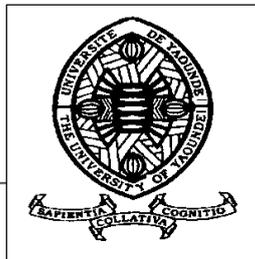


UNIVERSITE DE YAOUNDE I
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

**Centre de Recherche et de Formation
Doctorale en
Science de la Vie, Santé et Environnement**

**Centre for Research and Doctoral Training
in Life Sciences,
Health and the Environment**

**Laboratoire de Microbiologie
Microbiology Laboratory**

**Etude de la résistance bactérienne aux antibiotiques induite
par quelques extraits de plantes médicinales**

THESE

« Présentée et soutenue publiquement en vue de l'obtention du Doctorat/PhD en Biochimie »

Option : Microbiologie

Par :

EZO'O MENGOU Fabrice Télésfor



Sous la direction de :
ESSIA NGANG Jean Justin
Professeur

Année 2021

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

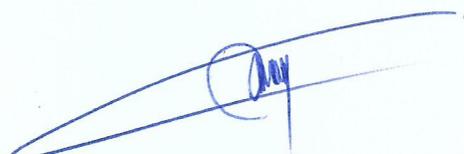
Nous, soussignés Pr. **NYEGUE Maximilienne Ascension épouse EONE** et Pr. **MOUNDIPA FEWOU Paul** respectivement Examineur et Président du jury de Thèse de Doctorat/Ph.D en Biochimie spécialité Microbiologie, soutenue par Monsieur **EZO'O MENGO Fabrice Télesfor** (Matricule **04T306**) le Mardi 05 Octobre 2021 à 11 heures dans la Salle Multimédia de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, sous le thème : " Etude de la résistance bactérienne aux antibiotiques induite par les extraits de plantes médicinales ", attestons que le candidat a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

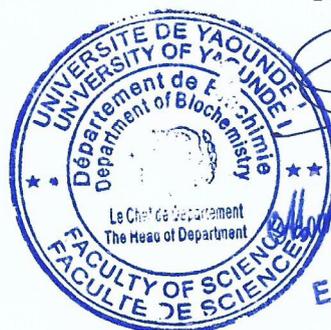
En foi de quoi, la présente attestation lui est établie pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le **09 DEC 2021**

Examineur

Président du jury


Pr NYEGUE Maximilienne Ascension
Professeur / HDR


Professor
Enzymology-Toxicology

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

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	ATOUGHO 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 NSANGOU 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	DAARS/FS
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste

5	DZEUFLET 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 MEGAPTCHÉ	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	CE / MINRESI
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	NGOOU 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 deMiss.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. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>
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. épse 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	GHOGOMU 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	Directeur/ MINESUP/ 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	C.E/ MINESUP
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. Anastasia	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	SIELINOU 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	AMINOUE 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	MONTHE DJIADEU Valery 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 & 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

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

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 FOUDA 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 épouse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19	EYEBE FOUDA 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	Directeur/ENS/UIYI

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

DEDICACE

A

Mon père MENGO MENGO Robin

REMERCIEMENTS

Je tiens à témoigner, très sincèrement, ma considération pour tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail. Merci pour avoir été de précieux instruments entre les mains du Créateur de l'Univers pour l'aboutissement de la réalisation de cette thèse. Sans sa grâce, je n'aurais pas pu finir ce travail. Merci Seigneur Jésus pour tout.

Je remercie tout d'abord mon Directeur de thèse, le Professeur Jean Justin ESSIA NGANG, qui malgré ses multiples occupations m'a fait honneur de diriger ces travaux. Sa rigueur scientifique et sa patience ont été un grand encouragement pour moi. Merci d'avoir cru en mes capacités d'aller jusqu'au bout de cette thèse. Je ne saurais vous exprimer ma profonde gratitude.

Mes sincères remerciements vont ensuite à l'endroit des Départements de Biochimie et de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I et à leurs chefs respectifs : le Professeur Paul MOUNDIPA FEWOU et le Professeur Jean Justin ESSIA NGANG, qui m'ont encadré dès mon entrée à l'Université et me donnent dans un proche avenir, l'occasion de soutenir cette thèse.

Je remercie par ailleurs, du fond du cœur :

Le Professeur Sylvain SADO KAMDEM, Maître de conférences à l'Université de Yaoundé I, pour sa disponibilité et son grand intérêt pour mes travaux ;

Le Professeur Jean Paul ASSAM ASSAM pour sa disponibilité, ses conseils, son soutien et son encadrement dans la réalisation de cette thèse ;

Le Professeur Maximilienne Ascension NYEGUE pour ses encouragements et ses multiples conseils ;

Tout le corps enseignant des Départements de Microbiologie et de Biochimie pour la qualité de leurs enseignements.

Mes sincères remerciements sont aussi adressés :

A l'équipe de Thésards et de Masters, du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I, qui m'ont encouragé et soutenus dans la réalisation de cette thèse ;

Au laboratoire de recherche en Tuberculose et Pharmacologie du Centre Biotechnologie de Nkolbisson pour le plateau technique mis à notre disposition pour la réalisation de ce travail ;

Au Dr OTELE MBEDE Jean, Promoteur de l'Institut Supérieur des Professions de Santé (ISPS) pour son soutien multidimensionnel et ses conseils qui m'ont été précieux pour la finalisation de ce travail.

Merci enfin :

A mon père qui n'a pas cessé de m'encourager et de me soutenir dans ce travail, à ma feuë mère Zeh Anne qui a cru en mes capacités et à ma deuxième mère Ebanembang Denise pour sa présence à mes cotés malgré ses difficultés ;

A tous les membres de ma famille nucléaire, la famille MENG0, pour leur soutien durant toutes les années de recherche et particulièrement, mes sœurs (Ze Majolie, Assako Julie, Ovo Nadine, Eyenga Hermine, Ndete Marie-christine), mes frères (Mbozo'o Jacques, Beti Mathurin, Ango Aristide, Nkoumou Jean-noel et Ebo'o Jordan), mes beaux-frères (Assako Jean-Pegui, Patrick Moneze et Ovo), et mes nièces et neveux ;

A tous mes oncles, tentes, cousins et cousines qui n'ont cessé de m'encourager, particulièrement à Eyenga Rosine ;

A certains de mes proches : Nana Martial, Boade Joel, Achille Nimpa, Maman Dobi, Tounouga Manuella, Nzeuko'o Elisabeth, Nya Raissa, Matcheu Gertrude, Mbouogno Hermine, David lobe, Bogne Miriam, Avomo Jeanne, Sandrine Youté, Dr Nkoudou Nardis, Dr Ngolong Legrand, Dr Moni, Claire Tchouang. Merci pour vos encouragements ;

A tous mes bien-aimé(e)s du groupe chrétien Wisdom School NG (Claudia, Darleine, Jolivette, Nicole, Arnaud, Blondèle, Sandra, Leonel, Rolin, Inès, Dieunedort, Adeline, Mireille, Angèle, Belvinard, Elsa, Ghislain, Nadine, Arnaud, Ruth, Sorel, Laetitia, Liza etc). Votre soutien m'a été d'un grand encouragement ;

A tous mes collègues de l'ISPS : Pr Nnomo Zanga, Dr Oyono Victor, Mme Otele Régine, Mme Aboudi Sandrine, Mme Biloa, Mme Etoundi Flora, Mme Ngono Gabrielle, Pr Moyou, M. Mama Georges, M. Omgba, M. Dingao, M. Obara ;

A l'Herbier National de Yaoundé-Cameroun qui a permis l'identification des espèces végétales utilisées ;

A tous ceux que je n'aurais pas cités ici par oubli, et qui d'une manière ou d'une autre ont contribué à la réalisation de ce travail. Trouvez, ici, toute ma reconnaissance.

TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	xxii
REMERCIEMENTS	xxiii
TABLE DES MATIERES	xxv
RESUME.....	xxix
ABSTRACT	xxx
LISTE DES ABREVIATIONS	xxxi
LISTE DES TABLEAUX.....	xxxiii
LISTE DES FIGURES	xxxv
LISTE DES ANNEXES	xxxvii
INTRODUCTION.....	2
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	5
I.1. CARACTERES GENERAUX DES BACTERIES PATHOGENES	6
I.1.1. Définition et mode d'infection	6
I.1.2. Exemples de bactéries pathogènes	6
I.1.2.1. Le genre <i>Salmonella</i>	6
I.1.2.2. Le genre <i>Staphylococcus</i>	9
I.2. CHIMIOOTHERAPIE ET UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES DANS LA LUTTE CONTRE LES BACTERIES PATHOGENES	11
I.2.1. Définition, classification et mécanisme d'action des antibiotiques	11
I.2.2. Résistance bactérienne aux antibiotiques	18
I.2.2.1. Résistance naturelle et résistance acquise	18
I.2.2.2. Support génétique de la résistance bactérienne	19
I.2.2.3. Mécanisme de résistance bactérienne aux antibiotiques	21
I.2.3. Evolution des bactéries résistantes aux antibiotiques.....	27
I.2.3.1. Cas de <i>Salmonella Typhi</i>	27
I.2.3.2. Cas de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
I.2.4. Causes probables de la résistance aux antibiotiques	28
I.2.5. Prévention de la résistance aux antibiotiques.....	29
I.2.5.1. Limiter l'utilisation des antibiotiques	30
I.2.5.2. Faire un meilleur usage des antibiotiques	30

I.3. UTILISATION DES PLANTES MEDICINALES DANS LA LUTTE CONTRE LES BACTERIES PATHOGENES	31
I.3.1. Le potentiel antimicrobien des plantes médicinales	32
I.3.1.1. Les composés phénoliques	33
I.3.1.2. Les terpènes ou terpénoïdes	33
I.3.1.3. Les alcaloïdes	33
I.3.2. Les plantes médicinales utilisées au Cameroun	34
I.3.2.1. Cas d' <i>Annickia chlorantha</i>	35
I.3.2.2. Cas d' <i>Irvingia gabonensis</i>	36
I.4. LES METHODES D'ETUDE <i>IN VITRO</i> DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE	37
I.4.1. La méthode de diffusion en milieu gélosé.....	37
I.4.1.1. La méthode de diffusion en milieu solide par la technique des disques	37
I.4.1.2. La méthode de diffusion en milieu solide par la technique des puits.....	38
I.4.1.3. La méthode de dilution en milieu gélosé ou d'incorporation à la gélose.....	38
I.4.2. La méthode de dilution en milieu liquide.....	38
I.4.3. La bioautographie.....	38
I.4.4. Technique de micro-atmosphère	39
I.5. IDENTIFICATION DES GENES CODANT POUR LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES PAR PCR (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>)	39
I.5.1. Principe de PCR	39
I.5.2. Protocole de PCR	40
I.5.3. Composition du mélange réactionnel	40
I.5.4. Révélation des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose	41
I.5.5. Limites et risques de la réaction PCR	41
I.5.6. Différents types de PCR.....	41
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	42
II.1. MATERIEL.....	43
II.1.1. Matériel végétal.....	43
II.1.2. Les antibiotiques	44
II.1.3. Les souches bactériennes	45
II.1.4. Les milieux de culture	45
II.2. METHODES	46

II.2.1. Pré-cultures des souches bactériennes.....	46
II.2.2. Préparation des extraits aqueux de plantes.....	46
II.2.3. Détermination de la concentration d'extrait de plantes à utiliser pour l'exposition des souches bactériennes	46
II.2.3.1.Détermination de l'activité antibactérienne des extraits de plantes et des antibiotiques par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.....	47
II.2.3.2.Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice par macrodillution.....	49
II.2.4. Mise en évidence de l'induction de la résistance de <i>S. Typhi</i> et de <i>S. aureus</i> aux antimicrobiens par leur exposition aux extraits de plantes.....	49
II.2.4.1.Etude de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques pendant le protocole d'induction de la résistance	50
II.2.4.2.Evaluation de l'impact de la concentration d'extrait de plante sur les capacités d'induction d'une antibiorésistance bactérienne	51
II.2.4.3.Etude de la sensibilité bactérienne aux extraits de plantes pendant le protocole d'induction de la résistance	52
II.2.5. Etude des mécanismes d'acquisition de la résistance bactérienne aux antibiotiques ..	52
II.2.5.1. Extraction et test de pureté de l'ADN.....	54
II.2.5.2.Préparation des mélanges réactionnels.....	54
II.2.5.3.Mélange Mix-ADN.....	55
II.2.5.4.Amplification.....	55
II.2.5.5.Révélation des produits d'amplification.....	55
II.2.6. Analyses statistiques	56
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	57
III.1. RESULTATS	58
III.1.1. Concentration d'extrait de plante à utiliser pour l'exposition de <i>S. Typhi</i> et de <i>S. aureus</i>	58
III.1.1.1.Profil de sensibilité de <i>S. Typhi</i> et de <i>S. aureus</i> aux extraits de plantes et aux antibiotiques	58
III.1.1.2.Concentration minimale inhibitrice (CMI).....	61
III.1.2. Résistance de <i>S. Typhi</i> et de <i>S. aureus</i> aux antibactériens induite par leur exposition aux extraits de plantes	64
III.1.2.1.Sensibilité de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques pendant et après son exposition aux extraits <i>Chromolaena odorata</i> et <i>Erigeron floribundus</i>	67
III.1.2.2.Comparaison de la résistance de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques induite par les extraits de plantes.....	68

III.1.2.3.Sensibilité de <i>S. Typhi</i> aux antibiotiques pendant et après son exposition aux extraits <i>Annickia chlorantha</i> et <i>Irvingia gabonensis</i>	70
III.1.2.4.Comparaison de la résistance de <i>S. Typhi</i> aux antibiotiques induite par les extraits de plantes.....	72
III.1.3. Impact de la concentration d'extrait de plante sur les capacités d'acquisition d'une antibiorésistance par <i>S. Typhi</i>	76
III.1.3.1.Résistance de <i>S. Typhi</i> à la ciprofloxacine induite par son exposition à trois concentrations fixes d'extrait de plante.....	76
III.1.3.2.Résistance de <i>S. Typhi</i> à la gentamicine induite par son exposition à trois concentrations fixes d'extrait de plante.....	77
III.1.3.3.Résistance de <i>S. Typhi</i> à l'amoxicilline induite par son exposition à trois concentrations fixes d'extrait de plante.....	78
III.1.3.4.Résistance de <i>S. Typhi</i> au chloramphénicol induite par son exposition à trois concentrations fixes d'extrait de plante.....	78
III.1.4. Sensibilité de <i>S. Typhi</i> aux extraits de plantes pendant le protocole d'induction de la résistance	79
III.1.5. Comparaison de la résistance de <i>S. Typhi</i> aux extraits de plantes induite par les substances végétales.....	81
III.1.6. Concentrations minimales inhibitrices des extraits de plantes testés sur <i>S. Typhi</i> après son exposition aux extraits de plantes	83
III.1.7. Mécanismes d'acquisition de la résistance des souches bactérienne aux antibiotiques	85
III.1.7.1.Extraction et électrophorèse du génome des différents échantillons de <i>S. Typhi</i>	85
III.1.7.2.Mécanisme d'acquisition de la résistance de <i>S. Typhi</i> aux β -lactamines (amoxicilline).....	86
III.1.7.3. Mécanisme d'acquisition de la résistance de <i>S. Typhi</i> au cotrimoxazole.....	88
III.1.7.4. Mécanisme d'acquisition de la résistance de <i>S. Typhi</i> au chloramphénicol.....	89
III.1.7.5. Mécanisme d'acquisition d'une multirésistance de <i>S. Typhi</i> aux antibiotiques.....	90
III.2. DISCUSSION	92
CONCLUSION	99
PERSPECTIVES.....	100
BIBLIOGRAPHIE	101
ANNEXES	P
PUBLICATION ISSUE DE LA THESE	V

RESUME

De nombreuses plantes au Cameroun, sont utilisées sous forme de décoctions issues d'un mélange de plantes ou de macéras pour soigner la fièvre typhoïde ou les maladies de la peau. Pourtant, dans ce pays où la médecine moderne et la médecine traditionnelle se côtoient, il n'est pas rare de constater de nombreux échecs thérapeutiques de la médecine moderne après un traitement par la médecine traditionnelle. De ce fait, le présent travail visait à élucider l'influence de l'exposition de *Salmonella enterica* sérotype Typhi (*S. Typhi*) et de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) aux extraits de plantes utilisés dans la pharmacopée traditionnelle sur leur capacité à acquérir une résistance aux antibactériens.

Sur la base des informations recueillies auprès des tradithérapeutes, les extraits ont été préparés à partir des mélanges de plantes médicinales sélectionnées, par décoction et par macération. Les tests de sensibilité de *S. Typhi* et de *S. aureus*, aux différents antibactériens, ont été réalisés. Les différentes bactéries ont été exposées aux extraits de plantes à concentration fixe (0,5mg/mL) contenus dans un bouillon nutritif renouvelé toutes les 24 heures pendant 14 jours. Par la suite, ces bactéries ont été cultivées dans un nouveau bouillon nutritif sans extrait de plante et renouvelé toutes les 24 heures pendant 14 jours supplémentaires. Un antibiogramme était réalisé toutes les 48 heures. La présence de cinq gènes cibles des antibiotiques utilisés (*blaTEM*, *blaSHV*, *sulI*, *floR* et *intI*) a été recherchée chez *S. Typhi* après son exposition aux extraits de plantes.

Les valeurs des diamètres d'inhibition et des CMI ont montré que les souches *S. Typhi* et *S. aureus* utilisées dans ce travail sont sensibles, aussi bien aux antibiotiques qu'aux extraits de plantes testés. Par ailleurs, les deux souches bactériennes soumises à une pression moléculaire des extraits de plantes ont acquis une résistance vis-à-vis des antibiotiques et des extraits de plantes. La détection des gènes cibles d'activité (*sulI*, *floR* et *intI*) chez *S. Typhi* après son exposition aux extraits de plantes (*Annickia chlorantha* (*Annonaceae*) et *Irvingia gabonensis* (*Irvingiaceae*)) a montré l'implication de certaines plantes dans l'expression de certains gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques.

Il ressort de cette étude que l'exposition des bactéries aux extraits de plantes induit leur résistance aux antibiotiques par divers mécanismes pouvant impliquer certains gènes spécifiques. Ainsi, la résistance antibactérienne n'est pas seulement le résultat d'une utilisation non contrôlée des antibiotiques, mais elle peut également être le résultat de la mauvaise utilisation des extraits de plantes.

Mots clés : Résistance bactérienne, Antibiotiques, Extraits de plantes médicinales, Induction.

ABSTRACT

Many plants are used in Cameroon in the form of decoctions from a mixture of plants or macerates in order to treat people with typhoid fever or skin diseases. Yet in this country where modern medicine and traditional medicine are used, it is not uncommon to see many therapeutic failures of modern medicine after treatment by traditional medicine. Therefore, the present work aimed to elucidate the influence of the exposure of *Salmonella enterica* serotype Typhi (*S. Typhi*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) to plant extracts used in the traditional pharmacopoeia on their ability to acquire resistance to antibacterial substances.

According to the informations obtained from traditional medicine healers, several medicinal plants from different parts were selected to compose mixtures which were used to produce the plant extracts by decoction and by maceration. The susceptibility tests of *S. Typhi* and *S. aureus* to the various antibacterials were carried out. The different bacteria were exposed to plant extracts at a fixed concentration (0.5 mg/mL) contained in a nutrient broth renewed every 24 hours for 14 days. Subsequently, these bacteria were cultivated in a new nutrient broth without plant extract and renewed every 24 hours for an additional 14 days. An antibiogram was performed every 48 hours. Five antibiotic target genes (*bla*TEM, *bla*SHV, *sul1*, *floR* and *int1*) were sought in *S. Typhi* after its exposure to plant extracts in order to detect their expression.

The values of the diameters of the inhibition and of the MICs showed that the strains of *S. Typhi* and of *S. aureus* used in this work are susceptible as well to the antibiotics as to the extracts of plants tested. In addition, the two bacterial strains (*S. Typhi* and *S. aureus*) subjected to molecular pressure from plant extracts have acquired resistance to the antibiotics and plant substances tested. The detection of activity target genes (*sul1*, *floR* and *int1*) in *S. Typhi* after its exposure to plant extracts (*Annickia chlorantha* and *Irvingia gabonensis*) has shown the involvement of plant extracts in the expression of certain genes in course of bacterial resistance to antibiotics.

This study shows that the exposure of bacteria to plant extracts induces their resistance to antibacterial substances by various mechanisms that may involve certain specific genes. Thus, antibacterial resistance, which is a major public health problem today, is not only the result of uncontrolled use of antibiotics, but it is also the result of the bad use of plant extracts.

Keywords : Bacterial resistance, Antibiotics, Medicinal plant extracts, Induction.

LISTE DES ABREVIATIONS

AMX	:	Amoxicilline
ATB	:	Antibiotiques
BET	:	Bromure d’Ethidium
C	:	Chloramphénicol
CA-SFM	:	Comité de l’Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CIP	:	Ciprofloxacine
CMB	:	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	:	Concentration Minimale Inhibitrice
CO	:	<i>Chromolaena odorata</i>
Dec.	:	Décoction
EC	:	<i>Annickia chlorantha</i>
ERY	:	Erythromycine
EUCAST	:	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GM	:	Gentamicine
HNC	:	Herbier National du Cameroun
IG	:	<i>Irvingia gabonensis</i>
LC	:	<i>Lantana camara</i>
Ligne M	:	Marqueur de poids moléculaire (100 pb)
MC	:	<i>Musanga cecropioides</i>
MLS	:	Macrolides-Lincosamides-Streptogramines
NCTC	:	<i>National Collection of Type Cultures</i>

OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
OXA	:	Oxacilline
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
<i>S. aureus</i>	:	<i>Staphylococcus aureus</i>
SRF/CAM	:	Société de Réserve Forestière du Cameroun
<i>S. Typhi</i>	:	<i>Salmonella enterica</i> sérotype Typhi
SXT/TSU	:	Cotrimoxazole
TBE	:	Tris Borate EDTA
Te	:	Témoin (souche repiquée dans un bouillon nutritif ne contenant pas d'extrait de plante)
TP	:	<i>Tridax procumbens</i>
VA	:	<i>Voacanga africana</i>
VNC	:	Vancomycine
Δ_P	:	Différence entre les diamètres d'inhibition des souches exposées 14jours de celles des souches initiales (n'ayant pas été en contact avec les extraits de plantes)
Δ_A	:	Différence entre les diamètres d'inhibition des souches issues de l'exposition (repiquées pendant 14jours dans un milieu sans extrait de plante) de celles des souches initiales

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Classification des principaux groupes, sous-groupes et molécules de la famille des β -lactamines (Megueya, 2018).....	13
Tableau II: Principaux mécanismes d'action des antibiotiques	17
Tableau III: Mécanismes de résistances non enzymatiques aux bêta-lactamines chez les germes à Gram négatif.....	24
Tableau IV: Liste des plantes médicinales utilisées contre les infections dues à <i>S. Typhi</i> and <i>S. aureus</i> au Cameroun.....	35
Tableau V: Plantes médicinales testées vis-à-vis de <i>S. Typhi</i>	43
Tableau VI: Plantes médicinales testées vis-à-vis de <i>S. aureus</i>	43
Tableau VII: Composition des décoctions testées vis-à-vis de <i>S. Typhi</i>	44
Tableau VIII: Mode d'action des antibiotiques testés vis-à-vis de <i>S. Typhi</i>	45
Tableau IX: Mode d'action des antibiotiques testés vis-à-vis de <i>S. aureus</i>	45
Tableau X: Séquences d'amorces utilisées pour la détection des gènes cibles des antibiotiques	54
Tableau XI: Mélanges réactionnels des PCR de détection génétique de la résistance aux antibiotiques	54
Tableau XII: Programmes d'amplification des ADN pour la détection génétique de la résistance aux antibiotiques	55
Tableau XIII : Diamètres moyens des auréoles d'inhibition des antibiotiques testés sur <i>S. Typhi</i> exposée ou non à <i>Annickia chlorantha</i>	65
Tableau XIV : Diamètres moyens des auréoles d'inhibition des antibiotiques testés sur <i>S. Typhi</i> exposée ou non à <i>Irvingia gabonensis</i>	65
Tableau XV : Diamètres moyens des auréoles d'inhibition des antibiotiques testés sur <i>S. aureus</i> exposée ou non à <i>Chromolaena odorata</i>	66
Tableau XVI : Diamètres moyens des auréoles d'inhibition des antibiotiques testés sur <i>S. aureus</i> exposée ou non à <i>Erigeron floribundus</i>	66
Tableau XVII : Sensibilité de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques pendant et après son exposition à <i>Chromolaena odorata</i>	67
Tableau XVIII: Sensibilité de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques pendant et après son exposition à <i>Erigeron floribundus</i>	68
Tableau XIX: Sensibilité de <i>S. Typhi</i> aux antibiotiques pendant et après son exposition à <i>Annickia chlorantha</i>	71

Tableau XX: Sensibilité de <i>S. Typhi</i> aux antibiotiques pendant et après son exposition à <i>Irvingia gabonensis</i>	71
Tableau XXI: Sensibilité de <i>S. Typhi</i> aux antibiotiques pendant et après son exposition à la décoction 2	72
Tableau XXII: Sensibilité de <i>S. Typhi</i> aux antibiotiques pendant et après son exposition à la décoction 4	72
Tableau XXIII: Diamètres moyens des auréoles d'inhibition de la ciprofloxacine testée sur <i>S. Typhi</i> exposée à trois concentrations fixes d'extrait de plante	77
Tableau XXIV: Diamètres moyens des auréoles d'inhibition de la gentamicine testée sur <i>S. Typhi</i> exposée à trois concentrations fixes d'extrait de plante	77
Tableau XXV: Diamètres moyens des auréoles d'inhibition de l'amoxicilline testé sur <i>S. Typhi</i> exposée à trois concentrations fixes d'extrait de plante	78
Tableau XXVI: Diamètres moyens des auréoles d'inhibition du chloramphénicol testé sur <i>S. Typhi</i> exposée à trois concentrations fixes d'extrait de plante	79
Tableau XXVII: Sensibilité de <i>S. Typhi</i> aux extraits de plantes pendant et après son exposition à <i>Annickia chlorantha</i>	80
Tableau XXVIII: Sensibilité de <i>S. Typhi</i> aux extraits de plantes pendant et après son exposition à <i>Irvingia gabonensis</i>	80
Tableau XXIX: Sensibilité de <i>S. Typhi</i> aux extraits de plantes pendant et après son exposition à un mélange d'antimicrobiens	81
Tableau XXX : CMI des extraits de plantes testés sur <i>S. Typhi</i> après induction de la résistance (mg/mL)	84
Tableau XXXI : Phénotype de résistance de <i>S. Typhi</i> à l'amoxicilline après son exposition à différents antibactériens	86
Tableau XXXII : Phénotype de résistance de <i>S. Typhi</i> au cotrimoxazole après son exposition à différents antibactériens	88
Tableau XXXIII : Phénotype de résistance de <i>S. Typhi</i> au chloramphénicol après son exposition à différents antibactériens.....	89
Tableau XXXIV : Phénotype de résistance de <i>S. Typhi</i> aux antibiotiques après son exposition à différents antibactériens.....	90
Tableau XXXV : Sensibilité de <i>S. Typhi</i> aux extraits de plantes après son exposition à <i>Annickia chlorantha</i>	U
Tableau XXXVI : Sensibilité de <i>S. Typhi</i> aux extraits de plantes après son exposition à <i>Irvingia gabonensis</i>	U

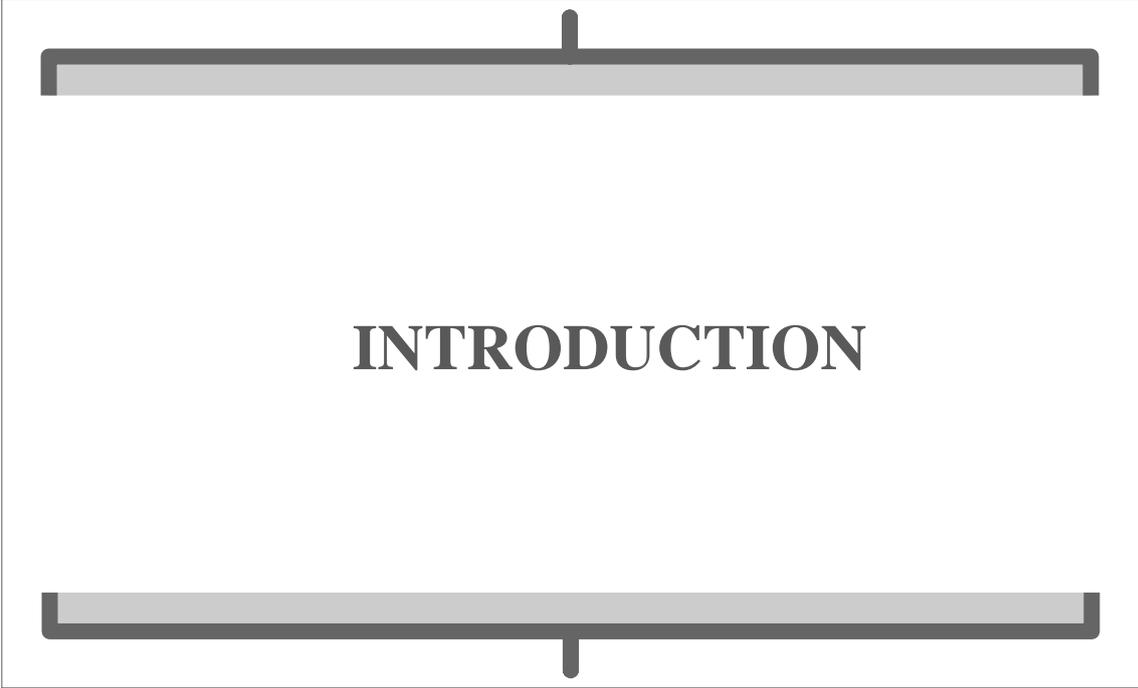
LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les cibles bactériennes des antibiotiques	12
Figure 2: Cycle beta-lactame.....	13
Figure 3: Structure de l'Amoxicilline (Amx) et de l'Oxacilline (Ossa)	14
Figure 4: Structure de la Gentamicine.....	15
Figure 5: Structure du Chloramphénicol.....	15
Figure 6: Structure de la Ciprofloxacine	16
Figure 7: Structure du Cotrimoxazole (Sulfaméthoxazole-triméthoprime)	16
Figure 8: Structure de la Vancomycine.....	17
Figure 9: Mécanismes de résistance aux antibiotiques	22
Figure 10: Diamètres des auréoles d'inhibition	48
Figure 11: Diamètres moyens des auréoles d'inhibition de la croissance bactérienne de <i>S. Typhi</i> en présence d'antibiotiques	59
Figure 12: Diamètres moyens des auréoles d'inhibition de la croissance bactérienne de <i>S. aureus</i> en présence d'antibiotiques	59
Figure 13: Diamètres moyens des auréoles d'inhibition de la croissance bactérienne de <i>S. Typhi</i> en présence des extraits de plantes	60
Figure 14: Diamètres moyens des auréoles d'inhibition de la croissance bactérienne de <i>S. aureus</i> en présence des extraits de plantes	60
Figure 15: CMI des antibiotiques ($\mu\text{g}/\text{mL}$) testés sur <i>S. Typhi</i>	61
Figure 16 : CMI des antibiotiques ($\mu\text{g}/\text{mL}$) testés sur <i>S. aureus</i>	62
Figure 17: CMI des extraits de plantes (mg/mL) testés sur <i>S. Typhi</i>	63
Figure 18: CMI des décoctions (mg/mL) testées sur <i>S. Typhi</i>	63
Figure 19: CMI des extraits de plantes (mg/mL) testés sur <i>S. aureus</i>	63
Figure 20: Résistance de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques induite par <i>Chromolaena odorata</i>	69
Figure 21: Résistance de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques induite par <i>Erigeron floribundus</i>	69
Figure 22: Résistance de <i>S. Typhi</i> aux antibiotiques induite par <i>Annickia chlorantha</i>	73
Figure 23: Résistance de <i>S. Typhi</i> aux antibiotiques induite par <i>Irvingia gabonensis</i>	74
Figure 24: Résistance de <i>S. Typhi</i> aux antibiotiques induite par la décoction 2.....	75
Figure 25 : Résistance de <i>S. Typhi</i> aux antibiotiques induite par la décoction 4.....	75
Figure 26: Résistance de <i>S. Typhi</i> aux extraits de plantes induite par <i>Annickia chlorantha</i> ...	82
Figure 27: Résistance de <i>S. Typhi</i> aux extraits de plantes induite par <i>Irvingia gabonensis</i>	82
Figure 28: Résistance de <i>S. Typhi</i> aux extraits de plantes induite par un mélange d'antibactériens	83

Figure 29: Profil de migration par électrophorèse du génome de <i>S. Typhi</i> exposée aux extraits de plantes.....	85
Figure 30: Profil de migration par électrophorèse des produits d'amplification du gène <i>blaTEM</i> de <i>S. Typhi</i>	87
Figure 31: Profil de migration par électrophorèse des produits d'amplification du gène <i>blaSHV</i> de <i>S. Typhi</i>	87
Figure 32: Profil de migration par électrophorèse des produits d'amplification du gène <i>sulI</i> de <i>S. Typhi</i>	89
Figure 33: Profil de migration par électrophorèse des produits d'amplification du gène <i>floR</i> de <i>S. Typhi</i>	90
Figure 34: Profil de migration par électrophorèse des produits d'amplification du gène <i>int1</i> de <i>S. Typhi</i>	91

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Composition des différents Milieux de culture	Q
Annexe 2 : Composition des différentes décoctions de plantes	R
Annexe 3 : Protocole d'extraction et de purification de l'ADN	S
Annexe 4 : Composition des réactifs utilisés pour l'extraction et la purification de l'ADN	T
Annexe 5 : Diamètres moyens des auréoles d'inhibition des extraits de plantes durant la phase d'exposition et la phase de non exposition des souches bactériennes.....	U



INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les infections bactériennes constituent un important problème de santé mondiale. Car, les maladies les plus ravageuses de l'humanité ont été causées par des bactéries. En effet, on a observé que ces maladies sont responsables de 17 millions de décès par an dans le monde (**Meyer, 2004**). Selon les estimations de l'OMS, la fièvre typhoïde touche entre 11 et 21 millions de personnes et entraîne 128 000 à 161 000 décès dans le monde entier (**OMS, 2020**). Une étude menée par **Gake et al. en 2015** dans le district sanitaire de Meri à l'extrême-nord du Cameroun a recensé 171 cas de fièvre typhoïde avec un taux de létalité de 2,23%. Par ailleurs, les infections nosocomiales et communautaires, ainsi que les intoxications alimentaires causées par *S. aureus* constituent une préoccupation dans la pratique des soins en général (**Kakupa et al., 2016a; Titouche, 2017**).

Le traitement de ces infections bactériennes est basé sur l'utilisation des antibiotiques, qui est le moyen de lutte le plus efficace et le plus utilisé en médecine moderne (**Meyer, 2004**). Depuis leur découverte au début du XX^{ème} siècle, ils ont permis de grandes avancées en thérapeutique et contribués à l'essor de la médecine moderne. L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes d'antibiotiques ont considérablement réduit la mortalité imputable des maladies autrefois incurables (**Prescott et al., 2000**). L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Malheureusement, l'émergence des bactéries résistantes aux antibiotiques a mis un terme à cette vague d'optimisme.

La résistance bactérienne aux antibiotiques est devenue un phénomène qui pose un problème global de santé publique, car elle cause 33 000 décès par an en Europe, une surmortalité équivalente est observée aux Etats Unis (**Institut Pasteur, 2021**). Au rythme où celle-ci avance, l'OMS prévoit, d'ici 2050, un retour aux années 1940 où les infections bactériennes étaient la première cause de mortalité, car elle devrait causer « 10 millions de morts par an » en 2050, soit plus que le cancer, les morts surviendraient principalement en Asie (4,7 Million) et en Afrique (4,1 Million) (**O'Neill, 2016**).

D'après les travaux de certains auteurs, la mauvaise utilisation des antibiotiques dans les pratiques cliniques, vétérinaires et agricoles serait à la base de ce problème (**Weiss, 2002 ; Martinez, 2009**). En effet, la consommation mondiale d'antibiotiques a augmenté de 65 % entre les années 2000 et 2015 (**Eili et al., 2018**). Et une corrélation entre la consommation d'antibiotiques, l'émergence et la diffusion de la résistance bactérienne est bien documentée à cet effet (**Barbosa et Levy, 2000 ; Goossens et al., 2005**). Cette consommation anarchique des

antibiotiques pourrait toutefois ne pas être la principale cause de cette antibiorésistance, puisque la résistance de différentes souches bactériennes aux antibiotiques a également été observée dans des zones peu exposées aux antibiotiques (**Pallecchi et al., 2008 ; Bartoloni et al., 2009 ; Clemente et al., 2015**). Ce qui prouve l'existence d'autres agents inducteurs de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Ces agents pourraient être d'origine végétale, la médecine traditionnelle est utilisée depuis des siècles pour améliorer le bien-être des populations africaines et elle continue de jouer un rôle essentiel dans les soins de santé (**OMS, 2020**). Et plusieurs études ont montré que les molécules antimicrobiennes isolées des plantes médicinales sont capables de se fixer sur les récepteurs des antibiotiques au niveau de la bactérie. Ainsi, grâce à ces molécules, les extraits de plante auraient une activité inhibitrice semblable à celle des antibiotiques (**Iroba et al., 2010; Musa et al., 2010; Darwang et Datup, 2012**) et par conséquent seraient capables d'induire une résistance antibactérienne.

Au Cameroun, l'art de guérir par les plantes médicinales est connu et pratiqué depuis longtemps par les herboristes et les tradithérapeutes. Les connaissances relatives à la médecine traditionnelle sont donc un patrimoine important pour les populations de ce pays (**Muthu et al., 2006**). Parmi les plantes médicinales utilisées au Cameroun pour soigner les infections bactériennes comme la fièvre typhoïde causée par *S. Typhi* et pour lutter contre les maladies de la peau ou les infections gastro-intestinales causées par *S. aureus*, on peut citer : *Annickia chlorantha*, *Irvingia gabonensis*, *Chromolaena odorata* et *Erigeron floribundus*. Les activités antibactériennes de ces plantes ont déjà été démontrées (**Ngene et al., 2015 ; Tene et al., 2016 ; Etame et al., 2019**). Ainsi, le Cameroun étant un pays où les populations font régulièrement recours à l'utilisation combinée ou en alternance des antibiotiques et des extraits de plantes, il n'est pas rare de constater de nombreux échecs thérapeutiques de la médecine moderne après un traitement par la médecine traditionnelle. L'on se pose donc la question de savoir si les plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle induisent une antibiorésistance tout comme les antibiotiques ?

Hypothèse de travail :

Les extraits de plantes médicinales induisent une résistance des souches bactériennes aux antibiotiques.

Objectif général :

Ce travail visait, d'une manière générale, à élucider l'impact de l'exposition des bactéries (*S. Typhi* et *S. aureus*) aux extraits de plantes utilisés dans la pharmacopée traditionnelle sur leur capacité à acquérir une résistance aux antibiotiques.

Objectifs spécifiques :

D'une manière plus spécifique, il a été question de :

- ✓ Déterminer la concentration d'extrait de plante à utiliser pour l'exposition de *S. Typhi* et *S. aureus* ;
- ✓ Mettre en évidence l'induction de la résistance de *S. Typhi* et *S. aureus* aux antibiotiques par leur exposition aux extraits de plantes ;
- ✓ Déterminer les mécanismes d'acquisition de la résistance aux antibiotiques en présence d'extraits de plantes.



**CHAPITRE I : REVUE DE LA
LITTERATURE**



I.1. CARACTERES GENERAUX DES BACTERIES PATHOGENES

I.1.1. Définition et mode d'infection

Un pathogène est une espèce microbienne où la virulence détermine la tendance nuisible de la souche pathogène. Les bactéries pathogènes possèdent des propriétés génétiques distinctes qui leur apportent de manière significative une capacité plus grande pour entrer en compétition avec d'autres bactéries, afin de préserver leur avantage à l'intérieur d'un hôte spécifique. La pathogénicité microbienne (ou virulence) a été définie comme les mécanismes biochimiques avec lesquels les micro-organismes causent la maladie avec une probabilité variable selon les souches (**Finley et Falkow, 1989**). La virulence n'est pas une unique propriété biologique mais un processus multifactoriel (**Smith, 1992**) dont les bases moléculaires sont les déterminants de la pathogénicité.

L'infection implique en fait un groupe de phénomènes :

- Le mouvement des pathogènes vers l'hôte ;
- L'attachement du pathogène sur la surface de l'hôte ;
- La prolifération du pathogène à l'intérieur de l'hôte immédiatement après son entrée.

Le fardeau des maladies infectieuses et la résistance aux antimicrobiens constituent une menace majeure pour la santé publique dans le monde (**Balaji et al., 2019**). La résistance aux antibiotiques existe dans tous les pays du monde mais elle est particulièrement importante dans les pays où les niveaux d'hygiène sont faibles (**INSERM, 2013**). Les agents pathogènes prioritairement impliqués dans ce phénomène de résistance comprennent : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella spp.* et *Shigella spp.* (**Balaji et al., 2019**).

I.1.2. Exemples de bactéries pathogènes

I.1.2.1. Le genre Salmonella

Les salmonelles furent nommées ainsi en l'honneur du bactériologiste américain Daniel Salmon, qui isola en 1885 avec quelques collègues une bactérie provenant du porc (maintenant connue sous le nom de *Salmonella Choleraesuis*) considérée comme étant la cause de la fièvre porcine (choléra du porc) (**Encarta, 2009**). La diversité antigénique des souches de salmonelle fut mise en évidence par Widal en 1896.

❖ Taxonomie

Le genre *Salmonella* est classé dans le domaine des "*Bacteria*" ou des "*Eubacteria*", le phylum des "*Proteobacteria*", la classe des *Gammaproteobacteria*, l'ordre des *Enterobacteriales* et la famille des *Enterobacteriaceae*. Il se divise depuis 2004 en trois espèces : *Salmonella enterica* espèce majoritaire, *Salmonella bongori* et *Salmonella subterranea*, espèces rares (Aubry, 2012). L'espèce *Salmonella enterica* est elle-même subdivisée en six sous-espèces dont la plus prédominante est *Salmonella enterica*, elle-même subdivisée en plusieurs serovars : *dublin*, *enteritidis*, *infantis*, *paratyphi*, *typhi*, *typhimurium*, *virchow*, etc.... Ces serovars sont subdivisés sur la base du sérotypage (détermination de l'antigène somatique O et du ou des antigènes flagellaires H). A ce jour, il existe plus de 2500 sérotypes de *Salmonella* (Aubry, 2012).

❖ Description générale

Les salmonelles sont des bacilles à coloration de Gram négative. En microscopie optique, elles apparaissent comme des bâtonnets de 0,3 µm à 1µm de large et longs de 1 à 6 µm, mobiles grâce à une ciliature péritriche (à l'exception du serovar *Gallinarum-Pullorum*) (Molbak *et al.*, 2006). Les salmonelles sont des bacilles incapables de sporuler, thermosensibles, aérobies facultatifs. Ce sont des bactéries mésophiles se développant à des températures comprises entre 5,2°C et 47°C et de manière optimale entre 35 et 37°C, à des pH compris entre 4,5 et 9 (Anses, 2011).

Salmonella est naturellement présente dans l'intestin des animaux, en particulier chez les volailles et les porcs. Certaines de ces souches peuvent également être isolées d'autres sources, telles que les animaux à sang froid (reptiles, tortues) et les animaux aquatiques (mollusques, poissons). Le réservoir animal constitue la principale source de danger. Les salmonelles présentes dans les matières fécales des animaux peuvent contaminer les pâturages, les sols, l'eau et y survivre pendant plusieurs mois voire plusieurs années. Les personnes qui consomment des aliments contaminés par *Salmonella* sont susceptibles de contracter des salmonelloses.

❖ Pathologies associées : Les salmonelloses

La salmonellose est une maladie infectieuse causée par les bactéries du genre *Salmonella*. Elle touche les êtres humains et les animaux. On distingue les salmonelloses non-typhiques et les salmonelloses typhiques (Aubry, 2012). Les salmonelloses non-typhiques attaquent tous les vertébrés. La contamination humaine par les salmonelles non-typhiques s'effectue essentiellement par la consommation des aliments contaminés (œufs et préparations à base

d'œufs, volailles, charcuteries, fromages au lait cru...) consommés crus ou insuffisamment cuits. Chez l'homme, les salmonelloses non-typhiques se manifestent sous forme de cas dispersés, de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ou d'épidémies communautaires (**Weill, 2008b**). Certaines salmonelles sont strictement adaptées à l'homme (salmonelles de sérotype Typhi, Paratyphi C et certaines populations de Paratyphi B) et sont responsables de salmonelloses typhiques : les fièvres typhoïde et paratyphoïde (**Aubry, 2012**).

❖ La fièvre typhoïde

La fièvre typhoïde est une infection systémique aiguë provoquée par *S. Typhi* ou bacille d'Eberth. Elle est potentiellement mortelle en l'absence de traitement. Le taux de mortalité est de 10% en l'absence de traitement antibiotique efficace contre moins de 1% pour les autres formes de salmonelloses (**Institut Pasteur, 2012**). L'OMS estime que chaque année, il y a 11 à 20 millions de cas qui entraînent 128000 à 161000 décès dans le monde entier (**OMS, 2020**). L'incidence annuelle dans les pays en voie de développement est de 274 cas/100.000 personnes en Asie, et de 50 cas/100.000 personnes en Afrique subsaharienne et en Amérique Latine contre 0,2 cas/100.000 habitants en France (**Kuete et al., 2010**).

Après une période d'incubation, d'une à deux semaines suite à la contamination, surviennent le passage dans le sang et les symptômes cliniques. Ces symptômes comprennent des céphalées, une fièvre continue plus ou moins associée à des signes digestifs : diarrhées, vomissements, constipation, pertes d'appétit et douleurs abdominales. La fréquence des différents signes est très variable selon la période de la maladie et le seul symptôme constant au début de la maladie est la fièvre. Des taches rosées apparaissent, mais sont rarement vues sur une peau noire (**Molbak et al., 2006**).

Dans les formes bénignes de fièvre typhoïde, l'état reste stationnaire pendant une quinzaine de jours puis la convalescence dure plusieurs semaines. Dans les formes plus graves où des complications peuvent survenir au niveau de l'intestin, du cœur ou du système nerveux, la fièvre typhoïde peut être fatale en l'absence de traitement. Une particularité épidémiologique de cette infection est qu'il existe des porteurs sains de cette bactérie. En effet après la guérison d'une fièvre typhoïde chronique, 2 à 5% des individus continuent à héberger des souches de *Salmonella Typhi* (essentiellement au niveau de la vésicule biliaire) qui sont excrétées épisodiquement dans les selles, et qui peuvent être à l'origine de cas secondaires (**Institut Pasteur, 2012**). Les symptômes de la fièvre typhoïde sont souvent non spécifiques, posant ainsi un diagnostic différentiel avec le paludisme, la grippe et d'autres maladies fébriles.

