *P. stuartii* (ATCC29916) a été réalisée et les résultats ont été représentés sur les figures 9 et 10 ci-contre. Les résultats indiquent que les substances d'intérêt interfèrent avec la cinétique de croissance bactérienne à concentration dépendante. En absence de l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* et du composé **8**, les courbes de croissance (contrôle négatif) montrent 3 phases qui sont : la phase de latence, la phase exponentielle et la phase stationnaire. Après 10 heures d'incubation, le composé **8** (l'acide 3-*O*-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oléanolique) à la CMI/2 raccourcit la phase exponentielle. A la CMI, l'extrait brut des feuilles et le composé **8** prolongent de 4 heures la phase de latence, suivie d'une croissance très lente du microorganisme. A la 2 $\times$ CMI, ces substances d'intérêts prolonge la phase de latence jusqu'à la fin de l'expérience.



Chaque point représente la moyenne  $\pm$  ESM ; 0,5 x CMI = Concentration Minimale Inhibitrice multipliée par un demi ; CMI = Concentration Minimale Inhibitrice ; 2 x CMI = Concentration Minimale Inhibitrice multipliée par deux.

**Figure 9:** Effet de l'extrait brut des feuilles de *Acacia polyacantha* sur la cinétique de croissance de *Providencia stuartii* ATCC29916



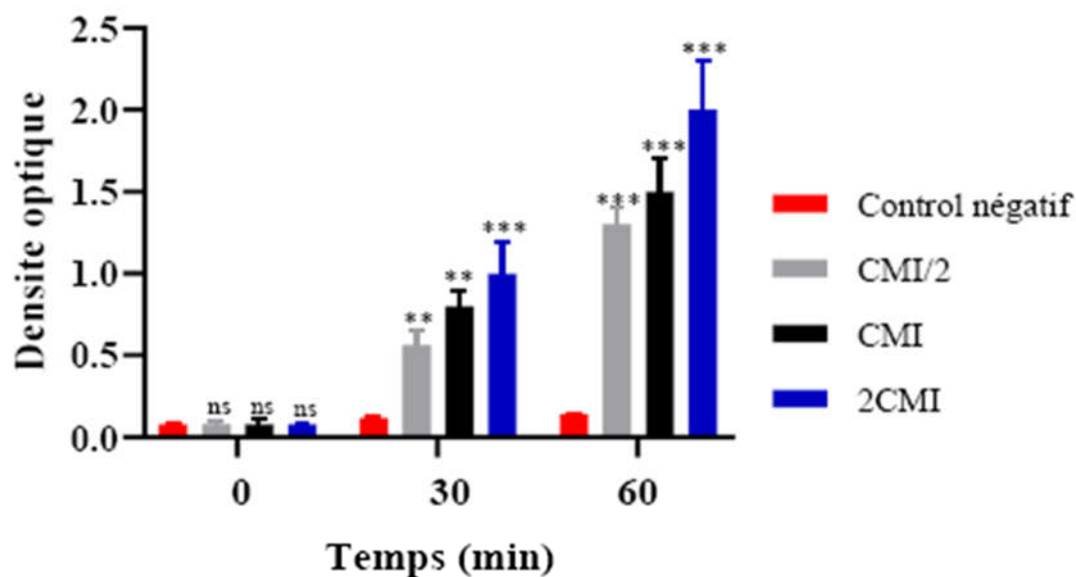
Chaque point représente la moyenne  $\pm$  ESM ; 0,5 x CMI = Concentration Minimale Inhibitrice multipliée par un demi ; CMI = Concentration Minimale Inhibitrice ; 2 x CMI = Concentration Minimale Inhibitrice multipliée par deux.

**Figure 10:** Effet du composé **8** (acide 3-O-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oléanolique) de *Acacia polyacantha* sur la cinétique de croissance de *Providencia stuartii* ATCC29916



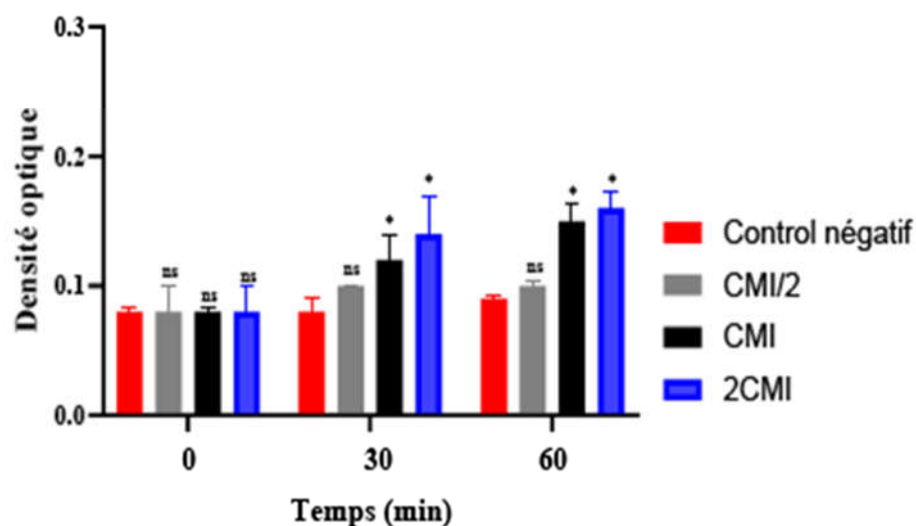
### III.1.4.3. Effet de l'extrait brut des feuilles de *Acacia polyacantha* et de son composé **8** sur la membrane bactérienne

La capacité de l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* et le composé **8** à altérer la membrane bactérienne a été évaluée et les résultats obtenus ont été représentés sur les figures 11, 12 et 13 ci-dessous. L'augmentation de la densité optique du milieu de culture des cellules traitées est proportionnelle à la quantité des éléments du cytoplasme. Cela traduit ainsi la présence des éléments du cytoplasme dans le milieu de culture du fait de l'endommagement de la membrane plasmique. Il ressort de ces figures que la destruction de la membrane bactérienne évolue en fonction du temps et de la concentration de la substance test. Comparativement aux cellules non traitées (control négatif), A t = 0 il n'y a pas de différence significative observée. En effet, la différence significative s'observe au seuil de probabilité 0,01 et 0,001 pour l'extrait brut des feuilles (APF) à partir de la 30<sup>ème</sup> et la 60<sup>ème</sup> minute respectivement. Pour ce qui est du composé **8**, la figure 12 montre une différence significative au seuil de probabilité 0,05 aux concentrations CMI et 2CMI à partir de la 30<sup>ème</sup> minute jusqu'à la fin de l'expérience. L'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* a une plus grande activité sur la membrane plasmique que le composé **8**. Il ressort également de ces figures que l'extrait brut des feuilles (Figure 11) et le composé **8** (Figure 12) altère significativement les membranes bactériennes à partir de la 30<sup>ème</sup> minute contrairement à la polymixine (contrôle positif) qui n'agit qu'à la 60<sup>ème</sup> minute (Figure 13).



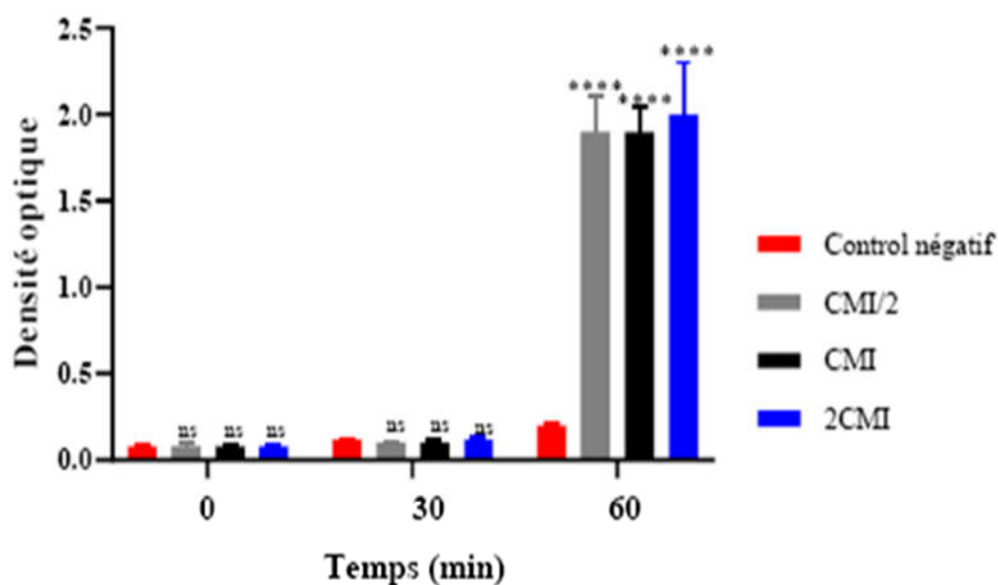
Les valeurs  $p < 0,05$  ont été considérées comme statistiquement significatives et leur degré de significativité a été noté comme \* valeurs  $p < 0,05$  ; \*\* valeurs  $p < 0,01$  ; \*\*\* valeurs  $p < 0,001$  et \*\*\*\* valeurs  $p < 0,0001$ . ns : non significatif ; Chaque point représente la moyenne  $\pm$  ESM ; CMI/2 = Concentration Minimale Inhibitrice multipliée par un demi ; CMI = Concentration Minimale Inhibitrice ; 2 x CMI = Concentration Minimale Inhibitrice multipliée par deux.

**Figure 11:** Effet de l'extrait brut des feuilles de *Acacia polyacantha* sur la membrane plasmique de *Providencia stuartii* ATCC29916.



Les valeurs  $p < 0,05$  ont été considérées comme statistiquement significatives et leur degré de significativité a été noté comme \* valeurs  $p < 0,05$  ; \*\* valeurs  $p < 0,01$  ; \*\*\* valeurs  $p < 0,001$  et \*\*\*\* valeurs  $p < 0,0001$ . ns : non significatif ; Chaque point représente la moyenne  $\pm$  ESM ; CMI/2 = Concentration Minimale Inhibitrice multipliée par un demi ; CMI = Concentration Minimale Inhibitrice ; 2 x CMI = Concentration Minimale Inhibitrice multipliée par deux.

**Figure 12:** Effet du composé 8 de *Acacia polyacantha* sur la membrane plasmique de *Providencia stuartii* ATCC29916



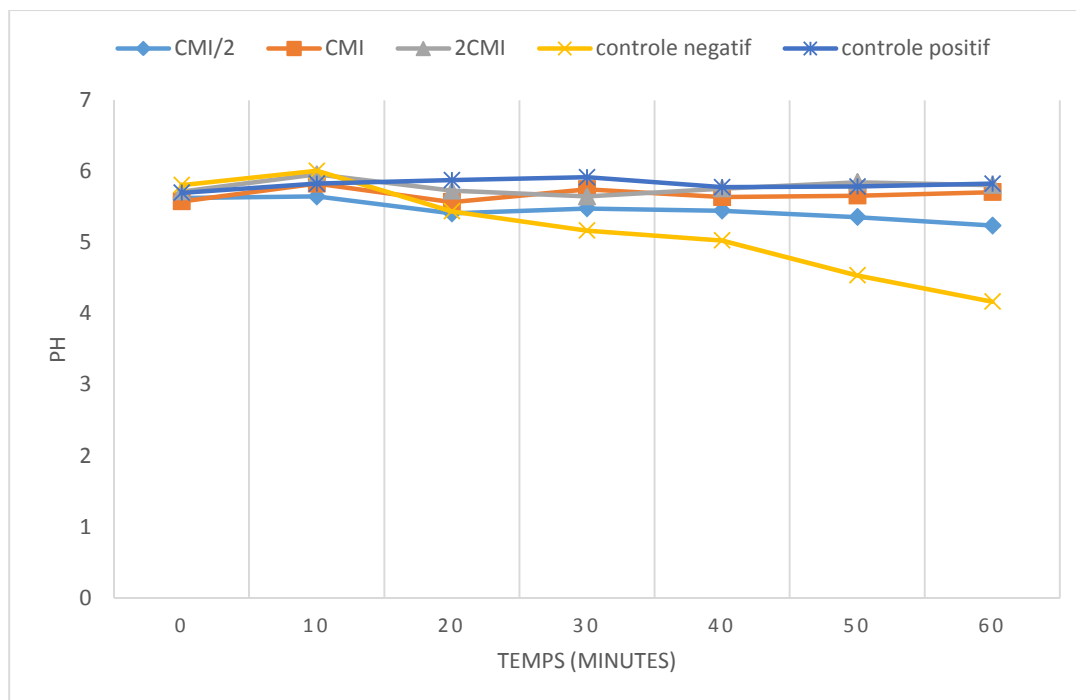
Les valeurs  $p < 0,05$  ont été considérées comme statistiquement significatives et leur degré de significativité a été noté comme \* valeurs  $p < 0,05$  ; \*\* valeurs  $p < 0,01$  ; \*\*\* valeurs  $p < 0,001$  et \*\*\*\* valeurs  $p < 0,0001$ . ns : non significatif ; Chaque point représente la moyenne  $\pm$  ESM ; CMI/2 = Concentration Minimale Inhibitrice multipliée par un demi ; CMI = Concentration Minimale Inhibitrice ; 2 x CMI = Concentration Minimale Inhibitrice multipliée par deux.

**Figure 13:** Effet de la polymyxine sur la membrane plasmique de *Providencia stuartii* ATCC29916.

#### III.1.4.4. Effet de l'extrait brut des feuilles de *Acacia polyacantha* et de son composé **8** sur les pompes à protons $H^+$ -ATPases bactériennes

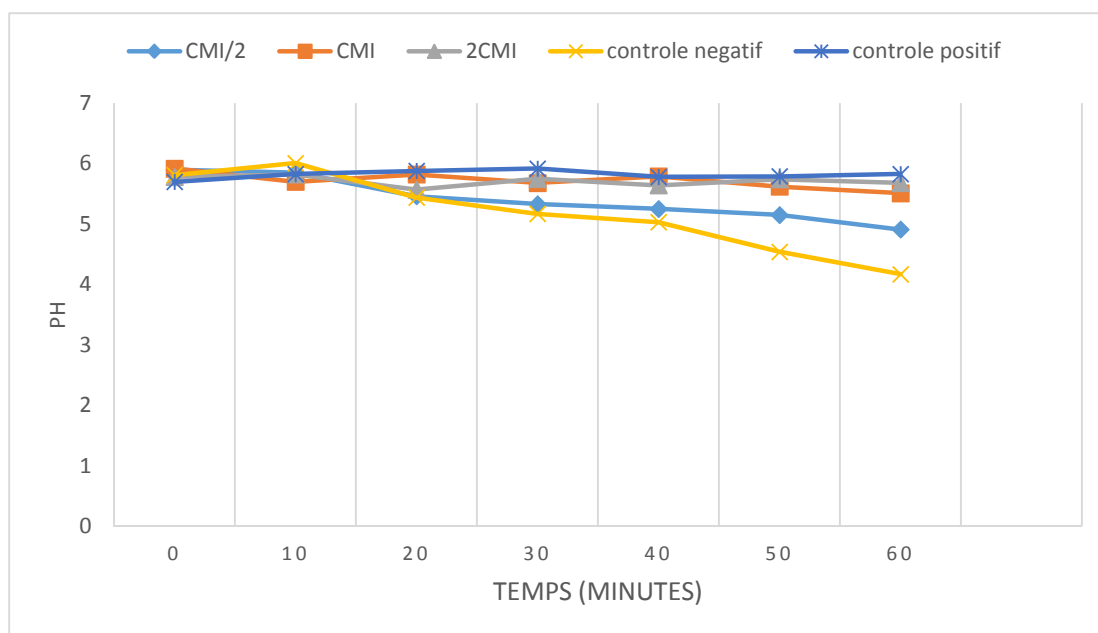
La capacité de l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* et du composé le plus actif (composé **8**) à bloquer les pompes à protons a été évaluée et les résultats ont été représentés dans les figures 14 et 15 ci-dessous. Il ressort de ces figures qu'en absence de l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* et du composé **8** (acide 3-*O*-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oléanolique), il y'a une acidification rapide du milieu induite par le métabolisme du glucose de la dixième minute jusqu'à la fin de l'expérience. Par contre, en présence de l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* aux concentrations CMI/2, CMI et 2x CMI cette acidification n'a pas été observée. Cela se matérialise par une tendance linéaire des courbes correspondantes à ces trois concentrations contrairement à la courbe du contrôle négatif qui tend à décroître avec le temps (Figure 14). En outre, en présence du composé **8** à la CMI/2 il y'a une acidification rapide du milieu de culture de la dixième minute à la vingtième minute, suivie d'une acidification lente jusqu'à la fin de l'expérience. A la CMI et 2CMI, nous n'avons observé aucune acidification du milieu de croissance, car à ces deux

concentrations, les courbes sont linéaires contrairement à celle du contrôle négatif qui diminue avec le temps (Figure 15).



Chaque point représente la moyenne  $\pm$  ESM ;  $0,5 \times \text{CMI}$  = Concentration Minimale Inhibitrice multipliée par un demi ; CMI = Concentration Minimale Inhibitrice ;  $2 \times \text{CMI}$  = Concentration Minimale Inhibitrice multipliée par deux.

**Figure 14:** Effet de l'extrait brut des feuilles de *Acacia polyacantha* sur les pompes à protons de *Providencia stuartii* ATCC29916



Chaque point représente la moyenne  $\pm$  ESM ; 0,5 x CMI = Concentration Minimale Inhibitrice multipliée par un demi ; CMI = Concentration Minimale Inhibitrice ; 2 x CMI = Concentration Minimale Inhibitrice multipliée par deux.

**Figure 15:** Effet du composé **8** de *Acacia polyacantha* sur les pompes à protons de *Providencia stuartii* ATCC29916

### III.1.5. Toxicité aigüe de *Acacia polyacantha*

#### III.1.5.1. Symptômes physiques de la toxicité aigüe des animaux traités ou non avec l'extrait brut des feuilles de *Acacia polyacantha*

Après administration de la dose unique (5000 mg/kg) d'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha*, les symptômes physiques de la toxicité aigüe ont été notés, ces derniers ont été consignés dans le tableau XII ci-après. De ce tableau, il ressort que les aspects physiques tels que la sensibilité à la douleur, la sensibilité au bruit, l'activité motrice, les grincements de dents, l'aspect des fèces, l'état de la queue, le tremblement, la somnolence et la convulsion sont pour la plus part absents et normaux.

**Tableau XII:** Evaluation des symptômes physiques de la toxicité pendant les 4 premières heures, 24 h et 14 jours après administration de la dose de l'extrait brut de *Acacia polyacantha*

Rates critères	Feuilles					Contrôle				
	1	2	3	4	5	C1	C2	C3	C4	C5
Sensibilité à la douleur	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Sensibilité au bruit	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Activité motrice	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Grincements des dents	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Aspect des fécès	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Etat de la queue	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
tremblement	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
somnolence	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
convulsion	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

N : normale ; A : absent ; 1 à 5 : numéro des rates ; C1 à C4 : numéro des rates contrôle.

### III.1.5.2. Gain de poids et poids relatif des organes des animaux traités ou non avec l'extrait brut des feuilles de *Acacia polyacantha*.

Le gain de poids et le poids relatif des organes ont été évalués après administration d'une dose unique de 5000 mg/kg d'extrait des feuilles de *A. polyacantha* et les résultats ont été consignés dans les tableaux XIII et XIV ci-dessous. Il ressort de ces tableaux qu'aucune variation significative ( $P \geq 0,05$ ) du gain de poids et du poids relatif des organes n'a été observée.

**Tableau XIII:** Poids des animaux et gain de poids durant l'expérience

Paramètres	Poids initial	Poids final	Gain de poids
<b>Groupe de rates</b>			
Contrôle (0mg/kg)	213,8 ± 3,059	227,2 ± 3,187	13,5 ± 3,261
Group test : extrait au méthanol de <i>Acacia polyacantha</i> (5000 mg/kg)	174,8 ± 8,280 <sup>ns</sup>	191,2 ± 7,110 <sup>ns</sup>	16,2±5,678 <sup>ns</sup>

ns : non significatif

**Tableau XIV:** Effets de l'administration aigüe de l'extrait au méthanol de *Acacia polyacantha* sur le poids relatif des organes des rates

Organe	Control (0 mg/Kg)	Extrait au méthanol de <i>A. polyacantha</i> (5000 mg/Kg)
Foie	3,235±0,16	3,537± 0,328 <sup>ns</sup>
Cœur	0,301±0,005	0,308±0,018 <sup>ns</sup>
Poumon	0,580±0,092	0,551± 0,069 <sup>ns</sup>
Rate	0,402±0,019	0,407± 0,050 <sup>ns</sup>
Rein	0,659±0,033	0,692±0,059 <sup>ns</sup>

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne ± erreur standard sur la moyenne (ESM) ; les différences étaient significatives au seuil de probabilité 5% ( $P < 0.05$ ) ; ns : non significatif

### III.1.5.3. Effet de l'extrait brut des feuilles de *Acacia polyacantha* sur l'activité des protéines et des transaminases sériques

L'effet de l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* sur l'activité des protéines et transaminases sériques est représenté dans le tableau XV ci-dessous. Il en ressort que comparativement au groupe témoin, aucune différence significative sur les protéines et l'activité des transaminases sériques n'a été observée.

**Tableau XV:** Effets de l'administration aigue de l'extrait au méthanol de *Acacia polyacantha* sur la concentration sérique en protéines totales et les transaminases sériques (ALAT , ASAT)

Paramètres	Control (0 mg/Kg)	Extrait au méthanol de <i>A. polyacantha</i> (5000 mg/Kg)
Protéines totales sérique (mg/Kg)	0,373±0,087	0,367± 0,04 <sup>ns</sup>
Alanine amino-transférase (UI/l)	63,729± 3,086	59,8±1,154 <sup>ns</sup>
Aspartate amino-transférase (UI/l)	42,3405±1,85	45,97±5,3 <sup>ns</sup>

ns : non significatif



## III.2. DISCUSSION

Les plantes médicinales constituent une source importante de composés bioactifs en raison de la diversité des composés chimiques trouvée chez plusieurs espèces. Le criblage phytochimique a révélé dans les extraits bruts la présence de 4 classes de métabolites secondaires à savoir : les polyphénols, les tanins, les triterpènes et les stérols. Les saponines, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les coumarines sont sélectivement distribués (Tableau IV). Ces molécules sont réputées pour leurs activités antimicrobiennes significatives (Kueté, 2010 ; Cowan, 1999). La différence de composition chimique observée pourrait être due aux conditions environnementales, au sol et à l'âge de la plante (Brunetton, 1999). Les composés isolés de *A. polyacantha* comprenaient cinq terpénoïdes parmi lesquels: un stérol (stigmastérol; **1**), un triterpène ( $\beta$ -amyrine; **2**) et trois saponines [stigmastérol-3-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl (**3**), l'acide 3-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolique (**7**) et l'acide 3-*O*-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolique (**8**); deux flavonoïdes: l'épicatéchine (**5**) et la quercétine-3-*O*-glucoside (**6**) et un sucre, le 3-*O*-méthyl-D-chiro-inositol (**4**). Les recherches phytochimiques antérieures sur les feuilles de cette plante ont conduit à l'isolement du polyacanthoside A, de l'acide oléanolique, de l'épicatéchine, de la quercétine-3-*O*-glucoside ainsi que des composés **1**, **3**, **4**, **5**, **6** et **8** (Fotso *et al.*, 2018). Toutefois, peu de composés ont été isolés dans le cadre de notre étude. Probablement en raison du fait que nous nous sommes concentrés uniquement sur les fractions bioactives de l'extrait des feuilles tandis que les fractions moins actives n'ont pas été étudiées.

Ces dernières années, plusieurs plantes ont été évaluées avec succès pour leur activité antibactérienne dans le monde entier. Les résultats des tests antibactériens (étude préliminaire) ont montré que les extraits bruts de plantes étudiés dans ce travail possèdent une activité antibactérienne notable sur l'ensemble des souches testées. La diversité de métabolites secondaires présents dans ces extraits justifierait les activités observées. En effet, les composés phénoliques, les alcaloïdes et les saponines inhibent la croissance des microorganismes (Cowan, 1999). Il a également été rapporté par Cowan en 1999 que les flavonoïdes et les tannins inhibent les enzymes et ont la capacité de se complexer aux protéines extracellulaires et solubles. Les activités antibactériennes de ces extraits bruts variaient d'une souche à une autre. Ces différences d'activités pourraient être dues à leur composition chimique différente, aux mécanismes d'action distincts des phytomolécules contenues dans chaque extrait de plante et au profil génétique différent des germes utilisés (Lorenzi *et al.*, 2009; Kuate *et al.*, 2005; Tankeo *et al.*, 2004). Il est important de prendre en

considération le développement de la résistance des bactéries Gram négatif lors de la recherche de nouveaux agents antimicrobiens. Dans la présente étude, plusieurs bactéries exprimant le phénotype multirésistant ont été utilisées. Les valeurs de CMI du chloramphénicol étaient supérieures à 10 µg/ml sur la plupart des souches bactériennes (Tableau V), confirmant leur phénotype de résistance. Les seuils établis pour l'activité antibactérienne des extraits de plante considèrent que l'effet antimicrobien est significatif lorsque les valeurs de CMI sont inférieures à 100 µg/ml, modéré lorsque ces valeurs sont comprises entre 100 et 625 µg/ml et faible lorsque la CMI est supérieure à 625 µg/ml (Xu *et al.*, 2012 ; Kuete *et al.*, 2010). Sur cette base, l'activité antibactérienne des extraits bruts de *A. polyacantha* pourrait être considérée pour la plupart comme modérée (Tableau V). Néanmoins, des valeurs de CMI inférieures à 100 µg/ml ont été obtenues avec les feuilles de *A. polyacantha* sur les souches bactériennes problématiques comme *P. aeruginosa* (PA01) et *P. stuartii* ATCC29916 (Tableau V), ainsi qu'avec les écorces de cette plante contre *E. aerogènes* ATCC13048. Ces données suggèrent que ces extraits pourraient être utile pour lutter contre les infections bactériennes, en particulier en médecine traditionnelle. Les CMI des extraits bruts des feuilles et écorces de cette plante contre ces souches problématiques étaient inférieures à celles du chloramphénicol, confirmant cette hypothèse. Telle était la raison de procéder au fractionnement bioguidé afin d'isoler les composés responsables de l'activité de l'extrait des feuilles de cette plante.

L'activité observée avec l'extrait des écorces de *A. Cordifolia* contre *P. aeruginosa* PA01 (CMI 64 µg/ml) peut être considéré comme significative. Les activités antibactériennes modérées (CMI comprise entre 100 et 625 µg/ml) ont été obtenues avec la majorité des extraits (Tableau V). Cependant, ces valeurs de CMI obtenues sont significatives lorsque l'on considère l'importance médicinale des bactéries multirésistantes testées (Kuete *et al.*, 2011; Mallea *et al.*, 1998). *K. pneumoniae* KP55 et KP63 sont résistants à la plupart des antibiotiques couramment utilisés en thérapeutique et ont montré une résistance élevée à l'ampicilline, la ceftazidime et l'aztréonam, avec des valeurs de CMI allant jusqu'à 512 µg/ml (Chevalier, 2000). Dans la présente étude, les CMI plus faibles ont été obtenues avec l'extrait des écorces de *A. cordifolia* (128 µg/ml) et extrait de *L. aestuans* (256 µg/ml) contre *K. pneumoniae* KP63. De plus, des CMI de 512 µg/ml ont été également obtenues avec ces extraits contre *K. pneumoniae* KP55. Ces activités obtenues avec les extraits bruts contre ces bactéries multirésistantes pourraient être considérées comme intéressantes au regard de la nature problématique des souches testées.

*Pseudomonas aeruginosa* est un agent pathogène nosocomial très résistant aux antibiotiques et provoque un large éventail d'infections qui entraînent une morbidité et une mortalité importantes (Cardoso *et al.*, 2007). Les extraits des feuilles de *A. polyacantha* et des écorces de *A. cordifolia* avaient une CMI de 64 µg/ml contre *P. aeruginosa* PA01 (Tableau V). Ce résultat met clairement en évidence la capacité de ces extraits à combattre cette espèce bactérienne multirésistante. D'autres bactéries multirésistantes de la famille des entérobactéries testées dans cette étude comme *E. aerogenes*, *E. coli* et *P. stuartii* ont été également classées comme organismes résistants aux antimicrobiens (Kuethe *et al.*, 2010). Il est intéressant de noter que toutes ces souches multirésistantes étaient sensibles aux extraits étudiés, en particulier ceux de *A. polyacantha*, de *A. cordifolia* et de *L. aestuans*. Par conséquent, l'activité antibactérienne globale de *A. polyacantha*, *A. cordifolia* et de *L. aestuans* pourrait être considérée comme importante. De même, il a été démontré que l'extrait éthanol-eau 50% des feuilles de *A. cordifolia* présente des propriétés antibactériennes vis-à-vis d'un panel de bactéries et de champignons (Okeke *et al.*, 1999). Les valeurs de CMI rapportées variaient de 10 à 20 mg/ml contre diverses souches et isolats de bactéries Gram négatif telles que *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Candida freundii*, *K. pneumoniae*, *Salmonella flexneri*, *Salmonella paratyphi* et *Acinobacter baumannii* (Okeke *et al.*, 1999). Cependant, l'extrait était plus actif contre les bactéries Gram positif et avait des valeurs de CMI inférieures à 2,5 µg/ml contre différentes souches de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella epidermis*, *Bacillus subtilis* ainsi que les bactéries anaérobies, telles que *Peptostreptococcus spp.* et *Staphylococcus assacharolyticus* (Okeke *et al.*, 1999). Ce résultat est conforme à la présente étude parce que nous avons également constaté que cette plante a montré une activité contre les bactéries multirésistantes. Néanmoins, il convient de noter que de meilleures activités ont été obtenues dans le présent travail contre les bactéries Gram négatif, ce qui suggère que le méthanol pourrait être un meilleur solvant d'extraction pour les composés antibactérien de *A. cordifolia* que le mélange 50% éthanol-eau. Cette hypothèse est confortée par le fait que l'extrait aqueux et éthanologique de *A. cordifolia* séparément ont montré une activité antibactérienne faible ou nulle contre les bactéries Gram négatif. En effet, les valeurs de CMI rapportées des extraits éthanologiques étaient supérieures à 11,88 mg/ml contre *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella flexneri* et *E. coli*, tandis que l'extrait à eau présentait des valeurs de CMI supérieures à 18,75 mg/ml et aucune activité jusqu'à 300 mg/ml contre *Salmonella enteritidis* et *E. coli* (Adeleye *et al.*, 2008).

Bien que les résultats obtenus dans la présente étude avec *A. polyacantha*, *A. cordifolia* et *L. aestuans* sont généralement modérés, ils sont similaires à des données précédemment obtenues avec plusieurs autres plantes de la pharmacopée camerounaises comme *Olox subscorpioïdea*, *Solanum nigrum*, *Vernonia amygdalina*, *Capsicum frutescens*, *Afraegle gabonensis*, *Combretum molle*, *Gladiolus quartinianus*, et *Fagara tessmannii* (Fankam *et al.*, 2015; Tankeo *et al.*, 2015 ; Touani *et al.*, 2014 ; Fankam *et al.*, 2014 ; Noumedem *et al.*, 2013 ; Fankam *et al.*, 2011). En utilisant la méthode de diffusion sur gélose, Oloyede et Ayanbadejo ont montré que l'extrait au méthanol de *L. aestuans* avait une activité antimicrobienne modérée à 200 mg/ml contre un panel de bactéries Gram négatif et positif ainsi que sur des champignons, avec des diamètres d'inhibition de 10 mm à 20 mm. En revanche, les valeurs de la gentamicine à 10 mg/ml ou de tioconazole 70% (utilisés comme témoins positifs) variaient de 24 à 28 mm (Oloyede *et al.*, 2014). Nos données corroborent cette étude car nous avons également observé que l'extrait méthanolique de cette plante avait une activité modérée sur la majorité des bactéries Gram négatif testées, avec des CMI qui variaient généralement entre 256 à 1024 µg/ml (Tableau V).

Traditionnellement, *E. speciosa* est utilisé pour guérir les infections bactériennes, telles que la diarrhée, l'ulcère, la dysenterie et les infections des voies urinaires (Oben *et al.*, 2006 ; Kuete *et al.*, 2013). Cependant, l'activité antibactérienne observée dans la présente étude est plutôt faible (CMI= 1024 µg/ml) ou nulle. Ce résultat peut être dû au fait que la plupart des bactéries étudiées sont des phénotypes multirésistants ou dû au faible potentiel antibactérien de cette plante. En effet, une faible activité antibactérienne de l'extrait éthanolique à 95% de cette dernière a été également rapportée par Okokon *et al.* (2007) contre *E. coli* et *Staphylococcus aureus*. De même, *P. purpureum* et *S. campanulata* utilisés traditionnellement comme médicaments pour lutter contre les infections microbiennes a également montré une activité antibactérienne nulle ou modérée contre les bactéries testées. Les résultats obtenus sont conformes à ceux précédemment rapportés par Njoku *et al.* (2004). Ils ont démontré que *P. purpureum* avait un faible pouvoir antibactérien contre *E. coli* et *P. aeruginosa*. Par ailleurs, Rajesh *et al.* (2010). ont signalé les faibles effets inhibiteurs de *S. campanulata* contre *Proteus vulgaris*, *E. coli* et *K. pneumoniae*.

L'activité antibactérienne de l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* était meilleure que celle observée avec le CHL sur les souches les plus résistantes de notre répertoire (Tableau V). Le dégrossissement de cette plante a conduit à plusieurs fractions. Les fractions APFa, APFb et APFd avaient des valeurs de CMI inférieures à 100 µg/ml contre 1, 3

et 7 des 9 espèces bactériennes testées respectivement (Tableau VI). L'activité des composés phytochimiques a été définie comme significative lorsque la CMI était inférieure à 10 µg/ml, modérée lorsque la CMI est comprise entre 10 et 100 µg/ml et faible lorsque la CMI est supérieure à 100 µg/ml (Xu *et al.*, 2012 ; Kuete *et al.*, 2010). Cependant, des composés moins actifs ont été obtenus à partir des fractions purifiées (APFa, APFb et APFd), car aucun d'entre eux ne présentait une valeur CMI inférieure à 10 µg/ml (Tableau VI). Cela indiquerait que les constituants de l'extrait et des fractions pourraient inhiber synergiquement la croissance bactérienne. Tous les échantillons testés avaient des ratios CMB/CMI supérieurs à 4 (Tableaux V et VI), montrant ainsi qu'ils avaient principalement des effets bactériostatiques (Mins *et al.*, 1993). A notre connaissance, l'activité antibactérienne de *A. Polycantha* ainsi que celle de son constituant le plus actif (composé **8**) ont été rapportées pour la première fois.

