

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I  
ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
HIGHER TEACHERS' TRAINING  
COLLEGE

**DÉPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES**  
*DEPARTMENT OF BIOLOGICAL SCIENCES*

**ÉVALUATION *IN VITRO* DE L'ACTIVITÉ  
ANTIMICROBIENNE DE QUELQUES PLANTES  
MÉDICINALES CAMEROUNAISES ET ÉTUDE DE  
LA CINÉTIQUE D'ACTIVITÉ DE QUELQUES  
ANTIBIOTIQUES USUELS VIS-À-VIS DES  
ISOLATS CLINIQUES DE *HELICOBACTER  
PYLORI***

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

*Par :*

**WANGNAMOU MARCEL**

Matricule: **10Q0699**

Licencié ès-Sciences

**Option: BIOLOGIE DES ORGANISMES ANIMAUX**

*Sous la direction de:*

**Dr. KOUITCHEU MABEKU Laure Brigitte**

*Chargé de cours*

*Université de Dschang*

*Année académique 2015/2016*

# DÉDICACE

*À la mémoire de mon père de regretté mémoire **GOBAISSOU Paul**  
et à ma mère **GASSIDA Pauline***

# REMERCIEMENTS

Je rends grâce à Dieu le Père Tout Puissant de m'avoir suivi durant toute ma formation.

J'adresse mes sincères remerciements:

- Au Dr. KOUTICHEU MABEKU Épse KOUAM Laure Brigitte, Chargée de cours à l'Université de Dschang, pour son encadrement scientifique, pour la confiance qu'elle m'a accordée durant ce travail, surtout pour sa patience et sa rigueur qui ont rendu ce travail possible.
- Au Pr. TAMESSE Joseph Lebel, pour le suivi permanent et l'intérêt particulier qu'il a toujours porté à la réalisation de ce mémoire. Qu'il trouve à travers ce travail un motif de satisfaction.
- Au Chef de Département des Sciences Biologiques de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé, le Pr. SONKÉ Bonaventure, qui n'a pour souci que de faire de ses élèves des enseignants dignes et responsables.
- À tous les enseignants de l'École Normale Supérieure de Yaoundé en général et ceux du Département des Sciences Biologiques en particulier pour la patience et le dévouement dont ils ont fait preuve durant ma formation.
- Au Pr. KOUAM Jacques, qui malgré ses nombreuses occupations a œuvré pour la réalisation de ce travail.
- Au Laboratoire de Pharmacie de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de Yaoundé I sous la responsabilité du Dr. NANGA, qui a mis à ma disposition son Laboratoire pour la réalisation de ce travail. Je lui exprime toute ma gratitude.
- À M. ÉYOUM BILLÉ Bertrand, qui a été pour beaucoup dans la réalisation de mes manipulations et qui tout le temps a réussi à résoudre toutes mes difficultés scientifiques. Je lui exprime toute ma gratitude.
- À mes collaborateurs de Laboratoire AFANDA Sandrine, NOAH Célestin, SOUPGUI Franck pour l'esprit de groupe qui a pu régner entre nous durant nos travaux.
- À mes camarades de promotion en général et à NGUIME MAKOLLO Richard, NDONG Luc Désiré, NOAH NVODONO Yannick, ONANA Michel Thierry, André KLAPAI, MILAWÉ

Ange Driss, NGUIATCHUENG TOTIE Carole en particulier pour l'esprit de corps et de fraternité qui a régné durant notre formation.

- À mon défunt père M. GOBAÏSSOU PAUL. Papa je te dis merci pour tous les sacrifices que tu as consentis pour nous et surtout pour l'homme de valeur que je suis devenu. Tes conseils, ton canevas de discipline et tes exigences dans le travail bien fait ont été pour moi un chemin lumineux vers une vie paisible et honorable. Papa que la terre de nos ancêtres te soit légère.
- À Mme GOBAÏSSOU née GASSIDA PAULINE. Femme au cœur plein d'amour et travailleuse infatigable, comblant inlassablement tous ses enfants de bénédictions et de vœux de prospérités. Cependant aucun mot ne peut exprimer toute ma gratitude que je décline à ton égard. Je dis tout simplement je t'aime très chère ma Maman.
- À mes frères VROUMSIA SINAI, DJAFSIA Abel, GUIDEUNA Gilbert, DJAMSIA Paul, FISSOU BOUBA pour leurs soutiens financiers et moraux durant ma formation. Je vous exprime toute ma gratitude.
- À mes sœurs ASTA Elisabeth, DJANABA Talita, DJANGA Martine, FOULDA Jacqueline, TOUNSSOUKKA Marie-Noël, YASMINE Samira pour leurs soutiens financiers et moraux durant ma formation.
- À ma petite famille MBOULDA Marthe, LIMISSIA Marcel Dimitri.
- À ma tante FIRIDA Albertine pour son soutien moral.
- À mes amis et frères WAMALAM Germain (SISSOKO), BONGO André, TIBATI, HOLÉ Mathieu, SOUARÉ Samuel qui m'ont assisté et soutenu tant dans les temps difficiles que dans les temps de joie.
- À tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail et dont les noms ne sont pas cités. Je vous dis merci.

# TABLE DE MATIÈRE

<i>DÉDICACE</i> .....	<i>i</i>
<i>REMERCIEMENTS</i> .....	<i>ii</i>
<i>TABLE DE MATIÈRE</i> .....	<i>iv</i>
<i>ABSTRACT</i> .....	<i>vii</i>
<i>LISTE DES ABRÉVIATIONS</i> .....	<i>viii</i>
<i>LISTE DES FIGURES</i> .....	<i>ix</i>
<i>LISTE DES TABLEAUX</i> .....	<i>x</i>
<i>INTRODUCTION GÉNÉRALE</i> .....	<i>1</i>
<b><i>CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTÉRATURE</i></b> .....	<b><i>3</i></b>
<b><i>I.1. GÉNÉRALITÉS SUR <i>HELICOBACTER PYLORI</i></i></b> .....	<b><i>3</i></b>
I.1.1. Historique de la découverte de la bactérie .....	<i>3</i>
I.1.2. Caractéristiques générales .....	<i>3</i>
<b><i>I.2. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION À <i>H. PYLORI</i></i></b> .....	<b><i>9</i></b>
I.2.1. Facteurs de virulences de <i>H. pylori</i> .....	<i>9</i>
<b><i>I.3. <i>HELICOBACTER PYLORI</i> ET PATHOLOGIES GASTRO-DUODENALES</i></b> .....	<b><i>10</i></b>
I.3.1. <i>H. pylori</i> et ulcères.....	<i>10</i>
I.3.2. <i>H. pylori</i> et lymphome .....	<i>10</i>
I.3.3. <i>H. pylori</i> et cancer gastrique .....	<i>10</i>
<b><i>I.4. ÉPIDEMIOLOGIE</i></b> .....	<b><i>10</i></b>
I.4.1. Prévalence de l'infection .....	<i>11</i>
I.4.2. Mode de transmission .....	<i>11</i>
<b><i>I.5. DIAGNOSTIC DE L'INFECTION À <i>H.PYLORI</i></i></b> .....	<b><i>12</i></b>
I.5.1. Méthodes invasives (directes).....	<i>12</i>
I.5.2. Méthodes non invasives (indirectes) .....	<i>14</i>
<b><i>I.6. THÉRAPIES D'ÉRADICATION DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i></i></b> .....	<b><i>16</i></b>

I.6.1. Schémas thérapeutiques.....	16
<b>I.7. SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES.....</b>	<b>17</b>
I.7.1. Antibactériens (Antibiotiques) .....	17
I.7.2. Antimicrobiens d'origine végétale .....	21
<b>I.8. MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE IN VITRO.....</b>	<b>23</b>
I.8.1. Méthode de diffusion sur milieu solide .....	24
I.8.2. Méthode de dilution en milieu liquide.....	25
<b>I.9. CROISSANCE MICROBIENNE.....</b>	<b>25</b>
I.9.1. Dynamique de la croissance microbienne .....	25
I.9.2. Méthode de mesure de la croissance microbienne .....	27
I.9.3. Cinétique de la croissance microbienne en présence d'un antibiotique .....	27
<b>I.10. GÉNÉRALITÉS SUR LES ESPÈCES VÉGÉTALES ÉTUDIÉES.....</b>	<b>28</b>
<b>CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>30</b>
<b>II.1. MATÉRIEL .....</b>	<b>30</b>
II.1.1 Microorganismes.....	30
II.1.2. Matériel végétal.....	30
II.1.3. Matériel de laboratoire .....	30
II.1.4. Équipements et réactifs utilisés .....	31
<b>II.2. MÉTHODES.....</b>	<b>32</b>
II.2.1. Conservations des isolats cliniques .....	32
II.2.2. Évaluation <i>in vitro</i> de l'activité anti- <i>Helicobacter pylori</i> des extraits de plantes et des antibiotiques de référence .....	32
II.2.3. Étude cinétique de l'activité bactéricide .....	34
<b>II.3. Traitement des données .....</b>	<b>35</b>
<b>CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>36</b>
<b>III.1. RÉSULTATS.....</b>	<b>36</b>
III.1.1. Extraction.....	36
III.1.2. Activité antibactérienne des extraits de plantes et des antibiotiques de référence	37
III.1.2. Activité bactéricide des antibiotiques vis-à-vis de <i>Helicobacter pylori</i> .....	41

<b>III.2. DISCUSSION .....</b>	<b>43</b>
<b><i>CHAPITRE IV: IMPLICATION SUR LE SYSTÈME ÉDUCATIF DU SUJET.....</i></b>	<b>46</b>
<b>IV.1. Généralités .....</b>	<b>46</b>
<b>IV.2. Intérêt didactique .....</b>	<b>46</b>
<b><i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</i></b>	<b>52</b>
<b><i>BIBLIOGRAPHIE .....</i></b>	<b>53</b>
<b><i>ANNEXES .....</i></b>	<b>63</b>

# ABSTRACT

Bacterial infections continue to cause serious problems in the world. The search for new antimicrobial agents is of great necessity in view of the ever increasing pressure of the resistance of microorganisms against conventional antibiotics. This makes it imperative when seeking new drugs that could substitute those for which resistance phenomena have developed or restore their lost activity. It is in this context that the present study take place to evaluating the antimicrobial properties of nine Cameroonian medicinal plants against ten clinical isolates of *Helicobacter pylori* causative agent of gastroduodenal ulcers. Extracts of plant samples of the selected plants were prepared by maceration of the plant powder in ethyl acetate firstly and secondly in methanol. These were the following plants: *Afzelia africana*, *Ageratum conyzoides*, *Crossopteryx febrifuga*, *Khaya senegalensis*, *Moringa oleifera*, *Piliostigma reticulatum*, *Acacia albida*, *Azadirachta indica* and *Picralima nitida*. The antimicrobial activity of these plant extracts as well as that of Amoxicillin, Erythromycin, Metronidazole, Clarithromycin, Ciprofloxacin and Doxycycline; antibiotics used in treatment regimens for this infection were evaluated in ten clinical isolates of *Helicobacter pylori* by the microdilution method in liquid medium. Next, the kinetics of the bactericidal activity of Clarithromycin, Ciprofloxacin and Doxycycline against *Helicobacter pylori* was evaluated by counting method after culture on agar medium. Only certain methanolic plant extracts exhibited moderate antimicrobial activity compared to those extracted with ethyl acetate. The best activity anti-*Helicobacter pylori* obtained was that of methanol extracts of *Acacia albida*, *Picralima nitida* and *Azadirachta indica* against 30%, 50% and 10% of isolates tested with MIC value 256 µg/mL. However, extracts of *Afzelia africana*, *Ageratum conyzoides*, *Crossopteryx febrifuga*, *Khaya senegalensis*, *Moringa oleifera* and *Piliostigma reticulatum* showed no significant antimicrobial activity. Ciprofloxacin presented bactericidal time dependent activity contrary to that of Clarithromycin and Doxycycline was rather dependent on concentration.

**Keywords:** *antimicrobial activity, medicinal plants, Helicobacter pylori, common antibiotics, bacterial kinetics.*

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

**AE:** Acétate d'éthyle

**AINS:** Anti-inflammatoire non stéroïdiens

**BHI:** *Broth Hearth Infusion*

**CMB:** Concentration Minimale Bactéricide

**CMI:** Concentration Minimale Inhibitrice

**DMSO:** Diméthylsulfoxyde

**HNC:** Herbar National du Cameroun

***H. pylori:*** *Helicobacter pylori*

**INT:** Para-Iodonitrotétrazolium

**IPP:** Inhibiteurs de la Pompe à Proton

**M.A.L.T:** *Mucosæ Associated Lymphoid Tissue*

**MeOH:** Méthanol

**NaCl:** Chlorure de sodium

**OMS:** Organisation Mondiale de la Santé

**SRFC:** Société des Réserves Forestière du Cameroun

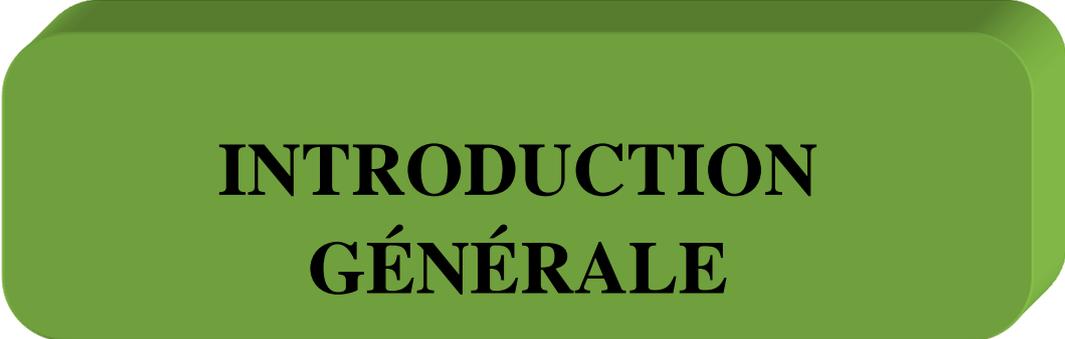
**UFC:** Unité Formant Colonie

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> <i>H. pylori</i> au microscopique électronique.....	4
<b>Figure 2.</b> Examen microscopique d'une culture après coloration de Gram. <i>H. pylori</i> apparaît sous diverses formes: bacillaire, incurvé, en U, en C ou en O.....	5
<b>Figure 3.</b> Habitat de <i>H. pylori</i> .....	6
<b>Figure 4.</b> Répartition géographique de la prévalence de l'infection à <i>H. pylori</i> dans le monde (% de la population infectée). .....	11
<b>Figure 5.</b> Test de l'uréase en milieu Urée-Indole.....	13
<b>Figure 6.</b> Aspects des colonies de <i>Helicobacter pylori</i> sur gélose Columbia au sang. ....	14
<b>Figure 7.</b> Test respiratoire à l'urée marquée. ....	15
<b>Figure 8.</b> Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide .....	26
<b>Figure 9.</b> Évolution de la croissance microbienne en présence d'antibiotique. ....	28
<b>Figure 10.</b> Cinétique de l'activité bactéricide de la Ciprofloxacine à différentes concentrations vis-à-vis de <i>Helicobacter pylori</i> . ....	41
<b>Figure 11.</b> Cinétique de l'activité bactéricide de la Clarithromycine à différentes concentrations vis-à-vis de <i>Helicobacter pylori</i> .....	42
<b>Figure 12.</b> Cinétique de l'activité bactéricide de la Doxycycline à différentes concentrations vis-à-vis de <i>Helicobacter pylori</i> . ....	43

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Autres espèces bactériennes du genre <i>Helicobacter</i> et les pathologies associées... 7	7
<b>Tableau 2.</b> Spectre et mode d'action des antibiotiques ..... 19	19
<b>Tableau 3.</b> Données générales sur les espèces végétales étudiées ..... 29	29
<b>Tableau 4.</b> Période, localité de récolte et code d'identification des plantes..... 30	30
<b>Tableau 5.</b> Les différents antibiotiques utilisés ..... 31	31
<b>Tableau 6.</b> Néphélomètre standard de Mc Farland ..... 33	33
<b>Tableau 7.</b> Rendements d'extraction et caractéristiques physiques des extraits préparés ..... 36	36
<b>Tableau 8.</b> Concentrations minimales inhibitrices ( $\mu\text{g/mL}$ ) des extraits de plantes et des antibiotiques de référence vis-à-vis des isolats cliniques de <i>Helicobacter pylori</i> ..... 38	38



**INTRODUCTION  
GÉNÉRALE**

Au Cameroun comme dans les autres pays en voie de développement, les maladies infectieuses et parasitaires constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence et de leur gravité (Bourgeois 1999).

*Helicobacter pylori* est un petit bacille (0,5 pm de diamètre sur 2 pm de longueur) de forme hélicoïdale, Gram négatif, mobile grâce à de multiples flagelles (5 à 7) entourés d'une gaine et disposés selon une ciliature polaire. L'*H. pylori* est à l'origine d'une inflammation chronique de l'estomac, c'est-à-dire d'une gastrite située dans la plupart des cas au niveau de l'antra de l'estomac et qui reste le plus souvent asymptomatique (Thomson 1997). Tous les patients infectés présentent cette gastrite antrale. La bactérie ne semble cependant pas entraîner les mêmes lésions chez tous les patients. Elle cause chez les uns des ulcères et chez les autres des lymphomes.

L'ulcère est une sorte de plaie, qui peut être superficielle ou profonde. Elle survient lorsque la couche protectrice des muqueuses se détériore à certains endroits, laissant ainsi pénétrer les acides gastriques naturels de l'estomac qui causent des lésions. L'ulcère gastrique résulte d'un déséquilibre entre les facteurs d'agression et les mécanismes de défense de la muqueuse gastrique sous l'influence de certains facteurs: alimentaires (épices, alcool, tabac), médicamenteux (salicylés, AINS); psychogènes (stress) et infectieux (*Helicobacter pylori*). L'infection à *H. pylori* est l'une des infections les plus répandues dans le monde, près de la moitié de la population mondiale est porteuse de la bactérie. Les malades sont généralement soumis à une trithérapie comportant: un antiacide (Hydroxyde d'aluminium, Sucralfate), un antisécrétoire (Cimétidine, Oméprazole) et deux antibiotiques (Metronidazole et Amoxicilline). Parfois l'élimination de *Helicobacter pylori* nécessite une combinaison de trois antibiotiques (Delaney *et al.* 2002).

Toutefois, la prévalence varie de 20 à 90% selon les pays, l'infection étant plus fréquente dans les pays en voie de développement (Leclerc 2006). Ce qui fait de cette infection un vrai problème de santé. Au Cameroun, la pathologie ulcéreuse gastrique a une prévalence de 31,65 % avec une prédominance chez les hommes (Ndjitoyap *et al.* 1990).

L'approvisionnement en médicaments modernes reste encore faible surtout en zones rurales, et les populations ont recours aux médicaments à base de plantes que leur offre les tradipraticiens (Diafouka 1997), car leur revenu n'arrive pas toujours à couvrir leurs besoins les plus élémentaires. La situation est davantage plus préoccupante à cause de l'apparition des souches de microorganismes antibiorésistants et l'émergence des infections non communes (Vanden & Vlietinck 1991) qui compromettent les traitements à l'aide des médicaments existants.

Face à ces nombreux obstacles que présente l'utilisation des antibactériens disponibles, il est indispensable de rechercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces et à large spectre d'action. Une des stratégies pour cette recherche consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle (Biyiti *et al.* 2004).