❖ Le traitement de la fièvre typhoïde

Le traitement spécifique de la fièvre typhoïde fait appel à l'antibiothérapie classique notamment dans les pays en voie de développement, car il est de moindre coût. La durée de ces traitements est d'environ 2 semaines (Aubry, 2012). Chloramphénicol, ampicilline, cotrimoxazole étaient les antibiotiques de première intention. Le développement de la pharmacorésistance a entraîné la généralisation de l'usage des fluoroquinolones, y compris en pédiatrie. Actuellement, on note une moindre sensibilité aux fluoroquinolones. Les antibiotiques supposés être actifs sont :

- ✓ Les phénicolés (chloramphénicol et thiamphénicol) : 50 mg/kg/j par voie orale pendant 14 à 21 jours ; risque : myélotoxicité (1/10.000); rechutes dans 10 à 20%; intérêt : prix peu élevé.
- ✓ Les β -lactamines : amino-pénicillines (ampicilline et amoxicilline) : 60 à 100 mg/kg/j par voie orale pendant 14 à 21 jours ; céphalosporines de 3ème génération (ceftriaxone) : dose : 60 mg/kg/j pendant 7 jours. Risque d'échec clinique et de rechutes, la pénétration intracellulaire des β -lactamines étant faible.
- ✓ Le cotrimoxazole : 50 mg/kg/j de SXT et 10 mg/kg/j de triméthoprimine pendant 14 à 21 jours.
- ✓ Les fluoroquinolones : ciprofloxacine 500 mg, 2 fois par jour, ofloxacine 400 à 800 mg/j pendant 5 jours.
- ✓ L'azithromycine : 1 g per os le premier jour, puis 500 mg X 6 jours (dose adulte), si souches résistantes aux fluoroquinolones.

En pratique, les fluoroquinolones sont actuellement prescrites en zones tropicales comme en zones tempérées. En cas de portage chronique jouant un rôle majeur dans la transmission : fluoroquinolones (ciprofloxacine, 1g/j pendant 4 semaines chez l'adulte) et cholécystectomie chez les sujets porteurs de lithiase biliaire en cas d'échec de l'antibiothérapie.

I.1.2.2. Le genre *Staphylococcus*

Les premières descriptions des staphylocoques (bactéries en forme de coques) isolés à partir de pus d'abcès datent de 1871; mais ce n'est que quelques années plus tard que ces travaux permettront de proposer un nom à la bactérie rencontrée. Ainsi en 1878, Robert Koch en Allemagne et Louis Pasteur en 1880 en France décrivent des grappes de coques dans du pus d'origine humaine (Karthik, 2007).

❖ Taxonomie

Selon la 9^{ème} édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, les staphylocoques sont classés parmi les bactéries à Gram positif pauvres en base GC, dans le phylum des firmicutes.

Classification (**Prescott et al., 2010**) :

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : *Staphylococcaceae*

Genre : *Staphylococcus*

Espèce : *Staphylococcus aureus*

❖ Description générale

Les staphylocoques sont des bactéries commensales de la peau, des muqueuses de l'homme et des animaux (**Quinn et al., 2011**). Chez l'homme, les staphylocoques en particulier les espèces *Staphylococcus aureus* font partie de la flore résidente cutanée de nombreux individus qui sont des « porteurs Asymptomatiques ». Elles jouent un rôle important dans l'équilibre physico-chimique de la peau et constituent une barrière de colonisation, empêchant l'implantation de bactéries de la flore transitoire (**Wylie et al., 2005**). Cependant, l'habitat préférentiel de *Staphylococcus aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale. Les souches de *S. aureus* sont présentes également sur les membranes muqueuses du tractus respiratoire ainsi que le tractus urogénital et comme flore transitoire dans le tractus digestif (**Quinn et al., 2011**). Ces bactéries survivent et prolifèrent du fait de leur particulière résistance aux conditions environnementales hostiles (**Breche et al., 1988**). Elles sont largement disséminées dans l'environnement, retrouvées dans le sol et la poussière (l'air, l'eau et dans certains produits alimentaires tels que les laitages et les conserves salées) (**Shimeld et Rodgers, 1999**).

A l'examen microscopique, les *S. aureus* se présentent sous l'aspect de cocci sphériques de 1µm de diamètre, à coloration de Gram positive, immobiles, non sporulés. Sur les cultures en milieu solide, ils se disposent en amas irréguliers polyédriques, évoquant l'aspect caractéristique de "grappes de raisin" (**Ananthanarayan et Paniker, 2006**). Alors qu'en milieu liquide, ils sont souvent isolés, en diplocoques, en tétrades ou en très courtes chaînettes (en générale de 3 à 5 éléments) (**Le loir et al., 2003**). La pathogénie de *S. aureus* est un phénomène complexe, faisant intervenir une multitude de facteurs de virulence. C'est l'action combinée de l'ensemble de ces facteurs qui explique le fort pouvoir pathogène de cette bactérie et la multitude de maladies humaines qu'elle provoque (**Hiron, 2007**).

❖ Pathologies associées, épidémiologie, et traitement

S. aureus peut être responsable de deux types de syndromes : les infections suppuratives et les toxi-infections ou toxémies staphylococciques. Les infections suppuratives sont caractérisées par plusieurs phases : la prolifération bactérienne, l'invasion, la destruction des tissus de l'hôte et la réponse inflammatoire. Les infections à *S. aureus* les plus fréquentes sont les infections cutanéomuqueuses telles que les folliculites, impétigo, furoncles, anthrax, panaris, cellulites ou les sinusites et les otites. Il s'agit le plus souvent d'auto-infections (**Lowy, 1998**). Les infections toxiques staphylococciques regroupent le choc toxique staphylococcique, la maladie exfoliante généralisée, les toxi-infections alimentaires, la pneumonie nécrosante (**Dinges et al., 2000**). Le syndrome de choc toxique staphylococcique est provoqué par la diffusion dans l'organisme de la toxine (TSST-1) ou de certaines entérotoxines (B, C, etc.) (**McCormick et al., 2001**).

La prévalence des infections staphylococciques nosocomiales et communautaires augmente régulièrement (**Amazian et al., 2010**). Entre 2006 et 2008, 3 127 foyers de toxi-infections alimentaires collectives (Tiac) ont été déclarés aux autorités sanitaires en France. Elles concernaient 33404 malades dont 2302 ont été hospitalisés et 15 sont décédés. De même en 2013, 1346 foyers ont été déclarés, affectant 10602 personnes, dont 643 (6%) ont été hospitalisées et 2 décédées (**Durand, 2013**). Au Cameroun, les études menées en 2013 par **Njall et al.** à l'hôpital Laquintinie de Douala ont montré que *S. aureus* est responsable de 15,4% des cas d'infection nosocomiale. Les travaux menés par **Gonsu et al.** en 2013 au Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé ont montré que 63% des cocci à Gram positif (représentés majoritairement par *S. aureus* et les staphylocoques à coagulase négative) sont responsables de la majeure partie d'affection oculaire. Le traitement des infections staphylococciques fait appel à l'utilisation des antibiotiques.

I.2. CHIMIOTHERAPIE ET UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES DANS LA LUTTE CONTRE LES BACTERIES PATHOGENES

I.2.1. Définition, classification et mécanisme d'action des antibiotiques

Définition

En 1941 Waksman, qui a découvert la streptomycine, a proposé le mot antibiotique pour désigner toute substance produite par un micro-organisme et qui a le pouvoir d'inhiber la croissance d'autres micro-organismes et même de les détruire (**Courvalin et al., 2001**). Aujourd'hui, cette notion s'étend aux substances semi-synthétiques ou même synthétiques ayant

la même fonction. Qu'il soit naturel ou semi-synthétique, avant son exploitation en médecine thérapeutique, l'antibiotique doit répondre aux critères de la définition de Paul Ehrlich sur la chimiothérapie. Pour ce dernier, « une substance chimiothérapeutique utilisable par voie générale dans le traitement des maladies infectieuses doit être nuisible pour le microorganisme pathogène mais inoffensive pour les cellules de l'organisme de l'hôte ». De ce fait, jusqu'aujourd'hui, sur les 10 000 antibiotiques découverts, seulement 150 sont utilisés en médecine thérapeutique (Walsh, 2003). Environ 80% de ces antibiotiques naturels sont produits par des bactéries et 20% par des moisissures.

Classification

Les différents antibiotiques exploités en médecine thérapeutique peuvent être classés par famille chimique et par leurs modes d'action. Pour qu'un antibiotique soit efficace, il faudrait qu'il atteigne sa cible dans la bactérie. A la différence des antiseptiques, les antibiotiques agissent sur les bactéries en s'attaquant directement à leurs structures essentielles (paroi cellulaire, membrane plasmique, ribosomes et acides nucléiques) (Figure1) et/ou en perturbant leurs métabolismes, et par conséquent leurs fonctions (Naïrouz, 2005).

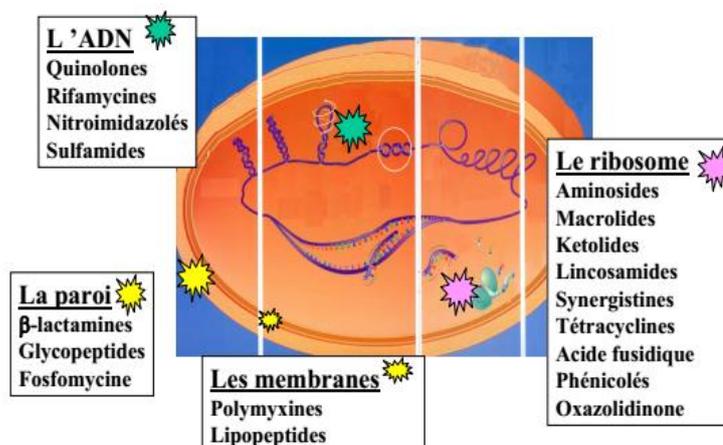


Figure 1: Les cibles bactériennes des antibiotiques (Naïrouz, 2005)

Mécanisme d'action des antibiotiques

❖ Mécanisme d'action des bêta-lactamines

Les β -lactamines représentent la famille la plus importante, la plus diversifiée et la moins toxique d'antibiotiques ; leur structure de base, le noyau β -lactame, est essentiel à leur activité antibactérienne. Elles agissent en bloquant la synthèse du peptidoglycane, constituant commun de la paroi des bactéries Gram négatif en inhibant les enzymes essentielles à la synthèse : les transpeptidases et les carboxypeptidases, appelées protéines de liaison à la pénicilline (PLP).

La fixation de l'antibiotique empêche celle du substrat naturel (Acyl-D-Alanyl-D-Alanine) qui présente une analogie structurale avec le cycle beta-lactame. Ainsi, lorsque les β -lactamines sont mises en contact avec les bactéries, elles se fixent aux PLP et se comportent comme les substrats de ces dernières. Les réactions de transpeptidation et de transglycosylation qui entraînent la maturation du peptidoglycane sont alors inhibées et la croissance bactérienne est arrêtée (Jehl *et al.*, 2003). Elles agissent par conséquent sur des bactéries dont le peptidoglycane est en cours de formation. L'inhibition de la synthèse de la paroi entraîne un arrêt de la croissance bactérienne et l'effet bactéricide des β -lactamines est lié à l'activation d'autolysines du fait de l'accumulation de précurseurs de peptidoglycane. Le Tableau I présente les principaux groupes, sous-groupes et molécules de la famille des β -lactamines.

Ce sont des antibiotiques possédant tous un cycle bêta-lactame (responsable de l'activité anti-bactérienne) dans leur structure chimique.

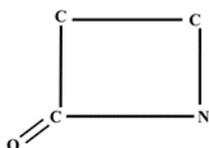


Figure 2: Cycle beta-lactame

Tableau I: Classification des principaux groupes, sous-groupes et molécules de la famille des β -lactamines (Megueya, 2018)

Groupes	Sous-groupes	Principales molécules
Pénicillines	Pénicillines G et V	Benzyl pénicillines et phénoxy méthyle pénicilline
	Pénicillines M	Cloxacilline, oxacilline
	Aminopénicillines	Ampicilline, amoxicilline
	Urédopénicillines	Pipéracilline, mezlocilline
Céphalosporines	Carboxypénicillines	Ticarcilline
	Première génération (C1G)	Céfalexine, céfalotine, céfalonium
	Deuxième génération (C2G)	Céfoxitine, céfamandole, céfuroxime
	Troisième génération (C3G)	Céfotaxime, céfopérazone, ceftazidime, ceftiofur, cefpodoxime
Carbapénèmes	Quatrième génération (C4G)	Céfépime, cefpirome
	Céphamycines	Céfoxitine, céfotétan
Monobactames		Imipénème, ertapénème, méropénème
Inhibiteurs de β -lactamases		Aztréonam
		Amoxicilline + acide clavulanique, Ampicilline + sulbactam, Pipéracilline + tazobactam

✓ Les pénicillines

Elles sont constituées d'un cycle bêta-lactame accolé à un cycle thiazolidine. Les pénicillines les plus fréquemment utilisées sont :

- Les aminopénicillines dont le spectre d'activité comprend les entérobactéries, ne sécrétant pas de bêta-lactamases (*E. coli*, *Proteus indole*) et les *Streptocoques*. Exemples : l'amoxicilline, l'oxacilline

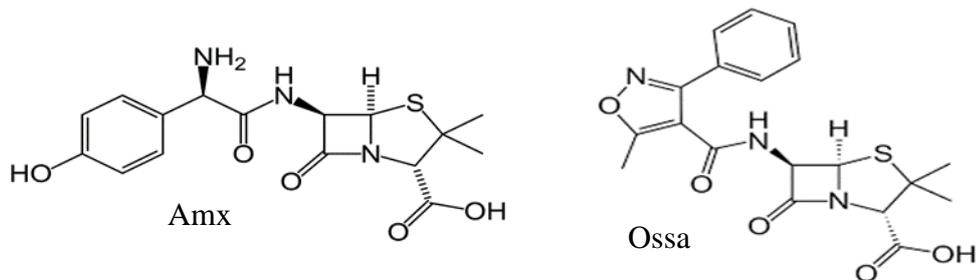


Figure 3: Structure de l'Amoxicilline (Amx) et de l'Oxacilline (Ossa)

- Les carboxypénicillines dont le spectre d'activité s'étend des *Pseudomonas*, *Proteus* aux ampicillino-résistants. Exemple : Carbénicilline
- Les ureidopénicillines dont le spectre d'activité regroupe la plupart de souche d'entérobactéries, les *Pseudomonas* et les *Streptocoques*. Exemple : Pipéracilline

✓ Les céphalosporines (CSP)

Elles sont constituées d'un cycle bêta-lactame accolé à un cycle dihydrothiazolidine. Elles sont subdivisées en quatre groupes :

- Les CSP de première génération dont le spectre d'activité regroupe les Staphylocoques, les Streptocoques et les Entérobactéries (sensibilité variable selon les souches). Exemple : Céfaloquine
- Les CSP de deuxième génération dont le spectre d'activité regroupe les Streptocoques, Staphylocoques et certaines entérobactéries. Exemple : Cefoxitine
- Les CSP de troisième génération dont le spectre d'activité est élargi et qui sont actifs sur la majorité des germes d'importance médicale. Exemple : ceftriaxone
- les CSP de quatrième génération dont le spectre d'activité est également élargi.

❖ Mécanisme d'action des aminosides

Les antibiotiques agissent en perturbant l'intégralité de la membrane externe et de la membrane plasmique des bactéries en se fixant sur l'ARN ribosomal sur la sous-unité 30S avec

une forte affinité : ce qui entraîne des erreurs de lecture des ARN messagers donnant des protéines anormales qui s'incorporent à la membrane et l'altèrent (**Houvenaeghel, 1992**).

Ce sont des antibiotiques bactéricides à large spectre, possédant une structure aminoglycosidique (**Thévenot, 2003**). On distingue :

- ✓ les aminosides de première génération. Exemple : Kanamycine
- ✓ les aminosides de deuxième génération. Exemple : Gentamicine

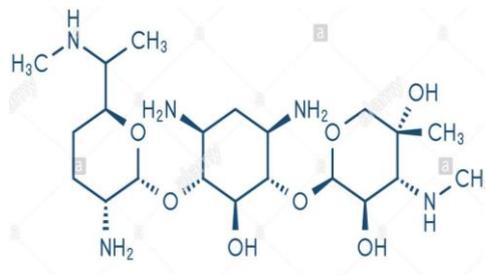


Figure 4: Structure de la gentamicine

- ✓ les aminosides de troisième génération. Exemple : Nétilmycine

❖ Mécanisme d'action des phénicolés

Ils agissent en inhibant la synthèse protéique en se fixant au niveau de la sous unité 50S des ribosomes et empêchent la transpeptidation de l'ARN de transfert (**Thévenot, 2003**).

Ce sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre qui couvrent une grande variété de germe à Gram positif et à Gram négatif. Nous distinguons dans ce groupe le Chloramphénicol et le Thiamphénicol.

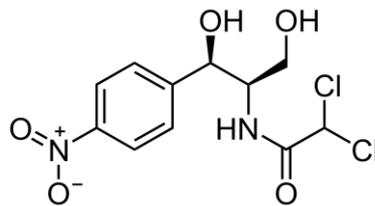


Figure 5: Structure du chloramphénicol

❖ Mécanisme d'action des quinolones

Les quinolones inhibent l'ADN gyrase qui change la topologie de l'ADN. Elles se fixent sur la sous-unité A de la gyrase et entraînent une fragmentation de l'ADN, responsable de la mort de la bactérie. Ce sont des antibiotiques bactéricides à large spectre, possédant une structure de base comportant un cycle accolé à un hétérocycle pipérazine en position 7 et un atome de fluor en position 6 (**Andriole, 2000 ; Hooper et Rubinstein, 2003**). On distingue :

- ✓ les quinolones anciennes. Exemple : Acide nalidixique
- ✓ les quinolones de deuxième génération ou fluoroquinolones. Exemple : Ciprofloxacine

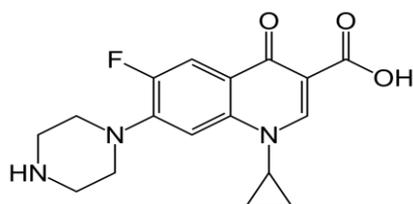


Figure 6: Structure du ciprofloxacine

Leur spectre d'activité concerne les entérobactéries, les staphylocoques et *Pseudomonas* (inconstant).

❖ Mécanisme d'action du cotrimoxazole

Le cotrimoxazole inhibe la synthèse des acides nucléiques en agissant sur les deux enzymes principales de la voie de synthèse des bases puriques : le sulfaméthoxazole inhibe le dihydrofolate synthétase (DHS) et le triméthoprim, la dihydrofolate réductase (DHR). L'association sulfaméthoxazole-triméthoprim possédant un très large spectre permettant d'exercer un effet bactéricide.

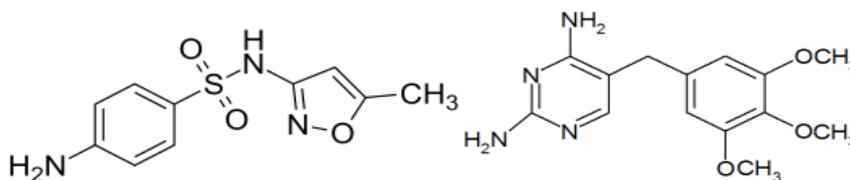


Figure 7: Structure du cotrimoxazole (sulfaméthoxazole-triméthoprim)

❖ Mécanisme d'action des glycopeptides

Les glycopeptides sont au même titre que les β -lactames des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne (**Bégué et Astruc, 1999 ; Perronne, 1999**). Leur action est toutefois différente. L'inhibition est due à l'affinité de ces antibiotiques pour l'extrémité (D-alanyl-D-alanine) des précurseurs du peptidoglycane. Ceux-ci, après avoir été synthétisés dans le cytoplasme bactérien, sont transportés à travers la membrane cytoplasmique pour finalement être branchés par des enzymes membranaires bactériennes (transglycosylases et transpeptidases) au peptidoglycane en cours d'élongation. La fixation du glycopeptide sur l'extrémité du précurseur empêche, par encombrement stérique, son branchement au peptidoglycane. Ces antibiotiques sont lentement bactéricides. Ils sont rarement bactéricides au bout de 24 heures et ne le deviennent qu'après 48 heures de contact avec les bactéries.

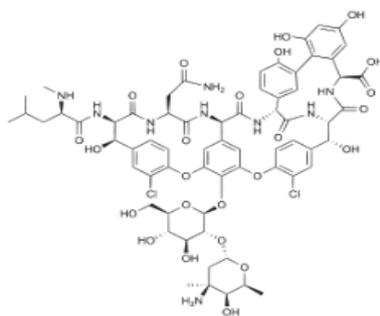


Figure 8: Structure de la Vancomycine

Tableau II: Principaux mécanismes d'action des antibiotiques

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques représentants	Mécanismes d'action
Inhibition de la synthèse de la paroi		
β-lactamines	Pénicilline	Active les enzymes lytiques de la paroi.
	Ampicilline	Inhibe les enzymes de transpeptidation impliquées dans le pontage des chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane de la paroi.
Glycopeptides	Vancomycine	Se fixe directement sur la terminaison D-Ala-D-Ala et inhibe la transpeptidation.
Inhibition de la synthèse protéique		
Aminosides	Streptomycine	Se fixe à la sous unité 30S du ribosome bactérien pour inhiber la synthèse protéique et provoquer des erreurs dans la lecture de l'ARNm.
	Gentamicine	
Phénicolés	Chloramphénicol	Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et empêche la formation des liaisons peptidiques par l'inhibition de la peptidyl-transférase.
Groupe des « MLS »	Erythromycine (macrolides)	Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et inhibe l'élongation de la chaîne peptidique.
Inhibition de la synthèse des acides nucléiques		
Quinolones	Ciprofloxacine et autres quinolones	Inhibe l'ADN gyrase bactérienne et donc interfère avec la réplication de l'ADN, la transcription et autres activités impliquant l'ADN.
Destruction de la membrane cellulaire		
Polymyxines	Polymyxine B	Se fixe à la membrane cellulaire et perturbe sa structure et ses propriétés de perméabilité.
Antagonisme métabolique		
Sulfamides	Sulfaméthoxazole	Inhibe la synthèse de l'acide folique par compétition avec l'acide para-aminobenzoïque (PAB).

Source : Prescott *et al.*, 2003

L'utilisation clinique des antibiotiques surtout semi-synthétiques, dès la fin de la première moitié du XX^e siècle, a radicalement modifié le pronostic des maladies infectieuses d'origine bactérienne (**Leclerc *et al.*, 1995**). Mais il se pose un problème : celui de la résistance bactérienne.

I.2.2. Résistance bactérienne aux antibiotiques

Une bactérie est dite résistante à un antibiotique lorsqu'elle est capable de se développer en présence d'une concentration d'antibiotique qui habituellement, inhibe sa croissance (**Nairouz, 2005**). Mais la définition de la résistance aux antibiotiques peut être différente selon qu'on se place d'un point de vue clinique ou bactériologique.

Du point de vue bactériologique, une bactérie est dite résistante à un antibiotique si elle possède un mécanisme de défense lui permettant de survivre et de se multiplier en présence d'antibiotiques.

Du point de vue clinique, on parle de résistance quand la concentration en antibiotique nécessaire pour obtenir l'effet voulu (bactériostatique ou bactéricide) est supérieure ou égale à la concentration en antibiotique toxique pour le malade. Dans ce cas, des critères pharmacodynamiques et cliniques sont à considérer (**Mhedi *et al.*, 2008**).

Lorsqu'une bactérie possède plusieurs gènes de résistance pour différents antibiotiques, elle est qualifiée de "multirésistante"; c'est le cas notamment de *S. Typhi* et de *S. aureus*. La résistance bactérienne aux antibiotiques se caractérise par son caractère naturel ou acquis, son support génétique et son mécanisme biochimique (**Yala *et al.*, 2001b**).

I.2.2.1. Résistance naturelle et résistance acquise

La résistance bactérienne naturelle est une insensibilité innée aux antibiotiques existant chez tous les membres d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Elle fait donc partie du patrimoine génétique normal du germe (**Yala *et al.*, 2001b**). Elle est différente de la résistance acquise qui n'apparaît que chez des bactéries sensibles aux antibiotiques (**Nairouz, 2005**).

La résistance acquise résulte d'une modification du capital génétique, par mutation ou par acquisition d'un matériel génétique étranger, permettant ainsi à une bactérie de tolérer une concentration d'antibiotiques plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce. Ces gènes acquis peuvent provenir du chromosome d'une espèce différente ou être véhiculés par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les transposons et les intégrons. Ces éléments génétiques peuvent être transférés horizontalement d'une bactérie à une autre selon trois mécanismes : la conjugaison, la transformation ou la transduction. Le transfert

horizontal est le principal mécanisme par lequel les gènes de résistance se propagent au sein du monde bactérien (Saadaoui, 2008).

I.2.2.2.Support génétique de la résistance bactérienne

La résistance naturelle est programmée dans le génome bactérien. Les modifications génétiques responsables de la résistance acquise sont chromosomiques, secondaires à une mutation portant sur le chromosome ou extra-chromosomiques par délétion, transposition, substitution ou transformations des gènes.

❖ Chromosome bactérien

La résistance chromosomique aux antibiotiques peut être due soit à la présence naturelle de gènes de résistance soit à des mutations affectant les gènes portés par le chromosome (Faure, 2009). Une mutation est tout changement non léthal spontané ou provoqué par un agent mutagène dans la séquence d'ADN d'une bactérie. Les mutations, conséquences d'altérations au niveau de l'ADN existant ou d'erreurs survenant au cours du processus de réplication, peuvent se produire naturellement au sein de tout organisme vivant. Face à ces mutations et à leurs effets souvent délétères sur la survie d'une cellule individuelle, les bactéries ont été contraintes de développer des mécanismes de correction et de réparation de l'ADN. Cependant, ces systèmes ne sont pas non plus à l'abri des mutations, créant ainsi des bactéries dites « supermutantes », dotées de capacité d'adaptation plus élevées lorsqu'elles sont confrontées à un environnement hostile tel qu'en présence d'antibiotiques. Le chromosome peut également intégrer les structures génétiques mobiles comme les transposons ou les éléments conjugatifs intégrés (Boerlin et Reid-Smith, 2008).

❖ Plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires, extra-chromosomiques, capables d'autoréplication et transmissibles de façon stable au cours des divisions cellulaires. On distingue généralement trois groupes de plasmides : les plasmides conjugatifs, les plasmides non conjugatifs mobilisables et les plasmides non conjugatifs non mobilisables (Gautier, 2007). Les plasmides bactériens ne sont pas essentiels à la survie des bactéries les hébergeant mais revêtent une importance toute particulière dans l'étude des phénomènes de résistance, car ils constituent à la fois un vecteur de premier plan pour la dissémination des résistances et un immense réservoir génétique. En effet, ils sont porteurs de gènes de résistance vis-à-vis de la majorité des antibiotiques disponibles pour un usage clinique actuellement, y compris les fluoroquinolones (Gay *et al.*, 2006 ; Jacoby *et al.*, 2006). Il n'est pas rare qu'un seul plasmide

soit simultanément porteur de gènes de résistances vis-à-vis de plusieurs antibiotiques de familles différentes et qu'il soit porté par des genres bactériens différents (**Harbottle et al., 2006**). Ils sont identifiés à la fois parmi des bactéries pathogènes et commensales, Gram positives et Gram négatives. Par conséquent, les plasmides offrent, aux cellules hôtes, la capacité d'occuper une grande variété de niches écologiques et contribuent dès lors à l'évolution, non seulement des espèces bactériennes, mais également des plasmides au sein de ces espèces.

❖ **Transposons**

La transposition consiste en l'insertion, en un site du génome de la bactérie (le chromosome ou un plasmide), d'une unité discrète d'ADN appelé transposon (séquence d'insertion). Le mouvement effectué par le transposon est appelé transposition et les enzymes qui en sont responsables sont nommées transposases. Le transposon, également surnommé « jumping gene », code pour ses propres transposases et conserve sa capacité à « sauter » d'une région à l'autre du génome lorsqu'il se déplace. Les transposons, en plus du gène de la transposase, portent un ou plusieurs autres gènes qui confèrent à la cellule hôte la résistance aux antibiotiques. Les transposons et les séquences d'insertion sont très répandues chez les bactéries (**Amadou, 2013**).

Il existe deux classes principales de transposons (**Doublet, 2004**) :

- Les transposons de classe I ou transposons composites qui sont constitués de deux séquences d'insertion (IS) portant chacune aux extrémités une séquence nucléotidique répétée et inversée ;
- Les transposons de classe II ou transposons non-composites qui sont délimités par deux séquences inversées mais ne possèdent pas d'IS.

❖ **Intégrons**

Les intégrons sont des supports génétiques bactériens de capture, d'expression et de dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques sous forme de cassettes ; c'est un système naturel de recombinaison génétique (**Canal et al., 2016**). On distingue deux groupes majeurs d'intégrons à savoir les intégrons de résistance et les super-intégrons (**Faure, 2009**). Ils jouent un rôle majeur dans l'acquisition et l'expression de la résistance aux antibiotiques dans le monde bactérien (**Rowe-Magnus et Mazel, 2002**). Ils sont majoritairement décrits chez les bactéries à Gram négatif à qui ils confèrent généralement un phénotype de multirésistance.

Il existe 5 principales classes d'intégrons de résistance en fonction des séquences en acides aminés de leurs intégrases (**Cambray et al., 2010**) et ils sont obligatoirement portés par

un support génétique (ADN chromosomique, plasmide ou transposon) : les intégrons de classe 1, 2 et 3 (responsables de la dissémination de la résistance aux antibiotiques de part le monde) et les intégrons de classe 4 et 5 (Canal *et al.*, 2016; Simo, 2016).

Les intégrases appartenant aux intégrons de classe 1, 2 et 3 de même que les intégrases VchlntIA et IntI9 sont les seules à être associées à des gènes de résistance aux antibiotiques.

Les intégrons sont constitués d'une région 5' et d'une région 3' conservées entre lesquelles peuvent s'insérer une ou plusieurs cassettes. La région conservée 5' est constituée :

- Du gène *IntI* qui code pour une intégrase *IntI1* qui est une recombinase spécifique du site ;
- D'un promoteur (P) qui assure l'expression des cassettes ;
- Du site *attI*, qui est le site spécifique de recombinaison.

Les classes d'intégrons (classe 1, 2 et 3) différentes par leur région 5' ont été définies ; leurs intégrases ont été identifiées respectivement en *IntI1*, *IntI2* et *IntI3*. La région conservée 3' diffère d'une classe d'intégrons à une autre ; chez les intégrons de classe 1, cette région 3' contient trois cadres de lecture ouverts (*qacEΔ1*, *sul 1* et ORF5). Le gène *qacEΔ1* code pour la résistance aux ammoniums quaternaires, le gène *sul 1* code pour la résistance aux sulfamides, l'ORF 5 ne code pour aucune protéine de fonction connue (Ploy, 2000).

I.2.2.3.Mécanisme de résistance bactérienne aux antibiotiques

Les bactéries peuvent devenir résistantes aux antibiotiques au travers de différents mécanismes à savoir : l'inactivation enzymatique, la modification de la cible de l'antibiotique, la diminution de la perméabilité de la paroi bactérienne et la mise en place ou la multiplication de systèmes de pompes à efflux (Weiss, 2002). Une même souche bactérienne peut cumuler plusieurs de ces mécanismes (Yala *et al.*, 2001b). S'agissant de :

- ✓ **L'inactivation enzymatique** : certaines bactéries vont produire des enzymes capables de modifier ou de détruire un antibiotique, conduisant ainsi à son inactivité. Par exemple, elles peuvent acquérir des gènes codant des enzymes telles que les β-lactamases qui détruisent l'agent antibactérien (les β-lactamines) avant qu'il ne produise son effet.
- ✓ **La modification de la cible** : c'est lorsqu'un antibiotique donné ne peut plus se lier à la cible sur laquelle il agit habituellement. Par exemple, les bactéries peuvent acquérir plusieurs gènes pour une voie métabolique qui aboutit à la production de parois cellulaires altérées ne contenant plus de sites de fixation des agents antimicrobiens.
- ✓ **La diminution de la perméabilité de la paroi bactérienne** : ce mécanisme opère soit par l'intermédiaire de mutations de la structure des porines des bactéries à Gram négatif,

soit par l'intermédiaire de mutations au niveau de systèmes de transport de l'antibiotique.

- ✓ **Les systèmes de pompes à efflux** : les bactéries peuvent acquérir des pompes insérées dans la membrane capables d'éjecter l'antibiotique hors de la bactérie grâce à un canal. Cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique. L'agent antibactérien est enlevé de la cellule avant qu'il n'atteigne le site de sa cible.

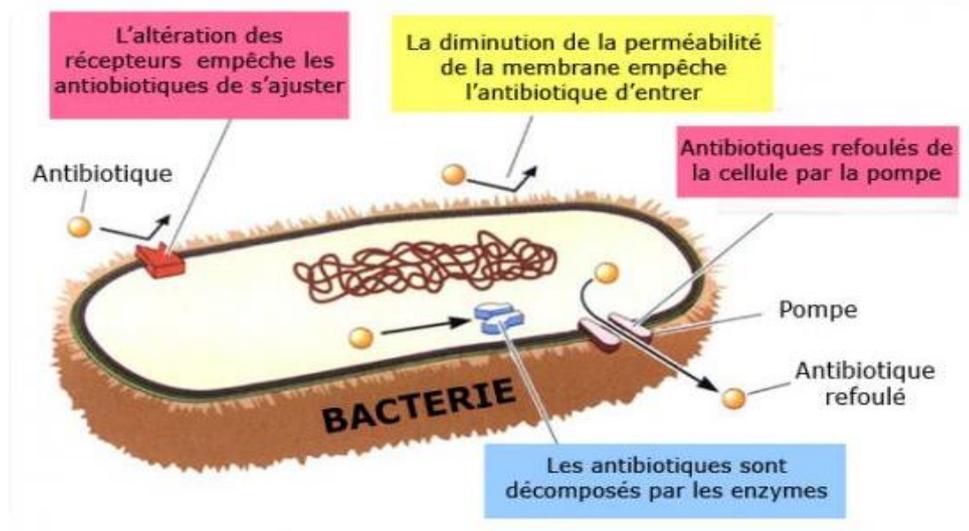


Figure 9: Mécanismes de résistance aux antibiotiques

D'autres mécanismes de résistances existent (Mah, 2001 ; Hyun Youk et Oudenaarden, 2010) :

- ✓ **La sur-expression de la cible de l'antibiotique** : En produisant davantage de la macromolécule ciblée, la bactérie arrive à maintenir suffisamment d'activité biologique pour se développer, malgré la présence de l'antibiotique ;
- ✓ **La défense altruiste** : Des bactéries très résistantes sont capables de synthétiser l'indole en très grande quantité pour subvenir aux besoins des bactéries sensibles. Ce composé organique possède une double fonction de résistance : efflux des antibiotiques et activation d'une voie métabolique empêchant la synthèse de radicaux libres qui peut être favorisée par l'antibiotique ;
- ✓ **Les biofilms accidentellement et anormalement devenus pathogènes sont souvent très résistants et notamment antibiorésistants** : Cette résistance accrue est acquise par plusieurs moyens et, en particulier, par le phénomène de "conjugaison" qui opère une mutation des gènes bactériens à l'intérieur du biofilm.

❖ Résistance aux bêta-lactamines

✓ Résistance par production d'enzymes :

Chez les bactéries normalement sensibles aux bêta-lactamines, il s'agit du mécanisme de résistance le plus important. Les bêta-lactamases sont des enzymes capables d'hydrolyser les antibiotiques en ouvrant les cycles beta-lactames. Ceci va conduire à la production de dérivés inactifs. Le support génétique des bêta-lactamases peut être chromosomique ou plasmique.

La classification des bêta-lactamases la plus utilisée est celle de Richmond et Sykes. Schématiquement, les bêta-lactamases peuvent être individualisées en Pénicillinases et Céphalosporinases.

○ Les pénicillinases :

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en absence de tout indicateur sauf celle de *Staphylococcus aureus*. Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV et PSE. L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les *Haemophilus*, les *Neisseria*, les *Pasterella*, les *Pseudomonas*. Elle inactive les Aminopénicillines, les Carboxypénicillines, les Ureidopénicillines. Ces bêta-lactamases sont inhibées par les inhibiteurs de bêta-lactamases comme l'acide clavulanique et le Tazobactam. Une augmentation importante de la production de bêta-lactamases peut être responsable de la résistance aux inhibiteurs de bêta-lactamases. Ces bêta-lactamases résistantes aux inhibiteurs de bêta-lactamases sont appelées IRT (Inhibitor Resistant TEM). Comme les IRT, les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) dérivent par mutations ponctuelles de bêta-lactamases déjà connues, essentiellement TEM ou SHV. Les BLSE peuvent être retrouvées chez toutes les entérobactéries mais plus particulièrement chez *Klebsiella pneumoniae*.

○ Les Céphalosporinases :

Elles sont généralement chromosomique et inductibles. Elles sont codées par un gène appelé AMPc et hydrolysent préférentiellement les CSP I. La résistance naturelle vis-à-vis de la céfoxitine est la conséquence de l'induction très importante de la céphalosporinase par cet antibiotique. La production normalement inductible de ces céphalosporinases est sous le contrôle de différents gènes qui, s'ils sont mutés, vont aboutir à une hyperproduction spontanée de niveaux variables de la céphalosporinase. Une fois hyperproduites, elles peuvent hydrolyser les CSP III et entraîner la résistance à ces antibiotiques. Actuellement 20% des *Enterobacter*

produisent constitutivement une céphalosporinase et sont résistantes aux CSP III. Depuis 1990, des céphalosporinases codées par des gènes plasmidiques ont été décrites. Parmi celle-ci, il y a MIR-1 et CMY-2.

○ **Les amidases :**

Elles hydrolysent la chaîne latérale des bêta-lactamines et libèrent l'acide-amino-7 céphalosporinique dans le cas des céphalosporines et de l'acide 6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

○ **Les estérases :**

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines, les rendent inactifs.

✓ **Résistance non enzymatique aux bêta-lactamines :**

Les mécanismes de résistance non enzymatique s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liés à la production de bêta-lactamases. Chez les germes à Gram négatifs, la structure particulière de ces germes confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux bêta-lactamines.

Tableau III: Mécanismes de résistances non enzymatiques aux bêta-lactamines chez les germes à Gram négatif

Modification des porines ou de protéines de la membrane externe	Entérobactéries (<i>Escherichia coli</i> , <i>Escherichia cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i>) <i>Pseudomonas</i> <i>Haemophilus</i> <i>Gonocoque</i>
Modification des PLP	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>Haemophilus</i> <i>Gonocoque</i>

○ **Rôle de la perméabilité dans la résistance des germes à Gram négatif aux bêta-lactamines :**

La pénétration des bêta-lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont les canaux protéiques remplis d'eau. La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. Chez *E. coli*, la relation entre les porines et les bêta-lactamines a été la mieux étudiée. Deux types de porines sont présents chez *E. coli* (OmpC et OmpF). Chez les mutants OmpC-, la pénétration des bêta-lactamines n'est pas diminuée, car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire, l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 fois la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine. Ces résultats

témoignent d'un passage préférentiel des bêta-lactamines à travers la porine OmpF, car plus large. Quant aux mutants OmpC- et OmpF-, leur CMI est augmenté d'une manière très importante.

- **Rôle des PLP dans la résistance de germes à Gram négatif aux bêta-lactamines :**

L'efficacité des bêta-lactamines est liée à leur capacité de se fixer aux PLP. La liaison (antibiotique/cible) est liée à la structure de la cible. Diverses mutations peuvent entraîner des modifications diminuant l'efficacité de l'antibiotique. L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les germes à Gram négatif. Le rôle des PLP dans la résistance chez les mutants intrinsèques a été mis en évidence chez les mutants d'*E. coli* qui avaient une résistance augmentée au Mécillinaam et à l'Imipénème due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour les antibiotiques, alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines.

- ✓ **Autres mécanismes de résistance aux bêta-lactamines**

Tolérance bactérienne : Une bactérie est dite tolérante lorsqu'ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport : CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste, alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique disparaît. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène. Ce phénomène est surtout marqué pour les bêta-lactamines vis-à-vis des Streptocoques.

Persistance de la résistance : On observe une persistance du germe in vivo en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec pour conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les bêta-lactamines mais, également, avec les autres antibiotiques.

- ❖ **Résistance aux aminosides**

- ✓ **Altération de la cible**

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent, pour la plupart des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

✓ **Modification du transport de l'antibiotique**

La pénétration des aminosides dans les bactéries est un phénomène de diffusion passive à travers les porines de la membrane externe et le transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne. Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotiques dans la cellule.

✓ **Détoxication enzymatique des antibiotiques**

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique. C'est ce troisième mécanisme d'origine plasmidique prédominant chez l'entérocoque qui est responsable de l'apparition de souches hautement résistantes aux aminosides. Ces enzymes classées en trois catégories en fonction de la réaction qu'elles catalysent (nucléotidation, phosphorylation, cétylation) sont nommées en fonction de leurs substrats.

❖ **Résistance aux macrolides et apparentes**

Une des caractéristiques des bacilles à Gram négatif est d'être résistant spontanément aux macrolides et aux substances apparentées. Chez les autres espèces bactériennes, la résistance acquise est due à des plasmides qui codent pour la sécrétion d'une méthylase qui elle-même va induire l'altération du RNA ribosomal 23S. L'existence de mutants chromosomiques résistants a été prouvée.

❖ **Résistance aux sulfamides et au triméthoprime**

Le mécanisme le plus souvent décrit ici concerne la cible de l'antibiotique. Celle-ci est substituée et n'est donc plus reconnue par l'antibiotique. L'autre mécanisme mis en évidence au cours de la résistance aux sulfamides et au triméthoprime concerne la perméabilité de la bactérie à ces molécules.

❖ **Résistance aux quinolones**

Les quinolones sont des produits de synthèse. La résistance aux quinolones est presque toujours de valeur chromosomique. Il s'agit d'une mutation dont la traduction sera soit une diminution de la perméabilité à l'antibiotique, soit une modification de la cible par altération d'une sous-unité de la gyrase.

❖ Résistance aux glycopeptides

La résistance aux glycopeptides est due à la production de précurseurs de la paroi modifiés (terminés par D-alanyl-D-lactate ou D-alanyl-D-sérine) et à l'élimination des précurseurs naturels de haute affinité (terminés par D-Ala-D-Ala) (Courvalin, 2006). Cette modification de cible résulte de la coopération de plusieurs gènes organisés en opéron codant pour l'ensemble des enzymes nécessaires à la reprogrammation du peptidoglycane (Courvalin, 2006 ; Depardieu *et al.*, 2007). Le changement porte sur l'extrémité du précurseur et fait disparaître une liaison hydrogène essentielle (Walsh, 2000).

I.2.3. Evolution des bactéries résistantes aux antibiotiques

Les différents modes d'acquisition des résistances donnent une idée de la fréquence de leurs apparitions ainsi que des activités qui les favorisent. L'acquisition de la résistance par le transfert des gènes est celle qui présente la fréquence la plus élevée. Les résistances bactériennes acquises par mutation chromosomique concernent 10 à 20% des souches isolées en clinique (Courvalin *et al.*, 2001). La combinaison de ces deux modes se traduit par une augmentation de la fréquence des résistances.

I.2.3.1. Cas de *Salmonella Typhi*

Le chloramphénicol a été utilisé avec succès dès 1948, mais des résistances sont apparues au cours des années 1970 (Rowe *et al.*, 1997). L'ampicilline et le cotrimoxazole ont alors été utilisés en première intention jusqu'à l'apparition rapide de résistance dès les années 1970-1980. Actuellement les fluoroquinolones sont utilisées en première intention chez l'adulte par voie orale si possible : ciprofloxacine ou ofloxacine en comprimés pendant 8 à 10 jours. Mais en 1992, des cas de résistance aux fluoroquinolones sont apparues aux Royaume-Unis (Threlfall *et al.*, 1999).

Certaines souches de *S. Typhi* sensibles à la ciprofloxacine d'après l'antibiogramme classique mais résistantes à l'acide nalidixique, répondent mal au traitement avec risque d'échec clinique accru, d'où l'importance de tester systématiquement la sensibilité à l'acide nalidixique (Aubry, 2012). Les principales alternatives sont alors les céphalosporines de troisième génération (C3G) et l'azythromycine. La ceftriaxone (C3G) en intraveineuse peut être utilisée, en première intention chez l'enfant mais son efficacité est inférieure à celle des fluoroquinolones (Weill, 2010).

I.2.3.2. Cas de *Staphylococcus aureus*

Certains auteurs ont observé une augmentation rapide de la fréquence d'apparition des *Staphylococcus aureus* producteurs de la pénicillinase dès les années 1945 (**Barber, 1947; Medeiros, 1997; Bush, 2004**).

D'un pourcentage d'apparition de moins de 10% en 1945, cette valeur atteint environ 80% en 1955. Du fait de l'inefficacité des pénicillines sur les *Staphylococcus aureus*, d'autres familles d'antibiotiques ont dû être utilisées. Par conséquent, à côté de l'acquisition de cette résistance aux pénicillines, ces souches de *Staphylococcus aureus* ont acquis de nouvelles résistances aux antibiotiques, et sont devenues progressivement des souches multirésistantes. L'acquisition de ces résistances mixtes par ces souches déjà résistantes aux pénicillines a été mise en évidence par **Tankovic (1997)** dans ses travaux à l'hôpital Henri Mondor sur la période de 1969 à 1995. Toujours par le même principe, on observe des fréquences d'apparition de ces types de résistances de plus en plus élevées dans le temps. Le taux de résistance de cette bactérie (déjà résistante aux pénicillines) aux autres familles d'antibiotiques tels que les cyclines, les aminosides et les quinolones augmente également et atteint des valeurs proches de 100% sur cette période. On notera que ces résistances croisées sont apparues progressivement avec l'usage d'autres antibiotiques pour le traitement des infections aux *Staphylococcus aureus*. La bactérie n'a fait que s'adapter aux nouveaux types de traitement par l'addition des résistances. L'addition des résistances des bactéries est de plus en plus observée et ce phénomène constitue une véritable inquiétude.

I.2.4. Causes probables de la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques résulte d'une évolution par sélection naturelle. Les antibiotiques exercent une pression sélective très forte en éliminant les bactéries sensibles. Les bactéries, présentant une mutation leur permettant de survivre en présence des antibiotiques, continuent à se reproduire et peuvent transmettre à leur descendance leurs gènes de résistance. Ainsi, elles peuvent produire une génération de bactéries pleinement ou majoritairement résistantes.

Diverses causes peuvent être à l'origine de cette résistance aux antibiotiques sans cesse croissante. L'on peut citer notamment :

- ✓ L'utilisation massive des antibiotiques par l'Homme : en effet, l'usage excessif de certaines molécules, telles que les antibiotiques, constitue évidemment un facteur de pression considérable sur l'écologie bactérienne. De plus, dans certains cas, l'utilisation fréquente d'un antibiotique favorise l'augmentation de la résistance d'un agent

pathogène à cette molécule (par exemple : pénicilline et *Streptococcus pneumoniae*) (Martinez, 2009).