Concernant la relation structure-activité, il est apparu que les terpénoïdes **1**: stigmasterol et **2**:  $\beta$ -amyrine (sans sucre dans leurs structures chimiques) et **3**: stigmastérol-3-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl (avec un seul sucre) étaient dépourvus d'activité antibactérienne (Tableau VI). Les flavonoïdes **5**: l'épicatéchine et **6**: la quercétine-3-*O*-glucoside ainsi que les saponines **7**: l'acide 3-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolique et **8**: l'acide 3-*O*-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolique avaient un pouvoir antibactérien sélectif et faible. Au sein des saponines, on peut noter que la présence d'un deuxième substituant galactopyranosyle (composé **8**) au lieu du xylopyranosyle (composé **7**) a augmenté de manière significative l'activité antibactérienne du composé **8** avec des valeurs de CMI  $\leq$  64 µg/ml contre 7/9 bactéries testées par rapport à 0/9 pour le composé **7** (Tableau VI).

Les bactéries multirésistantes testées dans ce travail ont surexprimé le mécanisme d'efflux *via* les pompes à efflux de la famille des « *Resistance Nodulation cell Division* » (RND), à savoir AcrAB-TolC pour les entérobactéries (*E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* et *P. stuartii*) et MexAB-OprM pour *P. aeruginosa* (Tran *et al.*, 2010 ; Chevalier *et al.*, 2000). Ces pompes à efflux expulsent les composés toxiques (y compris les antibiotiques) du cytoplasme bactérien, les empêchant d'atteindre leur cible intracellulaire (Van *et al.*, 2006). Les inhibiteurs des pompes à efflux tels que le PA $\beta$ N pourraient être utilisés comme adjuvant pour restaurer la concentration intracellulaire des antibactériens en bloquant les pompes à efflux bactériens. En présence du PA $\beta$ N, il a été observé que l'activité de l'extrait brut (sauf contre *P. aeruginosa* PA01) des fractions APFb et APFd ainsi que du composé **8** et du CHL augmentait fortement sur presque toutes les bactéries testées (Tableau VII). Le degré

d'augmentation variait de 2 à  $\geq 4$  pour APFb, de  $\geq 1$  à 8 pour CHL, de 2 à  $\geq 128$  pour le composé **8**, de 0,5 à 64 pour APF et de 2 à 128 pour APFd. Cela indique clairement que le composé **8** ainsi que d'autres constituants actifs de *A. polyacantha* sont des substrats de pompes d'efflux bactériens et qu'ils peuvent avoir une cible intracellulaire (Mahamoud *et al.*, 2007). Par conséquent, le développement d'un médicament antibactérien constitué soit du composé **8**, soit de l'extrait brut ou encore des fractions avec un inhibiteur des pompes à efflux pourrait être intéressant pour lutter contre les infections dues aux bactéries multirésistantes. En effet, un facteur de modulation  $\geq 2$  définit une substance modulatrice de la résistance aux antibiotiques biologiquement significative (Kovac *et al.*, 2014 ; Chaturvedula *et al.*, 2012). Une étude précédente a démontré que le PA $\beta$ N pouvait également restaurer l'activité de plusieurs composés naturels sur les bactéries multirésistantes exprimant des pompes à efflux actif (Fankam *et al.*, 2017). En effet, les valeurs de CMI diminuent en dessous de 10  $\mu\text{g/ml}$  dans la plupart des bactéries testées pour plusieurs substances naturelles à l'instar de la coumarine, MAB3, la xanthone, laurentixanthone B, la naphthoquinone: diospyrone, plumbagine et les flavonoïdes: 4-hydroxyonchocarpine et l'isobavachalcone (Kuethe, 2010).

Des difficultés dans le domaine de la découverte de nouveaux médicaments antibactériens pour lutter contre les agents pathogènes résistants ont conduit à une recherche de plante plus accentuée. Une d'elles a pour but d'améliorer ou de restaurer l'activité des antibiotiques couramment utilisés en thérapeutique. La combinaison d'antibiotiques avec des plantes et des phytomolécules est une stratégie intéressante. Si une substance antibactérienne améliore l'activité d'au moins 70% des antibiotiques testés sur plus de 70% des souches bactériennes testées, elle pourrait être considérée comme un inhibiteur potentiel de la pompe à efflux (Braga *et al.*, 2005). Tel n'a pas été le cas dans la présente étude, car ni l'extrait des feuilles de *A. polyacantha* (APF), ni les composés **7** et **8** n'étaient capables d'exercer un tel degré d'effets synergiques avec les antibiotiques (Tableaux IX-XI). Toutefois, des effets synergiques ont été observés entre APF, les composés **7** et **8** avec au moins un des huit antibiotiques testés sur plus de 50% des souches bactériennes multirésistantes (Tableaux IX-XI). Cela suggère qu'une combinaison possible de ces échantillons avec des antibiotiques spécifiques pourrait aider dans l'antibiothérapie impliquant les phénotypes multirésistants.

La cinétique de croissance bactérienne est spécifique à chaque bactérie. En milieu non renouvelé, la courbe de croissance bactérienne comporte 6 phases à savoir : la phase de latence, la phase d'accélération, la phase exponentielle, la phase de décélération, la phase

stationnaire et la phase de déclin (Courcol, 2006). Chaque phase correspond à des processus biochimiques nécessaires au bon développement de la cellule bactérienne. L'inhibition de ces processus biochimiques entraîne un prolongement de ces phases, inhibant ainsi la croissance de la bactérie en question. Dans la présente étude, le prolongement de la phase de latence indique l'action inhibitrice de l'extrait brut des feuilles et du composé **8** de *A. polyacantha* aux concentrations CMI et 2CMI (Figure 9 et 10). L'extrait brut des feuilles et le composé **8** agissent de façon similaire sur la croissance de *P. stuartii* ATCC29916. Ceci indique que ces derniers agiraient en inhibant la biosynthèse des enzymes nécessaires au métabolisme et par conséquent bloquent l'entrée dans la phase exponentielle (Rolf *et al.*, 2012). Ainsi, en cas d'infection, ces molécules peuvent empêcher la colonisation du site d'infection par les bactéries.

La pompe à protons est une protéine transmembranaire (transporteur membranaire actif), qui déplace les protons contre leur gradient de concentration en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse d'une molécule d'adénosine triphosphate (ATP). Son fonctionnement aboutit à l'enrichissement du milieu extracellulaire de la bactérie en ions  $H^+$ , conduisant à l'acidification de ce milieu extracellulaire. Les pompes Proton-ATPase jouent des rôles variables dans les cellules bactériennes. L'un des rôles le plus important est de réguler le pH du cytoplasme des bactéries Gram négatif. L'inhibition de ces pompes inhibe également la croissance des bactéries (Kobayashi, 1985). Le blocage de ces pompes par le composé **8** et l'extrait des feuilles de *A. polyacantha* indiqué par un pH constant du milieu de culture aux concentrations CMI et 2CMI (Figure 14 et 15) montre que ces pompes sont des cibles possibles de ces substances (Manavathu *et al.*, 2001). Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont résistantes principalement à travers la pompe à efflux RND. Le blocage des pompes ATPasiques conduit à l'arrêt du flux de proton ( $H^+$ ) nécessaire au fonctionnement de la pompe RND, ce qui entraîne la mort de la bactérie.

La recherche des différentes voies par lesquelles l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* et le composé **8** inhibent la croissance des bactéries nous a permis de noter que ces derniers affectent également l'intégrité de la membrane plasmique (Figure 11, 12). Ceci pourrait être dû à la présence des saponines dans l'extrait des feuilles de *A. polyacantha* à l'instar du composé **8**. En effet, les saponines sont des hétérosides (glucosides) ayant une propriété tensioactive (surfactante) et qui provoquent la dissolution des membranes (activités hémolytiques). Ils agissent en s'insérant entre les phospholipides externes de la membrane. Cette insertion peut entraîner une augmentation anormale de la perméabilité membranaire, ce

qui conduirait à une fuite de substances intracellulaires à travers la membrane plasmique, entraînant par conséquent la mort de la bactérie (Mahenina, 2014). La différence d'action au niveau de la membrane notée entre l'extrait brut de *A. polyacantha* et le composé **8** serait due au fait que l'extrait brut contient un mélange de composé qui agissent en synergie parmi lesquels les composés phénoliques. Il a été rapporté que la présence du groupement hydroxyle confère aux composés phénoliques la capacité de détruire la membrane cytoplasmique des cellules bactériennes (Gyawali et Ibrahim, 2014). L'accumulation des groupements phénoliques hydrophobes dans la bicouche lipidique peut perturber l'interaction lipide–protéine et augmenter la perméabilité des membranes. Cette perméabilité provoque des altérations dans la structure de la membrane et accélère la fuite des constituants intracellulaires (Char *et al.*, 2010 ; Yanping *et al.*, 2016).

La toxicité aigüe de *A. polyacantha* a été évaluée afin de prévenir l'exposition humaine aux potentiels risques liés à sa consommation et de valoriser l'extrait brut des feuilles de ce dernier. Tout au long de l'étude, aucune mortalité des rates n'a été observée après administration orale de la dose de 5000 mg/kg d'extrait brut. Selon l'échelle de toxicité d'une substance chimique en fonction de la DL<sub>50</sub> et de la voie d'administration de Hodge et Stener, cet extrait a un indice de toxicité équivalent à 5, ce qui indique qu'il n'est presque pas toxique (Delonges *et al.*, 1983; Charles *et al.*, 2016). En outre, aucun signe de toxicité n'a été observé pendant les 4 h qui ont suivi l'administration de l'extrait, notamment la baisse de la sensibilité au stimulus (douleur et bruit), la diminution de la mobilité (activité motrice) ou le ramollissement des fèces, le grincement des dents, l'état de la queue, les tremblements, la somnolence et la convulsion (Tableau XII). Concernant le poids relatif des organes de façon globale, aucune différence significative n'a été trouvée entre le contrôle et le groupe test (dose de 5000 mg/kg de l'extrait brut) ainsi que sur les protéines totales. Le foie est l'organe central du métabolisme. L'activité des transaminases (ALAT, ASAT) augmente lorsque cet organe est endommagé (Gatsing *et al.*, 2005). Tel n'a pas été le cas dans cette étude car, en comparaison avec le groupe contrôle, il n'y a pas eu de variation significative sur l'activité des transaminases sériques. Cet extrait est donc relativement non toxique car les substances avec une DL<sub>50</sub> comprise supérieur à 5000 mg/kg par voie orale sont considérées comme ayant une toxicité faible, mais elles peuvent être dangereuses pour les populations vulnérables (OCDE, 2008). Les feuilles de *A. polyacantha* pourraient donc être utilisées pour la production d'un médicament traditionnel amélioré, après les études de toxicité subaiguë et chroniques, ainsi que les tests précliniques et cliniques.



# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION

L'émergence des maladies infectieuses dues aux bactéries multirésistantes, ainsi que l'inefficacité et la rareté des antibiotiques usuels disponibles sur le marché ont conduit à la recherche de nouveaux médicaments pouvant faire face à ce fléau. Ce travail a été mis sur pied dans le but « d'augmenter l'arsenal de substances naturelles actives *in vitro*, en vue d'accroître la chance d'aboutir plus tard à un médicament antibactérien actif sur les bactéries Gram négatif multirésistantes ». Il ressort de cette étude que :

➤ Les extraits bruts des plantes étudiées possèdent un potentiel antibactérien important sur l'ensemble des souches testées excepté *P. aeruginosa*. L'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* a été actif sur 73% des souches testées avec les meilleures valeurs de CMI sur les souches les plus problématiques (*P. aeruginosa* et *P. stuartii*). Il constitue ainsi une source potentielle de nouvelles molécules pouvant lutter contre les infections dues aux bactéries multirésistantes. Les extraits bruts de *A. polyacantha*, *A. cordifolia*, *E. speciosa*, *L. aestuans*, *P. Purpureum* et *S. campanulata* possèdent une composition phytochimique similaire et regorgent des classes de composés à activité biologique démontrée

➤ . Les constituants antibactériens de l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* sont : le 3-*O*-méthyl- $\beta$ -D-chiro-inositol (**4**), l'épicatéchine (**5**), la quercétine-3-*O*-glucoside (**6**), l'acide 3-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1→4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oléanolique (**7**) et l'acide 3-*O*-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1→4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oléanolique (**8**). La saponine (**8**) est le constituant antibactérien majeur de la plante.

➤ L'efflux est le principal mécanisme de résistance utilisé par les souches bactériennes étudiées pour résister à l'action toxique de *A. polyacantha* et de son constituant le plus actif (composé **8**). Bien que l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* et ses constituants ne sont pas des inhibiteurs des pompes à efflux, ils ont montré des effets synergiques avec plusieurs antibiotiques et pourraient être utilisés sélectivement en chimiothérapie bactérienne. La cinétique de croissance bactérienne révèle que l'extrait des feuilles de *A. polyacantha* et le composé **8** agissent de façon similaire en inhibant la croissance bactérienne au niveau de la phase de latence. Les pompes à protons sont des cibles de l'extrait des feuilles et du composé **8** de *A. polyacantha*. Ces substances bloquent les pompes à protons empêchant ainsi la croissance bactérienne. Elles provoquent la désintégration de la membrane plasmique des bactéries en libérant le contenu du cytoplasme dans le milieu extracellulaire.

➤ La toxicité orale aigüe de l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* n'a montré aucune anomalie ni mortalité chez les rates à la dose de 5000 mg/kg de poids corporel. Ceci révèle donc que cet extrait est relativement non toxique et est potentiellement sans danger pour la santé humaine. Il peut donc être utilisé pour la conception d'un médicament traditionnel amélioré après les études de toxicité subaiguë, chronique, ainsi que les tests précliniques et cliniques.

Ainsi, nous avons identifié au terme de ce travail deux substances à activité antibactérienne intéressantes, notamment l'extrait brut des feuilles de *A. polyacantha* et son principe actif l'acide 3-*O*-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1→4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oléanolique (**8**). Ces derniers peuvent être utilisés seul ou en association avec un inhibiteur des pompes à efflux pour lutter contre les infections bactériennes impliquant les phénotypes Gram négatif multirésistants, Ceci dans l'optique de palier à la réémergence des maladies infectieuses. L'extrait brut peut être utilisé pour une formulation à court ou long terme d'un phytomédicament ou d'un médicament traditionnel amélioré au regard de son innocuité. Le composé **8** pourrait également faire partir d'une formulation dans le même sens.

## PERSPECTIVES

Pour compléter ce travail, nous nous proposons dans un futur :

- ❖ D'évaluer l'activité antibactérienne *in vivo* des extraits bruts et produits actifs de *A. polyacantha* ;
- ❖ D'étudier les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de ces derniers ;
- ❖ De continuer les investigations toxicologiques sur l'extrait des feuilles de *A. polyacantha* et d'évaluer la toxicité aiguë, sub-chronique et chronique du composé actif (composé **8**) de *A. polyacantha* ainsi que les associations antibiotiques-composés phytochimiques actifs ;
- ❖ De déterminer les mécanismes d'action des composés **4** et **5**
- ❖ Déterminer les mécanismes d'action des synergies observées entre les composés de *A. polyacantha* et les antibiotiques usuels.

# REFERENCES

- Adeleye A. I., Omonigbehin A. E., Stella S., Oluwatosin O. et Sobande J. S. (2008).** Antibacterial activity of extracts of *Alchornea cordifolia* (Schum and Thonn) Mull.Arg., *Boerhavia diffusa* (L) and *Bridellia micrantha* (Hoscht) Baill. used in traditional medicine in Nigeria on *Helicobacter pylori* and four diarrhoeagenic bacterial pathogens. *African Journal Biotechnology*. **7**: 3761-3764.
- Adeneye A. A., Oreagba A. I., Ishola I. O. et Kalejaiye H. A. (2014).** Evaluation of the anti-arthritic activity of the hydroethanolic leaf extract of *Alchornea cordifolia* in rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. **11**: 402-410.
- Adnyana I. K., Tezuka Y., Awale S., Banskota A. H., Tran K.Q. et Kadota S. (2000).** Quadransides VI-XI, six new triterpene glucosides from the seeds of *Combretum quadrangulare*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **48**: 1114–1120.
- Akhila J. S., Deepa, S. et Alwar M. C. (2007).** Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. *Current Science*. **93**(7): 917-920.
- Amhis W., Benslimane A., Tiouit D. et Naim M. (2001).** Tests de sensibilité utiles au traitement antibiotique. *Médecine du Maghreb*. **91**: 22- 25.
- Anne D. R., Mathias W., Mahendran, Eric H., Matteo C., Que-Tien T., Kozhinjampara R., Helge W. et Pagès J.M. (2010).** Resistance of *Providencia stuartii* implication of porins in b-Lactam. *Journal of Biological Chemistry*. **285**: 32273-32281.
- Audrey G. (2011).** Plantes et médicament. <http://carabinsnicois.fr> consulté le 16 juin 2019.
- Avorn J. L., Barrett J. F., Davey P. G., Mc Ewen S. A., O'Brien T. F. et Levy S. B. (2001).** Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups: alliance for the prudent use of antibiotics.
- Barrial K. et Scotet J. (2006).** Classification raisonnée des  $\beta$ -lactamases chez les bacilles Gram négatif : Perspectives d'évolution. *DES Bactériologie*. Université de Lyon 1. p. 2.
- Beoletto V. G., De las Mercedes Oliva M., Marioli J. M., Carezzamo M. E., Demo M. S. (2016).** Antimicrobial natural products against bacterial biofilms. Dans kateryna K. et Mahendra R. Antibiotic Resistance: Mechanism and New Antimicrobial Approaches. Elsevier.
- Bergmeyer H. U., Horder M., Rej R. (1986).** Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC

method for alanineaminotransférase. *Journal of Clinical Chemistry and Biochemistry*. **24**: 481-489.

**Bhardwaj S., Deepika G., Seth G. L. et Bihani S. D. (2012).** Study of acute, sub-acute and chronic toxicity test. *International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical and Biosciences*. **1**: 103-129.

**Biomerieux. (2017).** *Rapport annuel 2017*. [En ligne] Disponible sur <https://www.fondation-merieux.org/IMG/pdf/fondation-merieux-rapport-annuel-2015.pdf>. Consulté le 18 Juin 2019.

**Boyce T. G., Gruber W. C. et Fisher R. G. (2004).** Enterobacter. In **R. D. Feigin, Cherry, Demmler and Kaplan** (Eds.). *Textbook of pediatric infectious diseases* (5th ed., pp. 1427- 1431). PA, USA: Saunders.

**Braga L. C., Leite A. A. M., Xavier K. G. S., Takahashi J. A., Bemquerer M. P., Chartone-souza E. et Nascimento A. M. (2005).** “Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Canadian Journal of Microbiology*. **51**: 541–547.

**Brown M. H., Paulsen I. T. et Skurray R. A. (1999).** The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Molecular Microbiology*. **31**(1): 394-395.

**Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème Ed Tec&Doc. Paris (France). 11 P.

**Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A. et Pinon G., et Vargues R. (1987).** *Bactériologie médicale : techniques usuelles*. SIMEP, Paris (France).

**Cardoso O, Alves AF et Leitao R. (2007).** Surveillance of antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a central hospital in Portugal. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*. **60**: 452-454.

**Carson C. F., Mee B. J. et Riley T. V. (2002).** Méchanism of action of *Maleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis leakage and salt tolerance and electron microscopie. *Antimicrobial agent and chemotherapy*. **46**: 1914-1920.

**Cassandre Saveurs-CBD. (2019).** Quels sont les principaux terpènes et quelles sont leurs vertus. <http://www.saveurs-cbd.fr>. Consulté le 2 novembre 2019

**Cattoir V. (2004).** Pompes d’efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie*. **52**: 607–616.

- Cecil O. E., Martial D. T., Jean P. N., Guy P. N., Gérard B. et Dieudonné A. (2015).** Evolution de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées à l'hôpital général de Douala de 2005 à 2012. *The Pan African Medical Journal*. **20**: 227.
- Charles A., Jemima A., Kwesi B., Priscilla K. (2016).** Aqueous leaf extract of *Carica papaya* (*caricaceae*) linn. Causes liver injury and reduced fertility in rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **8**: 261-265.
- Char C. D., Guerrero S. N. et Alzamora, S.M. (2010).** Mild thermal process combined with vanillin plus citral to help shorten the inactivation time for *Listeria innocua* in orange juice. *Food Bioprocess Technology*. **3**: 752–761.
- Chaturvedula V. S. et I. Prakash. (2012).** Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from the dichloromethane extract of *rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal*. **9**: 239–242.
- Cheng Z. F., Zheng C. (2004).** The Cheng Zhi-Fan Collectanea of Medical History. Beijing, Peking University Medical Press.
- Chen H. Y., Xu L. W., Qi J. et Shi Y. P. (2012).** Phytochemicals and their biological activities of plants in *Tagetes L.* *Chinese Herbal Medicines*. **4**: 103–117.
- Chevalier J, Pages JM, Eyraud A et Mallea M. (2000).** Membrane permeability modifications are involved in antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. **274**: 496-499.
- Chopra I. et Roberts M. (2001).** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*. **65**: 232–260.
- Cos P., Vlietinck A. J., Berghe D. V. et Maes L. (2006).** Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof-of-concept. *Journal of Ethnopharmacology*. **106** : 290 – 302.
- Courcol R. (2006).** Cours de bactériologie médical. *Faculté de médecine-Université de Lille* 2. Hhttp://www.microbes-edu.org. Consulté le 2 juin 2019.
- Coutinho H. D. M., Costa J. G. M., Lima E. O., Falcão-Silva V. S. et Siqueira J. J. P. (2009).** Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia L*; *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **9**: 13.



- Cowan M. M. (1999).** Plants products as antimicrobial activity. *Clinical Microbiology Reviews*. **12**: 564 – 582.
- Coyle M. B. (2005).** *Manual of antimicrobial susceptibility testing*, American Society for Microbiology. <http://www.asm.org/cceLibraryFiles/FILENAME/000000002484:Manual%20ofAntimicrobial%20Suceptibility%20Testing.pdf>. Consulté le 20 janvier 2020.
- Davin-Regli A., Chollet R. et Bollet J. M. C. (2004).** Enveloppe bactérienne, antibiotiques et colonisation, EA 2197. *Facultés de Médecine et Pharmacie, Université de la Méditerranée* (France). **6**: 202-206.
- Decoster. (2004).** La résistance bactérienne aux antibiotiques : Apparition et stratégies de lutte. Thèse de doctorat ; Université de Limoges ; France. 147 p.
- Delongas J. L., Burnel D., Netter P., Grignon M., Mor J. et Royer R. J. (1983).** Toxicité et pharmacocinétique de l'oxychlorure de zincinium chez la souris et chez le rat. *Journal of Pharmacology*. **14**: 437-447.
- Djeussi D. E., Noumedem J. A. K., Jackson S. A., Fankam A. G., Voukeng K. I., Tankeo B. S., Nkuete A. H. et Kuete V. (2013).** Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **13**: 164.
- Ducruet C. (2017).** La résistance aux antibiotiques plus meurtrière que le cancer d'ici 2050. <http://www.lesechos.fr>. (2017). Consulté le 15 juin 2019.
- Dye C. (2014).** After 2015, infection diseases in a new era of health and development. *Philosophical transaction of the royal society B*. **1645**: 20130426.
- Elkins C. A. et Mullis L. B. (2007).** Substrate competition studies using whole-cell accumulation assay with the major tripartite multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. **51**: 923-929.
- Essiet U., Edet N. et Bala D. (2011).** Phytochemical and physiochemical analysis of the leaves of *Laportea aestuans* (Linn) Chew and *Laportea aestuans* (Schumach) Chew (male and female). *Asian Journal of Plant Science and Research*. **1**: 35-42.
- Epillytrop. (2016).** Maladies infectieuses tropicales. *Collège des universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales*. <http://www.infectiologie.com>. Edition web consulté le 16 novembre 2019. 976p.

- Ezo'o, M. F., Tchonang, S. C., Kemaleu, L. H., Kamdem, S. L. S. & Ngang, E. J. J. (2018).** Exposure to Plant Extract Causes the Variation of Antibiotic Susceptibility of Two Bacterial Strains (*Salmonella Serotype Typhi* and *Staphylococcus aureus*). *Journal of Advances in Microbiology*. **12**: 1-14.
- Fankam A. G., Kuete V., Voukeng I. K., Kuate J. R. et Pages J. M. (2011).** Antibacterial activities of selected Cameroonian spices and their synergistic effects with antibiotics against multidrug-resistant phenotypes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **11**: 104.
- Fankam A. G., Kuate J. R. et Kuete V. (2014).** Antibacterial activities of *Beilschmiedia obscura* and six other Cameroonian medicinal plants against multi-drug resistant Gram-negative phenotypes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **14**: 241.
- Fankam A. G., Kuate J. R. et Kuete V. (2015).** Antibacterial and antibiotic resistance modifying activity of the extracts from *Allanblackia gabonensis*, *Combretum molle* and *Gladiolus quartinianus* against Gram-negative bacteria including multi-drug resistant phenotypes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **15**: 206.
- Fankam A. G., Kuate J.-R. et Kuete V. (2017).** Antibacterial and antibiotic resistance modulatory activities of leaves and bark extracts of *recinodindron heudelotii* (Euphorbiaceae) against multidrug-resistant gram-negative bacteria, *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **17**: 168.
- FAO (2004).** Trade in medical plants. <http://fao.org/docrep/fao/008/af285e00pdf>. Consulté le 8 février 2020.
- Farmer J. J., Boatwright K. D. et Janda J. M. (2007).** Enterobacteriaceae: Introduction and identification. In **P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry et M. Pfaller A.** (Eds.), *Manual of Clinical microbiology* (9th ed., pp. 649-669). Washington, DC, USA: ASM press.
- Faure S. (2009).** Transfert d'un gene de résistance aux  $\beta$ -lactamines blaCTX-M-9 entre salmonella et les enterobactéries de la flore intestinale humaine: impact d'une antibiothérapie. Thèse de doctorat ; Université de Rennes ; France. 184p.
- Fotso G. W., Na-Iya J., Mbaveng A. T., Ango P. Y., Demitras I. et Kuete V. (2018).** Polyacanthoside A, a new oleanane-type triterpenoid saponin with cytotoxic effects from the leaves of *Acacia polyacantha* (Fabaceae). *Natural Product Research (Formerly Natural Product Letters)*. **33**: 3521-3526.

- Freire C. S. R., Coelho D. S. C., Santos N. M., Silvestre A. J. D. et Neto C. P. (2005).** Identification of delta7 phytosterols and phytosteryl glucosides in the wood and bark of several acacia species. *Lipids*. **40**: 317–322.
- Gangoue´-P. J., Bedenic B., Koulla-S. S., Randegger C., Adiogo D., Ngassam P., Ndumbe P., et Hächler H. (2005).** Extended-Spectrum-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Yaounde, Cameroon. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**: 3273-3277.
- Gatsing D., Aliyu R., Kuiaté J. R., Garba I. H., Jaryum K. H., Tedongmo N., Tchouanguép F. M., Adoga G. I. (2005).** Toxicological evaluation of aqueous extract of *Allium sativum* bulbs on laboratory mice and rate. *Cameroon Journal of Experimental Biology*. **1**: 39-45.
- Gavaric N., Kovac J., Bucar F. et Mozina S. S. (2014).** “Antimicrobial and resistance modulatory activity of *alpinia katsumadai* seed phenolic extract, essential oil and post-distillation extract. *Food Technology and Biotechnology*. **52**: 248–254.
- Gyawali R. et Ibrahim S. A. (2014).** Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*. **46**: 412–429.
- Gérard gomez. (2016).** Les alcaloïdes. <http://www.ac-montpellier.fr>. Consulté le 2 novembre 2019.
- Gillepsie H. S., Banford B. K. (2012).** Medical microbiology and infection at a glance. 4<sup>th</sup> ed. *Wiley-blackwell, Oxford*. 127p.
- Ghisalberti D., Masi M., Pagès J. M. et Chevalier J. (2005).** Chloramphenicol and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **328**: 1113-1118.
- Gornall A. G., Barwill G. S. et David M. M. (1949).** Determination of serum protein by eanms of the buiret reaction. *Journal of Biological and Chemistry*. **177**: 751-766.
- Godreuil S. (2007).** Infections nosocomiales et bactéries multirésistantes. M7 *Bactériologie, Faculté de Médecine Montpellier – Nîmes* (France). P. 2.
- Hadacek F. et Harald G. (2000).** Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical analysis*. **11**(3): 137-147.
- Hanif W. M.; Eroglu E., Lavars M. S., Newton K., Gibson T. C., Stroeber H. U., Chen X., Boulos A. R., Raston L. C. et Harmer L. S. (2015).** Microencapsulation of

bacterial strains in graphene oxide nano-sheets using vortex fluidics. *RSC advances*. **5**: 37424-37430.

**Harbone J. B. (1976)**. Phytochemical methods. A guide of modern techniques of plants analysis. Chapman and Hall, London, 150p.

**Hugo W. B., Russel A. D. (1998)**. Pharmaceutical Microbiology (6th ed). *Blackwell science Ltd. Oxford*.

**INSPQ. (2018)**. Mesures de prévention et de contrôle des bacilles à Gram négatif multirésistants autres que les entérobactéries productrices de carbapénémases dans les milieux de soins aigus. [www.inspq.qc.ca/pdf](http://www.inspq.qc.ca/pdf). Consulté le 3 juin 2019.

**Iserm (2016)**. Résistance aux antibiotiques : Un phénomène massif et préoccupant. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/resistance-antibiotiques>. Consulté le 12 juillet 2019.

**Ishikawa Y., Nagai J., Okada Y., Sato K., Yumoto R. et Takano M. (2010)**. Function and Expression of ATP-Binding Cassette Transporters in Cultured Human Y79 Retinoblastoma. *Cells Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **33**: 504 - 511.

**Kamicker J. B., Sweeney T. M., Kaczmarek F., Dib-Haj F., Shang W., Crimin K., Duignan J. et Gootz D. T. (2007)**. Bacterial Efflux Pump Inhibitors. *Methods in Molecular Medicine*. **142**: 187 – 204.

**Kareem S. O., Akpan I. et Ojo O. P. (2008)**. Antimicrobial activities of *Calotropis procera* on selected pathogenic microorganisms. *African Journal of Biomedical Research*. **11**: 105-110.

**Khalilzadeh P. (2009)**. Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. *Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse*. 40 P.

**Kobayashi H. (1985)**. A proton-translocating ATPase regulates pH of bacterial cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry*. **260**: 72–75.

**Koudoro Y. A., Agbangnan D. C., Tchobo F. P., Yehouenou B., Avlessi F., Akoégninou A. et Sohounhloué K. C. D. (2015)**. Chemical characterization and biological activities of extracts from two plants (*Cissus quadrangularis* and *Acacia polyacantha*) used in veterinary medicine in Benin. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. **3**: 91–96.

- Kovac J., Gavaric N., Bucar F. et Mozina S. S. (2014).** Antimicrobial and resistance modulatory activity of *alpinia katsumadai* seed phenolic extract, essential oil and post-distillation extract. *Food and Technology Biotechnology*. **52**: 248–254.
- Kuete V et Efferth T. (2010).** Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. *Front Pharmacology*. **1**: 123.
- Kuete V. (2010).** Potential of cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta Medica*. **76**: 1479–1491.
- Kuete V., Alibert-Franco S., Eyong K. O., Tangmouo J. G., Bolla J. M., Alibert-Franco S., Ngadjui B. T. et Pages J. M. (2011).** Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **37**: 156-161.
- Kuete V., Ango P. Y., Fotso G.W., Gilbert D. K., Dzoyem J. P., Wouking A. G., Ngadjui B. T. et Abegaz B. L. (2011).** Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from *Artocarpus communis* (Moraceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **11**: 1-5.
- Kuete V., Metuno R., Ngameni B., Tsafack A. M., Ngandeu F., Fotso G. W., Bezabih M., Etoa F. X., Ngadjui B. T., Abegaz B. M. et Beng V. P. (2007).** Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Treculia obovoidea* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. **112**: 531–536.
- Kuete V., Ngameni B., Tangmouo J. G., Bolla J. M., Alibert- Franco S., Ngadjui B. T. et Pages J. M. (2010).** Efflux pumps are involved in the defense of Gram-negative bacteria against the natural products isobavachalcone and diospyrone. *Antimicrob Agents Chemother*. **54**: 1749-1752.
- Kuete V., Nguemeving J. R., Beng V. P., Azebaze A. G. B., Etoa F. X., Meyer M., Bodo B. et Nkengfack A..E. (2007).** Antimicrobial Activity of the Methanolic Extracts and Compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). *Journal of Ethnopharmacology*. **109**: 372–379.
- Kuete V., Voukeng I. K., Tsobou R, Mbaveng A. T, Wiench B., Beng V.P et Efferth T. (2013).** Cytotoxicity of *Elaeophorbium drupifera* and other Cameroonian medicinal plants against drug sensitive and multidrug resistant cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **13**: 250.

- Lattanzio V. (2001).** Phenolic compounds: dans Ramawat K. G. et Mérillon J. M. Natural Products. Springer, Berlin Heidelberg.
- Lavigne J. P. (2007).** Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. *Faculté de Médecine Montpellier – Nîmes*. <http://Univ-montp1.fr>. Consulté le 5 Juin 2019.
- Leejae S., Taylor P. W. et Voravuthikudchai S. P. (2013).** Antibacterial mechanisms of rhodomyrton against important hospital-acquired antibiotic-resistant pathogenic bacteria. *Journal of Medical Microbiology*. **62**:78-85.
- Levy S. B. et Mc Murry L. (1978).** Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline. *Nature*. **276**: 90-92.
- Li X. Z. et Nikaido H. (2004).** Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*. **64**(2): 159–204.
- Lonchel C. M., Meex C., Gangoué-P. J., Boreux R., Okomo A. M.-C., Melin P., et De M. P. (2012).** Proportion of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in community setting in Ngaoundere, Cameroon. *BMC Infectious Diseases*. **12**: 7.
- Lorenzi V., Muselli A., Benardini A. F., Berti L., Pagès J. M., Amaral L. et Bolla J. M. (2009).** Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from Gram-negative species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **53**: 2209-2211.
- Lozano R., Nalghavi M., Foreman K., Lim S., Shibuya K., Aboyams V. et Almazroa M. A. (2013).** Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *The lancet*. **380**: 2095-2128.
- Lozniewski A., Rabaud C. et Nancy. (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux – Infections associées aux soins CCLIN Sud-Est*. p4.
- Mah T. F. C. et O’Toole G. A. (2001).** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*. **9**: 34-39.
- Mahamoud A., Chevalier J., Alibert-Franco S., Kern W. V. et Pagès J. M. (2007).** Antibiotic efflux pumps in gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **59**: 1223–1229.