En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS 2002) estime que, pour se soigner, 80% de la population africaine recourt toujours à la médecine traditionnelle pour laquelle la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs des plantes médicinales.

Face à l'usage populaire de plus en plus croissant de plantes traditionnelles, une exploration scientifique s'avère nécessaire afin d'évaluer son effet anti-ulcérogénique et de garantir l'efficacité pour leur meilleure utilisation.

Le but du présent travail est de contribuer à la valorisation de la flore médicinale camerounaise à travers l'évaluation de l'activité antimicrobienne de neuf plantes utilisées en médecine traditionnelle camerounaise vis-à-vis des isolats cliniques de *Helicobacter pylori*. De façon plus spécifique, il s'agit de:

- Évaluer l'activité antibactérienne des extraits à l'acétate d'éthyle et au méthanol des plantes sélectionnées.
- Évaluer l'activité antibactérienne des antibiotiques usuels des schémas thérapeutiques de l'infection à *Helicobacter pylori*.
- Évaluer la cinétique de bactéricidie des antibiotiques actifs vis-à-vis de *Helicobacter pylori*.

**CHAPITRE I:**  
**REVUE DE LA LITTÉRATURE**

## **I.1. GÉNÉRALITÉS SUR *HELICOBACTER PYLORI***

### **I.1.1. Historique de la découverte de la bactérie**

A cause du pH bas qui y règne, l'estomac a longtemps été considéré comme un milieu stérile et par conséquent hostile à toute colonisation microbienne. Cette assertion était soutenue par les travaux de Palmer en 1945 qui confirmaient l'absence de spirochète au niveau de la muqueuse gastrique à partir de l'examen de 1180 biopsies, nonobstant des observations isolées et très anciennes faisant état de la présence de bactéries spiralées dans la cavité gastrique. L'activité uréasique au niveau de l'estomac a été décrite pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1924 (Luck & Seth 1924).

En 1950, deux irlandais démontrent que chez les patients présentant un ulcère gastroduodéal, l'uréase neutralise l'acidité gastrique via la production d'ammoniac (Fitzgerald & Murphy 1950). Malgré le fait qu'on ait noté la disparition de cette activité enzymatique avec un traitement antibiotique, le lien entre l'activité uréase et des bactéries n'a pu être mis en évidence qu'en 1984 (Langenberg *et al.* 1984). En 1979, la bactérie fut redécouverte par deux chercheurs australiens Barry Marshall et Robin Warren de l'hôpital «Royal de Perth» qui décrivaient la présence abondante de bactéries spiralées dans le mucus recouvrant la muqueuse gastrique de patients présentant une gastrite. La publication de leur recherche fut d'abord refusée en 1983 par la société Australienne de Gastroentérologie, mais ensuite acceptée lors du 2<sup>ème</sup> Congrès international sur les infections à *Campylobacter* (2nd International Microbiology Workshop on *Campylobacter* infections) organisée la même année. Ces mêmes chercheurs parvinrent à cultiver la bactérie spiralée à partir d'une biopsie gastrique d'un patient souffrant d'ulcère duodéal et la baptisèrent initialement *Campylobacter-like organism* (CLO) car ils pensaient que c'était une nouvelle espèce du genre *Campylobacter* (Marshall & Warren 1983). La bactérie fut ensuite appelée *Campylobacter pyloridis* (Marshall *et al.* 1984). Pour des raisons de grammaire latine, elle fut ensuite dénommée *Campylobacter pylori* (Marshall & Goodwin 1987) puis *Helicobacter pyloridis*, et enfin *Helicobacter pylori* au vue des caractéristiques morphologiques, structurelles et génétiques spécifiques à ce nouveau genre (Goodwin *et al.* 1989).

### **I.1.2. Caractéristiques générales**

#### **I.1.2.1. Taxonomie**

*H. pylori* est une bactérie de forme hélicoïdale découverte dans une zone de l'estomac proche du pylore, d'où son nom. Elle est classée dans le règne des *Bacteria*, la division

*Proteobacteria*, la classe *Epsilon proteobacteria*, l'ordre des *Campylobacterales*, la famille *Helicobacteraceae*, le genre *Helicobacter* et l'espèce *Helicobacter pylori* (Garrity *et al.* 2005).

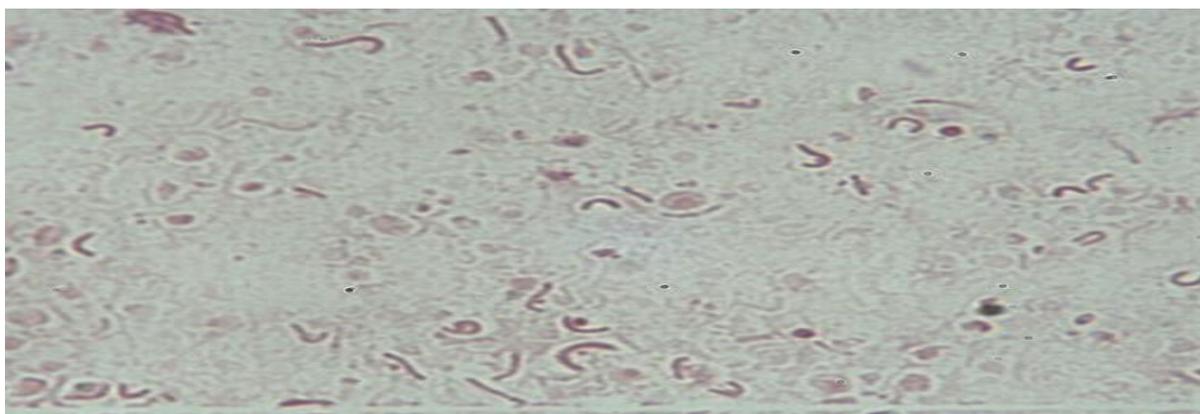
### I.1.2.2. Morphologie de *Helicobacter pylori*

*H. pylori* est un bacille à Gram négatif spiralé non sporulé. Il mesure 0,5 à 1 µm de largeur sur 2,5 à 5 µm de longueur (Goodwin *et al.* 1989). Il est très mobile grâce à la présence de 4 à 7 flagelles, gainés en ciliature lophotriche (Figure 1), qui lui permettent de se mouvoir dans le suc gastrique (Hazell *et al.* 1986). La forme hélicoïdale (d'où le nom «*Helicobacter*») lui permet de s'ancrer dans la paroi stomacale par des mouvements hydrodynamiques.



**Figure 1.** *H. pylori* au microscopique électronique. (Photo du Prof. Yutaka Tsutsumi, Université de Fujita, Japon 1989).

Après l'isolement de la bactérie par la culture *in vitro*, la morphologie peut varier entre une forme bacillaire, en U, en C ou en O (Figure 2). De plus lorsque les cultures sont vieilles, apparaissent des formes coccoïdes non viables. La bactérie peut, en effet, devenir coccoïde si elle pousse sur un milieu pauvre ou dans d'autres conditions défavorables (Van der Hulst *et al.* 1996, Kuster *et al.* 1997, Vandenbroucke-Grauls *et al.* 1999).



**Figure 2.** Examen microscopique d'une culture après coloration de Gram. *H. pylori* apparaît sous diverses formes: bacillaire, incurvé, en U, en C ou en O. (Miendje 2011).

### **I.1.2.3. Caractéristiques culturaux et biochimiques**

*H. pylori* est une bactérie micro-aérophile avec un optimum de croissance à 37°C. En effet, la bactérie est sensible à l'oxygène, à la teneur atmosphérique et requiert pour vivre une atmosphère appauvrie en oxygène. Elle requiert une concentration en O<sub>2</sub> de 3 à 6% (optimum de l'ordre de 5%) et une concentration en CO<sub>2</sub> de 6 à 10% (Goodwin *et al.* 1989). Elle possède une catalase (Hazell *et al.* 1991), une oxydase (Maier *et al.* 1996) et un superoxyde dismutase (Pesci & Pickett 1994). La bactérie synthétise également une  $\gamma$  glutamyl transférase, une leucine aminopeptidase et une phosphatase alcaline (Mégraud *et al.* 1985). Son activité enzymatique la plus caractéristique est son uréase qui lui permet de résister à l'acidité gastrique, en créant un environnement alcalin par l'hydrolyse de l'urée (Mégraud *et al.* 1985, Marshall *et al.* 1990). L'uréase est une métallo-enzyme sécrétée en quantité abondante par toutes les souches; elle représente 6 à 10% des protéines exprimées par *H. pylori* (Mobley *et al.* 1988). Les mutants non uréolytiques sont incapables de coloniser la muqueuse gastrique (Tsuda *et al.* 1994).

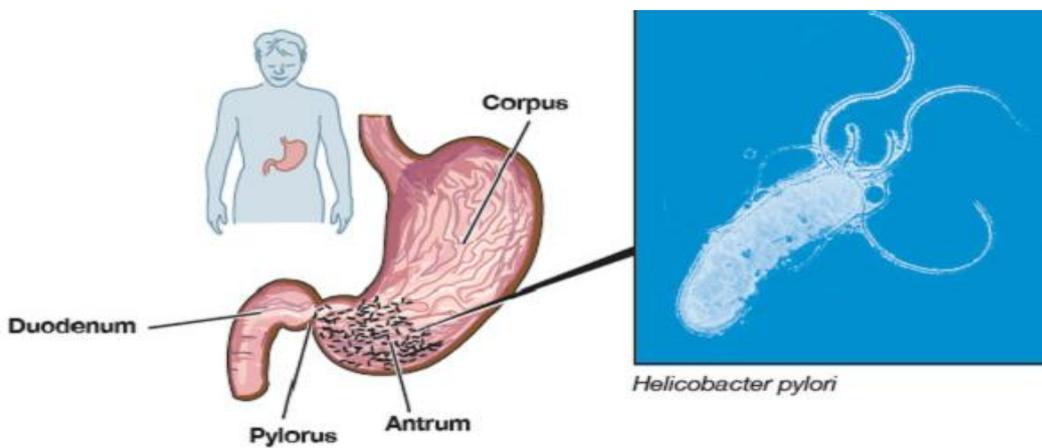
### **I.1.2.4. Caractéristiques génotypiques**

*H. pylori* est composé d'un seul chromosome circulaire dont le nombre de paires de bases varie entre 1 549 666 (HP908) et 1 667 867 (26695). Le corps du génome contient environ 1200 gènes. Le contenu en G+C (Guanine + Cytosine) de toutes ces souches est en moyenne de 39%. Néanmoins les génomes séquencés présentent des régions ayant des contenus en G+C% différents. L'une de ces régions correspond à l'îlot de pathogénicité dénommé Cag dont le contenu en G+C est de 35% (Censini *et al.* 1996). *H. pylori* est l'une des bactéries pathogènes montrant d'importantes variations génétiques entre les souches et ce particulièrement au niveau de gènes spécifiques (microdiversité) (Salama *et al.* 2000,

Gressmann *et al.* 2005, Suerbaum *et al.* 2007, Dong *et al.* 2009). La séquence génomique des différentes souches de *H. pylori* varie en fonction des régions géographiques (Falush *et al.* 2003, Linz *et al.* 2007).

### I.1.2.5. Habitat de *H. pylori*

Le réservoir naturel de *H. pylori* est l'estomac humain (Figure 3). C'est le microorganisme le plus fréquemment retrouvé dans la muqueuse gastrique humaine en association avec les cellules épithéliales. Il vit préférentiellement au niveau de l'antrum gastrique.



**Figure 3.** Habitat de *H. pylori*.

([http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2005/press.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/press.html)). Visité le 21/06/2015.

### I.1.2.6. Autres espèces du genre *Helicobacter*

Le tableau 1 ci-dessous présente les autres espèces bactériennes du genre *Helicobacter* et les pathologies associées.

**Tableau 1.** Autres espèces bactériennes du genre *Helicobacter* et les pathologies associées (www.bacteriologie.net/medicale/helicobacter.html, Pr. J-P. Euzéby). Visité le 21/ 06/ 2015

<i>Helicobacter</i> ayant un tropisme préférentiel pour l'estomac			
Espèces	Hôtes	Pouvoir pathogène	
<i>Candidatus Helicobacter suis</i>	Porcs, hommes, primates non-hominiens	Gastrites chez le porc	
<i>Helicobacter bizzozeronii</i> , <i>Helicobacter salomonis</i>	Chiens	Gastrites	
<i>Helicobacter cynogastricus</i>	Chiens	Pouvoir inconnu	pathogène
<i>Helicobacter felis</i>	Chats, chiens, guépards	Gastrites chez les carnivores	
<i>Helicobacter mustelae</i>	Furets ( <i>mustela putorius furo</i> )	Gastrites chez le furet	
<i>Helicobacter</i> ayant un tropisme préférentiel pour l'intestin et /ou le foie			
Espèces	Hôtes	Pouvoir pathogène	
<i>Helicobacter bilis</i>	Souris, rats, hamsters, gerbilles, chiens, Chats, ovins, porcs, hommes	Diarrhées sévères chez les souris co-infectées par <i>Helicobacter rodentium</i> pouvoir pathogène incertain pour les autres espèces	
<i>Helicobacter canadensis</i>	Hommes, oies (Branta canadensis, Branta leucopsis)	Diarrhées chez l'homme	

<i>Helicobacter canis</i>	Chiens, chats, hommes	Gastro-enterite chez l'homme
<i>Helicobacter cholecystus</i>	Hamsters (mesocricetus auratus)	Pancréatite centrolobulaire et cholangiofibrose.
<i>Helicobacter cinaedi</i>	Hommes, hamsters (Mesocricetus auratus) chiens, chats, renards, rhésus (Macaca mulatta)	Infections chez l'homme
<i>Helicobacter fenneliae</i>	Hommes, primates non-hominiens, chiens	Infections chez l'homme
<i>Helicobacter ganmani</i>		Infections chez les animaux de laboratoire.
<i>Helicobacter hepaticus</i>		<i>Helicobacter hepaticus</i> est responsable d'hépatite chronique active chez la souris et cette espèce est impliquée dans la survenue de cancers hépatiques.
<i>Helicobacter mastomyrinus</i>		
<i>Helicobacter muridarum</i>	Souris, rats	
<i>Helicobacter rodentium</i>		
<i>Helicobacter typhlonius</i>		
<i>Helicobacter pullorum</i>	Volailles, hommes	Hépatites vibriennes des poules pondeuses. Entérite chez l'homme
<i>Helicobacter trogontum</i>	Rats, porcs, ovins	Avortements et placentites chez les ovins.

## **I.2. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION À *H. PYLORI***

### **I.2.1. Facteurs de virulences de *H. pylori***

#### **I.2.1.1. Adaptation au milieu**

La grande mobilité et la morphologie spiralée de *H. pylori* lui permettent de traverser le mucus beaucoup mieux que les autres germes. *H. pylori* est aussi sensible que les autres bactéries à l'acidité gastrique cependant, on a montré qu'en présence d'urée, il restait viable 2 heures dans un milieu à pH 2. Cette résistance est due à sa puissante uréase qui en hydrolysant l'urée normalement présente dans l'estomac, libère de l'ammoniac qui tamponne l'acidité du milieu suffisamment longtemps pour permettre à la bactérie de gagner, à travers le mucus, les cellules muqueuses gastriques donc le pH est voisin de la neutralité (Fauchere 1994).

#### **I.2.1.2. Adhésion**

L'étude des systèmes d'adhésion d'*H. pylori* aux membranes des cellules de la muqueuse gastrique n'en est qu'à ses débuts, les bactéries colonisent préférentiellement le tissu antral ou les zones de métaplasie gastrique du duodénum. Plusieurs composés bactériens peuvent jouer le rôle de facteurs d'adhésion: des hémagglutinines, non spécifique du germe du fait de la présence de leurs récepteurs (N-acetyl-neuraminyl-Iactose) sur la plupart des cellules épithéliales. Par contre, des travaux montrent qu'une protéine de surface de 63 KDa associée à l'uréase et se fixant sur une phosphatidyl-éthanol-amine membranaire ainsi qu'une protéine de 20 KDa sont des adhésines potentielles d'*H. pylori* (Courillon-Mallet *et al.* 1994, Fauchere 1994).

#### **I.2.1.3. Persistance**

La persistance de *H. pylori* pendant de longues périodes, voire toute la vie en dépit d'une réponse humorale et générale est une énigme non résolue. L'existence de mécanismes d'échappement aux effecteurs du système immunitaire ou l'inefficacité de ces effecteurs dans l'environnement gastrique sont deux explications possibles mais non élucidées. Plusieurs mécanismes démontrant la résistance de *H. pylori* à la phagocytose et/ou à la bactéricidie ont été mis en évidence (Fauchere 1994). La perte possible de l'efficacité des phagocytes dans le milieu gastrique, cumulée aux facteurs bactériens seraient probablement les raisons de cette inefficacité phagocytaire. La diminution d'efficacité des anticorps opsonisants a été également invoquée, de même que la saturation de ces anticorps par des antigènes relargués par la bactérie ou leur destruction par des protéases bactériennes ou gastriques (Fauchere 1994).

### **I.3. HELICOBACTER PYLORI ET PATHOLOGIES GASTRO-DUODENALES**

#### **I.3.1. *H. pylori* et ulcères**

En 1983 a été mise en évidence, au niveau de la muqueuse gastrique atrophiée de la gastrite chronique de type B, une bactérie spiralée appelée *H. pylori*. On la retrouve dans l'estomac (antre, fundus, liquide gastrique) et dans les zones de métaplasie gastrique quel que soit leur site (duodénum, œsophage, diverticule de Meckel, rectum). L'infection à *H. pylori* est une cause majeure de développement d'ulcère duodéal chez l'adulte et l'enfant. La prévalence de cette infection est de 11 à 75% pour l'ulcère gastrique et de 33% à 100% des cas pour l'ulcère duodéal (Hang 1999).

#### **I.3.2. *H. pylori* et lymphome**

*H. pylori* entraîne une prolifération lympho-épithéliale de la muqueuse gastrique, celle-ci étant normalement dépourvue de follicule lymphoïde, et évoque la phase d'initiation du lymphome gastrique de type M .A.L.T" Mucosæ Associated Lymphoid Tissue" à cellule B de bas grade de malignité. Par ailleurs, l'éradication de *H. pylori* entraînerait une régression du lymphome type MALT de bas grade de malignité à cellule B dans 90 à 100 des cas (Lamoliatte 1994).

#### **I.3.3. *H. pylori* et cancer gastrique**

L'existence d'un lien entre l'infection par l'*H. pylori* et la survenue d'un cancer de l'estomac est possible comme témoigne l'existence d'une association significative entre la présence des anticorps anti-*H. pylori* et l'apparition d'un cancer gastrique. Ainsi, le risque relatif de survenue d'un cancer gastrique dans les populations infectées par *H. pylori* est de 6, et le risque de développer un cancer gastrique est élevé d'autant plus que l'infection à *H. pylori* est ancienne. En plus, *H. pylori* provoque une diminution du taux d'acide ascorbique, une hypochlorhydrie favorisant la pullulation microbienne et par conséquent la formation des nitrosamines, ensemble de facteurs incriminés dans la genèse du cancer gastrique (Dobrilla & Benvutti 1995).

