

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I

ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE

DÉPARTEMENT DES SCIENCES
BIOLOGIQUES



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

HIGHER TEACHERS' TRAINING
COLLEGE

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL SCIENCES

**ÉVALUATION DES PROPRIÉTÉS ANTIBACTÉRIENNES
DE L'EXTRAIT ÉTHANOLIQUE DES TIGES D'*Allexis
cauliflora* (Violaceae)**

Mémoire présenté et soutenu en vue de l'obtention du Diplôme de Professeur de l'Enseignement
Secondaire Général-Deuxième Grade (DI.P.E.S. II) en Biologie

Par

GOUNOU GHEMKAM Roméo Xavier

Matricule : 09R0372

Licencié ès sciences

OPTION : Biochimie

Sous la direction de :

Dr ZONDEGOUMBA Ernestine

Chargé de Cours

FS-UY 1

Année académique 2015/2016

DÉDICACE

À ma maman POTAGO Véronique

REMERCIEMENTS

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail de recherche au sein du Laboratoire de Chimie Médicinale de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I et du Centre de Biologie Moléculaire de Ngoussou sous la direction du Dr ZONDEGOUMBA Ernestine du Département de Chimie de l'Université de Yaoundé I. À cette occasion, je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères :

- Au Seigneur DIEU tout puissant qui m'a permis de mener à bien ce travail
- Au Dr ZONDEGOUMBA Ernestine pour avoir accepté de diriger ce mémoire, pour son encouragement, sa disponibilité et sa patience. Je la remercie de m'avoir conseillé dans la réalisation de ce projet et du soutien qu'elle m'a toujours manifestée.
- Au Professeur NKENFOU Céline et à Mr NOTEDJI Augustin pour nous avoir guidés dans la réalisation de ce travail et pour leur disponibilité durant ces travaux.
- Au Dr ACHOUNDONG de l'Herbier National du Cameroun pour nous avoir facilité l'obtention de toutes informations quelconques.
- Au Pr SONKE Bonaventure, Chef de Département des Sciences Biologiques de l'École Normale Supérieure de Yaoundé et l'ensemble du corps Enseignant pour leurs initiations au métier d'Enseignant des Lycées et Collèges.
- A mes parents Mr GUEMKAM Nestor et Mme POTAGO Véronique pour leur amour, leur encouragement et leur sacrifice.
- A mon oncle Mr GUETCHUENG Gabriel et famille, pour leur soutien constant.
- A mes amis et collègues Enseignants de promotion en particulier NGUIME MAKOLLO Richard, FOUMAN Jean, ZEBAZE Joël, ainsi que Mlles NGO NKONDJOCK Marguerite et KANA Myriam avec qui j'ai travaillé durant toute cette période.
- A mes amis d'enfance et de tous les jours KAMSU Romaric, MOTEMDJIE Anicet, TALOM Exodus, NEGHAN Sidonie, NKUMEDJEU Germain, FOKOK Charibert, MAGNE Raïssa et leurs familles respectives.
- A tous mes voisins du quartier MONTEE JOUVENCE, en particulier Mr WAMBA Pierre et Mr KARKANGNE Mathieu pour leur conseil et encouragement pendant les moments les plus difficiles.

SOMMAIRE

DÉDICACE.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
SOMMAIRE	iii
ABSTRACT.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX	ix
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	2
I-1 GÉNÉRALITÉS SUR LA PLANTE UTILISÉE	2
I-1-1 Famille des Violaceae.....	2
I-1-2 Genre : <i>Allexis</i>	2
I-1-3 Espèce: <i>Allexis cauliflora</i>	2
I-1-3-1 Aspect botanique	2
I-1-3-2 Position systématique	3
I-3-2-3 Usages traditionnels d' <i>Allexis cauliflora</i>	4
I-3-2-4 Travaux antérieurs sur quelques Violaceae	4
I-2-GÉNÉRALITES SUR LES BACTÉRIES	4
I-2-1-Définition.....	4
I-2-2 Morphologie.....	5
I-2-3-Structure	5
I-2-4-Composition de la paroi des bactéries Gram- et Gram+	6
I.2.5 Croissance.....	7
I.2.6 Infections bactériennes	7
I -2-7 Généralités sur les espèces bactériennes utilisées et les infections associées.....	9
I-3-GÉNÉRALITES SUR LES SUBSTANCES ANTIBACTÉRIENNES	10
I-3-1 Substances antibactériennes synthétiques : les antibiotiques	10
I-3-2 Biomolécules naturelles.....	11
I-4MÉTHODES D'ÉVALUATIONS DES ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNES	15
I-4-1 Méthode par diffusion	15
I-4-2 Méthode de dilution en milieu liquide.....	17

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	18
II-1 CADRE DE L'ÉTUDE.....	18
II-2 MATÉRIEL.....	18
II-2-1 Support biologique.....	18
II-2-2 Matériel végétal	18
II-2-3 Matériels pour les tests bactériologiques.....	18
II-2-4 Matériels et réactifs pour l'extraction et le screening chimique.....	19
II-3 MÉTHODOLOGIE	20
II-3-1 CHIMIE.....	20
II-3-1-1 Préparation de l'extrait.....	20
II-3-1-2 Le screening phytochimique de l'extrait.....	22
II-3-2 BACTÉRIOLOGIE.....	24
II-3-2-1 :Test de sensibilité des germes aux extraits végétaux	24
II-3-2-2 Réalisation de l'antibiogramme : relation concentration-activité	24
II-3-2-2-1 Culture des souches bactériennes.....	24
II-3-2-2-2 Préparation de l'inoculum	24
II-3-2-2-3 Préparation de la solution mère de l'extrait éthanolique et de l'antibiotique de référence	25
II-3-2-2-4 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	25
CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION	27
III-1 RÉSULTATS	27
III-1-1 Étude phytochimique	27
III-1-1-1-Résultats des essais d'extraction	27
III-1-1-2 Rendement de l'extraction	27
III-1-1-3 Criblage phytochimique.....	27
III-1-2 Essais antibactériens	28
III-1-2-1 Évaluation des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)	28
III-1-2-2 Étude de la sensibilité des bactéries à l'antibiotique de référence : antibiogramme.	29
III-2 DISCUSSION	31
CHAPITRE IV: IMPLICATION DU SUJET SUR LE SYSTÈME ÉDUCATIF	32
IV-1 Définition de quelques concepts	32
IV-2 Objectif de la didactique des disciplines	32
IV-3 Fiche tabulaire de préparation d'une leçon de SVT	32

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	37
CONCLUSION	37
PERSPECTIVES	37
BIBLIOGRAPHIE.....	38
ANNEXES	38

ABSTRACT

The natural extracts of plant contain a variety of active principles to which are attributed diversely biological activities. In the present studies we have evaluate the activities of antibacterial extract from the sterms of *Allexis cauliflora* (Violaceae). These plants have being harvested in the locality of Kribi (South Cameroon). The powder of the sterms of *Allexis cauliflora* has been extracted cold and hot. The solubility tests have been realized in the base of chromatography thin layers and ethanol have been detained as the best solvent extraction. The extract of phytochemical screening has revealed the richest of plant in flavonoids, sugars, lipids, phenol, sterol, tannins and saponins. The evaluation of the power of antibacterials of the ethanolic extracts by the method of microdilution method on microtiter plate have been realized in fives species of bacteria to know *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter BM/67*. From these studies, it can be said that the sterms of *Allexis cauliflora* trained an antibacterial power manifested on the germ studies which minimal inhibitor concentration varies from 62, 5 µg/ml to 125µg/ml. These results confirmed certain pharmacologic and therapeutic use of the sterms of *Allexis cauliflora* extracts against bacterial infections.

Key words: *Allexis cauliflora*, phytochemical screening, natural extracts, antibacterial power.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

ATCC : American Type Culture Collection

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO:Diméthylsulfoxyde

MHA: Mueller Hinton Agar

MHB: Mueller Hinton Broth

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

UFC : Unité Formant Colonies

UMR : Unité Mixte de Recherche

LISTE DES FIGURES

Figure 1: <i>Allexis cauliflora</i>	3
Figure 2: Cellule bactérienne (https://natyinfirmiere.files.wordpress.com consulté le 14/11 2015 à 18 h 03min).	6
Figure 3: Membrane des bactéries Gram+ et des bactéries Gram-	7
Figure 4: Montage d'une CCM.....	20
Figure 5: Protocole d'extraction par l'éthanol de la poudre des tiges d' <i>Allexis cauliflora</i>	21
Figure 6: Evaporateur rotatif.....	22
Figure 7: Illustration de l'utilisation d'une plaque de microtitration pour la détermination des CMI des différents extraits	26
Figure 8: Chromatogramme de l'extrait des tiges d' <i>Allexis cauliflora</i>	27
Figure 9: Plaque de microtitration après révélation à la résazurine	29

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Rendement de l'extraction	27
Tableau 2 : Tests phytochimiques de l'extrait éthanolique des tiges d'Allexis cauliflora.....	28
Tableau 3 : Effet de l'extrait éthanolique sur la croissance bactérienne à différentes concentrations	28
Tableau 4 : Concentration minimale inhibitrice de l'extrait éthanolique	29
Tableau 5 : Activité de la Ciprofloxacine sur les 5 souches bactériennes	30

INTRODUCTION

Les maladies infectieuses sont une des principales causes de mortalité dans le monde. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que ces maladies sont responsables de 14 millions de décès par an dans le monde et elles représentent 43% des décès dans les pays en voies de développement (OMS 1999). Au Cameroun, en 2008, quatre parmi les cinq premiers décès dans les districts sanitaires étaient dûs aux pathologies d'origine infectieuse. Il s'agissait du paludisme, de la diarrhée, de la tuberculose et des infections respiratoires aiguës (Ministère de la Santé 2009). Il faut reconnaître que les stratégies de lutte ont porté fruit, cependant de nouveaux défis sont à relever. En effet l'usage non rationnel des antibiotiques a rendu de plus en plus de bactéries résistantes à ces médicaments. Aussi, le coût relativement cher des antibiotiques limite l'accès de populations des pays en voie de développement à ces médicaments (Vanden et Vlietinck 1991). Pour pallier à ces insuffisances, il est nécessaire de trouver de nouvelles molécules médicamenteuses. La médecine traditionnelle constitue un terrain privilégié de recherche de ces nouvelles molécules, au regard du fort potentiel qu'elle regorge.