- Mahato S. B. et Kundu A. P. (1994).** <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochemistry*. **37**: 1517–1575.
- Mahenina J. M. (2013).** Etude chimique et biologique de saponines isolées de trois espèces mal-gaches appartenant aux familles des Caryophyllaceae, Pittosporaceae et Solanaceae. Thèse de doctorat de l'Université de Bourgogne. Pdf [www.tel.archives-ouvertes.fr](http://www.tel.archives-ouvertes.fr).
- Malléa M., Mahamoud A., Chevalier J., Alibert-franco S., Brouant P., Barbe J. et Pagès J. M. (2003).** Alkyl amino quinolines inhibit the bacterial antibiotic efflux pump in multidrug resistant clinical isolates. *Biochemical Journal*. **376**: 801–805.
- Mallea M., Chevalier J., Bornet C., Eyraud A., Daving-regli A., Bollet C. et Pagès J. M. (1998).** “Porin alteration and active efflux: two in vivo drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiology*. **144**: 3003–3009.
- Manavathu E. K., Dimmock J. R., Vashishtha S. C. et Chandrasekar P. H. (2001).** Inhibition of H<sup>+</sup>-ATPase-mediated proton pumping in *Cryptococcus neoformans* by a novel conjugated styryl ketone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **47**: 491–494.
- Manga H. M., Brkic D., Marie D. E. et Quetin-Leclercq J. (2004).** In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & thonn.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *Journal Ethnopharmacology*. **92**: 209-214.
- Marbou W. et Kuete V. (2020).** Methicillin-resistant staphylococcus aureus in metabolic syndrome patients at the Mbouda hospitals, West region of Cameroon. *Cureus*. **12** : 7274.
- Marty N. (2001).** Anatomie fonctionnelle des bactéries. *Laboratoire Bactériologique-Hygiène*. CHU de Ranguéil. <http://www.medecine.ups-tlse.fr>. Consulté le 10 juin 2019.
- Memobio (2021).** Antibiotique : mécanisme d'action et de résistance. <http://www.memobio.fr/html/bact/ba> an atb. Consulté le 30 mai 2021.
- Mesaros N., Van B. F., Glupczynski Y., Vanhoof R. et Tulkens P. M. (2005);** l'efflux des antibiotiques: un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. Etat de la question et implications microbiologiques et cliniques. *Louvain Medical*. **124**: 308-320.

- Metzger M., Bernet C., Hajjar J., Caillet-Vallet E., Ayzac L. et Fabry J. (2005).** ISO Protocole de surveillance C. *Clin Sud-Est*. 29p.
- Miailhes P., Hingstman F., Louis F. J. et Cot M. (1992).** L'association ampicilline-sulbactam, une alternative intéressante dans le traitement des infections gonococciques non compliquées. *Médecine d'Afrique Noire*. **39**: 685-688.
- Michael, V. H. M. A., Schuurmans, J. M., Smid, M. C., Koenders, B. B. & Kuile B. H. (2011).** De novo acquisition of resistance to three antibiotics by *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance*. **17**: 141-147.
- Mims C., Playfair J., Roitt I., Wakelin D. et Williams R. (1993).** Antimicrobials and chemotherapy. *Medical Microbiology Review*. CA. Mims, Ed., **35**: 1–34.
- Mohamedi D. (2010).** Classification et mode d'action des antibiotiques. [www.ands.dz/aarn/classification.pdf](http://www.ands.dz/aarn/classification.pdf). Consulté le 10 Mai 2019.
- Murray R. P., Rosenthal S. K et Pfaller A. M. (2013).** Medical microbiology. (7ed) Philadelphia, Elsevier. 888p.
- Nishimo C., Enoki N., Tawata S., Mori A., Kobayashi K. et Fukushima M. (1987).** Antibacterial activity of flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a skin bacterium. *Agricultural and biological chemistry*. **51**: 139-143.
- Njoku O., Okorie I. et Okafor E. O. J. (2004).** Investigation on the phytochemical and antimicrobial properties of *Pennisetum purpureum*. *Journal of Medicinal and Aromatic Plants Science*. **26**: 311-314.
- Noumedem J. A., Mihasan M., Kuate J. R., Stefan M., Cojocar D., Dzoyem J. P. et Kuete V. (2013).** In vitro antibacterial and antibiotic potentiation activities of four edible plants against multidrug resistant Gram-negative species. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **13**: 10.
- Noumedem J. A., Mihasan M., Lacmata S. T., Stefan M., Kuate J. R. et Kuete V. (2013).** Antibacterial activities of the methanol extracts of ten Cameroonian vegetables against Gram-negative multidrug resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **13**: 9.
- Oben J., Assi S., Agbor G. et Musoro D. (2006).** Effect of *Eremomastax speciosa* on experimental diarrhoea. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. **3**: 95-100.



- OCDE. (2008).** Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques N° 425 Toxicité orale aiguë - Méthode d'essai limite. *OCDE*, 1p-29p.
- OFSP. (2020).** Quelles sont les principales maladies bactériennes? <https://www.bag.admin.ch.com>. Consulté le 30 mai 2021.
- Ogungbamila F. O et Samuelsson G. (1990).** Smooth muscle relaxing flavonoids from *Alchornea cordifolia*. *Acta Pharmaceutica Nordica*. **2**: 421-422.
- Okeke I. N., Ogundaini A. O., Ogungbamila F. O. et Lamikanra A. (1999).** Antimicrobial spectrum of *Alchornea cordifolia* leaf extract. *Phytotherapy Research*. **13**: 67-69.
- Okereke S., Elekwa I. et Nmaju A. (2014).** Gas chromatographic fid, hypoglycemic and hypolipidemic effects of leaves of *Laportea aestuans* in alloxan induced diabetes in male albino rats. *IOSR Journal of Environmental Science Toxicology and Food Technology*. **8**: 42-46.
- Okokon J., Antia B., Udoh A. et Akpan M. (2007).** Antianaemic and antimicrobial activity of *Eremomastax speciosa*. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. **2(2)**: 196-199.
- Oloyede G. et Oyelola M. (2013).** Chrysen-2-ol derivative from West Indian wood nettle *Laportea aestuans* (L.) chew inhibits oxidation and microbial growth in vitro. *EXCLI Journal*. **12**: 894-906.
- Oloyede G. K. et Ayanbadejo O. E. (2014).** Phytochemical, toxicity, antimicrobial and antioxidant screening of extracts obtained from *Laportea aestuans* (Gaud). *Journal of Medicine Science*. **14**: 51-59.
- OMS (2014).** Premier rapport de l'OMS sur la résistance aux antibiotiques: une menace grave d'ampleur mondiale <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr>. Consulté le 3 juillet 2019.
- OMS (2015).** Résistance aux antibiotiques: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/fr/>. Consulté le 3 juin 2019
- OMS. (2000).** Résistance aux antimicrobiens : une menace pour le monde <http://www.who.int/medicinedocs/pdf/s2249f/s2249f.pdf>. Consulté le 3 Mai 2019.
- OMS. (2006).** Rapport mondial sur la santé dans le monde 2006, objectifs du millénaire pour le développement. *World Bank, Insitut Pasteur, PNUD*.
- OMS. (2011).** Plan d'action stratégique européenne sur la résistance aux antibiotiques. *Comité régional de l'Europe EUR/RC61/14*. p. 13. Consulté le 12 juin 2019.

- OMS. (2017).** L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques. *Communiqué de presse*. Genève: OMS. <http://www.euro.who.int/fr>. Consulté le 19 mai 2019..
- Osadebe P. O. et Okoye F. B. (2003).** Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. **89**: 19-24.
- Ouedraogo A. S., Jean P. H., Banuls A. L., Ouédraogo R. et Godreuil. (2017).** Emergence et diffusion de la résistance aux antibiotiques en Afrique de l'Ouest : facteurs favorisants et évaluation de la menace. *Médecine et santé tropicale*. **27**: 147-154.
- Oussou K. R., Yolou S. F., Tue Bi B., Kanko C., Boti J. B., Ahibo C. et Casanova J. (2010).** Etude Chimique Bio-Guidée de L'huile Essentielle de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). *European Journal of Scientific Research*, **40**: 50-59.
- Oussou K. R., Yolou S., Boti J. B., Guessennnd K. N., Kanko C., Ahibo C. et Casanova J. (2008).** Étude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*. **24**: 94-103.
- Pasteur. (2008).** Des menaces bactériennes. *Magazine trimestriel de l'institut pasteur*. P.44.
- Phan G. (2008).** Etude structurale du système d'efflux membranaire MexXY-OprM impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Thèse de Doctorat*, Université Paris-Descartes, France. p1997.
- Philippon A. (2013).** Les beta-lactamases a spectre elargi ou etendu (blse) extended-spectrum beta-lactamases. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*. **28**: 287-296.
- Philippon A. (2009).** Résistance des bactéries aux antibiotiques. *Faculté de médecine Paris-Descarte*. <http://cstvn.free.fr/Downloads/Philippon1.pdf2249f.pdf>. Consulté le 5 Juin 2019.
- Poole K. (2004).** Efflux-mediated multiresistance in Gram -negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. **10**: 12–26.
- Potvin É. (2007).** Présentation de *Pseudomonas aeruginosa*. *Collection mémoires et thèses électroniques*. Université Laval (Canada).
- Putman M., Van V. H. W. et Konings W. N. (2000).** Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 672–693.

- Pretsch ernö, Simon wilhelm, Seibl joseph, Clerc thomas. (1989).** Tables of spectral data for structural determination of organic compounds, <sup>13</sup>C-NMR, <sup>1</sup>H-NMR, IR, MS, UV in . W. Fresenius, J. F. K. Huber, E. Pungor, G. A. Rechnitz, W. SIMON, Th. West, *chemical laboratory practice*, berlin ; heilderberg, springer-verlag. 399-416.
- Rahman M. A., Rana M. S., Zaman M. M., Uddin S. A. et Akter R. (2010).** Antioxidant, Antibacterial and Cytotoxic Activity of the Methanol Extract of *Urtica Crenulata*. *Journal of Scientific Research*. **2**: 169-177.
- Rajesh K., Harsha R., Mohammed G., Hareesh A., Thammanna G., Dinesha R., Satish K. et Irfan A. (2010).** Antimicrobial activity of ethanol extract of leaf and flower of *Spathodea campanulata* P. Beauv. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science*. **1**: 691-698.
- Reitman S. et Frankel S. (1957).** A colorimetric determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *American Journal of Clinical Pathology*. **28**: 56-63.
- Robinson S., Ockert D., Stei P. et Dreher D. (2007).** Challenging the regulatory requirement for conventional acute toxicity studies in pharmaceutical drug development. *Toxicology*. **50**: 345-52.
- Rolfe M. D., Christopher J., Rice, Lucchini S., Pin C., Thompson A., Cameron A. D. S., Alston M., Stringer M. F., Betts R. P., Baranyi J., Peck M. W. et Hintona J.C. D. (2012).** Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of Bacteriology*. **194**: 686–701.
- Rossignol G. (2007).** Contribution à l'étude de facteurs de virulence d'une souche hospitalière de *Pseudomonas fluorescens* : Activité hémolytique et variation phénotypique. Thèse de doctorat de l'école Doctorale Normande de chimie .p7.
- Russo T. A. et Johnson J. R. (2008).** Diseases Caused by Gram -Negative Enteric Bacilli. In A. S. Fauci, et A. Fauci (Eds.). *Harrison's principles of internal medicine*. Online.statref.com/document.aspx?FxId=55and DocID=1 and grpalias=. Consulté le 6 Juin 2019.
- Sabin C. (2006).** La lectine PA-IIL de *Pseudomonas aeruginosa* : Structure, affinité et spécificité pour des ligands naturels et glycomimétiques. *Thèse de doctorat*. p 14.

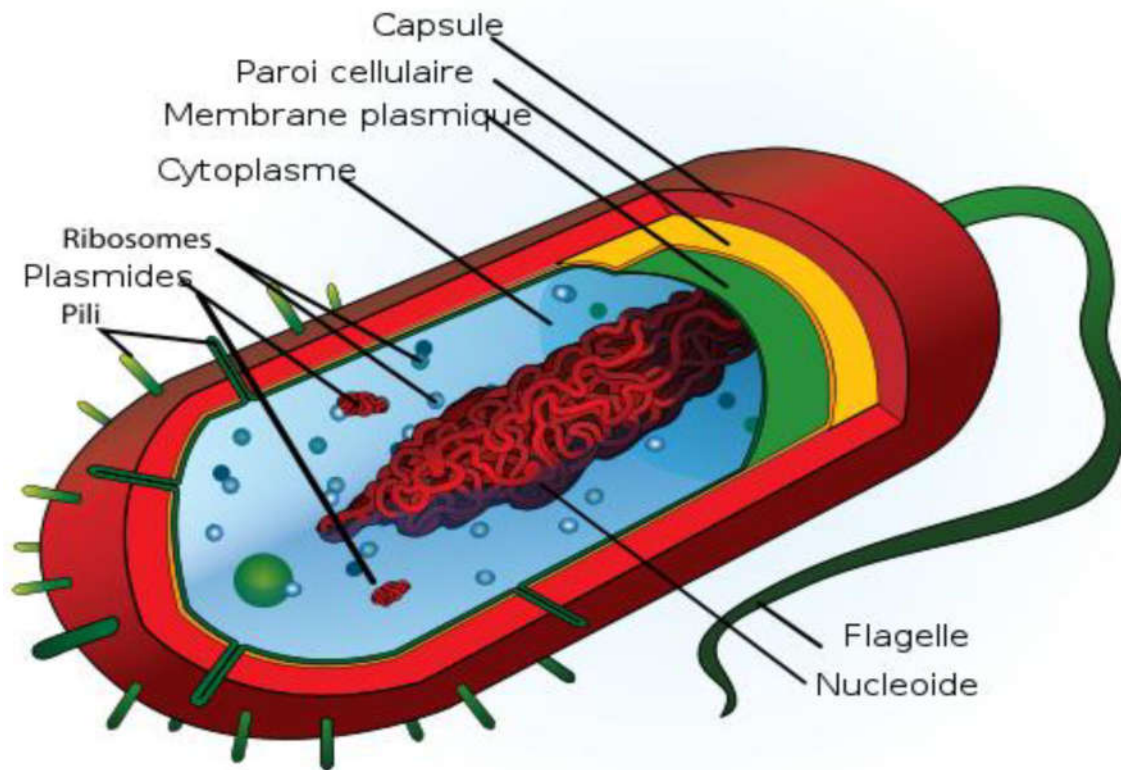
- Seukep J. A., Fankam A. G., Djeussi D. E., Voukeng K. I., Tankeo S. B., Noumedem J. A. K., Kuete A. H. et Kuete V. (2013).** Antibacterial activities of the methanol extracts of seven Cameroonian dietary plants against bacteria expressing MDR phenotypes. *Springerplus*. **2**:8.
- Sharma N., Verma M. K., Gupta D. K. , Satti N. K. et Khajuria R. K. (2016).** Isolation and quantification of pinitol in *Argyrobium roseum* plant, by <sup>1</sup>H-NMR,. *Journal of Saudi Chemical Society*. **20**: 81–87.
- Song J.H. (2008).** what's new on the antimicrobial horizon? *International Journal of Antimicrobial Ag*. **32**: S207- S213.
- Sowjanya P., Hapsana P., Kiran B., Vagdevi G. et Srinivasa B. (2013).** Pharmacognostical and physicochemical standardization of leaves of *Spathodea campanulata* P. Beauv. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemical*. **2**: 189-192.
- Tankeo S., Damen F., Awouafack M., Mpetga J., Tane P., Eloff J. et Kuete V. (2015).** Antibacterial activities of the methanol extracts, fractions and compounds from *Fagara tessmannii*. *Journal of Ethnopharmacology*. **169**: 275-279.
- Tchinda C. F., Voukeng I. K., Veronique P. B. et Kuete V. (2017).** Antibacterial activities of the methanol extracts of *Albizia adianthifolia*, *Alchornea laxiflora*, *Laportea ovalifolia* and three other Cameroonian plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences*. **24**: 950-955.
- Telefo P. B. (1998).** Contribution à l'étude des plantes médicinales du Cameroun : Influence de l'extrait aqueux du mélange des feuilles d'*Aloe buettneri* A. Berger (Liliacées), *Dicliptera verticillata* GJH Amshoff (Acanthacees), *Hibiscus macranthus* Hochst 88 ex Arich (Malvacees), *Justicia insularis* T. Anders (Acanthacées), sur certains paramètres biochimiques et physiologiques de la reproduction chez la rate. Thèse de Doctorat 3<sup>e</sup> cycle en Biochimie, Université de Yaoundé I, 154p.
- Tona L., Kambu K., Ngimbi N., Mesia K., Penge O., Lusakibanza M., Cimanga K., De Bruyne T., Apers S. et Totte J. (2000).** Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo. *Phytomedicine*. **7**: 31-38.
- Touani F. K., Seukep A. J., Djeussi D. E., Fankam A. G., Noumedem J. A. et Kuete V. (2014).** Antibiotic-potential activities of four Cameroonian dietary plants against multidrug resistant Gram-negative bacteria expressing efflux pumps. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **14**: 8.

- Tran Q. T., Mahendran K. R., Hajjar E., Ceccarelli M., Davin-Regli A., Winterhalter M., Weingart H. et Pages J. M. (2010).** Implication of porins in beta-lactam resistance of *Providencia stuartii*. *Journal of Biology Chemistry*. **285**: 32273-32281.
- UMVF. (2014).** Structure et physiologie de la bactérie : Anatomie – Structure. [www.CHU-rouen.fr](http://www.CHU-rouen.fr). Consulté le 3 juin 2019.
- Van Bambeke F., Pages J. M. et Lee V. J. (2006).** Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery*. **1**: 157-175.
- Viveiros M., Jesus A., Brito M., Leandro C., Martins M., Ordway D., Molnar A. M., Molnar J. et Amaral L. (2005).** Inducement and reversal of tetracycline resistance in *Escherichia coli* K-12 and expression of proton gradient-dependent multidrug efflux pump genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 3578-3582.
- Voukeng I. K., Kuete V., Dzoyem J. P., Fankam A. G., Noumedem J. A. K., Kuiate J. R. et Pagès J. M. (2012).** Antibacterial and antibiotic-potential activities of the methanol extract of some Cameroonian spices against gram-negative multi-drug resistant phenotypes. *BMC Research Notes*. **5**: 299.
- Voukeng I. K., Veronique P. B. et Kuete V. (2016).** Antibacterial activity of six medicinal Cameroonian plants against Gram-positive and Gram-negative multidrug resistant phenotypes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **16**: 9.
- Waterman C., Smith R. A., Pontiggia L. et Der- Marderosian A. (2010).** Anthelmintic screening of sub-saharan African plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. **127**: 755–759.
- WHO. (2009).** World health statistics 2009: Cause-specific mortality and morbidity. [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/FR\\_WHS09\\_Full.pdf](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/FR_WHS09_Full.pdf). consulté le 30 Juin 2019.
- Wladimir S. et David T. (2003).** Résistance aux  $\beta$ -lactamines. *Cours de la Faculté de médecine de Pierre et Marie curie : Service de Bactériologie-Hygiène-Pitié-Salbétrière*. <http://www.jussieu.fr>. Consulté le 15 Juin 2019.
- Woolhouse M. E. J. et Gowtage-Sequeria S. (2005).** Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerging Infectious Diseases Research* **11**: 1842 – 1847.
- Xu L. W., Chen J., Qi H. Y. et Shi Y. P. (2012).** Phytochemicals and their biological activities of plants in *Tagetes L.* *Chinese Herbal Medicines*. **4**: 103–117.

- Yala D., Merad A. S., Mohamedi D. et Ouar K. M. N. (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*. **91**: 5-12.
- Yanping W., Jinrong B., Kai Z., Yina H., Huayi Q., Yan J. et Hong G. (2016).** Antibacterial activity and membrane-disruptive mechanism of 3-p-trans-coumaroyl-2-hydroxyquinic acid, a novel phenolic compound from Pine Needles of *Cedrus deodara*, against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. **21**: 1084.
- Zahid Z., Aniruddha P., Sagar D., Subur K. et Rana Z. (2011).** Comparative phytochemical screening of flowers and bark of *Spathodea campanulata*. *Int Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. **5**: 233-235.
- Zgurskaya H. I. et Nikaido H. (2000).** Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Molecular Microbiology*. **37**: 219-225.

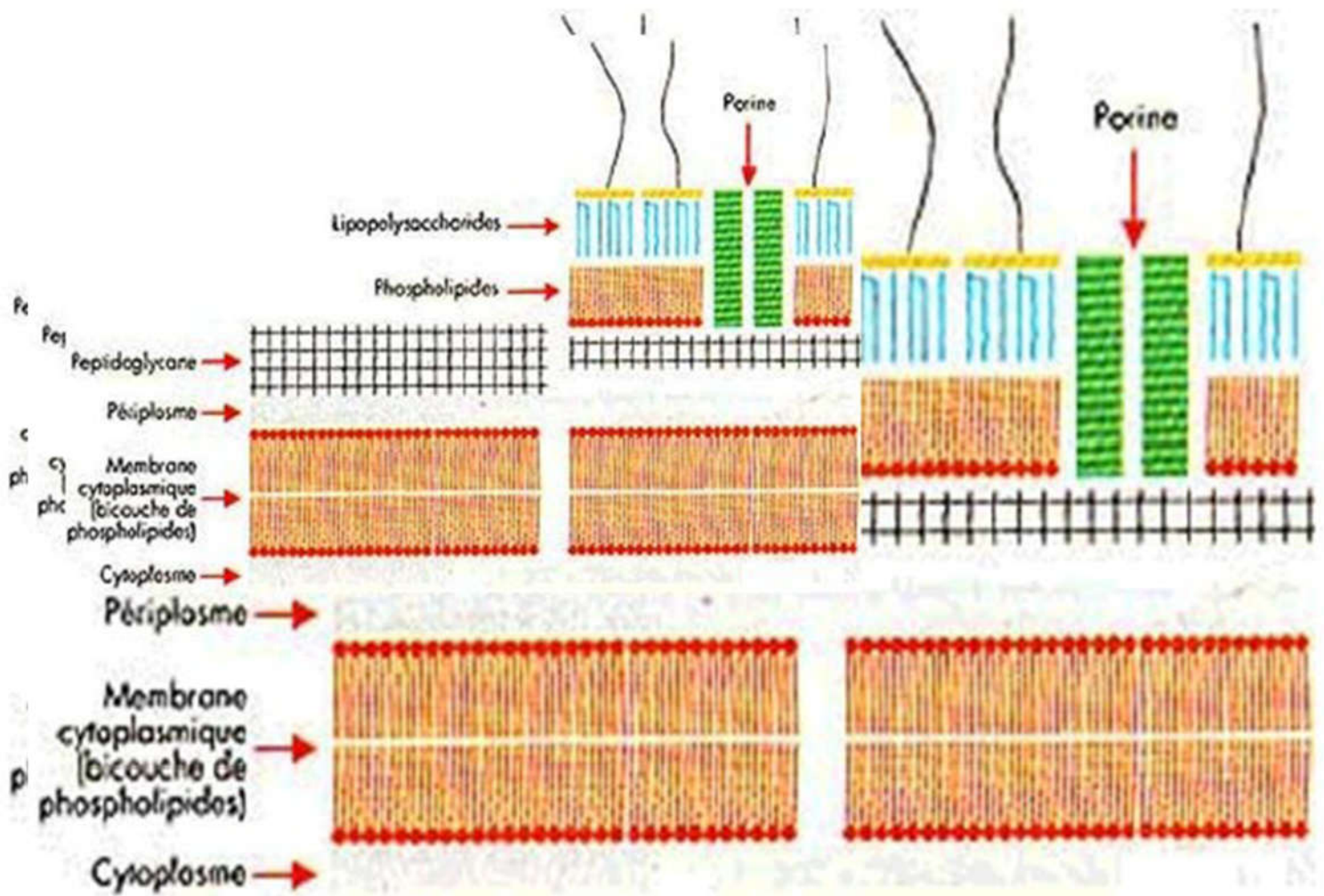
# **ANNEXES**

**Annexe 1: Structure de la bactérie et de la paroi bactérienne**



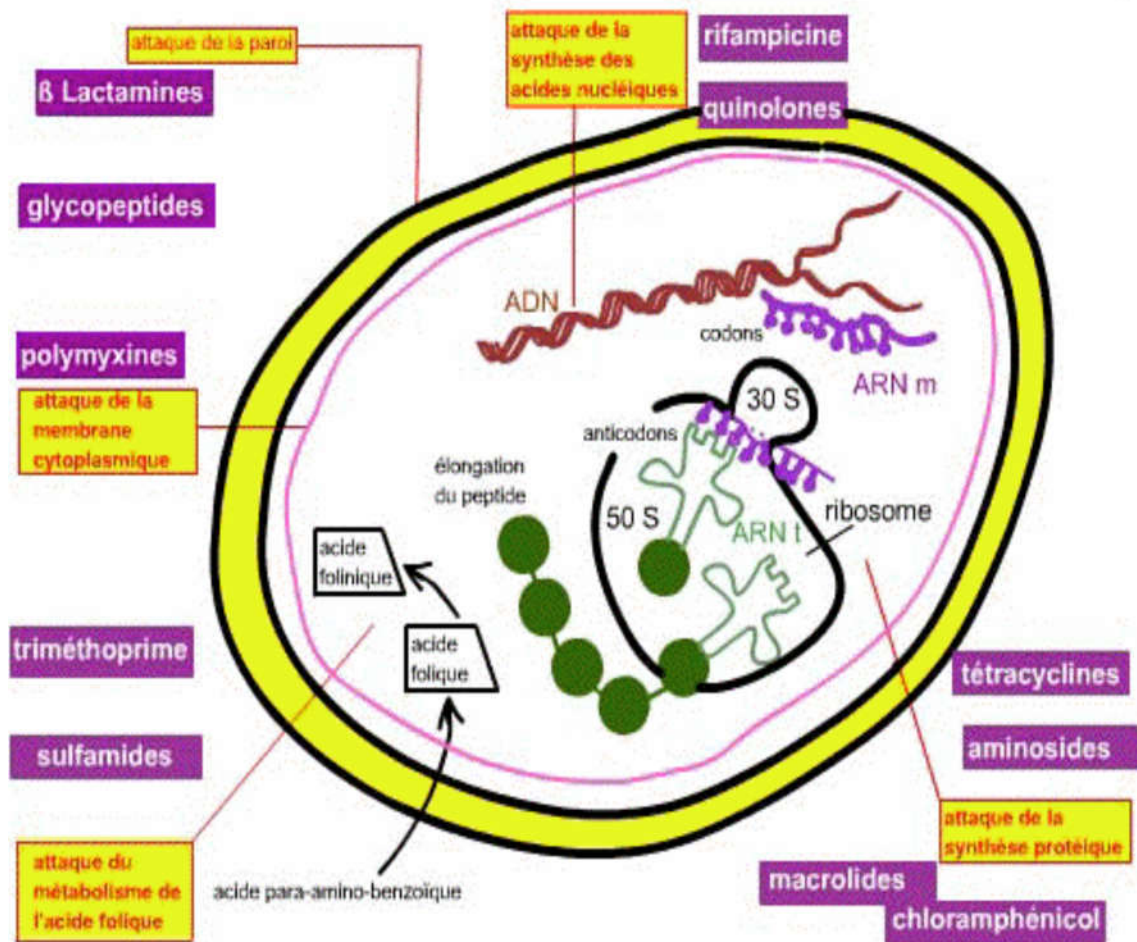
Structure de la bactérie (UMVF, 2014)





Paroi bactérienne (UMF, 2004).

## Annexe 2: Résumé des différents mécanismes d'action des antibiotiques



Résumé des différents modes d'action des antibiotiques (Lavigne, 2007)

**Annexe 3:** Echelle de toxicité d'une substance chimique en fonction de la DL<sub>50</sub> et de la voie d'administration de Hodge et Stener

Indices de toxicité	Termes couramment utilisés	Voies d'administrations			Quantité probablement létale chez les humains
		DL <sub>50</sub> orale Une seule dose à des rats (mg/kg)	DL <sub>50</sub> inhalation Exposition des rats pendant 4 Heures (ppm)	DL <sub>50</sub> cutanée Une seule application sur la peau des lapins (mg/kg)	Un grain, une pincée, une goutte
1	Extrêmement toxique	1 ou moins	10 ou moins	5 ou moins	4 ml
2	Hautement toxique	1-50	10-100	5-43	30 ml
3	Modérément toxique	50-500	100-1000	44-340	600 ml
4	Légèrement toxique	500-5000	1000-10000	350-2810	1 l
5	Presque pas toxique	5000-15000	10000-100000	2820-22590	1 l
6	Relativement inoffensive	15000 ou plus	100000 ou plus	22600 ou plus	1 l

Annexe 4: Gavage des rates, sacrifice, prélèvement et nettoyage des différents organes







Annexe 5: Toxicité aigüe « photos des organes des rates après administration d'extrait brut des feuilles d'*Acacia polyacantha* »

Groupe test



Contrôle



C : contrôle

## Annexe 6: Quelques solutions

- ❖ Solution de chlorure ferrique 5% : chlorure ferrique anhydre (5 g) ; eau distillé (100 ml).
- ❖ Solution de HCl 1% : acide chloridrique concentré (1 ml) ; eau distillée (100 ml).
- ❖ Solution d'acide sulfurique 1% : acide sulfurique concentré (1 ml) ; eau distillée (100 ml)
- ❖ Réactif de Mayer : solution de chlorure mercurique (Chlorure mercurique 1,35 g et eau distillée 60 ml) ; Solution d'iodure de potassium (Iodure de potassium 5 g et eau distillée 10 ml). Mélanger les deux et ajuster le volume à 100 ml



## Annexe 7: Composition des milieux de culture et de l'aliment des rats

### Bouillon Mueller hinton

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
<b>Extrait de bœuf</b>	300
<b>Caséine</b>	17,5
<b>Amidon</b>	1,5
pH 7,3± 0,1	

### Gélose Mueller hinton

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
<b>Extrait de bœuf</b>	300
<b>Caséine</b>	17,5
<b>Amidon</b>	1,5
<b>Agar</b>	17
pH 7,3 ± 0,1	

### Gélose de l'éosine du bleue de méthylène

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
<b>Peptone</b>	10
<b>Lactose</b>	10
<b>Phosphate d'hydrogène diphosphate</b>	2
<b>Eosine Y</b>	0,4

<b>Bleu de méthylène</b>	0,065
<b>Agar</b>	15
pH 6,8 ± 0,2	

Gélose Chapman

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
<b>Extrait de bœuf</b>	1
<b>Peptone</b>	10
<b>maniton</b>	10
<b>Chlorure de sodium</b>	75
<b>Rouge phénol</b>	0,025
<b>Agar</b>	15
pH 7,5 ± 0,2	

Gélose McConkey

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
<b>Peptone</b>	20
<b>Lactose</b>	10
<b>Sels biliaires</b>	5
<b>Sodium chloride</b>	5
<b>Rouge neutre</b>	0,075
<b>Agar</b>	12
pH 7,4 ± 0,2	

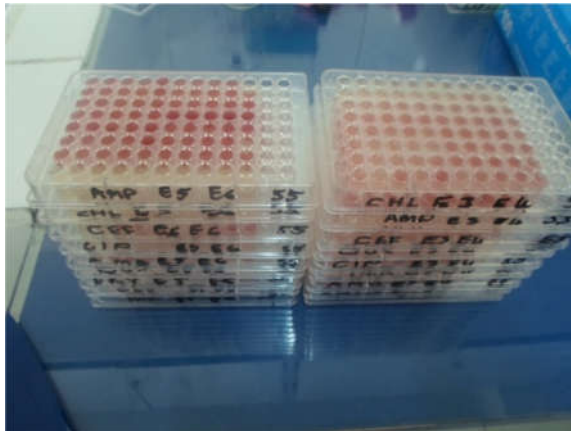
Alimentation standart des rats (Telefo, 1998).

<b>Composition</b>	<b>g</b>
<b>Maïs</b>	15000
<b>Soja</b>	5000
<b>Farine de poisson</b>	2500
<b>Farine d'os</b>	250
<b>Vitamine</b>	50
<b>Sel</b>	50
<b>Huile d'arachide</b>	250 ml

#### **Annexe 8: Equipements**

- Balance SHIMADZU 98545
- Évaporateur rotatif HEIDOLPH ROTAVAPOR VV-2000
- Bec BUNSEN
- Autoclave YXQ-SG 41280
- Bain – marie
- Congélateur ZHUJIANG LRH-150-B
- Incubateur ZHUJIANG LRH-250-6
- Spectrophotomètre CORNING -259
- Etuve
- Agitateur magnétique

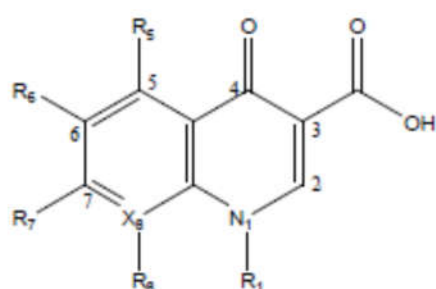
## Annexe 9: Photos des plaques lors des tests antibacteriens et des associations



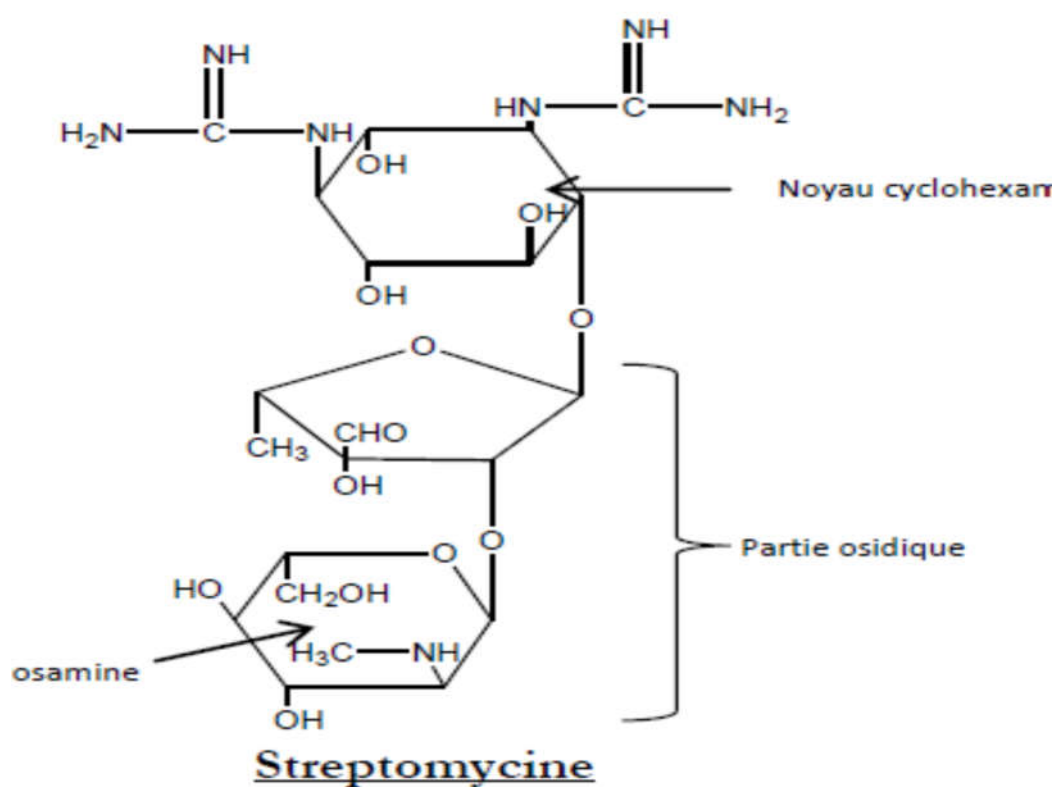
## Annexe 10: Structures des antibiotiques

<p>Noyau pénème (Pénicillines)</p>	<p>Noyau clavame (inhibiteurs de beta-lactamases)</p>
<p>Noyau céphème (céphalosporines)</p>	<p>Oxacéphème</p>
<p>Carbapénème</p>	<p>Monobactame</p>

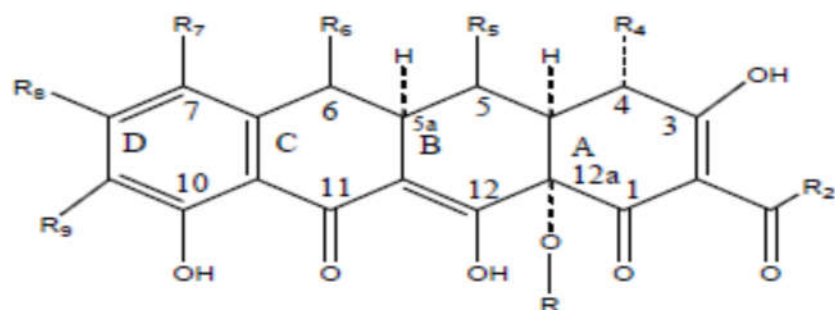
Diversité des antibiotiques de type beta-lactames : principaux cycles et antibiotiques représentatifs (Tulkens *et al.*, 2002).