- ✓ Les diagnostics incorrects suivis d'antibiothérapie : les prescriptions abusives ou de précaution et l'automédication constituent d'autres facteurs de risque. En effet, la prescription d'un antibiotique à défaut de toutes les autres classes d'antibiotiques a des répercussions non seulement sur la personne à qui il est prescrit, mais aussi sur l'ensemble de la population, puisqu'une espèce bactérienne pourrait en être affectée et se propager chez d'autres personnes (Weiss, 2002).
- ✓ La densité de la population ainsi que les voyages semblent également jouer un rôle. En effet, ils permettent une dissémination plus rapide d'un clone résistant (Weiss, 2002).
- ✓ L'utilisation des antibiotiques dans le monde animal par des éleveurs pour augmenter la productivité ou pour lutter contre les bactéries, est à l'origine de certains problèmes de résistance bactérienne aux antibiotiques chez l'homme (Bager et Helmuth, 2001; Weiss, 2002; Djordjevic *et al.*, 2013). Une étude conduite par Norajit et Ryu (2012) sur 88 souches de *Salmonella* isolées de 300 produits de la viande (bœuf cru, viande de poulet et nourritures de rue) de la ville de Kuala Lumpur, il ressort que 73.8% étaient résistants à la tétracycline, 63.6% aux sulfonamides, 57.9% à la streptomycine et 44.3% à l'acide nalidixique. Ces statistiques inquiétantes indiquent la nécessité d'approfondir des travaux de recherche sur ce micro-organisme résistant.

I.2.5. Prévention de la résistance aux antibiotiques

Pour les médecins, l'apparition d'un réservoir de gènes de résistance transférables à des bactéries pathogènes pour l'homme ou bien la possible transmission de bactéries multirésistantes directement de l'animal à l'homme (zoonose) représentent une menace sérieuse. Pour les vétérinaires, la dissémination de l'antibiorésistance rend la thérapeutique classique moins efficace. Wise (1998) estime que 40 à 80% des antibiotiques sont utilisés à des fins pouvant être remises en cause. Le contrôle de l'apparition de nouvelles souches résistantes doit être pris en compte tant pour les conséquences possibles en santé publique que pour l'efficacité des traitements antibiotiques.

Le développement de l'antibiorésistance provient du fait même de l'utilisation des antibiotiques mais certaines pratiques favorisent sa progression. C'est le cas de l'utilisation des antibiotiques alors que ce n'est pas nécessaire (par exemple, lors d'affections virales non surinfectées) ou de leur utilisation à des doses sub-efficaces (Thomas *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999).

La limitation de l'expansion de la résistance bactérienne passe par une limitation et une meilleure utilisation des antibiotiques. Plusieurs actions sont possibles : limiter l'utilisation des antibiotiques et faire un meilleur usage des antibiotiques.

I.2.5.1. Limiter l'utilisation des antibiotiques

✓ Eduquer les éleveurs et les propriétaires

Il est nécessaire d'informer les personnes susceptibles d'administrer des antibiotiques aux animaux. Leur utilisation, sans raison clinique, ne peut conduire qu'à des schémas thérapeutiques inadéquats. L'accent doit être mis sur les dangers d'une mauvaise utilisation : que ce soit pour la progression de l'antibiorésistance ou pour les effets secondaires ou la toxicité.

✓ Favoriser l'hygiène et de bonnes conditions d'élevage

Une meilleure hygiène et des méthodes d'élevages contrôlées permettent de réduire le nombre d'infections et donc de traitements antibiotiques. De plus, une bonne hygiène limitera la dissémination des bactéries résistantes.

✓ Favoriser la vaccination

Le recours à la vaccination, lorsqu'elle est possible, doit être encouragé. La diminution de maladies virales permet d'éviter les surinfections bactériennes.

✓ Essayer d'éradiquer certaines maladies

En éradiquant certaines maladies virales favorisant les surinfections bactériennes ou les maladies débilitantes, on limitera l'utilisation des antibiotiques.

I.2.5.2. Faire un meilleur usage des antibiotiques

Lorsqu'il n'est pas possible d'éviter l'usage des antibiotiques, leur utilisation doit se faire dans la mesure du possible en suivant certaines règles (AVMA, 2000).

✓ Optimiser le schéma thérapeutique

Si la CMI permet une bonne évaluation de l'évolution de la résistance bactérienne au cours du temps, sa connaissance seule ne permet pas la meilleure adaptation possible de la posologie à la bactérie en cause dans une infection.

A l'heure actuelle, les progrès de la pharmacocinétique (PK) et de la pharmacodynamie (PD) ont permis la détermination d'indices ayant pour but de prédire l'efficacité d'un schéma posologique et sa capacité à limiter l'apparition de résistance. Ces indices sont développés plus

spécialement en médecine humaine mais les bases théoriques sont identiques pour la médecine vétérinaire (**Sanchez-Navarro, 1999**).

✓ **Minimiser les contaminations de l'environnement**

En minimisant les contaminations environnementales en antibiotiques, on limite la possibilité de laisser en présence de bactéries des antibiotiques à des concentrations sub-efficaces.

✓ **Etablir une banque de données**

La conservation de données sur le malade, la thérapeutique, la souche bactérienne... permettent la réalisation d'études rétrospectives ayant pour but d'améliorer encore l'adaptation des schémas posologiques.

Malgré l'importance des antibiotiques et leur utilité dans le traitement de diverses maladies infectieuses, plusieurs obstacles se sont manifestés à leur égard : la résistance, la multi-résistance, leur toxicité à l'exemple des réactions allergiques (**Ahmad et al., 1998**), ainsi que dans certains cas leur coût élevé surtout pour les pays en voie de développement. En conséquence, tout ceci a poussé un grand nombre de personnes à se détourner de ces traitements pour se diriger vers des médicaments alternatifs procurés par la nature, il s'agit notamment des plantes médicinales (**Clark, 1996**).

I.3. UTILISATION DES PLANTES MEDICINALES DANS LA LUTTE CONTRE LES BACTERIES PATHOGENES

La médecine traditionnelle, aussi qualifiée de médecine complémentaire, alternative, non conventionnelle ou encore parallèle existe depuis des millénaires. Son apport dans la prise en charge des pathologies est reconnu. Aujourd'hui, cette médecine reste toujours très utilisée dans les pays en développement du fait de l'insuffisance et donc inaccessibilité des centres de santé modernes pour les populations des campagnes isolées mais également du fait du coût plus élevé de la prise en charge d'un patient par la médecine moderne (**Ahorlu, 1997**). Selon une étude réalisée au Ghana (Afrique de l'Ouest), le traitement du paludisme par les plantes médicinales est trois fois moins onéreux qu'une automédication par achat direct en pharmacie sans ordonnance et seize fois moins onéreux qu'un traitement thérapeutique après consultation (**Ahorlu, 1997**).

Les plantes représentent la matière première la plus exploitée dans la médecine traditionnelle. Elles sont utilisées entièrement ou en partie (un organe précis) pour leurs propriétés thérapeutiques en santé humaine ou animale. Si ces « anciennes » pratiques ont continué à exister jusqu'aujourd'hui malgré la présence dominante de la médecine « moderne », c'est parce qu'elles enregistrent des succès thérapeutiques. C'est ainsi que l'OMS a mis en évidence leur efficacité à partir de 50 Essais Thérapeutiques Randomisés (ETR) issus des travaux de différents auteurs publiés par « *Therapeutics_Letter* », (WHO, 2002).

Il arrive que certains patients aient recouru aux plantes médicinales (médecine traditionnelle) soit après une série d'échecs thérapeutiques avec la médecine moderne ou dans les cas où la médecine moderne se trouve dans une position d'impuissance (Anderson *et al.*, 1993; Ostrow *et al.*, 1997; WHO, 2002). Selon cette étude présentée par l'OMS, 78% des personnes porteuses du VIH combinent médecine moderne et traditionnelle (Anderson *et al.*, 1993; Ostrow *et al.*, 1997; WHO, 2002).

On note toujours, dans la même étude, que cette médecine complémentaire est exploitée par 40% de la population générale des adultes.

I.3.1. Le potentiel antimicrobien des plantes médicinales

Les plantes sont des organismes vivants qui utilisent la matière minérale et l'énergie du soleil pour produire de la matière organique. Ce processus permet à la plante de synthétiser dans une première étape des hydrates de carbone (les glucides) (Bruneton, 2009; Dewick, 2011). Ces glucides de faibles poids moléculaires (oses) sont utilisés pour la synthèse de métabolites primaires nécessaires pour la survie. Il s'agit de glucides complexes (l'amidon, la cellulose, les pectines etc.), des acides aminés (pour la synthèse de protéines) et d'acides gras. Ces métabolites primaires sont exploités par l'homme et les animaux pour leur alimentation et apports énergétiques. Par ailleurs, l'homme les utilise également dans le domaine médical pour la fabrication d'excipients tels que : les oses édulcorants, les polysaccharides dans la fabrication des comprimés ou encore pour l'obtention d'émulsions et autres. Certains de ces métabolites primaires servent aussi de molécules thérapeutiques. A partir des oses et des métabolites primaires, la plante synthétise une grande variété de métabolites dits secondaires, plus complexes.

Aujourd'hui, plusieurs de ces phytomolécules ont déjà été décrites, cependant un grand nombre reste encore mal connu et non caractérisé. Ces composés constituent les principes actifs des plantes médicinales exploités dans la médecine traditionnelle. En se basant sur leurs structures chimiques, ces phytomolécules issues des métabolites secondaires sont classées en

quatre grands groupes chimiques : composés phénoliques, alcaloïdes, terpènes et autres constituants (dérivés simples des métabolites primaires).

I.3.1.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques regroupent un grand nombre de substances chimiques qui possèdent au moins un noyau aromatique. Ce noyau porte une ou plusieurs fonctions alcool (groupement hydroxyle). Les phytomolécules phénoliques ont des structures allant des plus simples (acide gallique) aux plus complexes (les tannins). Les composés phénoliques possèdent de nombreuses activités biologiques dont des activités antimicrobiennes (**Xiang *et al.*, 2008; Jankittivong *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2011; Basli *et al.*, 2012**).

On peut classer les polyphénols en fonction de leur voie de biosynthèse. On distingue ainsi les phénols simples, les coumarines, les stilbènes, les flavonoïdes, les saponines, les lignanes, les quinones et les tannins. Les tannins ont une action antibactérienne puissante leur permettant d'inhiber la croissance des bactéries ruminales (dont certaines sont sporogènes) comme *Clostridium aminophilum*, *Butyvirbio fibrisolvens*, *C. proteoclasterium* (**Leitao *et al.*, 2013**), ainsi que les bactéries responsables de différentes infections chez l'homme : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*. L'inhibition bactérienne par les tannins est dépendante de la structure et du degré de polymérisation de ces derniers, mais ceci n'est pas toujours le cas (**Sivakumaran *et al.*, 2004**).

I.3.1.2. Les terpènes ou terpénoïdes

Les terpènes sont des huiles essentielles de nombreuses plantes. Ils sont volatils et constituent la résine et les essences des plantes. C'est le cas de l'essence de térébenthine isolée à partir de la résine de pin. Sur le plan structural, les terpènes sont des dérivés de l'isoprène (C₅H₈). Leur nomenclature et leur classification se font en fonction du nombre d'unités isopréniques qui constituent la molécule. Des activités antimicrobiennes des terpénoïdes ont été mises en évidence (**Oussou *et al.*, 2004; Bourkhiss *et al.*, 2007; Goetz et Ghedira, 2012**). On les classe en monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes et caroténoïdes.

I.3.1.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent une vaste famille de composés chimiques dont la structure comporte au moins un hétérocycle azoté. Ce sont des composés qui présentent plusieurs activités pharmacologiques telles qu'analgésique (la morphine), antimicrobienne (imidazole, chloroquine, quinine), anticancéreux (vinblastine, vincristine). Ce sont des précurseurs de nombreux médicaments. On les divise en sous-groupes structuraux que sont les tropanes, les

pyrrolizidines, les pyridines, les tropolones, les isoquinoléines, les indoles, les purines, les imidazoles et les alcalamines.

Leurs structures moléculaires sont complexes, plus ou moins basiques et douées des propriétés physiologiques prononcées même à faible dose. Ils constituent un des groupes de métabolites secondaires contenant plus de 10000 à 12000 différentes structures (**Stöckigt et al., 2002**).

Les alcaloïdes sont connus comme doués de propriétés antimicrobiennes (**Faizi et al., 2003**). Le mécanisme d'action des alcaloïdes est attribué à leur capacité à s'intercaler avec l'ADN.

I.3.2. Les plantes médicinales utilisées au Cameroun

Au Cameroun, il y a une grande tradition en ce qui concerne l'usage de la médecine traditionnelle pour traiter différentes maladies. Beaucoup de travaux ont été faits sur l'usage traditionnel de plantes médicinales au Cameroun. Par exemple, **Kébou (1993)** a listé les plantes médicinales utilisées par les populations de Foto dans la subdivision de la Menoua (région Ouest) ; **Betti (2002)** a cité les plantes médicinales vendues dans les marchés de la ville de Yaoundé et ; **Betti et Lejoly (2009)** ont décrit les plantes médicinales utilisées par les mères de famille dans la réserve de la biosphère du Dja. **Tsobou et al., (2013)** ont relevé qu'un impressionnant nombre d'espèces végétales était utilisé pour le traitement traditionnel de la fièvre typhoïde dans le Département de Bamboutos de la Région Ouest du Cameroun. Un total de 59 plantes médicinales appartenant à 56 genres et 33 familles ont été enregistrées pendant leur étude. Les familles les plus utilisées étaient : Asteraceae, Fabaceae, Bignoniaceae et Malvaceae.

Tableau IV: Liste des plantes médicinales utilisées contre les infections dues à *S. Typhi* and *S. aureus* au Cameroun

Nom scientifique	Famille	Nom commun	Partie utilisée	Plantes associées	Méthode de préparation	Moyen	Références
<i>Citrus medica</i>	<i>Rutaceae</i>	Cedratier	Fruit		Décoction	Oral	Mpondo et al.,2012
<i>Mangifera indica</i>	<i>Anacardiaceae</i>	Andok (Ewondo)	Ecorces	Citron	Décoction	Oral	Tsobou et al., 2013
<i>Senna alata</i>	<i>Fabaceae</i>	Datrier	Feuilles		macération	Oral	
<i>Carica papaya</i>	<i>Caricaceae</i>	Fofu (Ewondo)	Feuilles	Datrier, sel germe	Macération, décoction, trituration	Oral	
<i>Bidens pilosa</i>	<i>Asteraceae</i>	Colé-colé	Ecorces	Aloès	Trituration	Oral	Ngene et al.,2015; Dibong et al., 2011
<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Poaceae</i>	Citronnelle Ossanga (Ewondo)	Feuilles	Citron	Décoction, Macération	Oral	
<i>Alstonia boonei</i>	<i>Apocynaceae</i>	Ekuk (Ewondo)	Ecorces	Feuilles de Nivaquine	Macération, fermentation	Oral	Ngene et al.,2015
<i>Panax ginseng</i>	<i>Araliaceae</i>	Ginseng	Fruit, racine	Kinkeliba en fruit	Infusion, macération	Oral	
<i>Entandrophragma sp.</i>	<i>Meliaceae</i>	Sapeli blanc	Ecorces	Baobab, dattier	Macération, fermentation	Oral	
<i>Voacanga africana</i>	<i>Apocynaceae</i>	Voacanga d'Afrique	Feuilles	Noix de Cola	Macération, décoction	Oral	Angora et al., 2015
<i>Annickia chlorantha</i>	<i>Annonaceae</i>	Nfol	Ecorces	Citrus limon	Décoction	Oral	
<i>Irvingia gabonensis</i>	<i>Irvingiaceae</i>	Andok beti (Ewondo)	Ecorces	Ngongui	Décoction	Oral	
<i>Musanga cecropioides</i>	<i>Cecropiaceae</i>	Asseng	Ecorces		Décoction	Oral	Agнем et al., 2011
<i>Chromolaena odorata</i>	<i>Asteraceae</i>	Kondengui (Ewondo)	Feuilles	Roi des herbes	Trituration	Peau, Oral	
<i>Erigeron floribundus</i>	<i>Asteraceae</i>	Vien nguim	Feuilles		Frottement dans l'eau chaude	Peau	

I.3.2.1. Cas d'*Annickia chlorantha*

❖ Systématique

Elle se présente de la manière suivante :

- Règne : Plantae ;
- Classe : Angiospermes ;
- Ordre : Magnoliales ;
- Famille : Annonaceae;
- Genre : Annickia ;
- Espèce : Chlorantha ;
- Nom commun : Nfol

❖ Utilisations traditionnelles et propriétés biologiques

L'écorce de la tige, qui est amère, est utilisée en médecine traditionnelle comme un antimicrobien et pour le traitement de la jaunisse, des fièvres, de la tuberculose, des vomissements sanglants et des infections urinaires. L'arbre est récolté pour son bois, ses fibres et comme source de colorant. L'écorce en poudre sert en usage externe à soigner les plaies, les ulcères ou les plaies (Burkill, 2000). Des recherches ont permis de démontrer l'action antibactérienne de l'écorce, son activité antivirale avec un potentiel contre la fièvre induite par pyrogènes. Le colorant jaune issu de l'écorce interne est utilisé pour colorer le coton et d'autres fibres. L'écorce fibreuse est utilisée pour la fabrication des tapis et des chapeaux. L'écorce sert également à fabriquer les cloisons et les portes des cabanes. Son bois jaune est brunissant à l'exposition. Le cœur et l'aubier ne sont pas différenciés. Son bois fin, doux et facilement polis est utilisé pour la construction de maisons, des meubles, et de la menuiserie générale (Burkill, 2000).

Annickia chlorantha contient de nombreux composés bioactifs qui justifient ses nombreuses vertus médicinales. Le criblage phytochimique a montré la présence de saponines, flavonoïdes, alcaloïdes, phénols, sucre réducteur et glycoside cardiaque (Adesokan *et al.*, 2008). Les alcaloïdes se révèlent quantitativement plus élevés que les autres constituants et les flavonoïdes les moins. D'après les travaux de Dawodu *et al.* en 2014, les alcaloïdes qui sont responsables de l'activité médicale. Le mécanisme d'action de ces phytobiomolécules est attribué à leur capacité à s'intercaler avec l'ADN (Faizi *et al.*, 2003).

I.3.2.2. Cas d'*Irvingia gabonensis*

❖ Systématique

Elle se présente de la manière suivante :

- Règne : Plantae ;
- Classe : Angiospermes ;
- Ordre : Malpighiales ;
- Famille : Irvingiaceae ;
- Genre : *Irvingia* ;
- Espèce : *gabonensis* ;
- Nom commun : Andok beti

❖ Utilisations traditionnelles et propriétés biologiques

Les différents usages d'*Irvingia gabonensis* ont été abordés par plusieurs travaux. Ainsi, **Okolo et al. (1995)** rapportent que la décoction de l'écorce de cet arbre est efficace contre les maux de ventre et la dysenterie. Les mêmes auteurs affirment aussi que des études scientifiques ont montré l'existence de principes actifs, conférant des propriétés analgésiques à l'écorce d'*I. gabonensis*. De même, **Ndoye et al. (1994)** mentionnent que la décoction de l'écorce est aussi efficace dans le traitement de la diarrhée et dans le sevrage des enfants.

L'analyse phytochimique qualitative a révélé la présence de tanins, saponines, terpénoïdes, flavonoïdes, phénols, alcaloïdes, stérols, glycosides et anthraquinones (**Efosa et Ngozi, 2018 ; Don, 2018 ; Ekpe et al., 2019**). Les tanins sont quantitativement plus élevés que tous les autres constituants (**Efosa et Ngozi, 2018 ; Don, 2018**). Cependant l'activité antibactérienne de ces phytobiomolécules varie d'une molécule à une autre. L'évaluation de cette activité peut se faire selon différentes méthodes.

I.4. LES METHODES D'ETUDE *IN VITRO* DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

Il existe plusieurs méthodes d'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne dont trois sont les plus communément utilisées, car elles sont reproductibles et faciles de mise en œuvre. Ces trois méthodes sont les suivantes : la méthode de diffusion en milieu gélosé, la méthode de dilution en milieu gélosé ou d'incorporation à la gélose et la méthode de dilution en milieu liquide (**Cos et al., 2006**).

I.4.1. La méthode de diffusion en milieu gélosé

Elle est généralement utilisée pour l'évaluation préliminaire *in vitro* de l'activité antibactérienne et se caractérise surtout par sa rapidité et sa facilité de mise en œuvre. Elle peut se réaliser selon des techniques différentes.

I.4.1.1. La méthode de diffusion en milieu solide par la technique des disques

Elle consiste à déposer des disques de papier Whatman N°1 stériles imprégnés d'une quantité déterminée de la substance antibactérienne à tester, sur la surface d'un milieu de culture solideensemencé au préalable avec l'inoculum désiré et isolé en culture pure. Après incubation dans les conditions optimales de croissance de la bactérie, une zone d'inhibition de croissance autour du disque est observée si le germe est sensible à l'antibactérien testé.

I.4.1.2. La méthode de diffusion en milieu solide par la technique des puits

Elle consiste à creuser de manière aseptique des puits de quelques millimètres de diamètre dans la gélose. L'ensemencement des souches est effectué par inondation avec une suspension de bactéries préalablement préparée. Après l'initiation de la croissance du germe, on introduit dans les puits une quantité définie de la substance à tester qu'on laisse diffuser pendant le temps d'incubation. A la fin de l'incubation, on observe la croissance et on mesure le diamètre d'inhibition des germes sensibles.

I.4.1.3. La méthode de dilution en milieu gélosé ou d'incorporation à la gélose

La dilution en milieu gélosé consiste en l'incorporation de la substance antibactérienne à tester dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution de progression géométrique 2. Par la suite l'inoculum bactérien est ensemencé à la surface de la gélose de la boîte. Ces résultats sont souvent considérés comme les plus fiables pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'une substance antibactérienne. L'un des grands avantages de cette méthode est la capacité de tester plusieurs bactéries sur la même boîte de gélose et au même moment (l'exception est faite pour des bactéries envahissantes).

I.4.2. La méthode de dilution en milieu liquide

La méthode de dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'une substance antibactérienne (habituellement des dilutions de progression géométrique 2) dans un milieu liquide de composition prédéfinie. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 mL (macro-dilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques à micro-cupules (micro-dilution). Après incubation dans les conditions optimales, on observe la croissance du germe dans les micro-cupules ou tubes à essai et ce à travers la turbidité du milieu. La plus petite concentration qui empêche une croissance visible du microorganisme est définie comme la concentration minimale inhibitrice (CMI). L'un des désavantages de cette méthode est que l'achat de l'équipement et des gammes d'antibactériens peuvent être coûteux et de ce fait, cette méthodologie peut ne pas être réalisable dans certains laboratoires.

I.4.3. La bioautographie

La bioautographie est une méthode de screening microbiologique communément utilisée pour la détection d'activités antimicrobiennes. Par le screening, il est possible de mesurer la

présence ou l'absence d'une activité biologique recherchée. Cette activité peut se référer à un effet, antibactérien, antifongique, antitumoral ou encore antiprotozoaire. Elle est plus sensible que les autres méthodes et peut être utilisée pour tester des produits naturels polaires et non polaires (Ben Nasr, 2017).

I.4.4. Technique de micro-atmosphère

Elle consiste à adapter un disque de papier filtre imprégné d'HE au centre du cercle d'une boîte de Pétrie, sans que l'HE entre en contact avec la géloseensemencée par les microorganismes. La boîte est hermétiquement fermée. Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum (Ferhat, 2009).

Cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne réelle des HE, elle montre seulement l'activité des constituants volatiles à la température d'incubation. On considère que l'espace occupé par l'air est très petite (le disque imprégné d'HE est près d'environ 5mm de la surface de l'agar) et ne permet pas de mesurer la concentration des vapeurs de l'HE, c'est pour cette raison qu'on emploie une boîte en verre hermétiquement clos d'un volume d'air de un litre (Ferhat, 2009).

I.5. IDENTIFICATION DES GENES CODANT POUR LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES PAR PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)

La mise en évidence des gènes qui confèrent la résistance aux antibiotiques se fait principalement par amplification d'un fragment d'ADN cible en utilisant la technique de « *Polymerase Chain Reaction* » (PCR). La PCR a été décrite en 1986 par Kary Mullis. Son principe est basé sur l'amplification d'une séquence d'ADN spécifique à l'aide d'une enzyme (ADN polymérase) afin d'obtenir une quantité de matériel génétique suffisante permettant sa détection (Rahman *et al.*, 2013).

I.5.1. Principe de PCR

La PCR peut être considérée comme une version simplifiée du processus de réplication de l'ADN qui se produit au cours de la division cellulaire. La PCR de base se compose de trois étapes : la dénaturation thermique de l'ADN cible, l'hybridation des amorces oligonucléotidiques de synthèse, et l'extension des amorces hybridées par une polymérase d'ADN (Hennekinne, 2010).

I.5.2. Protocole de PCR

Chaque cycle est constitué de cinq (05) étapes (**Wang *et al.*, 2008**) :

❖ La pré-dénaturation

C'est une étape de chauffage (20 à 15 min à 95°C) permettant de dérouler l'ADN matériel double brin en cassant les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique et de dénaturer des enzymes autres que la Taq polymérase qui pourraient se trouver dans la solution ;

❖ Dénaturation

Elle s'effectue entre 94°C et 95°C (Température de dénaturation) et dure environ une minute. A cette température, les liaisons hydrogènes ne peuvent plus se maintenir et l'ADN matériel double brin se dénature en simple brin (monocaténaire) ;

❖ Hybridation

Cette étape se déroule à une température comprise entre 40°C et 70°C (en fonction du pourcentage en GC de l'ADN) dite température d'hybridation des amorces. Durant cette étape les amorces vont s'hybrider de manières spécifiques aux extrémités 5' et 3' de la séquence d'ADN cible. Plus cette température est élevée, plus elle est sélective.

❖ Extension des amorces

La Taq polymérase qui se fixe aux extrémités des amorces pour démarrer la réplication, favorisant ainsi l'élongation des amorces le long des brins d'ADN. La Taq polymérase est une enzyme extraite de la bactérie thermophile, « *Thermus aquaticus* » qui a la particularité de synthétiser l'ADN à une température supérieure à 75°C ; contrairement à la plupart des ADN polymérases qui agissent à 37°C et surtout de rester stable à ces températures.

❖ Extension terminale

Le dernier cycle est suivi d'une phase d'extension terminale 10 minutes permettant l'élongation des amorces restantes dans le milieu réactionnel.

I.5.3. Composition du mélange réactionnel

La PCR est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend : la Taq polymérase qui est l'enzyme d'amplification, le chlorure de magnésium (MgCl₂) qui sert de cofacteur de l'enzyme, un couple d'amorces du gène à amplifier, l'eau de PCR, le DMSO ou solution Q 5X, le tampon de PCR 10X et les quatre dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) qui fournissent des nucléotides et de l'énergie nécessaire pour l'amplification de l'ADN. Ces derniers sont en excès dans le milieu réactionnel (**Rahman *et al.*, 2013**).

I.5.4. Révélation des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

La détection et l'analyse des produits PCR peuvent très rapidement être réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose. L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode de séparation des macromolécules en fonction de leur taille, de leur charge électrique et d'autres propriétés physiques.

I.5.5. Limites et risques de la réaction PCR

Malgré sa spécificité et sa sensibilité raisonnable, la PCR souffre de quelques problèmes limitant son utilisation à large échelle entre autre : Les amorces dont la séquence doit être complémentaire aux régions flanquantes du segment à amplifier. La composition du mélange réactionnelle doit être préparée et évaluée avant le début de l'analyse, car la PCR bien que aisée requière une minutie extrême. Le risque majeur de la PCR est la contamination ; ce dernier constitue un sérieux handicap pour l'application de la PCR comme technique de routine, d'où l'intérêt de procéder délicatement à la réalisation de l'amplification et d'y inclure des témoins positifs et négatifs. Afin de minimiser les risques d'obtention de résultats faussement positifs, des précautions rigoureuses doivent être prises : Les échanges de matériel entre les deux salles sont à éviter, de même que le port d'une blouse et de gants pour chaque manipulation est obligatoire (**O'Sullivan et al., 2011**). La technique de la PCR a été largement appliquée pour la détection rapide des espèces de staphylocoques. Le gain de temps par rapport aux techniques d'identification traditionnelles est considérable, est quelques heures au lieu de 3 jours. La technique ne cesse de s'affiner avec le temps afin de permettre une détection et une identification efficiente des Staphylocoques (**Corrigan et al., 2012**).

I.5.6. Différents types de PCR

On distingue deux types de PCR :

- ✓ La PCR en point final ou PCR classique au cours de laquelle les produits d'amplification sont analysés au stade terminal du processus analytique par dépôt sur un gel d'agarose et visualisation sous la forme d'une fluorescence après électrophorèse. Cette approche ne permet pas, toutefois, d'obtenir que des résultats qualitatifs (réponse présence/absence de la séquence cible).
- ✓ La PCR en temps réel ou PCR quantitative qui permet de détecter le produit de la PCR au fur et à mesure qu'il s'accumule. L'accumulation des séquences d'ADN cibles dans le milieu réactionnel se traduit par une augmentation d'une émission de fluorescence qui est détectée et quantifiée en temps réel, cycle par cycle.



CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES



II.1. MATERIEL

II.1.1. Matériel végétal

Plusieurs espèces de plantes médicinales utilisées dans le traitement de la typhoïde et dans la lutte contre les infections staphylococciques ont été récoltées dans la région du centre Cameroun durant la période allant d’Août 2013 à Septembre 2014. Ces plantes dont les parties utilisées sont présentées dans les Tableaux V et VI, ont été choisies sur la base des informations reçues auprès des tradithérapeutes et des vendeurs de plantes médicinales et des indications de la littérature. Leur identification botanique et leur authentification ont été effectuées à l’Herbier National du Cameroun sis à Yaoundé.

Tableau V: Plantes médicinales testées vis-à-vis de *S. Typhi*

N°	Nom Scientifique	Partie utilisée	N° de Référence	Zone de collecte
1	<i>Annickia chlorantia</i>	Ecorces	2133/SRF/CAM	Mont Eloumden
2	<i>Irvingia gabonensis</i>	Ecorces	48383/HNC	Mont Eloumden
3	<i>Chromolaena odorata</i>	Feuilles	952/SRF/CAM	Ngoa-Ekellé
4	<i>Musanga cecropioides</i>	Ecorces	20889/SRF/CAM	Mont Eloumden

Tableau VI: Plantes médicinales testées vis-à-vis de *S. aureus*

N°	Nom Scientifique	Partie utilisée	N° de Référence	Zone de collecte
1	<i>Chromolaena odorata</i>	Feuilles	952/SRF/CAM	Ngoa-Ekellé
2	<i>Erigeron floribundus</i>	Feuilles	48832/HNC	Ngoa-Ekellé
3	<i>Lantana camara</i>	Feuilles	49462/HNC	Ngoa-Ekellé
4	<i>Tridax procumbens</i>	Feuilles	19444/SRFCAM	Ngoa-Ekellé

Les informations recueillies auprès des tradithérapeutes ont également permis de constater qu’en plus d’utiliser des macérats de plante unique pour soigner la fièvre typhoïde, certains utilisent des mélanges de plusieurs plantes sous forme de décoction. Ainsi, quelques unes de ces décoctions ont été sélectionnées pour quelques tests dans cette étude. Leurs compositions sont présentées dans le Tableau VII.

Tableau VII: Composition des décoctions testées vis-à-vis de *S. Typhi*

Décoctions	Plantes utilisées	Quantités
N°1	<i>Allium cepa</i> (Oignon)	250 g
	<i>Allium sativum</i> (Ail)	200g
	<i>Citrus medica</i> (Cedratier)	15ml
	Lait non sucré	1000ml
N°2	<i>Bidens pilosa</i> (Colé-colé)	1,2g
	Ecorce d' <i>Annickia chlorantha</i> (Nfol)	69,3g
	Ecorce d' <i>Alstonia boonei</i> (Ekuk)	49,9g
	Fruit de <i>Picralima nitida</i> (Ebam)	168g
	Tiges de <i>Dracaena fragrans</i> (Dragonnier)	23,2g
	<i>Cymbopogon citratus</i> (Citronelle)	7,3g
	Feuilles d' <i>Eremomastax speciosa</i> (Elok dibi)	12,6g
	Tiges de <i>Costus sp.</i> (Minkuisa)	50,05g
	Feuilles d' <i>Aloes sp.</i>	24,02g
Eau	1000ml	
N°3	Ecorce de <i>Mangifera indica</i> (Andok)	137,9g
	Feuilles de <i>Psidium guajava</i> (Goyavier)	9,2g
	Fruit de <i>Picralima nitida</i> (Ebam)	59g
	Feuilles de <i>Carica papaya</i> (Fofa)	28,4g
	<i>Ocimum basilicum</i> (Basilic)	15,4g
Eau	1000ml	
N°4	Ecorce d' <i>Alstonia boonei</i> (Ekuk)	86,3g
	Fruit de <i>Citrus medica</i> (Cedratier)	37g
	Racines de <i>Panax ginseng</i> (Ginseng)	359g
	Ecorce d' <i>Entandrophragma sp.</i> (Sapeli blanc)	51g
	Eau	1000ml

II.1.2. Les antibiotiques

Les antibiotiques dont les modes d'action sont résumés dans les Tableaux VIII et IX ont été utilisés. Il s'agit de la Gentamicine, du Cotrimoxazole (Strides Acrolab Ltd), l'Erythromycine (Alice pharma Ltd), de la Ciprofloxacine (Maxheal Pharmaceuticals (India) Ltd.), du Chloramphénicol (Nanjing Baijingyu Pharmaceutical Co. Ltd), de la Vancomycine, de l'Amoxicilline et de l'Oxacilline.

Le choix de ces antibiotiques s'est basé sur leur fréquence d'utilisation dans la lutte contre la fièvre typhoïde et les infections staphylococciques mais aussi sur leur appartenance familiale.

Tableau VIII: Mode d'action des antibiotiques testés vis-à-vis de *S. Typhi*

Antibiotiques	Abréviation usuelle	Familles d'antibiotiques	Mode d'action
Ciprofloxacine	CIP	Quinolones	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques
Amoxicilline	AMX	Béta-lactamine	Inhibition de la synthèse de la paroi
Chloramphénicol	C	Phénicolés	Inhibition de la synthèse protéique
Gentamicine	GM	Aminosides	Inhibition de la synthèse protéique
Cotrimoxazole	SXT/TSU	Sulfamides	Antagonisme métabolique

Tableau IX: Mode d'action des antibiotiques testés vis-à-vis de *S. aureus*

Antibiotiques	Abréviation usuelle	Familles d'antibiotiques	Mode d'action
Gentamicine	GM	Aminosides	Inhibition de la synthèse protéique
Oxacilline	OSSA	Béta-lactamine	Inhibition de la synthèse de la paroi
Cotrimoxazole	SXT/TSU	Sulfamides	Antagonisme métabolique
Erythromycine	ERY	Macrolide	Inhibition de la synthèse protéique
Vancomycine	VNC	Glycopeptide	Inhibition de la synthèse de la paroi

II.1.3. Les souches bactériennes

Un isolat d'une bactérie Gram- dont *Salmonella enterica* Sérotype Typhi, qui est l'une des espèces les plus virulentes du genre *Salmonella* a été sélectionnée dans cette étude. Nous avons également effectué quelques tests avec une bactérie Gram+ *Staphylococcus aureus* NCTC 10652, impliquée dans les maladies de la peau et dans les infections nosocomiales. Ces souches ont été fournies par le laboratoire de microbiologie du Département des sciences des aliments de l'Université de Bologne.

II.1.4. Les milieux de culture

Plusieurs milieux de culture, dont la composition se trouve en annexe ont été utilisés au cours de ces travaux. Le bouillon nutritif pour le repiquage des souches et la détermination du paramètre d'inhibition CMI (concentration minimale inhibitrice). C'est un milieu qui permet la croissance des germes ne présentant pas d'exigences particulières. La gélose nutritive (Oxoid CM0003 Blades Biological Ltd) pour la vérification de la pureté des souche. La gélose Mueller-Hinton (Sharlau 02-277) pour l'analyse des diamètres des auréoles d'inhibition.

II.2. METHODES

II.2.1. Pré-cultures des souches bactériennes

Les pré-cultures de *S. Typhi* et de *S. aureus* ont été réalisées partant d'une copie de chaque souche. Une vérification de la pureté a été faite par la méthode des stries. Après incubation pendant 24 heures à 37 °C, une colonie isolée était inoculée dans un eppendorf contenant 1 mL de bouillon nutritif et incubé pendant 24 heures. Un double repiquage a ensuite été effectué à raison de 1mL dans 9 mL de bouillon nutritif. A la culture microbienne de 10 mL obtenue après incubation, 4,2 mL de glycérol ont été ajoutés. Le mélange obtenu a été reparti dans des eppendorfs qui étaient alors conservés à -24 °C. Avant chaque utilisation pour des tests, un triple repiquage de la bactérie était initié 72 heures avant pour la revivifier, à raison d'un repiquage toutes les 24 heures.

II.2.2. Préparation des extraits aqueux de plantes

Pour la préparation des macérats, les différentes parties de chaque plante récoltée ont été lavées à l'eau, séchées et finement broyées à l'aide d'un broyeur électrique. Les poudres obtenues sont macérées dans de l'eau selon un rapport de 10% (p/v) pendant 48heures. Les solutions sont filtrées sous vide sur papier filtre Watman N°1 et les filtrats recueillis séchés à l'étuve à 45 °C. Les extraits secs obtenus étaient conservés dans un réfrigérateur à 4 °C pour des utilisations ultérieures.

La préparation des décoctions, quant à elle, a été réalisée sur la base des recettes proposées par les tradithérapeutes pour le traitement de la fièvre typhoïde. En effet, les plantes récoltées ont été lavées, séchées et broyées. Les différents échantillons de poudres ont ensuite été pesés et l'ensemble mélangé suivant ce qui est présenté dans le Tableau VII. Les différentes solutions obtenues sont portées à ébullition pendant 30minutes puis refroidies à température ambiante. Les décoctions sont filtrées sous vide sur papier filtre Watman N°1 et les filtrats obtenus ont été séchés à l'étuve à 45°C. Les décoctions ainsi obtenues et codifiées Dec.1; Dec.2; Dec.3 et Dec.4 respectivement étaient conservées à 4°C pour des utilisations ultérieures.

II.2.3. Détermination de la concentration d'extrait de plantes à utiliser pour l'exposition des souches bactériennes

L'exposition des souches bactériennes dans le protocole d'induction, qui consiste à créer un environnement hostile à la bactérie sans toutefois empêcher sa croissance, nécessite qu'on utilise des concentrations sub-inhibitrices des substances antibactériennes (**Samuelsen *et al.*, 2005 ; Van der Horst *et al.*, 2011**).

Dans cette partie, il était donc question d'une part, de vérifier l'activité antibactérienne des substances à tester afin de sélectionner celles ayant la meilleure activité pour la suite du travail et d'autre part, de déterminer leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI).

II.2.3.1. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits de plantes et des antibiotiques par la méthode de diffusion sur milieu gélosé

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes et des antibiotiques utilisés a été déterminée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé (CASFM, 2020).

❖ Principe

La méthode des disques repose sur la diffusion des substances à tester de concentration connue, imprégnée sur les disques de papier filtre en contact avec le milieu de culture solide coulé dans les boîtes de Pétri, préalablement ensemencé d'un inoculum bactérien. Les boîtes de Pétri sont incubées dans des conditions appropriées au germe en étude. Après incubation, si la substance contenue dans les disques a une activité antibactérienne sur le germe ensemencé, une auréole d'inhibition de croissance sera observée autour de ces derniers (CASFM, 2020).

❖ Mode opératoire

Préparation des solutions d'extraits de plantes et d'antibiotiques à tester

Les solutions d'extraits de plantes ont été préparées en diluant 100 mg d'extrait brut dans 1 mL d'eau stérile pour une concentration de solution de 100 mg/mL (Kuete *et al.*, 2006). Les solutions d'antibiotiques ont été préparées à une concentration de 100 µg/mL.

Préparation de l'inoculum bactérien

Les souches bactériennes (*S. Typhi* et *S. aureus*), conservées au laboratoire sur milieu liquide (bouillon nutritif), ont été repiquées toutes les 24 heures pendant 3 jours successifs dans un bouillon nutritif pour leur revivification. Les cultures de 24 heures obtenues du troisième repiquage sont ensuite diluées de manière à obtenir des inocula d'une concentration de 10^6 UFC/mL susceptibles de donner des nappes de colonies semi confluentes sur milieu gélosé (Kuete *et al.*, 2006).

Préparation des disques imprégnés

Pour la préparation des disques imprégnés d'extrait de plantes, 20 µL de chaque solution d'extrait de plantes préparée à une concentration de 100 mg/mL ont été prélevés et déposés sur les différents disques de papier filtre (6 mm de diamètre).

Et pour l'imprégnation des disques par les antibiotiques, 10 µL de chaque solution d'antibiotique préparée à une concentration de 100 µg/mL ont été déposés sur les différents disques. Les disques imprégnés ont été séchés pendant 24 heures à 37°C pour évaporation totale du solvant. Le solvant utilisé (l'eau stérile) a été déposé sur les disques de papier afin de constituer les témoins de croissance.

Ensemencement par étalement

Le milieu de culture (gélose Mueller-Hinton) préparé, stérilisé et maintenu en surfusion a été coulé dans différentes boîtes de Pétri à hauteur de 4 mm. Après solidification, 100 µL d'inoculum bactérien ont été ensemencés par étalement et les boîtes ont été séchées pendant 15 min (**Carbonnelle et al., 1987**).

Dépôt des disques imprégnés et incubation

Les disques précédemment préparés ont été déposés à la surface du milieu ensemencé avec un écart suffisant pour éviter le chevauchement des zones d'inhibition. Les boîtes de Pétri ont été couvertes et laissées à température ambiante pendant 45 min pour une pré-diffusion des extraits et des antibiotiques, puis incubées à 37°C pendant 24 heures.

Lecture des résultats

La lecture des résultats a été faite en mesurant, à l'aide d'un pied à coulisse, les diamètres des auréoles d'inhibition autour des disques de papier filtre à l'extérieur de la boîte de Pétri fermée (Figure 11). Plus le diamètre de ces auréoles est grand plus la souche est sensible (**Choi et al., 2016**).

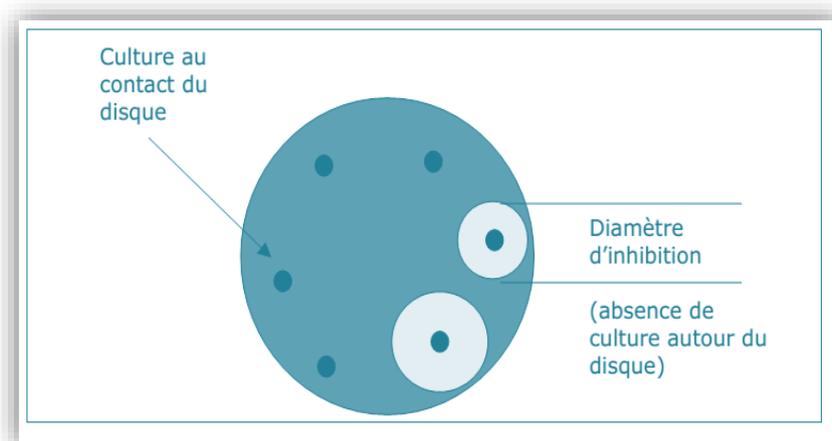


Figure 10: Diamètres des auréoles d'inhibition

II.2.3.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice par macrodillution

Principe

Elle consiste à cultiver une souche microbienne, sur un milieu liquide, contenant des concentrations décroissantes d'une substance à tester et à noter la concentration ne permettant pas une croissance visible du microorganisme (CASFM, 2020).

Mode opératoire

Une augmentation progressive en double des concentrations des différents extraits de plantes s'étalant de 0,1 mg/mL jusqu'à 1600 mg/mL a été réalisée. Pour les antibiotiques, la gamme de concentrations allait de 1 à 500 µg/mL. Par la suite, ces tubes ont étéensemencés avec un volume de 100 µL de l'inoculum (10^6 UFC/mL) et ont été incubés pendant 24 heures à 37°C. Les témoins d'expérience se constituaient d'un bouillon sans inoculum mais contenant la substance inhibitrice. Après incubation, la présence de trouble indiquait la croissance visible des bactéries, tandis que l'absence de trouble impliquait l'effet antibactérien des substances testées. La CMI a été déterminée comme étant la plus petite concentration ayant inhibée toute croissance visible à l'œil nu (Sopa *et al.*, 2008).

II.2.4. Mise en évidence de l'induction de la résistance de *S. Typhi* et de *S. aureus* aux antimicrobiens par leur exposition aux extraits de plantes

Ce test qui se base sur la réalisation quotidienne de cultures de chaque souche en présence, puis en absence de l'antimicrobien à des concentrations fixes ou variables durant une période déterminée, a été réalisé selon la méthode développée par Van der Horst *et al.* en 2011 avec quelques modifications.

La mise en évidence de l'implication des extraits de plantes dans le mécanisme d'induction de la résistance s'est faite en trois étapes. Tout d'abord, une étude a été réalisée sur l'impact de l'exposition des souches bactériennes (*S. Typhi* et *S. aureus*) aux extraits de plantes sur leur sensibilité aux antibiotiques pendant le protocole d'induction. Ensuite, le travail s'est poursuivi avec l'extrait de plante *Annickia chlorantha*, le plus actif de tous les extraits testés vis-à-vis de *S. Typhi*, pour évaluer l'impact de la concentration d'extrait de plante sur le développement d'une antibiorésistance par cette souche. Et enfin, une étude sur l'impact que l'exposition de cette souche aux extraits de plantes aurait sur sa capacité à développer une résistance aux substances végétales s'est faite.

II.2.4.1. Etude de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques pendant le protocole d'induction de la résistance

✓ Sélection des antimicrobiens utilisés

Plusieurs macérats et décoctions de plantes ont été utilisés pour les essais préliminaires. De toutes ces plantes, celles ayant présenté les activités antimicrobiennes les plus importantes ont été retenues pour l'induction.

Les concentrations des antimicrobiens utilisés pour l'exposition ont été fixées sur la base des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues dans les tests préliminaires. Ainsi, une concentration d'extrait de plante susceptible de ne pas inhiber la croissance bactérienne inférieure à la CMI de l'extrait de plante ayant présenté la plus petite CMI, a été retenue pour le protocole d'induction de la résistance.

✓ Mode opératoire

Les deux souches bactériennes (*S. Typhi* et *S. aureus*) ont été cultivées toutes les 24 heures pendant 14 jours dans un bouillon nutritif contenant les extraits de plantes à concentration fixe (soit 0,5 mg/mL pour chaque extrait). Les souches témoins ont été cultivées dans un bouillon nutritif sans antimicrobien selon la même procédure. Lorsque la croissance était visible dans les tubes, 100 µL de cette culture étaient prélevés pour inoculer un nouveau bouillon nutritif contenant la même concentration d'extrait de plante (**Van der Horst et al., 2011**). Les diamètres des auréoles d'inhibition des différents antibiotiques et des différents extraits testés vis-à-vis des souches étudiées exposées ou non aux extraits de plantes étaient évaluées toutes les 48 heures en utilisant la méthode de diffusion des disques décrite précédemment (**CASFM, 2020**).

Après 14 jours d'exposition aux extraits de plantes correspondants à la « phase d'exposition », les souches étaient à nouveau cultivées toutes les 24 heures pendant 14 jours supplémentaires dans un bouillon nutritif sans extraits de plantes correspondant à la « phase de non exposition », afin de vérifier la stabilité d'une éventuelle résistance acquise (**Van der Horst et al., 2011**). Un antibiogramme était également réalisé toutes les 48 heures.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches exposées aux extraits de plantes dans le temps s'est basée sur la détermination de deux indices codifiés Δ_P et Δ_A .