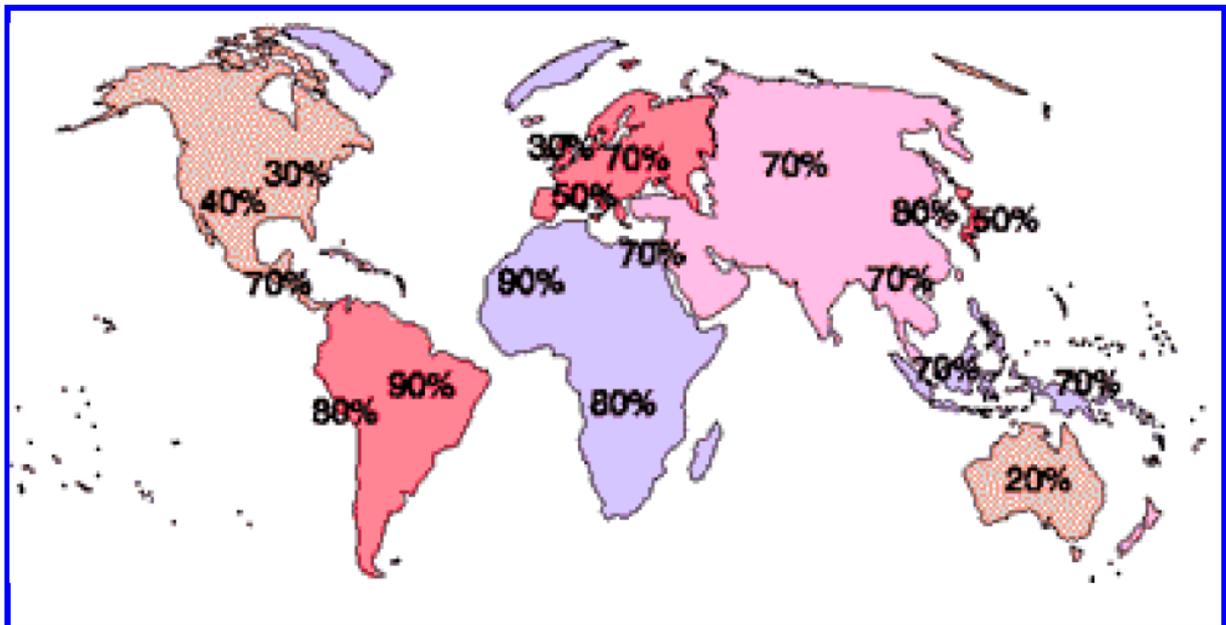
### **I.4. ÉPIDÉMIOLOGIE**

Une fois acquise l'infection à *H. pylori* éventuellement inapparente va persister plusieurs décennies et représenter pour l'individu colonisé un risque d'évolution à l'ulcère duodéal ou au cancer gastrique. Outre la connaissance théorique sur la microbiologie de la

bactérie, plusieurs raisons cliniques justifient donc que l'on s'intéresse à l'épidémiologie de l'infection à *H. pylori*. Afin de contrôler l'infection, il est en effet nécessaire lors du traitement d'un patient, d'évaluer son risque de réinfection.

#### I.4.1. Prévalence de l'infection

*H. pylori* est l'un des plus fréquents agents infectieux. À l'échelle mondiale sa prévalence est supérieure à 50% (Brown 2000). Elle dépend du taux d'acquisition, de la clearance de l'infection et de la durée entre les 2 étapes précédentes. Aussi, la prévalence de l'infection varie d'un pays à l'autre et même au sein d'un même pays, en fonction de plusieurs facteurs, entre autres, l'âge, le statut socio-économique, les appartenances ethniques et les relations interfamiliales (Brown 2000). La prévalence de l'infection est plus élevée dans les pays en développement (Vale *et al.* 2010) (Figure 4). Etre né dans un pays en développement constitue donc un facteur de risque d'infection (Kivi *et al.* 2006).



**Figure 4.** Répartition géographique de la prévalence de l'infection à *H. pylori* dans le monde (% de la population infectée). (Extrait de [www.helicobacter.com/h\\_epidemiology.html](http://www.helicobacter.com/h_epidemiology.html)). Visité le 11/ 11/ 2015.

#### I.4.2. Mode de transmission

##### I.4.2.1. Transmission par voie oro-orale

À partir de l'estomac, l'*H. pylori* peut coloniser la partie haute du tube digestif. On peut postuler que le liquide gastrique transporte les organismes viables jusqu'à l'œsophage et la bouche durant la régurgitation. L'*H. pylori* a été trouvé dans l'œsophage dans les cas de

reflux gastro-œsophagien et les patients souffrant de maladie de Barrett (Mégraud 1995). L'*H. pylori* a été cultivé à partir de la salive dans plusieurs études. Les données récentes supportent le rôle prépondérant de la transmission par la voie orale-orale (Deltenre & Koster 2000).

#### **I.4.2.2. Transmission par voie féco-orale**

Le suc gastrique est éliminé dans l'intestin mais on n'a jamais prouvé la multiplication de l'*H. pylori* dans les selles. L'*H. pylori* est sensible à la bile acide ce qui pourrait être la cause de sa destruction dans les intestins. Il souffrirait aussi de la compétition des autres micro-organismes des intestins (Mégraud 1995). Même si on mettait de côté la question de son transit, la survie dans l'environnement extérieur devrait être nécessaire pour permettre cette transmission par les aliments, par l'eau ou même par contact direct (transmission fécale-orale entre personne sans réservoir environnemental intermédiaire).

### **I.5. DIAGNOSTIC DE L'INFECTION À *H.PYLORI***

Les méthodes de recherche de *H. pylori* sont classées en «invasives» ou «non invasives» selon qu'elles nécessitent ou non une fibroscopie gastroduodénale.

#### **I.5.1. Méthodes invasives (directes)**

##### **I.5.1.1. Test rapide à l'uréase**

Ce test est basé sur la puissante activité uréasique produite par *H. pylori*. Pour le réaliser, la biopsie gastrique est placée dans un milieu contenant de l'urée (Figure 5). Suite à la production d'ammonium associée à l'activité de l'uréase, un changement de pH est mis en évidence par le virage colorimétrique d'un indicateur de pH. Les avantages du test rapide à l'uréase sont sa simplicité, son faible coût et sa facilité d'exécution. Il s'effectue facilement dans une salle d'endoscopie. La positivité de ce test peut être suffisante pour démarrer le traitement (Malfertheiner *et al.* 2007). C'est ainsi qu'il occupe une place de choix dans le diagnostic de l'infection à *H. pylori* dans les pays en développement.



**Figure 5.** Test de l'uréase en milieu Urée-Indole. (Malferttheiner *et al.* 2007)

### **I.5.1.2. Examen bactériologique standard**

#### **I.5.1.2.1. Frottis colorés**

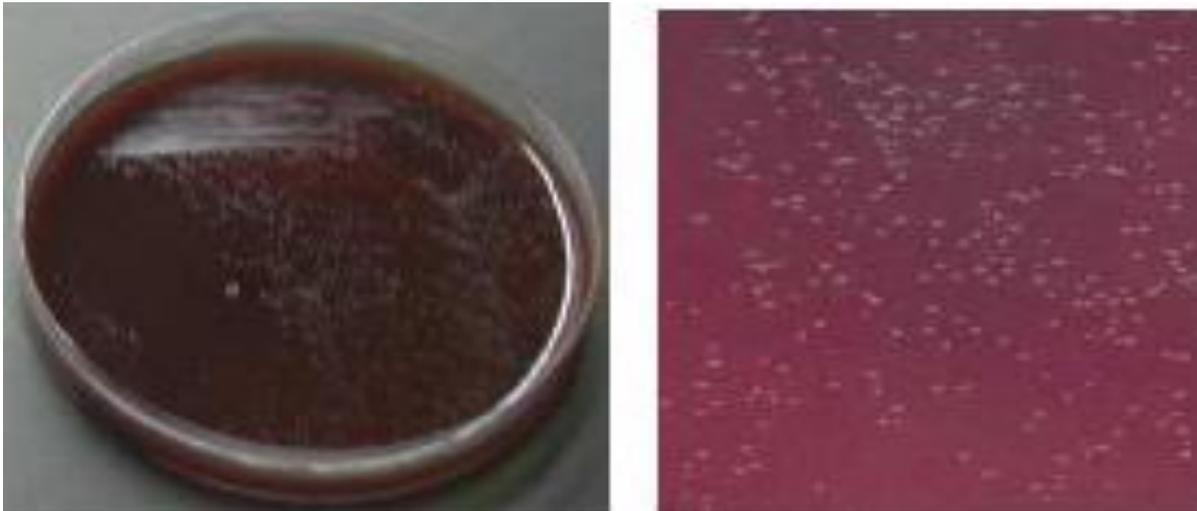
Cet examen comporte la recherche des bactéries spiralées sur un frottis coloré, par la méthode de Gram. Le frottis est préparé en frottant une biopsie, côté mucus sur une lame porte-objet. Après coloration de Gram, les bactéries incurvées ou spiralées apparaissent. Cette méthode peut être combinée à la culture, mais elle implique l'obtention d'une biopsie supplémentaire. La présence de formes coccoïdes doit être vérifiée par un test immunologique ou par la coloration à l'acridine orange (Glupczynski 1994).

#### **I.5.1.2.2. Culture bactérienne**

Collection et transport des échantillons: Il n'y a pas de consensus quant au nombre d'échantillons de biopsie gastriques à réserver pour la culture. Néanmoins, vu la distribution inégale de *H. pylori* au niveau de l'estomac plus le nombre d'échantillons sera élevé, plus grandes seront les chances de détection de *H. pylori* (Bayerdorffer *et al.* 1989). Il est souhaitable d'avoir au minimum un échantillon de l'antrum et un du fundus. Généralement, les biopsies sont transportées dans une gélose semi-solide. Elles peuvent être conservées réfrigérées pendant 24 heures. Au-delà, il est préférable de les congeler à  $-70^{\circ}\text{C}$  ou dans de l'azote liquide (Heep *et al.* 1999).

Ensemencement: La biopsie broyée est ensemencée sur des milieux gélosés frais conservés dans des boîtes fermées à  $4^{\circ}\text{C}$  pour maintenir l'humidité et éviter l'exposition à la lumière. La plupart de milieux gélosés (Columbia, Wilkins-Chalgren) peuvent être utilisés, néanmoins l'ajout de sang ou de sérum (5 à 10%) est indispensable pour la croissance de *H. pylori* (Figure 6). Les principaux antimicrobiens utilisés pour rendre les milieux sélectifs sont la vancomycine pour inhiber les cocci à Gram positif; la polymyxine, l'acide nalidixique, la colistine, le triméthoprime ou la cefsulodine pour inhiber les bacilles à Gram négatif, et enfin

de la nystatine ou l'amphotéricine B pour inhiber les champignons (Mégraud & Lehours 2007).



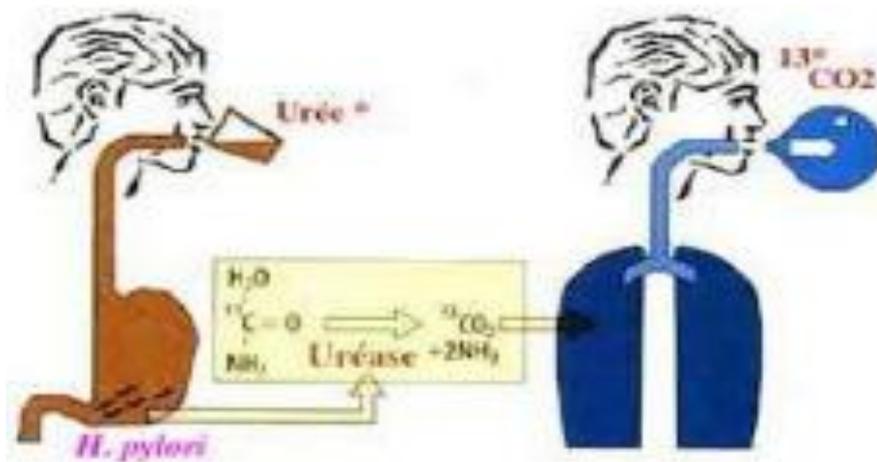
**Figure 6.** Aspects des colonies de *Helicobacter pylori* sur gélose Columbia au sang. (Heep *et al.* 1999).

### **I.5.2. Méthodes non invasives (indirectes)**

Les méthodes indirectes ont l'avantage de ne pas nécessiter d'endoscopie et d'être des méthodes dites « globales », c'est-à-dire qui explorent la totalité de la muqueuse gastrique. Elles sont sensibles et spécifiques et permettent un suivi de l'infection. Cependant, elles ne permettent pas l'isolement des bactéries.

#### **I.5.2.1. Test respiratoire à l'urée marquée**

Cette méthode consiste à mettre en évidence l'activité uréasique de la bactérie en faisant ingérer au patient de l'urée marquée au  $^{13}\text{C}$  (isotope non radioactif), puis à détecter le  $\text{CO}_2$  marqué dans l'air expiré. Le  $^{13}\text{CO}_2$  doit alors être dosé par spectrographie de masse. Si la bactérie est présente dans l'estomac, l'urée se scinde et libère le carbone 13 (ou 12) qui passe dans le sang puis les poumons et se retrouve dans l'air expiré. Ce test, fiable à plus de 98 %, présente l'avantage de rechercher la présence de la bactérie dans la totalité de l'estomac. (Figure 7)



**Figure 7.** Test respiratoire à l'urée marquée. (Graham *et al*, 1987)

### I.5.2.2. Sérologie

C'est une méthode simple et très accessible qui consiste en la recherche des anticorps anti-*H. pylori* dans le sang par des techniques de type ELISA ou Western Blot. La persistance, parfois prolongée, des anticorps dirigés contre *H. pylori*, ne permet pas de distinguer une infection encore active d'une infection asymptomatique. La sensibilité et la spécificité varient de 71 à 95%, selon les kits commercialisés (Mégraud & Lehours 2007). Son usage est prépondérant dans des études épidémiologiques.

### I.5.2.3. Recherche des antigènes fécaux

Basée sur l'élimination de *H. pylori* par les selles, cette méthode de diagnostic a été proposée en 1998 (Makristathis *et al*. 1998). La recherche d'antigène spécifique de *H. pylori* s'effectue sur selles fraîches ou conservées à basse température ou même congelées à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Différents kits sont proposés à cet effet; ceux utilisant les anticorps monoclonaux offrent de meilleurs résultats (Blanco *et al*. 2008). En pratique, ce test peut servir au diagnostic primaire de l'infection mais s'avère surtout utile pour le contrôle de l'efficacité du traitement d'éradication. Assez pratique en pédiatrie, il pourrait être utilisé comme alternative au test respiratoire pour le contrôle d'éradication (Malfertheiner *et al*. 2007).

## I.6. THÉRAPIES D'ÉRADICATION DE *HELICOBACTER PYLORI*

### I.6.1. Schémas thérapeutiques

#### I.6.1.1. Traitement de première ligne

Le traitement classique consiste en une triple thérapie (7 à 14 jours) associant deux (02) antibiotiques (clarithromycine + amoxicilline ou clarithromycine + métronidazole) à un IPP (Inhibiteurs de pompes à protons) à double dose pour neutraliser l'acidité gastrique (Malfertheiner *et al.* 2007). Dans ces conditions, la bactérie n'est éradiquée que dans environ 70% de cas (Graham *et al.* 2007).

- **Clarithromycine**, reste le macrolide le plus utilisé pour la thérapie anti-*H. pylori*. Les macrolides inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien, notamment au niveau de l'ARN ribosomal (ARNr) 23S.

- **Amoxicilline**, c'est une aminopénicilline (betalactamines) dont la structure résulte de l'addition d'un groupe amino à la benzylpénicilline. Elle inhibe la synthèse du peptidoglycane, constituant de la paroi bactérienne en s'attaquant aux protéines liant les pénicillines (PLP). Très peu de souches de *H. pylori* sont résistantes à l'amoxicilline, d'où son usage fréquent dans les associations.

- **Métronidazole**, il appartient à la famille des 5-nitroimidazolés. C'est l'addition de la fonction nitro en position 5 qui leur confère l'activité antibactérienne, spécifiquement sur les bactéries anaérobies ainsi que sur certaines espèces microaérophiles dont *H. pylori*. Il agit par inhibition de synthèse de l'ADN bactérien. L'activité du métronidazole n'est pas influencée par le pH. Il est sécrété de façon active dans la lumière gastrique.

#### I.6.1.2. Traitement de deuxième ligne

Les schémas thérapeutiques proposés en 2<sup>ème</sup> ligne sont:

- La quadri-thérapie (10 à 14 jours) incluant le Bismuth: IPP + Sels de Bismuth + tétracycline + métronidazole. Le taux d'éradication est de l'ordre de 85% (Fischbach *et al.* 2004);

- des thérapies incluant les nouvelles générations de fluoroquinolones (lévofloxacine, moxifloxacine), généralement associées à l'amoxicilline et un IPP. Ce schéma devient fortement limité par l'accroissement rapide de la résistance aux quinolones (Miendje *et al.* 2010);

•des schémas incluant les rifamycines (rifampicine, rifabutine) ou la furazolidone ont également été proposés (Malfertheiner *et al.* 2007).

**-Sels de Bismuth:** Ils ont un effet antibactérien par inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne. En outre, ils alcalinisent le milieu (accroissent le contenu en ions  $\text{HCO}_3^-$  au niveau de la muqueuse gastrique), ce qui potentialise l'effet des antibiotiques auxquels ils sont associés.

**-Tétracyclines,** inhibent la synthèse des protéines bactérienne en se liant à la sous unité 30S du ribosome où elle bloque la fixation de l'aminoacyl-ARNt résultant en la synthèse d'un peptide tronqué. Les molécules utilisées sont la tétracycline et la doxycycline.

**-Rifamycines** (rifampicine, rifabutine) qui inhibent la synthèse de l'ARN bactérien par blocage de la synthèse de la sous unité B de l'ARN polymérase ADN dépendante codée par le gène *rpoB*.

**-Furazolidone,** dérivé du nitrofurane, étudiée dès les années 90 pour son activité anti-*H. pylori* (Xiao *et al.* 1990).

### **I.6.1.3. Traitement de troisième ligne**

L'adaptation de la thérapie en fonction de l'antibiogramme est indispensable en cas d'échec d'éradication. Une stratégie thérapeutique basée sur les tests de sensibilité serait plus efficace, préserverait le capital thérapeutique, limiterait la sélection des mutants résistants et serait probablement moins coûteuse (Malfertheiner *et al.* 2007).

## **I.7. SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES**

### **I.7.1. Antibactériens (Antibiotiques)**

Les antibiotiques sont des substances chimiques, qui empêchent la multiplication des bactéries. Ils ont une toxicité sélectivement dirigée contre les bactéries (cellules procaryotes), mais cette toxicité existe aussi, bien que moindre, pour les cellules de l'organisme humain (cellules eucaryotes); ils exercent leur action en des points précis (cibles) de certaines des chaînes métaboliques des bactéries; ils provoquent leurs effets à faibles concentration (mg/L) et relativement lentement (heures). Les antibiotiques sont répartis en familles qui réunissent les molécules qui ont une structure chimique de base identique et possèdent un même mécanisme d'action antibactérien. Les antibiotiques d'une même famille peuvent se différencier par leur spectre d'activité; ils sont alors réunis par groupes de spectre identique

quelquefois subdivisés en sous-groupes. Les antibiotiques d'un même groupe ou d'un même sous-groupe peuvent différer par leurs propriétés pharmaco-cinétiques.

#### **I.7.1.1. Modalité d'action des antibiotiques**

L'effet antibactérien d'un antibiotique sur une souche bactérienne est apprécié sur la courbe de croissance de la population bactérienne de cette souche bactérienne. L'action d'un antibiotique sur la population de bactéries d'une souche bactérienne se manifeste pour une concentration déterminée, par un effet antibactérien qui peut être soit nul, soit une bactériostase, soit une bactéricidie. Un effet antibactérien nul ne provoque aucun changement de la croissance bactérienne.