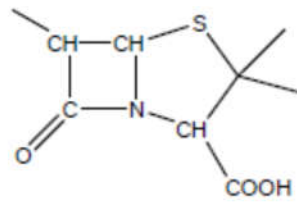
structure de base des quinolones



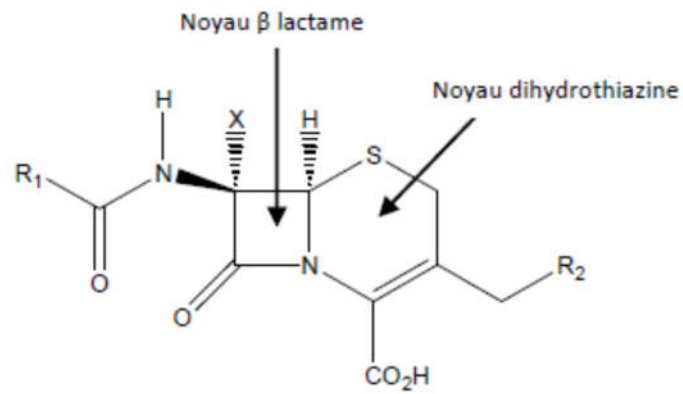
Streptomycine



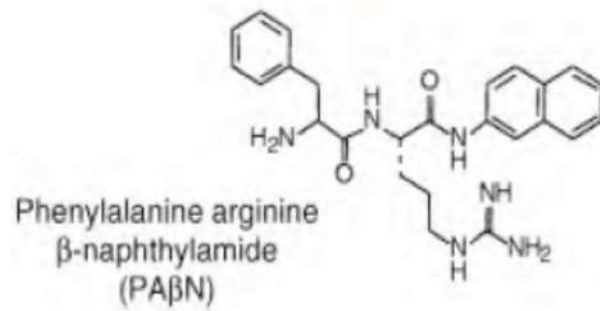
structure de base des tétracyclines



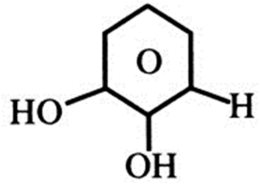
structure de base des pénicillines



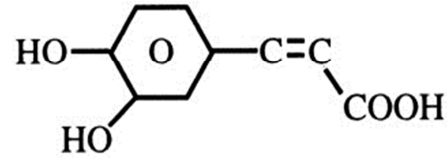
structure de base des céphalosporines



Annexe 11: Structures des metabolites secondaires

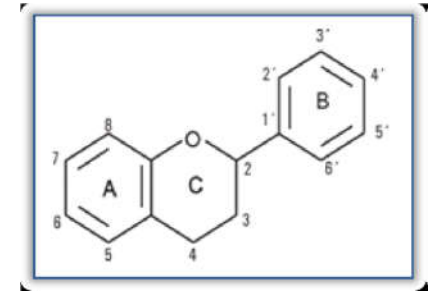


Catechol

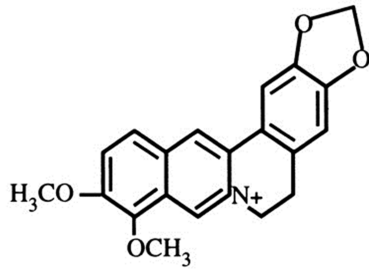


Acide caféique

Coumarine

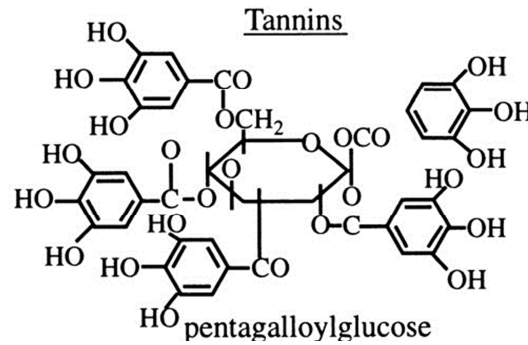


Structure de base des flavonoïdes

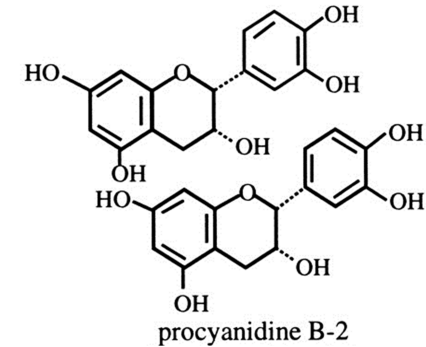


berberine

Alcaloïde



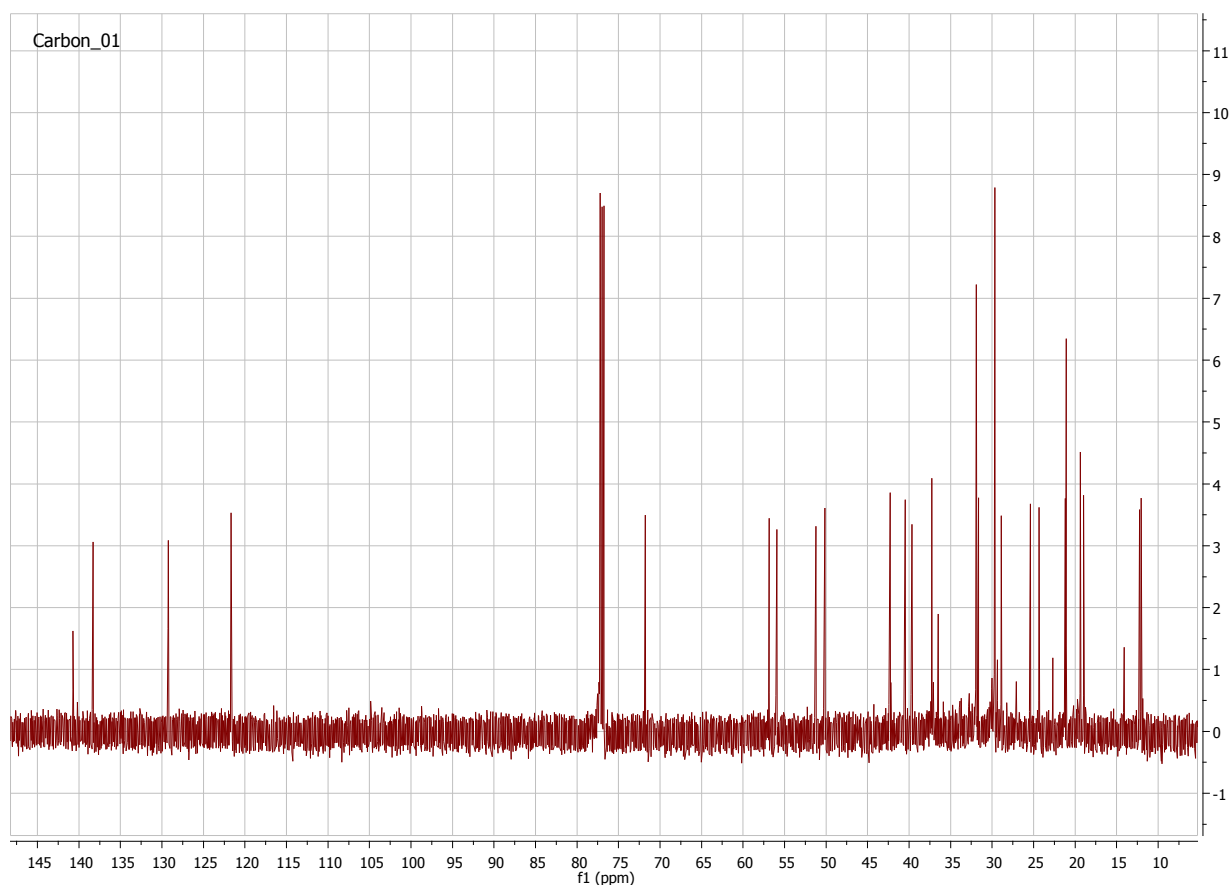
Tanin hydrolysable



Tanin condens

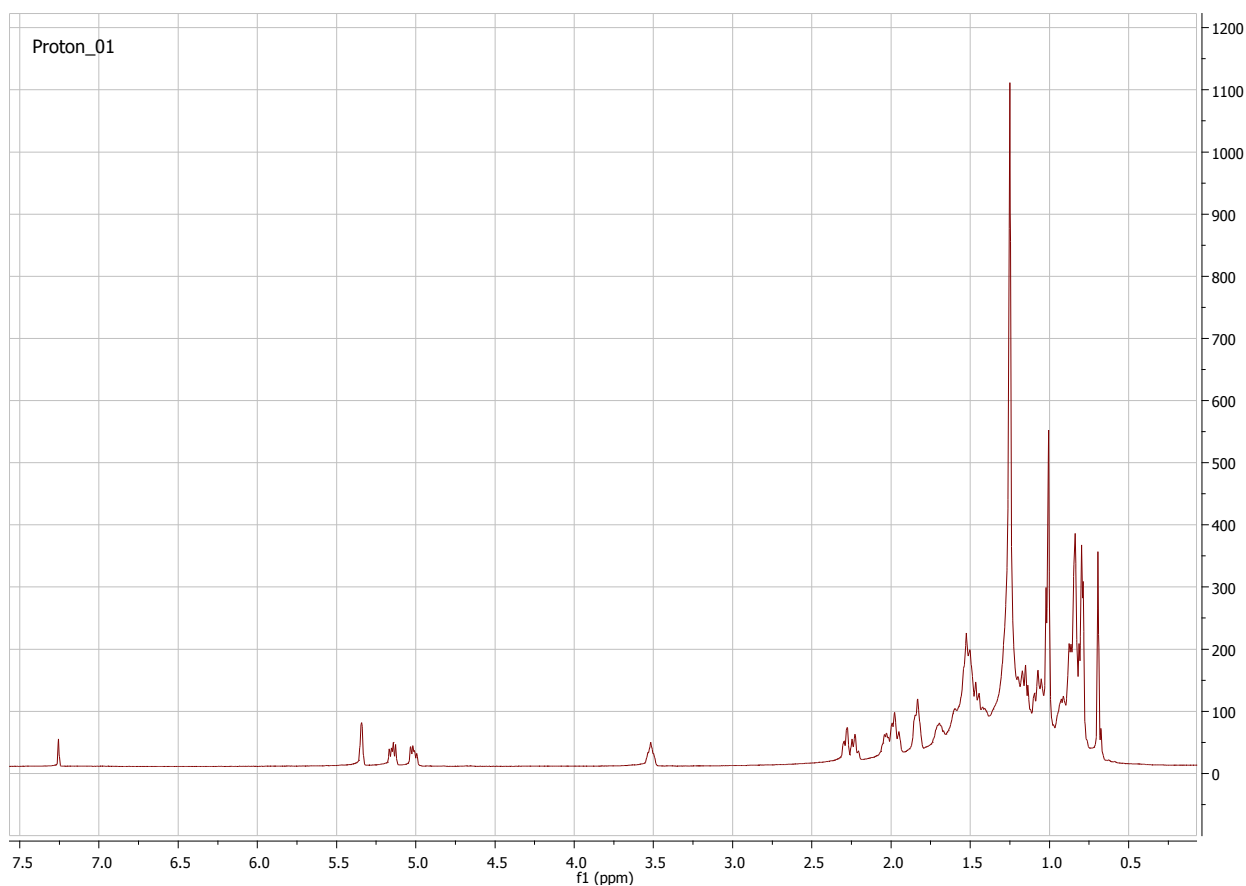
## Annexe 12: RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ et déplacements chimiques majeurs des composés étudiés

Composé **1** (stigmastérol): RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz): 12,0 (C-29) ; 12,2 (C-24) ; 18,9 (C-28) ; 19,4 (C-27) ; 21,1 (C-26) ; 21,4 (C-11) ; 22,7 (C-22) ; 24,4 (C-15) ; 25,4 (C-23) ; 29,4 (C-16) ; 29,7 (C-25) ; 31,7 (C-7 et C-8) ; 31,9 (C-2) ; 36,5 (C-10) ; 37,2 (C-1) ; 39,7 (C-12) ; 40,6 (C-18) ; 42,2 (C-13) ; 42,3 (C-4) ; 50,2 (C-22) ; 51,2 (C-9) ; 55,9 (C-17) ; 56,8 (C-14) ; 71,8 (C-3) ; 121,7 (C-6) ; 129,3 (C-21) ; 138,3 (C-20) ; 140,7 (C-5) (Chaturvedula et Prakash, 2012).



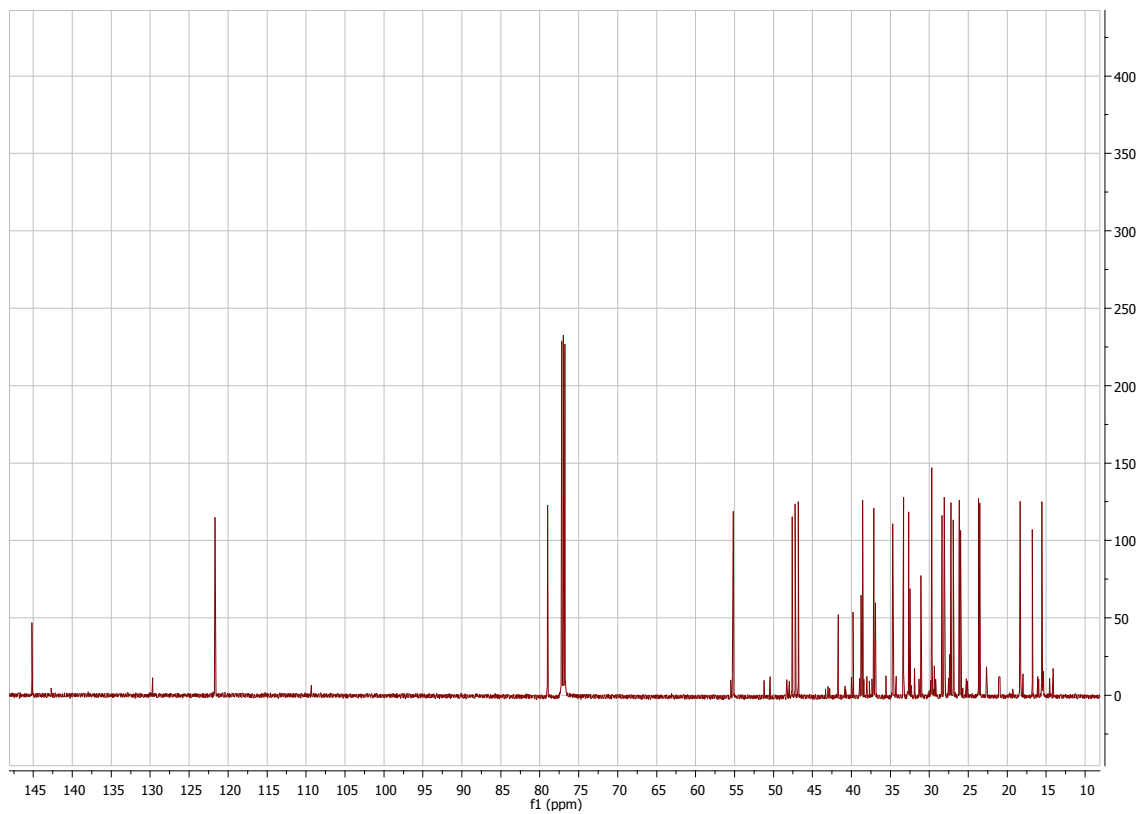
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) du composé **1**



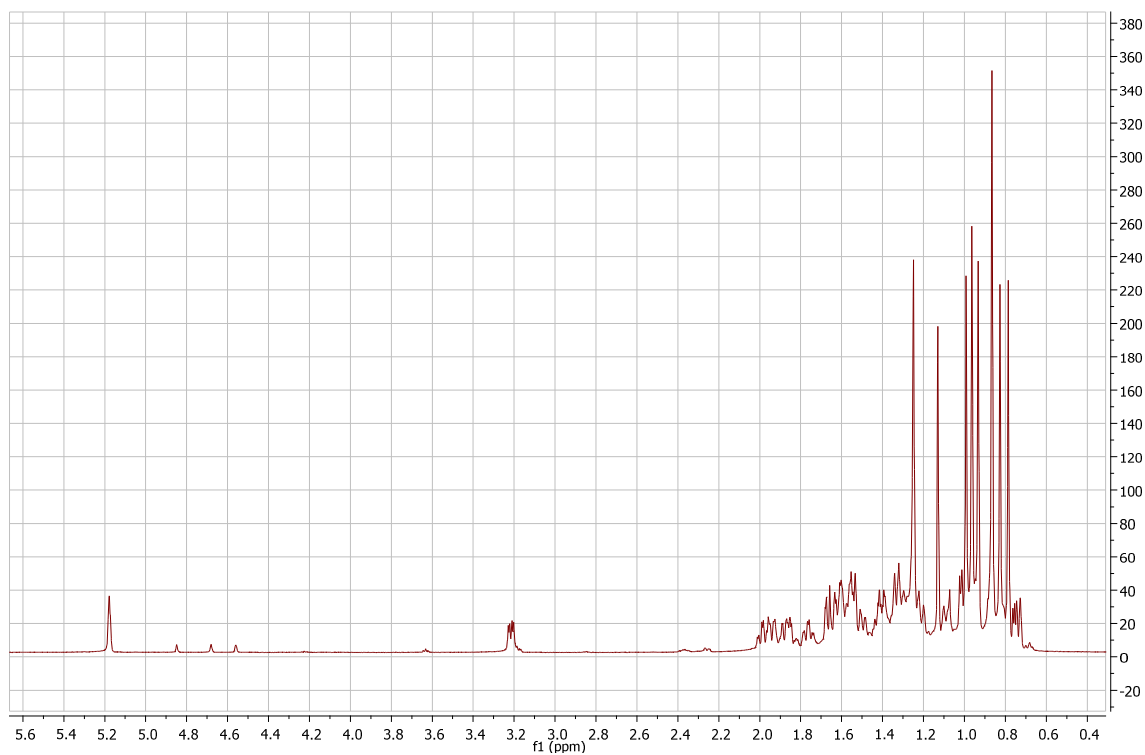


RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) du composé **1**

Composé **2** ( $\beta$ -amyrine): RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz): 15,5 (C-25) ; 15,6 (C-24) ; 16,3 (C-26) ; 18,6 (C-6) ; 23,6 (C-11) ; 23,7 (C-30) ; 25,9 (C-27) ; 26,1(C-16) ; 26,2 (C-15) ; 26,6 (C-15) ; 27,2 (C-27) ; 28,0 (C-23) ; 28,4 (C-28) ; 31,0 (C-20) ; 32,5 (C-7) ; 32,6 (C-17) ; 33,8 (C-29) ; 34,7 (C-21) ; 36,9 (C-10) ; 37,1 (C-22) ; 38,6 (C-4) ; 38,8 (C-1) ; 39,8 (C-8) ; 41,7 (C-14) ; 46,8 (C-19) ; 47,2 (C-18) ; 47,6 (C-9) ; 55,2 (C-5) ; 79,0 (C-3) ; 121,7 (C-12) ; 145,2 (C-13) (Mahato et Kundu, 1994).

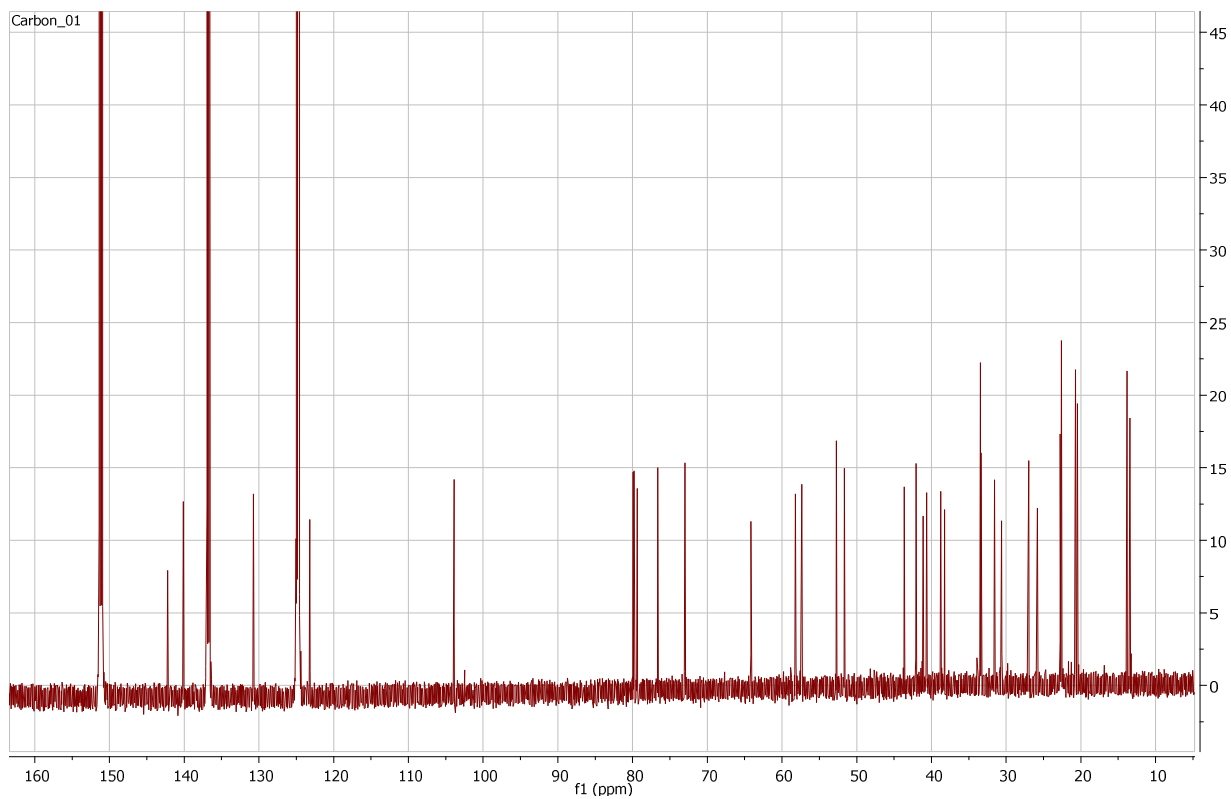


RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) du composé 2

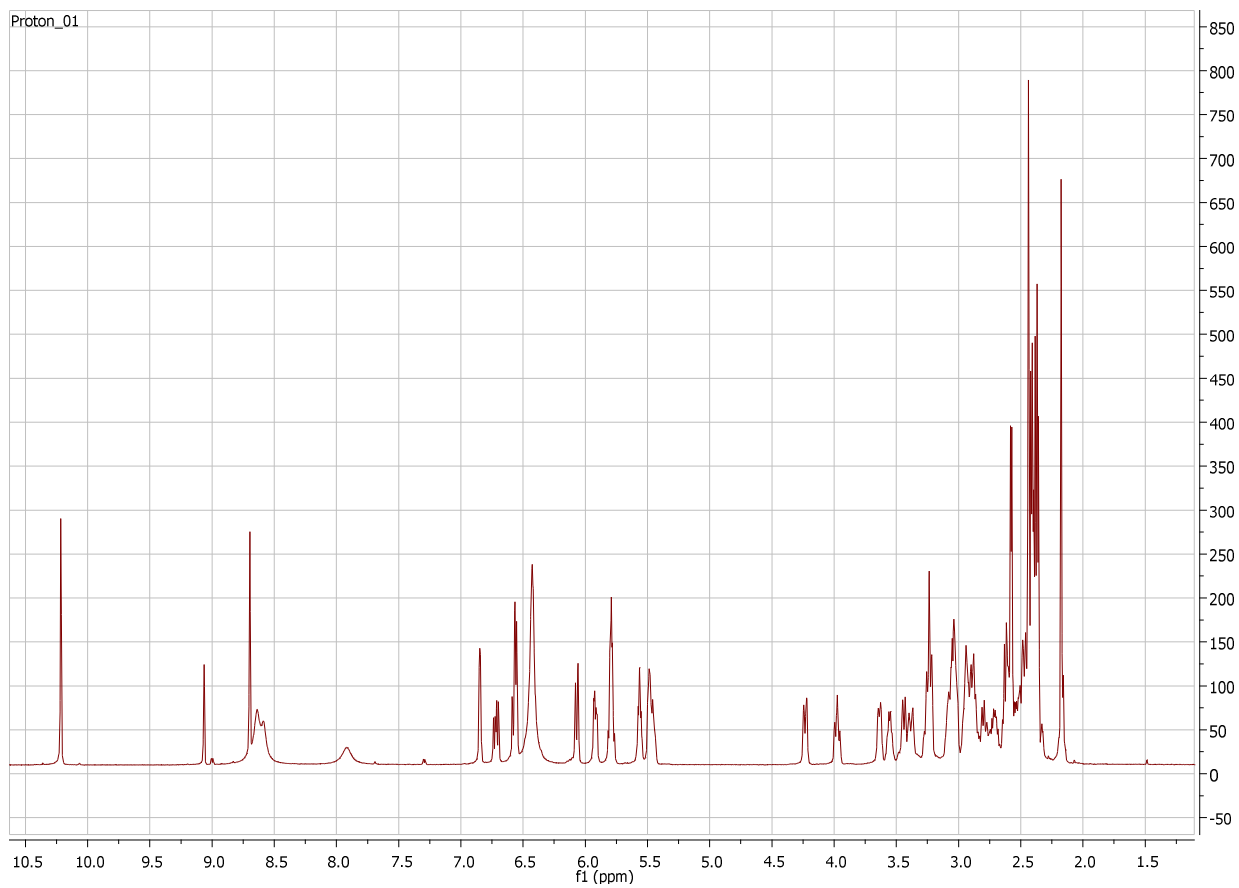


RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) du composé 2

Composé **3** (stigmasterol-3-*O*- $\beta$ -glucopyranosyle)

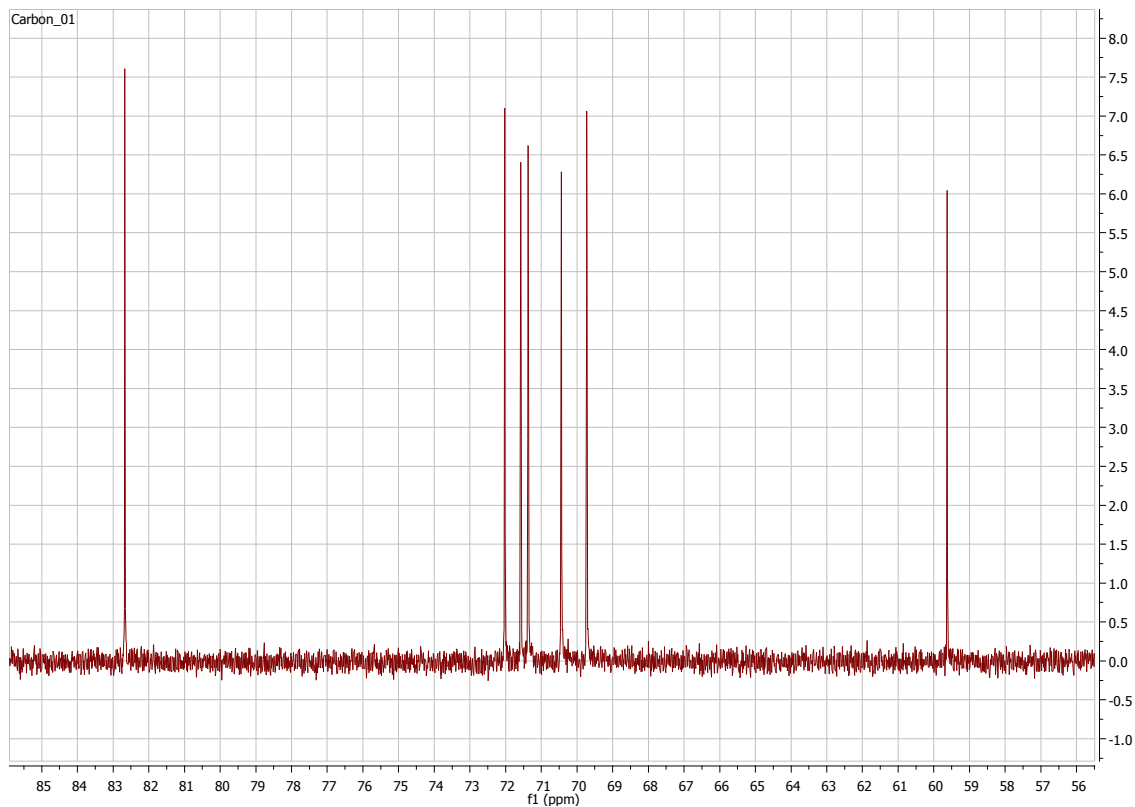


RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 150 MHz) du composé **3**

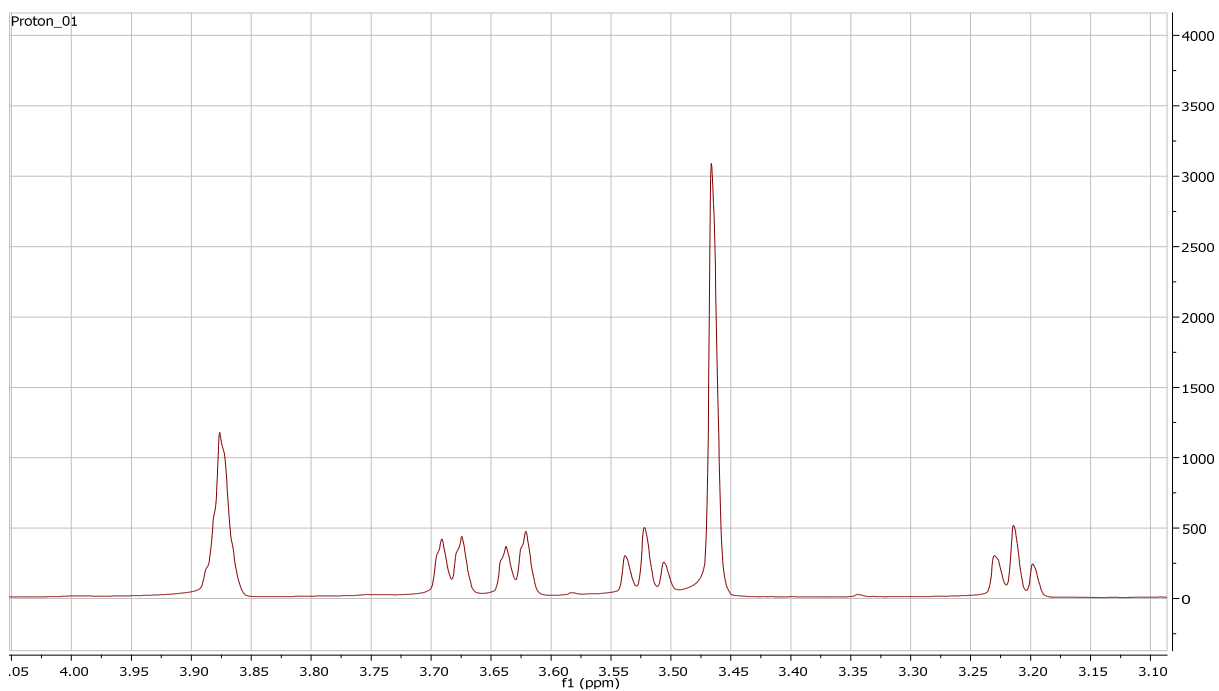


RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 600 MHz) du composé **3**

Composé 4 (3-*O*-méthyl- $\text{-D}$ -Chiro-inositol): RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 150 MHz): 59,6 (MeO-) ; 69,7 (C-4) ; 70,5 (C-2) ; 71,4 (C-6) ; 71,6 (C-1) ; 72,0 (C-5) ; 82,7 (C-3) (Sharma *et al.*, 2016).