La flore végétale africaine en général est réputée pour sa richesse car contient de milliers d'espèces végétales parmi lesquelles certaines ont déjà été scientifiquement étudiées et abouti à des médicaments utilisables dans les soins de santé primaires selon les recommandations de l'Organisation Mondiale de le Santé (Keita 2002). La flore du Cameroun quant à elle, bien que riche et variée contient plusieurs espèces qui n'ont pas encore fait l'objet d'études scientifiques approfondies. Dans l'optique d'une connaissance approfondie des plantes anti-infectieuses qui font l'objet d'un usage en médecine traditionnelle au Cameroun, nous nous sommes intéressés à *Allexis cauliflora* (Violaceae), une plante utilisée en médecine traditionnelle au Sud Cameroun. Ses tiges sont utilisées dans le traitement des pathologies diverses dont les infections cutanées et digestives. En absence de tous rapports phytochimiques publiés sur les tiges d'*Allexis cauliflora* à notre connaissance, la présente étude a été envisagée avec pour objectif général d'évaluer les activités antibactériennes de l'extrait éthanolique des tiges d'*Allexiscauliflora* sur cinq souches bactériennes résistantes à Gram négatif. Pour atteindre cet objectif, nous avons axé notre travail autour des points suivants :

- préparer l'extrait éthanolique brut
- réaliser le criblage phytochimique de l'extrait éthanolique
- déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait éthanolique

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

I-1 GÉNÉRALITÉS SUR LA PLANTE UTILISÉE

I-1-1 Famille des Violaceae

Les violaceae sont une famille de plantes dicotylédones qui comprennent 800 espèces en 16 à 23 genres (Rodolphe-Edouard *et al.* 2002). Ce sont des plantes herbacées, rarement annuelles, ou des arbres, arbustes, sous-arbrisseaux pérennes. Les violaceae sont des plantes à feuilles alternes ou basales (chez certains ligneux comme *Rinorea*, elles sont opposées et anisophylles), stipulées et à limbe entier (plus rarement feuilles palmées) (Rodolphe-Edouard *et al.* 2002).

Leurs fleurs sont en général tétracycliques, hermaphrodites (à l'exception des petites fleurs unisexuée du genre *Melicytus*), pentamères, parfois cléistogames, zygomorphes (actinomorphes chez *Rinorea*), solitaires, en grappe, thyrses, panicules ou glomérules. (Rameau & Dume 2002). Le calice est composé de 5 sépales imbriqués libres (ou soudés légèrement à leur base) et inégaux persistant après la floraison, la corolle de 5 pétales libres imbriqués à confortés, parfois l'abaxial formant un large labelle ou éperon nectarifère à l'arrière, ce qui favorise la pollinisation par entomophilie (Rameau & Dume 2008).

I-1-2 Genre : *Allexis*

Le genre *Allexis* appartient à la famille des violaceae, Arbuste droit ayant environ 20m de hauteur est représenté par des fleurs portées par des branches tiges principales (Hutchinson et Dalziel 1954). Quatre espèces sont reconnues au Cameroun : *Allexis batangae*, *Allexis cauliflora*, *Allexis obanensis* et *Allexis zygomorpha* (Achoundong 2010).

I-1-3 Espèce: *Allexis cauliflora*

I-1-3-1 Aspect botanique

On rencontre cette plante au Ghana et au Sud Cameroun (axe Ebolawa-Kribi) dans la forêt de kienke, c'est un arbuste possédant des grandes feuilles de 50 cm de long mesurant jusqu'à 8m de haut. La floraison se fait sur la tige (Achoundong & Onana 1998).



Figure 1: *Allexis cauliflora* (photo prise par Mr NANA)

I-1-3-2 Position systématique

Domaine : *Eukaryota*

Règne : *Plantae*

Sous-règne : Viridaplantae

Embranchement : Tracheophytina

Sous-embranchement : Euphyllophytina

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Super-ordre : Violanae

Ordre : Malpighiales

Famille : Violaceae

Sous-famille : Violoideae

Genre: *Allexis*

Espèce : *Allexiscauliflora*

I-3-2-3 Usages traditionnels d'*Allexis cauliflora*

Les écorces d'*Allexis cauliflora* sont utilisées pour traiter la fièvre et la syphilis (Achoundong et Onana 1998). Il en est de même pour les écorces des *Rinorea* qui sont utilisées pour calmer la douleur chez les femmes lors de l'accouchement et sont également utilisées pour soigner la fièvre (Stewart *et al.* 2000). En général, toutes les violaceae ont des propriétés émoullientes, et ont été employées dans le traitement des maladies respiratoires telles que la bronchite et la coqueluche, et de nos jours sous forme de pastilles à sucer.

I-3-2-4 Travaux antérieurs sur quelques Violaceae

Très peu de rapport phytochimique ont été publiés sur le genre *Allexis* jusqu'à ce jour. Les travaux effectués par NGANSO *et al.* (2011) ont révélé les activités anti-tripanosomales et cytotoxiques de la 22-Hydroxyclérostérol, un stérol isolé des écorces d'*Allexis cauliflora*. Les extraits méthanoliques des écorces d'*Allexis cauliflora* ont montré une activité bactéricide contre *Escherichia coli* AG100A avec une valeur de concentration minimale bactéricide de 512µg/ml (Tchana *et al.* 2014).

Les études phytochimiques antérieures sur certaines espèces d'autres genres violacées indiquent la présence de métabolites secondaires de médicaments potentiellement utiles tels que les flavonoïdes et triterpénoïdes. Ils ont été signalés comme inhibiteurs de métalloprotéinases matricielles. Au Cameroun, l'espèce *Allexis cauliflora* a émergé comme l'une des plantes les plus couramment utilisées dans la gestion des maladies parasitaires (Lune *et al.* 2005).

I-2-GÉNÉRALITES SUR LES BACTÉRIES

I-2-1-Définition

Les bactéries sont des êtres vivants unicellulaires de petite taille, de morphologie différente qui présentent des caractéristiques propres (Procaryote) et sont ubiquitaires. Elles sont donc observables seulement à l'aide d'un microscope (Singleton & Sainsbury 1990).

I-2-2 Morphologie

Les bactéries présentent une grande diversité de tailles et de formes. Les cellules bactériennes typiques ont une taille comprise entre 0,5 et 5 μm de longueur

La plupart des bactéries sont soit sphériques, soit en forme de bâtonnets. Dans le premier cas elles sont appelées coques (du grec *kókkos*, grain) et dans le second cas, bacilles (du latin *baculus*, bâton). Il existe aussi des formes intermédiaires : les coccobacilles. Quelques bactéries en forme de bâtonnets sont légèrement incurvées comme les *Vibrio*. D'autres bactéries sont hélicoïdales. Ce sont des spirilles si la forme est invariable et rigide, des spirochètes si la structure est flexible et peut changer de forme. La grande diversité de formes est déterminée par la paroi cellulaire et le cytosquelette. Les différentes formes de bactéries peuvent influencer leur capacité d'acquérir des nutriments, de s'attacher aux surfaces, de nager dans un liquide et d'échapper à la prédation (<https://fr.wikipedia.org> consulté le 14/11/2015 à 17h25min).

I-2-3-Structure

Une caractéristique importante des bactéries est la paroi cellulaire. La paroi donne à la bactérie sa forme et la protège contre l'éclatement sous l'effet de la très forte pression osmotique du cytosol (<https://fr.wikipedia.org> consulté le 14/11/2015 à 17 h23min). Les bactéries peuvent être structurellement divisées en deux groupes : les bactéries à paroi unimembranée (ne contenant qu'une seule membrane, la membrane plasmique) et les bactéries à paroi bimembranée (constituée de deux membranes superposées, la membrane interne et la membrane externe).

L'appareil nucléaire est un filament d'ADN non entouré par une membrane. Il forme un chromosome unique. La cellule bactérienne est haploïde. Certains organites extracellulaires comme les flagelles où les poils peuvent être enchâssés dans la paroi cellulaire (<https://fr.wikipedia.org> consulté le 14/11/2015 à 17 h25min).

En tant que procaryote (organisme sans noyau), les bactéries sont des cellules relativement simples, caractérisées par une absence de noyau et d'organites comme les mitochondries et les chloroplastes, elles n'ont pas non plus de réticulum endoplasmique ou d'appareil de Golgi (<https://fr.wikipedia.org> consulté le 14/11/2015).

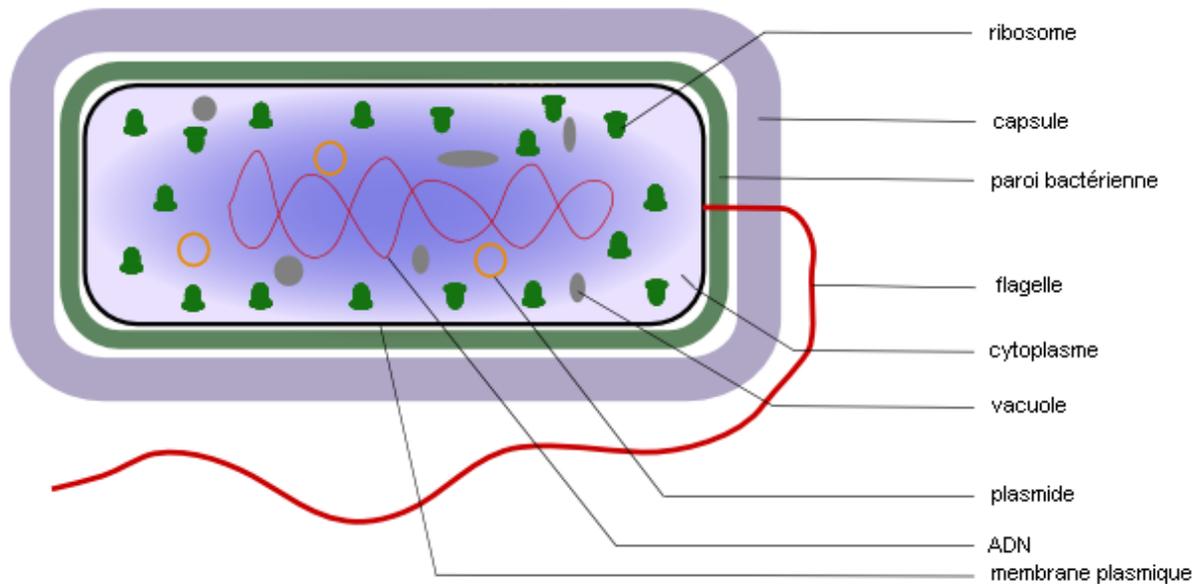


Figure 2: Cellule bactérienne (<https://natyinfirmiere.files.wordpress.com> consulté le 14/11/2015 à 18 h 03min).

I-2-4-Composition de la paroi des bactéries Gram- et Gram+

La coloration de Gram est la technique la plus utilisée dans l'étude de la composition de la paroi des bactéries. Elle permet de distinguer deux grands groupes de bactéries : Gram- et Gram+.

- Paroi des bactéries à Gram- : Beaucoup plus complexe, le peptidoglycane est en couche mince peu dense (15% du poids sec). L'autre constituant essentiel est un lipide complexe (A) couplé à la glucosamine et des résidus phosphore qui est amphiphile possédant une partie hydrophobe et une partie hydrophile.