La bactériostase consiste en un ralentissement de la croissance de la population bactérienne pouvant aller jusqu'à une absence de croissance. L'effet (ou activité) bactériostatique d'un antibiotique sur la population d'une souche bactérienne est indiquée par la détermination de la mesure de la CMI (concentration minimale inhibitrice). Cette CMI entraîne un ralentissement de la croissance de la population bactérienne tel qu'il atteint une absence de croissance.

La CMI est définie comme la plus faible concentration d'un antibiotique donné capable d'interrompre, dans un milieu et à des conditions parfaitement définis, toute croissance visible d'une souche bactérienne donnée.

La bactéricidie consiste en la destruction d'une partie de la population bactérienne d'une souche bactérienne. L'effet (ou activité) bactéricide d'un antibiotique sur une souche bactérienne est indiquée par la détermination de la mesure de la CMB (concentration minimale bactéricide).

La CMB d'un antibiotique pour une souche bactérienne donnée est définie comme la plus faible concentration de cet antibiotique permettant une réduction du nombre de survivants de la population de cette souche au moins égale à  $10^4$  bactéries/ml d'un inoculum de  $10^6$  bactéries/ml (soit 100 survivants/mL sur 1.000.000 bactériesensemencées/mL c'est à dire 1 survivants sur 10.000 bactéries de l'inoculum) après 18h de culture à 37°C de cette souche en présence de l'antibiotique.

L'activité bactéricide d'un antibiotique peut être dépendante du temps (antibiotiques bactéricides temps dépendant) ou être dépendante de la concentration (antibiotiques bactéricides concentration dépendant).

L'effet post-antibiotique est l'effet antibactérien observé après suppression du contact de la population bactérienne avec l'antibiotique.

La tolérance est un état acquis par une partie de la population d'une même souche bactérienne dans lequel un antibiotique réputé bactéricide reste bactériostatique mais perd son effet bactéricide.

### I.7.1.2. Sites d'action et propriétés d'activité des antibiotiques

Un antibiotique ne peut être actif que si ses molécules atteignent leur cible. (Tableau 2)

**Tableau 2.** Spectre et mode d'action des antibiotiques

Antibiotique	Cible	Effet	Spectre d'action.	Mode d'action
<b>Béta-lactames</b> pénicillines, ampicilline, amoxicilline <b>Céphalosporines</b> céfépime céfalexine <b>Carbapénèmes</b> méropénème <b>Monobactames</b> Aztréoname	<b>Paroi</b>	Bactéricide	Cocci Gram+/- Bacilles G+ Large spectre  Large spectre  Bacilles Gram+	Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne par inhibition de l'activité de la transpeptidase (Larvigne 2007).
Polymixines	<b>Membrane</b>	Bactéricide	Bacille Gram-	Lyse de la membrane cytoplasmique en détruisant l'organisation de la bicouche phospholipidique (Bonfiglio & Furneri 2001).
Gramicidine, tyrocidine		Bactéricide	Bacille Gram+	

<b>cyclines:</b> tétracycline, doxycycline	<b>Ribosome</b>	Bactériostatique	Large	Inhibent la synthèse protéique en agissant sur la sous unité 30S des ribosomes (Prescott 2004).
<b>Aminoglycosides</b> : gentamicine, streptomycine, kanamycine		Bactéricide	Large, sauf les streptocoques et les anaérobies	
<b>Phénicolés:</b> chloramphénicol		Bactériostatique	Large	
<b>Macrolides:</b> érythromycine		Bactériostatique	Cocci Gram+/- Bacilles G+	
Synergistines		Bactéricide	Inactif sur les entérobactéries	
<b>Lincosamides:</b> lincomycine, Clindamycine		Bactéricide	et <i>Pseudomonas</i> .	
<b>Acide fusidique</b>		/	Staphylocoques	
Novobiocine	<b>Acides nucléiques</b>	Bactéricide		Bloque la réplication de l'ADN
Nitrofuranes		/	Large	
Nitroimidazolés.		/	Bactéries anaérobies	
<b>Quinolones :</b> ciprofloxacine, acide nalidixique		Bactéricide	Gram-, sauf <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Inhibent la synthèse de l'ADN en se fixant sur l'ADN-ADN gyrase (Collet <i>et al.</i> 1996).
<b>Rifamycine</b>		Bactéricide	Large	Bloque la transcription par liaison à la sous unité $\beta$ de l'ARN polymérase (Prescott 2004)

<b>Sulfamides:</b> <b>Trimetroprime</b> bactrim ptéroate	<b>Synthèse de l'acide folique</b>	Bactériostatique	Large	Inhibe la synthèse de l'acide tétrahydrofolique, cofacteur de la synthèse de bases azotées par action sur l'ARN polymérase (Prescott 2004)
--	------------------------------------	------------------	-------	--

## **I.7.2. Antimicrobiens d'origine végétale**

Une plante est dite médicinale lorsqu'au moins une de ses parties possède une ou plusieurs propriété(s) médicamenteuse(s) (Akoka & Akoka 1972). Plusieurs travaux ont été réalisés sur des plantes en vue de rechercher des substances antimicrobiennes (Saïka *et al.* 2001, Kuate 2007, Kuete *et al.* 2008). Pour cela, il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent dans l'organisme contre les microorganismes. Différentes classes de molécules sont ainsi trouvées et présentent des activités biologiques variées (Kuete 2010).

### **I.7.2.1. Alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées d'origine végétale, à caractère alcalin, et doués d'importantes activités pharmacologiques (Bruneton 1999). Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité. L'action sur le système nerveux peut aller jusqu'à une action antispasmodique, et mydriatique, anesthésique locale et narcotique. Les alcaloïdes sont aussi doués d'activité parasitaire suite à leur action sur l'ADN (Cowan 1999).

### **I.7.2.2. Composés phénoliques et polyphénols**

Un composé est dit phénolique lorsqu'il possède un hydroxyle lié à un noyau aromatique. Un polyphénol quant à lui est un composé qui possède plusieurs hydroxyles phénoliques. Les composés phénoliques exercent une activité antimicrobienne grâce à leur action inhibitrice sur les enzymes (Cowan 1999).

### **I.7.2.3. Composés terpéniques et stéroïdiques**

Ils sont élaborés à partir des mêmes précurseurs (mévalonate) et constituent le plus vaste ensemble connu des métabolites secondaires des végétaux. Tous les terpènes et stéroïdes peuvent être considérés comme formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta

carbonés ramifiés du 2-méthylbutadiène. Très peu d'entre eux ont des propriétés thérapeutiques comparativement aux composés phénoliques (Kuetze 2010). Néanmoins certains présentent des activités antifongiques et antibactériennes (Cowan 1999).

#### **I.7.2.4. Coumarines**

Elles sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide P-coumarique. Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. Elles ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituants. En lumière ultra-violette, les CCM présentent des tâches dont la coloration varie du bleu au pourpre en passant par le jaune.

Les coumarines sont cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives; elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées. L'odeur de foin fraîchement coupé de la coumarine est très utilisée en parfumerie. Elles sont aussi utilisées dans les produits cosmétiques. Les coumarines de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et certaines comme l'imperatorine et l'heraclenol sont des antimicrobiens (Widelski *et al.* 2009).

#### **I.7.2.5. Flavonoïdes**

Les flavonoïdes constituent l'un des groupes de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle et des caroténoïdes). Ce n'est que depuis quelques années que certaines propriétés pharmacologiques ont été mises en évidence et que leur étude a pris un nouvel essor. Les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-cancéreuses (Madhavi *et al.* 1996).

#### **I.7.2.6. Quinones**

Les quinones sont des composés qui régénèrent les radicaux libres pouvant se complexer irréversiblement avec les macromolécules telles que les acides nucléiques et les protéines (Stern *et al.* 1996).

### **I.7.2.7. Saponines**

C'est un groupe important de glycosides, largement distribué dans les plantes supérieures. Elles sont considérées responsables de nombreuses propriétés pharmacologiques (Sparg *et al.* 2004). Les saponines constituent une importante classe de métabolites secondaires d'origine végétale et animale, de masse moléculaire entre 600 à 2000 Daltons et de structure complexe. Les saponines ont aussi été recherchées par l'industrie pharmaceutique parce qu'elles forment le point de départ de l'hémi-synthèse des médicaments stéroïdiens.

### **I.7.2.8. Tannins**

Les tannins sont des phénols associés à un sucre capables de précipiter les protéines et la gélatine (Stern *et al.* 1996). On peut en outre les utiliser en cas d'empoisonnement par des alcaloïdes, car ils les précipitent et les rendent inoffensifs (sauf pour la morphine, la cocaïne et la nicotine). En cas de surdose, l'excès de tannins libère à nouveau la substance toxique et cause une deuxième inflammation. Les tannins ont des effets astringents, très utiles quand il y a trop de sécrétions (les bronchites, les diarrhées, les leucorrhées, les plaies saignantes). Ce sont de très grands antihémorragiques antiseptiques. Ils dessèchent et peuvent entraîner des lésions de la muqueuse gastrique et intestinale mais aussi ils peuvent blesser les reins (Scalbert 1991).

## **I.8. MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE *IN VITRO***

Les paramètres quantitatifs de base de l'activité *in vitro* des antibiotiques sont la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB). La CMI est la plus faible concentration de l'antibiotique qui empêche toute croissance visible alors que la CMB est la plus faible concentration d'antibiotiques qui en un temps donné tue 99,9 % des bactéries de l'inoculum original.

Plusieurs méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne ont été élaborées. Le choix de la méthode à utiliser dépend des paramètres recherchés, de la nature de la substance à tester et de celle du microorganisme. On peut donc distinguer:

### **I.8.1. Méthode de diffusion sur milieu solide**

C'est une méthode généralement utilisée pour la recherche préliminaire de l'activité d'une substance. Elle est rapide et facile à réaliser (Smith-Palmer *et al.* 1998). Elle comprend plusieurs techniques:

#### **I.8.1.1. Technique de diffusion sur disque de papier**

Les disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé ensemencé avec une suspension de bactéries ( $10^6$  UFC /mL) en phase exponentielle de croissance. L'antibiotique diffuse dans la gélose, sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration). Après incubation, on observe autour du disque une zone d'inhibition de la croissance bactérienne pour les germes sensibles. On mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne dans deux directions perpendiculaires et on retient la moyenne. On pourra en déduire la valeur approchée de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée (Berche *et al.* 1988).

#### **I.8.1.2. Technique de diffusion par puits**

C'est une méthode semblable à la méthode des disques à la seule différence qu'ici les disques de papier sont remplacés par des puits creusés dans la gélose dans lesquels sont déposés des volumes précis d'antibactérien est introduit dans chaque puits. Après incubation les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés autour des puits (Vanden & Vlietinck 1991).

#### **I.8.1.3. Technique de diffusion de l'E-test**

Un autre test de détermination de la CMI dit E-test connaît actuellement un essor considérable. Il est caractérisé par sa facilité et sa rapidité de réalisation, et sa précision dans la détermination de la CMI. Son principal inconvénient est son coût élevé (Amhis *et al.* 2001). Une bandelette (5x50 mm) imprégnée d'un gradient d'antibiotique est déposée à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture de la souche à étudier. Après incubation, cette bandelette s'entoure d'une zone d'inhibition ellipsoïdale (d'où le nom E-test). La zone de contact entre la pousse bactérienne et la bandelette indique la CMI.

## I.8.2. Méthode de dilution en milieu liquide

La dilution est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée avec des tubes (macro dilution) ou avec des plaques de 24 ou de 96 puits (microdilution). L'on distribue dans une série de tubes stériles (ou dans les capsules d'une plaque), un même volume d'antibiotique de concentrations décroissantes. Puis on ajoute dans chaque tube, un même volume d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance d'environ  $10^6$  bactéries/ml (Berche *et al.* 1988). Après incubation, la croissance est vérifiée en comparant la turbidité à celle des tubes témoins non inoculés ou en ajoutant un agent révélateur tel que le para-Iodonitrotétrazolium chloride (INT) 0,2 % qui fait apparaître la coloration rose en présence des bactéries viables (Kuetze *et al.* 2008).

## I.9. CROISSANCE MICROBIENNE

### I.9.1. Dynamique de la croissance microbienne

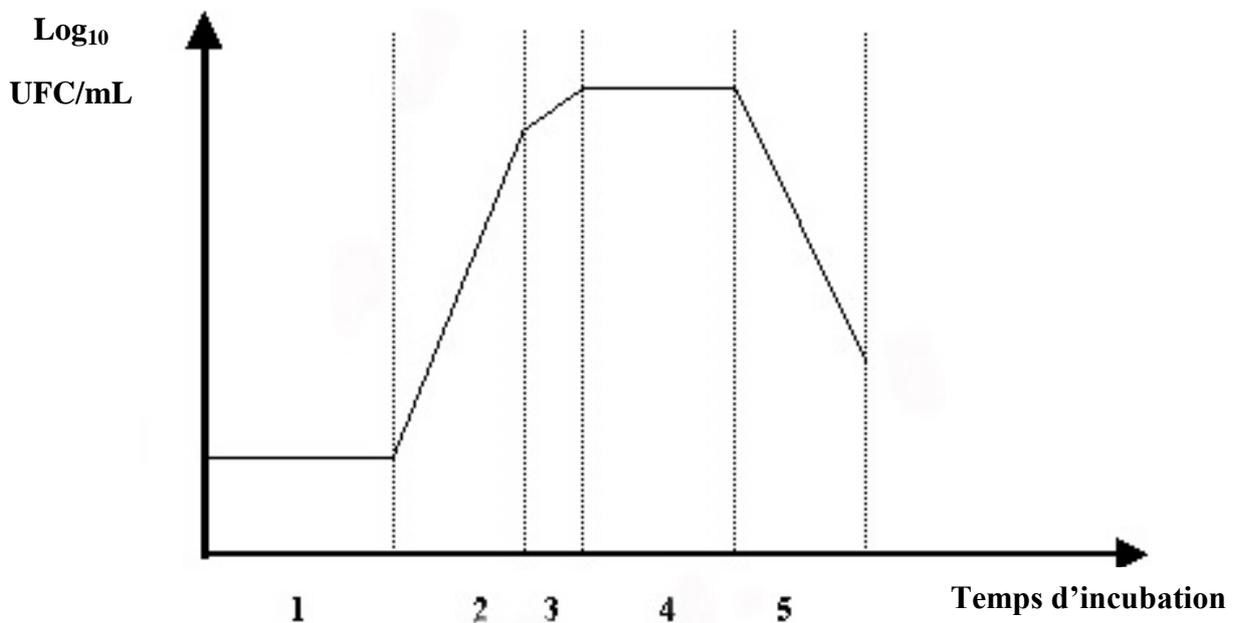
Pour une population microbienne homogène (c'est-à-dire où tous les individus sont pratiquement identiques sur le plan génétique et physiologique) qui se développe en milieu liquide dans des conditions idéales (température, oxygène, teneur en  $\text{CO}_2$ , concentrations des éléments nutritifs, pH) le nombre de cellule ainsi que la masse cellulaire double à chaque génération. La croissance d'une bactérie peut être définie par deux constantes:

**-le temps de génération**, c'est-à-dire l'intervalle de temps entre deux divisions successives ou celui nécessaire au doublement de la population. En partant d'une cellule bactérienne unique, ce dernier se fait selon une progression géométrique. Dans une population bactérienne toutes les cellules ne se développent pas au même rythme. Le temps de génération varie avec l'espèce considérée et les conditions de culture. (Buchanan 1918)

**-le taux de croissance** est le nombre de division par unité de temps. Autrement dit, il est l'inverse du temps de génération.

La croissance bactérienne est l'accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie. Elle aboutit à l'augmentation du nombre de bactéries. Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme, éventuellement toxiques. La croissance peut être étudiée en milieu liquide ou solide. Le tracé de la densité microbienne en fonction du temps permet d'obtenir une courbe de croissance constituée de cinq (05) phases (Figure 8) (Buchanan 1918):

- **Phase de latence:** le taux de croissance nul ( $\mu = 0$ ). La durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu. C'est le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat (pas de phase de latence si repiquage sur milieu identique au précédent).
- **Phase de croissance exponentielle:** le taux de croissance atteint un maximum ( $\mu = \max$ ). Cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante. Le temps de doublement des bactéries est le plus court. La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle).
- **Phase de ralentissement:** la vitesse de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets. Il existe un début d'autolyse des bactéries.
- **Phase maximale stationnaire:** le taux de croissance devient nul ( $\mu = 0$ ). Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.
- **Phase de déclin:** le taux de croissance est négatif ( $\mu < 0$ ). Toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes. Cependant, il persiste une croissance par libération de substances libérées lors de la lyse (croissance cryptique).



**Figure 8.** Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide. (Buchanan 1918)

1-phase de latence, 2-phase de croissance exponentielle, 3-phase de ralentissement, 4-phase stationnaire, 5-phase de déclin.

### **I.9.2. Méthode de mesure de la croissance microbienne**

La plupart des méthodes permettent une estimation de la masse (nombre) microbienne.

- Par lecture au microscope à l'aide d'une cellule hématimétrique
- Par dénombrement après culture
- À l'aide d'un compteur automatique de particules
- Par épifluorescence qui ne colore que les bactéries vivantes.

### **Méthode de dénombrement après culture**

Le dénombrement des bactéries viables est en pratique courante. La méthode communément utilisée peut se faire de plusieurs façons:

- **Après culture en boîte de pétrie**

Les bactéries cultivables forment des colonies sur un milieu de culture approprié: on utilise la culture en boîtes de Pétries ou Plate Count. Ici, on dénombre au moins 20 boules à souche pure = colonies

- **par lecture de densité optique:**

De nombreuses cellules isolées ne forment pas nécessairement de Colonie. On évalue la DO du milieu de croissance en fonction du temps, à une longueur d'onde donnée. La mesure de la D.O. se fait à une longueur d'onde allant de 450 à 550 nm et les cultures bactériennes sont diluées de façon à obtenir des D.O. inférieures à 0,4 (les DO évoluent linéairement à la concentration cellulaire).