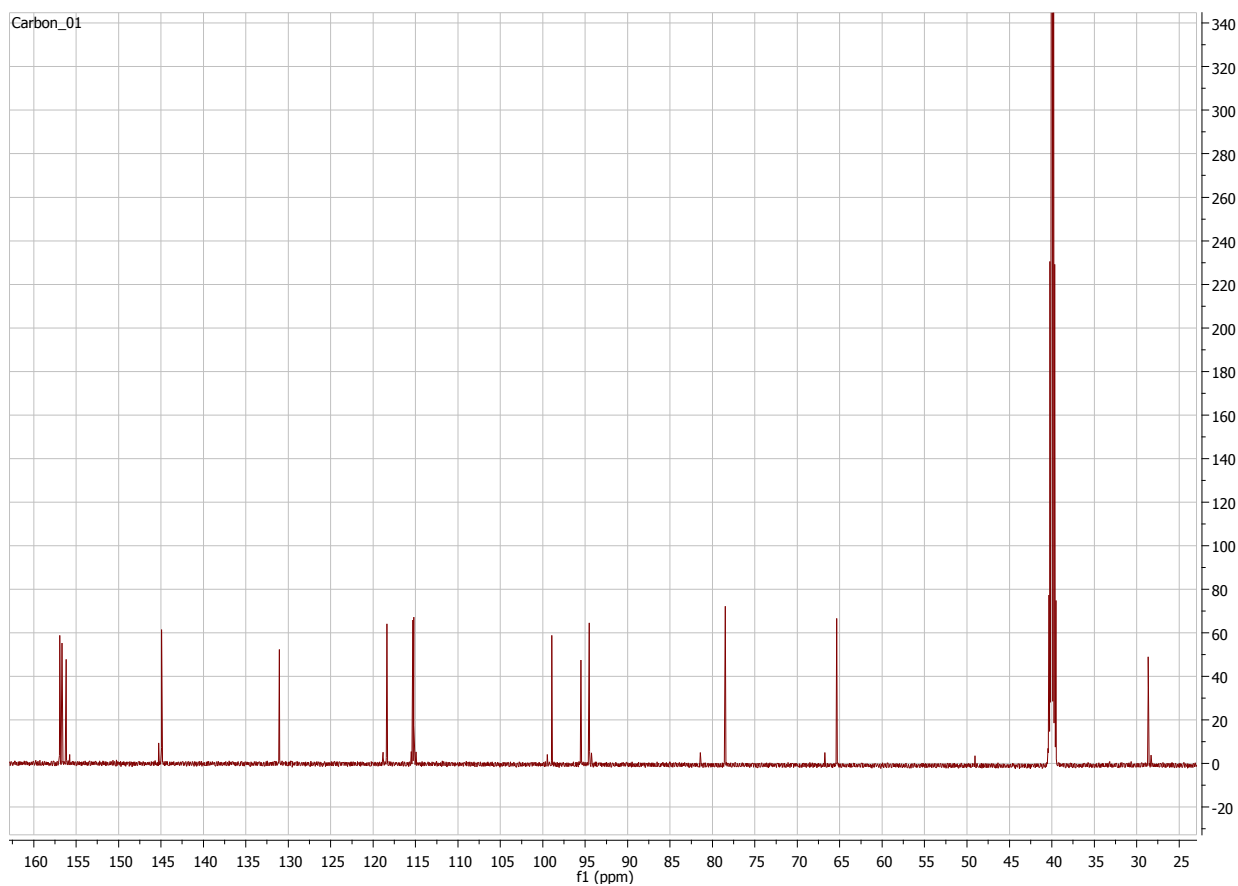


RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 150 MHz) du composé 4

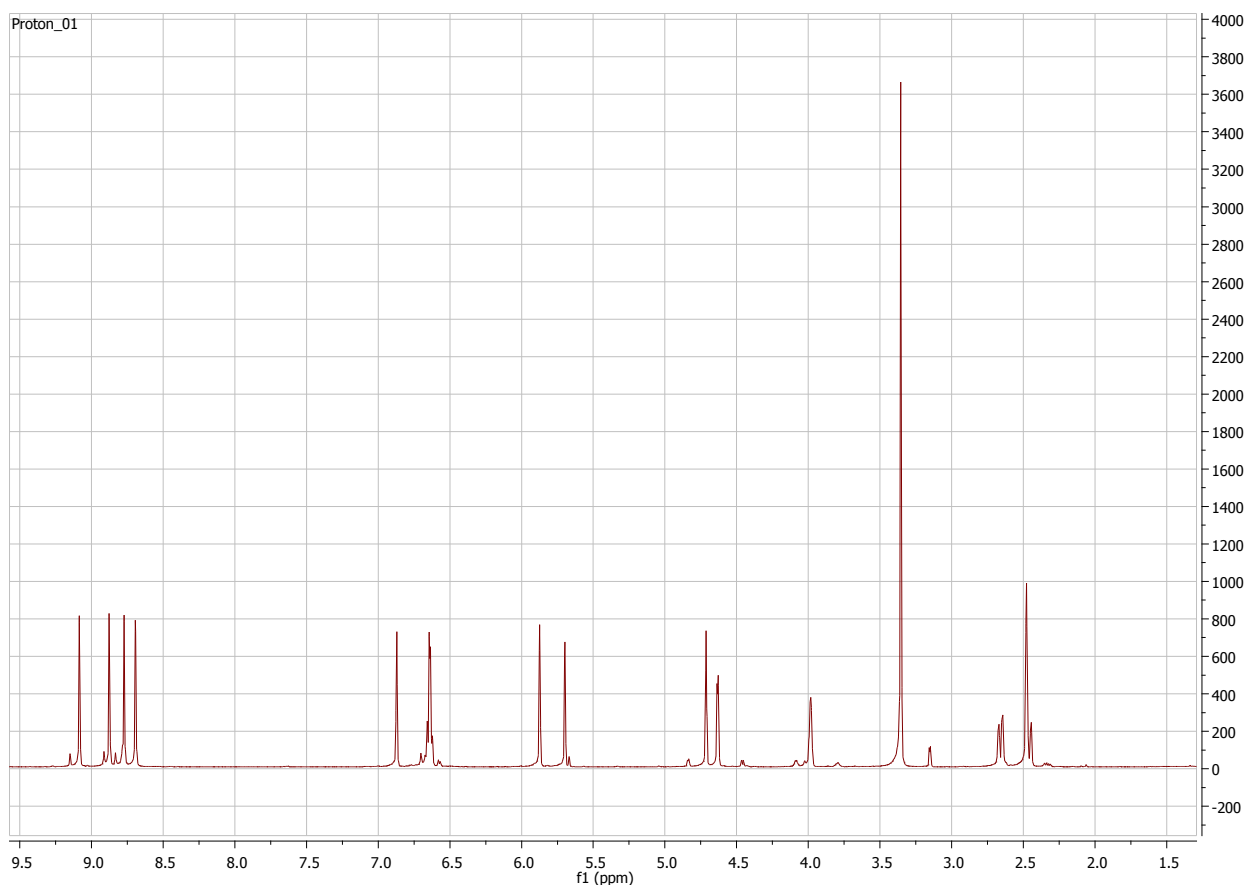


RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz) du composé **4**

Composé **5** (Epicatechine): RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 150 MHz): 28,6( $\text{C-4}$ ) ; 65,3( $\text{C-3}$ ) ; 78,5( $\text{C-2}$ ) ; 94,5( $\text{C-8}$ ) ; 95,5 ( $\text{C-6}$ ) ; 98,9 ( $\text{C-4a}$ ) ; 115,2 ( $\text{C-2'}$ ) ; 115,3 ( $\text{C-5'}$ ) ; 118,4 ( $\text{C-6'}$ ) ; 131,0 ( $\text{C-1'}$ ) ; 144,8 ( $\text{C-4'}$ ) ; 144,9 ( $\text{C-3'}$ ) ; 156,1 ( $\text{C-8a}$ ) ; 156,6 ( $\text{C-5}$ ) ; 156,9 ( $\text{C-7}$ ) (Adnyana *et al.*, 2000).

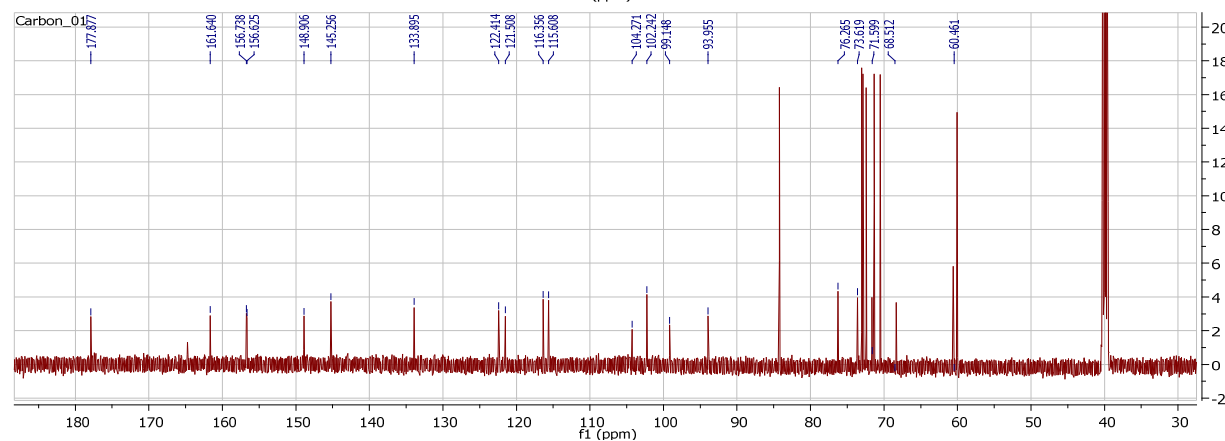
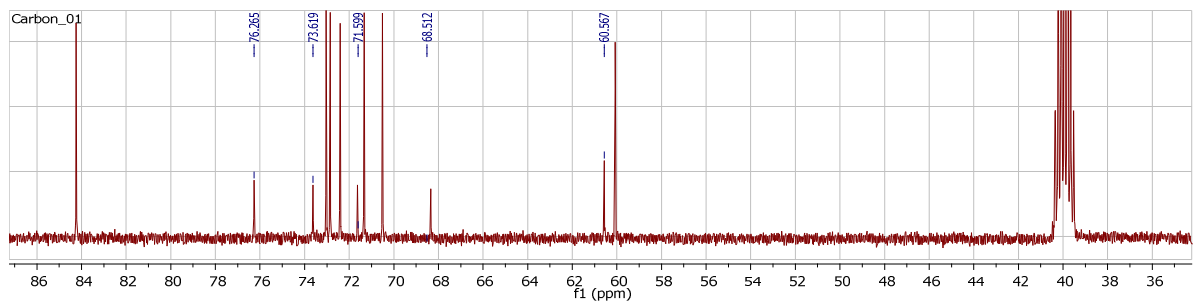
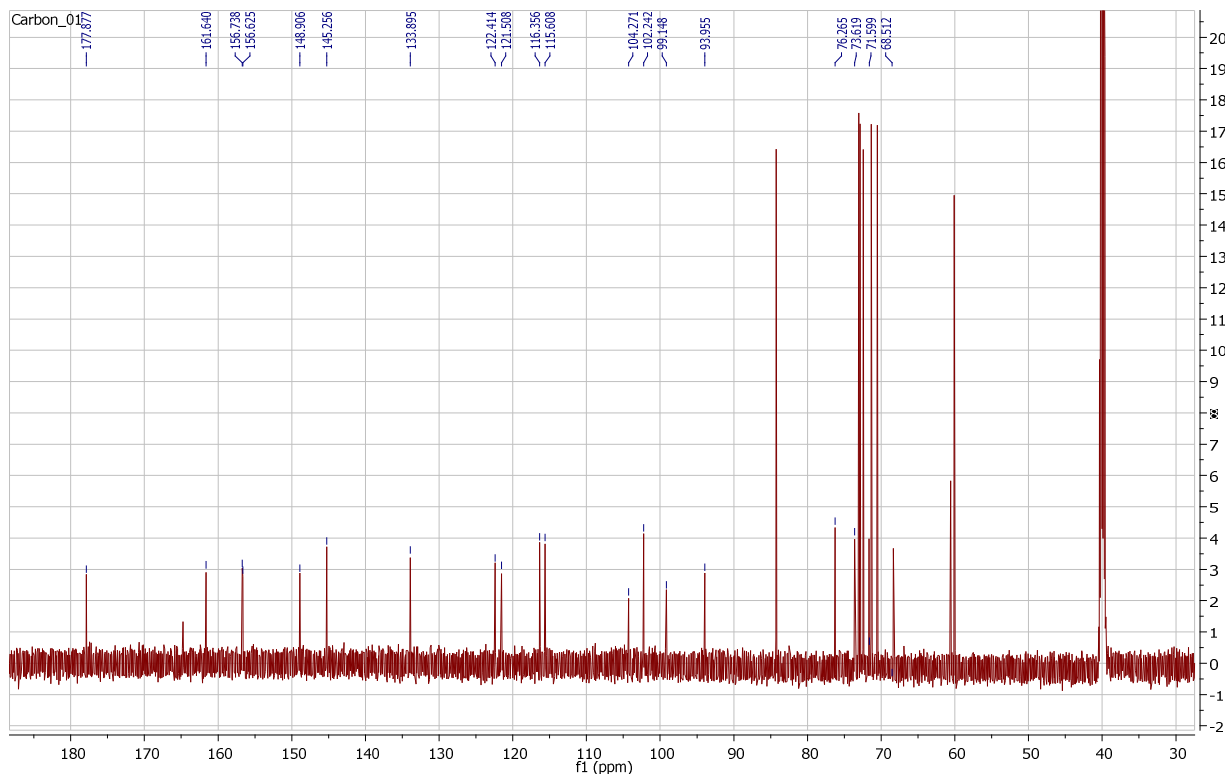


RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 150 MHz) du composé **5**



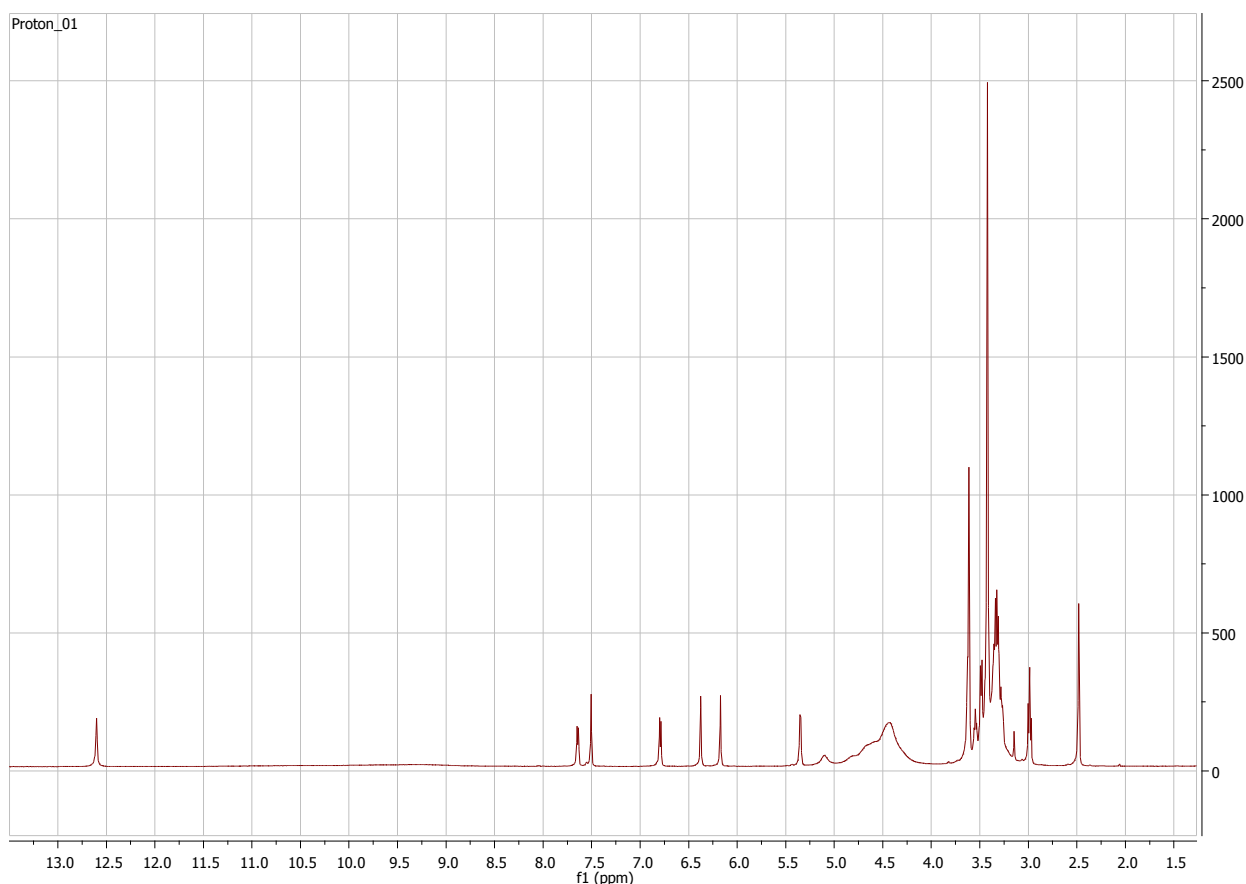
RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) du composé **5**

Composé **6** (quercetin-3-*O*-glucoside): RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 150 MHz): 60,6 (C-6''); 68,5 (C-4''); 71,5 (C-2''); 73,6 (C-3''); 76,3 (C-5''); 93,4 (C-8); 99,1 (C-6); 102,2 (C-1''); 104,2 (C-4a); 115,6 (C-2'); 116,3 (C-5'); 121,5 (C-1'); 122,4 (C-6'); 133,82 (C-3); 145,3 (C-3'); 148,9 (C-4'); 156,6 (C-8a); 156,7 (C-2); 161,6 (C-5); 164,7 (C-7); 177,7 (C-4) (Xu *et al.*, 2012).



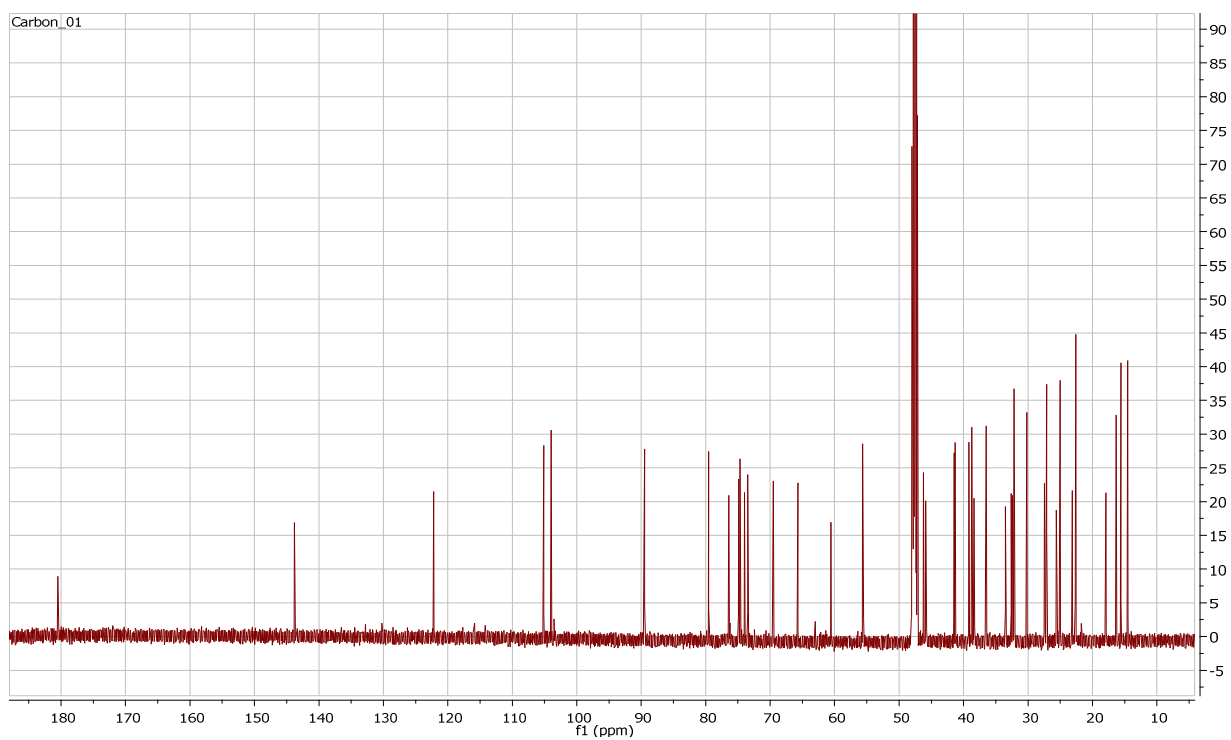
RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) du composé **6**



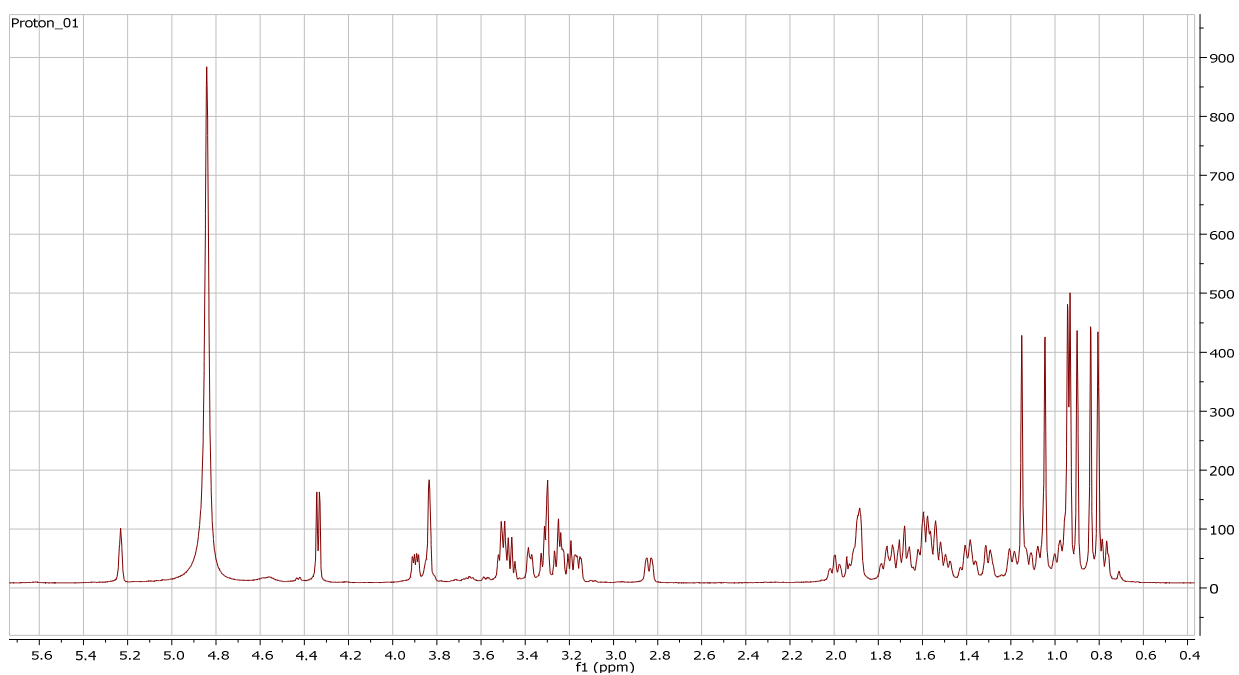


RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) du composé **6**

Composé **7** acide (3-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolique): RMN  $^{13}\text{C}$  (CD $_3$ OD, 150 MHz): 14,5 (C-25) ; 15,6 (C-24) ; 16,3 (C-26) ; 17,9 (C-6) ; 22,6 (C-30) ; 22,7 (C-16) ; 23,1 (C-11) ; 25,0 (C-27) ; 25,6 (C-2) ; 27,1 (C-23) ; 27,4 (C-15) ; 30,2 (C-20) ; 32,2 (C-29) ; 32,4 (C-22) ; 32,6 (C-7) ; 33,5 (C-21) ; 36,5 (C-10) ; 38,4 (C-1) ; 38,7 (C-4) ; 39,2 (C-18) ; 41,3 (C-8) ; 41,5 (C-14) ; 45,8 (C-19) ; 46,2 (C-17) ; 47,6 (C-9) ; 55,6 (C-5) ; 60,6 (C-6') ; 65,7 (C-5'') ; 69,5 (C-4'') ; 73,5 (C-2'') ; 74,0 (C-2') ; 74,6 (C-5') ; 74,9 (C-3') ; 76,4 (C-3'') ; 79,5 (C-4') ; 89,5 (C-3) ; 104,0 (C-1'') ; 105,1 (C-1') ; 122,2 (C-12) ; 143,8 (C-13) ; 180,5 (C-28) (Fotso *et al.*, 2018).

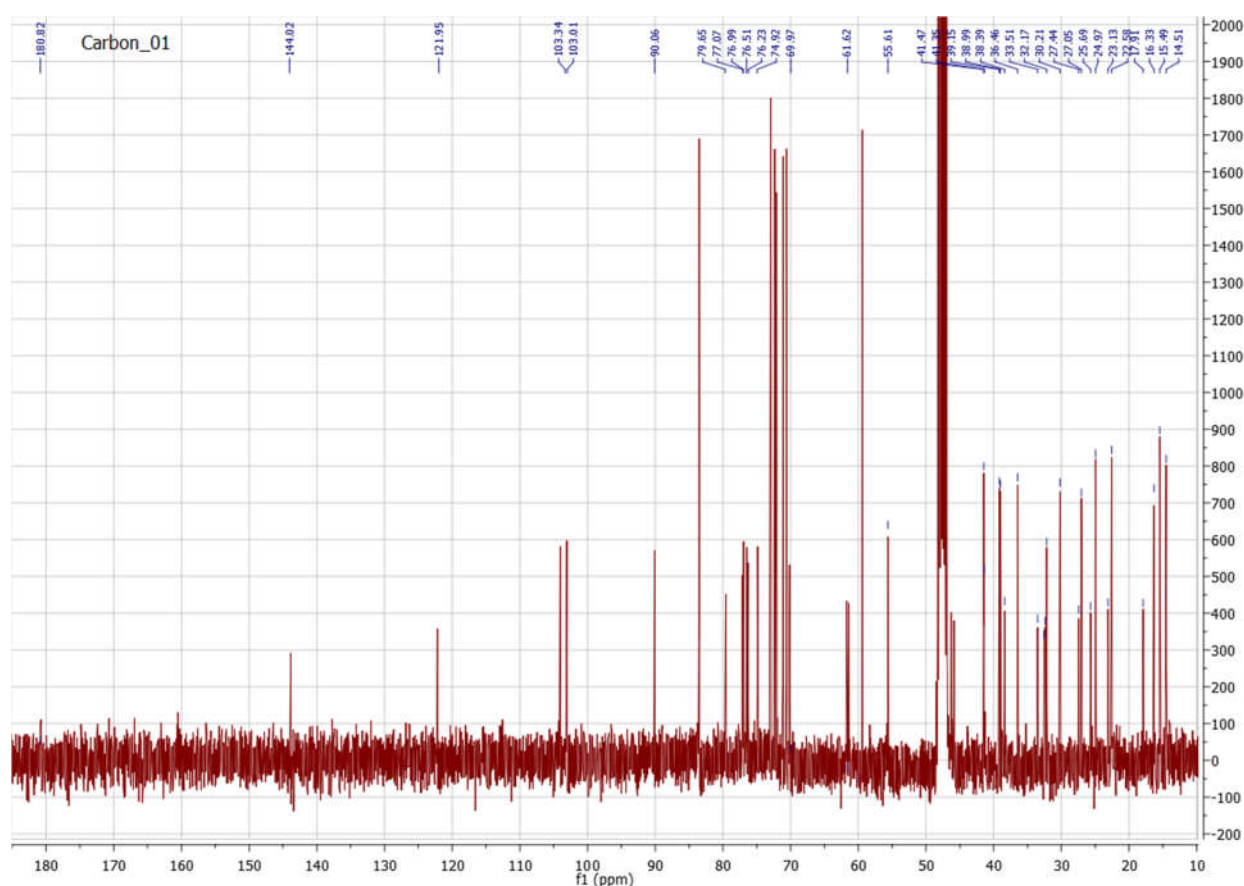


RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé 7

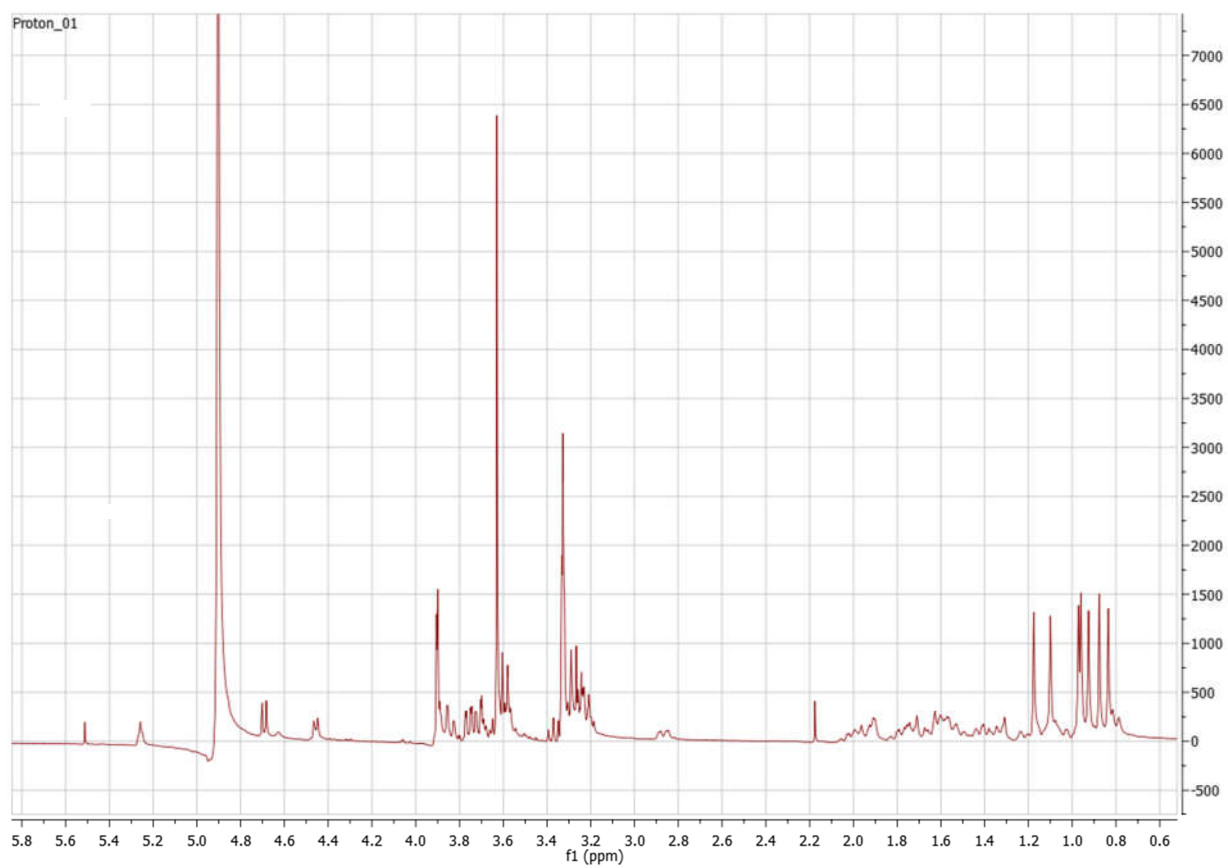


RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) du composé 7

Composé **8** acide (3-*O*-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolique): RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz): 14,5 (C-25) ; 15,5 (C-24) ; 16,3 (C-26) ; 18,0 (C-6) ; 22,7 (C-30) ; 23,1 (C-16) ; 25,0 (C-11) ; 25,7 (C-27) ; 27,1 (C-2 et C-23) ; 27,4 (C-15) ; 32,2 (C-20) ; 32,4 (C-7) ; 32,6 (C-22 et C-29) ; 33,5 (C-21) ; 36,5 (C-10) ; 38,4 (C-4) ; 39,2 (C-1) ; 39,0 (C-8) ; 41,4 (C-18) ; 41,5 (C-14) ; 45,9 (C-17) ; 45,7 (C-9) ; 46,3 (C-19) ; 55,6 (C-5) ; 61,7 (C-6') ; 70,1 (C-4'') ; 70,4 (C-2'') ; 74,9 (C-3') ; 76,2 (C-3'') ; 76,5 (C-2') ; 77,0 (C-5') ; 77,1 (C-5'') ; 79,7 (C-4') ; 90,1 (C-3) ; 103,1 (C-1') ; 104,0 (C-1'') ; 122,2 (C-12) ; 143,8 (C-13) ; 180,7 (C-28) (Chaturvedula et Prakash, 2012).

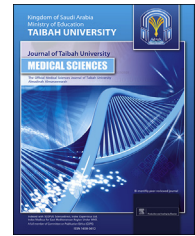


RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) du composé **8**



RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) du composé **8**

**PUBLICATIONS ISSUES DE  
LA THESE**



## Original Article

## Antibacterial activities of methanol extracts from *Alchornea cordifolia* and four other Cameroonian plants against MDR phenotypes



Flora T. Mambe, MSc<sup>a</sup>, Igor K. Voukeng, MSc<sup>b</sup>, Veronique P. Beng, PhD<sup>a</sup> and Victor Kuete, PhD<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

<sup>b</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Dschang, Dschang, Cameroon

Received 31 August 2015; revised 3 December 2015; accepted 8 December 2015; Available online 14 January 2016

### المخلص

**أهداف البحث:** برزت الالتهابات البكتيرية المقاومة للعديد من الأدوية، خاصة التي تنجم من الأنماط سلبية الغرام، كواحدة من المخاوف الصحية الرئيسية في جميع أنحاء العالم. في هذه الدراسة؛ تم التحقق في النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات المنثول لخمسة من النباتات الطبية الكامرونية؛ الكورنيا كورديفوليا، وارموماستاكس سببسيوسا، ولابورتيا ايستوانس، وبينسيتوم بوربيريوم وسباتوديا كامبانولاتا ضد ١٥ بكتيريا سلبية الغرام من ضمنها الأنماط المقاومة للعديد من الأدوية.

**طرق البحث:** تم استخدام طريقة التخفيف الصغرى للسائل لتحديد الحد الأدنى من الكثافة المثبطة، والحد الأدنى من كثافة مبيد البكتيريا لجميع العينات. تم استخدام الطرق القياسية النباتية للفحص الأولي النباتي للمستخلصات النباتية.

**النتائج:** أظهر التحليل الكيميائي النباتي وجود البولي فينول، والعفص، والترينبات والستيرول في جميع المستخلصات المدروسة. تم تحديد الطبقات الكيميائية الأخرى من المركبات الثانوية بعناية. كما أظهرت النتائج أفضل الأنشطة المضادة للبكتيريا (تتراوح بين ٦٤-١٠٢٤ ميكروجرام/مل)، التي تم الحصول عليها ضد الـ ١٥ نوع من البكتيريا المختبرة، من أوراق ٩٣,٣٪، ولحاء ٨٦,٧٪ وجذور ٨٠٪ مستخلصات الكورنيا كورديفوليا، بالإضافة إلى لابورتيا ايستوانس ٨٦,٧٪ وبينسيتوم بوربيريوم ٦٦,٧٪. أقل قيمة للحد الأدنى من الكثافة المثبطة ٦٤ ميكروجرام/مل سجلت مع لحاء الكورنيا كورديفوليا ضد سودومونس ايروجينوسا.

**الاستنتاجات:** تقدم هذه الدراسة نظرة عميقة إلى إمكانية استخدام النباتات المدروسة، خاصة الكورنيا كورديفوليا ولابورتيا ايستوانس في السيطرة على الالتهابات البكتيرية السلبية الغرام بما فيها الأنواع المقاومة للعديد من الأدوية.