Les formules de Δ_p et de Δ_A sont les suivantes :

$$\Delta_P(X) = \delta_P(X) - \delta_P(Te) ; \quad \Delta_A(X) = \delta_A(X) - \delta_A(Te)$$

Δ_P (mm) : Différence entre les diamètres d'inhibition des antibiotiques testés sur la souche exposée pendant 14 jours de celles des antibiotiques testés sur la souche initiale. La souche initiale est celle n'ayant pas été en contact avec les extraits de plantes ;

Δ_A (mm) : Différence entre les diamètres d'inhibition des antibiotiques testés sur la souche issue de l'exposition, et repiquée pendant 14 jours dans un milieu sans extrait de plante, de celles des antibiotiques testés sur la souche initiale ;

δ_P (X) (mm) : Différence entre les diamètres d'inhibition, du premier jour (J1) et du quinzième jour (J15) d'exposition, des antibiotiques testés sur la souche exposée à un extrait de plante ;

δ_A (X) (mm) : Différence entre les diamètres d'inhibition, du dernier jour de la phase de non exposition (J29) et du dernier jour de la phase d'exposition (J15), des antibiotiques testés sur la souche issue de l'exposition à un extrait de plante et repiquée dans un milieu sans extrait ;

X : Type d'extrait de plante utilisé pour l'exposition ;

Te : Témoin (il s'agit de la souche repiquée dans un bouillon nutritif ne contenant pas d'extrait de plante).

Ainsi :

Si $\Delta_P > 0$, la souche devient moins sensible aux antibiotiques durant la phase d'exposition ;

Si $\Delta_P < 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques durant la phase d'exposition ;

Si $\Delta_P = 0$, la sensibilité de la souche est constante ;

Si $\Delta_A < 0$, la souche issue de la phase d'exposition devient moins sensible aux antibiotiques durant la phase de non exposition ;

Si $\Delta_A > 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques durant la phase de non exposition ;

Si $\Delta_A = 0$, la sensibilité de la souche préalablement exposée est constante.

Dans le but d'évaluer la résistance développée par les souches bactériennes aux antibiotiques après le protocole d'induction, la différence $\Delta_P - \Delta_A$ a été prise en compte.

Ainsi :

Si $\Delta_P - \Delta_A > 0$, la souche a développé une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé ;

Si $\Delta_P - \Delta_A < 0$, la souche n'a pas développé une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé ;

Si $\Delta_P - \Delta_A = 0$, la souche est restée stable.

II.2.4.2. Evaluation de l'impact de la concentration d'extrait de plante sur les capacités d'induction d'une antibiorésistance bactérienne

Pour chaque médicament, il existe une dose usuelle et une dose maximale. Mais concernant les médicaments à base de plantes, aucune réglementation n'est mise en œuvre pour

garantir une utilisation rationnelle de ces médicaments. Ainsi, différentes posologies sont exploitées par les tradithérapeutes dans la lutte contre les infections bactériennes telle que la fièvre typhoïde. Il était donc nécessaire d'évaluer l'impact que pourrait avoir la variation des doses d'extraits de plantes sur le mécanisme d'induction de la résistance de cette souche. Pour cette étude, *S. Typhi* a été utilisé comme bactérie test et la plante utilisée pour la variation des différentes concentrations d'extrait était *Annickia chlorantha*, ceci à cause de sa forte activité antibactérienne.

Le protocole utilisé était le même que celui de la méthode d'induction de la résistance décrite plus haut. Mais au lieu d'utiliser une seule concentration fixe d'extrait de plante pour l'exposition de la souche bactérienne, le travail s'est fait avec trois concentrations fixes sub-inhibitrices. Pour obtenir ces trois concentrations, la concentration fixe (0,5 mg/mL) utilisée dans le protocole général d'induction de la résistance a été doublée et ensuite triplée pour obtenir : 0,5 mg/mL, 1 mg/mL et 1,5 mg/mL. Les analyses ont été faites durant les 14 jours de la phase d'exposition et un antibiogramme était réalisé toutes les 48h (**Van der Horst *et al.*, 2011**).

II.2.4.3. Etude de la sensibilité bactérienne aux extraits de plantes pendant le protocole d'induction de la résistance

Les cas de résistance de la fièvre typhoïde au traitement traditionnel suscite un intérêt quand à l'impact que l'exposition de *S. Typhi* aux extraits de plantes pourrait avoir sur sa capacité à développer une résistance aux substances végétales.

Le protocole utilisé était le même que celui décrit précédemment pour l'induction de la résistance aux antibiotiques. Pour l'exposition, deux de nos meilleurs extraits constitués de plante unique à savoir *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis* ont été utilisés. En plus de ces deux extraits, un mélange constitué d'un extrait de plante (*Annickia chlorantha*) et d'un antibiotique (Chloramphénicol) a également été testé. Le choix de ce mélange était dû au fait que les populations souffrant de fièvre typhoïde combinent souvent le traitement moderne au traitement traditionnel. Les extraits de plantes testés à la place des antibiotiques étaient : *Annickia chlorantha*, *Irvingia gabonensis*, *Musanga cecropioides* et de *Chromolaena odorata*. Afin de confirmer la résistance développée par *S. Typhi* issue du protocole d'induction, les CMI des extraits de plantes testés sur cette souche après le processus ont été déterminées.

II.2.5. Etude des mécanismes d'acquisition de la résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques étant associée à la présence dans le génome d'une bactérie des gènes cibles des antibiotiques, cinq de ces gènes ont été recherchés par PCR

dans le génome des échantillons de *S. Typhi* issus du protocole d'induction de la résistance aux antibiotiques.

Il s'agit à cet effet des gènes :

- **blaTEM** codant pour la résistance à l'ensemble des β -lactamines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes ;
- **blaSHV** codant pour la résistance à l'ensemble des β -lactamines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes ;
- **sulI** codant pour la résistance aux sulfamides (cotrimoxazole) ;
- **floR** codant pour la résistance aux phénicolés (chloramphénicol) ;
- **int1** codant pour la résistance à plusieurs antibiotiques.

Ces gènes ont été sélectionnés sur la base de leur fréquence d'apparition chez *S. Typhi* et sur la base des différentes familles d'antibiotiques pour lesquelles cette souche a développé une résistance durant le protocole d'induction de la résistance.

Les différents échantillons de *S. Typhi* testés étaient les suivants :

- **St_T** : échantillon de *S. Typhi* initial témoin non exposé
- **St_{Ec}** : échantillon de *S. Typhi* exposé à *Annickia chlorantha*
- **St_g** : échantillon de *S. Typhi* exposé à *Irvingia gabonensis*
- **St_{Ep+A}** : échantillon de *S. Typhi* exposé au mélange Extrait de plante (*Annickia chlorantha*) et Antibiotique (chloramphénicol)

Pour confirmer la résistance développée par ces échantillons durant le protocole d'induction de la résistance aux antibiotiques, les CMI des différents antibiotiques testés sur cette souche avant de commencer la recherche des gènes ont été déterminées.

Les gènes cibles ont été recherchés dans le but de déterminer le mécanisme d'acquisition de la résistance aux antibiotiques induite par l'exposition de cette souche aux antibiotiques.

Les différentes séquences d'amorces utilisées pour la détection de ces gènes sont consignées dans le Tableau X.

Tableau X: Séquences d'amorces utilisées pour la détection des gènes cibles des antibiotiques

Gènes	Amorces	Séquences des amorces	Nature du gène	Fonction codée	Taille du gène (pb)	Références
<i>TEM</i>	TEM-F	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	Gène cible des β -lactamines	Résistance à l'ensemble des β -lactamines à l'exception des Céphamycines et des Carbapénèmes	1080	Weill <i>et al.</i>, 2004
	TEM-R	GACAGTTACCAATGCTTAATCA				
<i>SHV</i>	SHV-INT-F	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	Gène cible des β -lactamines	Résistance à l'ensemble des β -lactamines à l'exception des Céphamycines et des Carbapénèmes	650	Weill <i>et al.</i>, 2004
	SHV-INT-R	GATTTGCTGATTTGCTCGG				
<i>SulI</i>	Sul-F	TTTCCTGACCCTGCGCTCTAT	Gène cible du cotrimoxazole	Résistance aux sulfamides	793	Toleman <i>et al.</i>, 2007
	Sul-R	GTGCGGACGTAGTCAGCGCCA				
<i>floR</i>	floR-F	ATGACCACCACACGCCCCG	Gène cible du chloramphénicol	Résistance aux phénicolés	198	Toleman <i>et al.</i>, 2007
	floR-R	AGACGACTGGCGACTTCTTCG				
<i>Int1</i>	INT-3'-CS	GGCATCCAAGCAGCAAGC	Groupe de gènes cibles des antibiotiques	Capture et expression des gènes cibles pour la résistance aux antibiotiques	1950	Lévesque <i>et al.</i>, 1995
	INT-5'-CS	AAGCAGACTTGACCTGAT				

II.2.5.1. Extraction et test de pureté de l'ADN

Le kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep qui a été utilisé pour l'extraction est conçu pour purifier l'ADN d'un large éventail d'échantillons. Pour y parvenir, à partir des cultures pures des différents échantillons de *S. Typhi* de 18 à 24 heures sur gélose MH, une suspension bactérienne a été préparée dans un tube Eppendorf de 1,5 mL contenant 200 µL d'eau pour biologie moléculaire. Par la suite, un protocole à 12 étapes détaillé en annexe 2 a été suivi pour l'extraction et la purification de l'ADN. Afin de vérifier la pureté de l'ADN total recueilli, une partie de cet ADN a été révélée par électrophorèse sur gel d'agarose concentré 1,5% préparé à l'aide du tampon Tris Borate EDTA (TBE) 1X. L'autre partie ayant été conservé à -20°C. Avant chaque utilisation, l'extrait d'ADN était décongelé à température ambiante.

II.2.5.2. Préparation des mélanges réactionnels

Les mélanges réactionnels (Mix) ont été préparés dans une salle exempte de tout matériel biologique, sous une hotte à flux laminaire préalablement stérilisée pendant 30 minutes aux radiations ultraviolettes (UV) et contenant tous les consommables stériles nécessaires à la manipulation. Les réactifs utilisés pour la préparation de chaque Mix conservés dans un bac à glaçon, de même que leurs quantités respectives utilisées au cours de l'étude sont présentés dans le Tableau XI ci-dessous.

Tableau XI: Mélanges réactionnels des PCR de détection génétique de la résistance aux antibiotiques

Réactifs (Concentration initiale)	Concentration finale	Volume par échantillon (µL)
Eau pour biologie moléculaire	/	28,75
Q Solution	5X	5
Tampon 10X	1X	5
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	4
dNTP (20 mM)	200 µM	0,5
Amorces (10µM)	Sens	50 pM
	Anti-sens	50 pM
<i>Taq</i> polymérase (5 U/µL)	1,25 U	0,25

II.2.5.3. Mélange Mix-ADN

La recherche des gènes de résistance aux antibiotiques s'est faite dans 48,5 µL de mélange réactionnel additionné de 1,5 µL d'extrait d'ADN. Un témoin négatif (tube dans lequel l'extrait d'ADN sera remplacé par de l'eau de biologie moléculaire) nécessaire pour déceler d'éventuelles contaminations a été introduit dans chaque série d'amplification.

II.2.5.4. Amplification

Les tubes contenant les mélanges Mix-ADN ont été introduits dans un thermocycleur (gen Amp 9700) pour l'amplification. Le thermocycleur a permis d'exposer les tubes à différentes températures choisies et pour des durées déterminées par le manipulateur. Les programmes d'amplification des ADN utilisés pour tous les gènes recherchés sont présentés dans le tableau XII.

Tableau XII: Programmes d'amplification des ADN pour la détection génétique de la résistance aux antibiotiques

Gène / supports	Dénaturation	35 cycles			Elongation
	Initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Terminale
<i>BlaSHV</i>	10 min à 94°C	30 s à 94°C	30 s à 47°C	1 min à 72°C	10 min à 72°C
<i>BlaTEM</i>	10 min à 94°C	30 s à 94°C	30 s à 47°C	1 min à 72°C	10 min à 72°C
<i>Int1</i>	10 min à 94°C	30 s à 94°C	30 s à 55°C	2 min à 72°C	10 min à 72°C
<i>Sul1</i>	5 min à 95°C	30 s à 94°C	30 s à 55°C	30 s à 72°C	10 min à 72°C
<i>floR</i>	5 min à 95°C	30 s à 94°C	30 s à 55°C	30 s à 72°C	10 min à 72°C

II.2.5.5. Révélation des produits d'amplification

Les tubes contenant les produits d'amplification ont été transférés dans la salle post-PCR pour la révélation de ces derniers par électrophorèse sur gel d'agarose concentré 1.5% préparé à l'aide du tampon Tris Borate EDTA (TBE) 1X, servant également de tampon de migration. Un volume de 10 µL de Bromure d'Ethidium (BET) a été ajouté à 200 mL de gel avant sa polymérisation. Le BET est une substance fluorescente sous rayonnement UV qui s'intercale entre les brins de la molécule d'ADN permettant ainsi de matérialiser la présence du gène recherché. 10 µL de chaque produit d'amplification ont ensuite été ajoutés à 3 µL de tampon de charge puis introduit dans un puits du gel. Un volume de 3 µL de marqueur de poids moléculaire 100 pb a également été déposé dans un puits pour permettre l'estimation de la taille des produits d'amplification. Après 15 minutes de migration environ, le gel a été observé sous rayonnement UV dans un transilluminateur. Les tailles des fragments d'ADN vus sur un

moniteur électronique étaient estimées par comparaison avec les bandes du marqueur de poids moléculaire.

II.2.6. Analyses statistiques

Le tableur Microsoft Excel 2007 a été utilisé pour le calcul des moyennes, des indices et le tracé des courbes et des graphiques. La comparaison de ces moyennes s'est faite en utilisant le test Anova au seuil de probabilité 5% ($p < 0,05$) grâce au logiciel SPSS Statistics 20.0 pour Windows.



**CHAPITRE III : RESULTATS ET
DISCUSSION**



III.1. RESULTATS

III.1.1. Concentration d'extrait de plante à utiliser pour l'exposition de *S. Typhi* et de *S. aureus*

Les tests préliminaires réalisés dans cette partie ont permis d'une part, de vérifier l'activité antibactérienne des extraits de plantes et des antibiotiques à tester ; et d'autre part, de déterminer leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI) afin de fixer la concentration sub-inhibitrice d'extrait de plante à utiliser pour l'exposition de *S. Typhi* et de *S. aureus* dans le protocole d'induction de la résistance.

III.1.1.1. Profil de sensibilité de *S. Typhi* et de *S. aureus* aux extraits de plantes et aux antibiotiques

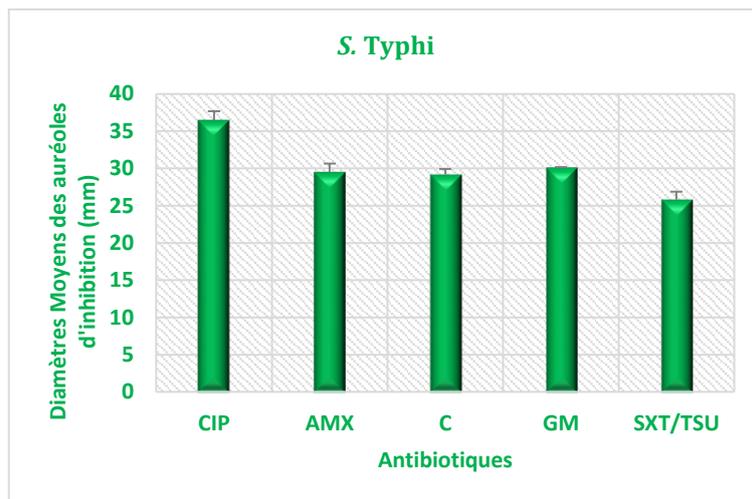
La sensibilité des souches bactériennes (*S. Typhi* et *S. aureus*) vis-à-vis des différents antimicrobiens étudiés durant le protocole d'induction de la résistance ayant été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé à partir des disques imprégnés de la substance étudiée, une analyse préliminaire de l'activité antimicrobienne de ces substances a été réalisée afin d'évaluer leur impact sur les souches initiales non exposées aux extraits de plantes.

L'analyse des diamètres des auréoles d'inhibition obtenus et présentés dans les Figures 11, 12, 13 et 14 traduisant l'activité antimicrobienne de la substance, montre que *S. Typhi* et *S. aureus* sont sensibles aussi bien aux antibiotiques qu'aux extraits de plantes testés.

Les activités antimicrobiennes des extraits de plantes restent cependant bien inférieures à celles des antibiotiques. Que ce soit pour les extraits obtenus à partir des feuilles ou des écorces, que pour ceux obtenus à partir du mélange d'organes de plusieurs plantes (décoctions).

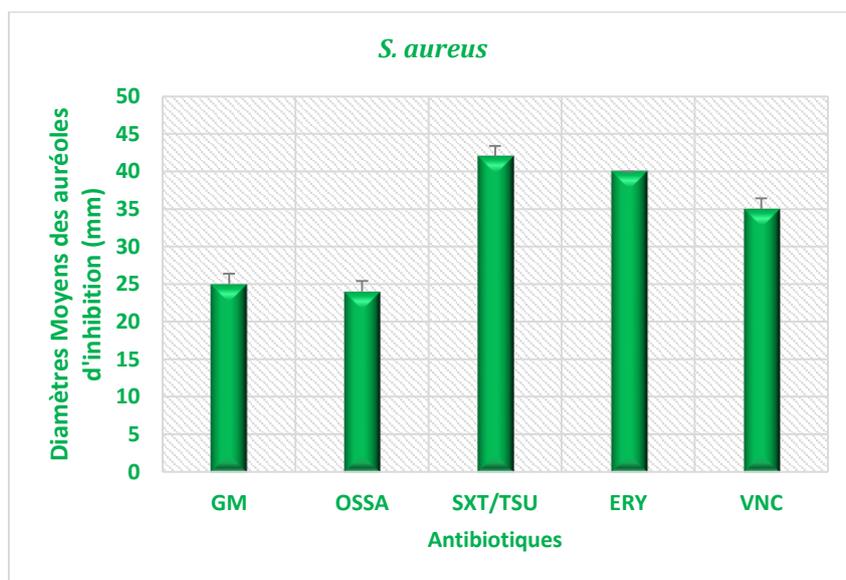
Concernant *S. Typhi*, il a été constaté que les diamètres des auréoles d'inhibition oscillent entre 25,83 mm et 36,43 mm pour les antibiotiques, tandis que ceux des extraits de plantes varient entre 9,00 mm et 13,00 mm (Figures 11 et 13). Quant à *S. aureus*, les diamètres des auréoles d'inhibition des antibiotiques oscillent entre 24,00 mm et 42,00 mm tandis que ceux des extraits de plantes varient entre 7,50 mm et 12,00 mm (Figures 12 et 14).

S'agissant des antibiotiques, la Ciprofloxacine, la Gentamicine et l'Amoxicilline sont les plus actifs vis-à-vis de *S. Typhi*, tandis que le Cotrimoxazole est l'antibiotique le moins actif sur cette souche avec un diamètre d'inhibition de 25,83 mm (Figures 11). Quant à *S. aureus*, la Vancomycine, l'Erythromycine et le Cotrimoxazole sont les antibiotiques les plus actifs avec des diamètres d'auréoles d'inhibition de 35 mm, 40 mm et de 42 mm respectivement. L'Oxacilline a le diamètre d'inhibition le plus bas soit 24 mm (Figures 12).



CIP : Ciprofloxacine, AMX : Amoxicilline, C : Chloramphénicol, GM : Gentamicine, SXT/TSU : Cotrimoxazole

Figure 11: Diamètres moyens des auréoles d’inhibition de la croissance bactérienne de *S. Typhi* en présence d’antibiotiques

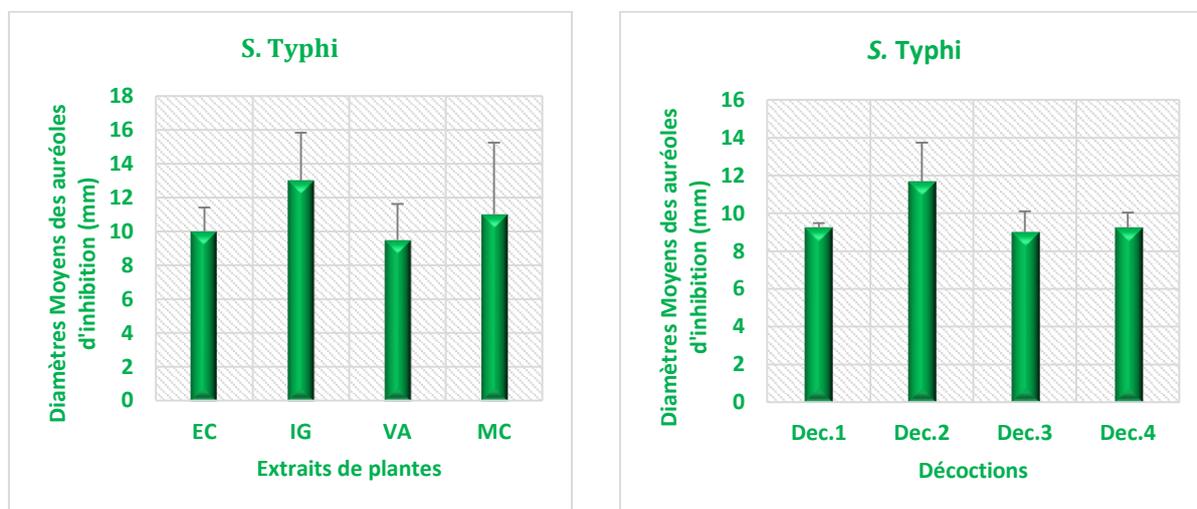


GM: Gentamicine, OSSA: Oxacilline, SXT/TSU: Cotrimoxazole, ERY: Erythromycine, VNC: Vancomycine

Figure 12: Diamètres moyens des auréoles d’inhibition de la croissance bactérienne de *S. aureus* en présence d’antibiotiques

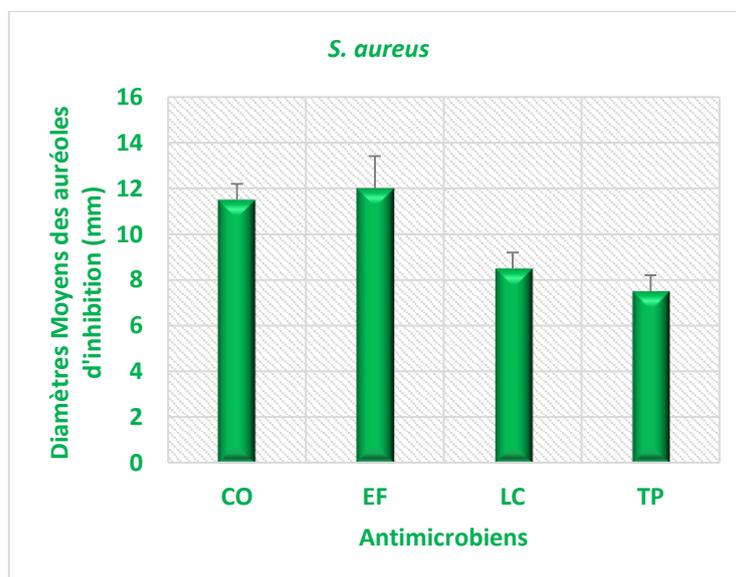
Concernant l’activité des plantes, *Annickia chlorantha*, *Musanga cecropioides*, *Déc.2* et *Irvingia gabonensis* présentent les meilleures activités antibactériennes vis-à-vis de *S. Typhi* avec pour diamètres d’auréoles d’inhibition respectifs 10 mm, 11 mm, 11,67 mm et 13,00 mm (Figure 13). Par ailleurs, *Chromolaena odorata* et *Erigeron floribundus* avec des diamètres d’inhibition respectifs 11,50 mm et 12,00 mm, sont les extraits les plus actifs vis-à-vis de *S.*

aureus, tandis que *Tridax procumbens* a la plus faible activité vis-à-vis de cette même souche avec un diamètre d'inhibition de 7,5 mm (Figure 14).



EC : *Annickia chlorantha*, IG : *Irvingia gabonensis*, VA : *Voacanga africana*, MC : *Musanga cecropioides*, Dec.1 : Décoction1, Dec.2 : Décoction2, Dec.3 : Décoction3, Dec.4 : Décoction4

Figure 13: Diamètres moyens des auréoles d'inhibition de la croissance bactérienne de *S. Typhi* en présence des extraits de plantes



CO : *Chromolaena odorata*, EF : *Erigeron floribundus*, LC : *Lantana camara*, TP : *Tridax procumbens*

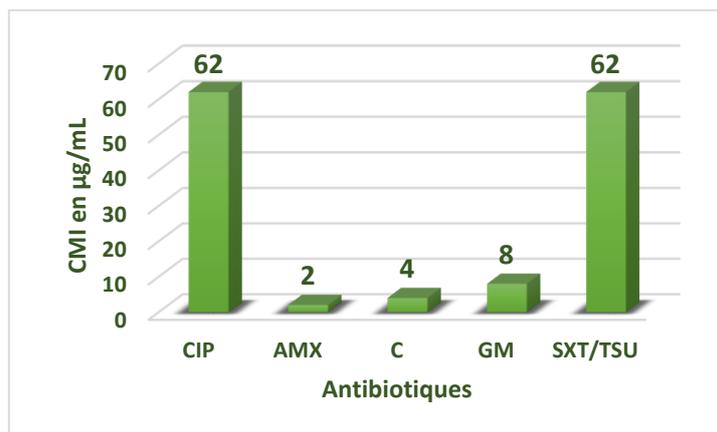
Figure 14: Diamètres moyens des auréoles d'inhibition de la croissance bactérienne de *S. aureus* en présence des extraits de plantes

III.1.1.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les CMI des antibiotiques et des extraits de plantes testés précédemment sur les souches bactériennes *S. Typhi* et *S. aureus*, ont été déterminées afin de mieux apprécier la sensibilité de ces souches à ces antimicrobiens et de fixer leurs concentrations sub-inhibitrices à utiliser dans le protocole d'induction de la résistance.

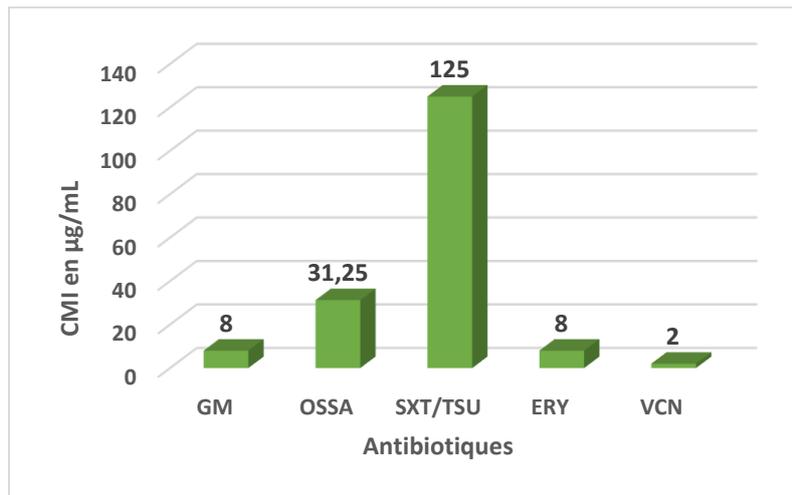
Les résultats obtenus et présentés sur les Figures 15, 16, 17, 18 et 19 montrent que l'activité antibactérienne des antibiotiques est largement supérieure à celle des extraits de plantes. En effet, les valeurs des CMI des antibiotiques sont plus de 1000 fois supérieures à celles des CMI des extraits de plantes.

Parmi les antibiotiques testés sur *S. Typhi*, il ressort de la Figure 15 que l'amoxicilline a la valeur de CMI la plus basse soit 2 µg/mL. Les résultats présentés sur la Figure 16 montrent que parmi les antibiotiques testés sur *S. aureus*, c'est la Vancomycine qui a la valeur de CMI la plus basse (2 µg/mL).



CIP : Ciprofloxacine, AMX : Amoxicilline, C : Chloramphénicol, GM : Gentamicine, SXT/TSU : Cotrimoxazole.

Figure 15: CMI des antibiotiques (µg/mL) testés sur *S. Typhi*



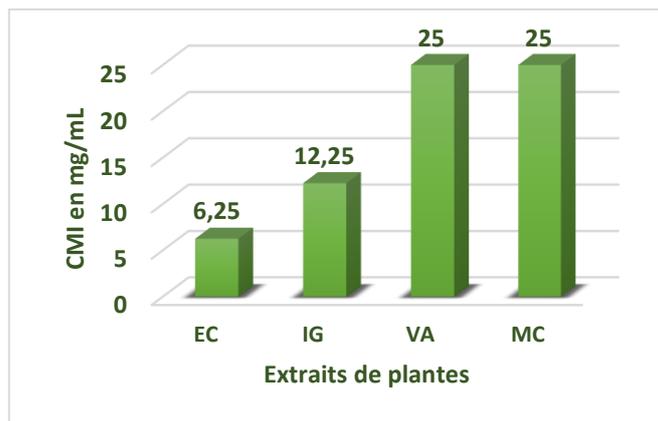
GM : Gentamicine, OSSA : Oxacilline, SXT/TSU : Cotrimoxazole, ERY : Erythromycine, VCN : Vancomycine

Figure 16 : CMI des antibiotiques (µg/mL) testés sur *S. aureus*

Concernant les extraits de plantes, les valeurs des CMI obtenues sont présentées sur les Figures 17, 18 et 19. Ces valeurs varient d'un extrait à un autre et d'une bactérie à une autre. Cependant, les extraits à base de plusieurs plantes (décoctions) présentent une activité inhibitrice bien plus inférieure à celles des autres extraits à base de plante unique.

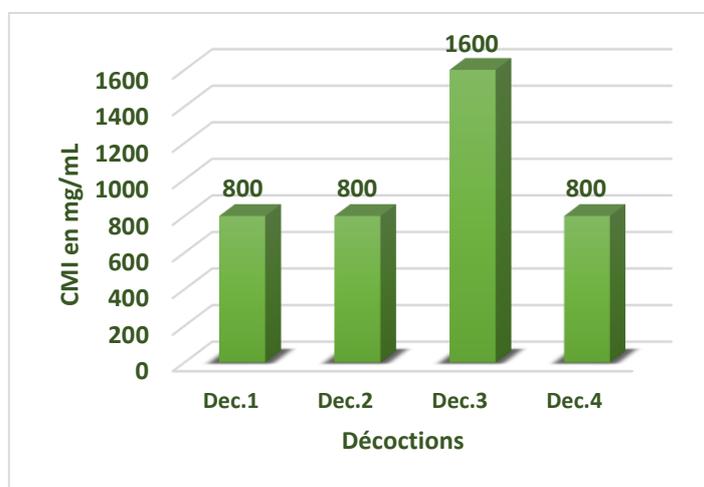
Selon les résultats obtenus dans les tests de diffusion en milieu gélosé, les extraits de plante : *Annickia chlorantha*, *Musanga cecropioides*, Déc.2 et *Irvingia gabonensis* ont présenté les meilleures activités antibactériennes vis-à-vis de *S. Typhi*. Cependant, les valeurs des CMI obtenues et présentées sur les Figures 17 et 18 ont permis de confirmer la forte activité des extraits *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis* avec des CMI respectivement égales à 6,25 mg/mL et 12,25 mg/mL.

Les résultats des CMI des extraits de plante testés sur *S. aureus* présentés sur la Figure 19 ont permis de confirmer la forte activité de *Chromolaena odorata* vis-à-vis de cette souche par rapport à tous les autres extraits testés sur la même souche. En effet, cet extrait a la plus petite CMI, soit 6,25 mg/mL. Les autres extraits moins actifs vis-à-vis de *S. aureus* ont une CMI similaire égale à 25 mg/mL.



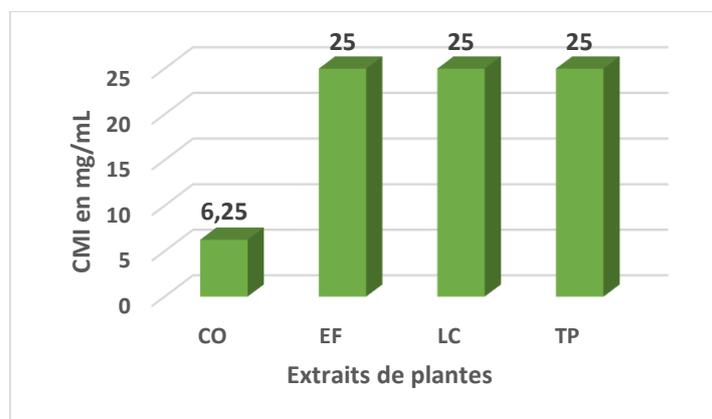
EC: *Annickia chlorantha*, IG: *Irvingia gabonensis*, VA: *Voacanga africana*, MC: *Musanga cecropioides*

Figure 17: CMI des extraits de plantes (mg/mL) testés sur *S. Typhi*



Dec.1 : Décoction1, Dec.2 : Décoction2, Dec.3 : Décoction3, Dec.4 : Décoction4

Figure 18: CMI des décoctions (mg/mL) testés sur *S. Typhi*



CO: *Chromolaena odorata*, EF: *Erigeron floribundus*, LC: *Lantana camara*, TP: *Tridax procumbens*

Figure 19: CMI des extraits de plantes (mg/mL) testés sur *S. aureus*

Les valeurs des diamètres des auréoles d'inhibition et des CMI ont montré que *S. Typhi* et *S. aureus* sont sensibles aussi bien aux antibiotiques testés qu'aux extraits de plantes, mais que l'activité antimicrobienne des antibiotiques est largement supérieure à celles des extraits de plantes. Les résultats obtenus dans cette étude préliminaire ont révélé que les plantes les plus actives vis-à-vis de *S. Typhi* et de *S. aureus* sont : *Annickia chlorantha*, *Irvingia gabonensis*, *Chromolaena odorata* et *Erigeron floribundus*. Celles-ci ont été retenues pour la suite du travail. Sur la base de la plus petite CMI des extraits de plantes obtenue à savoir 6,25 mg/mL, la concentration d'extrait à utiliser pour l'exposition des souches dans le but d'induire leur résistance était fixée à 0,5 mg/mL.

III.1.2. Résistance de *S. Typhi* et de *S. aureus* aux antibactériens induite par leur exposition aux extraits de plantes

L'exposition en continue de *S. Typhi* et de *S. aureus* aux extraits de plantes à des concentrations fixes s'est traduite par une variation de leur profil de sensibilité aux antimicrobiens testés. Cette variation de la sensibilité se caractérise par une modification des diamètres des auréoles d'inhibition des antibiotiques, aussi bien durant la phase d'exposition aux extraits de plantes, qu'après cette phase. Les variations observées dépendent toutefois de l'antibiotique testé, de la souche et de l'extrait de plante utilisé durant la phase d'exposition. Les différentes valeurs des diamètres des auréoles d'inhibition obtenues toutes les 48h pour chaque antimicrobien utilisée ont permis de suivre leurs variations dans le temps.

Deux indices de sensibilité ont été calculés à partir des valeurs contenues dans les Tableaux XIII, XIV, XV et XVI. Il s'agit de :

- L'indice Δ_p représentant la différence entre les diamètres d'inhibition des antibiotiques testés sur la souche exposée pendant 14jours de celles des antibiotiques testés sur la souche initiale (la souche initiale est celle n'ayant pas été en contact avec les extraits de plantes) et de ;
- L'indice Δ_A représentant la différence entre les diamètres d'inhibition des antibiotiques testés sur la souche issue de l'exposition, et repiquée pendant 14jours dans un milieu sans extrait de plante, de celles des antibiotiques testés sur la souche initiale.

Tableau XIII : Diamètres moyens des auréoles d'inhibition des antibiotiques testés sur *S. Typhi* exposée ou non à *Annickia chlorantha*.

Valeurs des diamètres d'inhibition des antibiotiques testés sur <i>S. Typhi</i> pendant et après son exposition à <i>Annickia chlorantha</i> (mm)					
Jours	CIP	AMX	C	GM	SXT
1	36,43±1,25	29,50±0,71	29,17±0,76	30,10±0,10	25,83±1,04
3	19,50±0,71	29,50±0,71	19,50±0,71	14,00±1,41	18,50±0,00
7	15,00±1,41	29,00±1,41	11,50±2,12	9,00±0,00	10,00±1,40
15	16,00±0,00	17,50±0,71	14,00±1,41	11,00±1,41	19,00±0,00
25	15,00±1,41	21,00±0,00	15,00±1,41	14,50±0,71	18,00±0,00
29	19,50±0,71	28,50±0,71	15,00±1,41	12,50±2,12	18,00±0,00
Valeurs des diamètres d'inhibition des antibiotiques testés sur <i>S. Typhi</i> repiquée en absence de tout extrait de plante (mm)					
Jours	CIP	AMX	C	GM	SXT
1	36,43±1,25	23,67±1,15	29,17±0,76	30,10±0,10	25,83±1,04
3	21,50±3,54	29,00±1,41	19,00±0,00	15,50±0,71	17,50±0,71
7	19,00±0,00	31,00±2,83	20,00±1,41	14,00±0,00	15,50±4,95
15	20,00±2,83	20,00±0,00	17,00±0,00	15,00±0,00	18,00±0,00
25	18,50±0,71	22,50±0,71	15,00±0,00	16,00±0,00	20,00±0,00
29	19,50±0,71	29,50±2,12	15,00±0,00	14,50±0,71	19,00±0,00

CIP: Ciprofloxacine, AMX: Amoxicilline, C: Chloramphénicol, GM: Gentamicine, SXT/TSU: Cotrimoxazole.

Tableau XIV : Diamètres moyens des auréoles d'inhibition des antibiotiques testés sur *S. Typhi* exposée ou non à *Irvingia gabonensis*.

Valeurs des diamètres d'inhibition des antibiotiques testés sur <i>S. Typhi</i> pendant et après son exposition à <i>Irvingia gabonensis</i> (mm)					
Jours	CIP	AMX	C	GM	SXT
1	36,43±1,25	23,67±1,15	29,17±0,76	30,10±0,10	25,83±1,04
3	22,00±1,41	29,50±0,71	21,00±0,00	13,00±0,00	18,50±0,71
7	12,00±1,41	27,00±2,83	15,50±2,12	11,00±0,00	14,50±0,71
15	15,00±2,83	21,00±2,83	16,00±0,00	14,00±1,41	15,00±0,00
25	14,00±4,24	22,00±0,00	15,50±2,12	16,00±0,00	18,00±0,00
29	18,50±2,12	29,50±0,71	15,50±2,12	12,00±0,00	15,00±0,00
Valeurs des diamètres d'inhibition des antibiotiques testés sur <i>S. Typhi</i> repiquée en absence de tout extrait de plante (mm)					
Jours	CIP	AMX	C	GM	SXT
1	36,43±1,25	23,67±1,15	29,17±0,76	30,10±0,10	25,83±1,04
3	21,50±3,54	29,00±1,41	19,00±0,00	15,50±0,71	17,50±0,71
7	19,00±0,00	31,00±2,83	20,00±1,41	14,00±0,00	15,50±4,95
15	20,00±2,83	20,00±0,00	17,00±0,00	15,00±0,00	18,00±0,00
25	18,50±0,71	22,50±0,71	15,00±0,00	16,00±0,00	20,00±0,00
29	19,50±0,71	29,50±2,12	15,50±2,12	14,50±0,71	19,00±0,00

CIP : Ciprofloxacine, AMX : Amoxicilline, C : Chloramphénicol, GM : Gentamicine, SXT/TSU : Cotrimoxazole.

Tableau XV : Diamètres moyens des auréoles d'inhibition des antibiotiques testés sur *S. aureus* exposée ou non à *Chromolaena odorata*.

Valeurs des diamètres d'inhibition des antibiotiques testés sur <i>S. aureus</i> pendant et après son exposition à <i>Chromolaena odorata</i> (mm)					
Jours	GM	OSSA	SXT/TSU	ERY	VNC
1	25,00±0,70	24,00±1,41	42,00±1,41	40,00±1,41	35,00±1,41
3	24,00±2,82	23,00±1,41	27,00±0,70	40,00±0,00	28,00±1,41
7	16,50±0,70	12,00±4,24	30,50±1,41	38,00±0,00	24,00±1,41
15	16,00±0,00	9,00±0,00	29,00±0,00	33,00±0,00	23,50±0,70
25	20,50±0,70	21,50±1,42	30,50±2,82	31,50±0,70	30,50±1,41
29	16,50±2,12	20,00±0,70	30,00±1,41	29,50±1,41	28,50±0,70
Valeurs des diamètres d'inhibition des antibiotiques testés sur <i>S. aureus</i> repiquée en absence de tout extrait de plante (mm)					
Jours	GM	OSSA	SXT/TSU	ERY	VNC
1	25,00±0,70	24,00±0,70	42,00±0,70	40,00±1,41	35,00±0,70
3	19,50±0,70	17,00±1,41	39,50±0,70	40,00±0,00	29,00±1,41
7	19,00±0,00	12,00±1,41	34,00±1,41	36,00±0,00	28,00±0,00
15	13,50±0,70	8,50±4,24	25,00±1,41	30,00±0,00	23,50±2,12
25	18,50±0,70	22,50±2,82	28,00±1,41	26,50±1,41	26,50±1,41
29	18,50±2,12	22,00±0,7	32,00±2,12	29,00±1,41	29,00±0,70

GM : Gentamicine, SXT/TSU : Cotrimoxazole, OSSA : Oxacilline, ERY : Erythromycine, VNC : Vancomycine.

Tableau XVI : Diamètres moyens des auréoles d'inhibition des antibiotiques testés sur *S. aureus* exposée ou non à *Erigeron floribundus*.

Valeurs des diamètres d'inhibition des antibiotiques testés sur <i>S. aureus</i> pendant et après son exposition à <i>Erigeron floribundus</i> (mm)					
Jours	GM	OSSA	SXT/TSU	ERY	VNC
1	25,00±0,70	24,00±0,70	42,00±0,70	40,00±2,12	35,00±0,70
3	24,50±2,12	10,50±3,53	36,00±1,41	39,00±1,41	31,00±1,41
7	17,00±0,00	11,00±0,00	34,50±2,12	32,50±0,00	27,00±0,70
15	17,50±0,70	18,50±4,94	25,00±2,12	28,50±1,41	26,50±0,00
25	19,50±0,70	26,00±0,70	28,50±1,41	30,50±1,41	27,00±1,41
29	19,00±0,70	22,50±0,70	30,00±0,00	37,00±1,41	31,00±0,70
Valeurs des diamètres d'inhibition des antibiotiques testés sur <i>S. aureus</i> repiquée en absence de tout extrait de plante (mm)					
Jours	GM	OSSA	SXT/TSU	ERY	VNC
1	25,00±0,70	24,00±0,70	42,00±0,70	40,00±1,41	35,00±0,70
3	19,50±0,70	17,00±1,41	39,50±0,70	40,00±0,00	29,00±1,41
7	19,00±0,00	12,00±1,41	34,00±1,41	36,00±0,00	28,00±0,00
15	13,50±0,70	8,50±4,24	25,00±1,41	30,00±0,00	23,50±2,12
25	18,50±0,70	22,50±2,82	28,00±1,41	26,50±1,41	26,50±1,41
29	18,50±2,12	22,00±0,7	32,00±2,12	29,00±1,41	29,00±0,70

GM : Gentamicine, SXT/TSU : Cotrimoxazole, OSSA : Oxacilline, ERY : Erythromycine, VNC : Vancomycine.

III.1.2.1. Sensibilité de *S. aureus* aux antibiotiques pendant et après son exposition aux extraits *Chromolaena odorata* et *Erigeron floribundus*

Parmi les extraits de plantes testés, deux ont été utilisés pour évaluer l'impact d'un contact prolongé de *S. aureus* à ces extraits sur sa sensibilité aux antibiotiques. Il s'agit des extraits *Chromolaena odorata* et *Erigeron floribundus* qui ont été choisis par rapport aux autres extraits sur la base de leur potentiel antibactérien élevé. Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux XVII et XVIII.

Le suivi de l'activité antibactérienne des antibiotiques sur *S. aureus* durant son exposition à *Chromolaena odorata* (Tableau XVII), montre qu'un contact en continu de cette souche avec cette plante la rend moins sensible à un antibiotique sur les cinq testés ($\Delta_P > 0$). Il s'agit de l'érythromycine dont l'efficacité vis-à-vis de *S. aureus* a continué de diminuer en absence de tout extrait de plante. Ainsi, la résistance à l'érythromycine, développée par *S. aureus* pendant la phase d'exposition à *Chromolaena odorata*, a augmenté durant la phase de non exposition.

Cependant, le contact prolongé de *S. aureus* à *Erigeron floribundus* la rend moins sensible à deux antibiotiques sur les cinq testés (Tableau XVIII). Il s'agit de l'oxacilline et de l'érythromycine ($\Delta_P > 0$). Mais les observations faites durant la phase de non exposition montrent que la sensibilité de la souche continue de diminuer vis-à-vis de l'oxacilline ($\Delta_A < 0$), ce qui n'est pas le cas vis-à-vis de l'érythromycine. Ainsi la résistance développée par *S. aureus* vis-à-vis de l'oxacilline pendant son exposition à *Erigeron floribundus* persiste même en absence de cet extrait. Par contre, celle développée par cette souche vis-à-vis de l'érythromycine ne persiste pas, la souche étant redevenue plus sensible à cet antibiotique.

Tableau XVII : Sensibilité de *S. aureus* aux antibiotiques pendant et après son exposition à *Chromolaena odorata*

	GM	OSSA	SXT/TSU	ERY	VCN
Δ_P mm (en présence d'extrait)	-2,50±0,70	-0,50±4,95	-4,00±2,12	3,00±0,00	0,00±2,13
Δ_A mm (en absence d'extrait)	-4,50±0,70	-2,50±4,24	-6,00±0,70	-2,50±0,00	-0,50±1,42

Si $\Delta_P > 0$, la souche devient moins sensible aux antibiotiques. Si $\Delta_P < 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta_P = 0$, la sensibilité de la souche est constante. Si $\Delta_A < 0$, la souche issue de la phase d'exposition devient moins sensible aux antibiotiques durant la phase de non exposition. Si $\Delta_A > 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta_A = 0$, la sensibilité de la souche préalablement exposée est constante. GM : Gentamicine ; OSSA : Oxacilline ; SXT/TSU : Cotrimoxazole ; ERY : Erythromycine ; VNC : Vancomycine

Tableau XVIII: Sensibilité de *S. aureus* aux antibiotiques pendant et après son exposition à *Erigeron floribundus*

	GM	OSSA	SXT/TSU	ERY	VCN
Δ_P mm (en présence d'extrait)	-4,00±0,00	10,00±0,70	-0,50±0,71	1,50±0,70	-3,00±2,12
Δ_A mm (en absence d'extrait)	-3,50±1,42	-9,50±0,70	-2,50±2,80	9,50±1,41	-1,00±2,12

Si $\Delta_P > 0$, la souche devient moins sensible aux antibiotiques. Si $\Delta_P < 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta_P = 0$, la sensibilité de la souche est constante. Si $\Delta_A < 0$, la souche issue de la phase d'exposition devient moins sensible aux antibiotiques durant la phase de non exposition. Si $\Delta_A > 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta_A = 0$, la sensibilité de la souche préalablement exposée est constante. GM : Gentamicine ; OSSA : Oxacilline ; SXT/TSU : Cotrimoxazole ; ERY : Erythromycine ; VCN : Vancomycine

III.1.2.2. Comparaison de la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques induite par les extraits de plantes

La variation de l'activité antibactérienne des antibiotiques testés sur *S. aureus*, montre que l'exposition de cette souche à *Chromolaena odorata* la rend résistante à tous les antibiotiques (Figure 20). Cette résistance qui se traduit par $\Delta_P - \Delta_A > 0$, est toutefois moins importante vis-à-vis de la vancomycine car proche de 0 ($\Delta_P - \Delta_A = 0,5$ mm). Contrairement à *Chromolaena odorata*, l'exposition de *S. aureus* à *Erigeron floribundus* induit une résistance de cette souche à deux antibiotiques (l'oxacilline et le cotrimoxazole) sur les cinq testés (Figure 21). Cependant, cette résistance est plus grande à l'oxacilline ($\Delta_P - \Delta_A = 19,5$ mm) et très faible au cotrimoxazole ($\Delta_P - \Delta_A = 2$ mm).