### **Méthode de dénombrement par Cytométrie en flux:**

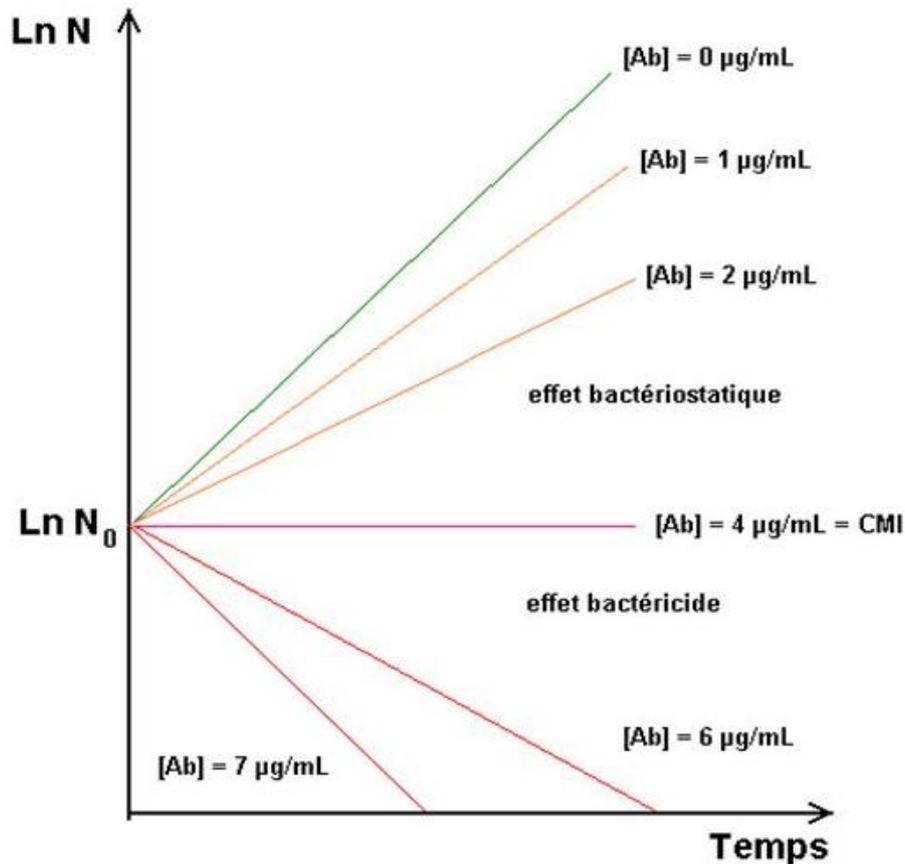
Elle consiste à mesurer un ou plusieurs paramètres spécifiques d'une cellule isolée, entraînée par un flux liquide. Cette technique est couramment appliquée en hématologie. Elle est encore en cours d'évaluation en microbiologie

### **I.9.3. Cinétique de la croissance microbienne en présence d'un antibiotique**

L'activité bactéricide des antibiotiques peut se mesurer à temps variable et consiste à déterminer le nombre de survivants au cours du temps. Les résultats exprimés sous forme de courbe reliant le logarithme du nombre de survivants au temps classent les antibiotiques en:

-Antibiotique concentration dépendants, l'activité bactéricide augmente avec la concentration, pas de saturation quelque soit le nombre de fois dont la CMI est multiplié et la vitesse de bactéricide est rapide.

-Antibiotique temps dépendants, l'activité bactéricide augmente avec la concentration d'antibiotique jusqu'à un certain seuil de saturation de la bactéricidie obtenue à 4-5 CMI, et est corrélée avec la durée d'exposition à l'antibiotique (Figure 9).



**Figure 9.** Évolution de la croissance microbienne en présence d'antibiotique. ( Archambaud 2009)

## I.10. GÉNÉRALITÉS SUR LES ESPÈCES VÉGÉTALES ÉTUDIÉES

Les informations relatives aux plantes étudiées sont consignées sur le tableau ci-après (Tableau 3).

**Tableau 3.** Données générales sur les espèces végétales étudiées

Nom scientifique	Famille	Noms vernaculaires	Utilisation en médecine traditionnelle	Parties utilisées	Bioactivité de la plante
<i>Acacia albida</i>	Césalpinacées	<b>Tchoutna (Massa)</b>	Antipaludique; maux de ventre	Ecorces du tronc	Antibactérienne (Hakizamungu <i>et al.</i> 1988)
<i>Azalia africana</i>	Césalpinacées	<b>Ma'asna (Massa)</b>	Plaies	Ecorces du tronc	Antibactérienne (Yemoa <i>et al.</i> 2008)
<i>Ageratum conyzoides</i>	Astéracées	<b>Moul ousna (Massa)</b>	Fièvre; maux de ventre; céphalées.	Feuilles	Antibactérienne (Ndip <i>et al.</i> 2009)
<i>Azadirachta indica</i>	Meliacées	<b>Ngnimna (Massa)</b>	Ulcères d'estomac; œdèmes.	Feuilles	Antibactérienne (Bélangier <i>et al.</i> 2005)
<i>Crossopteryx febrifuga</i>	Rubiacées	<b>De'esna (Massa)</b>	Maux de ventre; maux d'articulation.	Ecorces du tronc	Antibactérienne (Yahaya <i>et al.</i> 2011)
<i>Khaya senegalensis</i>	Meliacées	<b>Gamna (Massa)</b>	Constipation; plaies.	Ecorces du tronc	Antimicrobienne AE: antiulcéreuse (Yamahara <i>et al.</i> 1990)
<i>Moringa oleifera</i>	Moringacées	<b>Gligandja (Massa)</b>	Douleurs gastriques; anémie.	Feuilles	Antibactérienne (Caceres <i>et al.</i> 1991)
<i>Piliostigma reticulatum</i>	Césalpinacées	<b>Marasna (Massa)</b>	Maux de dents et maux de ventre	Ecorces du tronc	Antimicrobienne (Ouedraogo 1999)
<i>Picralima nitida</i>	Apocynacées		Maux de ventre, antipaludique	Feuilles	Anti-diarrhétique (Kouitchou <i>et al.</i> 2013)

## **CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## II.1. MATÉRIEL

### II.1.1 Microorganismes

Un total de 10 isolats cliniques de *Helicobacter pylori* dénommés *H. pylori* de 1 à 10 a été utilisé lors de cette étude. Ces isolats cliniques d'*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ont été prélevés des biopsies gastriques des patients souffrant d'ulcères gastroduodénaux des services de gastroentérologie de l'Hôpital Laquintinie et de l'Hôpital Général de Douala dans le cadre d'une étude antérieure menée par l'équipe de recherche du Dr KOUITCHEU de 2013-2014.

### II.1.2. Matériel végétal

Les feuilles et/ou écorces de neuf espèces végétales de la flore camerounaise ont été récoltées dans les localités de Yagoua, de Mbandjock et de Zo-étélé, puis identifiées à l'Herbier National du Cameroun (HNC) (Tableau 4). Les informations relatives à ces différentes plantes figurent dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 4.** Période, localité de récolte et code d'identification des plantes.

Nom de la plante	Partie utilisée	Période de récolte	Localité de récolte	Code d'identification
<i>Acacia albida</i>	Ecorces	Mars 2015	Yagoua	49880 HNC
<i>Afzelia africana</i>	Ecorces	Mars 2015	Yagoua	36372 HNC
<i>Ageratum conyzoides</i>	Feuilles	Juin 2015	Mbandjock	32761 HNC
<i>Azadirachta indica</i>	Feuilles	Mars 2015	Yagoua	4447 SRFK
<i>Crossopteryx febrifuga</i>	Ecorces	Mars 2015	Yagoua	35927 HNC
<i>Khaya senegalensis</i>	Ecorces	Mars 2015	Yagoua	51229 HNC
<i>Moringa oleifera</i>	Feuilles	Mars 2015	Mbandjock	42891 HNC
<i>Piliostigma reticulatum</i>	Ecorces	Mars 2015	Yagoua	26333 HNC
<i>Picralima nitida</i>	Feuilles	Juin 2015	Zo-étélé	2136/SRFK.

### II.1.3. Matériel de laboratoire

Becher; erlenmeyer; éprouvette; bouteilles de 250 mL; boîtes de pétries; plaques de microtitration; alcool à 95%; eau de javel; eau de robinet; seau; papier aluminium; anse de platine; bougie; seringue; tubes à vis; coton; papier hygiénique; papier Whatman n°1; embouts jaunes et bleus; micropipette 100 µL; micropipette multichannel.

## II.1.4. Équipements et réactifs utilisés

### II.1.4.1. Équipements

Congélateur (BIOBASE); réfrigérateur (BIOBASE -25°C Frezer); jarre chimique; la hotte; bec bunsen; incubateur (BIOBASE, 37°C); étuve (BIOBASE 44°C); l'autoclave (Model LS-B75L); balance électronique (VWR Science éducation); évaporateur rotatif (Büchi R200).

### II.1.4.2. Réactifs utilisés

#### II.1.4.2.1. Milieux de culture

Quatre milieux de culture ont été utilisés dans ce travail:

- Le milieu Columbia Agar (Biomerieux, France) pour la culture et l'entretien des isolats cliniques;
- le bouillon Cœur cerveau (Accumix, Belgique) pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices de la croissance bactérienne;
- le milieu Urée-indole (Biomerieux, France) pour l'identification et la caractérisation biochimique (des isolats cliniques);
- le milieu physiologique (NaCl 0,9%) pour la préparation des inocula.

#### II.1.4.2.2. Antibiotiques

Six antibiotiques appartenant à cinq familles différentes et communément utilisés dans le traitement des ulcères gastroduodénales liés à *Helicobacter pylori* au Cameroun ont été retenus dans le cadre de ce travail (Tableau 5).

**Tableau 5.** Les différents antibiotiques utilisés

Famille	Antibiotiques
<b>β lactamines</b>	Amoxicilline
<b>Tétracyclines</b>	Doxycycline
<b>Macrolides</b>	Érythromycine, Clarithromycine
<b>Fluoroquinolones</b>	Ciprofloxacine
<b>Produits nitrés (nitro-imidazolés)</b>	Métronidazole

## **II.2. MÉTHODES**

### **II.2.1. Conservations des isolats cliniques**

La conservation des souches de *H. pylori* a été faite sur milieu Columbia au sang cuit, coulé en pente dans des boîtes de pétries stériles. L'ensemencement a été réalisé par stries à partir des colonies obtenues en primo-culture ou à partir des ré-isolements. Ces boîtes de pétries hermétiquement fermés ont été incubés pendant 2 jours à 37°C en micro-aérophilie, conservés à une température comprise entre 4 à 8°C. Pour la conservation de longue durée, l'ensemencement a été réalisé dans le milieu cœur cervelle avec 15 à 20% de glycérol et conservé à -10°C.

### **II.2.2. Évaluation *in vitro* de l'activité anti-*Helicobacter pylori* des extraits de plantes et des antibiotiques de référence**

#### **II.2.2.1. Préparation des extraits de plantes**

Les différentes parties de plantes choisies ont été découpées, séchées à l'abri du soleil puis broyées et macérées dans du méthanol d'une part et de l'acétate d'éthyle d'autre part (à raison de 6 L de méthanol par kg de matière végétale), pendant 48 heures en homogénéisant régulièrement. L'homogénat obtenu a été filtré sur papier Whatman n°1 et le filtrat concentré au moyen d'un évaporateur rotatif (Büchi R200) à 65°C pour le méthanol et à 40°C pour l'acétate d'éthyle. Les extraits ont été récupérés et séchés à l'étuve à 40°C pour évaporation complète des solvants d'extraction. Seule l'extraction au méthanol de *Picralima nitida* a été effectuée. Ainsi un total de 17 extraits de plante a été obtenu. Le rendement de chaque extrait a été évalué par rapport à la masse de matière végétale sèche de départ.

#### **II.2.2.2. Préparation des solutions mères d'extrait de plantes et des antibiotiques de référence**

Les solutions mères des extraits de plantes ont été préparées en dissolvant 10 mg d'extrait dans 122 µL de DMSO. Après dissolution complète de l'extrait, le milieu de culture a été ajouté pour un volume final de 2441 µL, correspondant à une concentration d'extrait de 4096 µg/mL. La ciprofloxacine, la doxycycline, la clarithromycine, l'amoxiciline, l'érythromycine et le métronidazole ont été utilisés comme témoin positif pour les tests antibactériens. Les solutions mères de ces substances pures, ont été également préparées à une concentration de 2048 µg/mL.

### II.2.2.3. Préparation des inocula bactériens

Des suspensions de bactéries ont été préparées à partir des colonies de culture de bactéries âgées de 48 heures et de 10 ml de solution de NaCl 0,9% stérile. Ces suspensions ont été obtenues en comparant sa turbidité à celle de 0,5 d'échelle néphélométrie de Mc Farland (Tableau 6) ayant une densité cellulaire de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Soixante sept microlitres de chacune des suspensions bactériennes a été complétée à 50 mL avec du BHI, et leur densité a ainsi été ajustée à  $2 \times 10^5$  UFC/mL. Les inocula ont été obtenus par dilution de 667  $\mu$ L de chacune des suspensions bactériennes pour un volume final de 50 mL dans du bouillon cœur cervelle leur densité cellulaire a été de  $2 \times 10^6$  UFC/mL.

**Tableau 6.** Néphélomètre standard de Mc Farland (Hang 1999)

Echelle de Mc Farland	0	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1% BaCl <sub>2</sub> (ml)	0,00	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90
1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	0,00	9,95	9,90	9,80	9,70	9,60	9,50	9,40	9,30	9,20	9,10
Eau distillée	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Densité approximative des cellules (X 10 <sup>8</sup> UFC/mL)	0,00	1,5	3,00	6,00	9,00	12,00	15,00	18,00	21,00	24,00	27,00
	0,00	0,13	0,20	0,33	0,49	0,64	0,66	0,72	0,94	0,101	0,118

### II.2.2.4. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

Les CMI des extraits sur les différents isolats bactériens ont été déterminées par la méthode de microdilution en milieu liquide (Newton *et al.* 2002) en utilisant des microplaques de 96 puits. Chaque concentration a été testée (dans deux puits) et le test répété 3 fois. Cent microlitres de milieu de culture (BHI) ont été introduits dans chaque puits. Cent microlitres de solution mère d'extrait à la concentration de 4096  $\mu$ g/mL ont été introduites dans les premiers puits de chaque colonne (de huit puits); des dilutions successives en série, de facteur 2 ont été faites dans les autres puits en maintenant le volume final à 100  $\mu$ L de façon à obtenir dix (10) concentrations (2048 - 4  $\mu$ g/mL) d'extraits, puis 100  $\mu$ L d'inoculum ont été introduit pour finalement avoir des concentrations d'extraits allant de 1024-2  $\mu$ g/mL.

Pour le control positif, 100 µL des solution mères de ciprofloxacine, doxycycline, clarithromycine, métronidazole, érythromycine et amoxiciline de concentration 1024 µg/mL ont été introduites dans les premiers puits des deux dernières colonnes de huit puits, des dilutions successives en série, de facteur 2 ont été faites dans les autres puits en maintenant le volume à 100 µL de façon à obtenir treize (13) concentrations (1024 – 0,25 µg/mL) de ciprofloxacine, doxycycline, clarithromycine, métronidazole, érythromycine et amoxiciline, puis 100 µL d'inoculum ont été introduit dans chaque puits ramenant les concentrations d'antibiotiques finalement testés entre 512 – 0.125 µg/mL.

Enfin, 100 µL d'inoculum à  $2 \times 10^6$  UFC/mL ont été introduits dans chaque puits. Des puits témoins négatifs, contenant uniquement du BHI et le DMSO (5 %) et ceux contenant l'inoculum sans extrait ni antibiotiques ont été réalisés. Les microplaques ont été recouvertes à l'aide de couvercles stériles puis mis en incubation dans des conditions de micro-aérophilie générée dans la jarre. Après 48 heures d'incubation à 37°C, la croissance bactérienne a été révélée dans chaque puits à l'aide de 40 µl d'une solution de INT (*para*-Iodonitrotétrazolium Chloride) 0,2% puis réincubée pendant 30 min à 37°C (Mativandlela *et al.* 2006). Après réincubation, le changement de coloration du jaune au rose a été noté comparativement aux témoins négatifs. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) étaient définies comme étant les plus petites concentrations de substances pour lesquelles nous n'avons pas eu de croissance (absence de coloration rose).

### **II.2.3. Étude cinétique de l'activité bactéricide**

#### **II.2.3.1. Préparation des solutions d 'antibiotiques**

Les antibiotiques utilisés pour les tests de cinétique bactérienne ont été ceux ayant présentés une activité anti-*Helicobacter* notable d'après les tests précédents; à savoir la ciprofloxacine, la doxycycline et la clarithromycine. Des dilutions ont été réalisées à partir d'une solution mère d'antibiotique de manière à obtenir des concentrations finales d'antibiotiques égale à 1, 2, 4 et 8 fois la CMI.

#### **II.2.3.2. Préparation de l'inoculum**

Un seul des souches cliniques a été utilisé dans le cadre de cette évaluation, au vue de la sensibilité égale de tous les isolats cliniques testés vis-à-vis des antibiotiques évalués. Dans un premier temps, une suspension microbienne a été constituée dans du BHI à partir des colonies de 48 heures sur milieu gélosé par ajustement de la turbidité aux différents points de l'échelle de Mac Farland (0,5 - 3), puis des dilutions de raison géométrique 10 ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ )

dans le milieu pré-cité ont été réalisés. Cent microlitre (100 µL) de chacune de ces dilutions, après homogénéisation ont étéensemencés par étalement sur la gélose BHI et incubés pendant 48 heures dans les conditions décrites précédemment.

La numération des colonies a été effectuée dans les boîtes de Pétries contenant entre 30 et 300 colonies, après s'être assuré de la pureté de l'isolat (aspect morphologique des colonies, test a uréase et a l'oxydase).

Les résultats obtenus après plusieurs essais de dénombrement nous ont conduits à utiliser une suspension microbienne ajustée au point de l'échelle de Mac Farland, correspondant à  $\approx 1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

### **II.2.3.3. Réalisation pratique**

La méthode de la microdilution en milieu liquide sur plaques de microtitration a été utilisée pour évaluer la croissance bactérienne en présence des concentrations variables des antibiotiques ci-dessus cités (Newton *et al.* 2002). Les concentrations d'antibiotiques évaluées ont été de 1, 2, 4 et 8 fois la CMI obtenus pour chaque antibiotique dans le test précédemment. La méthode de dénombrement des colonies après culture en boîte de pétri a été utilisée pour la détermination des bactéries survivantes avant l'incubation (inoculum initial: HO) et aux temps d'incubation de 4, 8, 24, 48 et 72 heures. Les densités microbiennes (UFC) obtenues à chaque temps d'incubation pour chacune des concentrations d'antibiotique testées ont été exprimées en logarithme (Log) par mL du milieu de culture.

### **II.3. Traitement des données**

La saisie des données et le tracé des courbes ont été traités dans la base des données Microsoft Office Excel 2007.

# **CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION**

### III.1. RÉSULTATS

#### III.1.1. Extraction

Les rendements d'extraction ainsi que l'aspect physique des extraits à l'acétate d'éthyle et au méthanol des différents spécimens de plantes sont représentés sur le Tableau 7 ci-dessous.