**الكلمات المفتاحية:** الكورنيا كورديفوليا؛ البكتيريا سلبية الغرام؛ لابورتيا ايستوانس؛ الالتهابات البكتيرية المقاومة للعديد من الأدوية؛ النباتات الطبية

### Abstract

**Objectives:** Multidrug-resistant (MDR) bacterial infections, especially those caused by Gram-negative phenotypes, have emerged as one of the major health concerns worldwide. In the present study, we investigated the antibacterial activity of methanol extracts from five Cameroonian medicinal plants (*Alchornea cordifolia*, *Eremomastax speciosa*, *Laportea aestuans*, *Pennisetum purpureum* and *Spathodea campanulata*) against 15 Gram-negative bacteria that included MDR phenotypes.

**Methods:** The broth microdilution method was used to determine the minimal inhibitory concentrations (MIC) and the minimal bactericidal concentrations (MBC) of all of the samples. Standard phytochemical methods were used for a preliminary phytochemical screening of the plant extracts.

**Results:** Phytochemical analysis showed the presence of polyphenols, tannins, triterpenes and sterols in all of the studied extracts. Other chemical classes of secondary metabolites were selectively identified. The best antibacterial activities (MICs ranges of 64–1024 µg/mL) obtained against the 15 tested bacteria were found in extracts of leaves (93.3%), bark (86.7%) and roots (80%) of *A. cordifolia* as well as extracts of *L. aestuans* (86.7%) and *P. purpureum* (66.7%). The lowest MIC value of 64 µg/mL was recorded for the *A. cordifolia* bark extract against *Pseudomonas aeruginosa* PA01.

**Conclusions:** The findings of this study provide deep insights into the possible use of the studied plants, especially *A. cordifolia* and *L. aestuans*, for the control of

\* Corresponding address: Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Dschang, P.O. Box 67, Dschang, Cameroon.  
E-mail: [kuetevictor@yahoo.fr](mailto:kuetevictor@yahoo.fr) (V. Kuete)

Peer review under responsibility of Taibah University.



Gram-negative bacterial infections, especially against MDR species.

**Keywords:** *Alchornea cordifolia*; Gram-negative bacteria; *Laportea aestuans*; MDR bacteria; Medicinal plants

© 2016 The Authors.

Production and hosting by Elsevier Ltd on behalf of Taibah University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introduction

Multidrug-resistant (MDR) bacterial infections, especially those caused by Gram-negative microorganisms, have emerged as a global health concern.<sup>1</sup> Efflux pumps that belong to the resistance-nodulation-cell division (RND) family of tripartite efflux pumps are largely involved in the multidrug resistance of Gram-negative bacteria.<sup>2</sup> The scarcity of novel antibacterials to combat bacterial MDR phenotypes drives the search for novel drugs from natural sources. With regards to the variety and diversity of secondary metabolites, medicinal plants constitute a good source of antibacterials.<sup>3</sup> In the past five years, studies have intensified on the search of phytochemicals from African plants to tackle MDR bacterial infections. Some of the most active plants against MDR Gram-negative bacteria include *Beilschmiedia cinnamomea*, *Fagara xanthoxyloides*, *Olax subscorpioidea*,<sup>4</sup> *Solanum nigrum*,<sup>5</sup> *Vernonia amygdalina*,<sup>6</sup> *Peperomia fernandopoiana*,<sup>7</sup> *Capsicum frutescens*,<sup>8</sup> *Allanblackia gabonensis*, *Combretum molle*, *Gladiolus quartianus*,<sup>9</sup> and *Fagara tessmannii*.<sup>10</sup> In our continuous search for antibacterials from African flora, we designed the present study to investigate the *in vitro* antibacterial activity of the methanol extracts of five Cameroonian medicinal plants, that is, *Alchornea cordifolia* (Schum. & Thonn.) Müll.-Arg. (Euphorbiaceae), *Eremomastax speciosa* (Hochst.) Cufod. (Acanthaceae), *Laportea aestuans* (Linn.) Chew (Urticaceae), *Pennisetum purpureum* Schumach. (Poaceae) and *Spathodea campanulata* P. Beauv. (Bignoniaceae), against MDR Gram-negative bacteria.

## Materials and Methods

### Plant materials and extraction

Different parts of the selected plants were collected from various regions of Cameroon in January 2014. These included leaves, bark and roots of *A. cordifolia* and *S. campanulata* and whole plants of *E. speciosa*, *L. aestuans* and *P. purpureum*. The plants were identified at the Cameroon National Herbarium (Yaounde, Cameroon) where voucher specimens were deposited under the reference numbers shown in Table 1. Each plant sample was air-dried and powdered. Methanol is known to be powerful extraction solvent of antibacterial compounds from plants.<sup>3</sup> Therefore, the obtained powder (200 g) was extracted with methanol (MeOH 100%; 1 L) for 48 h at room temperature. The extract was then concentrated at 68 °C

under reduced pressure to obtain the residues that constituted the crude extract. All of the extracts were kept at 4 °C until further use.

### Ethics statement

No specific permits were required from the local authority for the collection of the studied plants. The medicinal plants chosen for this study are not endangered or protected by the laws of the country.

### Preliminary phytochemical screening

The major phytochemical classes, such as alkaloids, triterpenes, flavonoids, anthraquinones, polyphenols, sterols, coumarins, saponins and tannins, in the plant extracts were detected according to commonly described phytochemical methods.<sup>11</sup>

### Antimicrobial assays

#### Chemicals for the antimicrobial assay

Chloramphenicol (CHL; Sigma—Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was used as a reference antibiotic (RA). In addition, *p*-Iodonitrotetrazolium chloride (INT) was used as a microbial growth indicator.<sup>12,13</sup>

#### Microbial strains and culture media

The studied microorganisms included sensitive and resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* and *Providencia stuartii* obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) as well as clinical strains. Their bacterial features were previously reported.<sup>8,14,15</sup> Nutrient agars were used for the activation of the tested Gram-negative bacteria, and Mueller Hinton Broth was used for the antibacterial assays.<sup>16</sup>

#### INT colourimetric assay for MIC and MBC determinations

The MIC determinations on the tested bacteria were conducted using the rapid *p*-Iodonitrotetrazolium chloride (INT) colourimetric assay according to the described methods<sup>12</sup> with certain modifications.<sup>17,18</sup> The test samples and the RA were first dissolved in DMSO/Mueller Hinton Broth (MHB). The final concentration of DMSO was lower than 2.5% and did not affect microbial growth.<sup>19,20</sup> The solution obtained was then added to Mueller Hinton Broth and serially diluted two-fold (in a 96-well microplate). One-hundred microlitres (100 µL) of an inoculum of  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL prepared in an appropriate broth was then added.<sup>17,18</sup> The plates were covered with a sterile plate sealer and then agitated to mix the contents of the wells using a plate shaker and incubated at 37 °C for 18 h. The assay was performed in triplicate. Wells that contained adequate broth, 100 µL of the inoculum and DMSO to a final concentration of 2.5% served as the negative control. The MIC of samples was detected after 18 h of incubation at 37 °C and after the addition of 40 µL (0.2 mg/mL) of INT and were incubated at 37 °C for 30 min. Viable

**Table 1: Information about the studied plants.**

Species (family); Voucher Number <sup>a</sup>	Traditional uses	Parts traditionally used	Bioactive or potentially bioactive components	Bioactivity of the crude extract
<i>Alchornea cordifolia</i> (Schum. & Thonn.) Müll.-Arg. (Euphorbiaceae); 9657/SRF/Cam	To treat rheumatic pains, fever, wounds, diarrhoea, convulsions, coughs, gonorrhoea, yaws, ulcer, rheumatic pains, bronchial troubles <sup>39,40</sup>	Leaves, seeds, bark and roots	Alchornine, alchorneinone, gentisnic acid and yohimbine <sup>39</sup>	Crude extract showed spasmolytic, <sup>39</sup> anti-inflammatory, <sup>41</sup> antimicrobial, <sup>31</sup> anti-diarrhoeal <sup>42</sup> and analgesic <sup>43</sup> activities
<i>Eremomastax speciosa</i> (Hochst.) Cufod. (Acanthaceae); 24165/SRF/Cam	Haematopoietic, antidiarrhoeal, antiulcer, treatment of female infertility, dysentery, anaemia, irregular menstruation, fracture, haemorrhoids and urinary tract infections <sup>34,35</sup>	Whole plant	Not reported	Antimicrobial effect of <u>crude extract</u> (Q); <i>Ec</i> , <i>Sa</i> , <i>Ca</i> <sup>36</sup>
<i>Laportea aestuans</i> (Linn.) Chew (Urticaceae); 34812/HNC	Antihelmintic, treatment of headaches, syphilitic yaws, fever, gonorrhoea, rheumatism, menopausal disorder, antidote, asthma, hypertension, stomach-ache, diarrhoea, wounds <sup>44</sup>	Leaves, roots	Vanilic acid, gallic acid, ferulic acid, (6)-gingerol, capsaicin, rosemamic acid, tannic acid, p-coumaric acid, caffeic acid, scopoletin, catechin, resveratrol, genistein, apigenin, kaempferol, epicatechin, epigallocatechin, ellagic acid, myricitin acid, quercetin- 3, 7, 4-trimethyl ether, quercetin-3,7,3',4'-trimethyl ether, artemetin, kaempferol-arabinoside, quercitrin, isoquercitrin, naringin, rutin, hesperidin, limonene, alpha pinene, beta pinene, cis-ocimene, myrcene, citronellol, neryl acetate, malvidine, lycopene, carotene, lutein, hispogenin, diosgenin, neochlorogenin, hecogenin <sup>45,46</sup>	Antimicrobial effect of <u>crude extract</u> (Q); <i>K</i> , <i>Ec</i> , <i>Sa</i> , <i>Bs</i> , <i>St</i> , <i>Pa</i> , <i>Ca</i> <sup>33,45</sup>
<i>Pennisetum purpureum</i> Schumach. (Poaceae); 12525/SRF/Cam	Diuretic, antivenomous, Treatment of measles, wound healing <sup>37</sup>	Whole plant	Not reported	Antimicrobial effect of <u>EO</u> : (Q); <i>Ec</i> , <i>Pa</i> <sup>37</sup>
<i>Spathodea campanulata</i> P. Beauv. (Bignoniaceae) 22791/SRF/Cam	Treatment of mental disorders, malaria, haemorrhoids, bacterial infections, HIV, poor blood circulation, gastro-intestinal diseases, urinary tract disorders <sup>47</sup>	Flowers, leaves, bark	Carbohydrates, alkaloids, tannins, iridoid glucoside, phydroxy-benzoic acid, methyl p-hydroxy-benzoate <sup>47,48</sup>	Antimicrobial effect of <u>crude extract</u> (Q): <i>Pv</i> , <i>Ec</i> , <i>Kp</i> <sup>38</sup>

<sup>a</sup> (HNC): Cameroon National Herbarium; (SRF/Cam): Société des Réserves Forestières du Cameroun; (Q): qualitative activity based on the inhibition zone. EO: Essential oil; *Sa*: *Staphylococcus aureus*; *Ec*: *Escherichia coli*; *Bs*: *Bacillus subtilis*; *Kp*: *Klebsiella pneumoniae*; *St*: *Salmonella typhi*; *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *Se*: *Salmonella enterica*; *Pv*: *Proteus vulgaris*; *Ca*: *Candida albicans*; Underline: Tested sample from the plant.

bacteria reduced the yellow dye to pink. The MIC was defined as the sample concentration that prevented the colour change of the medium and exhibited a complete inhibition of the microbial growth.<sup>12</sup> The MBC was determined by adding 50 µL aliquots of the preparations that did not show any growth after the incubation during the MIC assays in 150 µL of adequate broth. These preparations were incubated at 37 °C for 48 h. The MBC was regarded as the lowest extract concentration that did

not produce a colour change after the addition of INT, as mentioned above.<sup>17,18</sup>

## Results

In the present study, the qualitative phytochemical composition and antibacterial activity of extracts from five Cameroonian medicinal plants were determined. The results



of the phytochemical composition of the tested plants are summarized in Table 2. It appears that all of the extracts contained polyphenols, tannins, triterpenes and sterols. Apart from the leaf extracts of *L. aestuans* and *S. campanulata*, all of the other samples also contained alkaloids, whilst anthraquinone was not detected; saponins, flavonoids and coumarins were selectively distributed. The antibacterial results depicted in Table 3 showed that all of the tested extracts displayed selective activities. The best activity with MIC values that ranged from 64 to 1024 µg/mL were obtained with leaf [14/15 (93.3% of the tested bacteria)], bark [13/15 (86.7%)] and root [12/15 (80%)] extracts of *A. cordifolia*, as well as with *L. aestuans* [13/15 (86.7%)] and *P. purpureum* [10/15 (66.7%)] extracts. The lowest antibacterial spectra were obtained with leaf and bark extracts of *S. campanulata* and *E. speciosa* [6/15 (40% of the tested bacteria)] and the root extract of *S. campanulata* [3/15 (20%)]. The lowest MIC value (64 µg/mL) was recorded with the *A. cordifolia* bark extract on *P. aeruginosa* PA01. However, none of the extracts were as active as the established antibacterial compound, that is, chloramphenicol. In general, the tested extracts exerted bacteriostatic effects with a MBC/MIC ratio above 4.

## Discussion

Medicinal plants constitute an important source of bioactive compounds because of the chemical diversity found in several species. In recent years, certain plants have been successfully evaluated for their antibacterial activity worldwide. The rationale of this study is based on the fact that various parts of the abovementioned medicinal plants are traditionally used to treat bacterial infections in addition to other ailments, as depicted in Table 1. The parts that are traditionally used in the treatment of bacterial infections include leaves, seeds, bark and roots of *A. cordifolia*; the whole plant of *E. speciosa* and *P. purpureum*; the leaves and roots of *L. aestuans*; as well as the flowers, leaves and bark of *S. campanulata*. Differences in the antibacterial activities were detected among the extracts. Several molecules that belong to the classes of secondary

metabolites detected in this study were found to be active against pathogenic microorganisms.<sup>3,21</sup> The presence of such metabolites in the studied plant extracts can provide a preliminary explanation on their antibacterial activities. The differences in the antibacterial activities of the extracts could be due to the different chemical composition and the distinct mechanisms of action of their bioactive constituents.<sup>3</sup> According to Kuate et al.,<sup>21,22</sup> the antibacterial activity of a plant extract is considered to be significant when the MIC values are below 100 µg/mL, moderate when  $100 \leq \text{MIC} \leq 625$  µg/mL and weak when  $\text{MIC} > 625$  µg/mL. Consequently, the activity (MIC of 64 µg/mL) observed with *A. cordifolia* bark extract against *P. aeruginosa* PA01 can be considered to be significant. Moderate antibacterial activities ( $100 \leq \text{MIC} \leq 625$  µg/mL) were obtained with the majority of the extracts (Table 2). However, the obtained MIC values are significant when considering the medicinal importance of the tested MDR bacteria.<sup>23–29</sup> Both *K. pneumoniae* KP55 and KP63 were reported to be resistant to most of the commonly used antibiotics and showed high resistance to ampicillin, ceftazidime and aztreonam, with MIC values of up to 512 µg/mL.<sup>24</sup> In the present study, lower MIC values were obtained with the *A. cordifolia* bark extract (128 µg/mL) and *L. aestuans* extract (256 µg/mL) against *K. pneumoniae* KP63. In addition, MIC values of 512 µg/mL were also obtained with these extracts against *K. pneumoniae* KP63. Such activities recorded with crude extracts against MDR bacteria could be considered interesting. *P. aeruginosa* is an important nosocomial pathogen that is highly resistant to commonly used antibiotics and causes a wide spectrum of infections that might lead to substantial morbidity and mortality.<sup>30</sup> Interestingly, the bark extract of *A. cordifolia* had a MIC value of 64 µg/mL against *P. aeruginosa* PA01; this outcome clearly highlights the ability of this extract to fight MDR bacterial species. Other MDR bacteria of the Enterobacteriaceae family tested in this study, such as *E. aerogenes*, *E. coli* and *P. stuartii*, have also been classified as antimicrobial-resistant organisms of medical concern.<sup>28</sup> Interestingly, it was observed that all of those MDR strains were susceptible to the studied extracts,

**Table 2: Phytochemical composition of the plant extracts.**

Classes	Studied plants (% yield)* and composition								
	<i>Alchornea cordifolia</i>			<i>Eremomastax speciosa</i>	<i>Laportea aestuans</i>	<i>Pennisetum purpureum</i>	<i>Spathodea campanulata</i>		
	L (7.84%)	B (11.32%)	R (6.23%)	W (14.69%)	W (8.82%)	W (9.05%)	L (16.13%)	B (15.27%)	R (11.41%)
Alkaloids	+	+	+	+	–	+	+	+	–
Polyphenols	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoids	+	+	+	+	+	+	–	–	–
Anthraquinones	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Coumarins	–	–	–	–	+	–	–	–	–
Tannins	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Triterpenes	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sterols	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponins	+	+	+	+	+	+	+	–	–

(–): Absent; (+): Present; \* yield calculated as the ratio of the mass of the obtained methanol extract/mass of the plant powder. The tested extracts were obtained from L: Leaves; B: bark; R: roots; W: whole plant.

**Table 3: MICs and MBCs in µg/mL of methanol extracts from the studied plants and chloramphenicol.**

Bacterial strains	Tested samples MIC and MBC (in bracket) values (µg/mL)									CHL	
	<i>Alchornea cordifolia</i>			<i>Eremomastax speciosa</i>	<i>Laportea aestuans</i>	<i>Pennisetum purpureum</i>	<i>Spathodea campanulata</i>				
	L	B	R	W	W	W	L	B	R		
<i>Escherichia coli</i>											
ATCC8739	512 (-)	256 (-)	1024 (-)	1024 (-)	1024 (-)	512 (-)	512 (-)	—	—	—	2 (64)
ATCC10536	512 (-)	256 (-)	1024 (-)	1024 (-)	1024 (-)	1024 (-)	—	—	—	—	2 (32)
AG100ATet	1024 (-)	1024 (-)	1024 (-)	—	256 (-)	1024 (-)	—	512 (-)	—	—	32 (256)
AG102	512 (-)	1024 (-)	1024 (-)	—	512 (-)	512 (-)	512 (-)	512 (-)	—	—	32 (256)
<i>Enterobacter aerogenes</i>											
ATCC13048	512 (-)	1024 (-)	1024 (-)	1024 (-)	512 (-)	512 (-)	—	1024 (-)	—	—	16 (128)
CM64	256 (-)	512 (-)	512 (-)	—	512 (-)	512 (-)	512 (-)	1024 (-)	—	—	256 (-)
EA 27	512 (-)	—	1024 (-)	—	512 (-)	—	—	—	—	—	32 (256)
EA 289	128 (-)	512 (-)	128 (-)	1024 (-)	256 (-)	128 (512)	1024 (-)	1024 (-)	512 (-)	—	32 (256)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>											
ATCC11296	512 (-)	128 (-)	1024 (-)	—	—	512 (-)	1024 (-)	1024 (-)	1024 (-)	—	32 (256)
KP55	1024 (-)	512 (-)	1024 (-)	—	512 (-)	—	—	—	—	—	64 (256)
KP63	512 (-)	128 (-)	—	—	256 (-)	512 (-)	—	—	—	—	32 (256)
<i>Providencia stuartii</i>											
ATCC29916	512 (-)	512 (-)	512 (-)	1024 (-)	256 (-)	—	—	—	—	—	64 (256)
NEA 16	512 (-)	256 (-)	512 (-)	—	512 (-)	—	512 (-)	—	1024 (-)	—	64 (256)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>											
PA01	512 (-)	64 (-)	—	1024 (-)	1024 (-)	512 (-)	—	—	—	—	64 (-)
PA124	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	256 (-)

—: > 1024 (MIC) or not determined: The tested extracts were obtained from L: Leaves; B: bark; R: roots; W: whole plant; CHL: chloramphenicol.

especially those from *A. cordifolia* and *L. aestuans*. Therefore, the overall antibacterial activity of *A. cordifolia* and *L. aestuans* could be considered to be significant. Likewise, it has been demonstrated that the 50% aqueous-ethanol extract of the leaves of *A. cordifolia* exhibits antibacterial activities against a panel of bacterial and fungal strains.<sup>31</sup> The reported MIC values varied from 10 to 20 mg/mL against various strains and isolates of Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *K. pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi A* and *Acinetobacter baumannii*.<sup>31</sup> However, the extract was more active against Gram-positive bacteria and had MIC values below 2.5 µg/mL against different strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* as well as against anaerobic bacteria, such as *Peptostreptococcus spp.* and *Staphylococcus assacharolyticus*.<sup>31</sup> This result is in accordance with the present study because we also found that this plant showed activity against MDR bacterial strains. Nonetheless, it should be observed that better activities were obtained in the present work against Gram-negative bacteria, which suggests that methanol could be a better extraction solvent for antibacterial compounds of *A. cordifolia* than a 50% water–ethanol mixture. This hypothesis is consolidated by the fact that a water extract and ethanol extract of *A. cordifolia* separately showed low or no antibacterial activity against Gram-negative bacteria. Indeed, the reported MIC values of the ethanol extracts were above 11.88 mg/mL against *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *S. flexneri* and *E. coli*, whilst the water extract displayed MIC values above 18.75 mg/mL, with no activity at up to 300 mg/mL against *S. enteritidis* and *E. coli*.<sup>32</sup> Although, the results

obtained in the present study with *A. cordifolia* and *L. aestuans* are mostly moderate, they are similar to previously obtained data with several other Cameroonian plants, such as *O. subscorpioidea*,<sup>4</sup> *S. nigrum*,<sup>5</sup> *V. amygdalina*,<sup>6</sup> *P. fernandopoiana*,<sup>7</sup> *C. frutescens*,<sup>8</sup> *A. gabonensis*, *C. molle*, *G. quartianus*,<sup>9</sup> and *F. tessmannii*.<sup>10</sup>

Using an agar diffusion assay, Oloyede and Ayanbadejo have observed that the methanol extract of *L. aestuans* had a moderate antimicrobial activity at 200 mg/mL against a panel of Gram-negative and Gram-positive bacteria as well as fungi, with inhibition zone diameters that varied from 10 mm to 20 mm. In contrast, the values for gentamicin at 10 mg/mL or 70% tioconazole (used as positive controls) varied from 24 to 28 mm.<sup>33</sup> Our data are in accordance with that study because we also observed that the methanol extract of this plant had a moderate activity on the majority of tested Gram-negative bacteria, with MIC values that generally ranged from 256 to 1024 µg/mL (Table 3). Traditionally, *E. speciosa* has been used to heal health conditions related to bacterial infections, such as diarrhoea, ulcers, dysentery and urinary tract infections.<sup>34,35</sup> However, the antibacterial activity observed in the present study was rather low (MIC values of 1024 µg/mL) or null. This outcome may be due to the fact most of the studied bacteria are MDR phenotypes or to the poor antibacterial potential of this plant. Indeed, the low antibacterial activity of the 95% ethanol extract was also reported by Okokon et al. against *E. coli* and *S. aureus*.<sup>36</sup> Similarly, *P. purpureum* and *S. campanulata* used in folk medicine to manage microbial infections also displayed a null or moderate antibacterial activity against the studied bacteria. The reported data are in conformity

with previously documented data because Njoku et al. have demonstrated that *P. purpureum* had a low antibacterial activity against *E. coli* and *P. aeruginosa*,<sup>37</sup> whereas Rajesh et al. have reported the low inhibitory effects of *S. campanulata* against *Proteus vulgaris*, *E. coli* and *K. pneumoniae*.<sup>38</sup>

## Conclusion

The results of the present investigation suggest that the extracts of the studied plants, in particular those from *A. cordifolia* and *L. aestuans*, can be used as potential leads to discover new antibacterials to control certain bacterial infections, especially those that involve MDR bacterial species.

## Competing interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Authors' contributions

FTM and IKV performed the study; VK and VPB supervised the work; VK designed the experiments, wrote the manuscript, supervised the work and provided the bacterial strains; all of the authors read and approved the final version of the manuscript.

## Acknowledgements

The authors are thankful to the Cameroon National Herbarium for the identification of plants.

## References

- Xu ZQ, Flavin MT, Flavin J. Combating multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Expert Opin Investig Drugs** 2014; 23(2): 163–182.
- Van Bambeke F, Pages JM, Lee VJ. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov** 2006; 1(2): 157–175.
- Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev** 1999; 12(4): 564–582.
- Fankam AG, Kuete V, Voukeng IK, Kuiate JR, Pages JM. Antibacterial activities of selected Cameroonian spices and their synergistic effects with antibiotics against multidrug-resistant phenotypes. **BMC Complement Altern Med** 2011; 11: 104.
- Noumedem JA, Mihasan M, Lacmata ST, Stefan M, Kuiate JR, Kuete V. Antibacterial activities of the methanol extracts of ten Cameroonian vegetables against Gram-negative multidrug-resistant bacteria. **BMC Complement Altern Med** 2013; 13: 26.
- Noumedem JA, Mihasan M, Kuiate JR, Stefan M, Cojocar D, Dzoyem JP, Kuete V. *In vitro* antibacterial and antibiotic-potential activities of four edible plants against multidrug-resistant Gram-negative species. **BMC Complement Altern Med** 2013; 13: 190.
- Fankam AG, Kuiate JR, Kuete V. Antibacterial activities of *Beilschmiedia obscura* and six other Cameroonian medicinal plants against multi-drug resistant Gram-negative phenotypes. **BMC Complement Altern Med** 2014; 14: 241.
- Touani FK, Seukep AJ, Djeussi DE, Fankam AG, Noumedem JA, Kuete V. Antibiotic-potential activities of four Cameroonian dietary plants against multidrug-resistant Gram-negative bacteria expressing efflux pumps. **BMC Complement Altern Med** 2014; 14: 258.
- Fankam AG, Kuiate JR, Kuete V. Antibacterial and antibiotic resistance modifying activity of the extracts from *Allanblackia gabonensis*, *Combretum molle* and *Gladiolus quartianianus* against Gram-negative bacteria including multi-drug resistant phenotypes. **BMC Complement Altern Med** 2015; 15: 206.
- Tankeo S, Damen F, Awouafack M, Mpetga J, Tane P, Eloff J, Kuete V. Antibacterial activities of the methanol extracts, fractions and compounds from *Fagara tessmannii*. **J Ethnopharmacol** 2015; 169: 275–279.
- Harbone J, editor. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. London: Chapman & Hall; 1973.
- Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med** 1998; 64(8): 711–713.
- Mativandla SPN, Lall N, Meyer JJM. Antibacterial, antifungal and antitubercular activity of (the roots of) *Pelargonium reniforme* (CURT) and *Pelargonium sidoides* (DC) (Geraniaceae) root extracts. **S Afr J Bot** 2006; 72(2): 232–237.
- Lacmata ST, Kuete V, Dzoyem JP, Tankeo SB, Teke GN, Kuiate JR, Pages JM. Antibacterial activities of selected Cameroonian plants and their synergistic effects with antibiotics against bacteria expressing MDR phenotypes. **Evid Based Complement Altern Med** 2012; 2012: 623723.
- Seukep JA, Fankam AG, Djeussi DE, Voukeng IK, Tankeo SB, Noumedem JA, Kuete AH, Kuete V. Antibacterial activities of the methanol extracts of seven Cameroonian dietary plants against bacteria expressing MDR phenotypes. **Springerplus** 2013; 2: 363.
- Kuete V, Kamga J, Sandjo LP, Ngameni B, Poumale HM, Ambassa P, Ngadjui BT. Antimicrobial activities of the methanol extract, fractions and compounds from *Ficus polita* Vahl. (Moraceae). **BMC Complement Altern Med** 2011; 11: 6.
- Kuete V, Nana F, Ngameni B, Mbaveng AT, Keumedjio F, Ngadjui BT. Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae). **J Ethnopharmacol** 2009; 124(3): 556–561.
- Kuete V, Wansi JD, Mbaveng AT, Kana Sop MM, Tadjong AT, Beng VP, Etoa FX, Wandji J, Meyer JJM, Lall N. Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Teclea afzeli* (Rutaceae). **S Afr J Bot** 2008; 74(4): 572–576.
- Kuete V, Ngameni B, Simo CC, Tankeu RK, Ngadjui BT, Meyer JJ, Lall N, Kuiate JR. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). **J Ethnopharmacol** 2008; 120(1): 17–24.
- Kuete V, Wabo GF, Ngameni B, Mbaveng AT, Metuno R, Etoa FX, Ngadjui BT, Beng VP, Meyer JJ, Lall N. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (Ixonanthaceae). **J Ethnopharmacol** 2007; 114(1): 54–60.
- Kuete V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. **Planta Med** 2010; 76(14): 1479–1491.
- Kuete V, Efferth T. Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. **Front Pharmacol** 2010; 1: 123.
- Mallea M, Chevalier J, Bornet C, Eyraud A, Davin-Regli A, Bollet C, Pages JM. Porin alteration and active efflux: two *in vivo* drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. **Microbiology** 1998; 144(Pt 11): 3003–3009.
- Chevalier J, Pages JM, Eyraud A, Mallea M. Membrane permeability modifications are involved in antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Biochem Biophys Res Commun** 2000; 274(2): 496–499.
- Pradel E, Pages JM. The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. **Antimicrob Agents Chemother** 2002; 46(8): 2640–2643.

26. Mallea M, Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S, Brouant P, Barbe J, Pages JM. Alkylaminoquinolines inhibit the bacterial antibiotic efflux pump in multidrug-resistant clinical isolates. **Biochem J** 2003; 376(Pt 3): 801–805.
27. Tran QT, Mahendran KR, Hajar E, Ceccarelli M, Davin-Regli A, Winterhalter M, Weingart H, Pages JM. Implication of porins in beta-lactam resistance of *Providencia stuartii*. **J Biol Chem** 2010; 285(42): 32273–32281.
28. Kuete V, Ngameni B, Tangmouo JG, Bolla JM, Alibert-Franco S, Ngadjui BT, Pages JM. Efflux pumps are involved in the defense of Gram-negative bacteria against the natural products isobavachalcone and diospyrone. **Antimicrob Agents Chemother** 2010; 54(5): 1749–1752.
29. Kuete V, Alibert-Franco S, Eyong KO, Tangmouo JG, Bolla JM, Alibert-Franco S, Ngadjui BT, Pages JM. Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. **Int J Antimicrob Agents** 2011; 37(2): 156–161.
30. Cardoso O, Alves AF, Leitao R. Surveillance of antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a central hospital in Portugal. **J Antimicrob Chemother** 2007; 60(2): 452–454.
31. Okeke IN, Ogundaini AO, Ogungbamila FO, Lamikanra A. Antimicrobial spectrum of *Alchornea cordifolia* leaf extract. **Phytother Res** 1999; 13(1): 67–69.
32. Adeleye Adeyemi I, Omonigbehin AE, Stella S, Oluwatosin O, Sobande Jumoke S. Antibacterial activity of extracts of *Alchornea cordifolia* (Schum and Thonn) Mull.Arg., *Boerhavia diffusa* (L) and *Bridellia micrantha* (Hoscht) Baill. used in traditional medicine in Nigeria on *Helicobacter pylori* and four diarrhoeagenic bacterial pathogens. **Afr J Biotechnol** 2008; 7: 3761–3764.
33. Oloyede GK, Ayanbadejo OE. Phytochemical, toxicity, antimicrobial and antioxidant screening of extracts obtained from *Laportea aestuans* (Gaud). **J Med Sci** 2014; 14: 51–59.
34. Oben J, Assi S, Agbor G, Musoro D. Effect of *Eremomastax speciosa* on experimental diarrhoea. **Afr J Trad Complement Altern Med** 2006; 3(1): 95–100.
35. Kuete V, Voukeng IK, Tsobou R, Mbaveng AT, Wiench B, Beng VP, Efferth T. Cytotoxicity of *Elaeophorbia drupifera* and other Cameroonian medicinal plants against drug sensitive and multidrug resistant cancer cells. **BMC Complement Altern Med** 2013; 13: 250.
36. Okokon J, Antia B, Udoh A, Akpan M. Antianaemic and antimicrobial activity of *Eremomastax speciosa*. **J Pharmacol Toxicol** 2007; 2: 196–199.
37. Njoku O, Okorie I, EC O Okafor J. Investigation on the phytochemical and antimicrobial properties of *Pennisetum purpureum*. **J Med Arom Plant Sci** 2004; 26: 311–314.
38. Rajesh K, Harsha R, Mohammed G, Hareesh A, Thammanna G, Dinesha R, Satish K, Irfan A. Antimicrobial activity of ethanol extract of leaf and flower of *Spathodea campanulata* P. Beauv **Res J Pharm Biol Chem Sci** 2010; 3: 691–698.
39. Ogungbamila FO, Samuelsson G. Smooth muscle relaxing flavonoids from *Alchornea cordifolia*. **Acta Pharm Nord** 1990; 2(6): 421–422.
40. Adeneye AA, Oreagba AI, Ishola IO, Kalejaiye HA. Evaluation of the anti-arthritic activity of the hydroethanolic leaf extract of *Alchornea cordifolia* in rats. **Afr J Tradit Complement Altern Med** 2014; 11(2): 402–410.
41. Manga HM, Brkic D, Marie DE, Quetin-Leclercq J. *In vivo* anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & thonn.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae). **J Ethnopharmacol** 2004; 92(2–3): 209–214.
42. Tona L, Kambu K, Ngimbi N, Mesia K, Penge O, Lusakibanza M, Cimanga K, De Bruyne T, Apers S, Totte J. Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some anti-diarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo. **Phytomedicine** 2000; 7(1): 31–38.
43. Osadebe PO, Okoye FB. Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. **J Ethnopharmacol** 2003; 89(1): 19–24.
44. Essiet U, Edet N, Bala D. Phytochemical and physicochemical analysis of the leaves of *Laportea aestuans* (Linn) Chew and *Laportea aestuans* (Schumach) Chew (male and female). **Asian J Plant Sci Res** 2011; 1: 35–42.
45. Oloyede G, Oyelola M. Chrysen-2-ol derivative from west indian wood nettle *Laportea aestuans* (L.) chew inhibits oxidation and microbial growth *in vitro*. **EXCLI J** 2013; 12: 894–906.
46. Okereke S, Elekwa I, Nmaju A. Gas chromatographic fid, hypoglycemic and hypolipidemic effects of leaves of *Laportea aestuans* in alloxan induced diabetes in male albino rats. **IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol** 2014; 42: 42–46.
47. Zahid Z, Aniruddha P, Sagar D, Subur K, Rana Z. Comparative phytochemical screening of flowers and bark of *Spathodea campanulata*. **Int J Appl Biol Pharm Technol** 2011; 2: 233–235.
48. Sowjanya P, Hapsana P, Kiran B, Vagdevi G, Srinivasa B. Pharmacognostical and physicochemical standardization of leaves of *Spathodea campanulata* P. Beauv **J Pharmacogn Phytochem** 2013; 2: 189–192.

**How to cite this article:** Mambe FT, Voukeng IK, Beng VP, Kuete V. Antibacterial activities of methanol extracts from *Alchornea cordifolia* and four other Cameroonian plants against MDR phenotypes. *Journal of Taibah University Medical Sciences* 2016;11:121–127.