Ainsi l'exposition de *S. aureus* à *Chromolaena odorata* provoque plus de résistance aux antibiotiques chez cette dernière que son exposition à *Erigeron floribundus*.

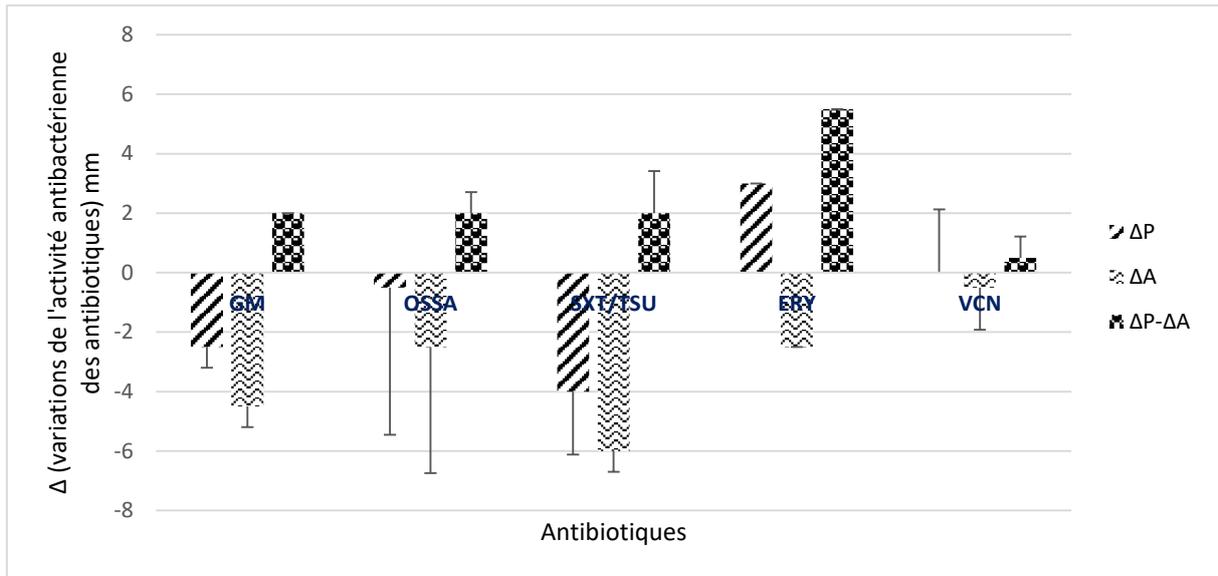


Figure 20: Résistance de *S. aureus* aux antibiotiques induite par *Chromolaena odorata*.

Si $\Delta_P - \Delta_A > 0$, la souche a développé une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A < 0$, la souche n'a pas développée une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A = 0$, la souche est restée stable. GM : Gentamicine ; OSSA : Oxacilline ; SXT/TSU : Cotrimoxazole ; ERY Erythromycine ; VCN : Vancomycine.

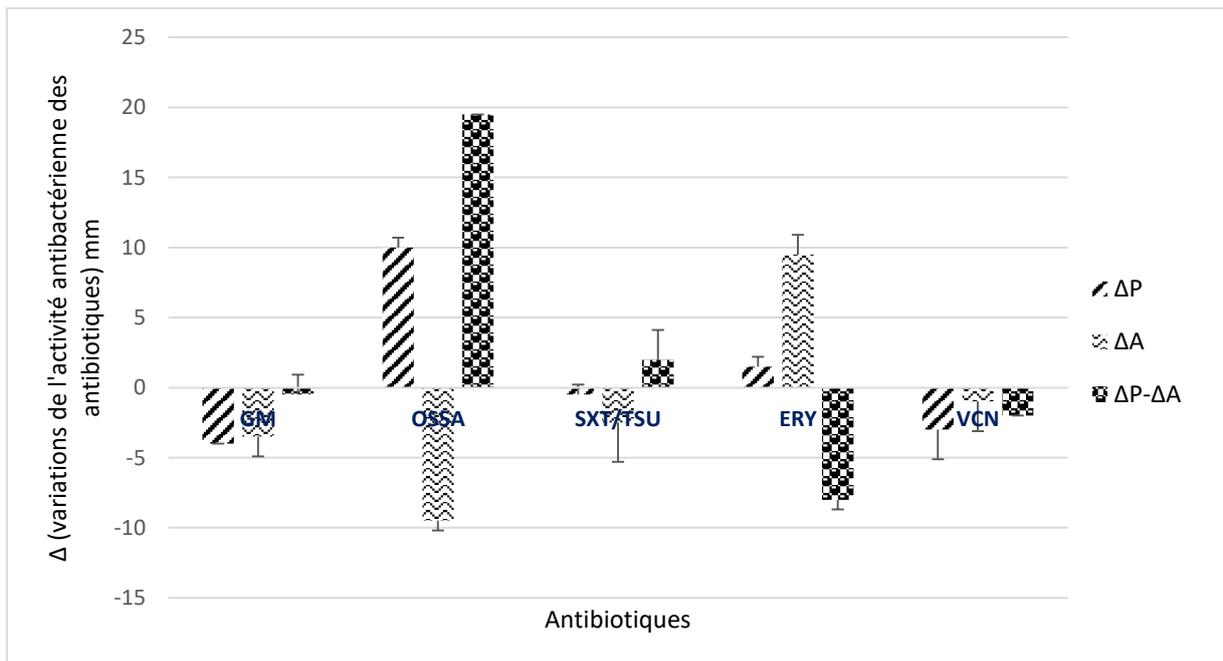


Figure 21: Résistance de *S. aureus* aux antibiotiques induite par *Erigeron floribundus*.

Si $\Delta_P - \Delta_A > 0$, la souche a développé une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A < 0$, la souche n'a pas développée une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A = 0$, la souche est restée stable. GM : Gentamicine ; OSSA : Oxacilline ; SXT/TSU : Cotrimoxazole ; ERY Erythromycine ; VCN : Vancomycine.

III.1.2.3. Sensibilité de *S. Typhi* aux antibiotiques pendant et après son exposition aux extraits *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis*

Pour étudier la sensibilité de *S. Typhi* aux antibiotiques durant le protocole d'induction, cette souche a été exposée à deux types d'antimicrobiens à savoir : deux extraits de plantes (*Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis*) et deux décoctions (Dec.2 et Dec.4). Les essais de sensibilité réalisés vis-à-vis des antibiotiques ont permis d'obtenir les résultats consignés dans les Tableaux XIX, XX, XXI et XXII.

❖ Sensibilité de *S. Typhi* aux antibiotiques pendant et après son exposition aux extraits aqueux *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis*

Le suivi de l'activité antibactérienne des antibiotiques testés sur *S. Typhi* en contact prolongé avec l'extrait de plante *Annickia chlorantha* (Tableau XIX), montre qu'à la fin de l'exposition à cette plante, *S. Typhi* devient moins sensible à quatre antibiotiques (ciprofloxacine, amoxicilline, chloramphénicol et gentamicine) sur les cinq testés ($\Delta_P > 0$). Le degré de résistance de cette souche à l'amoxicilline est plus élevé, avec une variation des diamètres d'inhibition égale à 8,33mm. Cependant, les observations faites durant la phase de non exposition de *S. Typhi*, c'est-à-dire absence d'*Annickia chlorantha*, montrent une augmentation de la sensibilité de cette souche vis-à-vis des quatre antibiotiques ($\Delta_A > 0$). Ainsi, la résistance développée par *S. Typhi* vis-à-vis de la ciprofloxacine, de l'amoxicilline, du chloramphénicol et de la gentamicine, durant son exposition à *Annickia chlorantha* n'est pas permanente dans le temps.

Par ailleurs, l'exposition de cette même souche à *Irvingia gabonensis* (Tableau XX) la rend moins sensible à quatre antibiotiques (ciprofloxacine, chloramphénicol, gentamicine et cotrimoxazole) sur les cinq testés ($\Delta_P > 0$). Cette diminution de la sensibilité est faible vis-à-vis du chloramphénicol et de la gentamicine ($\Delta_P = 1\text{mm}$), mais élevée vis-à-vis du cotrimoxazole ($\Delta_P = 3,00\text{mm}$) et de la ciprofloxacine ($\Delta_P = 5,00\text{mm}$). Après exposition à *Irvingia gabonensis*, la sensibilité de *S. Typhi* continue à diminuer vis-à-vis de la gentamicine et du cotrimoxazole ($\Delta_A < 0$) tandis qu'elle augmente vis-à-vis de la ciprofloxacine et du chloramphénicol ($\Delta_A > 0$). Ce résultat montre que durant l'exposition de *S. Typhi* à *Irvingia gabonensis*, cette souche a développé une résistance à quatre antibiotiques. Cependant même après exposition, cette résistance a persisté vis-à-vis de deux des quatre antibiotiques à savoir : la gentamicine et le cotrimoxazole.

Tableau XIX: Sensibilité de *S. Typhi* aux antibiotiques pendant et après son exposition à *Annickia chlorantha*

	CIP	AMX	C	GM	SXT/TSU
Δ_p mm (en présence d'extrait)	4,00±2,82	8,33±1,15	3,00±1,41	4,00±1,41	-1,00±0,00
Δ_A mm (en absence d'extrait)	4,00±2,82	1,50±2,12	3,00±0,00	2,00±0,00	-2,00±0,00

Si $\Delta_p > 0$, la souche devient moins sensible aux antibiotiques. Si $\Delta_p < 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta_p = 0$, la sensibilité de la souche est constante. Si $\Delta_A < 0$, la souche issue de la phase d'exposition devient moins sensible aux antibiotiques durant la phase de non exposition. Si $\Delta_A > 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta_A = 0$, la sensibilité de la souche préalablement exposée est constante. CIP : Ciprofloxacine, AMX : Amoxicilline, C : Chloramphénicol, GM : Gentamicine, SXT/TSU : Cotrimoxazole.

Tableau XX: Sensibilité de *S. Typhi* aux antibiotiques pendant et après son exposition à *Irvingia gabonensis*

	CIP	AMX	C	GM	SXT/TSU
Δ_p mm (en présence d'extrait)	5,00±0,00	-1,00±2,82	1,00±0,00	1,00±1,41	3,00±0,00
Δ_A mm (en absence d'extrait)	4,00±1,41	-1,00±4,24	1,50±2,12	-1,50±2,12	-1,00±0,00

Si $\Delta_p > 0$, la souche devient moins sensible aux antibiotiques. Si $\Delta_p < 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta_p = 0$, la sensibilité de la souche est constante. Si $\Delta_A < 0$, la souche issue de la phase d'exposition devient moins sensible aux antibiotiques durant la phase de non exposition. Si $\Delta_A > 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta_A = 0$, la sensibilité de la souche préalablement exposée est constante. CIP : Ciprofloxacine, AMX : Amoxicilline, C : Chloramphénicol, GM : Gentamicine, SXT/TSU : Cotrimoxazole.

❖ Sensibilité de *S. Typhi* aux antibiotiques pendant et après son exposition aux décoctions (Dec.2 et Dec.4)

Les résultats obtenus pendant l'exposition de *S. Typhi* aux décoctions 2 et 4 (Tableaux XXI et XXII), montrent une diminution globale de sa sensibilité à tous les antibiotiques testés, à l'exception de l'amoxicilline quand elle est exposée à la Dec.2. Ainsi, l'efficacité antibactérienne de ces antibiotiques a diminué, mais de façon variable. En effet, le chloramphénicol ($\Delta_p=7,33\text{mm}$) et le cotrimoxazole ($\Delta_p=9\text{mm}$) sont les antibiotiques dont l'efficacité a le plus diminué. Par ailleurs, les observations faites après exposition de *S. Typhi* aux décoctions, montrent que l'activité antibactérienne de plusieurs antibiotiques continue à diminuer ($\Delta_A < 0$). Ainsi, en absence de tout extrait, la sensibilité de *S. Typhi* après exposition à la Dec.2 a continué à diminuer vis-à-vis de la ciprofloxacine et du cotrimoxazole. La sensibilité de la même souche après exposition à la Dec.4 a aussi continué à diminuer vis-à-vis de la ciprofloxacine, de l'amoxicilline et de la gentamicine.

Nous pouvons conclure que la résistance développée par *S. Typhi* durant son exposition aux décoctions 2 et 4 persiste vis-à-vis de la ciprofloxacine et du cotrimoxazole après son exposition à Dec.2 et vis-à-vis de la ciprofloxacine, de l'amoxicilline et de la gentamicine après son exposition à Dec.4.

Tableau XXI: Sensibilité de *S. Typhi* aux antibiotiques pendant et après son exposition à la décoction 2

	CIP	AMX	C	GM	SXT/TSU
Δp mm (en présence d'extrait)	3,00±1,15	-1,33±0,58	7,33±1,15	3,50±0,87	3,33±0,58
ΔA mm (en absence d'extrait)	-6,33±0,58	-3,33±1,15	4,83±1,44	1,83±0,66	-0,33±0,58

Si $\Delta p > 0$, la souche devient moins sensible aux antibiotiques. Si $\Delta p < 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta p = 0$, la sensibilité de la souche est constante. Si $\Delta A < 0$, la souche issue de la phase d'exposition devient moins sensible aux antibiotiques durant la phase de non exposition. Si $\Delta A > 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta A = 0$, la sensibilité de la souche préalablement exposée est constante. CIP : Ciprofloxacine, AMX : Amoxicilline, C : Chloramphénicol, GM : Gentamicine, SXT/TSU : Cotrimoxazole.

Tableau XXII: Sensibilité de *S. Typhi* aux antibiotiques pendant et après son exposition à la décoction 4

	CIP	AMX	C	GM	SXT/TSU
Δp mm (en présence d'extrait)	2,33±1,15	0,33±0,58	6,67±0,58	1,17±0,87	9,00±0,00
ΔA mm (en absence d'extrait)	-6,33±1,15	-6,33±0,37	4,00±1,15	-1,17±0,08	4,33±0,95

Si $\Delta p > 0$, la souche devient moins sensible aux antibiotiques. Si $\Delta p < 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta p = 0$, la sensibilité de la souche est constante. Si $\Delta A < 0$, la souche issue de la phase d'exposition devient moins sensible aux antibiotiques durant la phase de non exposition. Si $\Delta A > 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta A = 0$, la sensibilité de la souche préalablement exposée est constante. CIP : Ciprofloxacine, AMX : Amoxicilline, C : Chloramphénicol, GM : Gentamicine, SXT/TSU : Cotrimoxazole.

III.1.2.4. Comparaison de la résistance de *S. Typhi* aux antibiotiques induite par les extraits de plantes

Les activités antibactériennes de cinq antibiotiques (Ciprofloxacine, Amoxicilline, Chloramphénicol, Gentamicine et Cotrimoxazole) ont été évaluées après induction de la résistance de *S. Typhi* par les extraits de plantes.

❖ **Résistance de *S. Typhi* aux antibiotiques induite par *Annickia chlorantha* et par *Irvingia gabonensis***

Les résultats présentés sur les Figures 22 et 23 montrent que l'exposition de *S. Typhi* aux extraits de plantes *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis*, induit la résistance de cette souche aux antibiotiques. En effet, l'exposition à l'extrait *Annickia chlorantha* induit la résistance de *S. Typhi* à trois antibiotiques (amoxicilline, gentamicine et cotrimoxazole) sur les cinq testés. C'est également le cas pour l'exposition à *Irvingia gabonensis* qui induit la résistance de *S. Typhi* à la ciprofloxacine, la gentamicine et au cotrimoxazole. Cependant, le degré de résistance pour les deux antibiotiques identiques à savoir la gentamicine et le cotrimoxazole varie en fonction de l'extrait de plante utilisé pour l'induction. La résistance à la gentamicine et au cotrimoxazole développée par cette souche étant beaucoup plus importante sous l'action d'*Irvingia gabonensis* que sous l'action d'*Annickia chlorantha*. C'est ainsi qu'on note vis-à-vis du cotrimoxazole un $\Delta_P - \Delta_A$ de 4mm et de 1mm respectivement après exposition à *Irvingia gabonensis* et à *Annickia chlorantha*, et vis-à-vis de la gentamicine des valeurs moyennes de $\Delta_P - \Delta_A$ égale à 4mm et à 3mm pour ces mêmes plantes.

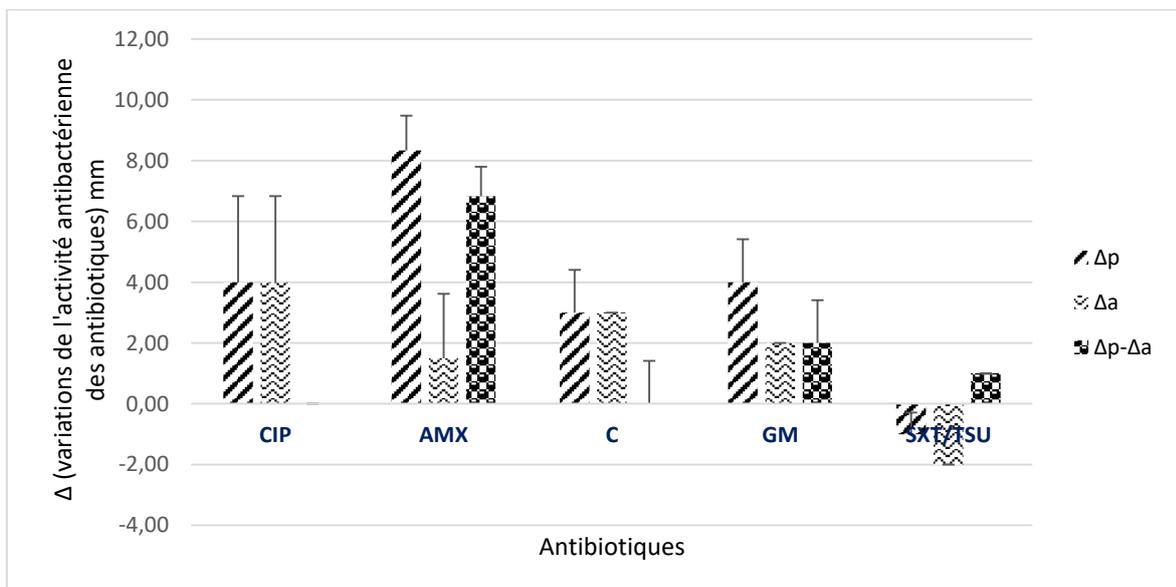


Figure 22: Résistance de *S. Typhi* aux antibiotiques induite par *Annickia chlorantha*

Si $\Delta_P - \Delta_A > 0$, la souche a développé une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A < 0$, la souche n'a pas développée une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A = 0$, la souche est restée stable. CIP: Ciprofloxacine, AMX: Amoxicilline, C: Chloramphénicol, GM: Gentamicine, SXT/TSU: Cotrimoxazole.

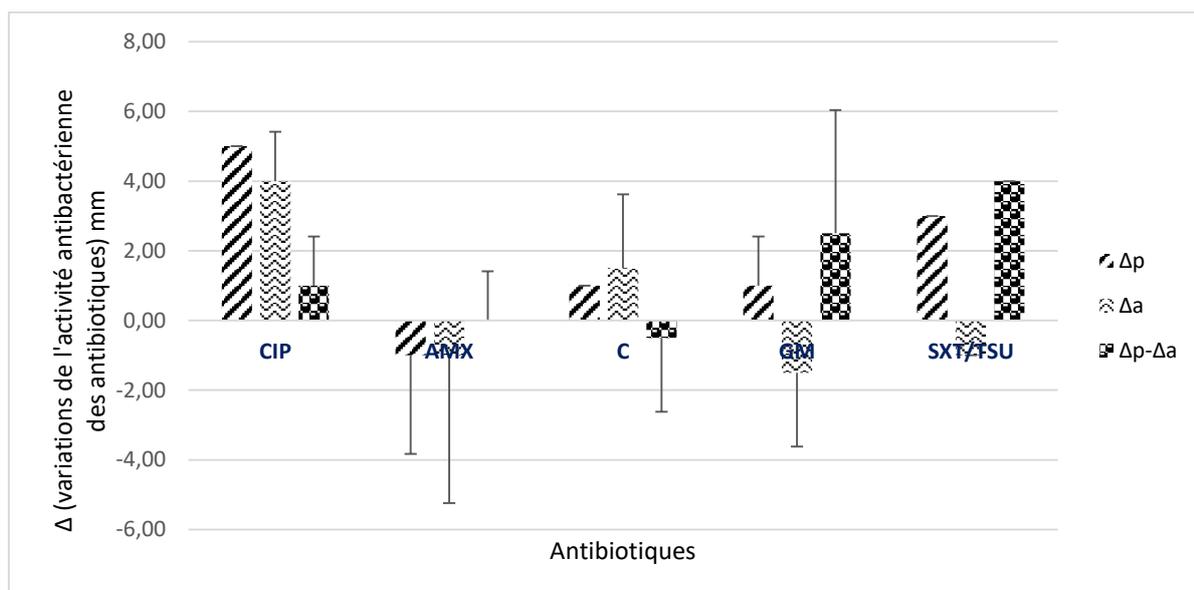


Figure 23: Résistance de *S. Typhi* aux antibiotiques induite par *Irvingia gabonensis*

Si $\Delta_p - \Delta_a > 0$, la souche a développé une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_p - \Delta_a < 0$, la souche n'a pas développée une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_p - \Delta_a = 0$, la souche est restée stable. CIP: Ciprofloxacine, AMX: Amoxicilline, C: Chloramphénicol, GM: Gentamicine, SXT/TSU: Cotrimoxazole.

❖ Résistance de *S. Typhi* aux antibiotiques induite par les décoctions 2 et 4

La souche *S. Typhi* exposée aux décoctions 2 et 4 est devenue résistante à tous les antibiotiques testés (Figures 24 et 25). Ces résultats montrent que le degré de résistance induit par les décoctions est beaucoup plus important que celui induit par les extraits de plantes *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis*. Cependant, des effets comparables produits par ces substances ont été relevés sur le comportement de *S. Typhi* vis-à-vis de certains antibiotiques. On peut en effet voir que, la résistance induite par la Dec.4 à l'amoxicilline est comparable à celle induite par *Annickia chlorantha* ; et celle induite par cette même décoction à la gentamicine et au cotrimoxazole est comparable à celle induite par *Irvingia gabonensis*.

Ces résultats ont également montré que la résistance de *S. Typhi* vis-à-vis de la ciprofloxacine après avoir été soumise à l'action de Dec.2 et de Dec.4 est plus élevée que celle observée vis-à-vis des autres antibiotiques.

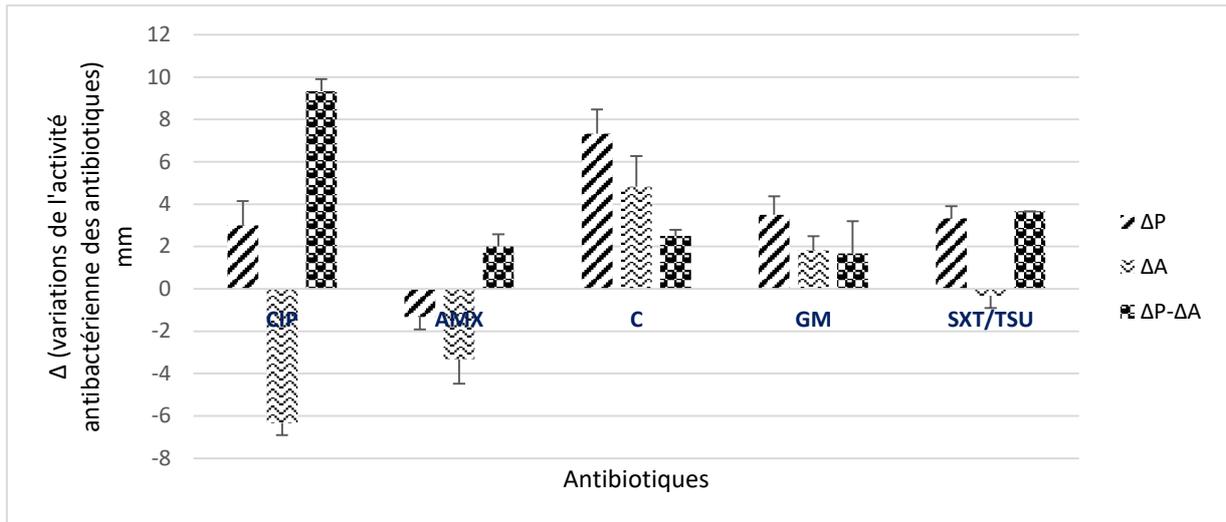


Figure 24: Résistance de *S. Typhi* aux antibiotiques induite par la décoction 2.

Si $\Delta_P - \Delta_A > 0$, la souche a développé une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A < 0$, la souche n'a pas développée une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A = 0$, la souche est restée stable. CIP : Ciprofloxacine, AMX : Amoxicilline, C : Chloramphénicol, GM : Gentamicine, SXT/TSU : Cotrimoxazole.

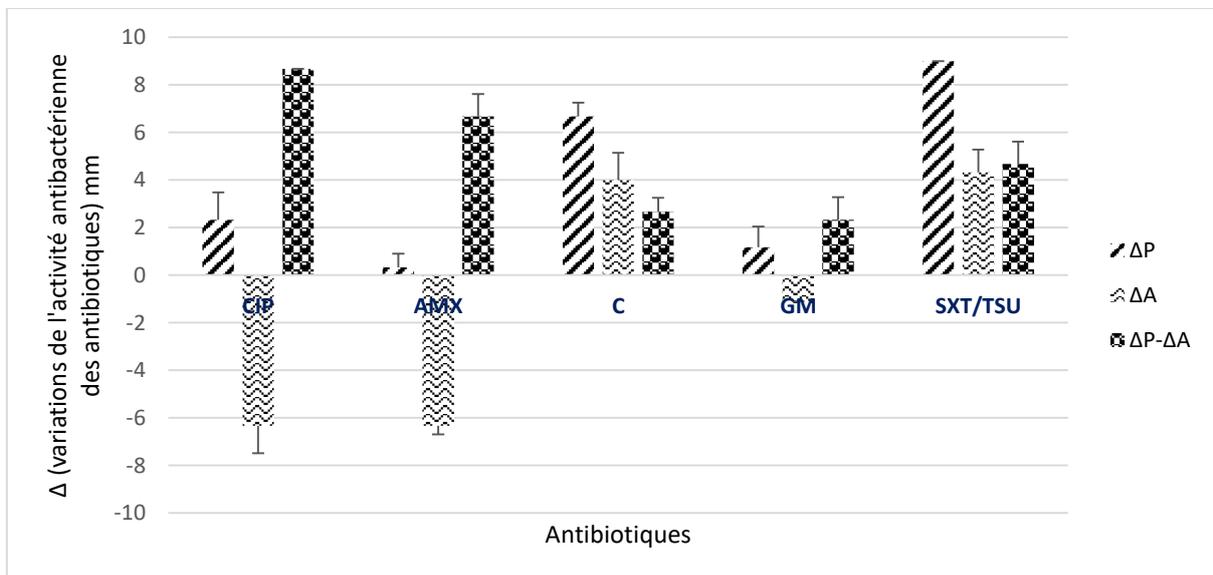


Figure 25 : Résistance de *S. Typhi* aux antibiotiques induite par la décoction 4.

Si $\Delta_P - \Delta_A > 0$, la souche a développé une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A < 0$, la souche n'a pas développée une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A = 0$, la souche est restée stable. CIP : Ciprofloxacine, AMX : Amoxicilline, C : Chloramphénicol, GM : Gentamicine, SXT/TSU : Cotrimoxazole.

III.1.3. Impact de la concentration d'extrait de plante sur les capacités d'acquisition d'une antibiorésistance par *S. Typhi*

Compte tenu des résultats précédents mettant en évidence une réduction globale de l'activité de différents antibiotiques sur *S. Typhi* exposée à une concentration fixe d'extrait de plante, il était indispensable d'examiner l'impact de l'utilisation de différentes concentrations fixes de la substance d'exposition sur l'induction de la résistance de cette souche aux antibiotiques.

Les résultats obtenus ont montré que *S. Typhi* exposée à différentes concentrations fixes (0,5mg/mL ; 1mg/mL et 1,5mg/mL) d'extrait *Annickia chlorantha*, développe une résistance aux antibiotiques testés (ciprofloxacine, gentamicine, amoxicilline et chloramphénicol). Ceci se traduisant par une diminution des diamètres des auréoles d'inhibition de ces antibiotiques. Cependant, cette diminution est fonction de la concentration d'extrait utilisée pour cette exposition.

III.1.3.1. Résistance de *S. Typhi* à la ciprofloxacine induite par son exposition à trois concentrations fixes d'extrait de plante

L'étude de la sensibilité de *S. Typhi* à la ciprofloxacine durant son exposition à l'extrait *Annickia chlorantha* pendant 14jours montre que cette souche exposée à trois concentrations fixes (0,5mg/mL ; 1mg/mL et 1,5mg/mL) développe une résistance à cet antibiotique (Tableau XXIII). En effet, les valeurs des diamètres d'inhibition obtenues au début de l'exposition sont significativement différentes de celles obtenues à la fin de l'exposition.

L'utilisation de la concentration 1mg/mL d'extrait pour l'exposition de *S. Typhi* entraîne une diminution progressive de sa sensibilité à la ciprofloxacine. En effet, on a observé une diminution des valeurs des diamètres d'inhibition de cet antibiotique partant de 32,5mm au premier jour d'exposition, à 25mm au cinquième jour et à 18,5mm au dernier jour. Par contre, l'exposition de cette même souche aux deux autres concentrations (0,5mg/mL et 1,5mg/mL) la rend moins sensible à la ciprofloxacine les 5 premiers jours d'exposition. Cependant, cette sensibilité tend à augmenter au dernier jour d'exposition.

L'analyse statistique montre qu'à la fin du processus d'induction de la résistance, il n'existe aucune différence significative entre les valeurs des diamètres d'inhibition de la ciprofloxacine obtenues après exposition de *S. Typhi* aux trois concentrations d'extrait de plante testées.

Tableau XXIII: Diamètres moyens des auréoles d'inhibition de la ciprofloxacine testée sur *S. Typhi* exposée à trois concentrations fixes d'extrait de plante

Jours	Valeurs des diamètres moyens des auréoles d'inhibition (mm)		
	0,5 mg/mL	1 mg/mL	1,5 mg/mL
1	32,5±2,12 ^e	32,5±2,12 ^e	32,5±2,12 ^e
5	16±1,00 ^{a,b}	25±1,41 ^d	14,55±0,70 ^a
15	18,5±0,70 ^{b,c}	18,5±0,70 ^{b,c}	18,5±0,70 ^{d,c}

Les diamètres moyens des auréoles d'inhibition affectés de la même lettre a, b, c, d, e sur la même ligne ne sont pas significativement différents à $p < 0,05$. Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type du diamètre moyen des auréoles d'inhibition.

III.1.3.2. Résistance de *S. Typhi* à la gentamicine induite par son exposition à trois concentrations fixes d'extrait de plante

Les résultats obtenus sur la sensibilité de *S. Typhi* à la gentamicine, présentés dans le Tableau XXIV, montrent que cette souche devient moins sensible à cet antibiotique de manière progressive durant son exposition aux trois concentrations fixes testées (0,5mg/mL ; 1mg/mL et 1,5mg/mL) d'extrait de plante. Ceci étant traduit par une diminution progressive des valeurs des diamètres d'inhibition. On note que l'utilisation de la concentration 1mg/ml d'extrait provoque une résistance chez *S. Typhi* plus importante que l'utilisation des autres concentrations fixes d'extrait 0,5mg/mL et 1,5mg/mL. Les valeurs des diamètres des auréoles d'inhibition étant de 12mm pour la concentration d'exposition 1mg/mL et de 13mm et 13,5mm respectivement pour les concentrations d'exposition 0,5mg/mL et 1,5mg/mL d'extrait de plante.

Tableau XXIV: Diamètres moyens des auréoles d'inhibition de la gentamicine testée sur *S. Typhi* exposée à trois concentrations fixes d'extrait de plante

Jours	Valeurs des diamètres moyens des auréoles d'inhibition (mm)		
	0,5 mg/mL	1 mg/mL	1,5 mg/mL
1	25,5±2,12 ^f	25,5±2,12 ^f	25,5±2,12 ^f
5	15±0,00 ^{c,d}	17±1,41 ^{d,e}	15,5±2,12 ^{c,d}
15	13±0,00 ^b	12±0,00 ^{a,b}	13,5±0,70 ^{b,c}

Les diamètres moyens des auréoles d'inhibition affectés de la même lettre a, b, c, d, e, f sur la même ligne ne sont pas significativement différents à $p < 0,05$. Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type du diamètre moyen des auréoles d'inhibition.

III.1.3.3. Résistance de *S. Typhi* à l'amoxicilline induite par son exposition à trois concentrations fixes d'extrait de plante

Dans le Tableau XXV, on constate à partir des valeurs des diamètres des auréoles d'inhibition obtenues au 15^{ème} jour, que la souche de *S. Typhi* exposée aux concentrations 0,5mg/mL et 1mg/mL de l'extrait de plante, a développé une résistance vis-à-vis de l'amoxicilline. Cependant, l'utilisation de la concentration 1mg/ml d'extrait pour l'exposition entraîne un niveau de résistance plus élevé que l'utilisation de la concentration 0,5mg/mL d'extrait. D'après les analyses statistiques, la valeur du diamètre d'inhibition (20,5mm) obtenue pour l'exposition à 1mg/mL, est statistiquement différente de celle obtenue pour la concentration 1,5mg/mL qui est de 26mm. Comme dans le cas de la gentamicine, ce résultat montre que le fait de doubler la concentration d'exposition, entraîne une différence plus importante dans le développement de la résistance à l'amoxicilline en favorisant ainsi ce processus.

Tableau XXV: Diamètres moyens des auréoles d'inhibition de l'amoxicilline testé sur *S. Typhi* exposée à trois concentrations fixes d'extrait de plante

Jours	Valeurs des diamètres moyens des auréoles d'inhibition (mm)		
	0,5 mg/mL	1 mg/mL	1,5 mg/mL
1	24±0,00 ^{a,b,c}	24±0,00 ^{a,b,c}	24±0,00 ^{a,b,c}
5	25,5±3,50 ^{a,b,c}	28,5±0,70 ^c	22±0,00 ^{a,b}
15	23±1,41 ^{a,b}	20,5±3,53 ^a	26±1,41 ^{b,c}

Les diamètres moyens des auréoles d'inhibition affectés de la même lettre a, b, c sur la même ligne ne sont pas significativement différents à $p < 0,05$. Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type du diamètre moyen des auréoles d'inhibition.

III.1.3.4. Résistance de *S. Typhi* au chloramphénicol induite par son exposition à trois concentrations fixes d'extrait de plante

La mise en évidence de la résistance de *S. Typhi* au chloramphénicol, après son exposition à différentes concentrations fixes d'extrait de plante, dont le résultat est présenté dans le Tableau XXVI, montre que cette souche devient moins sensible au chloramphénicol après 14 jours d'exposition. En effet, on observe une diminution importante des diamètres des auréoles d'inhibition allant de 29,17mm au 1^{er} jour d'exposition jusqu'à 10,5mm au dernier jour. Au 15^{ème} jour, on observe une différence significative ($p < 0,05$) entre les valeurs des diamètres des auréoles d'inhibition des deux concentrations d'exposition fixes (1mg/mL et 1,5mg/mL) et celle de 0,5mg/mL. Cependant, la concentration d'exposition 1mg/mL reste celle

qui induit un degré de résistance plus élevé au chloramphénicol. Ainsi, lorsqu'on double la concentration d'exposition de l'extrait de plante, la résistance de *S. Typhi* au chloramphénicol est plus élevée que dans le cas de l'utilisation des autres concentrations. Ce résultat est similaire à ce qui a été observé dans l'étude de la résistance de *S. Typhi* à la gentamicine et à l'amoxicilline.

Tableau XXVI: Diamètres moyens des auréoles d'inhibition du chloramphénicol testé sur *S. Typhi* exposée à trois concentrations fixes d'extrait de plante

Jours	Valeurs des diamètres moyens des auréoles d'inhibition (mm)		
	0,5 mg/mL	1 mg/mL	1,5 mg/mL
1	29,17±1,41 ^f	29,17±1,41 ^f	29,17±1,41 ^f
5	11,5±0,5 ^{a,b}	24,5±2,12 ^e	21±1,41 ^d
15	16±0,00 ^c	10,5±2,12 ^a	12±2,82 ^{a,b}

Les diamètres moyens des auréoles d'inhibition affectés de la même lettre a, b, c, d, e, f sur la même ligne ne sont pas significativement différents à $p < 0,05$. Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type du diamètre moyen des auréoles d'inhibition

III.1.4. Sensibilité de *S. Typhi* aux extraits de plantes pendant le protocole d'induction de la résistance

Les résultats obtenus précédemment ayant montré qu'un contact prolongé des souches bactériennes aux extraits de plantes est capable d'induire leur résistance aux antibiotiques testés, le travail mené dans cette partie consistait à tester les extraits de plantes à la place des antibiotiques pour voir si l'exposition des souches bactériennes aux extraits de plantes est aussi capable d'induire une résistance aux substances végétales.

A cet effet, à la place des antibiotiques testés précédemment durant le protocole d'induction, quatre extraits de plantes ont été testés : *Annickia chlorantha*, *Irvingia gabonensis*, *Musanga cecropioides* et *Chromolaena odorata*. Et pour l'exposition de *S. Typhi* durant le protocole d'induction, les extraits de plantes les plus actifs *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis* ont été sélectionnés. Un mélange d'antimicrobiens constitué d'un extrait de plante et d'un antibiotique a également été testé.

Les résultats obtenus et présentés dans les Tableaux XXVII et XXVIII ont montré que l'exposition en continue de *S. Typhi* à *Annickia chlorantha* diminue sa sensibilité à trois extraits de plantes (*Annickia chlorantha*, *Musanga cecropioides* et *Chromolaena odorata*), tandis que son exposition à *Irvingia gabonensis* la diminue à deux extraits de plantes (*Annickia chlorantha* et *Chromolaena odorata*) sur les quatre testés ($\Delta_P > 0$). Cependant, cette sensibilité de *S. Typhi* aux extraits de plantes varie dans le temps. Car après la phase d'exposition, les observations

faites durant les cultures répétées de cette souche en absence de tout extrait de plante montrent que l'efficacité des extraits de plantes testés a augmenté ($\Delta_A > 0$). Ainsi la résistance acquise par *S. Typhi* aux plantes médicinales durant la phase d'exposition diminue après cette phase, c'est-à-dire en absence d'antimicrobien.

Par ailleurs, *S. Typhi* exposée à un mélange d'antibactériens s'est comportée différemment (Tableaux XXIX). Car durant la phase d'exposition où la souche était en contact avec ce mélange d'antibactériens, elle est restée sensible à toutes les substances végétales testées, mais en absence de tout antibiotique cette souche est devenue moins sensible à trois extraits de plantes (*Annickia chlorantha*, *Irvingia gabonensis* et *Chromolaena odorata*) sur les quatre testés.

Tableau XXVII: Sensibilité de *S. Typhi* aux extraits de plantes pendant et après son exposition à *Annickia chlorantha*

	EC	IG	MC	CO
Δ_P mm (en présence d'extrait)	0,75±0,35	-0,25±0,35	1,00±0,00	0,50±0,70
Δ_A mm (en absence d'extrait)	0,25±0,35	-0,25±0,35	1,50±0,70	0,00±0,00

Si $\Delta_P > 0$, la souche devient moins sensible aux antibiotiques. Si $\Delta_P < 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta_P = 0$, la sensibilité de la souche est constante. Si $\Delta_A < 0$, la souche issue de la phase d'exposition devient moins sensible aux antibiotiques durant la phase de non exposition. Si $\Delta_A > 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta_A = 0$, la sensibilité de la souche préalablement exposée est constante. EC : *Annickia chlorantha*, IG : *Irvingia gabonensis*, MC : *Musanga cecropioides*, CO : *Chromolaena odorata*.

Tableau XXVIII: Sensibilité de *S. Typhi* aux extraits de plantes pendant et après son exposition à *Irvingia gabonensis*

	EC	IG	MC	CO
Δ_P mm (en présence d'extrait)	0,50±0,35	-0,25±0,35	-0,50±0,00	0,50±0,70
Δ_A mm (en absence d'extrait)	0,25±0,35	0,00±0,00	1,00±0,00	0,50±0,70

Si $\Delta_P > 0$, la souche devient moins sensible aux antibiotiques. Si $\Delta_P < 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta_P = 0$, la sensibilité de la souche est constante. Si $\Delta_A < 0$, la souche issue de la phase d'exposition devient moins sensible aux antibiotiques durant la phase de non exposition. Si $\Delta_A > 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta_A = 0$, la sensibilité de la souche préalablement exposée est constante. EC : *Annickia chlorantha*, IG : *Irvingia gabonensis*, MC : *Musanga cecropioides*, CO : *Chromolaena odorata*.

Tableau XXIX: Sensibilité de *S. Typhi* aux extraits de plantes pendant et après son exposition à un mélange d'antimicrobiens

	EC	IG	MC	CO
Δ_P mm (en présence d'extrait)	0,00±0,00	-0,75±0,35	-0,25±0,35	0,00±0,00
Δ_A mm (en absence d'extrait)	-0,75±0,70	-1,00±0,00	1,00±0,00	-0,50±0,70

Si $\Delta_P > 0$, la souche devient moins sensible aux antibiotiques. Si $\Delta_P < 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta_P = 0$, la sensibilité de la souche est constante. Si $\Delta_A < 0$, la souche issue de la phase d'exposition devient moins sensible aux antibiotiques durant la phase de non exposition. Si $\Delta_A > 0$, elle devient plus sensible aux antibiotiques. Et si $\Delta_A = 0$, la sensibilité de la souche préalablement exposée est constante. EC : *Annickia chlorantha*, IG : *Irvingia gabonensis*, MC : *Musanga cecropioides*, CO : *Chromolaena odorata*.

III.1.5. Comparaison de la résistance de *S. Typhi* aux extraits de plantes induite par les substances végétales

Les résultats de l'induction de la résistance de *S. Typhi* aux extraits de plantes montrent que lorsque cette souche est en contact avec *Annickia chlorantha*, elle développe une résistance ($\Delta_P - \Delta_A > 0$) à deux extraits de plantes que sont : *Annickia chlorantha* et *Chromolaena odorata* (Figure 26). L'exposition de cette même souche à *Irvingia gabonensis* provoque une résistance à *Annickia chlorantha* et à *Chromolaena odorata* comparable à celle observée précédemment ($\Delta_P - \Delta_A = 0,5\text{mm}$), mais aussi à *Irvingia gabonensis* (Figure 27). Cependant, quel que soit la plante utilisée pour l'exposition, la souche est devenue moins résistante à *Musanga cecropioides* $\Delta_P - \Delta_A$ étant inférieur à 0.

La Figure 28 montre que l'exposition de *S. Typhi* au mélange de l'extrait de plante+antibiotique induit une résistance vis-à-vis des extraits de plantes comparable à celle induite par l'exposition de cette souche à l'extrait *Irvingia gabonensis*. Cette exposition induisant une résistance à *Annickia chlorantha*, à *Irvingia gabonensis* et à *Chromolaena odorata*. Les degrés de résistance dans ce dernier cas demeurent toutefois plus importants avec les variations $\Delta_P - \Delta_A$ ayant des valeurs respectives de 0,5mm et 1mm en présence de l'extrait *Irvingia gabonensis* et du mélange (extrait de plante + antibiotique).

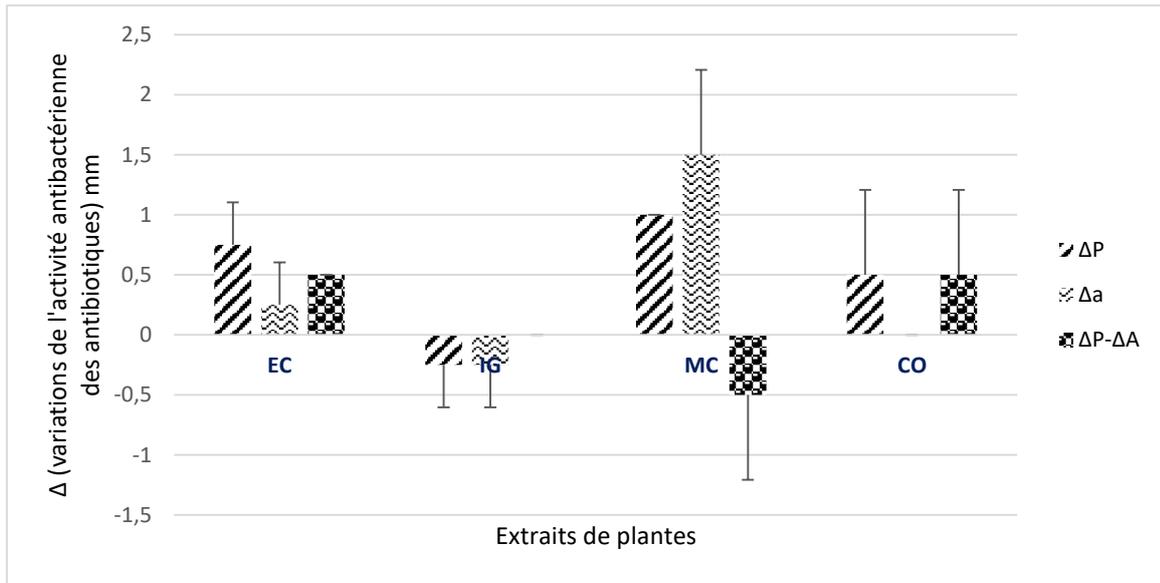


Figure 26: Résistance de *S. Typhi* aux extraits de plantes induite par *Annickia chlorantha*

Si $\Delta_P - \Delta_A > 0$, la souche a développé une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A < 0$, la souche n'a pas développée une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A = 0$, la souche est restée stable. EC: *Annickia chlorantha*, IG: *Irvingia gabonensis*, MC: *Musanga cecropioides*, CO: *Chromolaena odorata*.