**Tableau 7.** Rendements d'extraction et caractéristiques physiques des extraits préparés

Plantes	Solvant d'extraction	Rendement(%)	Aspect physique
<i>Acacia albida</i>	AE	1,34	Pâteux
	MeOH	3,35	
<i>Afzelia africana</i>	AE	1,46	Pâteux
	MeOH	3,56	
<i>Ageratum conyzoides</i>	AE	2,08	Pâteux
	MeOH	7,55	
<i>Azadirachta indica</i>	AE	3,84	Pâteux
	MeOH	5,76	
<i>Crossopteryx febrifuga</i>	AE	2,13	Pâteux
	MeOH	7,31	
<i>Khaya senegalensis</i>	AE	2,37	Pâteux
	MeOH	7,81	
<i>Moringa oleifera</i>	AE	5,21	Pâteux
	MeOH	8,69	
<i>Piliostigma reticulatum</i>	AE	3,26	Pâteux
	MeOH	5,71	
<i>Picralima nitida</i>	MeOH	8,13	Pâteux

AE=Acétate d'éthyle; MeOH=Méthanol

### III.1.2. Activité antibactérienne des extraits de plantes et des antibiotiques de référence

L'activité antibactérienne des différents extraits de plantes et antibiotiques a été évaluée vis-à-vis de 10 isolats cliniques de *H. pylori*. Les résultats obtenus figurent au tableau 8 ci-dessous. D'une manière générale, il se dégage de ces résultats que l'activité anti-*Helicobacter* des différents extraits de plantes testées a varié d'une plante à l'autre et au sein d'une même espèce végétale, d'un solvant d'extraction à l'autre avec les valeurs de CMI comprises entre 256 à >1024 µg/mL (Tableaux 8). Le méthanol a été le meilleur solvant d'extraction des composants antimicrobiens. En effet, aucun extrait à l'acétate d'éthyle n'a présenté une activité sur les isolats clinique de *H. pylori* testés avec une valeur de CMI inférieure à 1024 µg/mL (valeur de CMI la plus élevée considérable) au contraire des extraits au méthanol où 30% (3/10) ont présenté des valeurs de CMI comprises entre 256 et 512 µg/mL; il s'agit des extraits méthanoliques de *Acacia albida*, de *Picralima nitida* et de *Azadirachta indica* vis-à-vis respectivement de 100 % (10/10), de 100% (10/10) et de 80% (8/10) des isolats cliniques testés. Ainsi, le spectre d'activité le plus large (100%) a été obtenue avec les extraits au méthanol de *Acacia albida* et *Picralima nitida*. La valeur de CMI la plus faible a été de 256 µg/mL. Cette valeur de CMI a été obtenue avec les extraits au méthanol de *Azadirachta indica*, de *Acacia albida* et de *Picralima nitida* vis-à-vis respectivement de 10%, 30%, 50% des isolats cliniques testés. De ce fait, la meilleure activité anti-*Helicobacter* obtenue dans le cadre de ce travail a été celle des extraits au méthanol de *Acacia albida*, de *Picralima nitida* et de *Azadirachta indica* vis-à-vis respectivement de 30%, 50% et 10% des isolats testés. Des 10 isolats cliniques testés, 80% (8/10) ont été sensibles vis-à-vis des extraits de plantes testées avec les taux de sensibilité variant de 5,88 (1/17) à 11,76% (2/17). Le taux de sensibilité le plus élevé (11,76%) a été obtenue avec l'isolat clinique *H. pylori* a 10.

L'activité anti-*Helicobacter* de 6 antibiotiques (Amoxicilline, Erythromycine, Métronidazole, Clarithromycine, Doxycycline et Ciprofloxacine) utilisés dans le traitement de l'infection à *Helicobacter pylori* a été également évaluée pour servir de contrôle positif. L'activité anti-*Helicobacter* obtenue avec ces antibiotiques a été de loin notable comparée à celle obtenue avec les extraits de plantes. En effet, les valeurs de CMI obtenues avec ces substances de référence ont varié de 0,125 à >512 µg/mL (Tableau 8). Cependant, les antibiotiques tels que la Clarithromycine, la Doxycycline et la Ciprofloxacine ont été les plus actifs avec des CMI de 0,125 µg/mL vis-à-vis de 100% des isolats cliniques évalués.

**Tableau 8.** Concentrations minimales inhibitrices ( $\mu\text{g/mL}$ ) des extraits de plantes et des antibiotiques de référence vis-à-vis des isolats cliniques de *Helicobacter pylori*

Extraits de plantes / Antibiotiques		<i>H. pylori</i> $\alpha$ 1	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 2	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 3	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 4	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 5	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 6	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 7	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 8	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 9	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 10
<i>Acacia Albida</i>	AE	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
	MeOH	<b>512</b>	<b>256</b>	<b>256</b>	<b>256</b>						
<i>Azalia africana</i>	AE	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
	MeOH	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	1024	>1024
<i>Ageratum conyzoides</i>	AE	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
	MeOH	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
<i>Azadirachta indica</i>	AE	>1024	>1024	>1024	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
	MeOH	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	1024	1024	<b>512</b>	<b>256</b>

**Tableau 8 (suite).** Concentrations minimales inhibitrices ( $\mu\text{g/mL}$ ) des extraits de plantes et des antibiotiques de référence vis-à-vis des isolats cliniques de *Helicobacter pylori*

Extraits de plantes / Antibiotiques		<i>H. pylori</i> $\alpha$ 1	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 2	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 3	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 4	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 5	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 6	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 7	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 8	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 9	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 10
<i>Crossopteryx febrifuga</i>	AE	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
	MeOH	>1024	>1024	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
<i>Khaya Senegalensis</i>	AE	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
	MeOH	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
<i>Moringa oleifera</i>	AE	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
	MeOH	1024	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
<i>Piliostigma reticulatum</i>	AE	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
	MeOH	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
<i>Picralima nitida</i>	AE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	MeOH	<b>512</b>	<b>256</b>	<b>256</b>	<b>256</b>	<b>256</b>	<b>256</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>512</b>

**Tableau 8 (suite).** Concentrations minimales inhibitrices ( $\mu\text{g/mL}$ ) des extraits de plantes et des antibiotiques de référence vis-à-vis des isolats cliniques de *Helicobacter pylori*

Extraits de plantes / Antibiotiques	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 1	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 2	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 3	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 4	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 5	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 6	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 7	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 8	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 9	<i>H. pylori</i> $\alpha$ 10
<i>Amoxicilline</i>	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>Erythromycine</i>	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128
<i>Métronidazole</i>	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256
<i>Clarithromycine</i>	<b>0,125</b>									
<i>Ciprofloxacine</i>	<b>0,125</b>									
<i>Doxycycline</i>	<b>0,125</b>									

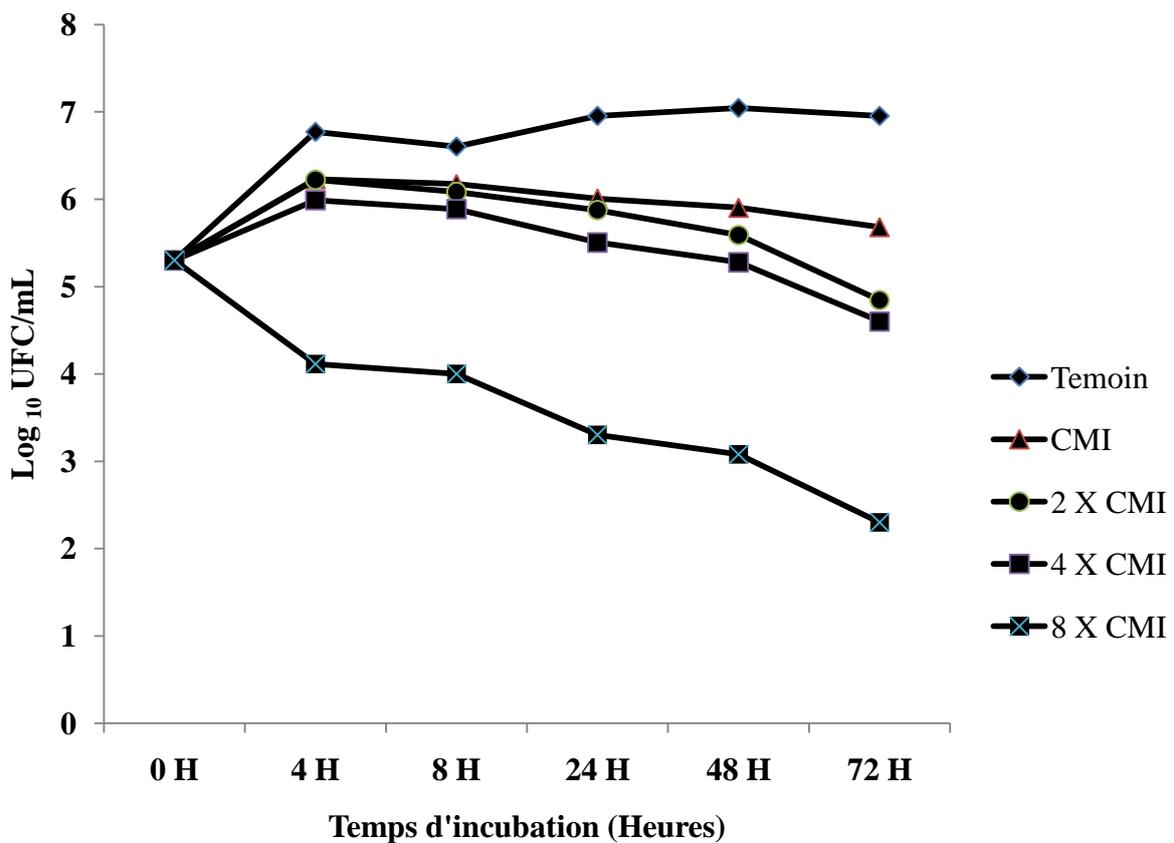
*H. pylori*: *Helicobacter pylori*; AE: acétate d'éthyle; MeOH: méthanol; /: pas de valeur

### III.1.2. Activité bactéricide des antibiotiques vis-à-vis de *Helicobacter pylori*

Seuls les antibiotiques ayant présentés une activité anti-*Helicobacter* notable à savoir la Ciprofloxacine, la Doxycycline et la Clarithromycine ont été utilisés pour l'évaluation de la cinétique bactérienne.

#### III.1.2.1. Cas de la Ciprofloxacine

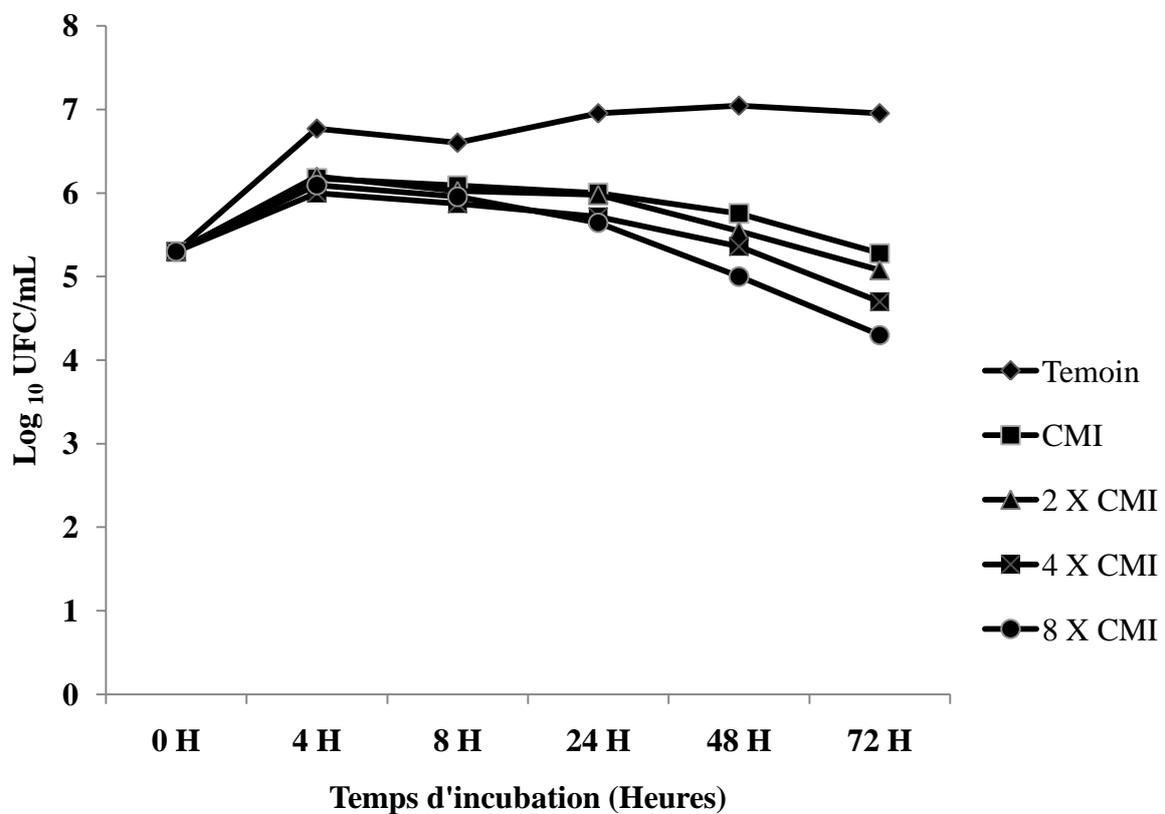
L'allure des courbes de ce graphe, révèle que l'effet bactéricide de la ciprofloxacine n'est dépendant de la concentration de ce dernier qu'à partir d'un seuil de concentration supérieure ou égale à 8 fois la CMI. En effet, aux concentrations inférieures à 8 fois la CMI les courbes obtenues ont tendance à se chevaucher, au contraire de celle correspondante à 8 fois la CMI qui présente une bactéricidie considérable, étroitement liée à la durée d'exposition de l'isolat à cet antibiotique (Figure 10). Cette observation révèle le caractère temps dépendant de ce dernier.



**Figure 10.** Cinétique de l'activité bactéricide de la Ciprofloxacine à différentes concentrations vis-à-vis de *Helicobacter pylori*.

### III.1.2.2. Cas de la Clarithromycine

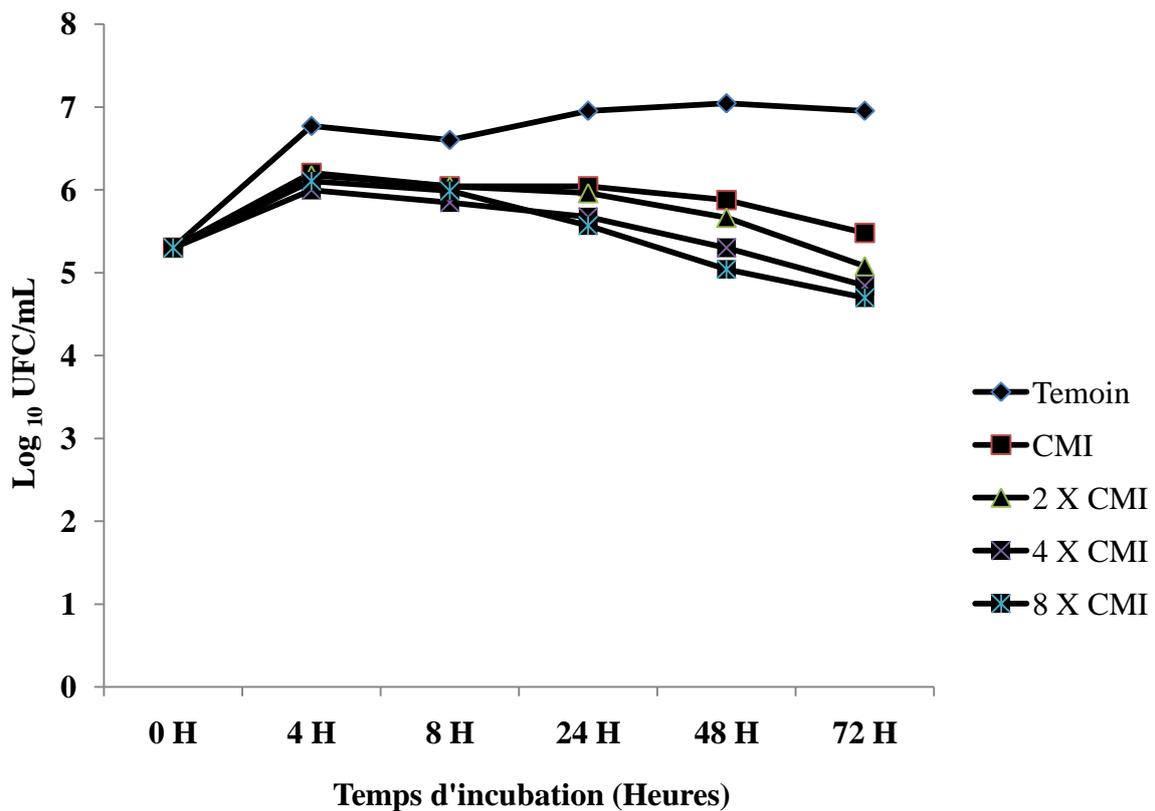
De l'analyse de ce graphe, il ressort que l'effet bactéricide de la clarithromycine ne semble pas être influencé de façon considérable aux concentrations d'antibiotiques testées (Figure 11). Cependant, on note une augmentation de la bactéricidie avec la concentration d'antibiotique à partir de la 48<sup>ème</sup> heure d'exposition ce qui laisse croire que l'élévation de concentration pourrait conduire à une bactéricidie totale de l'isolat d'intérêt, suggérant ainsi le caractère concentration dépendant de cet antibiotique.



**Figure 11.** Cinétique de l'activité bactéricide de la Clarithromycine à différentes concentrations vis-à-vis de *Helicobacter pylori*.

### III.1.2.3. Cas de la Doxycycline

Le caractère bactéricide de la doxycycline est comparable à celui de la clarithromycine à plus d'un point. En effet, l'analyse de ce graphe montre que la bactéricidie de la doxycycline augmente, certes légèrement avec la concentration de ce dernier mais sûrement (Figure 12). Ainsi, la bactéricidie induite par cet antibiotique augmenterait avec sa concentration sans qu'un quelconque phénomène de saturation ne soit observé.



**Figure 12.** Cinétique de l'activité bactéricide de la Doxycycline à différentes concentrations vis-à-vis de *Helicobacter pylori*.

## III.2. DISCUSSION

La recherche continue de nouvelles substances antimicrobiennes est un challenge important d'autant que les microorganismes développent de nouvelles formes de résistances de manière permanente. Les plantes, par la richesse et la diversité de leurs constituants chimiques constituent un réservoir quasi-inépuisable pour de telles substances (Nunes *et al.* 2005, Singh *et al.* 2011).

Dans l'optique de rechercher de nouvelles substances antimicrobiennes, nous avons mené cette étude qui a porté sur l'évaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne de neuf (09) plantes médicinales camerounaise vis-à-vis de 10 isolats cliniques de *H. pylori*.

Les résultats obtenus ont révélé que les composants antimicrobiens de ces plantes sont plus solubles dans le méthanol comparé à l'acétate d'éthyle. Cette observation corrobore avec les données de la littérature qui font état du fait que le méthanol constituerait le meilleur solvant d'extraction des composés antimicrobiens comparé à l'hexane, à l'eau, à l'éthanol et à l'acétate d'éthyle (Ahmad *et al.* 1998, Eloff *et al.* 1998, Lin *et al.* 1999, Kouitcheu *et al.* 2011). La meilleure activité anti-*Helicobacter* obtenue dans le cadre de ce travail a été celle des extraits au méthanol de *Acacia albida*, de *Picralima nitida* et de *Azadirachta indica* vis-à-vis respectivement de 30%, 50% et 10% des isolats testés avec une valeur de CMI de 256 µg/mL. La classification des substances naturelles au regard de leur propriété antimicrobienne se fonde sur les valeurs de CMI obtenues avec une limite maximale de 1024 µg/mL. D'après Kuete *et al.* 2010, les valeurs de CMI inférieures à 100 µg/mL désigneraient les substances à activité antimicrobienne notable alors que celle comprises entre 100 et 625 µg/mL celles à activité modérée. Sur la base de ce classement, nous pouvons dire que les extraits au méthanol de *Acacia albida*, de *Picralima nitida* et de *Azadirachta indica* ont une activité antimicrobienne modérée. Cependant une seconde classification, moins stricte que la précédente qualifie d'intéressantes, toutes substances naturelles ayant de valeurs de CMI de l'ordre 8000 µg/mL (Fabry *et al.* 1998). Ainsi, les extraits méthanolique de *Acacia albida*, de *Picralima nitida* et de *Azadirachta indica* auraient des activités antimicrobiennes intéressantes. L'activité antimicrobienne révélée par ces extraits s'avère importante au vue du caractère multirésistant des isolats cliniques testés. En effet, tous les isolats utilisés ont été résistants vis-à-vis de 3 familles distinctes d'antibiotiques testés, ce qui constitue une preuve de leur multirésistance. Par ailleurs, la prévalence élevée de cette infection cumulée a la virulence de cette souche constitue des arguments de plus en faveur de l'importance des résultats présents. L'activité antimicrobienne des extraits méthanolique de *Acacia albida*, de *Picralima nitida* et de *Azadirachta indica* telle que révélée dans cette étude serait liée a leur composition chimique, donc un screening phytochimique aurait certainement pu le démontrer. Les résultats des activités antibactériennes obtenus au cours de ce travail sont comparables à ceux de Satyavati *et al.* 1976 et Fekeye *et al.* 2000 qui ont révélé respectivement une activité antimicrobienne de l'extrait au méthanol de *P. nitida* et de *A. indica* vis-à-vis d'autres souches bactériennes Gram (-), Gram (+) et fongiques. Par ailleurs, la littérature fait état de l'activité

antimicrobienne de l'extrait au méthanol de *P. nitida* vis-à-vis d'*Escherichia coli*, de *Staphylococcus aureus* et de *Proteus vulgaris* (Kouam *et al.* 2011). Ainsi, les résultats faisant état de l'activité antimicrobienne de certains extraits de plantes, obtenus dans le présent travail constitue un apport supplémentaire à ceux déjà documentés.