- Paroi des bactéries à Gram+ : Le peptidoglycane est le constituant majeur. La mureine représente jusqu'à 30% du poids sec d'une cellule. Le peptidoglycane est très solide, les liaisons croisées entre chaînes glucidiques sont nombreuses (Flandrois 1997).

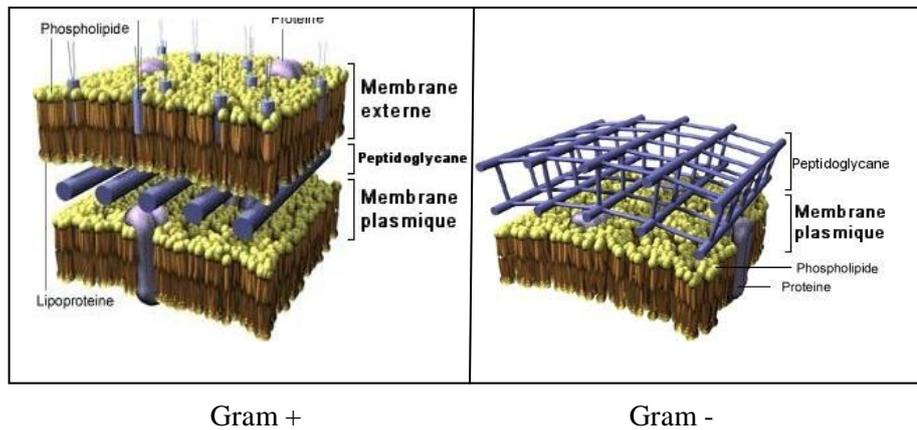


Figure 3: Membrane des bactéries Gram+ et des bactéries Gram-
 (<https://natyinfirmiere.files.wordpress.com> consulté le 14/11/2015 à 18 h 03 min).

I.2.5 Croissance

Les bactéries ne croissent que lorsqu'elles se trouvent dans les conditions favorables, dans un milieu ambiant où elles doivent pouvoir puiser les aliments qui leur sont nécessaires. L'ensemble des espèces consomme des substances nutritives extrêmement diverses mais une espèce donnée peut avoir un éventail alimentaire très étroit concernant ses besoins en oxygène. Lorsque la présence d'oxygène leur est indispensable ; elles sont dites aérobies stricts ou obligatoires, par contre les espèces ne pouvant vivre qu'en absence d'oxygène sont dites anaérobies. Il existe également des anaérobies facultatifs qui peuvent vivre en présence ou non d'oxygène.

Généralement chaque espèce bactérienne croît de façon optimale à une température donnée ; les bactéries dont l'optimum de température est supérieur à 45°C sont qualifiées de thermophiles. Les bactéries qui croissent de façon optimale entre 20 et 45°C sont appelées mésophiles et celles qui croissent à 0°C ou moins sont appelées psychrophiles (Singleton & Sainsbury 1990).

I.2.6 Infections bactériennes

a) Définition

Une infection désigne la pénétration et/ou la multiplication d'un agent pathogène dans un organisme hôte. Elle entraîne une diminution de la défense immunitaire et un accroissement de la virulence des germes (Baron *et al.* 1986).

b) Pathogenicité

La pathogenicité d'un germe est, quant à elle, fonction de l'inoculum, c'est-à-dire du nombre de germes qui affecte un organisme. Ainsi donc, une infection se développera d'autant plus que les défenses immunitaires d'un individu sont affaiblies et que l'inoculum sera intense. Les maladies résultent généralement de plusieurs causes. Les agents pathogènes utilisent différents modes d'actions.

➤ Secretion des toxines bactériennes

Une toxine est une substance synthétisée par un agent pathogène, capable de léser ou même de tuer l'hôte en perturbant certains de ses mécanismes fonctionnels. La plupart des bactéries pathogènes produisent une ou plusieurs toxines : c'est le cas du *vibrio cholerae*

➤ Pathogénie sans toxines

Les toxines ne paraissent pas jouer de rôle dans certaines maladies. Il semble que dans ces cas, la seule présence de l'agent pathogène est insuffisante pour déclencher la maladie ; l'hôte se rend malade en combattant l'infection : c'est le cas de *Mycobacterium tuberculosis* (Singleton & Sainsbury 1990).

C) Diagnostic

Le diagnostic bactériologique est un ensemble de moyens permettant de confirmer ou non la présence d'une infection d'origine bactérienne. Ces moyens diagnostiques sont variés et caractérisent soit le diagnostic direct soit le diagnostic indirect :

-Diagnostic Direct : mise en évidence de la bactérie elle-même, donc finalement de sa culture ou isolement qui permettra l'identification ultérieure ainsi que de préciser sa sensibilité aux antibiotiques.

-Diagnostic Indirect : mise en évidence de la réponse de l'organisme à l'infection par la présence d'anticorps spécifiques, le plus souvent sériques ou plus rarement par une réponse d'hypersensibilité dite allergique (Flandrois 1997).

I -2-7 Généralités sur les espèces bactériennes utilisées et les infections associées

❖ *Escherichia coli*

E. coli est une bactérie qui appartient à la famille des Entérobactéries. Elle est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif de l'Homme et des animaux. Dans l'intestin, *E. coli* est l'espèce aérobie facultative quantitativement la plus importante. Sa présence dans l'eau est témoin d'une contamination fécale. Elles résistent aux moyens de défense de l'organisme et causent des infections au niveau de la vessie (infections basses) ou au niveau des reins (infections hautes). L'infection à partir des *E. coli* se fait le plus souvent par voie ascendante, parfois après pose d'une sonde qui introduit les contaminants dans la vessie (Benzalar 2014).

❖ *Klebsiella pneumoniae*

Ce sont des bacilles à Gram négatif, immobile et possédant une volumineuse capsule de nature polysaccharidique. Essentiellement saprophytes et très répandues, elles peuvent se retrouver à l'état commensal dans le tube digestif et les cavités naturelles, en particulier les voies respiratoires. *Klebsiella pneumoniae* est principalement isolées chez l'homme dans les broncho-pneumopathies aiguës et subaiguës et d'infections urinaires. L'infection par *Klebsiella pneumoniae* peut survenir à la suite d'une dialyse péritonéale ou de la pose d'un cathéter (Sinon 2001).

❖ *Enterobacter cloacae*

C'est une bactérie anaérobie facultative ayant la forme de baguette. Elle est responsable des infections urinaires et des voies respiratoires chez l'Homme (Barnes *et al.* 2003).

❖ *Enterobacter aerogenes*

Bacille ubiquitaire et à Gram négatif, c'est une bactérie commensale du tube digestif de l'Homme et des animaux. On la rencontre dans les stations d'épurations des eaux usées, le sol, les selles et les produits fermentaires. Elle est responsable des infections des voies respiratoires chez l'Homme (Francine & Patrick 2006).

I-3-GÉNÉRALITES SUR LES SUBSTANCES ANTIBACTÉRIENNES

I-3-1 Substances antibactériennes synthétiques : les antibiotiques

a) Définition

On appelle antibiotique toute substance naturelle d'origine biologique élaborée par un organisme vivant, substance chimique produite par synthèse ou une substance semi synthétique obtenue par modification chimique d'une molécule de base naturelle ayant les propriétés suivantes : activité antibactérienne, activité en milieu organique, bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme.

Les antibiotiques ont la propriété d'interférer directement avec la prolifération des micro-organismes à des concentrations tolérées par l'hôte (Lavigne 2007).

b) Classification et mode d'action des antibiotiques

On dispose de plusieurs dizaines d'antibiotiques, regroupés en plus de dix familles dont les principales sont les suivantes : aminosides, bétalactamines (pénicillines et céphalosporines), macrolides, nitro-imidazoles, quinolones, cyclines). Ils inhibent la synthèse de la paroi qui entoure la bactérie ou bien la synthèse de ses protéines.

Ces antibiotiques sont classés selon plusieurs modalités :

- ❖ En fonction de l'origine : on a les antibiotiques naturels et les antibiotiques synthétiques(ou semi-synthétiques)
- ❖ En fonction du spectre d'activité : on a les antibiotiques à spectre large et les antibiotiques à spectre étroit
- ❖ En fonction de la nature chimique : on aura les antibiotiques hydrophiles (betalactamines, glycopeptides, aminosides) et les antibiotiques lipophiles (macrolides, fluoroquinolones, tétracyclines,...)
- ❖ En fonction du mode d'action : on va distinguer les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane, les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines, les antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires, les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques, les inhibiteurs de la synthèse des folates (Lavigne 2007).

I-3-2 Biomolécules naturelles

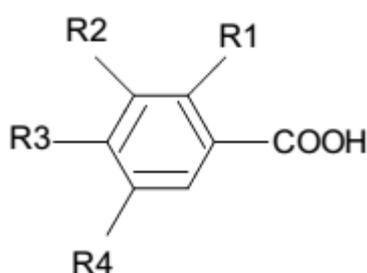
Majoritairement, les principes actifs isolés des plantes sont des métabolites secondaires ; certaines de ces substances interviennent dans le mécanisme de défense de la plante contre les micro-organismes, les insectes les herbivores alors que d'autres se contentent de donner à la plante son odeur caractéristique (Cowan 1999).

I-3-2-1 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). La structure des composés phénoliques naturels varie des molécules simples (acide phénolique, phénol simple) aux molécules les plus hautement polymérisés comme les tannins, les flavonoïdes, les coumarines, les saponines (Zeghad 2009).

I-3-2-1-1 Les phénols simples et les acides phénoliques

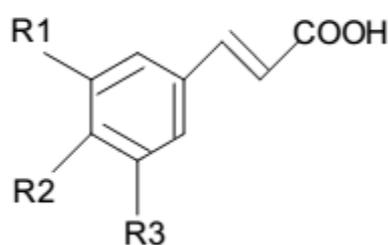
Les Phénols simples et les acides phénoliques sont les composés phytochimiques les plus simples possédant un noyau aromatique substitué (Cowan 1999). Leurs mécanismes d'action ne sont pas bien connus, mais le nombre et la position des groupements hydroxyles sur le noyau aromatique pourraient être en relation avec leurs propriétés antivirales, antibactériennes et antifongiques (Zeghad 2009).



Acide hydroxy-benzoïque

(R1=R2=R3=H; R4= OH)

(Sarni-Manchado & Cheynier 2006).