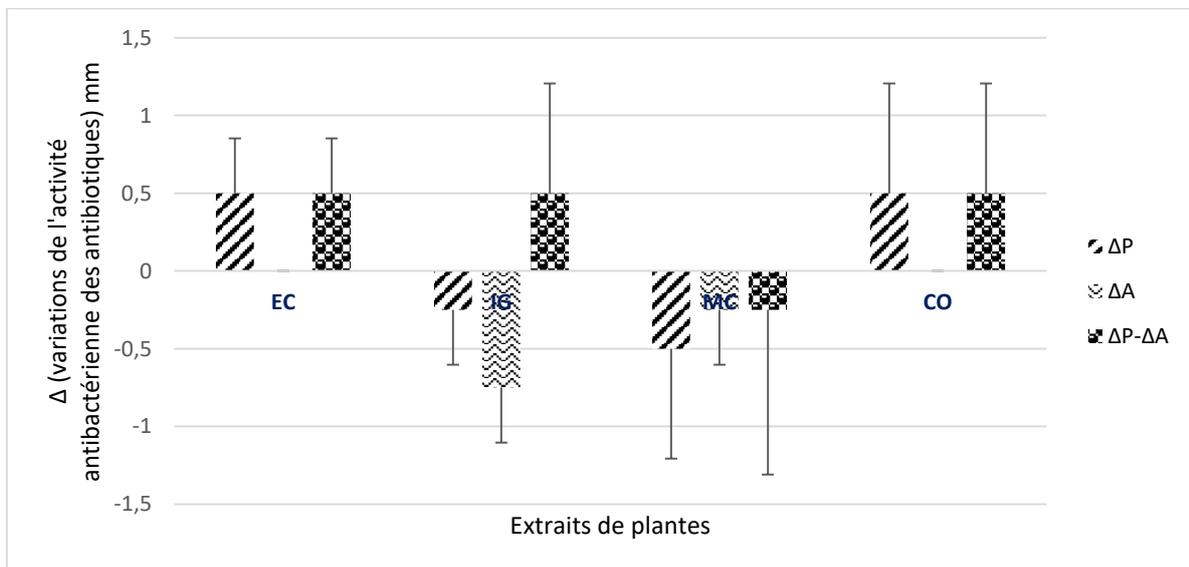


Figure 27: Résistance de *S. Typhi* aux extraits de plantes induite par *Irvingia gabonensis*

Si $\Delta_P - \Delta_A > 0$, la souche a développé une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A < 0$, la souche n'a pas développée une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A = 0$, la souche est restée stable. EC: *Annickia chlorantha*, IG: *Irvingia gabonensis*, MC: *Musanga cecropioides*, CO: *Chromolaena odorata*.

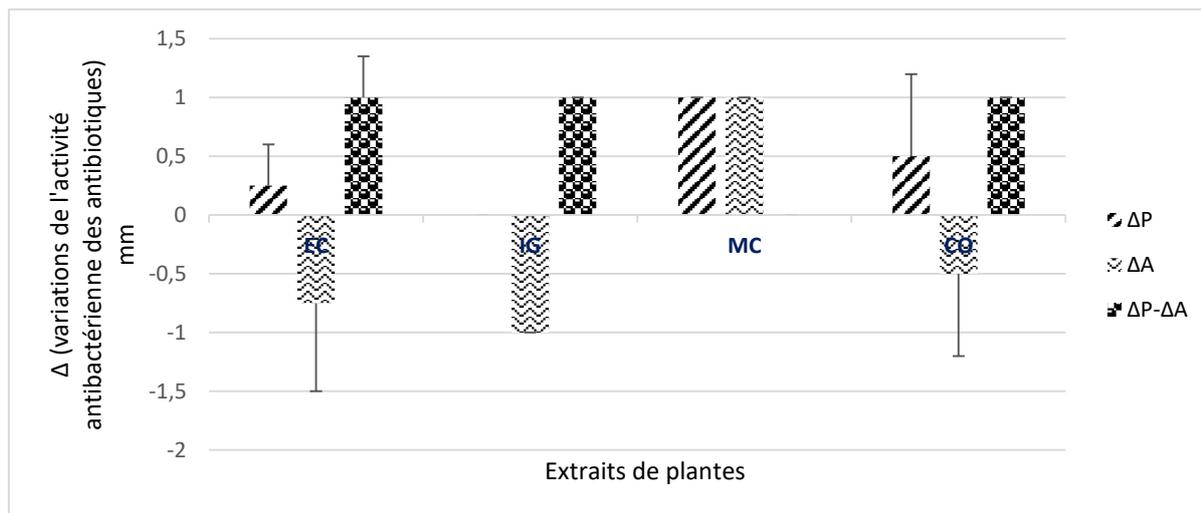


Figure 28: Résistance de *S. Typhi* aux extraits de plantes induite par un mélange d'antibactériens

Si $\Delta_P - \Delta_A > 0$, la souche a développé une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A < 0$, la souche n'a pas développée une résistance vis-à-vis de l'antibiotique testé. Si $\Delta_P - \Delta_A = 0$, la souche est restée stable. EC : *Annickia chlorantha*, IG : *Irvingia gabonensis*, MC : *Musanga cecropioides*, CO : *Chromolaena odorata*.

III.1.6. Concentrations minimales inhibitrices des extraits de plantes testés sur *S. Typhi* après son exposition aux extraits de plantes

La faible activité des extraits de plantes comparée à celle des antibiotiques testés n'ayant pas permis une bonne appréciation de la capacité des extraits de plantes à induire la résistance de *S. Typhi* aux extraits de plantes testés, les CMI de ces extraits de plantes ont été déterminées après le protocole d'induction. Connaissant les valeurs des CMI de ces extraits avant le protocole, une comparaison avec les valeurs obtenues après ce protocole a été faite afin de mieux apprécier le degré de résistance induite aux extraits de plantes chez *S. Typhi* après son exposition à *Annickia chlorantha*, à *Irvingia gabonensis* et à un mélange d'antibactériens.

Les résultats obtenus et présentés dans le Tableau XXX montrent qu'un contact prolongé de *S. Typhi* avec *Annickia chlorantha* induit sa résistance à trois extraits de plantes (*Annickia chlorantha*, *Irvingia gabonensis*, *Chromolaena odorata*), tandis que son exposition à *Irvingia gabonensis* induit sa résistance à deux (*Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis*). Par ailleurs, il est à noter que la souche ayant été mise en contact avec le mélange d'antimicrobiens est devenue résistante à tous les extraits de plantes testés.

Tableau XXX : CMI des extraits de plantes testés sur *S. Typhi* après induction de la résistance (mg/mL)

	<i>E. chlorantha</i>	<i>I. gabonensis</i>	<i>M. cecropioides</i>	<i>C. odorata</i>
<i>S. Typhi</i> _T	6.25	12.25	25	25
<i>S. Typhi</i> _{EC}	50	25	12.5	50
<i>S. Typhi</i> _{IG}	12.5	50	25	12.5
<i>S. Typhi</i> _{EP+A}	25	25	50	50

*S. Typhi*_T : *S. Typhi* témoin non exposée ; *S. Typhi*_{EC} : *S. Typhi* exposée à *Annickia chlorantha*, *S. Typhi*_{IG} : *S. Typhi* exposée à *Irvingia gabonensis*, *S. Typhi*_{EP+A} : *S. Typhi* exposée au mélange d'antibactériens.

L'exposition de *S. Typhi* et de *S. aureus* aux extraits de plantes entraîne une réduction globale de leur sensibilité aux antibiotiques pendant le protocole d'induction. Ce qui a permis de mettre en exergue la capacité des plantes médicinales à induire la résistance des bactéries aux antibiotiques. Les résultats obtenus en testant les extraits de plantes à la place des antibiotiques, ont montré que les substances végétales sont également capables d'induire la résistance de *S. Typhi* aux extraits de plantes. Cependant, la résistance induite vis-à-vis des extraits de plantes est moins importante que celle induite vis-à-vis des antibiotiques. Parmi les facteurs pouvant influencer le degré de résistance induite chez ces souches par les extraits de plantes, il y a la concentration utilisée pour l'exposition. En effet, il a été constaté que la résistance développée par *S. Typhi* exposée à la concentration fixe 1mg/mL d'extrait de plante est beaucoup plus importante que celle développée par cette même souche exposée aux autres concentrations fixes 0,5mg/mL et 1,5mg/mL de la même plante. Tous ces résultats mettent en évidence l'implication des extraits de plantes dans le mécanisme d'acquisition de la résistance des souches bactériennes aux antibiotiques.

III.1.7. Mécanismes d'acquisition de la résistance des souches bactérienne aux antibiotiques

Les résultats obtenus sur l'induction de la résistance des bactéries aux antibiotiques par leur exposition aux extraits de plantes ont mis en exergue la complexité du mécanisme d'acquisition de la résistance par ces souches aux antibiotiques. Les valeurs des CMI obtenues avant la recherche des gènes cibles des antibiotiques chez les échantillons de *S. Typhi* exposée aux extraits de plantes ont permis de confirmer ce phénomène. Ainsi la détection de certains gènes cibles d'activité au cours de la résistance aux antibiotiques chez *S. Typhi* ayant été exposée a permis d'avoir plus d'éclairage sur ce phénomène.

III.1.7.1. Extraction et électrophorèse du génome des différents échantillons de *S. Typhi*

La Figure 29 ci-dessous présente la photographie du gel d'agarose après extraction et électrophorèse du génome de *S. Typhi* exposée aux antibactériens. Une comparaison des bandes obtenues de l'ensemble des échantillons a été faite.

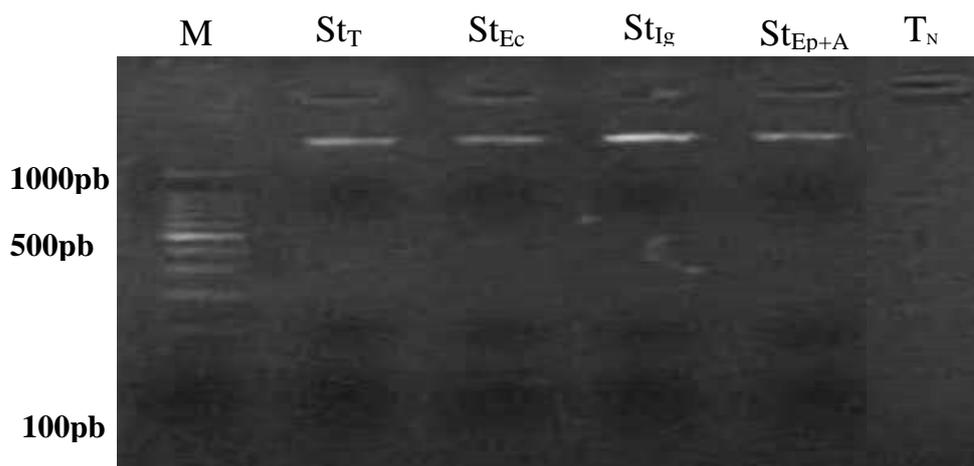


Figure 29: Profil de migration par électrophorèse du génome de *S. Typhi* exposée aux extraits de plantes

M: marqueur de poids moléculaire (100 pb) ; St_T : échantillon de *S. Typhi* initiale témoin non exposée ; St_{Ec} : échantillon de *S. Typhi* exposée à *Annickia chlorantha* ; St_{Ig} : échantillon de *S. Typhi* exposée à *Irvingia gabonensis* ; St_{Ep+A} : échantillon de *S. Typhi* exposée à un mélange Extrait de plante+antibiotique ; T_N : Témoin négatif sans souche

A l'observation de cette figure, il en ressort que les bandes du génome de *S. Typhi* exposée à *Annickia chlorantha* (Ec), à *Irvingia gabonensis* (Ig) et à un mélange d'antibactériens (Ep+A) sont semblables à celle de la souche témoin non exposée (T). En effet, la taille des bandes du génome de *S. Typhi* observée sur gel d'agarose après électrophorèse est la même pour la souche exposée ou non.

III.1.7.2. Mécanisme d'acquisition de la résistance de *S. Typhi* aux β -lactamines (amoxicilline)

Deux gènes codant pour deux β -lactamases à spectre élargi différents ont été recherchés par PCR (*bla*TEM et *bla*SHV) afin d'identifier le mécanisme de résistance de *S. Typhi* aux β -lactamines et particulièrement à l'amoxicilline après son exposition à différents antibactériens. Les valeurs des CMI de cet antibiotique présentées dans le Tableau XXXI, ont permis de confirmer la résistance induite par les substances antibactériennes chez cette souche. L'échantillon témoin (T) étant resté sensible à l'antibiotique. Cependant, la résistance induite par le mélange d'antimicrobiens chez la même souche est plus importante que celle induite par les extraits de plantes : *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis*.

Tableau XXXI : Phénotype de résistance de *S. Typhi* à l'amoxicilline après son exposition à différents antibactériens

	St_T	St_{Ec}	St_{Ig}	St_{Ep+A}
CMI de l'AMX (μ g/ml)	2	15	15	>500
Phénotype de résistance à l'AMX	S	R	R	R

S: la souche est sensible; R: la souche a développé une résistance

St_T: échantillon de *S. Typhi* initiale témoin non exposée ; St_{Ec}: échantillon de *S. Typhi* exposée à *Annickia chlorantha* ; St_{Ig}: échantillon de *S. Typhi* exposée à *Irvingia gabonensis* ; St_{Ep+A}: échantillon de *S. Typhi* exposée à un mélange Extrait de plante+antibiotique

Les résultats concernant l'expression des gènes codant pour les β -lactamases, présentés sur la Figure 30, ont permis de détecter la présence du gène *bla*TEM chez *S. Typhi* exposée aux différents antibactériens y compris chez l'échantillon témoin non exposé. Le gène *bla*SHV quant à lui n'était pas détecté chez tous les échantillons de *S. Typhi* exposée ou non (Figure 31).

Au vue de ce qui précède, la résistance développée par cette souche à l'amoxicilline (Tableau XXXI), observée après son exposition à *Annickia chlorantha* (Ec), à *Irvingia gabonensis* (Ig) et au mélange d'antibactériens (Ep+A) serait liée à l'expression du gène *bla*TEM chez cette souche.

Malgré la présence de ce même gène chez la souche témoin non exposée (T), celle-ci est restée sensible à l'amoxicilline. L'exposition de *S. Typhi* aux antibactériens serait donc à l'origine de l'expression de ce gène.

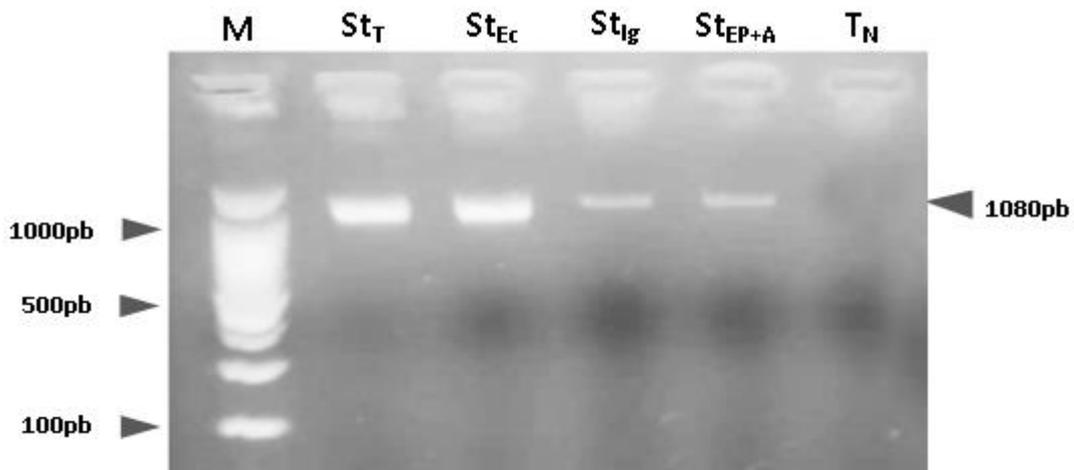


Figure 30: Profil de migration par électrophorèse des produits d'amplification du gène *bla*TEM de *S. Typhi*.

M: marqueur de poids moléculaire (100 pb) ; St_T : échantillon de *S. Typhi* initiale témoin non exposée ; St_{Ec} : échantillon de *S. Typhi* exposée à *Annickia chlorantha* ; St_{Ig} : échantillon de *S. Typhi* exposée à *Irvingia gabonensis* ; St_{EP+A} : échantillon de *S. Typhi* exposée à un mélange Extrait de plante+antibiotique ; T_N : Témoin négatif sans souche

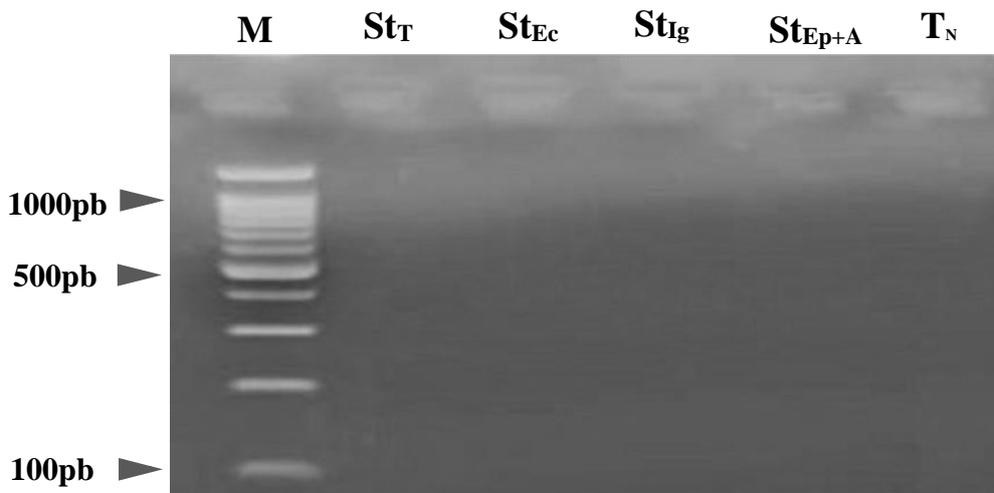


Figure 31: Profil de migration par électrophorèse des produits d'amplification du gène *bla*SHV de *S. Typhi*.

M: marqueur de poids moléculaire (100 pb) ; St_T : échantillon de *S. Typhi* initiale témoin non exposée ; St_{Ec} : échantillon de *S. Typhi* exposée à *Annickia chlorantha* ; St_{Ig} : échantillon de *S. Typhi* exposée à *Irvingia gabonensis* ; St_{EP+A} : échantillon de *S. Typhi* exposée à un mélange Extrait de plante+antibiotique ; T_N : Témoin négatif sans souche

III.1.7.3. Mécanisme d'acquisition de la résistance de *S. Typhi* au cotrimoxazole

La détection d'un gène spécifique conférant une résistance au cotrimoxazole à la souche *S. Typhi* exposée ou non a été recherchée par l'utilisation de l'amorce *Sul1*.

Les résultats du Tableau XXXII, présentant les valeurs des CMI du cotrimoxazole et le phénotype de résistance de *S. Typhi* à cet antibiotique, confirment les capacités des antibactériens utilisés pour l'exposition de cette souche, à induire la résistance de cette dernière au cotrimoxazole.

Tableau XXXII : Phénotype de résistance de *S. Typhi* au cotrimoxazole après son exposition à différents antibactériens

	St_T	St_{Ec}	St_{Ig}	St_{Ep+A}
CMI du SXT/TSU (µg/mL)	62	125	125	>500
Phénotype de résistance au SXT/TSU	S	R	R	R

S: la souche est sensible ; R: la souche a développé une résistance

St_T: échantillon de *S. Typhi* initiale témoin non exposée ; St_{Ec}: échantillon de *S. Typhi* exposée à *Annickia chlorantha* ; St_{Ig}: échantillon de *S. Typhi* exposée à *Irvingia gabonensis* ; St_{Ep+A}: échantillon de *S. Typhi* exposée à un mélange Extrait de plante+antibiotique

Les résultats présentés dans la Figure 32 ont permis de mettre en évidence la présence du gène *sul1* chez les échantillons de *S. Typhi* issue de l'exposition aux extraits de plante *Annickia chlorantha* (Ec) et *Irvingia gabonensis* (Ig). Par contre, ce gène n'a pas été détecté chez la même souche issue de l'exposition au mélange d'antibactériens (Ep+A) et chez le témoin non exposé (T). Contrairement à l'échantillon témoin qui est resté sensible au cotrimoxazole, l'échantillon de la souche exposée au mélange a développé une résistance à cet antibiotique. On note même que cette résistance est plus importante que celle développée par les échantillons de *S. Typhi* exposée à *Annickia chlorantha* (Ec) et à *Irvingia gabonensis* (Ig) chez lesquels on a identifié la présence du gène *sul1*. Ainsi, la résistance développée par cette souche au cotrimoxazole après son exposition à *Annickia chlorantha* (Ec) et à *Irvingia gabonensis* (Ig) serait liée à l'expression de ce gène due à l'influence de ces deux extraits de plante. Par contre la résistance acquise par la même souche au cotrimoxazole, après son exposition au mélange d'antibactériens (Ep+A) n'est pas liée à l'expression de ce gène.

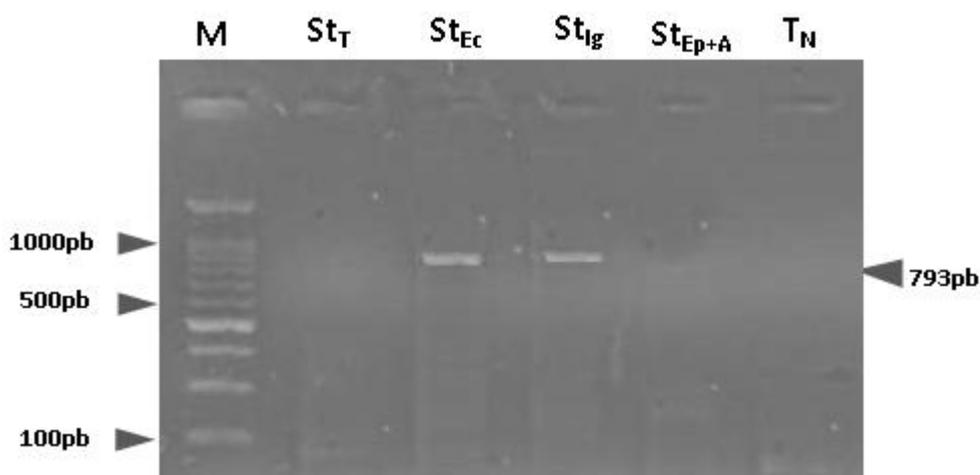


Figure 32: Profil de migration par électrophorèse des produits d’amplification du gène *sull* de *S. Typhi*.

M: marqueur de poids moléculaire (100 pb) ; St_T : échantillon de *S. Typhi* initiale témoin non exposée ; St_{Ec} : échantillon de *S. Typhi* exposée à *Annickia chlorantha* ; St_{Ig} : échantillon de *S. Typhi* exposée à *Irvingia gabonensis* ; St_{Ep+A} : échantillon de *S. Typhi* exposée à un mélange Extrait de plante+antibiotique ; T_N : Témoin négatif sans souche

III.1.7.4. Mécanisme d’acquisition de la résistance de *S. Typhi* au chloramphénicol

Le Tableau XXXIII présente les valeurs des CMI du chloramphénicol, obtenues avant la recherche du gène *floR*. On observe que tous les échantillons de *S. Typhi* exposée aux antibactériens ont acquis une résistance au chloramphénicol. Comme dans le cas précédent, le niveau de résistance de *S. Typhi* exposée au mélange Extrait de plante+antibiotique est plus importante que celui des échantillons de la même souche exposée aux autres antibactériens.

Tableau XXXIII : Phénotype de résistance de *S. Typhi* au chloramphénicol après son exposition à différents antibactériens

	St_T	St_{Ec}	St_{Ig}	St_{Ep+A}
CMI du C ($\mu\text{g/mL}$)	4	15	15	250
Phénotype de résistance au C	S	R	R	R

S: la souche est sensible; R: la souche a développé une résistance
 St_T : échantillon de *S. Typhi* initiale témoin non exposée ; St_{Ec} : échantillon de *S. Typhi* exposée à *Annickia chlorantha* ; St_{Ig} : échantillon de *S. Typhi* exposée à *Irvingia gabonensis* ; St_{Ep+A} : échantillon de *S. Typhi* exposée à un mélange Extrait de plante+antibiotique

Les résultats obtenus et présentés sur la Figure 33 concernant la recherche du gène *floR* codant pour la résistance au chloramphénicol montrent que seuls les échantillons ayant été exposés aux extraits de plantes (*Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis*) possèdent ce gène.

Ainsi, la résistance exprimée par *S. Typhi* vis-à-vis du chloramphénicol après son exposition aux deux extraits de plantes, serait liée au gène *floR* qui se trouve dans son génome. Dans ce cas, cette résistance serait le résultat de l'expression de ce gène contrairement à celle observée chez *S. Typhi* exposée au mélange d'antibactériens qui serait probablement le résultat d'une adaptation phénotypique.

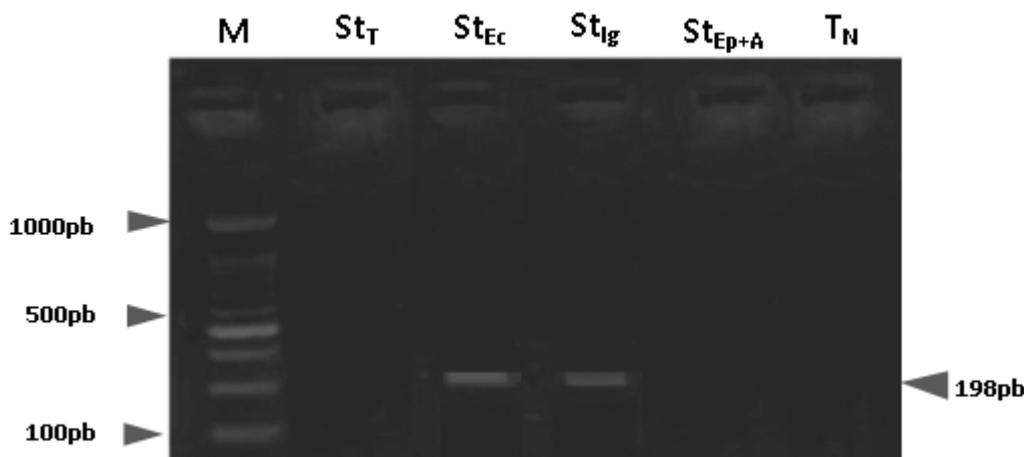


Figure 33: Profil de migration par électrophorèse des produits d'amplification du gène *floR* de *S. Typhi*.

M: marqueur de poids moléculaire (100 pb) ; St_T : échantillon de *S. Typhi* initiale témoin non exposée ; St_{Ec} : échantillon de *S. Typhi* exposée à *Annickia chlorantha* ; St_{Ig} : échantillon de *S. Typhi* exposée à *Irvingia gabonensis* ; St_{Ep+A} : échantillon de *S. Typhi* exposée à un mélange Extrait de plante+antibiotique ; T_N : Témoin négatif sans souche

III.1.7.5. Mécanisme d'acquisition d'une multirésistance de *S. Typhi* aux antibiotiques

Les intégrons de classe 1 (*intI*) qui constituent un groupe de gènes conférant une multirésistance aux antibiotiques, ont été recherchés par PCR. On remarque à partir du Tableau XXXIV, que tous les échantillons de *S. Typhi* ayant été soumis à l'action des antibactériens ont développé une résistance à plus de deux antibiotiques.

Tableau XXXIV : Phénotype de résistance de *S. Typhi* aux antibiotiques après son exposition à différents antibactériens

		St_T	St_{Ec}	St_{Ig}	St_{Ep+A}
CMI des ATB ($\mu\text{g/mL}$) et Phénotype de résistance de <i>S. Typhi</i> aux ATB	CIP	(62) S	(62) S	(15) S	(500) R
	AMX	(2) S	(15) R	(15) R	(>500) R
	C	(4) S	(15) R	(15) R	(250) R
	GM	(8) S	(62) R	(62) R	(15) R
	SXT/TSU	(62) S	(125) R	(125) R	(>500) R

S : la souche est sensible ; R : la souche a développé une résistance

Parmi les cinq échantillons de *S. Typhi* sélectionnés, deux ont révélé la présence du gène *int1* (Figure 34). Il s'agit de l'échantillon issue de l'exposition à l'extrait de plante *Annickia chlorantha* (Ec) et de celui issue de l'exposition à *Irvingia gabonensis* (Ig). Par contre, ce gène n'a pas été détecté chez l'échantillon issu de l'exposition au mélange Extrait de plante+antibiotique, ainsi que chez l'échantillon témoin non exposé (Figure 34). Par conséquent, la mise en évidence du gène *int1* chez les échantillons ayant été exposés aux extraits de plante *Annickia chlorantha* (Ec) et *Irvingia gabonensis* (Ig) indique que la résistance observée est liée à l'expression de ce gène. Par contre, l'absence de ce gène chez l'échantillon de *S. Typhi* issue du mélange Extrait de plante+antibiotique montre que la résistance observée dans ce cas est le résultat d'un mécanisme n'impliquant pas ce dernier.

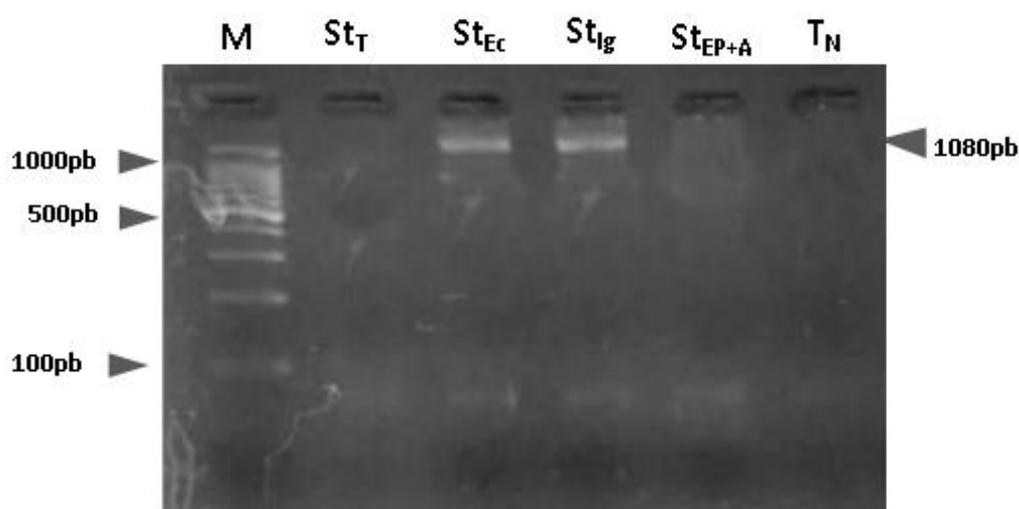


Figure 34: Profil de migration par électrophorèse des produits d'amplification du gène *int1* de *S. Typhi*.

M: marqueur de poids moléculaire (100 pb) ; St_T : échantillon de *S. Typhi* initiale témoin non exposée ; St_{Ec} : échantillon de *S. Typhi* exposée à *Annickia chlorantha* ; St_{Ig} : échantillon de *S. Typhi* exposée à *Irvingia gabonensis* ; St_{EP+A} : échantillon de *S. Typhi* exposée à un mélange Extrait de plante+antibiotique ; T_N : Témoin négatif sans souche

La détection des gènes de résistance *sulI*, *floR* et *int1* trouvés chez *S. Typhi* exposée aux extraits de plantes *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis* a montré que les extraits de plantes sont impliqués dans l'expression des gènes cibles aux antibiotiques. Cependant, ces gènes n'ont pas été détectés chez *S. Typhi* exposée au mélange Extrait de plante+antibiotique. Ces résultats ont démontré que les extraits de plantes sont capables d'induire la résistance bactérienne aux antibiotiques par divers mécanismes impliquant des gènes de résistance ou pas.

III.2. DISCUSSION

La sensibilité des souches bactériennes (*S. Typhi* et *S. aureus*) vis-à-vis des différents antimicrobiens testés s'est traduite par la présence d'auréoles claires autour des disques.

Les résultats obtenus montrent que les souches *S. Typhi* et *S. aureus* sont sensibles aussi bien aux antibiotiques qu'aux extraits de plantes testés dans ce travail. L'activité inhibitrice des extraits pourrait s'expliquer par la présence dans ceux-ci de différents métabolites secondaires possédant des propriétés antimicrobiennes, car plusieurs investigations ont eu à démontrer que les extraits de plantes contenaient des substances telles que les tanins, les flavonoïdes et les saponines, responsables de leur activité antibactérienne (**Adesokan et al., 2007; Dawang et Datup, 2012**). Cependant, l'activité antibactérienne des extraits de plantes varie d'une plante à une autre. Cette différence d'activité pourrait s'expliquer par la différence en composition et en concentration de métabolites secondaires de ces différents extraits (**Takeo et al., 2004**).

Par ailleurs, il a été observé que les activités antimicrobiennes des extraits de plantes restent bien inférieures à celles des antibiotiques. La faible activité des extraits de plantes par rapport aux antibiotiques se justifierait par le fait que contrairement aux antibiotiques qui sont des molécules pures, les extraits de plantes sont des mélanges de molécules actives auxquelles s'ajoutent d'autres substances telles que les polysaccharides et les polypeptides capables de se lier aux composés actifs et de masquer ou diminuer leur activité (**Sanogo et al., 2006**).

Parmi les antibiotiques testés sur *S. Typhi*; la ciprofloxacine, la gentamicine et l'amoxicilline ont présenté une meilleure activité par rapport aux autres antibiotiques. Et concernant la souche *S. aureus*; la vancomycine, l'érythromycine et le cotrimoxazole sont les antibiotiques les plus actifs. Cependant, les valeurs des CMI ont permis de confirmer la forte activité de l'amoxicilline et de la vancomycine vis-à-vis de *S. Typhi* et de *S. aureus* respectivement. L'efficacité de ces antibiotiques qui agissent au niveau de la paroi bactérienne, serait dû au fait qu'ils ont une certaine facilité à atteindre leurs cibles, car selon **Nairouz (2005)**, pour qu'un antibiotique soit efficace, il faudrait qu'il atteigne sa cible dans la bactérie. Les extraits de plantes *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis* ont présenté une meilleure activité vis-à-vis de *S. Typhi* par rapport aux autres plantes testées. La forte activité d'*Annickia chlorantha* serait liée à la présence dans cette plante, des alcaloïdes qui se révèlent quantitativement plus élevés que les autres constituants (**Dawodu et al., 2014**). En effet, ces molécules sont connues comme douées de propriétés antimicrobiennes (**Faizi et al., 2003**). Le mécanisme d'action des alcaloïdes est attribué à leur capacité à s'insérer avec l'ADN. La présence des tanins (composés phénoliques) dans l'extrait de plante *Irvingia gabonensis* à des quantités très élevées par rapport à tous les autres constituants (**Efosa et Ngozi, 2018 ; Don,**

2018) serait à l'origine de sa forte activité. Parmi les extraits de plante testés vis-à-vis de *S. aureus*, *Chromolaena odorata* et *Erigeron floribundus* ont présenté les meilleures activités. La forte activité de ces deux plantes, qui sont de la famille des Asteraceae, serait liée à leur richesse en métabolites secondaires et particulièrement à la présence élevée de composés phénoliques tels que les flavonoïdes (Sharma *et al.*, 2014 ; Akinmoladun *et al.*, 2007).

Les souches bactériennes *S. Typhi* et *S. aureus*, soumises à une pression moléculaire des extraits de plantes ont acquis une résistance aux antibiotiques testés. Cette capacité des bactéries à acquérir des résistances aux antibiotiques peut être le résultat de plusieurs modifications métaboliques et /ou génétiques dans la population bactérienne. Ces changements peuvent impliquer plusieurs mécanismes de résistance dépendant du mode d'action de chaque antimicrobien et de la souche bactérienne. Le mode d'action des molécules actives contenues dans les extraits de plantes suggère un mode d'action multi-objets impliquant à la fois des cibles membranaires et intracellulaires. La modification des sites de liaison initiaux des bactéries et /ou des modifications de la membrane cytoplasmique empêcheraient les antibiotiques d'atteindre leurs cibles (Bayer *et al.*, 2000 ; Peschel *et al.*, 2001 ; Samuelsen *et al.*, 2005).

Les variations des activités antibactériennes des antibiotiques testés vis-à-vis de *S. aureus* après le protocole d'induction, montrent que l'exposition de cette souche à *Chromolaena odorata* provoque plus de résistance chez cette dernière que son exposition à *Erigeron floribundus*. En effet, *S. aureus* exposée à *Chromolaena odorata* a développé une résistance à tous les antibiotiques testés. Tandis que la même souche exposée à *Erigeron floribundus* a développé une résistance à deux antibiotiques (l'oxacilline et le cotrimoxazole) sur les cinq testés. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que l'extrait de plante *Chromolaena odorata* est plus riche en métabolites secondaires doués d'activités antibactériennes à l'exemple des flavonoides, composés phénoliques majoritaires dans cette plante (Akinmoladun *et al.*, 2007). En effet, cette multitude de métabolites actifs suggère une multitude de mécanismes d'action qui seraient à l'origine des résistances observées à plusieurs antibiotiques par *S. aureus* après son exposition à *Chromolaena odorata* (Yala *et al.*, 2001). On a observé que la résistance induit par *Erigeron floribundus* chez *S. aureus* vis-à-vis de l'oxacilline est permanente. Le caractère persistant de cette résistance serait lié à une mutation génétique ou à une modification du métabolisme de la bactérie provoquée par la pression de l'antibiotique sur la souche (Van der Hors *et al.*, 2011). La souche aurait subi une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification de son métabolisme bactérien.

L'exposition de *S. Typhi* aux extraits de plantes *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis*, induit la résistance de cette souche aux antibiotiques. En effet, l'exposition à l'extrait *Annickia chlorantha* induit la résistance de *S. Typhi* à trois antibiotiques sur les cinq testés. C'est également le cas pour l'exposition à *Irvingia gabonensis*. L'efficacité de ces extraits de plante à induire la résistance aux antibiotiques serait liée à leur composition riche en métabolites actifs. En effet, plusieurs études ont révélé la présence à de grandes quantités des alcaloïdes dans l'extrait *Annickia chlorantha* et des tannins dans l'extrait *Irvingia gabonensis* ainsi que d'autres métabolites comme les saponines, les flavonoïdes, les phénols et les glycosides cardiaques et les terpénoïdes (**Dawodu et al., 2014 ; Efosa et Ngozi, 2018 ; Don, 2018**). Cependant les observations faites durant le protocole d'induction montrent que la résistance développée par *S. Typhi* en contact avec l'extrait de plante baisse en absence de tout contact avec ce dernier. Cette variation du taux de résistance de *S. Typhi*, vis-à-vis des différents antibiotiques testés serait le résultat d'une combinaison de mécanismes de résistance. En effet, il est possible que dans un premier temps, la présence de l'extrait de plante ait modifié le métabolisme de *S. Typhi* vis-à-vis des différents antibiotiques et que dans un deuxième temps le prolongement de l'exposition ait provoqué une mutation génétique sur cette souche de par la pression moléculaire (**Hall, 2004**) lui permettant ainsi de lutter efficacement contre ces antibiotiques. En absence de l'extrait plante, le mécanisme de résistance lié au métabolisme aurait cessé d'où la baisse du niveau de résistance observé après exposition.

Les observations faites durant la phase d'exposition de *S. Typhi* à la décoction 2 et 4 ont montré que ces extraits de plantes sont capables d'induire la résistance de cette souche à la plupart des antibiotiques testés. Mais on note que le niveau de résistance de *S. Typhi* vis-à-vis de ces antibiotiques tend à baisser en absence des décoctions. Malgré la baisse du niveau de résistance observée à la phase de repiquage en absence des décoctions, *S. Typhi* conserve tout de même sa résistance à tous les antibiotiques. Ces résultats montrent que Dec.2 et Dec.4 induisent plus la résistance de *S. Typhi* aux antibiotiques par rapport aux extraits *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis*. Ceci pourrait s'expliquer par le nombre élevé de molécules bioactives variées contenues dans les décoctions. En effet, la variété de biomolécules actives implique le développement de plusieurs mécanismes de résistance (**Yala et al., 2001**). Cependant, il n'est pas à exclure que les décoctions pourraient provoquer plus de mutations que les extraits de plantes simples.

Les résultats obtenus concernant l'impact de la concentration d'extrait de plante utilisée pour l'exposition ont montré que durant les cinq premiers jours d'exposition de *S. Typhi* à différentes concentrations fixes (0,5mg/mL ; 1mg/mL et 1,5mg/mL), celle-ci développe

rapidement une résistance à la majorité des antibiotiques testés. Cette perte de sensibilité serait liée à une adaptation, de cette souche dû à une modification du milieu de culture. Le mécanisme de résistance rapide observé serait le résultat de l'activation d'une réponse au stress chez la bactérie. D'après certains travaux, l'implication d'une protéine de réponse au stress dans la résistance aux antibiotiques a déjà été démontrée, plaidant pour une activation du système de stress bactérien en tant que mécanisme de résistance possible (**Ulvatne et al., 2002 ; Katzif et al., 2003 ; Samuelsen et al., 2005**). Par ailleurs, on note que toutes les trois concentrations d'extrait de plante testées pendant 14 jours sur *S. Typhi* ont influencé la sensibilité de cette souche en la rendant plus résistante aux antibiotiques. Cependant, cette sensibilité varie en fonction de l'antibiotique testé et de la dose d'exposition. Lorsqu'on expose *S. Typhi* à une concentration double d'extrait de plante passant de 0,5mg/mL à 1mg/mL, on observe une différence significative sur le comportement de cette souche vis-à-vis de tous les antibiotiques. En effet, l'exposition de *S. Typhi* à la concentration 1mg/mL d'extrait de plante rend cette souche beaucoup plus résistante aux antibiotiques par rapport à son exposition aux concentrations 0,5mg/mL et 1,5mg/mL d'extrait. Ce résultat suggèrent que l'exposition à des niveaux d'extraits de plantes inférieurs à la CMI et particulièrement à la concentration 1 mg/mL est un facteur de risque dans l'acquisition d'une résistance. Ce résultat va à l'encontre de celui de **Van der Hors et al.**, qui en 2011, avaient montré qu'en doublant la concentration des substances antibactériennes, cela n'a aucune influence significative sur le comportement de la souche vis-à-vis de ces antibiotiques. Par contre lorsque la concentration d'exposition des souches de *S. Typhi* tripple passant de 0,5 à 1,5 mg/mL d'extrait de plante, le comportement de cette souche vis-à-vis des antibiotiques vari d'un antibiotique à un autre. Ainsi, cette dose n'aurait aucune influence significative sur l'augmentation de la résistance de *S. Typhi* vis-à-vis des antibiotiques testés. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'à cette dose, la bactérie serait moins stressée. Ce résultat semble contredire celui de Martinez (2009) qui a montré que l'usage excessif des antibiotiques constitue un facteur de pression ou de stress considérable sur l'écologie bactérienne contribuant ainsi à augmenter leur résistance (**Martinez, 2009**).

L'exposition de *S. Typhi* à *Annickia chlorantha* et à *Irvingia gabonensis* a induit sa résistance aux extraits de plantes. Ainsi les phytochimolécules actives contenues dans les substances végétales sont capables d'induire une résistance bactérienne aux extraits de plantes. Cette résistance serait le résultat de plusieurs modifications métaboliques et / ou génétiques non spécifiques. En fait, il a été observé qu'un mécanisme général de résistance, tel que les pompes à éflux, qui consiste à éliminer les substances antibactériennes par pompage actif hors de la cellule, est impliqué dans la résistance bactérienne à certaines huiles essentielles (**Couriera,**

2017). Selon **Yap et al.** en 2014, les antibiotiques ont besoin d'être transportés à travers la membrane plasmique et une surproduction des pompes à protéines dans cette membrane plasmique faciliterait la résistance des bactéries par expulsion des antibiotiques. Donc par ce mécanisme, *S. Typhi* en présence des extraits de plantes *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis*, aurait surproduit les pompes à protéines lui permettant de développer une résistance par élimination des extraits de plantes testés, d'où les résistances observées.

Les résultats obtenus concernant les mécanismes de résistance ont montré que *S. Typhi*, ayant été exposée ou non aux substances antibactériennes possède le gène *bla*TEM. Par contre, le gène *bla*SHV n'a pas été détecté chez cette souche. Les autres gènes cibles des antibiotiques recherchés à savoir : *sul1*, *floR* et *int1* ont été trouvés chez *S. Typhi* exposée aux extraits de plantes *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis*. Cependant, ces gènes bien que présents dans le génome de cette souche, n'ont pas été détectés chez l'échantillon de *S. Typhi* exposée au mélange *Extrait de plante*+antibiotique et chez l'échantillon témoin non exposé. L'exposition de *S. Typhi* aux extraits de plantes *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis* aurait donc provoqué l'expression des gènes *sul1*, *floR* et *int1*. Par contre le fait de ne pas avoir détecté ces gènes dans les autres échantillons démontrent qu'ils étaient "silencieux" et que du fait de l'exposition en continue, ils ont pu s'exprimer. Ces résultats sont semblables à ceux de **Clemente et al. (2015)** qui ont trouvé des gènes de résistance sur des bactéries d'une communauté d'individus peu confrontés à des antibiotiques. Ces gènes étaient "silencieux" vis-à-vis des antibiotiques, mais pouvaient s'exprimer par une sélection naturelle en cas de contact répété de ces populations avec des antibiotiques. Ce résultat met ainsi en exergue l'implication des extraits de plantes dans le développement de la résistance bactérienne aux antibiotiques en rapport avec les modifications génétiques.

La détection du gène *bla*TEM, qui code pour les β -Lactamases, chez tous les échantillons de *S. Typhi* y compris chez l'échantillon témoin non exposée (T) aux antimicrobiens, montre que l'expression de ce gène pourrait être le résultat de l'exposition en continue aux substances antimicrobiennes. En effet les β -Lactamases qui sont des enzymes capables d'hydrolyser le noyau β -lactame des antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines (**Korzeniewska et Harnisz, 2013**) sont fabriquées en permanence par la bactérie en absence de toute substance antibactérienne. La résistance de *S. Typhi* à l'amoxicilline, observée après son exposition aux différentes substances antibactériennes se justifierait par une augmentation importante de la production de ces enzymes responsables de la résistance.

Le gène *sul1* a été mis en évidence chez les échantillons de *S. Typhi* issue de l'exposition aux extraits de plantes *Annickia chlorantha* (Ec) et *Irvingia gabonensis* (Ig). Par contre, ce gène

n'a pas été détecté chez la même souche issue de l'exposition au mélange Extrait de plante+antibiotique (Ep+A) et chez le témoin non exposée (T). Ceci pourrait se justifier par le fait que le gène *sulI* présent dans le génome de *S. Typhi* était « silencieux ». Il se serait exprimé sous l'influence des phytobiomolécules actives contenues dans les extraits de plantes *Annickia chlorantha* (Ec) et *Irvingia gabonensis* (Ig). Ainsi, la résistance développée par cette souche au cotrimoxazole après son exposition à *Annickia chlorantha* (Ec) et à *Irvingia gabonensis* (Ig) serait liée à l'expression de ce gène due à l'influence de ces deux extraits de plantes (**Clemente et al., 2015**). En effet, le gène *sulI* identifié est capable de produire la dihydroptéroate synthétase impliqué dans la synthèse des acides nucléiques (**Peyret, 1994**). Les sulfamides agissent comme inhibiteurs compétitifs de l'acide para-aminobenzoïque vis-à-vis de la dihydroptéroate synthétase. Donc les bactéries ont pu résister à l'action du cotrimoxazole, en augmentant la synthèse du dihydroptéroate synthetase et par là la production de l'acide para-aminobenzoïque (**Peyret, 1994**). Contrairement à l'échantillon témoin qui est resté sensible au cotrimoxazole, l'échantillon de la souche exposée au mélange Extrait de plante+antibiotique (Ep+A) a développé une résistance à cet antibiotique. Cette résistance serait le résultat d'un mécanisme qui n'est pas liée à l'expression du gène *sulI*. Tous ces changements impliquent plusieurs mécanismes de résistance dépendant du mode d'action des substances bioactives contenues dans ces extraits de plantes (**Yala et al., 2001**). En effet, le mécanisme le plus souvent décrit concerne la cible de l'antibiotique. Celle-ci est substituée et n'est donc plus reconnue par l'antibiotique. L'autre mécanisme mis en évidence au cours de la résistance au cotrimoxazole concerne la perméabilité de la bactérie à ces molécules.