## Research Article

# Antibacterial and Antibiotic Modifying Potential of Crude Extracts, Fractions, and Compounds from *Acacia polyacantha* Willd. against MDR Gram-Negative Bacteria

Flora T. Mambe,<sup>1,2,3</sup> Jean Na-Iya,<sup>4</sup> Ghislain W. Fotso,<sup>4</sup> Fred Ashu,<sup>1,2</sup> Bathélémy Ngameni,<sup>5</sup> Bonaventure T. Ngadjui,<sup>4</sup> Veronique P. Beng,<sup>2</sup> and Victor Kuete <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Dschang, Dschang, Cameroon

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

<sup>3</sup>Ministry of Scientific Research and Innovation, Cameroon

<sup>4</sup>Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

<sup>5</sup>Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Medicine and Biomedical Science, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

Correspondence should be addressed to Victor Kuete; [kuetevictor@yahoo.fr](mailto:kuetevictor@yahoo.fr)

Received 16 January 2019; Revised 12 February 2019; Accepted 24 February 2019; Published 7 March 2019

Guest Editor: José Carlos Tavares Carvalho

Copyright © 2019 Flora T. Mambe et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The present study aimed to assess the *in vitro* antibacterial and antibiotic modifying activities of methanol extracts prepared from the leaf (APL) and bark (APB) of *Acacia polyacantha*, fractions (APLa-d) and compounds isolated from APL against a panel of multidrug resistant (MDR) Gram-negative bacteria. Leaf extract was subjected to column chromatography for compounds isolation; antibacterial assays were performed on samples alone and with an efflux pump inhibitor (EPI), respectively, and several antibiotics on the tested bacteria. The phytochemical investigation of APL led to the isolation of stigmasterol (1),  $\beta$ -amyryn (2), 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosylstigmasterol (3), 3-O-methyl-D-chiro-inositol (4), epicatechin (5), quercetin-3-O-glucoside (6), 3-O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolic acid (7), and 3-O-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolic acid (8). APL and APB had minimal inhibitory concentration (MIC) values  $\leq 1024 \mu\text{g/mL}$  on 73.3% and 46.7% of the tested bacteria, respectively. APLb and APLd were effective against 88.9% of tested bacterial species with compound 8 showing the highest activity inhibiting 88.9% of tested bacteria. The EPI, phenylalanine-arginine- $\beta$ -naphthylamide (PABN), strongly improved the activity of APL, APLb, APLd, and compound 8 on all tested bacteria. Synergistic effects were obtained when APL and compounds 7 and 8 were combined with erythromycin (ERY), gentamycin (GEN), ciprofloxacin (CIP), and norfloxacin (NOR). The present study demonstrates the antibacterial potential of *Acacia polyacantha* and its constituents to combat bacterial infections alone or in combination with EPI.

## 1. Introduction

Bacterial drug resistance constitutes a serious concern in the therapy of infectious diseases. Despite the abundance of various classes of antibiotics, the emergence of resistant strains of bacteria is increasing [1]. This phenomenon of resistance has increased the disease burden, and it has become necessary to search for new and cheaper alternatives with fewer side effects [2]. Botanicals (or crude plant extracts) and their secondary metabolites have long been

used by humans for medicinal purposes. It is estimated that about 80% of the world's population uses medicinal plants as alternative for their health care [3]. Cameroon's flora is an enormous reservoir of antibacterial botanicals and phytochemicals (or plants secondary metabolites); some Cameroonian medicinal plants previously documented for their antibacterial potential include *Treculia obovoidea* [4], *Vismia laurentii* [5], *Artocarpus communis* [6], *Piper nigrum* and *Vernonia amygdalina* [7], *Cyperus esculentus* [8], and *Beilschmiedia obscura* [9]. Several botanicals have

previously been reported for their activity against multidrug resistant (MDR) bacteria and had the ability to potentiate the activity of currently used antibiotics; such plants included *Dorstenia psilurus* [10], *Combretum molle* [11], *Xanthosoma mafaffa*, *Moringa oleifera*, and *Passiflora edulis* [12], *Rubus fellatae*, and *Manihot esculenta* [13]. It is important to improve our library of botanicals and phytochemicals with promising antibacterial potential, in order to combat MDR phenotypes. In the present study, we selected another Cameroonian medicinal plant, *Acacia polyacantha* Willd. (Fabaceae). *Acacia polyacantha* is a deciduous, straight cylindrical, erect tree of about 10-15 m height found in Tropical Africa. It has a geographical distribution, ranging from Gambia to Ethiopia and southwards to Kenya and Zimbabwe [14, 15]. The plant is traditionally used to treat livestock diseases and gastrointestinal infections [16]. The plant is also used as a remedy for snakebite and as an infusion to bath children who are restless at night [14]. This is the first report on the antibacterial potential of this plant against MDR bacteria. It was found that this plant had no anthelmintic effect against a levamisole resistant strain of the nematode *Caenorhabditis elegans* [17]. Previous phytochemical investigations of the leaves of the plant led to the isolation of polyacanthoside A, oleanolic acid, stigmasterol, stigmasterol-3-O- $\beta$ -glucopyranosyl, epicatechin quercetin-3-O-glucoside, 3-O-methyl-D-Chiro-inositol, and 3-O- $[\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolic acid [15]. The present study was designed to evaluate the antibacterial activity of the leaf and bark extracts of *Acacia polyacantha* against Gram-negative bacteria expressing MDR phenotypes. The work includes the isolation and identification of the active constituents of the leaf as well as the ability of this plant and its components to potentiate the activity of commonly used antibiotics.

## 2. Material and Methods

**2.1. General Procedure.** Optical rotation was measured with a Horiba SEPA-300 polarimeter (Horiba, Kyoto, Japan). NMR spectra were recorded on Bruker DMX Avance 600 instruments equipped with an autotune probe and using the automation mode aided by the Bruker program. HREI-SMS spectra were determined on a micrOTOF-Q 98 spectrometer (Bruker-Daltonics, Billerica, MA). For column chromatography, silica gel 60 particles size 0.04–0.063 mm (Merck, Darmstadt, Germany) and Sephadex LH-20 purchased at Sigma-Aldrich (St Louis, MO) were used. The plates were visualized using UV (254 and 366 nm) and revealed by spraying with vanillin-sulphuric acid (1% ethanolic solution of vanillin + 10% ethanolic sulphuric acid).

**2.2. Plant Material and Extraction.** The bark and leaf of *Acacia polyacantha* Willd. (Fabaceae) were collected on February 2016 in Kaéle, in the Far North Region of Cameroon. The plant was then identified at the National Herbarium of Cameroon by Mr. Nana Victor and a voucher specimen was deposited under the registration number 58985/SRF/CAM. Air-dried and powdered leaf and bark of *A. polyacantha* (2

kg) were extracted twice at room temperature with 4 L of methanol (MeOH) for 48 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure to yield 229 g and 108 g of crude leaf (APL) and bark (APB) extracts, respectively. These extracts were then kept at 4°C until further use.

**2.3. Isolation of the Constituents from Leaves of *Acacia polyacantha*.** Part of APL (225 g) was dissolved in a mixture of petroleum ether/ethyl acetate (99:1) and shaken to remove a dark green extract of chlorophyll. The residue (110 g) was subjected to silica gel column chromatography (40-63  $\mu$ m, 6 x 50 cm) using hexane-ethyl acetate (AcOEt) and chloroform (CHCl<sub>3</sub>)-MeOH gradients as eluents. 198 sub-fractions (frs) of 300 mL each were collected as follows: sub-frs 1-13 (hexane:AcOEt, 95:5), sub-frs 14-29 (hexane:AcOEt, 90:10), sub-frs 30-63 (hexane:AcOEt,85:15), sub-frs 64-117 (hexane:AcOEt, 80:20), sub-frs 118-122 (hexane:AcOEt, 70:30), sub-frs 123-129 (hexane:AcOEt, 60:40), sub-frs 130-140 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 97.5:2.5), sub-frs 141-152 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 95:5), sub-frs 153-166 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 90:10), sub-frs 167-182 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 85:15), sub-frs 183-190 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 80:20), and sub-frs 191-198 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 75:25). These sub-frs were then pooled on the basis of their thin layer chromatography (TLC) profiles into four fractions as follows: APLa (sub-frs 1-34); APLb (sub-frs 35-171); APLc (sub-frs 172-183); and APLd (sub-frs 184-198). Upon antibacterial testing, fractions APLa, APLb, and APLd were selected for further purification.

Fraction APLa was column chromatographed over silica gel 60 column using increasing gradient of hexane:AcOEt, mixtures as eluents. 105 sub-fractions of 100 mL each were collected as follows: sub-frs 1-39 (hexane:AcOEt,95:5), sub-frs 40-87 (hexane:AcOEt,90:10), and sub-frs 88-105 (hexane:AcOEt,85:15). Compounds **1** (45.9 mg) and **2** (44.1 mg) were obtained as white powders after filtration from sub-frs 15-40 and sub-frs 41-90, respectively.

Fraction APLb was submitted to column chromatography (CC) over silica gel 60 using increasing gradient hexane:AcOEt, and CHCl<sub>3</sub>:MeOH, mixtures as eluents. 235 sub-fractions of 200 mL each were collected as follows: sub-frs 1-56 (hexane:AcOEt,85:15), sub-frs 57-133 (hexane:AcOEt,80:20), sub-frs 134-142 (hexane:AcOEt,70:30), sub-frs 143-155 (hexane:AcOEt,60:40), sub-frs 156-176 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 97.5:2.5), sub-frs 177-199 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 95:5), sub-frs 200-226 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 90:10), and sub-frs 227-235 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 85:15). Compound **3** (83.2 mg) was obtained as white powder after filtration from sub-frs 1-30. Subfraction 31-235 were pooled together and were further purified over Sephadex LH-20 using isocratic CHCl<sub>3</sub>:MeOH, (7:3) as eluent. Sub-frs of 5 mL were collected. Sub-frs 6-11 afforded compound **4** (6.11 mg) as a white powder while compound **5** (18 mg) was isolated in sub-frs 35-50 as a red powder.

Fraction APLd was submitted to CC using silica gel 60 with increasing gradient of CHCl<sub>3</sub>:MeOH, mixtures as eluents. 45 sub-frs of 100 mL each were collected as follows: sub-frs 1-21 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 80:20) and sub-frs 22-45 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 75:25). Compound **6** (30 mg) was obtained as yellow powder after filtration from sub-frs 1-13. Sub-frs

14-34 was further purified twice over Sephadex LH-20 using isocratic  $\text{CHCl}_3$ :MeOH, (7:3) to afford compound **7** (95.2 mg) as beige crystals. Sub-frs 35-42 was also purified similarly to sub-frs 14-34 for yield compound **8** (10.2 mg) as a white powder.

#### 2.4. Antibacterial Assays

**2.4.1. Chemicals for Antimicrobial Assay.** Chemicals used included phytochemicals, reference antibiotics (RA), microbial growth indicator, and efflux pump inhibitor (EPI). Phytochemicals were stigmaterol,  $\beta$ -amyrin, stigmaterol-3-O- $\beta$ -glucopyranosyl, 3-O-methyl-D-chiro-inositol, epicatechin, quercetin-3-O-glucoside, 3-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolic acid, and 3-O- $[\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolic acid. They were isolated from the leaf of *Acacia polyacantha*. Their  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) spectra as well as their major chemical shifts are provided as supporting information (S1). The RA tested were chloramphenicol (CHL), ciprofloxacin (CIP), cloxacillin (CLX), doxycyclin (DOX), gentamycin (GEN), erythromycin (ERY), kanamycin (KAN), and norfloxacin (NOR) obtained from Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France. The microbial growth indicator used was iodinitrotetrazolium  $\geq 97\%$  (INT, Sigma-Aldrich) while the EPI was phenylalanyl-arginine- $\beta$ -naphthylamide (PA $\beta$ N) (Sigma-Aldrich). Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich) was used to dissolve chemicals.

**2.4.2. Microbial Strains and Culture Media.** In this study, 15 Gram-negative bacterial strains belonging to five species were used. They included reference (from American Type Culture Collection, ATCC) and clinical (Laboratory collection) strains of *Escherichia coli* (ATCC8739, ATCC10536, AG102, and AG100Atet), *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048, CM64, EA27 and EA289), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC1296, KP55 and KP63), *Providencia stuartii* (ATCC29916 and NEA16), and *Pseudomonas aeruginosa* (PA01 and PA124). Bacterial features or resistance profiles previously reported [19] are shown as supporting information (Table S2). Bacterial cultures were maintained on agar plates at 4°C and subcultured on a fresh appropriate agar plates 24 h prior to any antimicrobial assay. The activation of bacteria prior to any assay was done in Mueller Hinton Agar (Sigma) meanwhile antibacterial assays were carried out using Mueller Hinton broth (MHB; Sigma) [20].

**2.4.3. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC).** The MICs and MBCs of extract, fractions and isolated compounds against the tested bacteria were determined by microplate dilution method using the rapid INT colorimetric assay according to previously described methods [21] with some modifications [19, 22, 23]. In general, the concentrations ranges were 8-1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for crude extracts, 4-512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for fractions, and 2-256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for chloramphenicol.

The role of efflux pumps in the susceptibility of Gram-negative bacteria to the most active samples (APL, APLb, APLd, compound **8** and CHL) was evaluated by testing the studied samples in the presence of an EPI, PA $\beta$ N (at 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) using the rapid INT colorimetric assay as earlier described [7, 19]. A preliminary study showed that the concentration of 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  did not affect the growth of selected bacteria [23]. Nine selected bacterial strains including *E. coli* ATCC8739 and AG102, *E. aerogenes* ATCC13048 and CM64, *K. pneumoniae* KP55 and KP63, *P. aeruginosa* PA01 and PA124 and *P. stuartii* ATCC29916 were used. Increase of activity was determined as the ratio of MIC in the absence of EPI versus MIC in the presence of EPI.

To evaluate the potentiating or antibiotic resistance modulating effect of samples, a preliminary assay was performed against a problematic bacterium, *P. aeruginosa* PA124 (see supporting information S3); the selected samples were tested at various subinhibitory concentrations in combination with antibiotics. MIC/2 and MIC/4 were selected as the best subinhibitory concentrations [6, 24] and were further used for the best samples (APL, compounds **7** and **8**) in combination with antibiotics against the seven other bacteria. Briefly, the MIC was determined as described above. The 96-wells microplate rows receiving antibiotic dilutions without extracts were used for the determination of the MICs of the antibiotics. The concentrations ranges of antibiotics were generally 2-256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The MIC was determined as described using INT colorimetric method as earlier described [3, 19]. The modulation factor was defined as the ratio of the MIC for the antibiotic alone and that of the antibiotics in the presence of the extract (RHL). Modulation factor  $\geq 2$  was set as the cutoff for biological significance of antibiotic resistance modulating effects [19, 20].

### 3. Results

**3.1. Phytochemistry.** The chemical structures of compounds isolated from the leaf of *Acacia polyacantha* were determined using NMR ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ) data, in comparison with the literature (Figure 1). Compounds were identified as stigmaterol  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$  (**1**; melting point (m.p.): 134-135°C;  $m/z$  414) [21],  $\beta$ -amyrin  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$  (**2**; m.p.: 187-190°C;  $m/z$  426) [25], 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosylstigmaterol  $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_6$  (**3**; m.p.: 272-274°C;  $m/z$  412) [26], 3-O-methyl-D-chiro-inositol  $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_6$  (**4**; m.p.: 181°C;  $m/z$  217;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : +60,00) [24], epicatechin  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$  (**5**; m.p.: 345-350°C;  $m/z$  270) [27], quercetin-3-O-glucoside  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$  (**6**; m.p.: 230-232°C;  $m/z$  464) [28], 3-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolic acid  $\text{C}_{41}\text{H}_{66}\text{O}_{12}$  (**7**; m.p.: 216-217°C;  $m/z$  773;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : +23,2° (c 1,25; MeOH)) [15] and 3-O- $[\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolic acid  $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$  (**8**; amorphous powder;  $m/z$  803) [21]. The  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR spectra and major chemical shifts of these compounds are available as supplementary data (S2).

**3.2. Antibacterial Activity.** Extracts, fractions, and isolated compounds were tested for their antimicrobial activity against the studied Gram-negative bacteria. The results are

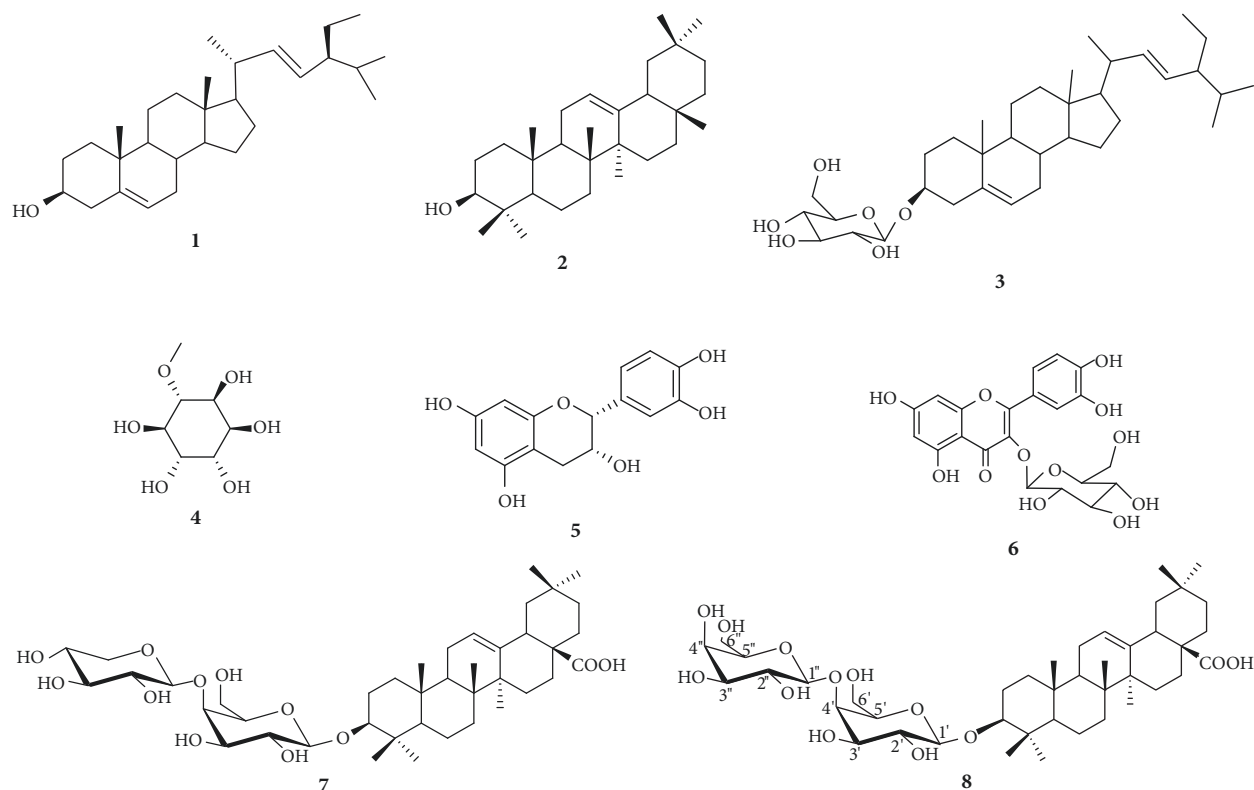


FIGURE 1: Chemical structures of compounds isolated from the leaf of *Acacia polyacantha*. **1**: stigmasterol, **2**:  $\beta$ -amyrin, **3**: 3- $O$ - $\beta$ - $D$ -glucopyranosylstigmasterol, **4**: 3- $O$ -methyl- $D$ -chiro-inositol, **5**: epicatechin, **6**: quercetin-3- $O$ -glucoside, **7**: 3- $O$ -[ $\beta$ - $D$ -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ - $D$ -galactopyranosyl]-oleanolic acid, and **8**: 3- $O$ -[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ - $D$ -galactopyranosyl]-oleanolic acid.

shown in Tables 1 and 2. APL and APB had MIC values  $\leq 1024 \mu\text{g/mL}$  on 11/15 (73.3%) and 7/15 (46.7%) tested bacteria. MIC values of CHL varied between 2-256  $\mu\text{g/mL}$  (Table 1). APLc as well as compounds **1**, **2** and **3** were not active (Table 2). MIC values  $\leq 512 \mu\text{g/mL}$  for fractions and  $\leq 256 \mu\text{g/mL}$  for compounds were obtained against 8/9 (88.9%) tested bacteria for both APLb and APLd and against 7/9 (77.8%) for compound **8** (Table 2). Analysis of data from Tables 1 and 2 indicated bacteriostatic effects as MBC/MIC ratios were generally above 4 with no MBC value  $\leq 1024 \mu\text{g/mL}$  recorded for the crude extract, fractions, and compounds.

**3.3. Role of Efflux Pumps in the Susceptibility of Gram-Negative Bacteria Botanicals and Phytochemicals.** The most active extracts, fractions, isolated compound and RA (APL, APLb, APLd, Compound **8**, CHL) were tested in the presence of EPI against 9 bacterial strains including reference strains and MDR phenotypes (Table 3). The results showed that PA $\beta$ N improves the activity (decrease of MIC values) of APL, APLb, APLd and compound **8** on all tested bacteria with the highest MIC values of 256  $\mu\text{g/mL}$  for crude extract (APL) and compound **8**, and 64  $\mu\text{g/mL}$  for fractions (Table 3). A preliminary study showed that the MIC of PA $\beta$ N was above 256  $\mu\text{g/mL}$  on the selected bacteria and that the concentration of 30  $\mu\text{g/mL}$  did not affect their growth.

**3.4. Antibiotic Resistance Modulating Effects of Botanicals and Phytochemicals.** A preliminary study against *P. aeruginosa* PA124 (see supporting information S3) allowed choosing the appropriate subinhibitory concentrations of MIC/2 and MIC/4 as well as APL, compounds **7** and **8** for further studies. These samples were combined with eight antibiotics to evaluate their possible synergistic effects. The results summarized in Tables 4, 5, and 6 showed that the synergistic effects were noted with all the tested samples and many antibiotics. When tested at their MIC/2, the percentages of bacterial strains on which synergism was observed (PBS) were  $\geq 50\%$  when APL was combined with ERY and CIP (Table 4), when compound **7** was combined with ERY, KAN and GEN (Table 5), and when compound **8** was combined with ERY, and DOX (Table 6). At their MIC/4, the PBS  $\geq 50\%$  was obtained when APL was combined with GEN and CIP (Table 4), when compound **7** was combined with ERY and GEN (Table 5), and when compound **8** was combined with ERY and NOR (Table 6).

## 4. Discussion

**4.1. Phytochemistry.** The isolated compounds included five terpenoids amongst which were one sterol (stigmasterol; **1**), one triterpene ( $\beta$ -amyrin; **2**), and three saponins



TABLE 1: Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) in  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of crude leaf and bark extracts, isolated compounds and chloramphenicol against reference strains and MDR Gram-negative bacteria.

Bacterial strains	Tested samples, MIC and MBC (in bracket) values ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		
	Leaf extract (APL)	Bark extract (APB)	Chloramphenicol
<i>Escherichia coli</i>			
ATCC8739	1024 (-)	512 (-)	2 (64)
AG102	512 (-)	-	32 (256)
AG100Atet	512 (-)	-	32 (256)
ATCC10536	1024 (-)	-	2 (32)
<i>Enterobacter aerogenes</i>			
ATCC13048	256 (-)	8 (-)	16 (128)
CM64	-	-	256 (-)
EA27	1024 (-)	256 (-)	32 (256)
EA289	-	-	32 (256)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
ATCC11296	1024 (-)	-	32 (256)
KP55	-	128 (-)	64 (256)
KP63	-	-	32 (256)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
PA01	64 (-)	256 (-)	64 (-)
PA124	256 (-)	512 (-)	256 (-)
<i>Providencia stuartii</i>			
NEA16	1024 (-)	-	64 (256)
ATCC29916	8 (-)	256 (-)	64 (256)

(-): MIC or MBC value  $> 1024 \mu\text{g}/\text{mL}$  for APL and APB or  $> 256$  for chloramphenicol; MIC values in bold: significant antibacterial effect [18].

[stigmasterol-3-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl (3), 7: 3-*O*-[ $\beta$ - $\text{D}$ -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ - $\text{D}$ -galactopyranosyl]-oleanolic acid, (7) and *O*-[ $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ - $\text{D}$ -galactopyranosyl]-oleanolic acid (8)], two flavonoids: epicatechin (5) and quercetin-3-*O*-glucoside (6) and one sugar, 3-*O*-methyl-*D*-chiro-inositol (4). Previous phytochemical investigations of the leaf of the plant led to the isolation of polyacanthoside A, oleanolic acid, epicatechin, quercetin-3-*O*-glucoside as well as compounds 1, 4, 3, 5 and 6 and 8 [15]. However, few compounds were reported in this study, probably due to the fact that we focussed only on the bioactive fractions of the leaf extract; meanwhile, less active fractions were not further investigated.

**4.2. Antibacterial Activity.** It is important to take into consideration the development of resistance by Gram-negative bacteria when searching for new antimicrobial agents. In the present study, several clinical MDR bacteria expressing MDR phenotypes were used. The MIC values of chloramphenicol were above  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  on most of the bacterial strains (Table 1), confirming their resistance phenotypes. Established cutoff points for antibacterial activity of botanicals consider that the inhibitory effect is significant when MIC values are below  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ , moderate when  $100 \leq \text{MIC} \leq 625 \mu\text{g}/\text{mL}$ , and weak when  $\text{MIC} > 625 \mu\text{g}/\text{mL}$  [18, 29]. On this basis, the antibacterial activity of the crude extracts (APL and APB) could mostly be considered as moderate or poor (Table 1). Nevertheless, MIC values below  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  were obtained with APL on the problematic bacterial strain *P. aeruginosa*

(PA01) and *P. stuartii* NAE16 (Table 1), as well as with APB against *E. aerogenes* ATCC13048. This data suggested that these extracts could be useful to fight bacterial infections, especially in traditional medicine where they are utilised. It is worth nothing that the MIC values of APL against *P. aeruginosa* (PA01) and *P. stuartii* ATCC29916, or APB against *E. aerogenes* ATCC13048 (Table 1) were lower than those of chloramphenicol, confirming this hypothesis. This was the rational for carrying out bioguided fractionation in order to isolate more active compounds from the leaf extract. Fractions APLa, APLb, and APLd had MIC values below  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  against 1, 3, and 7 of the 9 tested bacterial species, respectively (Table 2). This was an indication that fractionation led to more active samples. The activity of phytochemicals was set as significant when  $\text{MIC} < 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ , moderate when  $10 < \text{MIC} < 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ , and low when  $\text{MIC} > 100 \mu\text{g}/\text{mL}$  [18, 29]. However, less active compounds were obtained from the purified fractions, with none of them displaying MIC value below  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Table 2). This was an indication that constituents of the extract and fractions synergistically inhibited bacterial growth. All tested samples had MBC/MIC ratios above 4 (Tables 1 and 2), showing that they mostly exerted bacteriostatic effects [30]. To the best of our knowledge, the antibacterial activity of *A. polycantha* as well as that of its most active constituent (compound 8) was reported for the first time.

Concerning the structure-activity relationship, it appeared that terpenoids 1 and 2 (with no sugar in their chemical structures) and 3 (with only one sugar) as well as

TABLE 2: MICs and MBCs in  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of fractions and compounds isolated from the leaf (APL) of *Acacia polyacantha* and chloramphenicol against a panel of selected Gram-negative bacteria.

Bacterial strains	Fractions from APL			Tested samples MIC and MBC (in bracket) values ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )								Reference antibiotic chloramphenicol
	APLa	APLb	APLd	4	5	6	7	8	8			
<i>Escherichia coli</i>												
ATCC8739	-	<b>16</b> (-)	<b>16</b> (-)	-	-	-	-	-	32 (-)	32 (-)	<b>2</b> (64)	
AG102	-	128 (-)	<b>64</b> (-)	256 (-)	-	128 (-)	-	-	32 (-)	32 (-)	32 (256)	
<i>Enterobacter aerogenes</i>												
ATCC13048	-	256 (-)	<b>8</b> (-)	128 (-)	64 (-)	-	-	-	32 (-)	32 (-)	16 (128)	
EA27	-	-	128 (-)	256 (-)	256 (-)	-	-	-	-	-	32 (256)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>												
ATCC11229	<b>16</b> (-)	<b>64</b> (-)	<b>16</b> (-)	64 (-)	32 (-)	-	-	-	32 (-)	32 (-)	32 (256)	
KP55	-	<b>16</b> (-)	<b>64</b> (-)	128 (-)	256 (-)	-	128 (-)	-	32 (-)	32 (-)	64 (256)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>												
PA01	-	128 (-)	<b>64</b> (-)	-	-	-	-	-	-	-	64 (-)	
PA124	-	256 (-)	<b>64</b> (-)	256 (-)	128 (-)	-	-	-	32 (-)	32 (-)	256 (-)	
<i>Providencia stuartii</i>												
ATCC29916	-	128 (-)	-	-	-	-	-	-	64 (-)	64 (-)	64 (256)	

(-): > 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for fractions or > 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for compounds; APL: leaf extract; APLa, APLb, and APLd are fractions from APL; **1**: stigmastrol, **2**:  $\beta$ -amyrin, **3**: 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosylstigmastrol, **4**: 3-O-methyl-D-chiro-inositol, **5**: epicatechin, **6**: quercetin-3-O-glucoside, **7**: 3-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolic acid, **8**: 3-O- $[\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolic acid; MIC values in bold: significant antibacterial effect [18]. Notes: MICs of fraction APLc > 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and MIC of compounds **1**, **2**, **3** were > 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in all tested bacteria.

TABLE 3: MICs (in  $\mu\text{g/mL}$ ) of crude leaf extract (APL), active fractions (APLa and APLd), 3-O- $[\beta\text{-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-galactopyranosyl]-oleanolic acid (8)$  and chloramphenicol in the presence of PA $\beta$ N and fold increase of activity (in parenthesis) against a panel of selected Gram-negative bacteria.

Bacterial strains	Tested samples, MIC in $\mu\text{g/mL}$ in presence of PA $\beta$ N and fold increase of activity (in parenthesis)				Reference antibiotic Chloramphenicol
	Leaf extract APL	Fractions from APL APLb	APLd	Isolated compound 8	
<i>Escherichia coli</i>					
ATCC8739	256 (4)	4 (4)	2 (8)	$\leq 2$ ( $\geq 16$ )	$\leq 2$ ( $\geq 1$ )
AG102	64 (8)	32 (2)	8 (16)	$\leq 2$ ( $\geq 16$ )	4 (8)
<i>Enterobacter aerogenes</i>					
ATCC13048	64 (4)	4 (2)	$\leq 4$ ( $\geq 64$ )	$\leq 2$ ( $\geq 16$ )	2 (8)
EA27	16 (64)	64 (2)	4 (128)	64 (4)	4 (8)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
ATCC11229	128 (8)	$\leq 4$ ( $\geq 4$ )	$\leq 4$ ( $\geq 16$ )	$\leq 2$ ( $\geq 16$ )	4 (8)
KP55	128 (8)	32 (2)	4 (4)	$\leq 2$ ( $\geq 16$ )	16 (4)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
PA01	128 (0.5)	32 (2)	32 (4)	$\leq 2$ ( $\geq 128$ )	8 (8)
PA124	128 (2)	32 (2)	128 (2)	16 (2)	64 (4)
<i>Providencia stuartii</i>					
ATCC29916	$\leq 4$ ( $\geq 2$ )	32 (16)	32 (4)	16 (4)	16 (4)

(-): MIC > 1024  $\mu\text{g/mL}$  for crude extract APL, >512 for fractions APLb and APLd, 256  $\mu\text{g/mL}$  for 3-O- $[\beta\text{-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-galactopyranosyl]-oleanolic acid (8)$ ; (); values in parenthesis are fold increase of activity in the presence of PA $\beta$ N at 30  $\mu\text{g/mL}$ ; MIC values in bold: significant antibacterial effects for MIC [18] and significant increase of activity in the presence of PA $\beta$ N [19, 20]; fold increase of activity determined MIC of sample tested alone (Tables 1 and 2) versus MIC of the sample in the presence of PA $\beta$ N. The MIC of PA $\beta$ N was >256  $\text{mg/L}$  for *E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. aerogenes*, and *P. stuartii* strains.

TABLE 4: Antibiotic resistance modulatory activity of leaf extract (APL) of *Acacia polyacantha* against MDR Gram-negative bacteria.