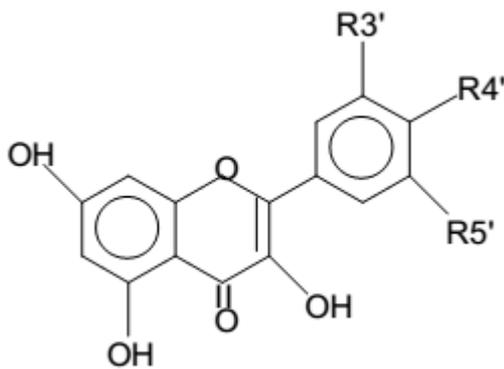
Acide hydroxy-cinnamique

(R1=R2=H; R3=OH)

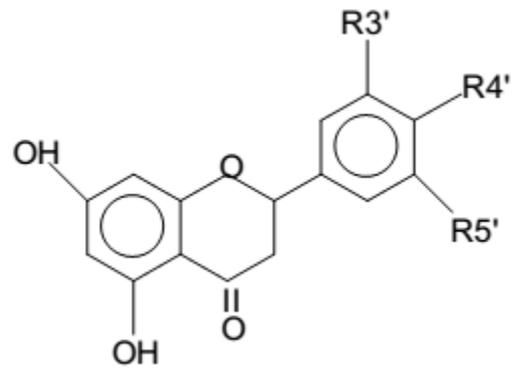
(Sarni-Manchado & Cheynier 2006).

I-3-2-1-2 Les flavonoïdes

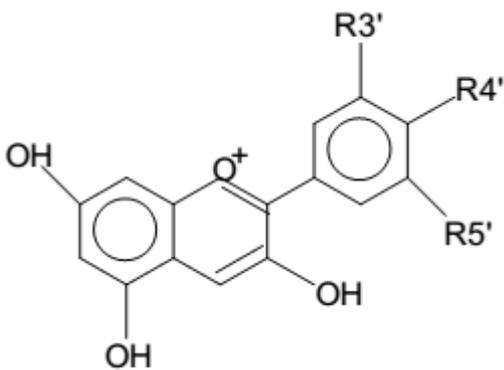
Les flavonoïdes sont fréquents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : tiges, fruits bois, graines, racines, feuilles, pollens (Zeghad 2009), ils peuvent aussi être rencontrés dans certaines boissons et chez certains fourrages (exemple : trèfle). Certaines classes de flavonoïdes sont fréquents exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont eux une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes (Zeghad 2009).



Flavanol (Erdman *et al.* 2007).



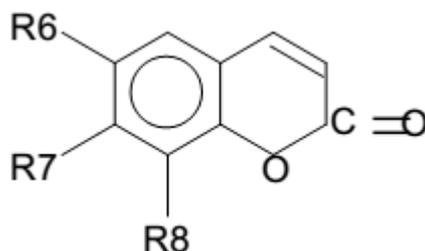
Flavanone (Erdman *et al.* 2007).



Anthocyanidine (Erdman *et al.* 2007).

I-3-2-2 Les coumarines

Les coumarines dérivent des acides hydroxy- cinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique.



Coumarine (Zeghad 2009)

I-3-2-3 Les tannins

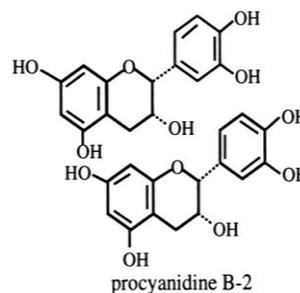
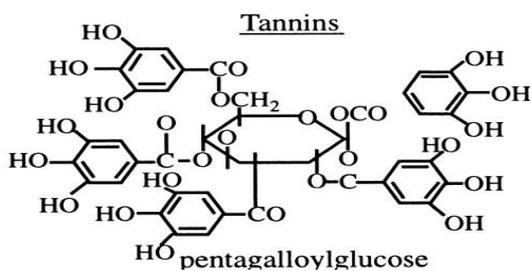
Le terme tannin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir par le dit composé (Bravo 1998). On distingue :

Les tannins hydrolysables

Ils comprennent l'acide gallique et les produits de condensation de son dimère, l'acide hexa-hydroxydiphénique. Comme leur nom l'indique, ces tannins subissent facilement une hydrolyse acide et basique ; ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et d'eau chaude.

Les tannins condensés

Les tannins condensés, appelés pro anthocyanidines ou procyanidines, sont des poly phénols de masse élevée. Ils résultent de la polymérisation auto-oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3-ol et/ou de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) des unités adjacentes, et se nomment ainsi pro anthocyanidines de type B. Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et par une liaison d'éther additionnelle entre C2 et C7, les pro anthocyanidines sont dits de type A (Wollgast & Antlam 2000).



Tannin condensé

Tannin hydrolysable

(Ghestem 2001)

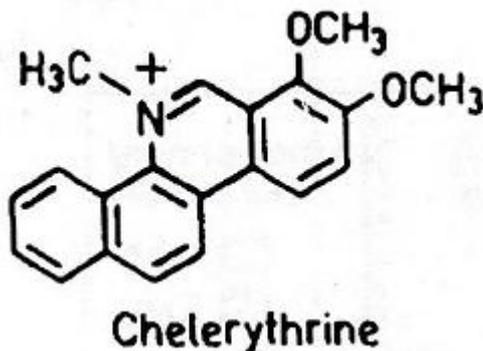
I-3-2-4 Les saponines

Le nom Saponine dérive du mot latin "Sapo" qui signifie savon, parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires en leurs molécules explique leur comportement moussant en solution aqueuse.

Comme définition, on dirait qu'une saponine est un glycoside de stéroïde ou de tri terpène. Ainsi, on distingue fondamentalement les saponines stéroïdiques et les stéroïdes tri-terpéniques dérivant tous deux, biosynthétiquement de l'oxydosqualene. Ils manifestent des propriétés antimicrobiennes, insecticides, anti-inflammatoires, hémolytiques et antalgiques (Vincken *et al.* 2007).

I-3-2-2 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes forment une grande famille hétérogène de métabolites secondaires, qui présentent un intérêt par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine. Ils provoquent chez l'homme diverses réponses physiologiques et psychologiques, qui à forte dose sont très toxiques. Ce sont des composés azotés naturels et dont le goût est amer. Leur synthèse a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, puis se concentrent dans la vacuole. Les alcaloïdes issus du métabolisme des acides aminés sont des alcaloïdes vrais.

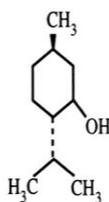


1.

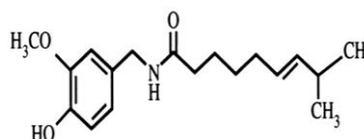
(Upreti *et al.* 1991)

I-3-2-3 Les terpénoïdes

Les terpènes constituent un groupe de composés dont la structure de base est une unité isoprénique. Si ces composés contiennent un autre élément comme l'oxygène, on parle de terpénoïdes. Les terpénoïdes sont connus comme doués de propriétés antibactériennes (Amaral *et al.* 1998). Le mécanisme d'action des terpénoïdes n'est pas bien connu mais, il pourrait induire une destruction de la membrane du microorganisme par une action lipophile (Cowan 1999). Les terpénoïdes sont les plus représentés dans la constitution des huiles essentielles (Brunetton 1999).



Menthol



Capsaicine

(Cowan 1999)

I-4MÉTHODES D'ÉVALUATIONS DES ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNES

I-4-1 Méthode par diffusion

La méthode par diffusion comprend deux types :

- ❖ La méthode de diffusion à partir des disques imprégnés
- ❖ La méthode de diffusion à partir des puits

a) Méthode de diffusion à partir des disques imprégnés :

Cette méthode est bien normalisée et a fait l'objet de nombreuses évaluations. Elle est recommandée par plusieurs organismes officiels comme méthode de référence. Elle peut comporter des modifications donnant lieu à plusieurs variantes dont la plus utilisée est la méthode de Kirdi- Bauer modifiée.

- **Principe de la méthode**

On dispose de disques de papier imprégnés d'antibiotique sur de la gélose uniformémentensemencée avec le germe à tester. Un gradient de concentration de l'antibiotique se forme par diffusion à partir du disque et la croissance du germe est inhibée à une distance du disque qui est liée, entre autres facteurs, à la sensibilité du germe.

- **Réactifs**

Le milieu de culture utilisé est celui de Mueller-Hinton² préparé conformément aux recommandations du fabricant. Les disques imprégnés d'antibiotiques sont disponibles dans le commerce. Ils doivent avoir le diamètre et l'activité appropriés.

Réalisation de l'antibiogramme

La gélose coulée dans les boîtes de pétri doit avoir une épaisseur de 4mm.

Les boîtes destinées à un usage immédiat sont séchées pendant 10 à 30 minutes dans une étuve.

Puis dans l'ordre, on procède aux opérations suivantes :

- ✓ ensemer le milieu en l'inondant avec l'inoculum ;
- ✓ aspirer l'excès de l'inoculum et laisser sécher les boîtes de pétri à température ambiante ;
- ✓ disposer les disques d'antibiotiques dans les boîtes ensemencées à l'aide d'un distributeur de disque ou d'une paire de pinces stérile.
- ✓ mettre les boîtes de pétri dans une étuve à 37°C pendant 18 heures.

- **Lecture de l'antibiogramme**

La limite de la zone d'inhibition s'apprécie à l'œil nu et correspond à l'endroit où la croissance bactérienne commence.

Les germes testés sont classés en «résistants», «intermédiaires» et «sensibles» selon l'importance de la zone d'inhibition produite.

L'interprétation des dimensions de la zone d'inhibition se fait soit :

- ✓ A l'aide d'un diagramme de référence superposable aux zones d'inhibition ;
- ✓ Par mesure directe à l'aide d'une règle ; lorsque les dimensions de la zone sont interprétées en fonction des diamètres critiques données dans un tableau.

Les diagrammes de référence et les tableaux servant à l'interprétation sont fournis par des structures habilitées reconnues par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

b) Méthode de diffusion à partir des puits

Elle repose sur le même principe que la méthode des disques. Elle consiste à réaliser des puits de profondeur dans l'épaisseur de la gélose.

Après ensemencement et séchage des boîtes de pétri, les puits sont comblés avec la solution d'antibiotique. Les semences sont mises à incuber à 37°C pendant 24 heures, mais souvent des résultats satisfaisants peuvent être obtenus dès la sixième heure.

Le principe de la lecture et de l'interprétation des résultats est le même que celui de la méthode des disques imprégnés.

I-4-2 Méthode de dilution en milieu liquide

Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé titré au contact d'extraits de concentrations croissantes selon une progression géométrique de raison 2. Selon que la dilution des extraits est réalisée dans une série de tubes ou de cupules sur microplaque contenant du bouillon nutritif, on aura respectivement une macro méthode de dilution et une micro méthode de dilution. L'inoculum bactérien est distribué dans chaque tube contenant l'extrait. Un tube dépourvu d'extrait sert de témoin de croissance. Après incubation, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est indiquée par le tube qui contient la plus faible concentration en extrait et où aucune croissance n'est visible (Cos *et al.* 2006).

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

II-1 CADRE DE L'ÉTUDE

Notre étude s'est déroulée au sein du Laboratoire de Chimie Médicinale de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I et du Centre de Biologie Moléculaire de Ngoussou.

Les opérations d'extraction et de screening chimique ont été menées au Laboratoire de Chimie Médicinale de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I.

Quant aux tests bactériologiques, ils ont été réalisés au Centre de Biologie Moléculaire (BMC) de Ngoussou.