Les résultats concernant la recherche du gène *floR* codant pour la résistance au chloramphénicol ont montré que seuls les échantillons de *S. Typhi* ayant été exposés aux extraits de plantes *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis* possèdent ce gène. Ainsi, la résistance acquise par *S. Typhi* vis-à-vis du chloramphénicol après son exposition aux deux extraits de plantes, serait liée au gène *floR* qui se trouve dans son génome. En effet, ce gène de par son expression est capable de conférer une résistance à la bactérie en codant pour un mécanisme non enzymatique qui présente une forte homologie avec les pompes à efflux (**Arcangioli, 2000**). Par contre, la résistance développée par *S. Typhi* au chloramphénicol après son exposition au mélange Extrait de plante+antibiotique fait appel à d'autres mécanismes qui n'impliqueraient pas le gène *floR*.

Parmi les cinq échantillons de *S. Typhi* sélectionnés, deux ont révélé la présence du gène *int1*. Il s'agit de l'échantillon issue de l'exposition à l'extrait de plante *Annickia chlorantha* (Ec) et de celui issue de l'exposition à *Irvingia gabonensis* (Ig). La présence du gène *int1*,

conférant la résistance à plusieurs antibiotiques, justifie le caractère multi-résistant observé chez *S. Typhi*. En effet, la présence de ce groupe de gènes chez les bactéries est généralement associée à un phénotype de multi-résistance (**Gillings *et al.*, 2008; Koczura *et al.*, 2014**). Des études ont démontré que les intégrons de classe 1 (*int1*) sont des intégrons de résistance qui portent en général un maximum de 10 gènes de résistance codant pour la résistance aux antibiotiques ou aux désinfectants (**Gassama-Sow *et al.*, 2006; An *et al.*, 2006**). Cependant, l'absence de ce gène chez *S. Typhi* exposée au mélange Extrait de plante+antibiotique mais résistante à plusieurs antibiotiques traduit le fait que la souche a développé d'autres mécanismes de résistance n'impliquant pas ce gène.

Ces résultats mettent en exergue la diversité des mécanismes impliqués dans l'acquisition de la résistance décrite par plusieurs auteurs (**Samuelsen *et al.*, 2005; Nikaido, 2009**). En effet, le mécanisme d'action d'un antibiotique sur une souche microbienne est fonction de la famille et de la diversité de la famille d'antibiotiques utilisés (**Yala *et al.*, 2001**).



**CONCLUSION
ET PERSPECTIVES**



CONCLUSION

Au terme de ce travail dont le but était d'élucider l'impact de l'exposition des bactéries (*S. Typhi* et *S. aureus*) aux extraits de plantes utilisés dans la pharmacopée traditionnelle sur leur capacité à acquérir une résistance aux antibiotiques, il en ressort que :

Les souches bactériennes (*S. Typhi* et *S. aureus*) avant l'exposition aux substances antimicrobiennes sont sensibles aussi bien aux antibiotiques testés qu'aux extraits de plantes. Les activités antimicrobiennes des extraits restent cependant bien inférieures à celles des antibiotiques ;

L'exposition de ces souches aux extraits de plantes traditionnellement utilisées au Cameroun dans le traitement de la typhoïde et des infections staphylococciques réduit de la sensibilité de ces souches vis-à-vis des antibiotiques et des extraits de plantes généralement prescrits dans la lutte contre ces infections. Ce qui prouve que l'utilisation sous pression sélective des plantes dans les traitements traditionnels peut, comme dans le cas de l'utilisation sous pression sélective des antibiotiques dans les pratiques cliniques et agricoles, être à l'origine de l'émergence et de la diffusion des bactéries résistantes aux antibiotiques. L'exposition de *S. Typhi* à trois concentrations fixes (0,5mg/mL ; 1mg/mL et 1,5mg/mL) d'extrait de plante induit la résistance de celle-ci aux antibiotiques. Ce qui a permis de montrer que la dose d'exposition influence le comportement de la bactérie vis-à-vis des antibiotiques. Ceci est d'autant plus alarmant qu'au Cameroun, l'automédication et le non-respect des doses d'antibiotiques seraient des pratiques très courantes.

La présence des gènes cibles des antibiotiques *sull*, *floR* et *int1* chez *S. Typhi* après son exposition aux extraits de plantes *Annickia chlorantha* et *Irvingia gabonensis* et l'absence de ces gènes chez l'échantillon de *S. Typhi* témoin non exposée a confirmé l'implication des extraits de plantes dans le mécanisme d'acquisition de la résistance aux antibiotiques.

Ces résultats permettent ainsi de lever un pan de voile sur le cas de plusieurs échecs thérapeutiques chez des populations admis dans nos hôpitaux après une longue cure non contrôlée d'utilisation de plantes médicinales.

PERSPECTIVES

Dans l'optique d'avoir plus d'éclairage sur les mécanismes d'acquisition de la résistance des souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques suite à leur exposition aux substances antibactériennes, il conviendrait d'approfondir cette étude aussi bien sur les souches bactériennes (*S. Typhi* et *S. aureus*), que sur les extraits de plantes utilisés dans la réalisation de ce travail. Ainsi, il serait important d'envisager dans des études futures :

- ✓ La détection des éventuelles mutations génétiques des souches utilisées suite à leur exposition aux extraits de plantes ;
- ✓ La recherche de tous les gènes impliqués dans le mécanisme d'acquisition de la résistance aux différentes familles des antibiotiques non seulement chez *S. Typhi* mais aussi chez *S. aureus* ;
- ✓ Les types interactions entre les phytobiomolécules contenues dans les extraits de plantes médicinales et les antibiotiques ;
- ✓ La réalisation *in vivo* de la mise en évidence de la résistance de *S. Typhi* et de *S. aureus* induite par les extraits de plantes.



BIBLIOGRAPHIE



- Adesokan A., Yakubu T., Owoyele V., Akanji A., Soladoye O., Lawal K (2008). Effect of administration of aqueous extract of *Annickia chlorantha* stem bark on brewer's yeast-induced pyresis in rats. *African Journal of Biochemistry Research*, 2 :165–9.
- Adesokan A., Akanji A., Yakubu T. (2007). Antibacterial potentials of aqueous extract of *Annickia chlorantha* stem bark. *African Journal of Biotechnology*, 6: 2502–2505.
- Agnem E., Aristide M., Abakar A., Eugène N. (2011). Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne de cinq plantes de la pharmacopée traditionnelle de l'Adamaoua (Cameroun). *Cameroon Journal of Experimental Biology*, 7 : 22-27.
- Agnem E., Sassa A., Abakar Abba, Nyonbourg E. (2011). Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne de cinq plantes de la pharmacopée traditionnelle de l'Adamaoua (Cameroun). *Cameroon Journal of Experimental Biology* 7 : 22-27.
- Ahmad I., Mehmood Z., Mohammad F. (1998). Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 62: 183–193.
- Ahorlu, C. (1997). Malaria-related beliefs and behaviour in southern Ghana : implications for treatment, prevention and control. *Tropical Medicine and International Health*, 2: 488–499.
- Amadou A., D. (2013). *Escherichia coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire. *Doctoral dissertation*, 62-63.
- Amazian K., Rossello J., Castella A., Sekkat S., Terzaki S., Dhidah L. et Fabry J. (2010). Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 16, 1070-1078.
- An T., Duijkeren V., Fluit and Gastra W. (2006). Characterization of resistance genes associated with class 1 integrons in non-typhoid *Salmonella*. In *Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture*, 92-95.
- Ananthanarayan P. (2006). Textbook of Microbiology. *Edition Seventh, India*. 665p.
- Anderson, O'Connor, MacGregor and Schwartz (1993). Patient use and assessment of conventional and alternative therapies for HIV infection and AIDS. *AIDS*, 7: 561-566.
- Andriole T. (2000). The Quinolones. *Elsevier Science*, 517 p.

Angora R., Amoin K., Bassirou B., Mamidou K. (2015). Antimicrobial potential of 27 plants consumed by chimpanzees (*Pan troglodytes* versus Blumenbach) in Ivory Coast. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 15 : 383.

Anses (2011). Fiche de danger biologique transmissible par les aliments : *Salmonella spp.* <https://www.anses.fr>.

Arcangioli A., Leroy-Setrin S., Martel J.L., Chaslus-Dancla E. (2000). Evolution of chloramphenicol resistance to florfenicol, in bovine *Salmonella* Typhimurium strains implicates definitive phage type (DT) 104. *Journal Medicinal of Microbiology*, 49 : 103-110.

Atata R., Sani A., Ajewole M. (2003). Effect of stem bark extracts of *Annickia chloranta* on some clinical isolates. *Biokemistri*, 15 : 84–92.

Aubry P. (2012). Les salmonelloses. *Médecine Tropicale* 1-6.

Aubry, P. (2013). Diarrhées infectieuses. *Médecine Tropicale* 1-7.

AVMA (2000). American Veterinary Medical Association judicious therapeutic use of antimicrobial. Consulté le 12 nov. 2000. URL : <http://www.avma.org/scienact/jtua/jtua98.asp>.

Bager F., Helmuth R. (2001). Epidemiology of resistance to quinolones in *Salmonella*. *Veterinary Research*, 32: 285–290.

Balaji V., Kamini (2019). Antimicrobial susceptibility profile and resistance mechanisms of Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) priority pathogens from India. *Indian journal of medical research*, 149: 87-96.

Barber M. (1947). Coagulase-positive Staphylococci resistant to penicillin. *The Journal of Pathology*, 59: 373-384.

Barbosa M., Levy B., (2000). The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist Updat*, 3: 3 - 11.

Bartoloni, A., Pallecchi, L., Rodriguez, H., Fernandez, C., Mantella, A., Bartalesi, F., Strohmeyer, M., Kristiansson, C., Gotuzzo, E., Paradisi, F., Rossolini, G.M. (2009). Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 125 - 129.

- Basli, A., Chibane K., Madani and Oukil (2012). Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10 : 2-9.
- Bayer S., Prasad R., Chandra J., Koul A., Smriti M., Varma A., Skurray R.A., Firth N., Brown M.H., Koo P. and Yeaman R. (2000). In vitro resistance of *Staphylococcus aureus* to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with alterations in cytoplasmic membrane fluidity. *Infection and Immunity*, 68 : 3548–3553.
- Bégué P. and Astruc J. (1999). Pathologie infectieuse de l'enfant, Masson 612 p.
- Betti L. (2002). Medicinal plants sold in Yaoundé markets, Cameroon. *African Study Monographs*, 23: 47–64.
- Betti L., Lejoly, J. (2009). Contribution to the knowledge of medicinal plants of the Dja Biosphere Reserve, Cameroon: plants used for treating jaundice. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3: 1056–1065.
- Boerlin P., and Reid-Smith J., (2008). Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. *Animal Health Research Reviews*, 9: 115-126.
- Bourkhiss M., Hnach, Bourkhiss, Ouhssine and Chaouch (2007). Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. *Afrique Sciences*, 3: 232 - 242.
- Breche P., Gaillard J., Simonet M. (1988). Collection de la biologie à la clinique. Bactéries des infections humaines” *Flammarion Médecine-Sciences, Paris*. 267-277.
- Bruneton J. (2009). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales, *Tec and Doc Lavoisier*, 1269 p.
- Burkill M., (2000). The useful plants of West Tropical Africa. 2nd Edition. *Families S–Z, Addenda. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, United Kingdom*, 5: 686p.
- Bush K. (2004). Antibacterial drug discovery in the 21st century. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 10-17.
- Cambray G., Guerout and Mazel D. (2010). Integrons. *Annual review of genetics*, 44: 141-166.

Canal N., Meneghetti L., Almeida D., Bastos R., Otton and Corção, (2016). Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. *Brazilian journal of microbiology*, 47 : 337-344.

Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon B., Varge R. (1987). Techniques usuelles de Bactériologie Médicale. *Editions SIMEP SA Paris France*, 227-234, 237–243, 249, 253-256 p.

CASFM (2020). Recommandations vétérinaires 2020 du comité de l'Antibiogramme de la SFM. Société Française de Microbiologie, 2019.

Choi Y., Gyung Y., Yoo H., Lee S-O., Kim H., Han Ha S., Hee Jung (2016). Trends in the distribution and antimicrobial susceptibility of causative pathogens of device-associated infection in Korean intensive care units from 2006 to 2013. *Journal of Hospital Infection*, 92: 363-371.

Clark M. (1996). Natural products as resource for new drugs. *Pharmaceutical Research*, 13: 1133–1141.

Clemente C., Erica C., Martin J., Kuldip S., Zhan G., Bin W., Magda M., Glida H., Monica C., Óscar N., Orlana L., Jeremy M., Mike C., Jens W., Phaik L., Jean F., Selena R., Nan S., Se J., Jessica M., Rob K., Gautam D., Gloria D., (2015). The microbiome of uncontacted Amerindians. *Advances.sciencemag.org*, 1 (3).

Corrigan D. K., Schulze H., Henihan G., Ciani I., Giraud G., Terry J. G., Bachmann T. (2012). Impedimetric detection of single-stranded PCR products derived from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates. *Biosensors and Bioelectronics*, 34: 178-184.

Cos P., Sindambiwe L., Vlietinck A., Berghe D. (2006). In Bioassays for Antibacterial and Antifungal Activities. Edited by: Mahabir P, Gupta S, Swami H, and Karan V. Biological Screening of plant constituents. *Training manual, International centre for science and high technology*, Trieste, 9-28.

Couriera M. (2017). Etude in vitro de la potentialisation d'antibiotiques contre des souches d'*Escherichia coli* O78k80 multi-résistantes isolées en élevage aviaire par les huiles essentielles. *Thèse Médecine – Pharmacie ; Université Claude-Bernard - Lyon I*. 44-45p.

Courvalin P. (2006). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Disease*, 42: 25-34.

- Courvalin P., Trieu P. (2001). Minimizing potential resistance: the molecular vie. *Clinical infectious diseases*, 33: 138-146.
- Dawang D., Datup A. (2012). Screening of five medicinal plants for treatment of typhoid fever and gastroenteritis in Central Nigeria. *Global Engineers and Technologists Review*, 2: 1–5.
- Dawodu O., Moses D., Apena A., Adetoro A., Dairo O. (2014). The proximate evaluation and phytochemistry of *Annickia chlorantha* stem bark in aqueous and ethanolic extract. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 21: 2145.
- Depardieu F., Podglajen I., Leclercq R. (2007). Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clinical Microbiology Review*, 20: 79-114.
- Dewick M. (2011). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, Wiley 550 p.
- Dibong D., Mpondo M., Ngoye, Kwin, Betti L. (2011). Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 37: 2496–2507.
- Dinges M., Orwin P., Schlievert P. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus* Clinique. *Microbiol. Review*, 13, 16-34.
- Djordjevic P., Stokes W., Chowdhury R. (2013). Mobile elements, zoonotic pathogens and commensal bacteria: conduits for the delivery of resistance genes into humans, production animals and soil microbiota. *Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, 4 : 1–12.
- Don L. (2018). Proximate Analysis and Phytochemical Screening of *Irvingia Gabonensis* (Agbono Cotyledon). *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research*, 5 : 4.
- Doublet B. (2004). Caractérisation des éléments génétiques mobiles du gène de résistance au florfénicol *floR* chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli* (Doctoral dissertation, Tours).
- Durand G. (2013). Caractérisation, épidémiologie et pathogénie d'un clone de *Staphylococcus aureus* résistant à la métiline portant le gène de la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1). 220.
- Efosa G. and Ngozi P. (2018). Phytochemicals, Antioxidant Activity and Acute Toxicity of Ethanol Stem Bark Extract of *Irvingia gabonensis* O'Rorke Baill. *EC Pharmacology and Toxicology*, 66 : 390-399.

Eili Y., Van Boeckeld T., Martinez E., Panta S., Gandraa S., Levine S., Goossens H et Ramanan L. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of sciences (PNAS)*, 115: 3463-3470.

Ekpe O., Nwaehujor C., Ejiofor C., Arikpo P., Woruji E., Amor E. (2019). *Irvingia gabonensis* seeds extract fractionation, its antioxidant analyses and effects on red blood cell membrane stability pharmacologyonline, 1: 1827-8620.

Encyclopédie Encarta, 2009. Salmonella. Microsoft Encarta 2009.

Etame E., Mouokeu R., Etoa FX (2019). Effet du fractionnement sur l'activité antibactérienne de la fraction n-butanol de l'extrait méthanolique d'écorce de tige d'*Enantia chlorantha*. *BMC médecine complémentaire et alternative*, 19: 56

Faizi S., Ali K., Soobia A., Shakeel A., Ageel S. (2003). New antimicrobial alkaloids from the roots of *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. *Planta medica*, 69 : 350-355.

Faure S. (2009). Transfert d'un gène de résistance aux bêta-lactamines blaCTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : influence d'un traitement antibiotique. *Doctoral dissertation, Université Rennes 1*.

Finlay B, Stanley F. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. *American Society for Microbiology*, 53: 210-230.

Gassama-Sow A., Diallo H., Boye S., Garin B., Sire M., Sow I. and Aïdara-Kane A. (2006). Class 2 integron-associated antibiotic resistance in *Shigella sonnei* isolates in Dakar, Senegal. *International journal of antimicrobial agents*, 27 : 267-270.

Gautier V. (2007). Caractérisation et expression des gènes codant pour les β -lactamases chromosomiques au sein des entérobactéries de l'environnement. *Mémoire EHPE*.

Gay K., Robicsek A., Strahilevitz J., Park H., Jacoby G., Barrett T., Hooper C. (2006). Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clinical Infectious Diseases*, 46: 297-304.

Gillings M., Boucher Y., Labbate M., Holmes A., Krishnan S., Holley M. and Stokes W. (2008). The Gillings, M. R., Krishnan, S., Worden, P. J. and Hardwick, S. A. (2008). Recovery of

diverse genes for class 1 integron-integrases from environmental DNA samples. *FEMS microbiology letters*, 287 : 56-62.

Goetz P. and K. Ghedira (2012). Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles. in *Phytothérapie anti-infectieuse*, Springer Paris, 193-208p.

Gonsu K., Epée E., Matalom C., Ngobo A., Toukam M., Sando Z., Moukouri E. (2013). Profil bactériologique et sensibilité aux antibiotiques des germes isolés des infections de la surface oculaire à Yaoundé, *Health sciences and diseases*, 14 : 4.

Goossens H., Ferech M., Vander Stichele R. (2005). ESAC Project Group. Out patient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national data base study. *Lancet*, 365: 579 - 87.

Hall G. (2004). Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 430–435.

Harbottle H., Thakur S., Zhao S. and White D. G. (2006). Genetics of antimicrobial resistance. *Animal biotechnology*, 17: 111-124.

Hennekinne, (2010). *Innovative approaches to improve staphylococcal food poisoning characterization*. 184.

Hiron A. (2007). Les transporteurs de peptides de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat en Microbiologie. *Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech)*, 242p.

Hoffman J., Outterson K., Røttingen J-A., Cars O., Clift C., Rizvi Z., Rotberg F., Tomson G et Zorzet A. (2015). OMS/Un cadre juridique international pour contrer la résistance aux antimicrobiens. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 93: 66.

Hooper D. C. and E., Rubinstein (2003). Quinolone antimicrobial agents. *American Society for Microbiology*, 485 p.

Houvenaeghel M. (1992). Les aminosides, antibiothérapie en réanimation et chirurgie. *Arnette Blackwell*, 15-25p.

Hyun Y. and Alexander O. (2010). « Microbiology : Altruistic defence », *Nature*, 467 : 34-35.

INSERM (2013). Dossiers d'informations. La résistance aux antibiotiques. Disponible sur <http://www.inserm.fr/thematiques/microbiologie-et-maladies-infectieuses/dossiersdinformation/la-resistance-aux-antibiotiques> (Consulté le 31/12/2018).

Institut Pasteur (2020). Résistance aux antibiotiques. Centre médical.

Iroba R., Ilang C., Ayogu E., Oji E., Ugbo C. (2010). Screening for anti-typhoid activity of some medicinal plants used in traditional medicine in Ebonyi state, Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4 : 860–864.

Jacoby A., Walsh E., Mills M., Walker J., Oh H., Robicsek A. and Hooper C. (2006). QnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50 : 1178-1182.

Jainkittivong A., Butsarakamruha and Langlais (2009). Antifungal activity of *Morinda citrifolia* fruit extract against *Candida albicans*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 108: 394-398.

Jehl F., Bobin S., Schalz, Balouka, Rohmer D., Wagner B., Woerther, Roger, Dubreuil C., Klossek, Romanet P., Triglia M., Renault, Borie C., Rouffiac E. (2003). Pénétration intra-auriculaire d'Augmentin : Forme pédiatrique per os administrée à la posologie de 80mg-10mg/kg 1j en 3 prises. *Médecine et maladies infectieuses*, 33 : 155-160.

Kakupa D., Muenze K., Byl B., Wilmet Michele D. (2016). Etude de la prévalence des infections nosocomiales et des facteurs associés dans les deux hopitaux universitaires de Lubumbashi. *Pan African Medical Journal*, 24 : 1937-8688.

Kanta V., Sharma U., Mahatma R. (2011). Une revue sur : le SIDA et les recours par les herbes. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2 : 1709-1713.

Karthik S. (2007). Role of MSA in the regulation of virulence and biofilm formation. *The University of Southern Mississippi. Edition UMI Microform USA*. 20-24p.

Katzif S., Danavall D., Bowers S., Balthazar J. T. and Shafer W.M. (2003). The major cold shock gene, *cspA*, is involved in the susceptibility of *Staphylococcus aureus* to an antimicrobial peptide of human cathepsin G. *Infection and Immunity*, 71 : 4304–4312.

Kebou P., (1983). Etude des plantes médicinales et importance dans la pharmacopée traditionnelle. Mémoire d'Ingénieur Agronome. 5-36p.

- Koczura R., Przyszlakowska B., Mokracka J. and Kaznowski A. (2014). Class 1 Integrons and Antibiotic Resistance of Clinical *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* Complex in Poznań, Poland. *Current microbiology*, 69 : 258-262.
- Kuete V., Tangmouo JG., Penlap Beng, Ngounou, Lontsi D. (2006). Antimicrobial activity of the methanolic extract from the stem bark of *Tridesmostemon omphalocarpoides* (Sapotaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 104 : 5-11.
- Kuete V., Poumale M., Guedem N., Shiono Y., Randrianasolo R., Ngadjui T. (2010). Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae). *South African Journal of Botany*, 76 : 536–542.
- Le Loir, Baron F., Gautier M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2 : 7-28.
- Leclerc H., Gaillard J. et Bergeret M. (1995). Microbiologie Générale, la bactérie et le monde bactérien. *Doin Editeurs, Paris*.
- Leitao F., Moreira, Almeida, Guimaraes (2013). Secondary metabolites from the mistletoes *struthanthus marginatus* and *struthanthus concinnus* (Loranthaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 48 : 215-218.
- Lévesque C., Piché L., Larose C., Roy P. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*, 39 : 185-191.
- Li C., Zhu, and Schentag (1999). Achieving an optimal outcome in the treatment of infections. The role of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials. *Clinical Pharmacokinetics*, 37 : 1-16.
- Lowy F. (1998). *Staphylococcus aureus* infection. *England Journal Medicine*, 339:520-532.
- Mah L., O’Toole A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiology*, 9 : 34- 39.
- Martinez J. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of The Royal Society Biological sciences*, 276 : 2521–2530.
- McCormick J., Yarwood J., Schlievert P. (2001). Toxic shock syndrome and bacterial superantigens : an update. *Annual. Review. Microbiol*, 55 : 77-104.

- Medeiros A. (1997). Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 24 : 19-45.
- Medhi H., Fabos V., Tuba R., Bodor A., Mika T., Horvath T. (2008). Integration of homogeneous and heterogeneous catalytic process for a multi-step conversion of biomass : From sucrose to levulinic acid. *Topics in Catalysis*, 48 : 49-54.
- Megueya Armelle (2018). Impact d'un effluent hospitalier sur la dissemination des bacteries resistantes aux antibiotiques dans l'environnement. Mémoire de Master, 11p.
- Meyer O. (2004). Biosynthèse des isoprénoïdes : synthèses d'analogues du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate, inhibiteurs potentiels de la voie du méthylérythritol phosphate. *Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur*, 285p.
- Molbak K., Olsen J. E., Wegener H. C. (2006). Salmonella infections. *Foodborne Infections. Elsevier Inc*, 57–114.
- Mpondo E., Ngene J., Léa M., Gisèle E., Philomène C., Yinyang, Siegfried D. (2017). Connaissances et usages traditionnels des plantes médicinales du département du haut Nyong. *Journal of Applied Biosciences*, 113: 11229-11245.
- Mpondo M., Dibong D. (2012). Traditional knowledge on medicinal plants use by ethnic communities in Douala, Cameroon. *European Journal of Medicinal Plants*, 2 : 159–176.
- Muthu C., Ayyanar M., Ignacimuthu S. (2006). Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Na. *India Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2 : 43.
- Naïrouz B. (2005). Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments. *Thèse de Doctorat en chimie. Université Mentouri de Constantine*, 153p.
- Ndoyer, Tchamou (1994). Utilization and marketing trends for *Irvingia gabonensis* products in Cameroon. *Conference on Irvingia gabonensis ICRAF-IITA, Nigeria*. 20th May.
- Ngene J-P., Ngoule C., Pouka K., Mvogo O., Ndjib R., Dibong S., Mpondo M. (2015). Importance dans la pharmacopée traditionnelle des plantes à flavonoïdes vendues dans les marchés de Douala est (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, 88: 8194-8210.

- Ngene J-P., Ngoule C., Pouka K., Mvogo O., Ndjib R., Dibong S., Mpondo M. (2015). Importance dans la pharmacopée traditionnelle des plantes à flavonoïdes vendues dans les marchés de Douala est (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, 88: 8194-8210.
- Nikaido H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 78 : 119 - 146.
- Norajit K., Ryu G.-H. (2012). Inhibitory effect of plant extracts on *Salmonella spp.*, in: *Salmonella – A Dangerous Foodborne Pathogen*. Dr. Barakat S. M. Mahmoud, 333–349p.
- O’Neill J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Review on antimicrobial resistance*. P 4.
- Okolo O., Johnson P. B., Abdurahman M., Abdu-Aguye I., Hussaini M. (1995). Analgesic effect of *Irvingia gabonensis* stem bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 45 : 125.
- OMS, (2020). Journée de la médecine traditionnelle africaine, 2002–2005.
- OMS, (2019). Centre des médias, questions et réponses, Fièvre typhoïde, 12 Mai 2020.
- Ostrow M. J., Cornelisse K. V., Heath K. J., Craib M. T., Schechter M., O’Shaughnessy J. S., Montaner and R. S. Hogg (1997). Determinants of complementary therapy use in HIVinfected individuals receiving antiretroviral or anti-opportunistic agents. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, 15: 115-120.
- O’Sullivan, M. V. N., Zhou, F., Sintchenko, V., Kong, F., & Gilbert, G. L. (2011). Multiplex PCR and Reverse Line Blot Hybridization Assay (mPCR/RLB). *Journal of Visualized Experiments*, (54).
- Oussou K. R., Kanko N., Guessend S., Yolou M., Dosso Y. T., N’Guessan G., Figueredo J.-C., Chalchat and G. Koukoua (2004). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d’Ivoire. *Comptes Rendus Chimie*, 7: 1081-1086.
- Pallecchi L., Bartoloni A., Paradisi F., Rossolini G. M., (2008). Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use : mechanisms and implications. *Expert Reviews Anti-infective Therapy*, 6 : 725–732.
- Perronne C. (1999). Les maladies infectieuses. *Doin Editions* 406p.

- Peschel A., Jack R. W., Otto M., Collins L. V., Staubitz P., Nicholson G., Kalbacher H., Nieuwenhuizen W. F., Jung G., Tarkowski A., Van Kessel K. P. and Van Strijp J. A. (2001). Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *Journal of Experimental Medicine*, 193 : 1067–1076
- Peyret M. (1994). Mécanismes de résistance aux antibiotiques. *Manuel de bactériologie clinique*, 1 : 209-226.
- Ploy C., Denis F., Courvalin P. and Lambert T. (2000). Molecular Characterization of Integrons in *Acinetobacter baumannii* : Description of a Hybrid Class 2 Integron. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44 : 2684-2688.
- Prescott L., Harley J., Klein D. (2003). La chimiothérapie antimicrobienne. *Microbiologie, 2ème édition, Bruxelles*. 806–811p.
- Prescott M., Harley P., Klein D. (2010). *Microbiologie. 2ème Edition Française. De Boeck Université*.
- Quinn P., Markey B., Leonard F., Hartigan P., Fanning S., FitzPatrick E. (2011). Veterinary Microbiology and Microbial Disease. *Edition Blackwell-science, USA*, 893p.
- Rahman T., Uddin S., Sultana R., Moue A. and Setu M. (2013). Polymerase chain reaction (PCR) : a short review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4 : 30-36.
- Rivera A., S. Giono, M. Gonzalez, N. Rodríguez and L. Cedillo (2011). Antibacterial effect of *Morinda citrifolia* fruit juice against mycoplasmas. *Annals of Biological Research*, 2: 491-497.
- Rowe B., Ward R., Threlfall J. (1997). Multidrug-resistant *Salmonella* Typhi : a worldwide epidemic. *Clinical Infectious Diseases*, 24 : 106–9.
- Rowe-Magnus D. A. and Mazel D. (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology*, 292 : 115-125.
- Saadaoui M. (2008). La fréquence des bactéries multirésistantes à l'hôpital Hassan II de Settat. *Thèse de doctorat Université Mohamed*.
- Samuelson, Hanne H., Havard J., Manuela K., Kjersti S., Hilde U., Lars Vorland (2005). Induced resistance to the antimicrobial peptide lactoferricin B in *Staphylococcus aureus*. *Federation of European Biochemical Societies*, 579 : 3421–3426.

Sanchez-Navarro and Sanchez (1999). Basis of anti-infective therapy : pharmacokinetic-pharmacodynamic criteria and methodology for dual dosage individualisation. *Clinical Pharmacokinetics*, 37 : 289-304.

Sanogo R., Diallo D., Diarra S., Ekoumou C., Bougoudogo F., (2006). Activités antibactérienne et antalgique de deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. *Mali Médical*, 21: 18–24.

Seignobos C. (2011). Les gaw du Cameroun, de chasseurs à tradipraticiens. *Journal des africanistes*. 35-59p.

Sharma R., Nishant V., Jha N., Brijesh K. (2014). Phytochemistry, Pharmacological Activity, Traditional and Medicinal Uses of Erigeron Species : A Review. *International Journal of Advance Research and Innovation*, 2 : 379-383.

Shimeld L., Rodgers A. (1999). Essentials of diagnostic microbiology. *Edition Delmar, New York*. 106p.

Simo-Tchuinte P. L. (2016). Intégrons de classe 3 : aspects mécanistiques et épidémiologiques. *Thèse de doctorat Université de Limoges*.

Sivakumaran S., Molan A., Meagher L., Burkard K., Yeap F., Lane A., Attwood A., Fraser K., Tavendale M. (2004). Variation de l'action antimicrobienne des proanthocyanidines de *Dorycnium rectum* contre les bactéries du rumen. *Phytochemistry*, 65 : 2485-2497.

Smith Harry (1992). Virulence determinants of *Escherichia coli* : present knowledge and questions. *Canadian Journal of Microbiology*, 38 : 747-752.

Sopa K., Supinya T., Sanan S. (2008). Anti-allergic of compound from *Kaempferia parviflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 116 : 191-193.

Stockigt J., Sheludk Y., Matthias U., Gerasimenko I., Warzecha H., Stockigt D. (2002). Analyse par spectrométrie de masse par chromatographie liquide haute performance, électrophorèse capillaire et électrophorétique capillaire-electropulvérisation par spectrométrie de masse de certains groupes alcaloïdes. *Journal of Chromatography*, 967 : 85-113.

Takeo O., Masato K., Keiko S., Rika O., Junko M., Hiroshi I., Hiroyuki K., Toshi A., Tosshifumi A., Shigeo M. (2004). In vitro and in vivo antimicrobial activities of tricyclic ketolide Te-802 and its analogs. *Journal of Antibiotics*, 57 : 518 - 527.

- Tankovic J., Aubry-damon H., Leclerc R. (1997). Résistance aux antibiotiques autres que les beta-lactamines chez *Staphylococcus aureus*. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 27 : 207-16.
- Tene O., Ngouafong F., Seukep J. (2016). Traditional uses, phytochemical and pharmacological profiles, and toxicity of *Annickia chlorantha* (Oliver) : *An overview*. *Edorium Journal of Medicine*, 3:12–18.
- Thévenot P. (2003). De l'antibiogramme à la prescription. *Editions BioMérieux* 136 p.
- Thomas K., Forrest S. (1998). Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrobial Agents Chemother*, 42 : 521.
- Threlfall J., Ward R., Skinner A., Smith R., Lacey S. (1999). Ciprofloxacin-resistant *Salmonella typhi* and treatment failure. *Lancet*, 353 : 1590–1591.
- Titouche Yacine (2017). Caractérisation de *Staphylococcus aureus* dans les produits laitiers traditionnels algériens. 13^{ème} congrès de la Société Française de Microbiologie.
- Toleman M., Peter B., Bennett, Jones R., Timothy R. (2007). Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes. *Emerging infectious diseases*, 13 : 559.
- Tsobou R., Mapongmetsem P.M., Van Damme P., (2013). Medicinal plants used against typhoid fever in Bamboutos Division, Western Cameroon. *Ethnobotany Research and Applications*, 11: 163–174.
- Ulvatne H., Haukland H. H., Samuelsen O., Kramer M. and Vorland L. H. (2002). Proteases in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferricin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50 : 461–467.
- Van der Horst M., Schuurmans M., Smid C., Koenders B., Kuile H. (2011). De novo acquisition of resistance to three antibiotics by *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance*, 17 : 141 - 147.
- Walsh C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406 : 775-81.
- Walsh C. (2003). Antibiotics : Actions, Origins, Resistance. *American Society for Microbiology* 335p.

- Wang Y., Kong F., Yang Y., et Gilbert L. (2008). A multiplex PCR-based reverse line blot hybridization (mPCR/RLB) assay for detection of bacterial respiratory pathogens in children with pneumonia. *Pediatric Pulmonology*, 43: 150-159.
- Weill X., Demartin M., Tandé D., Espié E., Rakotoarivony I. and Grimont P. A. (2004). SHV-12-like extended-spectrum- β -lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali. *Journal of clinical microbiology*, 42 : 2432-2437.
- Weill F.-X., (2008b). Salmonelles non-typhiques d'origine animale et résistance aux antibiotiques. *Bulletin de l'académie vétérinaire France*, 161: 221–234.
- Weill F.-X., (2010). La fièvre typhoïde n'est plus aussi simple à soigner. *Médecine/Sciences* 26: 969–975.
- Weiss K., (2002). La résistance bactérienne : la nouvelle guerre froide. *Le Médecin du Québec*, 37 : 41 – 49.
- WHO (2002). Stratégie de l'OMS pour la Médecine Traditionnelle pour 2002–2005. *OMS*, 74p.
- Wise R. (1998). Antimicrobial resistance is a major threat to public health. *British Medical Journal*, 317 : 609-10.
- Wylie J., Deborah L., Nowicki L. (2005). Molecular epidemiology of community-and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Manitoba, Canada. *Journal Clinical Microbiologie*, 43: 2830-2836.
- Xiang W., Song H.-J. Zhang and S.-P. Guo (2008). Antimicrobial anthraquinones from *Morinda angustifolia*. *Fitoterapia*, 79: 501-504.
- Yala D., Merad A., Mohamedi D., Ouar Korich M. (2001). Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 13–14p.
- Yala D., Merad A., Mohamedi D., Ouar Korich M. (2001b). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 5–12.
- Yap P., Yiap C., Ping Hu, Lim Hua Erin (2014). Essential oils, horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The open microbiology journal*, 8 : 6.



ANNEXES



Annexe 1 : Composition des différents Milieux de culture

BOUILLON NUTRITIF

◆ Peptone	10g
◆ Extrait de viande	10g
◆ Chlorure de sodium	5g

pH 7,3 ± 0,2

GÉLOSE NUTRITIVE (OXOID CM0003 Blades Biological Ltd)

◆ Peptone	10g
◆ Extrait de viande	10g
◆ Chlorure de sodium	5g
◆ Agar	15g

pH 7,3 ± 0,2

GÉLOSE MUELLER-HINTON (SHARLAU 02-277)

◆ Macération de bœuf	300mL
◆ Hydrolysate de caséine	17,5g
◆ Amidon	1,5g
◆ Agar	10g

pH 7,3 ± 0,2

Annexe 2 : Composition des différentes décoctions de plantes

Composition de D1 (2 litres de lait) :

- *Allium cepa* 500g
- *Allium sativum* 400g
- *Citrus medica* 30ml
- 2 litres Lait non sucré 28g

Composition de D2 (pour 5L d'eau) :

- *Bidens pilosa* 6g
- Ecorce d'*Annickia chlorantha* 346,5g
- Ecorce d'*Alstonia boonei* 249,5g
- Fruit de *Picralima nitida* 840g
- Tiges de *Dracaena fragrans* 116g
- *Cymbopogon citratus* 36,97g
- Feuilles d'*Eremomastax speciosa* 63,39g
- Tiges de *Costus sp.* 250,25g
- Feuilles d'*Aloes sp.* 120,1g

Composition de D3 (pour 2,5 L d'eau) :

- Ecorce de *Mangifera indica* 344,95g
- Feuilles de *Psidium guajava* 46,02g
- Fruit de *Picralima nitida* 295g
- Feuilles de *Carica papaya* 142g
- *Ocimum basilicum* 38,56g

Composition de D4 (pour 2,5 L d'eau):

- Ecorce d'*Alstonia boonei* 215,94g
- Fruit de *Citrus medica* 185,42g
- Racines de *Panax ginseng* 898,32g
- Ecorce d'*Entandrophragma sp.* 255g

Composition de D5 (pour 2,5 L d'eau):

- Tiges de *Costus sp.* 314,35g
- Ecorce d'*Annickia chlorantha* 242,45g
- *Kalanchoe crenata* 34,16g
- *Bidens pilosa* 5,62g
- Feuilles de *Voacanga africana* 120,27g

Composition de D6 (pour 2,5 L d'eau):

- *Kalanchoe crenata* 250g
- Ecorce d'*Entandrophragma sp.* 400g
- Ecorce d'*Annickia chlorantha* 150g
- Fruit de *Picralima nitida* 600g
- *Bidens pilosa* 70g

Annexe 3 : Protocole d'extraction et de purification de l'ADN

1. L'échantillon a été ajouté à un tube de lyse ZR BashingBead™. Puis 750 µl de solution de lyse ZymoBIOMICS™ ont été ajoutés dans le tube et boucher hermétiquement ;
2. Les tubes de lyse ZR BashingBead™ ont été centrifugés dans une microcentrifugeuse à $\geq 10\ 000$ x g pendant 1 minute.
3. Par la suite, 400 µl de surnageant ont été transférés dans le filtre Zymo-Spin™ III-F contenu dans un tube de prélèvement et centrifuger à 8 000 x g pendant 1 minute. Le filtre Zymo-Spin™ III-F a été jeté après centrifugation.
4. Puis 1 200 µl de tampon de liaison ADN ZymoBIOMICS™ ont été ajoutés au filtrat dans le tube de prélèvement de l'étape 3 et le tout a été bien mélangé.
5. Ensuite, 800 µl du mélange de l'étape 4 ont été transférés dans une colonne Zymo-Spin™ IIC-Z contenue dans un tube de prélèvement et centrifugé à 10 000 x g pendant 1 minute.
6. L'écoulement du tube de prélèvement a été jeté et l'étape 5 répété.
7. 400 µl de tampon de lavage 1 ADN ZymoBIOMICS™ ont été ajoutés à la colonne Zymo-Spin™ IIC-Z contenue dans un nouveau tube de prélèvement et centrifugés à 10 000 x g pendant 1 minute. L'écoulement a été jeté.
8. Puis 700 µl de tampon de lavage 2 ADN ZymoBIOMICS™ ont été ajoutés à la colonne Zymo-Spin™ IIC-Z dans un tube de prélèvement et centrifugés à 10 000 x g pendant 1 minute. L'écoulement a été jeté.
9. 200 µl de tampon de lavage 2 ADN ZymoBIOMICS™ ont été ajoutés à la colonne Zymo-Spin™ IIC-Z contenue dans un tube de prélèvement et centrifugés à 10 000 x g pendant 1 minute.
10. La colonne Zymo-Spin™ IIC-Z a été transférée dans un tube à microcentrifugeuse propre de 1,5 ml et 100 µl ZymoBIOMICS™ DNase / RNase Free Water ont été directement ajoutés dans la matrice de la colonne et incubés pendant 1 minute. Le tout a été centrifugé à 10 000 x g pendant 1 minute pour éluer l'ADN^{4,5}.
11. Un filtre Zymo-Spin™ III-HRC a été placé dans un nouveau tube de prélèvement et 600 µl de solution de préparation ZymoBIOMICS™ HRC ont été ajoutés. Le tout centrifugé à 8 000 x g pendant 3 minutes.
12. Enfin, l'ADN élué (étape 10) a été transféré dans un filtre Zymo-Spin™ III-HRC préparé dans un tube à microcentrifugeuse propre de 1,5 ml et centrifugé à exactement 16 000 x g pendant 3 minutes.

Annexe 4 : Composition des réactifs utilisés pour l'extraction et la purification de l'ADN

ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (Kit Size)	D4300T (5 preps.)	D4300 (50 Preps.)	D4304 (50 Preps.)
ZR BashingBead™ Lysis Tubes (0.1 & 0.5 mm)	5	50	-
ZymoBIOMICS™ Lysis Solution	4 ml	40 ml	-
ZymoBIOMICS™ DNA Binding Buffer¹	6 ml	100 ml	100 ml
ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 1	2 ml	50 ml	50 ml
ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 2	5 ml	60 ml	60 ml
ZymoBIOMICS™ DNase/RNase Free Water	1 ml	10 ml	10 ml
ZymoBIOMICS™ HRC Prep Solution	3 ml	30 ml	30 ml
Zymo-Spin™ III-F Filters	5	50	50
Zymo-Spin™ III-HRC Filters	5	50	50
Zymo-Spin™ IIC-Z Columns	5	50	50

Annexe 5 : Diamètres moyens des auréoles d'inhibition des extraits de plantes durant la phase d'exposition et la phase de non exposition des souches bactériennes.

Tableau XXXV : Sensibilité de *S. Typhi* aux extraits de plantes après son exposition à *Annickia chlorantha*

Jours	EC		IG		VA		MC		CO	
	esposée	ecart								
1	8	0	7	0	8	0	8	0	7	0
9	7	0	7	0	7	0	7	0	7,5	0,70
15	6,5	0,70	7,25	0,35	6	0	6	0	6	0
23	7	0	7	1,4	7	0	6	0	6,5	0,70
29	6,5	0,70	7	0	7	0	6,5	0,70	6,5	0,70
Jours	EC		IG		VA		MC		CO	
	témoin	ecart								
1	8	0	7	0	8	0	8	0	7	0
9	7	0	7	0	7	0	7,5	0,70	6,5	0,70
15	7,25	0,35	7	0	7	0	7	0	6,5	0,70
23	6,5	0,70	7	0	7	0	6,5	0,70	7,5	0,70
29	7	0	7	0	7	0	6	0	7	0

EC: *Annickia chlorantha*, IG: *Irvingia gabonensis*, VA: *Voacanga africana*, MC: *Musanga cecropioides*, CO: *Chromolaena odorata*

Tableau XXXVI : Sensibilité de *S. Typhi* aux extraits de plantes après son exposition à *Irvingia gabonensis*

Jours	EC		IG		VA		MC		CO	
	esposée	ecart								
1	8	0	7	0	8	0	8	0	7	0
9	7	0,7	7	0	7	0	7	0	7,75	0,35
15	6,75	1,06	7,25	0,35	7	0	7,5	0,70	6	0
23	7,25	0,35	7	0	6,5	0,70	6	0	7	0
29	6,5	0,70	6,5	0,70	6	0	6,25	0,35	6,5	0,70
Jours	EC		IG		VA		MC		CO	
	témoin	ecart								
1	8	0	7	0	8	0	8	0	7	0
9	7	0	7	0	7	0	7,5	0,70	6,5	0,70
15	7,25	0,35	7	0	7	0	7	0	6,5	0,70
23	6,5	0,70	7	0	7	0	6,5	0,70	7,5	0,70
29	7	0	7	0	7	0	6	0	7	0

EC: *Annickia chlorantha*, IG: *Irvingia gabonensis*, VA: *Voacanga africana*, MC: *Musanga cecropioides*, CO: *Chromolaena odorata*



PUBLICATION ISSUE DE LA THESE





Exposure to Plant Extract Causes the Variation of Antibiotic Susceptibility of Two Bacterial Strains (*Salmonella* Serotype Typhi and *Staphylococcus aureus*)

Fabrice Ezo'o Mengo¹, Stéphanie Claire Tchonang¹,
Hermann Ludovic Kemaleu¹, Sylvain Leroy Sado Kamdem^{2*}
and Jean Justin Essia Ngang²

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, The University of Yaounde 1, P.O.Box 812, Yaoundé, Cameroon.

²Department of Microbiology, Faculty of Science, The University of Yaounde 1, P.O.Box 812, Yaoundé, Cameroon.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors JJEN and SLSK designed, coordinated and supervised the study. Authors FEM, SCT and HLK performed the lab experiments. Authors FEM, SLSK and JJEN wrote the paper. Authors SLSK, FEM, SCT and HLK participated in data analyses. All the authors read and approved the final version of the manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/JAMB/2018/43446

Editor(s):

(1) Dr. Adekunle Sanyaolu, Epidemiology Division, Nigeria Center for Disease Control, Federal Ministry of Health, Abuja, Nigeria.

Reviewers:

(1) Oyetayo, Adedayo Michael, Rufus Giwa Polytechnic, Nigeria.
(2) Mina Ilyas, University of Lahore, Pakistan.

(3) Vivek Kumar Singh, Public Health and Infectious Disease Research Center (PHIDReC), Nepal.
Complete Peer review History: <http://www.sciencedomain.org/review-history/26281>

Original Research Article

Received 02 June 2018
Accepted 20 August 2018
Published 18 September 2018

ABSTRACT

Introduction: Several authors have associated the development of antibiotic resistance to the use of antibiotics. But this development of resistance could also be associated with plant extracts. This article explores the impact of exposure to different plant extracts of *Salmonella* serotype Typhi and *Staphylococcus aureus* on their sensitivity to antibiotics.

Methods: According to the informations obtained from traditional medicine healers, 13 plants

*Corresponding author: E-mail: sadosylvain@hotmail.com;

powders from different parts were selected to compose mixtures that were used to produce the extract by decoction. The susceptibility test through inhibition diameter analyses and the minimal inhibition concentration were performed using the decoctions and the two strains. Different microorganisms were exposed to a fresh broth containing the extract at fixed or increased concentration in every 24 h for 14 days. Subsequently, after the 14 days, these strains were grown in the same broth renewed at 24 h without added extract for another 14 days. Antibioqram using three antibiotics was performed at 48 h. Variation of inhibition diameter was used to evaluate the impact of extract exposure to the sensitivity.