Les isolats cliniques utilisés dans le présent travail ont été résistants à l'amoxicilline, à l'érythromycine et au métronidazole, antibiotiques pourtant faisant partie des schémas thérapeutiques préconisés dans le traitement de l'infection à *Helicobacter pylori*. Cette observation certes, non significative sur le plan statistique, constitue une mise en garde sur l'état de la prévalence de la résistance à *Helicobacter* au Cameroun. Les études récentes font état d'une résistance de *H. pylori* à la clarithromycine et au métronidazole fréquente avec un impact négatif important sur le taux d'éradication. Ainsi, la résistance à la clarithromycine conduit à un échec d'éradication dans 60 à 90% des cas et celle au métronidazole à un échec dans 10 à 30% des cas (Van der Wouden *et al.* 1999, Tankovic *et al.* 2001, Poon *et al.* 2002). Dès lors, il conviendrait d'adapter le traitement d'antibiotiques aux résultats de l'antibiogramme afin d'améliorer le taux d'éradication qui le ferait passer de 75 à 91% d'après l'étude de Toracchio *et al.* 2000 et de 67 à 76 % selon celle de Neri *et al.* 2003.

En revanche, les valeurs de CMI obtenus avec la ciprofloxacine, la clarithromycine et la doxycycline ont été de 0,125µg/mL. L'activité antimicrobienne notable de ces antibiotiques vis-à-vis des isolats cliniques d'*H. pylori* utilisés a justifié le choix porté sur ces derniers pour l'étude de bactéricidie.

Les résultats obtenus à ce sujet ont montré que l'effet bactéricide de la ciprofloxacine est corrélé à la durée d'exposition de *H. pylori* à cet antibiotique, le facteur temps s'exprimant à partir de 4 heures d'exposition au-delà d'une concentration seuil égale à 8 fois la CMI. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Bryant *et al.* 1987 et Spangler *et al.* 1997 qui ont montré un effet bactéricide respectivement sur les bactéries Gram (+) (*Propionibacterium acnes*) et les bactéries Gram (-) (*Escherichia coli*, *Entérobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*) avec la ciprofloxacine après 48 heures de contact avec une concentration élevée (1µg/mL). En revanche, l'activité bactéricide de la clarithromycine et la doxycycline semble être plus influencée par l'augmentation de la concentration de l'antibiotique que par celle de la durée de contact. Ainsi, la posologie d'administration de ces antibiotiques devrait tenir compte de ces caractères de bactéricidie.

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

#### **IV.1. Généralités**

Le présent travail cadre avec la démarche scientifique qui doit avoir cours dans les salles de classes: OHERIC (Observation, Hypothèse, Expérience, Résultat, Interprétation et Conclusion). Cette démarche nous permettra de mieux aborder les contenus des programmes officiels des enseignements des Sciences de la Vie et de la Terre, Éducation à l'Environnement, Hygiène et Biotechnologie élaborés par le Ministère des enseignements secondaires. Sachant que la nouvelle approche des enseignements des Sciences de la Vie et de la Terre, Education à l'Environnement, Hygiène et Biotechnologie évolue vers des savoirs faire et les compétences. Elle permet aux apprenants d'acquérir des compétences à travers des manipulations. Ce travail est salubre à toute la société en particulier aux populations dans les domaines de la médecine moderne et traditionnelle.

#### **IV.2. Intérêt didactique**

L'intérêt de ce travail porte sur l'importance de la phytothérapie et de l'antibiothérapie dans les infections bactérienne. Dès lors nous nous sommes suggéré d'inscrire cette leçon dans le programme officiel de la classe de Troisième, partie Microbiologie au chapitre intitulé: Aide au système immunitaire. Ainsi, cette leçon sera présentée suivant la fiche pédagogique de préparation d'une leçon de SVTEEHB selon l'APO ci-après:

## FICHE PÉDAGOGIQUE DE PRÉPARATION D'UNE LEÇON DES SVTEEHB SELON L'APO

Établissement: **COLLÈGES ET LYCÉES DU CAMEROUN**

Thème: **MICROBIOLOGIE**

Chapitre : **AIDE AU SYSTÈME IMMUNITAIRE**

Titre de la leçon: **LES TYPES D'INTERVENTIONS DE LA MÉDECINE**

Classe: **3<sup>ème</sup>**

Date: /

Enseignant: **WANGNAMOU Marcel**

Effectif: / G: / F: /

Période : /

Durée: **1heure**

Nombre de séances: **01**

**OPO:** À la fin de cette leçon, chaque apprenant sera capable de citer les types d'interventions de la médecine en cas d'immunodéficience et comparer l'action du vaccin et du sérum.

ÉTAPES	OPI	CONTENU	SUPPORT DIDACTIQUE	ACTIVITES ENSEIGNEMENT / APPRENTISSAGE		ÉVALUATIONS	DURÉE
				ENSEIGNANT	APPRENANTS		
<b>I N T R O D U</b>	<b>1-Établir le contrat enseignant-apprenants</b>	<b>LES TYPES D'INTERVENTIONS DE LA MÉDECINE</b>	Livre au programme ; craie ; effasoir ; tableau noir	Communique et écrit le titre de la leçon au tableau	Recopient le titre de la leçon dans leur cahier		<b>5 min</b>
	<b>2-Vérifier des pré-requis</b>	<b>Pré-requis</b> Défense de l'organisme	Cours précédent Vécu quotidien	<b>Q1:</b> Quels sont les éléments qui interviennent dans la défense de l'organisme?	<b>R1:</b> Leucocytes (globules blancs) et macrophages		
	<b>3-Déterminer l'intérêt de la séquence d'enseignement /apprentissage</b>	<b>Intérêt de la séquence d'apprentissage</b> Faire appel à la médecine en cas d'affaiblissement de l'organisme.	<b>Vécu quotidien</b>	Pose les questions pour amener les élèves à déterminer l'intérêt de la séquence	Écoute et répondent aux questions de l'enseignant		





<p style="text-align: center;"><b>N T</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Comparer l'action du vaccin et du sérum</b></p>	<p>température de 37°C. -Observer la formation d'auréole autour des pastilles.</p> <p>L'efficacité d'un antibiotique est proportionnelle à l'auréole qui se forme autour de lui.</p> <p><b>c-La sérovaccinothérapie</b> Elle est combinée du sérum et du vaccin à titre préventif. Exemple cas de l'épidémie</p> <p><b>2-Comparaison entre vaccin et sérum (voir annexe)</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Vécu quotidien</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Activité sur la comparaison entre le vaccin et sérum</b></p>	<p style="text-align: center;">Guide les activités et pose les questions</p>	<p><b>R7:</b> la forme de l'auréole</p> <p>Répondent aux questions de l'enseignant.</p>	<p><b>Q7:</b> De quoi dépend l'efficacité d'un antibiotique ?</p>	
<p style="text-align: center;"><b>C O N C L U S I O N</b></p>	<p>-Rappeler le problème scientifique -Rappeler les objectifs -Vérifier le degré d'atteintes des objectifs</p>	<p>On peut aider l'organisme, naturellement, à se défendre contre les microbes par le respect des règles d'hygiène corporel et alimentaire. Par des pratiques médicales telles que la vaccinothérapie, sérothérapie, antibiothérapie...</p>		<p>-Pose les questions de l'évaluation sommative</p>	<p>-Répondent aux questions de l'évaluation sommative</p>	<p><b>Q1:</b> Citer les types d'interventions avec exemples <b>Q2:</b> Donner l'action du vaccin et du sérum</p>	<p style="text-align: center;"><b>5 min</b></p>

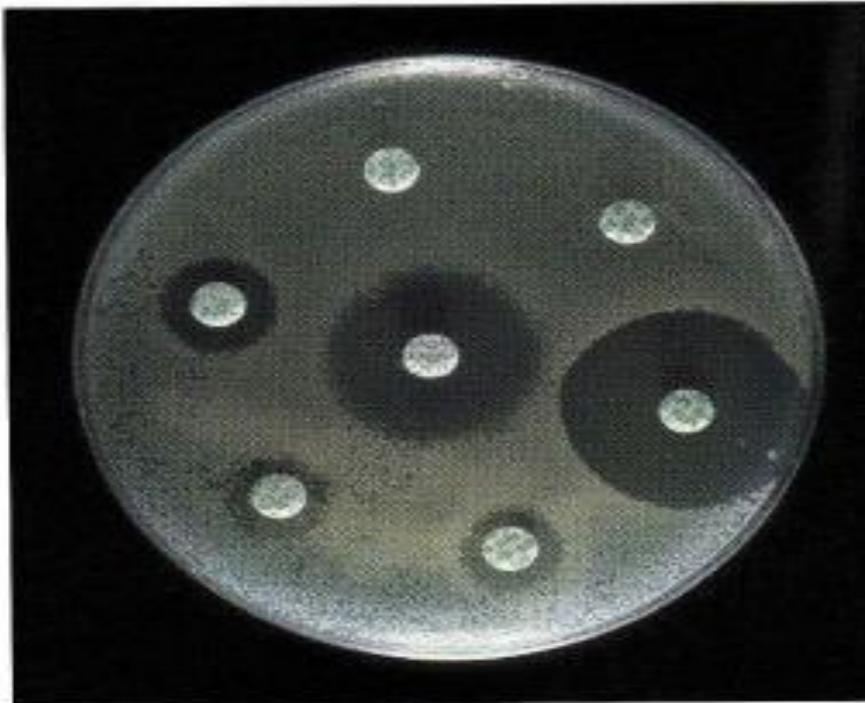
### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-Livre des *Sciences de la Vie et de la Terre au programme 3<sup>ème</sup>* HATIER INTERNATIONAL PARIS 2006. *Collection planète vivante*. Pages: 116-120

## Annexe

### Comparaison entre vaccin et sérum

	<b>Vaccin</b>	<b>Sérum</b>
<b>Usage</b>	Préventif	Curatif
<b>Contenu</b>	Antigènes atténués ou toxines	Anticorps
<b>Rôle</b>	Stimule la production d'anticorps (immunité active)	Apporte des anticorps (immunité passive)
<b>Action</b>	Spécifique lente de longue durée	Spécifique immédiate de courte durée



Une culture de bactérie et son antibiogramme

- Quels sont les antibiotiques les plus efficaces?
- Quels sont les antibiotiques les moins efficaces?

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Au terme de cette étude dont l'objectif était de contribuer à la valorisation de la flore médicinale camerounaise à travers l'évaluation de l'activité antimicrobienne de neuf (09) plantes utilisées en médecine traditionnelle camerounaise vis-à-vis de dix isolats cliniques de *Helicobacter pylori*, il ressort que:

- Les extraits au méthanol de *Acacia albida*, *Picralima nitida* et *Azadirachta indica* ont montré une activité modérée vis-à-vis respectivement de 30%, 50% et 10% des isolats testés avec une valeur de CMI de 256 µg/mL.
- *Azelia africana*, *Ageratum conyzoides*, *Crossopteryx febrifuga*, *Khaya Senegalensis*, *Moringa oleifera*, *Piliostigma reticulatum* n'ont pas présenté d'activité antimicrobienne vis-à-vis de ces isolats cliniques bactériens testés.

Les résultats obtenus à l'issue de la cinétique bactérienne des antibiotiques usuels montrent que la Ciprofloxacine a une activité bactéricide temps dépendant tandis que celle de la Clarithromycine et la Doxycycline est concentration dépendante.

A l'issue de cette étude exploratrice, plusieurs axes de recherches semblent se dégager. Il s'agit de:

- Faire une étude bioguidée des extraits de *A. albida*, *A. indica* et *P. nitida* en vue de tester les souches de *H. pylori* commercialisées.
- Faire une étude bioguidée de tous les extraits testés sur d'autres germes de microorganismes.
- Faire des combinaisons d'associations entre la ciprofloxacine, la clarithromycine et la doxycycline en vue d'évaluer l'activité de la cinétique bactérienne.
- Tester *in vivo* l'activité bactéricide de la ciprofloxacine.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Ahmad I., Mehmood Z., and Mohammad F. (1998) Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Journal of Ethnopharmacology*. 62: 183-193.
- Akoka G., Akoka A. (1972) Médecine 2000: Encyclopédie de Médecine en 3 volumes; *Argentenil Senine*. 3: 692.
- Ananil K., Hudson J.B., de Souza C., Akpaganal K., Towe G. H.N., Amason J. T. and Gbeassor. (2000) Investigation of medicinal plants of TOGO for antiviral and antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*. 38 (1): 40-45.
- Archambaud M (2009) Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques in vitro. Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU Rangueil Toulouse. 5: 25-26
- Bayerdorffer E.H., Oertel N., Lehn G., Kasper G.A., Mannes T., Sauerbruch and Stolte M. (1989) Topographic association between active gastritis and *Campylobacter pylori* colonisation. *Journal of Clinical Pathology*. 42: 834-839.
- Berche P., Gaillard J.L., Simonet M. (1988) Bactériologie, bactéries des infections humaines. *Edition Flammarion*. 6: 77-92.
- Bélangier A., Musabyimana T. (2005) Le Neem contre les insectes et les maladies. In: *Journée horticoles*.
- Biyiti L.F., Meko'o D.J.L., Tamze V., Amvam Zollo P.H. (2004) Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Pharmacie Médicinale Traditionnelle Africaine*. Vol.13: 11-20.
- Blanco S., Forne M., Lacombe., Prat C., Cuesta M.A., Latorre I., Viver J.M., Fernández G., Molinos S., Domínguez J. (2008) Comparison of stool antigen immunoassay methods for detecting *H. pylori* infection before and after eradication treatment. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 61: 150-155.
- Bourgeois A. (1999) *Les MSTISIDA au Cameroun .Biodiagnostic and therapy.Magazine bilingue de santé au Cameroun N°004*.
- Brown L.M. (2000) *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiology Reviews*. 22: 283-297.

- Brunetton J. (1999) Pharmacognosie, phytochimie, Plantes Médicinales, 3, paris, Lavoisier Tec et Doc, 1120.
- Bryant R.E., Hartstein A.I. (1987) Oral ciprofloxacin in refractory Gram-negative bacillary infections. *International Journal of clinical Pharmacology Reviews*. 7 (3): 1987 -94.
- Caceres A., Cabrera O., Morales O., Mollinedo P., Mendia P. (1991) Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 33: 213-216.
- Censini S., Lange C., Xiang Z., Crabtree J.E., Ghiara P., Borodovsky M., Rappuoli R., Covacci A.(1996) cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA*. 93:14648-14653.
- Courillon-Mallet A., Launay J.M., Roucayrol A.M. (1994) *H. pylori* infection: physiological implication of N-methyl Histamine. *Gastroenterology*. 106: 64.
- Cowan M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564-582.
- Delaney B., Moayyedi P., Forman D. (2002) *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Evidence*. 8: 453-468.
- Diafouka A. (1997) Analyse des plantes médicinales des quatre régions du Congo. Thèse doctorat Univers. Libre Bruxelles. 434 pages.
- Dong Q.J., Wang Q., Xin Y.N., Li N., Xuan S.Y. (2009) Comparative genomics of *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*. 15:3984-3991.
- Eloff J.N. (1998) Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*. 60: 1-8.
- Fabry W., Okemo P., Ansorg R. (1998) Antibacterial activity of East African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 60:79–84.
- Fakeye T.O., Itiola O.A., Odelola H.A. (2000) Evaluation of the antimicrobial property of the stem bark of *Picralima nitida* (Apocynaceae). *Phytotherapy Research*. 14 (5):368-370.

- Falush D., Wirth T., Linz B., Pritchard J.K., Stephens M., Kidd M., Blaser M.J., Graham D.Y., Vacher S., Perez-Perez G.I., Yamaoka Y., Mégraud F., Otto K., Reichard U., Katzowitsch E., Wang X., Achtman M., Suerbaum S. (2003) Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations of *Sciences*. 299:1582-1585.
- Fauchere J.L. (1994) Virulence de *H. pylori*: interaction avec la muqueuse gastrique. *Analyses Médicinales. Nancy-Est*. 33: 81-84.
- Fischbach L.A., van Zanten S., Dickason J. (2004) Meta-analysis: the efficacy, adverse events, and adherence related to first-line anti-*Helicobacter pylori* quadruple therapies. *Aliment Pharmacology Therapy*. 20:1071-1082.
- Fitzgerald O., Murphy P. (1950) Studies on the physiological chemistry and clinical significance of urease and urea with special reference to the stomach. *International Journal of Medicinal Sciences*. 292:97-159
- Garrity G., Bell M., Lilburn J.A.II. (2005) *Helicobacteraceae* fam. nov. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology New York, NU. Publied. Springer. 1168-1194.
- Glupczvnski Y. (1994) Epidémiologie de l'infection à *H. pylori* et méthodes diagnostiques. *Analyses Médicales. Nancy-Est*. 33: 89-93.
- Goodwin C.S., Armstrong J.A., Chilvers T., Peters M., Collins D., Sly L., McConnell W., Harper W.E.S. (1989) Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. and *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. respectively. *International System of Bacteriology*. 39: 397-405.
- Graham D.Y., Klein P.D., Evans D.J.Jr., Evans D.G., Alpert L.C., Opekun A.R., Boutton T.W (1987) *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the 13C-urea breath test. *Lancet*.1:1174-1177.
- Graham D.Y., Lu H., Yamaoka Y. (2007) A report card to grade *Helicobacter pylori* therapy. 12:275-278.
- Hakizamungu E., Weri M. (1988) Usage de plantes médicinales dans le traitement du paludisme en médecine traditionnelle Rwandaise. *Revue de la médecine traditionnelle et pharmacopée*. 2(1): 11-18

- Hang M. (1999) Basic technics for microbiological research in: Microbiological research technics. Laboratory of Microbiology Cooperative project in higher education between China and Cameroon. *Science Press, Beijing*: 29.
- Hazell S.L., Evans D.J.Jr., Graham D.Y. (1991) *Helicobacter pylori catalase*. *Journal of Genetics Microbiology*.137:57-61.
- Hazell S.L., Lee A., Hennessy W. (1986) *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *Journal of Infectious Diseases*. 153:658-663.
- Heep M., Beck D., Bayerdörffer E., Lehn N. (1999) Rifampin and rifabutin resistance mechanism in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 43: 1497-1499.
- [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2005/press.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/press.html). The 2005 Nobel Prize in Physiology or Medicine". Nobelprize.org. Visité le 21 juin 2015
- Kivi M., Tindberg Y. (2006) *Helicobacter pylori* occurrence and transmission: a family affair *Scand Journal of Infectious Diseases*. 38:407-417.
- Kouam J., Mabeku L.B.K., Kuate J.R., Tiabou A.T., Fomum Z.T. (2011) Antimicrobial glycosides and derivatives from roots of *Picralima nitida*. *International Journal of Chemotherapy*. 3: 23-31.
- Kouitcheu M.L.B., Kuate J.R., Oyono E.J.L. (2011) Screening of some plants used in the Cameroonian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *International Journal of Biology*. 3(4), 13-21.
- Kouitcheu L.B.M., Tamesse J.L., Kouam J. (2013) The anti-shigellosis activity of the methanol extract of *Picralima nitida* on *Shigella dysenteriae* type I induced diarrhoea in rats. *BMC* 13: 211.
- Koyama J. (2006) Anti-infective quinone derivatives of recent patents. *Recent patents on Anti-infective Drug Discovery*. 1(1): 113-125.
- Kuete V., Ngameni B., Fotso S.C.C., Kengap T.R., Tchaleu N.B., Meyer J.J.M., Lall N., Kuate J.R. (2008) Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 120: 18-24.