II-2 MATÉRIEL

II-2-1 Support biologique

Cinq souches bactériennes à Gram négatifs incluant trois souches de références (ATCC) et deux isolats cliniques multirésistants ont servi de support biologique. Ces souches appartenant à différentes espèces bactériennes proviennent du Laboratoire de l'Unité Mixte de Recherche (UMR) de l'Université de la Méditerranée en France. Elles sont réparties comme suit :

- *Escherichia coli* (ATCC8739)
- *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048)
- *Klebsiella pneumoniae* (ATCC11296)
- *Enterobacter cloacae* (K2)
- *Enterobacter* BM/67

II-2-2 Matériel végétal

Les tiges d'*Allexis cauliflora* ont été collectées à 09 h le 07 juin 2014 à Bidou, localité située à 20 km de la ville de Kribi dans la Région du Sud Cameroun et identifiée par M. NANA de l'Herbier National du Cameroun (Yaoundé) où un spécimen a été déposé sous le numéro HNC/18374.

II-2-3 Matériels pour les tests bactériologiques

Le matériel utilisé pour les tests bactériologiques comprend :

- Le Mueller Hinton Broth (MHB : Scharlau Chimie S.A ; Barcelona, Spain) : c'est le milieu de culture utilisé pour la réalisation des antibiogrammes.
- Le Mueller Hinton Agar (MHA : Scharlau Chimie S.A ; Barcelona, Spain) pour l'activation et la conservation des bactéries
- L'eau distillée stérile
- Consommables :
 - ✓ Boîtes de pétri
 - ✓ Tubes à essai en verre 15 ml
 - ✓ Tube en plastiques 2 ml
 - ✓ Embouts pour micropipettes
 - ✓ Plaques de microtitration à 96 puits
 - ✓ Un révélateur : la résazurine
 - ✓ Un milieu physiologique stérile (NaCl 0,9%)
- Un agent antibactérien de référence : la Ciprofloxacine. Elle est utilisée habituellement dans le traitement des infections bactériennes et elle agit en inhibant la synthèse protéique de la bactérie.

II-2-4 Matériels et réactifs pour l'extraction et le screening chimique

- Evaporateur rotatif (type BUCHI)
- Coton
- Verrerie
- Plaques pour CCM (gel de silice)
- Solution d'éthanol à 95%
- Solution de chlorure ferrique à 3%
- Centrifugeuse (type 4225 centrifuge)
- Solution d'acide sulfurique à 2%.
- Réactif de caractérisation des groupes chimiques :
 - ✓ Trichloromethane
 - ✓ Anhydride acétique
 - ✓ Réactif de Molish (solution d' α naphthol)
 - ✓ Réactif de Mayer (solution iodo-mercurate de potassium)
 - ✓ Réactif de Dragendorff (solution iodo-bismuthite de potassium)

- ✓ Copeaux de magnésium
- ✓ Trichlorure de fer
- ✓ Eau distillée
- ✓ Acide chlorhydrique

II-3 MÉTHODOLOGIE

II-3-1 CHIMIE

II-3-1-1 Préparation de l'extrait

a) Essai d'extraction organique par macération

Les tiges d'*Allexis cauliflora* récoltées ont été séchées à l'air libre, à l'abri du soleil avant d'être broyées à l'aide d'un moulin. La poudre ainsi obtenue a servi aux différentes opérations d'extraction. Avant l'extraction proprement dite, des essais d'extraction ont été préalablement réalisés dans cinq solvants (hexane, acétate d'éthyle, chlorure de méthylène, méthanol, éthanol) afin de déterminer le meilleur solvant d'extraction. Pour cela, 10ml des différents solvants ont été mesurés et introduits dans les flacons contenant chacun 1g de poudre végétale. Ces flacons ont été agités et fermés hermétiquement. Après quarante huit heures, le mélange a été filtré sur papier Wattman, et le filtrat concentré à l'évaporateur rotatif. L'extrait a été porté à l'étuve pour évaporation totale du solvant. Les différents extraits ont subi une chromatographie sur couche mince (CCM) de gel de silice et le chromatogramme obtenu à l'issue de ces opérations a été interprété.



Figure 4: Montage d'une CCM

b) Extraction proprement dite

1770 g de poudre des tiges ont été macérés dans 6 L d'éthanol pendant 3 jours. Le mélange a subi la même procédure que précédemment et l'extrait à l'éthanol a été obtenu.

Le protocole d'extraction est représenté à la figure 5 ci-dessous :

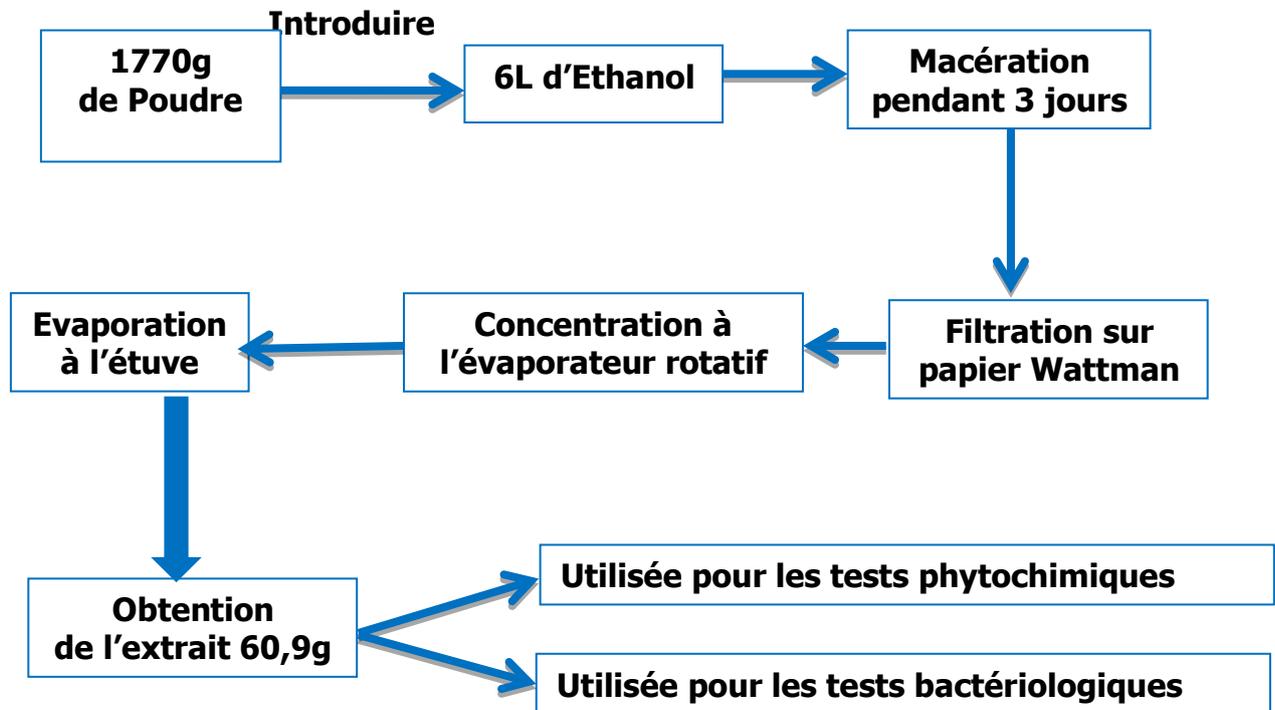


Figure 5: Protocole d'extraction par l'éthanol de la poudre des tiges d'*Allexis cauliflora*



Figure 6: Evaporateur rotatif

Le rendement d'extraction a été calculé d'après la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \frac{\text{masse de l'extrait obtenu (g)}}{\text{masse de poudre initiale (g)}} \times 100$$

Une partie de cet extrait va subir les tests phytochimiques et une autre partie va être utilisée pour les tests bactériologiques.

II-3-1-2 Le screening phytochimique de l'extrait

Le screening phytochimique permet de déterminer les différentes classes de métabolites secondaires que contient l'extrait dans le but d'ébaucher des hypothèses quant au comportement de l'extrait au cours des tests bactériologiques.

a) Test des tannins

Un mélange de 50mg d'extrait de plante et de 5ml d'eau a été chauffé dans un bain-marie à 70°C pendant 3 minutes puis 2 ml de FeCl₃ à 3 % ont été ajoutés. La présence des tannins se décèlerait par la présence d'une coloration verte foncée (Segelman *et al.* 1969).

b) Test des lipides

Trois gouttes d'extrait aqueux de plantes ont été déposés sur le papier filtre qui par la suite ont été séchés. La présence des tâches translucides sur le papier traduirait la présence des lipides (Rajaram *et al.* 2013).

c) Test de Libermann-Buchard (tri terpènes et stérols)

50 mg d'extrait de tiges de plante ont été dissouts dans 20ml de chlorure de méthylène. Quatre gouttes d'anhydride acétique ont été ajoutées dans une solution suivies de quatre gouttes d'acide sulfurique. La présence des triterpènes est reconnue par l'apparition de la couleur rouge violacée tandis que la couleur bleue verdâtre indiquerait celle des stérols (Harbone 1976).

d) Test des flavonoïdes

50 mg d'extrait de plante ont été dissouts dans 5ml de méthanol ; après ajout de quelques copeaux de magnésium, les gouttes de HCl concentré ont été introduit à 3ml de la solution, la présence des flavonoïdes se manifesterait par un changement de coloration avec effervescence qui peut être rouge brique ou violette (Harbone 1976).

e) Test des phénols

50 mg d'extrait de tige ont été dissouts dans le méthanol. Ensuite 3 gouttes de chlorure ferrique à 5 % fraîchement préparé ont été ajoutées. L'observation de la coloration bleue ou violette marquerait la présence des phénols (Odebeyi & Sofowora 1978).

f) Test des saponines

50mg d'extrait ont été mélangés dans un tube contenant 5ml d'eau distillée au bain marie bouillant pendant 5 minutes, puis rigoureusement agité. La présence d'une mousse de plus de 1cm d'épaisseur qui persiste pendant au moins une minute traduirait la présence des saponines (Salehi *et al.* 1992).

g) Test de Molish (sucres)

Dans un tube, 50 mg d'extrait ont été dissouts dans une solution contenant du naphthol. Ensuite quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ont été coulées sur la paroi du tube à essai. L'apparition d'un anneau violacé à l'interphase révélerait la présence des sucres (Odebeyi & Sofowora 1978).

h) Test des alcaloïdes

50 mg d'extrait ont été dilués dans 10ml d'acide sulfurique 2 %. Le mélange a été homogénéisé et porté à ébullition pendant deux minutes, puis filtré. A 1 ml du filtrat, cinq gouttes du réactif de Meyer ont été ajoutés. La coloration orangée traduirait la présence des alcaloïdes (Salehi *et al.* 1992).