Results: The two strains subjected to a molecular pressure of the plant extracts acquired resistance to the antibiotics tested, regardless of the concentration of the plant extract used for the exposure. The sensitivity of *Salmonella* Typhi exposed to two of the decoctions decreased vis-a-vis the three antibiotics tested and this decrease persisted 14 days repeated sowing in new broth without plant extract despite the lack of antimicrobial. In addition, exposure of *Staphylococcus aureus* to the extracts of *Chromoleana odorata* and *Erigeron floribundus* showed a decrease in sensitivity of this strain to Erythromycin. But this sensitivity compared to other antibiotics has decreased after non antimicrobial exposure.

Conclusion: This study shows that continuous exposure of bacteria to some plant extracts reduces the sensitivity of these strains. As a result, the development of antibiotic resistance is not only related to the uncontrolled use of antibiotics.

Keywords: Antibiotics; plant extracts; antimicrobial activity; continuous exposure; sensitivity.

ABBREVIATIONS

SXT/TSU: Cotrimoxazole; C: Chloramphenicol; GM: Gentamicine; ERY: Erythromycine; CIP: Ciprofloxacin; Dec.0: Decoction0; Dec.1: Decoction1; Dec.2: Decoction2; Dec.3: Decoction3; CO: *Chromolaena odorata*; EF: *Erigeron floribundus*; LC: *Lantana camara*; TP: *Tridax procumbens*; ΔP : Difference in inhibition diameter obtained during exposure period between the beginning and the end of the exposure; ΔA : Difference in inhibition diameter obtained during non exposure period between the beginning and the end of this period; MICs: Minimal inhibitory concentrations.

1. INTRODUCTION

The antibiotic resistance which today represents as a global public health problem is the cause of the search for new molecules, with a potential reserve being the use of medicinal plants. The observations made over the past 20 years showed that the number of new drugs reaching the market has unfortunately fallen [1,2] while the level of resistance has increased among pathogenic bacteria, including *Salmonella* and *Staphylococcus* types. This is the case for the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, as well as *Salmonella* serotype Typhi and *Salmonella* serotype Typhimurium resistant to second generation fluoroquinolones and to ceftriaxone [3]. Several authors have attributed antibiotic resistance to the selective pressure of antibiotic use in clinical, veterinary and agricultural practices [4]. A correlation between the use of antibiotics, the emergence and spread of bacterial resistance is indeed well documented [5].

Infections such as typhoid fever and meningitis caused by resistant bacteria have become difficult to treat and the treatment cost is increasingly high. The use of medicinal plant products or in combination with antibiotics is becoming a serious alternative in developing countries.

In general, combination studies of medicinal substances, particularly antibiotics along with extracts and essential oils obtained from plants are often described in the literature [6,7,8]. This strategy is indeed of great interest for potential clinical applications, since it reduces the possible side effects of current treatments by reducing the dose of the compound used [6], thus also limiting the development of antibiotic based resistance phenomena.

However, recent studies have shown that bacteria with antibiotic resistance traits can be isolated from people who have not been subjected to their significant exposure to

Table 1. List of medical plants used against *Salmonella Typhi* and *Staphylococcus aureus* in Cameroon

Scientific name	Family	Common name	Part used	Associated plants	Method of preparation	How to use	References
<i>Citrus medica</i>	Rutaceae	Cedratier	Fruit		Decoction	Oral	[12]
<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	Andok (Ewondo)	Bark	Citron	Decoction	Oral	[11]
<i>Carica papaya</i>	Caricaceae	Foto (Ewondo)	Leaves	Datrier, salt germ	Maceration, decoction, trituration	Oral	[14,10]
<i>Bidens pilosa</i>	Asteraceae	Colé-colé	Bark	Aloès	Trituration	Oral	[14,10]
<i>Senna alata</i>	Fabaceae	Datrier	Leaves		Boil, maceration	Oral	[11]
<i>Cymbopogon citratus</i>	Poaceae	Citronnelle Ossanga (Ewondo)	Leaves	Citron, cane of the twins	Decoction, Maceration	Oral	[10]
<i>Alstonia boonei</i>	Apocynaceae	Ekuk (Ewondo)	Ecorces	Nivaquine leaf	Maceration, fermentation	Oral	[14]
<i>Panax ginseng</i>	Araliaceae	Ginseng	Fruit, racine	Kinkeliba in fruit	Infusion, maceration	Oral	[14]
<i>Entandrophragma sp.</i>	Meliaceae	Sapeli blanc	Ecorces	Baobab, dattier	Macération, fermentation	Oral	[14]
<i>Voacanga africana</i>	Apocynaceae	Voacanga d'Afrique	Seed, Leaves	Cola nuts	Maceration, decoction	Oral	[14]
<i>Enantia chlorantia</i>	Annonaceae	Nfol	Ecorces	Citrus limon	Decoction	Oral	[14]
<i>Iringia gabonensis</i>	Iringiaceae	Andok beti (Ewondo)	Ecorces	Ngongui	Decoction	Oral	[15]
<i>Musanga cecropioides</i>	Cecropiaceae	Asseng	Ecorces		Decoction	Oral	[15]
<i>Chromolaena odorata</i>	Asteraceae	Kondengui (Ewondo)	Leaves	Kings of herbs	Trituration	Der-mal, Oral	[13]
<i>Erigeron floribundus</i>	Asteraceae	Vien nguim	Leaves		Friction in warm water	Der-mal	[13]

antibiotics, living in remote locations and undergoing very little geographical mobility [9]. This suggests that there are agents other than antibiotics that induce resistance.

Literature presents many plants that are used as a mixture in the form of decoctions to treat people with typhoid fever, caused by *Salmonella* Typhi in Cameroon. *Bidens pilosa*, *Carica papaya* and *Cymbopogon citratus* [10]; *Senna alata* and *Mangifera indica* [11] and *Citrus medica* [12] are among them. Several macerated plants are also used against skin diseases or gastrointestinal infections, as is the case of *Chromolaena odorata* and *Erigeron floribundus*, whose antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* has been demonstrated [13]. Yet in a country where modern medicine and traditional medicine are used, it is not uncommon to see many therapeutic failures of modern medicine after treatment with traditional medicine. This justifies the interest of this work which aimed at elucidating the influence of *Salmonella* Typhi and *Staphylococcus aureus* exposure to plant extracts on the antimicrobial activity of various antibiotics. In particular, those used in the fight against these two pathogens. This study was carried out in the Laboratory of Microbiology of the University of Yaounde 1, Cameroon between August 2013 and April 2015.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plants Selection

Several medicinal plant species used in the treatment of typhoid and staphylococcal skin

infections were harvested in Cameroon central region from August 2013 to September 2014. Some of these plants and the parts used are presented in Table 2. They were selected based on indications from the literature and information received from traditional healers and vendors of medicinal plants. Botanical identification and authentication were done at the National Herbarium of Cameroon

2.2 Preparing Aqueous Extracts of Plants

The preparation of the decoctions used in this work was prepared based on recipes from traditional healers for the treatment of typhoid fever.

Indeed, the harvested plants were washed, dried and ground. The various powder samples were then weighed and mixed in water in the ratio of (w / v) 1: 2 for the first solution obtained from the plants (1: 9: 10), 2: 3 for the second solution obtained from the plants (1: 7: 8), 1: 2 for the third solution obtained from the plants (4: 8: 11: 12; 13) and 2: 3 for the last solution obtained from the plants (1: 2: 3: 4: 5: 6). The solutions obtained were boiled for 30 minutes and then cooled to room temperature. The decoctions were filtered using Whatman No. 1 filter paper and the filtrate was dried in an oven at 45°C until a constant weight was achieved. Decoctions thus obtained and codified as :Dec.0; Dec.1; Dec.2 and Dec.3 respectively and stored at 4°C for later use.

Table 2. Medicinal plants selected for assessing the antibacterial activity

N°	Scientific name	Mass/litre	Part used	Reference	Location of collection
1	<i>Citrus medica</i>	120 g	Fruit	65106/HNC	Mokolo market
2	<i>Mangifera indica</i>	200 g	Bark	5734/HNC	Mount Eloumden
3	<i>Carica papaya</i>	180 g	Leaves	18647/SFR/CAM	Mendong
4	<i>Bidens pilosa</i>	40 g	Bark	42254/HNC	Mount Eloumden
5	<i>Senna alata</i>	80 g	Leaves	1871YA	Mount Eloumden
6	<i>Cymbopogon citratus</i>	30 g	Leaves	48536/SFR/CAM	Mendong
7	<i>Alstonia boonei</i>	88 g	Ecorces	2151/SRF/CAM	Mount Eloumden
8	<i>Entandrophragma</i>	102 g	Ecorces	29933/HNC	Mount Eloumden
9	<i>Allium cepa</i>	250 g	Bulbs	034/UDS	Mokolo market
10	<i>Allium sativum</i>	200 g	Bulbs	44810/HNC	Mokolo market
11	<i>Kalanchoe crenata</i>	100 g	Ecorces	50103/YA	Mokolo market
12	<i>Annickia chlorantha</i>	60 g	Ecorces	2949/SFR/CAM	Mokolo market
13	<i>Picralima nitida</i>	240 g	Fruit	1942/SRFK	Mokolo market
14	<i>Chromolaena odorata</i>	100 g	Leaves	952/SRF/CAM	Campus UY1
15	<i>Erigeron floribundus</i>	100 g	Leaves	48832/HNC	Campus UY1

The anti-staphylococcal decoction was made from four plant extracts: *Chromolaena odorata*; *Erigeron floribundus*; *Enantia chlorantha* and *Irvingia gabonensis*. For this, the different parts of each harvested plant were washed with water, dried and finely ground using an electric grinder. The resulting powder was soaked in water in a 10% ratio (w / v) for 48 h. The solution was filtered under vacuum on Whatman No. 1 filter paper and the filtrate was dried in the oven at 45°C. The dry extract obtained was kept in a refrigerator at 4°C for future use.

2.3 Bacterial Strains

Staphylococcus aureus NCTC 10652 and *Salmonella* Typhi 32 that are involved in skin diseases and typhoid fever respectively, were used in this work and provided by the Microbiology Laboratory of the Food Science Department of the University of Bologna (Italy).

2.4 Antibiotics

The following antibiotics: Gentamicin (GM), Cotrimoxazole (SXT/TSU) (Strides Acrolab Ltd), Erythromycin (ERY) (Alice pharma Pvt Ltd.), Ciprofloxacin (CIP) (Maxheal Pharmaceuticals Ltd.) and Chloramphenicol (C) (Baijingyu Nanjing Pharmaceutical Co. Ltd) were used. The choice of these antibiotics was based on the frequency of use and their family affiliation.

2.5 Antimicrobial Analysis

2.5.1 Inhibition diameter analysis

The antimicrobial activity of antibiotic substances and plant extracts used was determined by the diffusion method on agar medium [16]. Antibiotic solutions and plant extracts were prepared at concentrations of 1 mg/ml and 100 mg/ml respectively. Agar was seeded from a bacterial suspension of 10^6 UFC / ml. 10 μ l of each antibiotic solution and 20 μ l of each extract test solution and the solvent used as control (sterile water) were deposited on different filter paper disks (6 mm diameter). The impregnated disks were dried for 24 hours at 37°C to complete evaporation of the solvent and then deposited on the surface of the agar. After a 24-hour incubation period at 37°C, the various diameters of the inhibition halos obtained around the disks were measured.

2.5.2 Determination of MICs

MICs were determined according to the method described by Cos et al. in 2006 [16]. A geometric

progression of reason 2 of the concentrations of plant extracts ranging from 0.1 mg/ml to 1600 mg/ml was carried out. For antibiotics, the range of concentrations ranged from 0.001 to 0.5 mg/ml. Subsequently, these tubes were seeded with a volume of 100 μ l of the inoculum (10^6 UFC / ml) diluted 1/100; and were incubated for 24 hours at 37°C. The experimental controls consisted of (I) a broth without inoculum but the inhibitory substance and (II) broth with inoculum without the inhibitory substance. After incubation, the presence of haze indicated visible growth of the bacteria, while the absence of haze involved the antibacterial effect of the tested substances. MIC was determined to be the lowest concentration that inhibited any visible growth.

2.6 Continuous Exposure of Bacterial Strains to Plant Extracts

Strains of *Salmonella* Typhi and *Staphylococcus aureus* were cultured in every 24 hours for 14 days in nutrient broth containing the plant extracts at a fixed concentration and increasing sub-lethal concentrations. When growth was visible in the tubes, 100 μ l of this culture was taken to inoculate two different broths: firstly a new nutrient broth containing the same concentration of the plant extract and secondly a new nutrient broth containing the double concentration the plant extract. This was repeated in every 24 hours for 14 days.

After 14 days of exposure to the extracts « exposure period », the strains were grown again in every 24 hours for 14 additional days in nutrient broth without plant extracts « non-exposure period » to verify a possible change of strain behaviour towards the antimicrobial. The diameters of the inhibition halos of the different antibiotics vis-a-vis the strains studied exposed or unexposed to plants extracts were evaluated in every 48 hours by performing a standard antibiogram using the diffusion method with the disks described above.

The study of the antibiotic sensitivity of strains exposed to plant extracts over time was based on the determination of the indices ΔP and ΔA where, ΔP is the difference in inhibition diameter obtained during exposure period calculated as initial inhibition diameter minus final inhibition diameter. ΔA is the difference in inhibition diameter obtained during the non-exposure period calculated as inhibition diameter at the beginning minus inhibition diameter at the end. Thus: if $\Delta P < 0$, the strain became more sensitive

to antibiotics during the exposure period, if $\Delta P > 0$, it became more resistance to antibiotics during the exposure period, and if $\Delta A < 0$, the strain gained more resistance to antibiotics during the non-exposure period with respect to the exposure period; if $\Delta A > 0$, the strain became more sensitive to antibiotics during the non period exposure with respect to the exposure period.

3. RESULTS

3.1 Activity of Antimicrobial Substances

The sensitivity of the bacterial strains (*Salmonella Typhi* and *Staphylococcus aureus*) vis-a-vis different tested antimicrobial is presented in Table 3. The results shows that *Salmonella Typhi* and *Staphylococcus aureus* were sensitive to both the antibiotics and the plant extracts tested in this work. The antimicrobial activities of the extracts tested, however, remained much lower than those of antibiotics. The diameters of the inhibition halo obtained between 25.0 mm and 42.0 mm and between 7.5 mm and 12.00 mm respectively for antibiotics and plant extracts (Fig. 1). Ciprofloxacin (36.00 mm) and Chloramphenicol (29.00 mm) have the best antibacterial activity against *Salmonella Typhi* and for *Staphylococcus aureus* it is Cotrimoxazole (42.00 mm) and Erythromycine (40.00 mm). Regarding the plant extracts, Dec 1 has the highest antibacterial activity against *Salmonella Typhi* with an inhibition diameter of 12.00 mm, followed by the extracts of Dec 0 and Dec 3 whose Inhibitory activities were similar. Furthermore, *Erigeron floribundus* and *Chromolaena odorata* showed the best activities against *Staphylococcus aureus* NCTC 10652 with inhibition diameters of 12.00 mm and 11.50 mm respectively.

The results reported in Table 3 shows MIC values Typhi ranging from 0.008 to 0.320 mg / ml for antibiotics, and 6.25 to 1600.00 mg/ml for plant extracts. These results confirm the best activities of antibiotics compared to that of plant

extracts. Dec 0, Dec 1 and Dec 3 were the most active decoctions against *Salmonella* and with comparable activities (MICs equal to 800 mg/ml). Moreover, extract of *Chromoleana odorata* was the most active against *Staphylococcus aureus* NCTC 10652 with a MIC equal to 6.25 mg/ml.

3.2 Antibiotic Susceptibility of Strains Exposed to Plants Extracts

Continuous exposure of strains to plant extract resulted in a variation in their sensitivity to the antibiotics tested (Tables 4,5,6,7). Three most active antibiotics for each strain was used to monitor their strain behaviour towards them after exposure to plant extracts and the period of none exposure.

According to the present work, the monitoring of the antibacterial activity of the three antibiotics tested on *Salmonella Typhi* before and after its exposure to decoctions 1 and 3 shows that this strain has developed resistance to the three antibiotics ($\Delta P > 0$), this regardless of the concentrations used (Figs. 2 and 3). In addition, it was seen that this resistance developed during the increasing concentration exposed period which was maintained over time during the non exposure period ($\Delta A < 0$) with all the antibiotics. When the exposure period was at a fixed concentration of extract (Dec.1), only Chloramphenicol induced resistance was lost. In case of exposure to Dec.3, the resistance to antibiotic-induced during the exposure period was maintained only for Ciprofloxacin in the two tests and Cotrimoxazole only during the increasing concentration exposed period.

The results obtained during the exposure period of *Staphylococcus aureus* to *Chromoleana odorata* show that this strain has become more sensitive to all antibiotics ($\Delta P < 0$) except Erythromycin at a fixed concentration ($\Delta P > 0$). Similar results were obtained during the exposure period of *Staphylococcus aureus* to *Erigeron floribundus* (Figs. 4 and 5). The strain has become more sensitive to all

Table 3. Minimum inhibitory concentrations of antimicrobials (mg/ml)

	C	CIP	SXT/TSU	Dec.0	Dec.1	Dec.2	Dec.3
<i>Salmonella Typhi</i>	0.32	0.008	0.128	800	800	1600	800
	GM	ERY	SXT/TSU	CO	EF	LC	TP
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.008	0.008	0.125	6.25	25	25	25

SXT/TSU: Cotrimoxazole; C: Chloramphenicol; GM: Gentamicine; ERY: Erythromycine; CIP: Ciprofloxacin; Dec.0: Decoction0; Dec.1: Decoction1; Dec.2: Decoction2; Dec.3: Decoction3; CO: *Chromolaena odorata*; EF: *Erigeron floribundus*; LC: *Lantana camara*; TP: *Tridax procumbens*

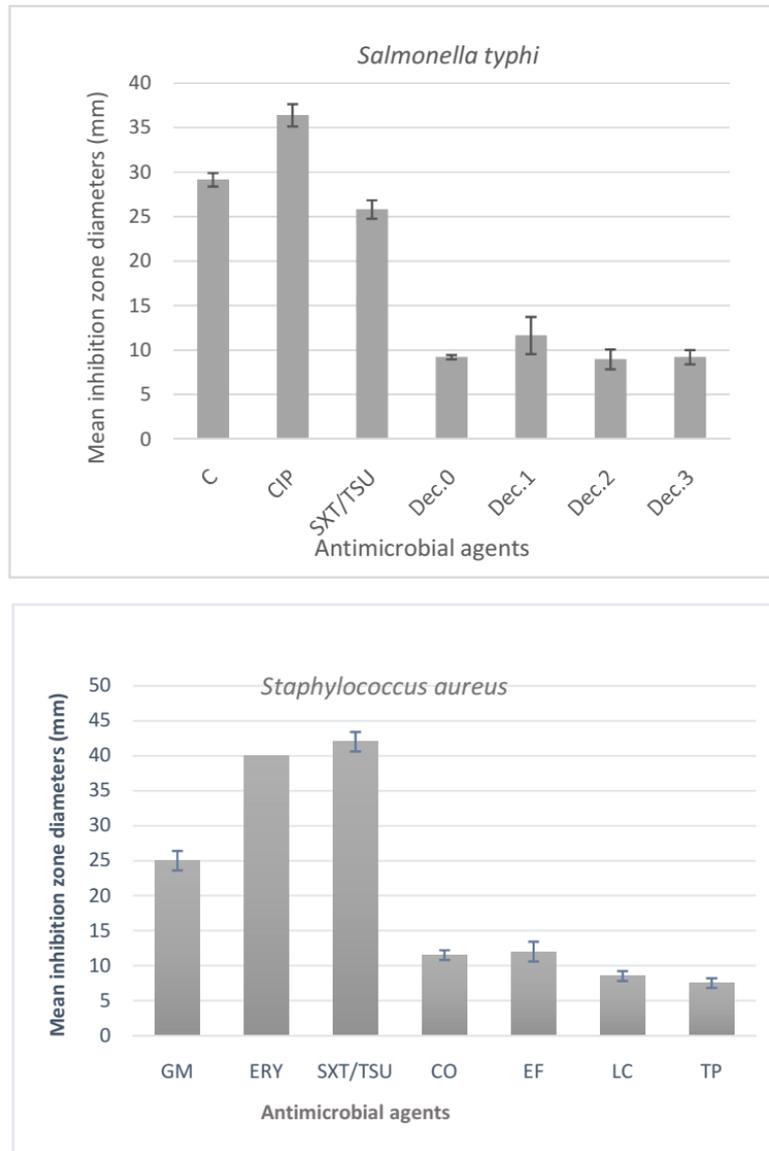


Fig. 1. Values of the mean diameters of the inhibition halos of antimicrobials tested vis-a-vis *Salmonella Typhi* and *Staphylococcus aureus*

SXT/TSU = Cotrimoxazole, C = Chloramphenicol, GM = Gentamicine, ERY= Erythromycin, CIP=Ciprofloxacin, Dec.0 = Decoction0, Dec.1 = Decoction1, Dec.2 = Decoction2, Dec.3 = Decoction3, CO= *Chromolaena odorata*, EF=*Erigeron floribundus*, LC= *Lantana camara*, TP= *Tridax procumbens*

antibiotics ($\Delta P < 0$) except Erythromycin at a fixed and increasing concentration ($\Delta P > 0$). Moreover, strains of *Staphylococcus aureus* obtained after exposure to *Chromolaena odorata* became less sensitive to all antibiotics during non exposure period ($\Delta A < 0$), and strains obtained after exposure to *Erigeron floribundus* had a lower

sensitivity to Gentamicin (only fixed concentration) and Cotrimoxazole during non exposure period ($\Delta A < 0$). In addition, we observed a gain of sensitivity of *Staphylococcus aureus* to Gentamicin (at increasing concentration) and Erythromycin during non exposure period.

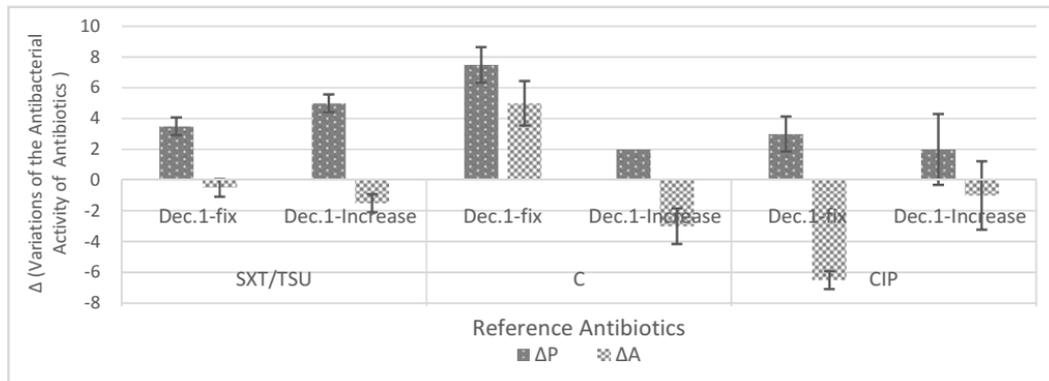


Fig. 2. Variations of the antibacterial activity of reference antibiotics against *Salmonella Typhi* in repeated culture in the presence and absence of fixed and increasing Dec.1

ΔP : difference in inhibition diameter obtained during exposure period calculated as initial inhibition diameter minus final inhibition diameter; ΔA : difference in inhibition diameter obtained during the non-exposure period calculated as inhibition diameter at the beginning minus inhibition diameter at the end. $\Delta P < 0$: the strain became more sensitive to antibiotics during the exposure period; $\Delta P > 0$: it became more resistance to antibiotics during the exposure period; $\Delta A < 0$: the strain gained more resistance to antibiotics during the non period exposure with respect to the exposure period; $\Delta A > 0$: it became more sensitive to antibiotics during the non period exposure with respect to the exposure period. SXT/TSU: Cotrimoxazole; C: Chloramphenicol; CIP: Ciprofloxacin; Dec.1-fix: Decoction1 at a fixed concentration; Dec.1-Increase: Decoction1 at increasing concentration

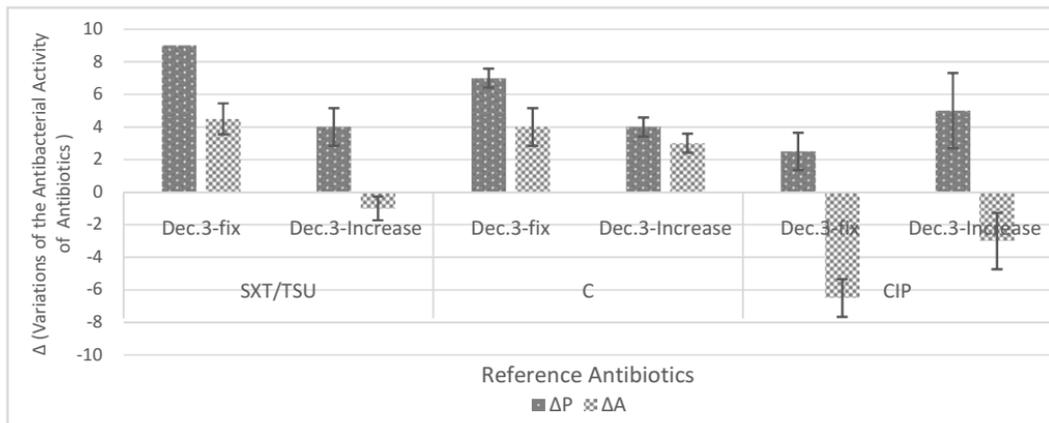


Fig. 3. Variations of the antibacterial activity of the reference antibiotics against *Salmonella Typhi* in repeated crops in the presence and absence of the fixed and increasing Dec.3

ΔP : difference in inhibition diameter obtained during exposure period calculated as initial inhibition diameter minus final inhibition diameter; ΔA : difference in inhibition diameter obtained during the non-exposure period calculated as inhibition diameter at the beginning minus inhibition diameter at the end. $\Delta P < 0$: the strain became more sensitive to antibiotics during the exposure period; $\Delta P > 0$: it became more resistance to antibiotics during the exposure period; $\Delta A < 0$: the strain gained more resistance to antibiotics during the non period exposure with respect to the exposure period; $\Delta A > 0$: it became more sensitive to antibiotics during the non period exposure with respect to the exposure period. SXT/TSU: Cotrimoxazole; C: Chloramphenicol; CIP: Ciprofloxacin; Dec.3-fix: Decoction3 at a fixed concentration; Dec.3-Increase: Decoction3 at increasing concentration

4. DISCUSSION

The low activity of plant extracts observed compared to antibiotics can be related to the presence of various molecules present in these plants. In fact, unlike antibiotics which are pure

molecules, plant extracts are mixtures of active molecules plus other substances such as polysaccharides, polypeptides capable of binding to the active compounds and hide or decrease their activity [17,18].

Table 4. Mean diameters of *Salmonella* Typhi inhibition rings after repeated cultures in the presence and absence of Dec.1 at a fixed concentration and growing for all antibiotics

Days	Mean diameter of inhibition halo (mm)					
	SXT/TSU		C		CIP	
	Dec.1-fix	Dec.1-increase	Dec.1-fix	Dec.1- increase	Dec.1-fix	Dec.1- increase
1	26,00±1,04f	26,00±1,04g	29,00±0,76d	29,00±0,76f	36,50±1,25g	36,50±1,25g
9	13,00±0,00c	14,00±0,00c,d	25,00±1,00b	26,50±0,29d	26,00±0,58b,c	27,50±0,58e
15	14,00±0,58c	12,50±0,58b,c	22,00±1,73a	28,00±0,58d,e	25,00±1,15a,b	26,00±0,00b,c,d,e
23	10,00±2,00b	9,00±1,00a	22,00±0,00a	23,00±1,15a,b	25,00±1,15a,b	25,00±0,58a,b,c
29	14,00±0,58c	11,50±0,58a,b	24,00±0,29b	22,00±1,73a	23,00±0,00a	29,50±0,50f

The average diameters of the inhibited zones affected by the same letter in the same column are not significantly different at $p < 0.05$. Each value represents the mean \pm standard deviation of the mean diameter of the inhibition zones. SXT/TSU: Cotrimoxazole; C: Chloramphenicol; CIP: Ciprofloxacin; Dec.1-fix: Decoction1 at a fixed concentration; Dec.1-Increase: Decoction1 at increasing concentration

Table 5. Mean diameters of *Salmonella* Typhi inhibition rings after repeated cultures in the presence and absence of Dec.3 at fixed and increasing concentration for all antibiotics

Days	Mean diameter of inhibition halo (mm)					
	SXT/TSU		C		CIP	
	Dec.3-fix	Dec.3- increase	Dec.3-fix	Dec.3- increase	Dec.3-fix	Dec.3- increase
1	26,00±1,04j	26,00±1,04h	29,00±0,76f,g	29,00±0,76f,g	36,50±1,25i	36,50±1,25g
9	13,00±0,00e	15,00±3,06f	26,00±2,00d,e	27,50±2,31e,f	28,00±0,00e,f	30,00±1,53e
15	8,00±0,00a	13,50±1,15d,e	23,00±1,15b	25,50±1,15c,d	25,50±1,15c,d	23,00±0,00b
23	11,00±1,15b,c	10,50±0,87b,c	24,50±0,58b,c	21,00±1,15a	23,00±1,15b	24,00±0,58b
29	13,00±1,53d,e	13,00±1,00d,e	24,00±0,00b,c	25,50±0,58c,d	24,00±0,58b,c	25,00±0,00c

The average diameters of the inhibited zones affected by the same letter in the same column are not significantly different at $p < 0.05$. Each value represents the mean \pm standard deviation of the mean diameter of the inhibition zones. SXT/TSU: Cotrimoxazole; C: Chloramphenicol; CIP: Ciprofloxacin; Dec.3-fix: Decoction3 at a fixed concentration; Dec.3-Increase: Decoction3 at increasing concentration

Table 6. Mean diameters of *Staphylococcus aureus* inhibition rings after repeated cultures in the presence and absence of fixed and increasing concentration of *Chromolaena odorata* (CO) for all antibiotics

Days	Mean diameters of inhibition halo (mm)					
	SXT/TSU		ERY		GM	
	CO-fix	CO- increase	CO-fix	CO- increase	CO-fix	CO- increase
1	42,00±1,41g	42,00±0,70h	40,00±1,41j	40,00±1,41f	25,00±0,70d	25,00±1,41e
9	29,00±1,41d	32,00±1,41e,f	28,50±2,12b	30,00±0,00a	14,00±1,41a	14,00±0,00a
15	29,00±0,00d	29,50±0,70c,d	33,00±0,00g	34,50±2,12d,e	16,00±0,00b	18,50±0,70b
23	23,50±0,70a	24,50±1,41a	30,00±1,41d	34,50±0,70d,e	17,00±0,00b	21,50±2,12d
29	30,00±1,41d	28,50±1,41b,c	29,50±1,41c	31,50±1,41a,b	16,50±2,12b	19,50±2,12b,c

The average diameters of the inhibited zones affected by the same letter in the same column are not significantly different at $p < 0.05$. Each value represents the mean \pm standard deviation of the mean diameter of the inhibition zones. SXT/TSU: Cotrimoxazole; C: Chloramphenicol; Ery: Erythromycin; CO-fix: *Chromolaena odorata* at a fixed concentration; CO- increase: *Chromolaena odorata* at increasing concentration

Table 7. Mean diameter of *Staphylococcus aureus* inhibition rings after repeated cultures in the presence and absence of fixed and increasing *Erigeron floribundus* (EF) for all antibiotics

Days	Mean diameters of inhibition halo (mm)					
	SXT/TSU		ERY		GM	
	EF-fix	EF- increase	EF-fix	EF- increase	EF-fix	EF- increase
1	42,00±0,70h	42,00±0,70h	40,00±2,12g	40,00±1,41g	30,00±0,10f	25,00±0,70h
9	32,00±0,00e	24,00±1,41b	35,00±0,70e	34,50±2,12d,e	24,00±2,00c,d	12,50±0,70g
15	25,5,00±2,12a	27,00±1,41c,d	28,50±1,41a	29,00±0,70a,b	24,50±1,53d	15,50±0,70b
23	27,50±0,70b	28,50±0,70d,e	29,00±0,70a	31,50±1,41c	24,00±0,58c,d	22,50±0,70f,g
29	30,00±0,00d	42,00±0,70h	37,00±1,41f	40,00±1,41g	24,50±0,87d	25,00±0,70h

The average diameters of the inhibited zones affected by the same letter in the same column are not significantly different at $p < 0.05$. Each value represents the mean \pm standard deviation of the mean diameter of the inhibition zones. SXT/TSU: Cotrimoxazole; C: Chloramphenicol; Ery: Erythromycin; EF-fix: *Erigeron floribundus* at a fixed concentration; EF- increase: *Erigeron floribundus* at increasing concentration

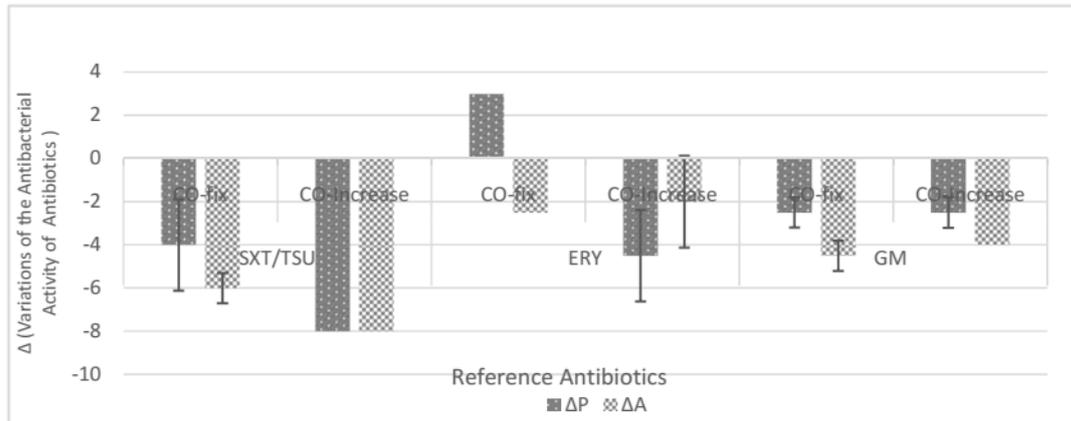


Fig. 4. Variations of the antibacterial activity of reference antibiotics against *Staphylococcus aureus* in the presence and absence of *Chromolaena odorata* (CO) at a fixed and increasing concentration

ΔP : difference in inhibition diameter obtained during exposure period calculated as initial inhibition diameter minus final inhibition diameter; ΔA : difference in inhibition diameter obtained during the non-exposure period calculated as inhibition diameter at the beginning minus inhibition diameter at the end. $\Delta P < 0$: the strain became more sensitive to antibiotics during the exposure period; $\Delta P > 0$: it became more resistance to antibiotics during the exposure period; $\Delta A < 0$: the strain gained more resistance to antibiotics during the non period exposure with respect to the exposure period; $\Delta A > 0$: it became more sensitive to antibiotics during the non period exposure with respect to the exposure period. SXT/TSU: Cotrimoxazole; C: Chloramphenicol; Ery: Erythromycin; CO-fix: *Chromolaena odorata* at a fixed concentration; CO- increase: *Chromolaena odorata* at increasing concentration

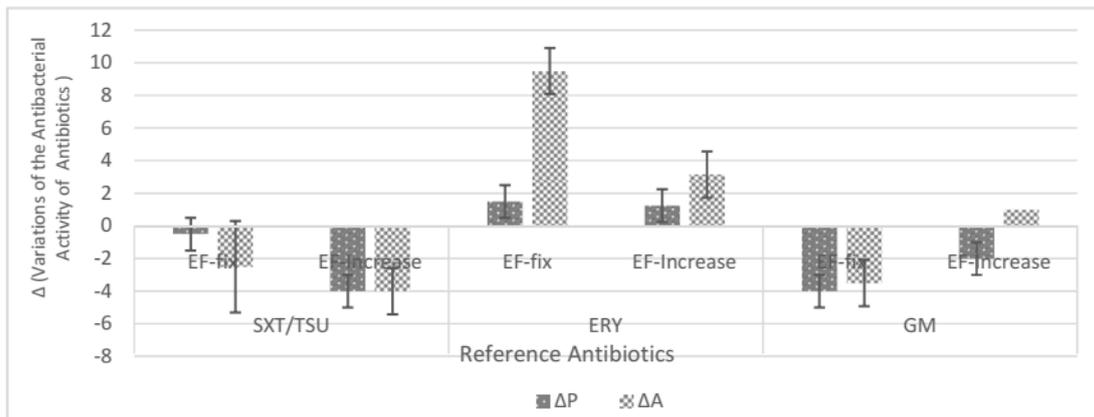


Fig. 5. Variations in antibacterial activity of reference antibiotics against *Staphylococcus aureus* in the presence and absence of *Erigeron floribundus* (EF) with fixed and increasing concentration

ΔP : difference in inhibition diameter obtained during exposure period calculated as initial inhibition diameter minus final inhibition diameter; ΔA : difference in inhibition diameter obtained during the non-exposure period calculated as inhibition diameter at the beginning minus inhibition diameter at the end. $\Delta P < 0$: the strain became more sensitive to antibiotics during the exposure period; $\Delta P > 0$: it became more resistance to antibiotics during the exposure period; $\Delta A < 0$: the strain gained more resistance to antibiotics during the non period exposure with respect to the exposure period; $\Delta A > 0$: it became more sensitive to antibiotics during the non period exposure with respect to the exposure period. SXT/TSU: Cotrimoxazole; C: Chloramphenicol; Ery: Erythromycin; EF-fix: *Erigeron floribundus* at a fixed concentration; EF- increase: *Erigeron floribundus* at increasing concentration

The resistance developed by *Salmonella Typhi* to the three antibiotics (Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Cotrimoxazole) during its exposure to decoctions 1 and 3 and maintained during the

non exposure period with most antibiotics may have been caused by a permanent adaptation, which instead of producing a metabolic burden as claimed by some authors [19,20] has

produced specific changes in bacterial metabolism that are beneficial for the growth of the bacteria [21,22,23].

During the exposure period of *Staphylococcus aureus* to *Chromolaena odorata* and *Erigeron floribundus* this strain has become more sensitive to most of the antibiotics ($\Delta P < 0$). This gain of sensitivity can be explained by the absence of an external membrane in *Staphylococcus aureus*, exposing its cell wall. Furthermore, Kosanić and Ranković [24] suggested that the cell wall structure and composition of bacteria could account for the different sensitivity to antimicrobial compounds. The lost sensitivity observed during non exposure period after exposure to *Chromolaena odorata* and *Erigeron floribundus* can be provoked by a phenotypic adaptation of microorganisms to environmental conditions [25].

The effect of plant extracts on the acquisition of resistance in *Salmonella Typhi* and *Staphylococcus aureus* could be related to the mechanism of action of each antibiotic and to the antibacterial activity of the phytochemicals contained in these plant extracts. According to Tenover [26] the antimicrobial compound interferes with the cell wall, the membrane, nucleic acid and enzymes. Chloramphenicol, Gentamicin and Erythromycin target ribosomes. But Chloramphenicol works by inhibiting the formation of peptide bonds by inhibition of peptidyl transferase while Gentamicin and Erythromycin act as inducing decoding error and inhibiting elongation of peptide chain respectively [27]. The three antibiotics interfere with protein synthesis, which is not the case with Cotrimoxazole, which interferes with the synthesis of folic acid and Ciprofloxacin, inhibiting nucleic acid synthesis. Furthermore, studies have shown that the plants contained in the decoctions as well as *Chromolaena odorata* and *Erigeron floribundus* contain secondary antibacterial metabolites such as tannins, saponins, flavonoids, quinones, phenols, beta-cyanins, cardioglycosides, coumarins, alkaloids and steroids [13,28]. Some of these metabolites contain aromatic forms in their structures as well as certain functional groups [29] found in the structure of the antibiotics tested. This can cause effects similar to those related to the use of antibiotics, thus explaining the acquisition of resistance of *Staphylococcus aureus* exposed to these plant extracts. Indeed, a study conducted by Mori et al. [30] has shown that metabolites

containing aromatic forms inhibit nucleic acid synthesis just like the Ciprofloxacin.

Furthermore, no significant difference was observed between the strains exposed to fixed concentrations of the extracts and those exposed to increasing concentrations vis-a-vis antibiotics tested. This goes against the work of Michael van der Horst et al. [31] whose strains exposed to antibiotics at fixed sub-lethal concentrations exhibited behaviour different from those exposed to antibiotics at increasing concentrations. The acquisition of antibiotic resistance may therefore not be closely related to the increase in the concentration of an antimicrobial substance as long as it remains sub-lethal, but to the nature of the molecule to which the microorganism is exposed.

The results presented here indicate that antibiotics are not the only actors in the emergence and spread of resistant bacteria as claimed by several authors [5,32]. Because all strains exposed to plant extracts exhibited different behaviour from unexposed strains. Many of them became less sensitive to the antibiotics tested. This decrease in the activity of antibiotics translated by the decrease of their diameters of inhibition. However, the behaviour varies according to the plant and the antibiotic tested, thus highlighting the diversity of mechanisms involved in the acquisition of resistance described by several authors [31,33].

5. CONCLUSION

The exposure of *Salmonella Typhi* and *Staphylococcus aureus* to some of the extracts of plants traditionally used in Cameroon in the treatment of typhoid and skin diseases has shown a reduction in the sensitivity of these strains to the antibiotics prescribed in the fight against these infections. These results, therefore, show that the selective pressure use of plants in traditional treatments can, as in the case of the selective pressure use of antibiotics in clinical and agricultural practices, be the cause of emergence and the spread of antibiotic-resistant bacteria, even though some of this resistance is not permanent. These could explain the case of several therapeutic failures of the populations admitted in hospitals after a long uncontrolled use of medicinal plants.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Spellberg B, Powers JH, Brass EP, Miller LG, Edwards. Trends in antimicrobial drug development: Implications for the future. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;38: 1279-1286.
2. Coates AR, Hu Y. New strategies for antibacterial drug design: targeting non-multiplying latent bacteria. *Drugs R and D*. 2006;7:133-151.
3. Reynolds R, Potz N, Colman M, Williams A, Livermore D, MacGowan A. Extended working party on bacteraemia resistance surveillance; 2004.
4. Weiss K. La résistance bactérienne: La nouvelle guerre froide. *Le Médecin du Québec*. 2002;37:41-49.
5. Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M. ESAC Project Group. Out patient antibiotic use in Europe and association with resistance: A cross-national data base study. *Lancet*. 2005; 3655:79-87.
6. Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Milillo MA. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*. 2007;14:727-732.
7. Gauthami R, Sudhakara RG, Karthik K. Evaluation of antibacterial effect of vernonia anthelmintica seed extract and its synergistic effect with antibiotics on resistant bacterial strains. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2012;3:79-81.
8. Thiago SA, João BTR, Fabiola FGR, Adriana RC, José GMC. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of Croton. *Industrial Crops and Products*. 2013;44:630-633.
9. Bartoloni A, Pallecchi L, Rodriguez H, Fernandez C, Mantella A, Bartalesi F, Strohmeyer M, Kristiansson C, Gotuzzo E, Paradisi F, Rossolini GM. Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009;33:125-129.
10. Dibong SD, Mpondo Mpondo E, Ngoye A, Kwin MF, Betti JL. Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*. 2011;37:2496-2507.
11. Tsobou R, Mapongmetsem PM, Van Damme P. Medicinal plants used against typhoid fever in Bamboutos Division, Western Cameroon. *Ethnobotany Research and Applications*. 2013;11:163-174.
12. Mpondo M, Yinyang J, Dibong S. Valorisation des plantes médicinales à coumarines des marchés de Douala Est (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*. 2012;85:7804-7823.
13. Agnem Clément Etchiké, Aristide Mebanga S, Abakar A, Eugène Nyonbourg. Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne de cinq plantes de la pharmacopée traditionnelle de l'Adamaoua (Cameroun). *Cameroon Journal of Experimental Biology*. 2011;7:22-27.
14. Ngene Jean-Pierre, Ngoule Charles Christian, Pouka Kidik Catherine-Marie, Mvogo Ottou Patrice Brice, Ndjib Rosette Christelle, Dibong Siegfried Didier, Mpondo Mpondo Emmanuel. Importance dans la pharmacopée traditionnelle des plantes à flavonoïdes vendues dans les marchés de Douala est (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*. 2015;88: 8194-8210.
15. Angora Rémi Constant Ahoua, Amino Georgette Konan, Bassirou Bonfoh and Mamidou Witabouna Koné. Antimicrobial potential of 27 plants consumed by chimpanzees (*Pan troglodytes* versus *Blumenbach*) in Ivory Coast. *International Society for Complementary Medicine Research*. 2015;15:383.
16. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* "proof-of-concept". *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;106:290-302.
17. Rollan. Kéfiplante: La biodisponibilité naturelle des actifs de plantes. *Laboratoire Symbiotec, Caribou TG-RAUST Conseil*; 2006.
18. Sanogo R, Diallo D, Diarra S, Ekoumou C, Bougoudogo F. Activités antibactérienne et antalgique de deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. *Mali Médical*. 2006;21:18-24.
19. Morosini MI, Ayala JA, Baquero F, Martinez JL, Blazquez J. Biological cost of AmpC production for *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44:3137-3143.
20. Andersson DI. The biological cost of mutational antibiotic resistance: Any practical conclusions? *Current Opinion in Microbiology*. 2006;9:461-465.

21. Alonso A, Morales G, Escalante R, Campanario E, Sastre L, Martinez JL. Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004;53:432-434.
22. Linares JF, Lopez JA, Camafeita E, Albar JP, Rojo F, Martinez JL. Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 2005;187:1384-1391.
23. Luo N, Pereira S, Sahin O, Lin J, Huang S, Michel L, Zhang Q. Enhanced *in vivo* fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 2005;102:541-546.
24. Kosanić M, Ranković B. Screening of antimicrobial activity of some lichen species *in vitro*. *Kragujevac J Sci*. 2010;32:65-72.
25. Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG. Genetics of antimicrobial resistance. *Animal Biotechnology*. 2006;17:111-124.
26. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*. 2006;119(6A):S3-S10.
27. Thévenot P. De l'antibiogramme à la prescription, Editions BioMérieux. 2003; 136.
28. Omotayo MA, Avungbeto O, Sokefun O, Eleyowo O. Antibacterial activity of *Crassocephalum crepidioides* (Fireweed) and *Chromolaena odorata* (Siam weed) hot aqueous leaf extract. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2015;5:114-122.
29. Atindehou Ménonvè, Latifou Lagnika, Bernard Guérold, Jean Marc Strub, Minjie Zhao, Alain Van Dorsselaer, Eric Marchioni, Gilles Prévost, Youssef Haikel, Corinne Taddéi, Ambaliou Sanni, Marie-Hélène Metz-Boutigue. Isolation and identification of two antibacterial agents from *Chromolaena odorata* L. active against four diarrheal strains. *Advances in Microbiology*. 2013;3:115-121.
30. Mori A, Nishino C, Enoki N, Tawata S. Antimicrobial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. 1987;26:2231-2234.
31. Michael Van der Horst MA, Schuurmans JM, Smid MC, Koenders BB, Kuile BH. De novo acquisition of resistance to three antibiotics by *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance*. 2011;17:141-147.
32. Levy SB. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002;49:25-30.
33. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 2009;78: 119-146.

© 2018 Ezo'o et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:

<http://www.sciencedomain.org/review-history/26281>