- Kuete V. (2010) Potential of Cameroonian Plants and Derived Products against Microbial Infections: A Review. *Planta Medica*.
- Kuete V., Efferth T. (2010) Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. *Front Pharmacol*. 1:123.
- Kuiate J.R., Mouokeu S., Wabo K.H., Tane P.(2007) Antidermatophytic Triterpenoids from *Zysygium jambos* (L.), Alston. *Phytoterapia research*. 21: 149-152.
- Kusters J.G., Gerrits M.M., VanStrijp J.A.G., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E. (1997) Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect. Immun*.65:3672-3679.
- Langenberg M., Tytgat G.N., Schipper M.E.S. (1984) Campylobacter-like organism in the stomach of patients and healthy individuals. *Lancet*.1: 1348-1349.
- Leclerc H. (2006) Epidemiological aspects of *Helicobacter pylori* infection. In: Pubmed.
- Lin J., Opoku A.R., Geheeb- keller M., Hutchings A.D., Terblanche S.E., Jager A.K., and Van staden J. (1999) Preliminary screening of some traditional Zulu medicinal plants for anti-inflammatory and anti-microbial activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 68:67-74.
- Linz B., Balloux F., Moodley Y., Manica A., Liu H., Roumagnac P., Falush D., Stamer C., Prugnolle F., van der Merwe S.W., Yamaoka Y, Graham D.Y., Perez-Trallero E., Wadstrom T., Suerbaum S., Achtman M. (2007) An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*. 445:915-918.
- Luck J.M., Seth T.N. (1924) Gastric urease. *Biochemycal Journal*. 18:1227-1231.
- Madhavi D.L., Deshpandle S.S. and Salumkhe D.K., (1996) Food antioxidants, Technological, Toxicological, and health perspectives. *Marcel Dekker*, New york.
- Maier R.J., Fu C., Gilbert J., Moshiri F., Olson J., Plaut A.G. (1996) Hydrogen uptake hydrogenase in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiology Letters*.141:71-76.
- Malfertheiner P., Mégraud F., O'Morain C., Bazzoli F., El-Omar E., Graham D., Hunt R., Rokkas T., Vakil N., Kuipers E.J. (2007) Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*.56:772-781.

- Marshall B.J. (1983) Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1:1273-1275.
- Marshall B.J., Goodwin C.S. (1987) Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37:68.
- Marshall B.J., Royce H., Annear D.I., Goodwin C.S., Pearman J.W., Warren J.R., Armstrong J.A. (1984) Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbiology Letters*. 25:83-88.
- Marshall B.J., Windsor H.M. (2005) The relation of *Helicobacter pylori* to gastric adenocarcinoma and lymphoma: pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention. *Medicinal Clinical of North America*. 89:313-344.
- Mativandlela S.P.N., Lall N., Meyer J.J.M. (2006) Antibacterial, antifungal and antitubercular activity of (the roots of) *Pelargonium reniforme* (CURT) and *Pelargonium sidoides* (DC) (Geraniaceae) root extracts *S. Afr. J. Bot.*, 72: 232–237.
- Mégraud F. (1995) Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment Pharmacology Therapy*. 9(2):85-91.
- Mégraud F., Bonnet F., Garnier M., Lamouliatte H. (1985) Characterization of *Campylobacter pyloridis* by culture, enzymatic profile, and protein content. *Journal of Clinical Microbiology*. 22:1007-1010.
- Mégraud F., Lehours Ph. (2007) *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 20: 280-322.
- Makristathis A., Pasching E., Schütze K., Wimmer M., Rotter M.L., Hirschl A.M. (1998) Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immune assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 2772-2774.
- Miendje D.V.Y (2011) Contribution au management de l'infection à *Helicobacter pylori* en Belgique. *Université Libre De Bruxelles*.70:16
- Miendje D.V.Y., Bentatou Z., Maaroufi Y., Scaillon M., Cadranel S., Burette A., Reynders M. (2010) The diagnosis of resistance of *H. pylori* by other methods than culture: what, how costs and availability. *Acta Gastroenterology Belgium*.73:101.

- Mobley H.L.T., Cortesia M.J., Rosenthal L.E., Jones B.D. (1988) Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*. 26: 831-836.
- Ndip R.N., Ajonglefac A.N., Wirna T., Ngwa F., Mbullah S.M., Tanih N.F., Akoachere J.F.T.K., Ndip L.M., Luma H.N., Wirmum C., Efange S.M.N. (2009) *In vitro antimicrobial activity* of Cameroonian medicinal plants on clinical isolates of *Helicobacter pylori*: *Ageratum conyzoides* (abstract PO 68) In: Proceeding of the 21<sup>st</sup> scientific congress of the Austrian Pharmaceutical Society, April 16 -18 th, Vienna, Austria. *Sciences Pharmaceutica*. 77: 267.
- Ndjitoyap N.E.C., Tzeuton C., Mbakop A., Pouepene J., Guemne T.A., Njoya O., Tagne S.M., Ngu L.J. (1990) Endoscopie digestive haute au Cameroun. *Médecine d'Afrique Noire*. 37 (9): 453-456.
- Neri M., Milano A., Laterza F., Di Bonaventura G., Piccolomini R., Caldarella M.P., Balatsinou C., Lapenna D., Cuccurullo F. (2003) Role of antibiotic sensitivity testing before first-line *Helicobacter pylori* eradication treatments. *Aliment Pharmacology Therapy*. 18: 821-7.
- 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: 57-63.
- Nunes Y.R.F., Giovana R.L., Braga L.L. (2005) Phenology of Tree Species Populations in Tropical Dry Forests of Southeastern Brazil *Lundiana* 6 (2): 99-105.
- OMS. (2002) Stratégie de l'OMS pour la médecine Traditionnelle pour 2002-2005.
- Ouedraogo D. (1999) *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst. Le petit arbre qui guérit plaies et ulcères. *Arbre et Développement*, bulletin de liaison du ministère du Tourisme et de l'Environnement, 24 (1<sup>er</sup> trimestre). 4: 31.
- Pesci E.C., Pickett C.L. (1994) Genetic organization and enzymatic activity of a superoxide dismutase from the microaerophilic human pathogen, *Helicobacter pylori*. *Genetics*. 143:111-116.

- Poon S.K., Chang C.S., Su J., Lai C.H., Yang C.C., Chen G.H., Wang W.C. (2002) Primary resistance to antibiotics and its clinical impact on the efficacy of *Helicobacter pylori* lansoprazole-based triple therapies. *Aliment Pharmacology Therapy*. 16: 291-6.
- Saika D., Khanuja S.P.S., Kahol A.P., Gupta S.C., Kumar S. (2001) Comparative antifungal activity of essential oils and constituents from three distinct genotype of *Cymbopogon* spp. *Current science*. 80(10): 1264-1266.
- Salama N., Guillemin K., McDaniel T.K., Sherlock G., Tompkins L., Falkow S.A. (2000) Whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 97: 14668-14673.
- Satyavati G.V., Raina M.K., Sharma M. (1976) *Medicinal Plants of India*, vol. 1.
- Scalbert A. (1991) Antimicrobial properties of tanins. *Phytochemistry*, 30 (12): 3875-3883.
- Smith-Palmer., Stewart A.J., Fyfe L. (1998) Antimicrobial food-borne pathogens. *Applied Microbiology*. 26: 118-122.
- Singh S., Sathpathy B.S., Sahoo R.K., Subudhi E., Nayak S. (2011) *In vitro* Validation and Phyto-constituent Analysis of Turmeric Extract: An Ethnological Alternative for Eye Treatment. *Research Journal of Medicinal Plant*. 5: 330-337.
- Spangler S.K., Jacobs M.R., Appelbaum P.C. (1997) Bactericidal activity of DU-6859 a compared to activities of three quinolones, three beta-lactams, clindamycin, and metronidazole against anaerobes as determined by time-kill methodology. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 4 (4): 847-9.
- Sparg S.G., Light M.E., Staden J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. 94(2-3), 219-243.
- Stern L.A., Kirby S.H., & Durham W.B. (1996) Peculiarities of methane clathrate hydrate formation and solid-state deformation, including possible superheating of water ice, *Sciences*. 273, 5283, 1843-1848.
- Suerbaum S., Josenhans C. (2007) *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *National Reviews of Microbiology*. 5: 441-452.

- Tankovic J., Lamarque D., Lascols C., Soussy C.J., Delchier J.C. (2001) Clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* has a major impact on the efficacy of the omeprazole-amoxicillin-clarithromycin therapy. *Pathology Biology* (Paris). 49: 528-33.
- Thomson A.B. (1997) "A suggested approach to patients with dyspepsia." *Can Journal of Gastroenterology*. 11(2): 135-40.
- Toracchio S., Cellini L., Di Campli E., Cappello G., Malatesta M.G., Ferri A., Ciccaglione A.F., Grossi L., Marzio L. (2000) Role of antimicrobial susceptibility testing on efficacy of triple therapy in *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacology Therapy*. 14: 1639-43.
- Tsuda M., Karita M., Morshed M.G., Okita K., Nakazawa T.A. (1994) Urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect Immun*. 62: 3586-3589.
- Vale F.F., Vitor J.M. (2010) Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: does food play a role in rural and urban areas? *International Journal of Food Microbiology*. 138: 1-12.
- Van der Hulst R.W.M., Verheul S.B., Weel J.F.L., Gerrits Y., Tenkate F.J.W., Dankert J., Tytgat G.N.J. (1996) Effect of specimen collection techniques, transport media, and incubation of cultures on the detection rate of *Helicobacter pylori*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 15: 211-215.
- Van der Wouden E.J., Thijs J.C., van Zwet A.A., Sluiter W.J., Kleibeuker J.H. (1999) The influence of in vitro nitroimidazole resistance on the efficacy of nitroimidazole containing anti-*Helicobacter pylori* regimens: a meta-analysis. *Am Journal Gastroenterology*. 94:17-18
- Vanden B.D.A., Vlietinck A.J. (1991) Methods in plant Biochemistry: Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agents from Higher Plants. Dey PMP, Harbone J B, editors. London: *Academic Press*. 6: 47-69.
- Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Gerrits M.M., van Strijp J.A.C., Kusters J.C. (1999) Les formes coccoïdes: signification Clinique et biologique. *Letters Infectious*. 14 (1): 22-26.
- Widelski J., Popova M., Graikou., Glowniak K., Chinou I. (2009) Coumarins from *Angelica lucida* L. *Antibacterial Activities Molecules*. 14: 2729-2734.

-[www.bacteriologie.net/medicale/helicobacter.html](http://www.bacteriologie.net/medicale/helicobacter.html) (Pr. J.P. Euzéby). Autres espèces bactériennes du genre *Helicobacter* et les pathologies associées. Visité le 21 juin 2015

-[www.helicobacter.com/h\\_epidemiology.html](http://www.helicobacter.com/h_epidemiology.html) « *Helicobacter* Foundation 2006 ». Site web du Prix Nobel de Médecine et de Physiologie. Visité le 11 novembre 2015.

-Xiao S.D., Liu W.Z., Xia D.H., Jiang S.J., Wang R.N., Zhang Z.H., Xu W.W. (1990) The efficacy of furazolidone and metronidazole in the treatment of chronic gastritis associated with *Helicobacter (Campylobacter) pylori* a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Hepatogastroenterology*. 37: 503-506.

-Yahaya T.A., Igwe S., Hafsat B. (2011) Gastro-protective Effect of *Crossopteryx febrifuga* Wister Rats. *African Journal of Traditional Medicine*. 8 (3): 219-223.

-Yamahara J., Mochizuki M., Fujimura R., Takaishi Y., Yoshida M., Tomimatsu T., Tamai Y. (1990) *Anti-ulcer action of Sophora flavescens root and an active constituent*. *Journal of Ethnopharmacology*. 29: pp173-177.

-Yemoa A.L., Gbenou J.D., Johnson R.C., Djego J.G., Zinsou C., Moudachirou M., Quetin-Leclercq J., Bigot A., Portaels F. (2008) Identification et étude phytochimique des plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin. *Ethnopharmacologia*. 42, 48-55.

# **ANNEXES**



*Acacia albida* (photo prise par Wangnamou, Mars 2015)



*Ageratum conyzoides* (photo prise par Wangnamou, Mars 2015)



*Azadirachta indica* (photo prise par Wangnamou, Mars 2015)



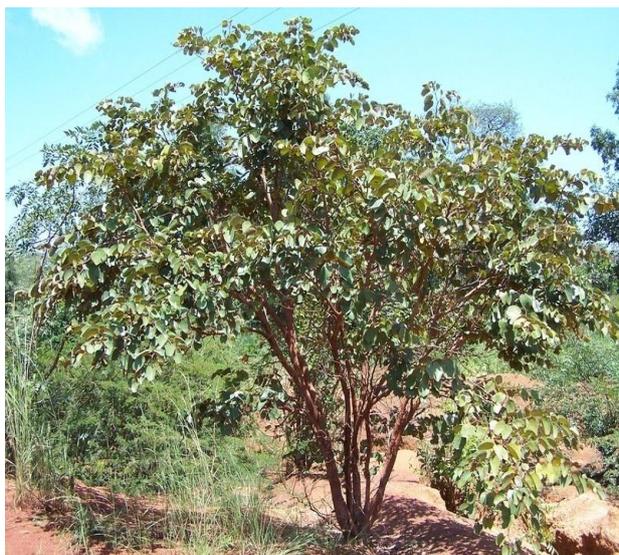
*Crossopteryx febrifuga* (photo prise par Wangnamou, Mars 2015)



*Kaya senegalensis* (photo prise par Wangnamou, Mars 2015)



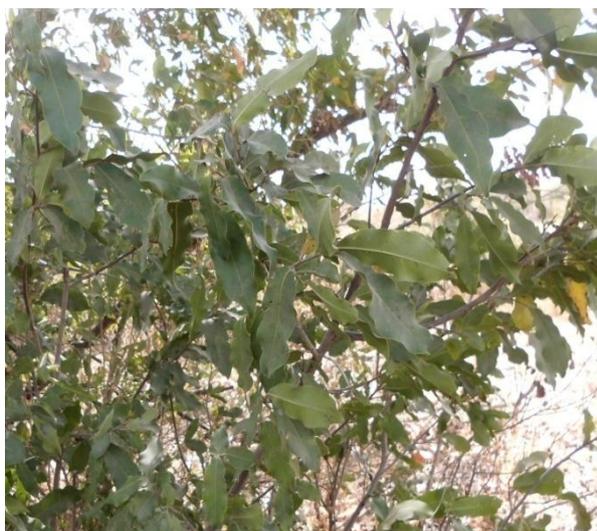
*Moringa oleifera* (photo prise par Wangnamou, Juillet 2015)



*Piliostigma reticulatum* (photo prise par Wangnamou, Mars 2015)



*Picralima nitida* (photo prise par Kouitchou, Septembre 2015)



*Afzelia africana* (photo prise par Wangnamou, Mars 2015)

#### **ANNEXE 1. Images des plantes utilisées**



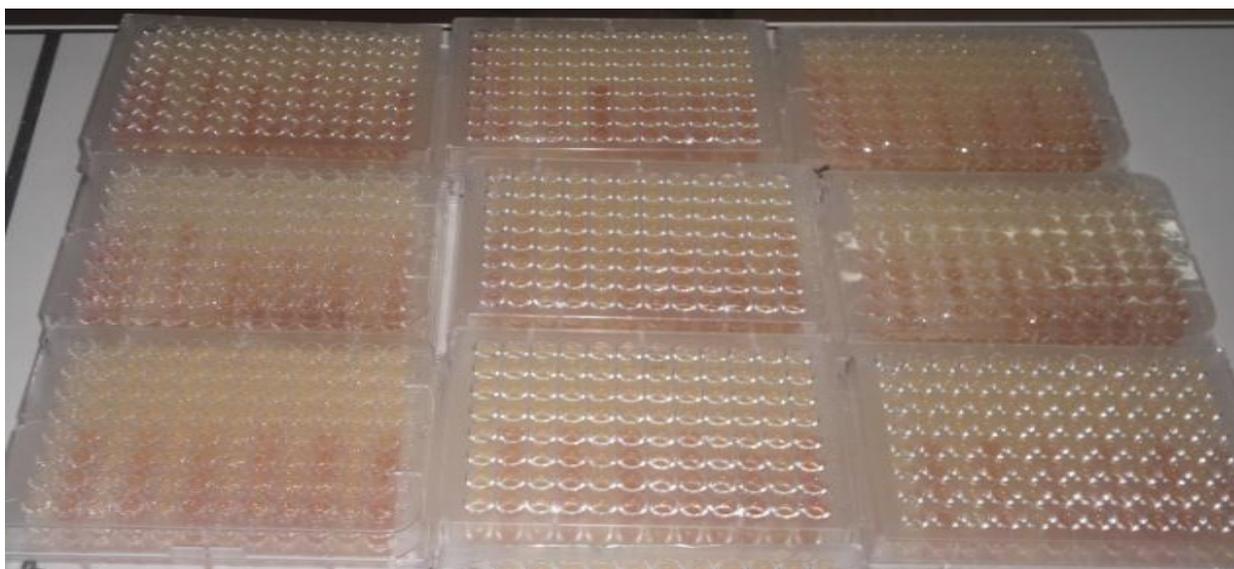
**ANNEXE 2. Identification de la bactérie** (photo prise par Wangnamou, Août 2015)



**ANNEXE 3. Colonies fraîches de *H. p* en stries** (photo prise par Wangnamou, Août 2015)



**ANNEXE 4. Plaques de microtitration prête pour incubation** (photo prise par Wangnamou Août 2015)



**ANNEXE 5. Révélation du test antimicrobien après 48h d'incubation** (photo prise par Wangnamou, Août 2015)

#### **Milieu BHIB**

- Beef heart, infusion from 250 ml
- Calf brain, infusion from 200ml
- Proteose peptone 10g
- Sodium chloride 5g
- Dextrose 2g
- Disodium phosphate 2,5g
- pH 7,4±0,2

#### **Milieu Columbia**

- Polypeptones: 17,0 g/L
- Peptone pancréatique de cœur: 3,0 g/L
- Amidon de maïs: 1,0 g/L
- Chlorure de sodium: 5,0 g/L
- Extrait de levure: 3,0 g/L
- Agar: 13,5 g/L
- pH= 7,3 ± 0,2

#### **ANNEXE 6. Composition de quelques milieux**