II-3-2 BACTÉRIOLOGIE

II-3-2-1 :Test de sensibilité des germes aux extraits végétaux

Ce test a pour but de connaître les extraits inhibant la croissance des différents germes étudiés. On pourra alors établir la relation concentration-activité de ces extraits et déterminer leur concentration minimale inhibitrice (CMI).

II-3-2-2 Réalisation de l'antibiogramme : relation concentration-activité

La relation concentration-activité est étudiée pour chaque extrait végétal actif vis-à-vis d'un germe.

II-3-2-2-1 Culture des souches bactériennes

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries sur milieu gélose MHA coulé dans les boîtes de pétri. Les boîtes de pétri ont été introduites dans l'incubateur (précision) à 37°C pendant 18 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées. Les colonies isolées ont servi à la préparation de l'inoculum.

II-3-2-2-2 Préparation de l'inoculum

A l'aide d'une anse de platine stérile, quelques colonies de bactéries de chaque souche ont été prélevées du milieu d'activation et introduites chacune dans un tube contenant une solution physiologique stérile (NaCl 0,9%). Le contenu de chaque tube a été homogénéisé à l'aide d'un vortex afin d'obtenir une turbidité comparable à l'échelle standard de 0,5 de McFarland correspondant ainsi à la concentration de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml. Ensuite, 147µL de la suspension résultante ont été prélevés et introduits dans 10853 µL de MHB pour un volume 11000 ml d'un milieu inoculé à $2 \cdot 10^6$ UFC/ml.

II-3-2-2-3 Préparation de la solution mère de l'extrait éthanolique et de l'antibiotique de référence

8 mg d'extrait a été dissouts dans un volume d'eau distillée de 200 μ L de façon à obtenir une solution stock d'extrait de concentration 10000 μ g/ml. Cette solution a été diluée dans le milieu de culture stérile (MHB), de façon à avoir une concentration de 2000 μ g/ml. On réalise une gamme de concentration croissante de 500 μ g/ml à 3.9 μ g/ml sur chaque plaque de microtitration. L'antibiogramme est réalisé avec cette série de concentration, chaque puits recevant 100 μ L d'une concentration donnée. Pour ce qui est de la Ciprofloxacine, 8 mg a été dissoute dans le DMSO de manière à obtenir 2500 μ g/ ml de solution stock qui sera diluée dans le milieu pour avoir une solution de 40 μ g/ml.

II-3-2-2-4 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La méthode de microdilution a été utilisée à cet effet selon le protocole décrit par **Newton *et al.* 2002**. A l'aide d'une micropipette, 100 μ L de bouillon de culture (MHB) ont été repartis dans chaque puits des plaques de microtitration de 96 puits. Ensuite, 100 μ L de solution d'extrait préparée ont été ajoutées dans le premier puits de chaque colonne et des dilutions séquentielles et successives variant selon une progression géométrique de raison 2 ont été effectuées. Le même procédé a été utilisé pour la Ciprofloxacine qui a servit de contrôle positif. Certains puits contenant la souche et le milieu de culture ont servi de contrôle négatif. Un volume de 100 μ L d'inoculum bactérien a été introduit dans tous les puits, ce qui a permis d'obtenir un volume final de 200 μ L par puits, avec une concentration finale d'inoculum de 1.10^6 UFC/ml.

Les plaques ont ensuite été recouvertes à l'aide d'un couvercle à microplaque puis déposés dans l'incubateur à 37°C pendant 18 heures.

Après 18 heures d'incubation, les plaques ont été observées à l'œil nu dans le but de noter les différentes CMI. La procédure est illustrée sur la figure ci-dessous :

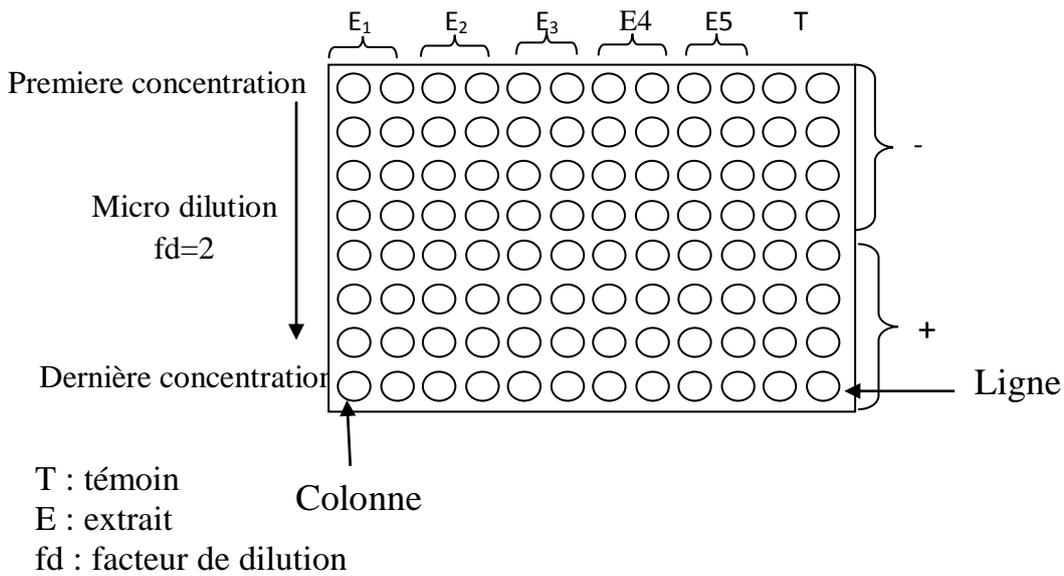


Figure 7: Illustration de l'utilisation d'une plaque de microtitration pour la détermination des CMI des différents extraits

Révélation à la résazurine

La révélation a été faite par la méthode colorimétrique utilisant la résazurine. On observe que les puits contenant une solution de coloration orangée indiquent que les bactéries sont viables et dans les puits ayant une solution de coloration bleue les bactéries sont mortes et dont la plus petite concentration pour laquelle on n'observe pas de pousses bactériennes est appelée CMI. Selon Aligiannis *et al.* (2001), la classification sur la CMI se présente comme suit : forte inhibition (CMI inférieure à 500 µg/ml), inhibition modérée (CMI entre 600µg/ml et 1500µg/ml), faible inhibition (CMI supérieure à 1600µg/ml).

CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION

III-1 RÉSULTATS

III-1-1 Étude phytochimique

III-1-1-1-Résultats des essais d'extraction

La figure 8 présente le chromatogramme montrant la migration des différents composés contenus dans les tiges d'*Allexis cauliflora*.

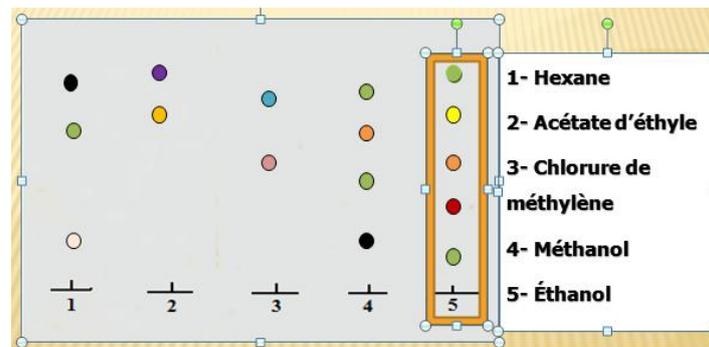


Figure 8: Chromatogramme de l'extrait des tiges d'*Allexis cauliflora*

Après analyse de ce chromatogramme, nous avons constaté que l'éthanol pur est le solvant qui extrait le plus grand nombre de composés dans la plante. Donc l'extraction de la tige d'*Allexis cauliflora* a été faite à l'éthanol et le rendement d'extraction a été calculé.

III-1-1-2 Rendement de l'extraction

L'extraction à l'éthanol a été réalisée sur la poudre des tiges d'*Allexis cauliflora*. Le rendement d'extraction a été déterminé et consigné dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Rendement de l'extraction

Extrait éthanolique	
Quantité de poudre utilisée (g)	1770
Quantité d'extrait sec (g)	60,9
Rendement (%)	3,44

Une partie de l'extrait a été soumis aux tests phytochimiques.

III-1-1-3 Criblage phytochimique

Les tests phytochimiques effectués avec l'extrait éthanolique ont mis en évidence plusieurs groupes de composés chimiques. Tableau 2

Tableau 2: Tests phytochimiques de l'extrait éthanolique des tiges d'*Allexis cauliflora*.

Composés	Extrait éthanolique
Triterpènes	+
Stérols	+
Phénols	+
Flavonoïdes	+++
Saponines	++
Tannins	+++
Lipides	++
Sucres	+
Alcaloïdes	-

+++ = présence forte,

++ = Présence moyenne

+ = présence faible,

- = absence

L'extrait a également subi les tests antibactériens sur cinq souches bactériennes multirésistantes, et la Ciprofloxacine a été utilisée comme produit de référence.

III-1-2 Essais antibactériens

III-1-2-1 Évaluation des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

Les CMI ont été obtenus à partir d'une dilution (gradient 2) de la solution mère de l'extrait éthanolique qui s'est montré actif sur les souches microbiennes (tableau 3 et 4)

Tableau 3: Effet de l'extrait éthanolique sur la croissance bactérienne à différentes concentrations

Germes	Dilution minimales inhibitrices du macéré et concentrations correspondantes en µg/ml							
	1/1 (500)	1/2 (250)	1/4 (125)	1/8 (62,5)	1/16 (31,25)	1/32 15,62	1/64 7,81	1/128 3,90
<i>Enterobacter</i> BM/67	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. Coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Enterobacteraerogenes</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Enterobactercloacae</i>	-	-	-	+	+	+	+	+

Le signe – correspond à une absence de croissance visible à l'œil

Le signe + correspond à une présence de croissance visible à l'œil

La figure 9 présente les résultats des tests de sensibilité dans une plaque de microtitration après révélation à la résazurine



Figure 9: Plaque de microtitration après révélation à la résazurine

Sur cette plaque de microtitration, on observe que les puits contenant une solution de coloration orangée indique que les bactéries sont viables et dans les puits ayant une solution de coloration bleu, les bactéries sont mortes et dont la plus petite concentration pour laquelle on n'observe pas de pousses bactériennes est appelée CMI.

Les valeurs de CMI déterminées pour chacun des germes testés sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4: Concentration minimale inhibitrice de l'extrait éthanolique

	<i>Enterobacter</i> BM/67	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter</i> <i>aérogènes</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
CMI (µg/ml)	62,5	125	125	62,5	125
Dilution	1/8	1/4	1/4	1/8	1/4

III-1-2-2 Étude de la sensibilité des bactéries à l'antibiotique de référence : antibiogramme.

La Ciprofloxacine utilisée comme produit de référence se caractérise par sa forte activité inhibitrice de croissance sur les germes testés, laquelle est matérialisée par des CMI moins importantes comparativement à celles obtenues avec l'extrait éthanolique.