Antibiotics	Extract concentration	ATCC8739	AG102	ATCC13048	CM64	KP55	KP63	PA124	NEA16	PBS (%)
ERY	0	128	256	256	256	256	256	256	256	
	MIC/2	256 (0.5) <sup>a</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>32 (8)<sup>S</sup></b>	> 256 (> 1) <sup>a</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	50
	MIC/4	256 (0.5) <sup>a</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>128 (2)<sup>S</sup></b>	37.5
CLX	0	256	1024	> 1024	> 1024	1024	512	> 1024	> 1024	
	MIC/2	> 1024 (> 0.25) <sup>a</sup>	> 1024 (> 1) <sup>a</sup>	> 1024 (≥ 1) <sup>I</sup>	> 1024 (≥ 1) <sup>I</sup>	> 1024 (> 1) <sup>a</sup>	> 1024 (> 0.5) <sup>a</sup>	> 1024 (≥ 1) <sup>I</sup>	> 1024 (≥ 1) <sup>I</sup>	0
	MIC/4	> 1024 (> 0.25) <sup>a</sup>	> 1024 (> 1) <sup>a</sup>	> 1024 (≥ 1) <sup>I</sup>	> 1024 (≥ 1) <sup>I</sup>	> 1024 (> 1) <sup>a</sup>	> 1024 (> 0.5) <sup>a</sup>	> 1024 (≥ 1) <sup>I</sup>	<b>1024 (1)<sup>S</sup></b>	12.5
KAN	0	16	16	< 2	16	4	64	8	64	
	MIC/2	128(0.125) <sup>a</sup>	64 (0.25) <sup>a</sup>	4 (0.5) <sup>a</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	< 2 (2) <sup>S</sup>	128 (0.5) <sup>a</sup>	8(1) <sup>I</sup>	< 2 (32) <sup>S</sup>	25
	MIC/4	128(0.125) <sup>a</sup>	32 (0.5) <sup>a</sup>	8 (0.25) <sup>a</sup>	<b>8 (2)<sup>S</sup></b>	< 2 (2) <sup>S</sup>	128 (0.5) <sup>a</sup>	8(1) <sup>I</sup>	<b>16 (4)<sup>S</sup></b>	37.5
GEN	0	32	16	16	16	256	32	128	256	
	MIC/2	> 256 (> 0.125) <sup>a</sup>	> 256 (> 0.062) <sup>a</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	> 256 (> 0.125) <sup>a</sup>	<b>64 (2)<sup>S</sup></b>	<b>16 (16)<sup>S</sup></b>	25
	MIC/4	> 256 (> 0.125) <sup>a</sup>	< 2(8) <sup>S</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	< 2 (128) <sup>S</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	<b>64 (2)<sup>S</sup></b>	<b>16 (16)<sup>S</sup></b>	50
DOX	0	< 1	4	16	16	4	8	64	32	
	MIC/2	2 (0.5) <sup>a</sup>	8 (0.5) <sup>a</sup>	32 (0.5) <sup>a</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	4 (1)	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	> 128 (> 0.25) <sup>a</sup>	25
	MIC/4	< 1 (≤ 1) <sup>I</sup>	8 (0.5) <sup>a</sup>	32 (0.5) <sup>a</sup>	16 (1) <sup>I</sup>	< 1 (> 4) <sup>S</sup>	8 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	> 128 (> 0.25) <sup>a</sup>	14.28
CHL	0	2	32	16	256	64	32	256	64	
	MIC/2	2 (1) <sup>I</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	> 16 (> 1) <sup>a</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	0
	MIC/4	2 (1) <sup>I</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	> 16 (> 1) <sup>a</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	6 (1) <sup>I</sup>	32 (1) <sup>I</sup>	256 (1) <sup>I</sup>	64 (1) <sup>I</sup>	0
NOR	0	4	8	32	32	8	8	64	32	
	MIC/2	32 (0.125) <sup>a</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	<b>16 (2)<sup>S</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	25
	MIC/4	> 128 (> 0.031) <sup>a</sup>	> 128 (> 0.062) <sup>a</sup>	<b>16 (2)<sup>S</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	> 128 (> 0.062) <sup>a</sup>	> 128 (> 0.062) <sup>a</sup>	<b>32 (2)<sup>S</sup></b>	32 (1) <sup>I</sup>	25
CIP	0	< 0.5	1	8	8	< 0.5	1	64	8	
	MIC/2	16 (0.031) <sup>a</sup>	16 (0.0625) <sup>a</sup>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	16 (0.031) <sup>a</sup>	8 (0.125) <sup>a</sup>	<b>16 (4)<sup>S</sup></b>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	50
	MIC/4	16 (0.031) <sup>a</sup>	16 (0.0625) <sup>a</sup>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	16 (0.031) <sup>a</sup>	8 (0.125) <sup>a</sup>	<b>16 (4)<sup>S</sup></b>	<b>4 (2)<sup>S</sup></b>	50

ERY: erythromycin; CLX: cloxacillin; KAN: kanamycin; GEN: gentamicin; DOX: doxycycline; CHL: chloramphenicol; NOR: norfloxacin; CIP: ciprofloxacin; bacterial strains: *Escherichia coli* (AG102, ATCC8739); *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048, CM64); *Klebsiella pneumoniae* (KP55, KP63); *Providencia stuartii* NEA16; PBS: percentages of bacteria strain on which synergism has been observed. 0: ameliorating factor of the antibiotics after association with APF; S: synergy; I: indifference; a: antagonist; values in bold: case of synergy [19, 20].

TABLE 5: Antibiotic resistance modulatory activity of 3-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolic acid (7) against MDR Gram-negative bacteria.

Antibiotics	Extract concentration	Bacteria, MIC ( $\mu$ g/mL) and modulating factors of compound 7 (in bracket)														
		ATCC8739	AG102	ATCC13048	CM64	KP55	KP63	PA124	NEA16	PBS (%)						
ERY	0	128	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	75	
	MIC/2	256 (0.5) <sup>a</sup>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>64 (4)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>64 (2)<sup>s</sup></b>	<b>64 (2)<sup>s</sup></b>	<b>64 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>87.5</b>
	MIC/4	256 (0.5) <sup>a</sup>	<b>64 (4)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>64 (2)<sup>s</sup></b>	<b>64 (2)<sup>s</sup></b>	<b>64 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>87.5</b>
CLX	0	256	1024	> 1024	> 1024	1024	512	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	37.5
	MIC/2	512 (0.5) <sup>a</sup>	> 1024 (>1) <sup>a</sup>	<b>1024 (1)<sup>s</sup></b>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>l</sup>	<b>512 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (4)<sup>s</sup></b>	<b>128 (4)<sup>s</sup></b>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>l</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>l</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>l</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>l</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>l</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>l</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>l</sup>	37.5
	MIC/4	512 (0.5) <sup>a</sup>	1024 (1) <sup>l</sup>	<b>1024 (1)<sup>s</sup></b>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>l</sup>	<b>128 (8)<sup>s</sup></b>	> 1024 (>0.5) <sup>a</sup>	> 1024 (>0.5) <sup>a</sup>	> 1024 (>0.5) <sup>a</sup>	> 1024 (>0.5) <sup>a</sup>	> 1024 (>0.5) <sup>a</sup>	> 1024 (>0.5) <sup>a</sup>	> 1024 (>0.5) <sup>a</sup>	> 1024 (>0.5) <sup>a</sup>	> 1024 (>0.5) <sup>a</sup>	37.5
KAN	0	16	16	< 2	16	4	64	64	64	8	8	64	64	64	50	
	MIC/2	128 (0.125) <sup>a</sup>	128 (0.125) <sup>a</sup>	< 2 ( $\leq$ 1) <sup>l</sup>	< 2 (>8) <sup>s</sup>	< 2 (>2) <sup>s</sup>	<b>16 (4)<sup>s</sup></b>	<b>16 (4)<sup>s</sup></b>	<b>16 (4)<sup>s</sup></b>	16 (0.5) <sup>a</sup>	16 (0.5) <sup>a</sup>	16 (0.5) <sup>a</sup>	<b>16 (4)<sup>s</sup></b>	<b>16 (4)<sup>s</sup></b>	50	
	MIC/4	128 (0.125) <sup>a</sup>	64 (0.25) <sup>a</sup>	< 2 ( $\leq$ 1) <sup>l</sup>	< 2 (>8) <sup>s</sup>	< 2 (>2) <sup>s</sup>	256 (0.25) <sup>a</sup>	256 (0.25) <sup>a</sup>	256 (0.25) <sup>a</sup>	16 (0.5) <sup>a</sup>	16 (0.5) <sup>a</sup>	16 (0.5) <sup>a</sup>	<b>4 (16)<sup>s</sup></b>	<b>4 (16)<sup>s</sup></b>	37.5	
GEN	0	32	16	16	16	256	32	128	256	256	256	256	256	256	62.5	
	MIC/2	64 (0.5) <sup>a</sup>	> 256 (>0.062) <sup>a</sup>	<b>4 (4)<sup>s</sup></b>	< 2 (>8) <sup>s</sup>	< 2 ( <b>128</b> ) <sup>s</sup>	<b>16 (2)<sup>s</sup></b>	<b>16 (2)<sup>s</sup></b>	<b>16 (2)<sup>s</sup></b>	256 (0.5) <sup>a</sup>	256 (0.5) <sup>a</sup>	256 (0.5) <sup>a</sup>	<b>4 (64)<sup>s</sup></b>	<b>4 (64)<sup>s</sup></b>	62.5	
	MIC/4	256 (0.125) <sup>a</sup>	> 256 (0.062) <sup>a</sup>	<b>4 (4)<sup>s</sup></b>	< 2 (>8) <sup>s</sup>	< 2 ( <b>128</b> ) <sup>s</sup>	256 (0.125) <sup>a</sup>	256 (0.125) <sup>a</sup>	256 (0.125) <sup>a</sup>	256 (0.5) <sup>a</sup>	256 (0.5) <sup>a</sup>	256 (0.5) <sup>a</sup>	<b>4 (64)<sup>s</sup></b>	<b>4 (64)<sup>s</sup></b>	50	
DOX	0	< 1	4	16	16	4	8	64	32	32	32	32	32	32	37.5	
	MIC/2	< 1 ( $\leq$ 1) <sup>l</sup>	8 (0.5) <sup>a</sup>	16 (1) <sup>l</sup>	16 (1) <sup>l</sup>	4 (1) <sup>l</sup>	<b>2 (4)<sup>s</sup></b>	<b>2 (4)<sup>s</sup></b>	<b>2 (4)<sup>s</sup></b>	32 (2) <sup>s</sup>	32 (2) <sup>s</sup>	32 (2) <sup>s</sup>	<b>16 (2)<sup>s</sup></b>	<b>16 (2)<sup>s</sup></b>	37.5	
	MIC/4	4 (0.25) <sup>a</sup>	4 (1) <sup>l</sup>	16 (1) <sup>l</sup>	16 (1) <sup>l</sup>	4 (1) <sup>l</sup>	<b>2 (4)<sup>s</sup></b>	<b>2 (4)<sup>s</sup></b>	<b>2 (4)<sup>s</sup></b>	32 (2) <sup>s</sup>	32 (2) <sup>s</sup>	32 (2) <sup>s</sup>	<b>16 (2)<sup>s</sup></b>	<b>16 (2)<sup>s</sup></b>	37.5	
CHL	0	2	32	16	256	64	32	256	64	64	32	256	64	64	0	
	MIC/2	2 (1) <sup>l</sup>	32 (1) <sup>l</sup>	16 (1) <sup>l</sup>	256 (1) <sup>l</sup>	64 (1) <sup>l</sup>	32 (1) <sup>l</sup>	32 (1) <sup>l</sup>	32 (1) <sup>l</sup>	256 (1) <sup>l</sup>	256 (1) <sup>l</sup>	256 (1) <sup>l</sup>	64 (1) <sup>l</sup>	64 (1) <sup>l</sup>	0	
	MIC/4	2 (1) <sup>l</sup>	<b>16 (2)<sup>s</sup></b>	16 (1) <sup>l</sup>	256 (1) <sup>l</sup>	64 (1) <sup>l</sup>	<b>16 (2)<sup>s</sup></b>	256 (1) <sup>l</sup>	256 (1) <sup>l</sup>	256 (1) <sup>l</sup>	256 (1) <sup>l</sup>	256 (1) <sup>l</sup>	64 (1) <sup>l</sup>	64 (1) <sup>l</sup>	25	
NOR	0	4	8	32	32	8	8	64	32	32	32	32	32	32	25	
	MIC/2	64 (0.062) <sup>a</sup>	32 (0.25) <sup>a</sup>	<b>16 (2)<sup>s</sup></b>	32 (1) <sup>l</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	8 (1) <sup>l</sup>	32 (2) <sup>s</sup>	32 (1) <sup>l</sup>	32 (2) <sup>s</sup>	32 (2) <sup>s</sup>	32 (2) <sup>s</sup>	32 (1) <sup>l</sup>	32 (1) <sup>l</sup>	25	
	MIC 4	64 (0.062) <sup>a</sup>	32 (0.25) <sup>a</sup>	32 (1) <sup>l</sup>	32 (1) <sup>l</sup>	32 (0.25) <sup>a</sup>	8 (1) <sup>l</sup>	32 (2) <sup>s</sup>	8 (1) <sup>l</sup>	32 (2) <sup>s</sup>	32 (2) <sup>s</sup>	32 (2) <sup>s</sup>	32 (1) <sup>l</sup>	32 (1) <sup>l</sup>	12.5	
CIP	0	< 0.5	1	8	8	< 0.5	1	64	8	8	8	8	8	8	37.5	
	MIC/2	2 (0.25) <sup>a</sup>	8 (0.125) <sup>a</sup>	<b>1 (8)<sup>s</sup></b>	8 (1) <sup>l</sup>	8 (0.062) <sup>a</sup>	4 (0.25) <sup>a</sup>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	4 (0.25) <sup>a</sup>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	<b>4 (2)<sup>s</sup></b>	<b>4 (2)<sup>s</sup></b>	37.5	
	MIC/4	8 (0.062) <sup>a</sup>	4 (0.25) <sup>a</sup>	<b>2 (4)<sup>s</sup></b>	8 (1) <sup>l</sup>	2 (0.25) <sup>a</sup>	4 (0.25) <sup>a</sup>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	4 (0.25) <sup>a</sup>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	<b>4 (2)<sup>s</sup></b>	<b>4 (2)<sup>s</sup></b>	37.5	

ERY: erythromycin; CLX: cloxacillin; KAN: kanamycin; GEN: gentamicin; DOX: doxycycline; CHL: chloramphenicol; NOR: norfloxacin; CIP: ciprofloxacin; bacterial strains: *Escherichia coli* (AG102, ATCC8739); *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048, CM64); *Klebsiella pneumoniae* (KP55, KP63); *P. aeruginosa* PA124; *Providencia stuartii* NEA16; PBS: percentages of bacteria strain on which synergism has been observed. 0: ameliorating factor of the antibiotics after association with compound 7; S: synergy; I: indifference; a: antagonist; values in bold: case of synergy [19, 20].

TABLE 6: Antibiotic resistance modulatory activity of 3-O- $[\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-oleanolic acid (**8**) against MDR Gram-negative bacteria.

Antibiotics	Extract concentration	ATCC8739	AG102	ATCC13048	CM64	KP55	KP63	PA124	NEA16	PBS (%)
Bacteria, MIC ( $\mu$ g/mL) and modulating factors of compound <b>8</b> (in bracket)										
ERY	0	128	256	256	256	256	256	256	256	
	MIC/2	256 (0.5) <sup>a</sup>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	256 (1) <sup>i</sup>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>64 (4)<sup>s</sup></b>	<b>64 (4)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>75</b>
	MIC/4	128 (1) <sup>i</sup>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	256 (1) <sup>i</sup>	256 (1) <sup>i</sup>	<b>64 (4)<sup>s</sup></b>	<b>64 (4)<sup>s</sup></b>	256 (1) <sup>i</sup>	50
CLX	0	256	1024	> 1024	> 1024	1024	512	> 1024	> 1024	
	MIC/2	1024 (0.25) <sup>a</sup>	> 1024 (>1) <sup>a</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>i</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>i</sup>	1024 (1) <sup>i</sup>	1024 (0.5) <sup>a</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>i</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>i</sup>	0
	MIC/4	> 1024 (>0.25) <sup>a</sup>	> 1024 (>1) <sup>a</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>i</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>i</sup>	1024 (1) <sup>i</sup>	> 1024 (>0.5) <sup>a</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>i</sup>	> 1024 ( $\geq$ 1) <sup>i</sup>	0
KAN	0	16	16	< 2	16	4	64	8	64	
	MIC/2	<b>4 (4)<sup>s</sup></b>	64 (0.25) <sup>a</sup>	128 (0.015) <sup>a</sup>	128 (0.125) <sup>a</sup>	< 2 (2) <sup>s</sup>	256 (0.25) <sup>a</sup>	8 (1) <sup>i</sup>	128 (0.5) <sup>a</sup>	25
	MIC/4	128 (0.125) <sup>a</sup>	32 (0.25) <sup>a</sup>	128 (0.015) <sup>a</sup>	128 (0.125) <sup>a</sup>	< 2 (2) <sup>s</sup>	256 (0.25) <sup>a</sup>	8 (1) <sup>i</sup>	128 (0.5) <sup>a</sup>	12.5
GEN	0	32	16	16	16	256	32	128	256	
	MIC/2	256 (0.125) <sup>a</sup>	64 (0.25) <sup>a</sup>	128 (0.125) <sup>a</sup>	<b>8 (2)<sup>s</sup></b>	<b>64 (4)<sup>s</sup></b>	256 (0.125) <sup>a</sup>	<b>64 (2)<sup>s</sup></b>	256 (1) <sup>i</sup>	37.5
	MIC/4	256 (0.125) <sup>a</sup>	> 256 (>0.062) <sup>a</sup>	128 (0.125) <sup>a</sup>	128 (0.125) <sup>a</sup>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	> 256 (>0.125) <sup>a</sup>	128 (1) <sup>i</sup>	<b>128 (2)<sup>s</sup></b>	25
DOX	0	< 1	4	16	16	4	8	64	32	
	MIC/2	< 1 ( $\leq$ 1) <sup>i</sup>	<b>2 (2)<sup>s</sup></b>	16 (1) <sup>i</sup>	32 (0.5)a	< 1 (>4) <sup>s</sup>	<b>2 (4)<sup>s</sup></b>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	<b>16 (2)<sup>s</sup></b>	62.5
	MIC/4	< 1 ( $\leq$ 1) <sup>i</sup>	4 (1) <sup>i</sup>	32 (0.5)a	32 (0.5)a	< 1 (>4) <sup>s</sup>	<b>2 (4)<sup>s</sup></b>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	32 (1) <sup>i</sup>	37.5
CHL	0	2	32	16	256	64	32	256	64	
	MIC/2	2 (1) <sup>i</sup>	<b>16 (2)<sup>s</sup></b>	16 (1) <sup>i</sup>	256 (1) <sup>i</sup>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	32 (1) <sup>i</sup>	256 (1) <sup>i</sup>	64 (1) <sup>i</sup>	25
	MIC/4	<b>1 (2)<sup>s</sup></b>	32 (1) <sup>i</sup>	16 (1) <sup>i</sup>	256 (1) <sup>i</sup>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	<b>16 (2)<sup>s</sup></b>	256 (1) <sup>i</sup>	64 (1) <sup>i</sup>	37.5
NOR	0	4	8	32	32	8	8	64	32	
	MIC/2	<b>2 (2)<sup>s</sup></b>	8 (1) <sup>i</sup>	> 128 (>0.25) <sup>a</sup>	64 (0.5) <sup>a</sup>	<b>4 (2)<sup>s</sup></b>	8 (1) <sup>i</sup>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	128 (0.125) <sup>a</sup>	37.5
	MIC/4	< 1 (>4) <sup>s</sup>	<b>2 (4)<sup>s</sup></b>	128 (0.25) <sup>a</sup>	64 (0.5) <sup>a</sup>	<b>4 (2)<sup>s</sup></b>	<b>4 (2)<sup>s</sup></b>	<b>32 (2)<sup>s</sup></b>	128 (0.125) <sup>a</sup>	62.5
CIP	0	< 0.5	1	8	8	< 0.5	1	64	8	
	MIC/2	< 0.5 ( $\leq$ 1) <sup>i</sup>	< <b>0.5 (&gt;2)<sup>s</sup></b>	64 (0.125) <sup>a</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	< 0.5 ( $\leq$ 1) <sup>i</sup>	4 (0.25) <sup>a</sup>	64 (1) <sup>i</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	12.5
	MIC/4	2 (0.25) <sup>a</sup>	< <b>0.5 (&gt;2)<sup>s</sup></b>	64 (0.125) <sup>a</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	1 (2) <sup>a</sup>	2 (0.5) <sup>a</sup>	64 (1) <sup>i</sup>	64 (0.125) <sup>a</sup>	12.5

ERY: erythromycin; CLX: cloxacillin; KAN: kanamycin; GEN: gentamycin; DOX: doxycycline; CHL: chloramphenicol; NOR: norfloxacin; CIP: ciprofloxacin; bacterial strains: *Escherichia coli* (AG102, ATCC8739); *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048, CM64); *Klebsiella pneumoniae* (KP55, KP63); *P. aeruginosa* PA124; *Providencia stuartii* NEA16; PBS: percentage of bacteria strain on which synergism has been observed. 0: ameliorating factor of the antibiotics after association with compound **8**; S: synergy; I: indifference; a: antagonist; values in bold: case of synergy [19, 20].



the polyol (**4**) were devoid of antibacterial activity (Table 2). Flavonoids **5** and **6** as well as saponins **7** and **8** had selective and poor antibacterial. Within saponins, it can be noted that the presence of a second galactopyranosyl substituent (compound **8**) instead of xylopyranosyl (compound **7**) significantly increased the antibacterial activity, with compound **8** displaying MIC values  $\leq 64 \mu\text{g/mL}$  against 7/9 tested bacteria versus 0/9 for compound **7** (Table 2).

**4.3. Role of Bacterial Efflux Pumps.** The clinical MDR bacteria tested in this work overexpressed efflux mechanism via the efflux pumps of the resistance nodulation cell division (RND) family, namely, AcrAB-TolC for enterobacteria such as *E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, and *P. stuartii* and MexAB-OprM for *P. aeruginosa* [31–36]. These efflux pumps expel toxic compounds (including antibiotics) out of the bacterial cytoplasm, preventing them from reaching their intracellular target [37]. Efflux Pump Inhibitors, such as Pa $\beta$ N, could be used to restore the intracellular concentration of antibacterials acting on intracellular target by blocking the bacterial efflux pumps. In the presence of PA $\beta$ N, it was observed that the activity of the crude extract (except against *P. aeruginosa* PA01), fractions APLb and APLd as well as compound **8** and CHL strongly increased on almost all tested bacteria (Table 3). The fold increase ranged from 2 to  $\geq 4$  for APLb, from  $\geq 1$  to 8 for CHL, from 2 to  $\geq 128$  for compound **8**, from 0.5 to 64 for APL, from 2 to 128 for APLd. This clearly indicated that compound **8** as well as other active constituents of the APL are substrates of bacterial efflux pumps and that they may have an intracellular target [38]. Consequently, the development of an antibacterial drug combination of compound **8**, as well as extracts or fractions with an EPI, could be an interesting strategy to tackle MDR bacterial infections. In effect, modulation factor  $\geq 2$  define a biologically significant antibiotic resistance modulating substance [19, 20]. Previous study demonstrated that PA $\beta$ N could also restore the activity of several natural compounds on MDR bacteria expressing active efflux pumps, with MIC values decreasing below  $10 \mu\text{g/mL}$  in most of the tested bacteria for the coumarin, MAB3, the xanthone, laurentixanthone B, the naphthoquinones: diospyrone and plumbagin and the flavonoids: 4-hydroxyonchocarpin and isobavachalcone [22, 23].

**4.4. Antibiotic Resistance Modulating Effects.** Difficulties in the field of novel antibacterial drug discovery, for combating resistant pathogens, have propelled the search for new alternative medicine to improve or to restore the activity of commonly used antibiotics. Combining antibiotics with botanicals and phytochemicals is an attractive strategy as regards the diversity of secondary metabolites from natural source. If an antibacterial substance improves the activity of at least 70% of the tested antibiotics on more than 70% tested bacterial strains, it might be considered as a potential efflux pump inhibitor [39]. However, this was not the case in the present study, as neither APL nor compounds **7** and **8** were able to exert such degree of synergistic effects with antibiotics (Tables 4–6). However, synergistic effects were

observed between APL, compounds **7** and **8** with at least one of the eight tested antibiotics against at least 50% of the MDR bacterial strains (Tables 3–6). This suggests that possible combination of these samples with specific antibiotics could help in antibacterial chemotherapy.

## 5. Limitations

Our study has limitations. The toxicity of this plant also needs to be performed to evaluate its safety.

## 6. Conclusion

In the present study, the antibacterial activity of the crude extract, fractions, and compounds from the leaf of *Acacia polyacantha* Willd. (Fabaceae) was investigated. It was found that the leaf extract was more active than the bark extract. The antibacterial constituents of the leaf extract include epicatechin (**5**), quercetin-3-O-glucoside (**6**), 3-O- $[\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-galactopyranosyl}]$ -oleanolic acid (**7**), and 3-O- $[\beta\text{-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-galactopyranosyl}]$ -oleanolic acid. Saponin **8** was the major antibacterial constituent of the plant and acted as a substrate of bacterial EPI. Although the crude extract and its constituents were not EPI, they showed synergistic effects with several antibiotics and could be selectively used in bacterial chemotherapy. The overall results demonstrated that *Acacia polyacantha* is a source of antibacterial drug that should be explored further to develop novel substances to combat both sensitive and MDR phenotypes.

## Abbreviations

1:	Stigmasterol
2:	$\beta$ -amyrin
3:	Stigmasterol-3-O- $\beta$ -glucopyranosyl
4:	3-O-methyl-D-chiro-inositol
5:	Epicatechin
6:	Quercetin-3-O-glucoside
7:	3-O- $[\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-galactopyranosyl}]$ -oleanolic acid
8:	3-O- $[\beta\text{-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-galactopyranosyl}]$ -oleanolic acid
AcOEt:	Ethyl acetate
ATCC:	American Type Culture Collection
APB:	<i>Acacia polyacantha</i> bark extract
APL:	<i>Acacia polyacantha</i> leaf extract
APLa-d:	Fractions of <i>Acacia polyacantha</i> leaf extract
CC:	Column chromatography
CIP:	Ciprofloxacin
CHCl <sub>3</sub> :	Chloroform
CHL:	Chloramphenicol
CLX:	Cloxacillin
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
DOX:	Doxycyclin

EPI:	Efflux pump inhibitor
<i>E. aerogenes</i> :	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>E. cloacae</i> :	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
ERY:	Erythromycin
GEN:	Gentamycin
INT:	<i>p</i> -iodonitrotetrazolium chloride
KAN:	Kanamycin
<i>K. pneumoniae</i> :	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MBC:	Minimal bactericidal concentration
MDR:	Multidrug resistant
MeOH:	Methanol
MHB:	Mueller Hinton Broth
MIC:	Minimal inhibitory concentration
m.p.:	Melting point
NMR:	Nuclear magnetic resonance
NOR:	Norfloxacin
PAS $\beta$ N:	Phenylalanine-arginine- $\beta$ -naphthylamide
<i>P. aeruginosa</i> :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. stuartii</i> :	<i>Providencia stuartii</i>
RA:	Reference antibiotic.

## Data Availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

## Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Authors' Contributions

Flora T. Mambe, Jean Na-Iya, Ghislain W. Fotso, and Fred Ashu carried out the study; Bathélemy Ngameni, Bonaventure T. Ngadjui, Veronique P. Beng, and Victor Kuete designed the experiments. Victor Kuete wrote the manuscript; Victor Kuete supervised the work and provided the bacterial strains; all authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

Authors are thankful to the Cameroon National Herbarium for identification of plants.

## Supplementary Materials

*Supplementary file.docx*. S1: RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and major chemical shifts of studied compounds; S2: bacterial strains and features; S3: preliminary evaluation of antibiotic resistance modulatory activity of selected samples at subinhibitory concentrations against *Pseudomonas aeruginosa* PA124 [1100 KB]. (*Supplementary Materials*)

## References

- [1] H. Harbottle, S. Thakur, S. Zhao, and D. G. White, "Genetics of antimicrobial resistance," *Animal Biotechnology*, vol. 17, no. 2, pp. 111–124, 2006.
- [2] A. A. Amgad, R. P. J. Martin, M. M. Ismail et al., "Antimicrobial activities of seed extracts of mango (*Mangifera indica* L.)," *Advances in Microbiology*, vol. 2, no. 4, pp. 571–576, 2012.
- [3] J. K. Dzotam, I. K. Simo, G. Bitchagno et al., "In vitro antibacterial and antibiotic modifying activity of crude extract, fractions and 3',4',7-trihydroxyflavone from *myristica fragrans* houtt against MDR Gram-negative enteric bacteria," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 18, no. 1, p. 15, 2018.
- [4] V. Kuete, R. Metuno, B. Ngameni et al., "Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *treculia obovoidea* (Moraceae)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 112, no. 3, pp. 531–536, 2007.
- [5] V. Kuete, J. R. Nguemeving, V. P. Beng et al., "Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 109, no. 3, pp. 372–379, 2007.
- [6] V. Kuete, P. Y. Ango, G. W. Fotso et al., "Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from *Artocarpus communis* (Moraceae)," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 11, no. 1, 2011.
- [7] D. E. Djeussi, J. A. K. Noumedem, J. A. Seukep et al., "Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 13, article 164, 2013.
- [8] J. A. Seukep, A. G. Fankam, D. E. Djeussi et al., "Antibacterial activities of the methanol extracts of seven Cameroonian dietary plants against bacteria expressing MDR phenotypes," *Springerplus*, vol. 2, article 363, 2013.
- [9] A. G. Fankam, J. R. Kuate, and V. Kuete, "Antibacterial activities of *beilschmiedia obscura* and six other cameroonian medicinal plants against multi-drug resistant gram-negative phenotypes," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 14, article 241, 2014.
- [10] I. K. Voukeng, V. Kuete, J. P. Dzoyem et al., "Antibacterial and antibiotic-potential activities of the methanol extract of some cameroonian spices against gram-negative multi-drug resistant phenotypes," *BMC Research Notes*, vol. 5, p. 299, 2012.
- [11] A. G. Fankam, J. R. Kuate, and V. Kuete, "Antibacterial and antibiotic resistance modifying activity of the extracts from *allanblackia gabonensis*, *combretum molle* and *gladiolus quarantinianus* against gram-negative bacteria including multi-drug resistant phenotypes," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 15, article 206, 2015.
- [12] J. K. Dzotam, F. K. Touani, and V. Kuete, "Antibacterial and antibiotic-modifying activities of three food plants (*Xanthosoma mafaffa* Lam., *moringa oleifera* (L.) Schott and *Passiflora edulis* Sims) against multidrug-resistant (MDR) gram-negative bacteria," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 16, no. 1, article 9, 2016.
- [13] H. T. Manekeng, A. T. Mbaveng, G. S. Nguenang et al., "Anti-staphylococcal and antibiotic-potentiating activities of seven Cameroonian edible plants against resistant phenotypes," *Investigational Medicinal Chemistry and Pharmacology*, vol. 1, no. 1, article 7, 2018.
- [14] C. Orwa, A. Mutua, R. Kindt, R. Jamnadass, and S. Anthony, "Agroforestry Database: a tree reference and selection



- guide version 4.0," <http://www.worldagroforestry.org/output/agroforestry-database>.
- [15] G. Fotso W., J. Na-Iya, A. Mbaveng T. et al., "Polyacanthoside A, a new oleanane-type triterpenoid saponin with cytotoxic effects from the leaves of *Acacia polyacantha* (Fabaceae)," *Natural Product Research (Formerly Natural Product Letters)*, pp. 1–6, 2018.
- [16] Y. A. Koudoro, D. C. P. Agbangnan, B. Yèhouénou et al., "Chemical characterization and biological activities of extracts from two plants (*Cissus quadrangularis* and *Acacia polyacantha*) used in veterinary medicine in Benin," *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 3, pp. 91–96, 2015.
- [17] C. Waterman, R. A. Smith, L. Pontiggia, and A. Dermarderosian, "Anthelmintic screening of sub-saharan african plants used in traditional medicine," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 127, no. 3, pp. 755–759, 2010.
- [18] V. Kuete, "Potential of cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review," *Planta Medica*, vol. 76, no. 14, pp. 1479–1491, 2010.
- [19] A. G. Fankam, J.-R. Kuate, and V. Kuete, "Antibacterial and antibiotic resistance modulatory activities of leaves and bark extracts of *recinodindron heudelotii* (Euphorbiaceae) against multidrug-resistant gram-negative bacteria," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 17, no. 1, article 168, 2017.
- [20] J. Kovač, N. Gavarić, F. Bucar, and S. S. Možina, "Antimicrobial and resistance modulatory activity of *alpinia katsumadai* seed phenolic extract, essential oil and post-distillation extract," *Food Technol Biotechnol*, vol. 52, no. 2, pp. 248–254, 2014.
- [21] V. S. Chaturvedula and I. Prakash, "Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from the dichloromethane extract of *rubus suavissimus*," *International Current Pharmaceutical Journal*, vol. 1, no. 9, pp. 239–242, 2012.
- [22] V. Kuete, B. Ngameni, J. G. Tangmouo et al., "Efflux pumps are involved in the defense of gram-negative bacteria against the natural products isobavachalcone and diospyrone," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 54, no. 5, pp. 1749–1752, 2010.
- [23] V. Kuete, S. Alibert-Franco, K. O. Eyong, B. Ngameni et al., "Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype," *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 37, no. 2, pp. 156–161, 2011.
- [24] N. Sharma, M. K. Verma, D. K. Gupta, N. K. Satti, and R. K. Khajuria, "Isolation and quantification of pinitol in *Argyrolobium roseum* plant, by <sup>1</sup>H-NMR," *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 20, no. 1, pp. 81–87, 2016.
- [25] S. B. Mahato and A. P. Kundu, "<sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features," *Phytochemistry*, vol. 37, no. 6, pp. 1517–1575, 1994.
- [26] C. S. R. Freire, D. S. C. Coelho, N. M. Santos, A. J. D. Silvestre, and C. P. Neto, "Identification of delta<sup>7</sup> phytosterols and phytosteryl glucosides in the wood and bark of several acacia species," *Lipids*, vol. 40, no. 3, pp. 317–322, 2005.
- [27] I. K. Adnyana, Y. Tezuka, S. Awale, A. H. Banskota, K. Q. Tran, and S. Kadota, "Quadranosides VI–XI, six new triterpene glucosides from the seeds of *Combretum quadrangulare*," *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 48, no. 8, pp. 1114–1120, 2000.
- [28] L. W. Xu, J. Chen, H. Y. Qi, and Y. P. Shi, "Phytochemicals and their biological activities of plants in *Tagetes L.*," *Chinese Herbal Medicines*, vol. 4, no. 2, pp. 103–117, 2012.
- [29] V. Kuete and T. Efferth, "Cameroonian medicinal plants: Pharmacology and derived natural products," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 1, article 123, 2010.
- [30] C. Mims, J. Playfair, I. Roitt, D. Wakelin, and R. Williams, "Antimicrobials and chemotherapy," in *Medical Microbiology Review*, CA. Mims, Ed., vol. 35, pp. 1–34, 1993.
- [31] J. Chevalier, J.-M. Pages, A. Eyraud, and M. Mallea, "Membrane permeability modifications are involved in antibiotic resistance in *klebsiella pneumoniae*," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 274, no. 2, pp. 496–499, 2000.
- [32] M. Malléa, A. Mahamoud, J. Chevalier et al., "Alkylaminoquinolines inhibit the bacterial antibiotic efflux pump in multidrug-resistant clinical isolates," *Biochemical Journal*, vol. 376, no. 3, pp. 801–805, 2003.
- [33] M. Mallea, J. Chevalier, C. Bornet et al., "Porin alteration and active efflux: two in vivo drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*," *Microbiology*, vol. 144, no. 11, pp. 3003–3009, 1998.
- [34] M. Viveiros, A. Jesus, M. Brito et al., "Inducement and reversal of tetracycline resistance in *Escherichia coli* K-12 and expression of proton gradient-dependent multidrug efflux pump genes," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 49, no. 8, pp. 3578–3582, 2005.
- [35] V. Lorenzi, A. Muselli, A. F. Bernardini et al., "Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 53, no. 5, pp. 2209–2211, 2009.
- [36] Q.-T. Tran, K. R. Mahendran, E. Hajjar et al., "Implication of porins in beta-lactam resistance of *providencia stuartii*," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 42, pp. 32273–32281, 2010.
- [37] F. Van Bambeke, J.-M. Pagès, and V. J. Lee, "Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux," *Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery*, vol. 1, no. 2, pp. 157–175, 2006.
- [38] A. Mahamoud, J. Chevalier, S. Alibert-Franco, W. V. Kern, and J.-M. Pagès, "Antibiotic efflux pumps in gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 59, no. 6, pp. 1223–1229, 2007.
- [39] L. C. Braga, A. A. M. Leite, K. G. S. Xavier et al., "Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 51, no. 7, pp. 541–547, 2005.



**Hindawi**

Submit your manuscripts at  
[www.hindawi.com](http://www.hindawi.com)