Tableau 5: Activité de la Ciprofloxacine sur les 5 souches bactériennes

	<i>Enterobacter BM/67</i>	<i>E. Coli</i>	<i>Enterobacter aéroènes</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
CMI ($\mu\text{g/ml}$)	0,15	0,15	0,15	0,62	0,31
Dilution	1/64	1/64	1/64	1/16	1/32

III-2 DISCUSSION

L'extraction à l'éthanol des tiges d'*Allexis cauliflora* a permis d'obtenir 60,9 g d'extrait, soit un rendement de 3,44% ; ce résultat traduit la pauvreté de cette plante en métabolites secondaires.

Les tests de caractérisation effectués au moyen de réactifs spécifiques sur l'extrait éthanolique ont permis d'identifier plusieurs groupes de principes chimiques tels que les tannins, les stérols et les triterpènes les stérols, les saponines et les flavonoïdes qui sont particulièrement important en pharmacologie et partant en thérapeutique (Bose *et al.* 1963). L'activité antimicrobienne de l'extrait étant toujours attribuée aux molécules bioactives présentes dans la plante (Gordana *et al.* 2007).

Les essais pharmacologiques antimicrobiens effectués dans le cadre de la présente étude ont mis en évidence une inhibition de l'extrait éthanolique des tiges d'*Allexis cauliflora* (Violaceae) sur les cinq microorganismes testés. Ce résultat s'expliquerait par le fait que les composés bioactifs présents dans l'extrait étaient suffisamment concentrés pour inhiber la croissance de ces bactéries. Les valeurs des CMI ont variées de 62,5µg/ml à 125µg/ml. Ce résultat corrobore la classification de Aligiannis *et al.* (2001) selon laquelle un extrait a une forte inhibition des souches lorsque sa CMI est inférieure à 500µg/ml. Les souches les plus sensibles ont été celle qui présentait les CMI les plus basses. Il s'agit de *Enterobacter* BM/67 et *klebsiella pneumoniae* avec des CMI de 62,5µg/ml suivie par *Escherichia Coli*, *Enterobacter aerogenes* et *Enterobacter cloacae* avec des CMI de 125µg/ml.

L'antibiogramme réalisé avec l'extrait éthanolique testé contre les souches bactériennes étudiées montre un profil antibactérien très faible par rapport à celui observé avec l'antibiotique de référence (Ciprofloxacine) si l'on en juge par les CMI, ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'extrait est un mélange de composés alors que la Ciprofloxacine est par définition une molécule purifiée.

**CHAPITRE IV: IMPLICATION DU SUJET SUR LE
SYSTÈME ÉDUCATIF**

IV-1 Définition de quelques concepts

La pédagogie : est l'art d'enseigner où c'est les méthodes d'enseignement propres à une discipline donnée, à une matière, à un ordre d'enseignement ou à une philosophie de l'éducation. De ce fait, les études pédagogiques vont prendre en compte l'enseignant, les savoirs et les élèves.

La didactique : est la science qui étudie et propose des principes et des méthodes d'enseignement-apprentissage sans s'occuper du contenu.

La didactique des disciplines s'intéresse à l'enseignement et à l'apprentissage des contenus disciplinaires (biologie, français, mathématiques, etc.). Elle a pour vocation d'étudier les processus de transmission et d'appropriation des connaissances d'une discipline donnée, en vue de l'améliorer. Elle étudie ainsi les conditions dans lesquelles les sujets apprennent ou n'apprennent pas, en portant une attention particulière aux problèmes spécifiques que soulèvent le contenu des savoirs et savoir-faire dont l'acquisition est visée dans une discipline donnée (**Vergnaud, 1992**).

IV-2 Objectif de la didactique des disciplines

L'objet de la didactique va donc être d'analyser ces processus d'apprentissage et l'on peut dire qu'en dégagant, à partir d'une analyse du travail, ce qui fait problème du point de vue de la formation, la didactique peut contribuer à identifier des situations formatives dans le travail, et au delà, à reconstruire, par transposition, des situations de référence pour l'enseignement telles que certaines notions abordées en classe de troisième

Par la suite nous vous présenterons une fiche de préparation d'une leçon de SVT, classe de troisième.

IV-3 Fiche tabulaire de préparation d'une leçon de SVT

Pour la préparation d'une fiche, l'enseignant aura besoin des connaissances nécessaires à la compréhension de la nouvelle notion ou pré-requis, savoir si la notion a déjà été vue dans les classes inférieures, déterminer l'intérêt de la séance d'apprentissage et recenser le matériel et les outils pédagogiques.

FICHE PÉDAGOGIQUE DE PRÉPARATION D'UNE LEÇON DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Établissement : Lycée Bilingue de Mendong

Domaine : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Thème II : Le monde microbien

Chapitre : L'aide au système immunitaire

Titre de la leçon : La lutte contre les maladies microbiennes : les méthodes curatives par antibiothérapie

Date : Mardi, le 05 Avril 2016

Enseignant : GOUNOU GHEMKAM Roméo Xavier

Classe : 3^{ème}

Effectifs : G : F :

Période: 12h20 – 13h15

Durée: 55mins

OPO : À la fin de cette leçon, chaque élève de la classe de 3^{ème} doit être capable de :

- relever les modes d'action des antibiotiques
- expliquer le principe de l'antibiothérapie

Etapes	O.P.O.I.	Contenus spécifiques aux OPOI	Matériels ou supports didactiques	Activités d'enseignement/apprentissage	Evaluation de l'atteinte des OPOI	Durée
INTRODUCTION	1) Etablir le contrat professeur-élèves	Titre : La lutte contre les maladies microbiennes : les méthodes curatives par antibiothérapie OPO : -relever les modes d'actions des antibiotiques - expliquer le principe de l'antibiothérapie	Livre programme Classe de 3 ^{ème}	Écriture du titre de la leçon au tableau et communication de l'OPOI Prise des notes par les apprenants		15 min
	2) Vérifier les pré-requis	On distingue deux moyens de lutte contre l'infection : les moyens préventifs et les moyens curatifs	Cours et apprentissage précédents	Brainstorming Remediation si possible	Quels sont les deux moyens de lutte contre l'infection ?	
	3) Déterminer l'intérêt de la séance d'apprentissage	Expliquer le choix d'un antibiotique dans le traitement d'une maladie microbienne	Vécu quotidien	Quel peut être l'intérêt pour une personne d'étudier cette leçon ?		
	4) Identifier le(s) problème(s) à résoudre	Quel est l'effet des antibiotiques sur les infections bactériennes ?	Livre de SVT3 ^{ème} ; collection Planète vivante. P 119 Document 6 : une culture bactérienne et son antibiogramme	Présentation du document par l'enseignant Observation, lecture et formulation de problèmes scientifiques	Qu'est ce que vous observez dans cette boîte ? Quelle est sa composition ?	

D E V E L O P P E M E N T	relever les modes d'action des antibiotiques	<p>I-Modes d'action des antibiotiques</p> <p>Les antibiotiques peuvent avoir une action bactériostatique (empêchent la multiplication des bactéries) car ils arrêtent la fabrication des enzymes et protéines des microbes, bactériolytique (dissolvent les bactéries), bactéricide (tue la bactérie). La pénicilline fut le premier antibiotique découvert par Fleming en 1928.</p>	Livre de SVT 3 ^e Collection Bord bleu. P 146	Observent la planche et répondent aux questions	Quels sont les mécanismes d'actions des antibiotiques contre les bactéries ?	2 5 m in
	Expliquer le principe de l'antibiothérapie	<p>II-Réalisation de l'antibiogramme</p> <p>Le choix d'un antibiotique nécessite la réalisation d'un antibiogramme qui permet de déterminer l'antibiotique le plus efficace contre la souche bactérienne donnée.</p> <p>Sur une culture d'une souche bactérienne, plusieurs pastilles imprégnées chacune d'un antibiotique différent ont été déposées. Les auréoles se développent plus ou moins autour de chaque pastille. L'antibiotique qui a la plus grande auréole est le plus efficace.</p>	Livre de SVT 3 ^{ème} , Collection planète vivante P119 figure 6	Brainstorming	Comment reconnaît-on l'antibiotique le plus efficace ?	

CONCLUSION		<p>On appelle antibiotique toutes substances naturelles fabriqués par un micro-organisme ou en laboratoire pour détruire ou empêcher la multiplication des bactéries.</p> <p>Un antibiogramme permet la recherche efficace d'un antibiotique pour chaque microbe. L'ensemble des microbes qu'un antibiotique peut détruire ou neutraliser est son spectre d'action.</p>		<p>Pose les questions de l'évaluation sommative</p>	<p>Qu'appelle-t-on antibiotique ?</p> <p>Qu'est qu'un antibiogramme ?</p>	<p>10min</p>
-------------------	--	---	--	---	---	---------------------

Bibliographie :

- Livre programme classe de 3^{ème}
- Livre de SVT 3^{ème}; Collection planète vivante P 119
- Livre de SVT 3^{ème}; Collection Bord Bleu P 146

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Allexis cauliflora est un arbuste appartenant à la famille des violacées. C'est une plante utilisée en pharmacopée traditionnelle, mais elle a fait l'objet de peu d'investigations, surtout sur le plan pharmacologique. Cependant, on reconnaît à la plante une activité anti-inflammatoire. Notre travail a consisté en l'étude des propriétés antibactériennes de l'extrait éthanolique brut des tiges d'*Allexis cauliflora*. Il en ressort que :

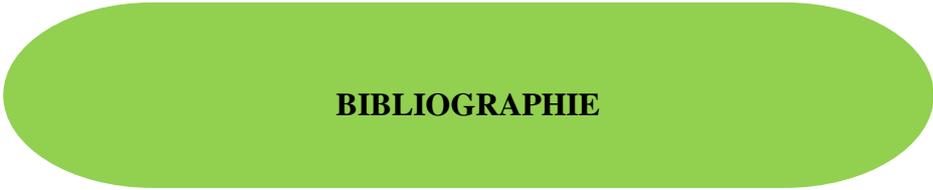
Le criblage phytochimique a démontré la richesse de cette plante en substances naturelles potentiellement intéressantes pour ses propriétés antibactériennes.

La mise en évidence effective d'un pouvoir antibactérien aux tiges d'*Allexis cauliflora* vient étendre la sphère d'action pharmacologique de cette plante du patrimoine médico-traditionnel du Sud Cameroun. Nos résultats apportent une confirmation quant à l'existence de propriétés antimicrobiennes de plus en plus reconnues à certaines espèces d'intérêt médical de notre pays.

PERSPECTIVES

Au plan des perspectives, certains aspects des résultats acquis commandent une investigation plus poussée ; il s'agit entre autres :

- D'étendre le choix des germes à tester à d'autres souches pathogènes telles que les germes antibiorésistants à l'origine de nombreux échecs de l'antibiothérapie.
- De procéder à un fractionnement de l'extrait éthanolique afin d'identifier les fractions actives qui pourront faire l'objet d'une étude toxico-pharmacologique.



BIBLIOGRAPHIE

1. Achoundong (2010). The Africa genus *Allexis*(Violaceae), a synoptic revision. 9p, p4.
2. Achoundong., OnanaJ.M. (1998). *AllexisZygomorpha* (Violaceae): une nouvelle espèce de la foret littoral du Cameroun. Bulletin, 53(4) : 1009-1010 de Kew.
3. Aligiannis N., Kalpotzakis E., Mitaku S., ChinouI.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. J. Agric. Food Chem. 40, 4168-70.
4. Amaral J. A.,Ekins A., Richards S.R., Knowles R. (1998). Effet of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. Application Environment Microbiology; 64: 520-525.
5. Barnes B.J., WiederholdN.P.,Micek S. T., Polish L. B., Ritchie D.J. (2003). *Enterobacter cloacae* ventriculitis successfully treated with cefepime and gentamicin: case report and review of the literature. Pharmacotherapy, 23 (4): 537-542
6. Baron S., Jemming P.M., Peterson J.W. (1986). Medical Microbiology, 4ed, Baron S; editions, California, 1274p, PP 256-258.
7. Benlazar N. (2014). Profils de résistance aux quinolones de souches communautaires *d'escherichia coli*, Master pharmacie, Alger 37P.
8. Bose B.C., Vijayvargiya R., Saifi A. Q., Sharma S.K (1963). Chemical and pharmacological studies on *Argemone Mexicana*. Journal of pharmaceutical sciences, 52: 1175-5
9. Brunetton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales. 3^{eme} Edition Revue et augmentée. Technique et Documentation, Lavoisier. Paris, 1120p
10. Cos P.M., SindambiweL.W.,VlietmckA.J.,BergheD.V. (2006).In Bioassays for Antibacterial and Antifungal Activities. Edited by: Mahabir P, Gupta S, Swami H, Karan V. Biological Screening of plant constituents, Training manual, International centre for science and high technology, Trieste, PP. 9-28.
11. Cowan M. M. (1999). Plants products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Review, 24 (4): 564-584.
12. Erdman W.J ., BalentineJ.T ., Harnly ., Arab L ., Beecher G ., Messina M., HollmanJ.P .,L.Keen C ., Mazza G ., Messina M ., S C Albert ., Vita J. **Williamson** G.,BurrowesJ. (2007). Flavonoids and heart: Proceeding of the ILSI Nord America flavanoids Workshop, May 31. June 1, 2005, Washington. Journal of the Nutrition; 137P
13. Flandrois J.P. (1997). Bactériologie médicale. Presses universitaires de Lyon.

14. Francine G., Patrick A.D.G. (2006). Chapitre 3.3.9 The Genus *Enterobacter*
15. Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M. (2001). Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, Botanique-Pharmacognosie-Phytothérapie-homéopathie. Technologies et Documentation (Edition), 272p.
16. Gordana S.C., Jasna M.C., Sonja M.D. (2007). Antioxydant potential, lipid peroxidation inhibition and antimicrobial activities of *Satureja montana* and *Kitaibelii* extracts. Introduction of Journal Molecular Sciences; 8: 1013-1027.
17. Harbone J.B. (1976). Phytochemical methods. A guide of modern techniques of plants analysis. Chapman and Hall, London, p150
18. Hutchinson J., Dalziel J.M. (1954). Flora of West Tropical Africa. 2^e édition. Crown Agents for overseas, London, pp 264-28.
19. Keita R.M. (2002). Etude de l'activité antifongique et antioxydant de quatorze plantes utilisées dans le traitement traditionnel des infections sexuellement transmissibles. Thèse pharmacie, Bamako, 107 P
20. Lahouel M. (2005). Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'Université Mentouri de Constantine
21. Lavigne J.P (2007). Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes,
22. Lega I. (2010). Evaluation des propriétés antibactériennes, *In Vitro*, d'extrait de feuilles d'*Argémone Mexicana* L (Papaveraceae). 76 P
23. Lune H.I., Lee J., Zee O.P., Chung J.H. (2005). Un isoflavonoïde glycosidique de *Viola hondoensis* W. Becker et H. Boissieu (Violaceae), et son effet sur l'expression de la matrice métalloprotéinase-1 causée par le rayonnement ultraviolet dans les fibroblastes de peau humaine cultivés. Biologie Pharmacologie Bulletin, 28 : 1123-1125. Doi : 10, 1248/bpb.28.1123.
24. Macheix J.J., Fleuriot A., Jay-Allemand C (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Edition presses Polytechnologiques et universitaires romandes P 4-5.
25. Ministère de la Santé/Cameroun. Annuaire Statistique 2008. Yaoundé : le Ministère, juin 2009
26. Newton S. M., Lau C., Gurcha S.S., Besra G.S., Wright C.W. (2002). The evaluation of forty three plant species for *in vitro* antimycobacterial activities; isolation of active

- constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria Canadensis*. Journal of Ethnopharmacology, 79: 57-67.
27. Nganso Y.O., Ngantchou W.I., Nkwengoua E., Nyasse B., Denier C.; Hannaert V., Schneider B. (2011). Antitrypanosomal and Cytotoxic Activities of 22-Hydroxycyclosterol, a new sterol from *Allexis cauliflora*. Scientia Pharmaceutica, 79, 137-144.
 28. Odebiyi O., Sofowora E.A. (1978). Phytochemical screening. Nigeria medicinal plants. L.Loydia, **41**: 41-234
 29. Piquenal G (2008). Les flavanoides (en ligne): [http://www. Detoursante. Com/ index. Php?](http://www.Detoursante.Com/index.Php?)
 30. Rajaram S.S., Ashvin G.G. (2013). Asian Journal of Plant Science and Research, 3(1): 21-25
 31. Rameau J.C., Dume G. (2008). Flore forestière française, Forêt privée française, p795
 32. Rodolphe-E.S., Vincent V. S., Murielle F., Daniel J. (2002). Botanique systématique des plantes à fleurs, PPUR, p256.
 33. Salehi-Surmaghi M.H., Aynehchi Y., Amin G.H., Mahhmoodi Z. (1992). DARU, 2:1-11.
 34. Sarni-Manchado P., Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Edition Lavoisier P 2-10
 35. Segelman A.B., Fransworth N.R., Quimbi M.D (1969). Lloydia, 32: 52-58
 36. Shan B., Cai., Brooks J.D., Corde H. (2007). The In Vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts, international Journal Food microbiology, 117: 112-9
 37. Singleton P., Sainsbury D. (1990). Bactériologie. Masson Paris Milan Barcelon Mexico, Pp 10-105
 38. Sinon L. (2001). Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne des extraits des feuilles de *Dichrostachys Cinerea*. Thèse pharmacie, Ouagadougou 100P.
 39. Stewart M., Bartholomew B., Currie F., Abbi D.K. (2000). Pyranoisoflavone from *rinorea welwischii*, Fitoterapia, **71**: 595-597
 40. Takeo O., Masato K., Keiko S., Rika O., Junko M., 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 Antibiotic, **57**: 518-527
 41. Tchana E. S., Fankam A.G., Mbaveng A.T., Nkwengoua T. E., Seukep J. A., Tchouani F. K., Nyassé B., and Kuete V. (2014). Activities of *Pentaclethra macrophylla*,

- Entada africana*, *Entada abyssinica* and other Selected Medicinal Plants against Multi-Drug Resistant Gram-negative Bacteria. African Health Sciences, 14(1).
42. Upreti K.K., Das M.K.S.K. (1991). Biochemical toxicology of Argemone oil. Effect on hepatic cytochrome P- 450 and Xenobiotic metabolizing enzymes. Journal Application Toxicologie; 11(3): 203-9.
43. VandenB.D.A and VlietlinckA.J. (1991) Screening methods for antibacterial and antiviral agent from higher plants. Academie Press, 6: 47-58.
44. VinckenJ.P., Heng L., De Groot A., Gruppen H. (2007). Review Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry 68, 275-297
45. Wollgast J., Anklam E. (2000). Review on Polyphenols in Theobromacacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Research International 33, 423-447.
46. Zeghad N. (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus Vulgaris*, *Rosmarinus Officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne 130 P

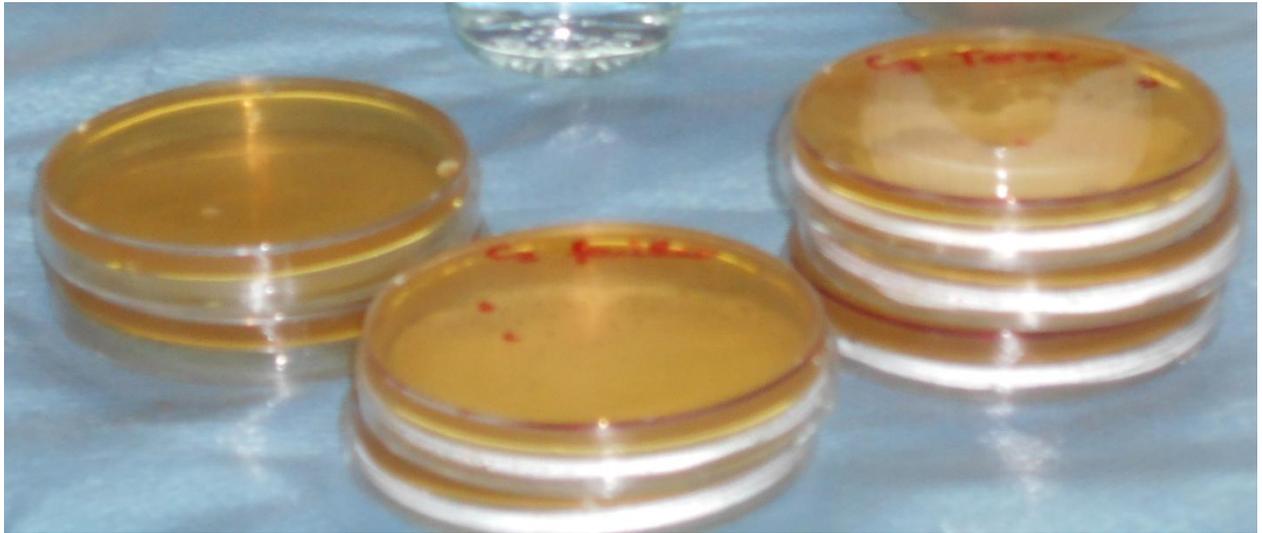
Sites internet

47. [https:// fr.wikipedia.org](https://fr.wikipedia.org) consulté le 14 novembre 2015 à 17h25min.
48. <https://naty.infirmiere.files.wordpress.com>, consulté le 14 novembre 2015 à 18h03min.



ANNEXES

Annexe 1 : Boîtes de pétri contenant des cultures bactériennes



Annexe 2 : Structure de l'antibiotique de référence : la Ciprofloxacine

