

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE

LABORATORY OF MICROBIOLOGY

**ACTIVITE ANTIMYCOBACTERIENNE ET CIBLES CELLULAIRES
DES HUILES ESSENTIELLES DE QUATRE PLANTES UTILISEES
DANS LE TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE À YABASSI ET
NKONDJOCK (Littoral-Cameroun)**

“ THESE ”

« Présentée et soutenue en vue de l'obtention du Doctorat/Ph.D en Microbiologie »

Spécialité : Microbiologie Médicale

Par

MONI NDEDI Esther Del Florence

Matricule : 06R590

Master ès-sciences

Devant le Jury composé de :

Président : ESSIA NGANG Jean J., Professeur, Université de Yaoundé I

Rapporteurs : ETOA François-Xavier, Professeur, Université de Yaoundé I
NYEGUE M. Ascension, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I

Membres : NGONO NGANE Rosalie Anne, Professeur, Université de Douala
TATSADJIEU NGOUNE Léopold, Professeur, Université de Ngaoundéré
RIWOM ESSAMA Sara H., Maître de Conférences, Université de Yaoundé I

Année académique 2018-2019

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

ANNÉE ACADEMIQUE 2018/2019
 (Par Département et par Grade)
DATE D'ACTUALISATION 19 Février 2019

ADMINISTRATIO N

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*
VICE-DOYEN / DPSAA : DONGO Etienne, *Professeur*
VICE-DOYEN / DSSE : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Maître de Conférences*
VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*
Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., *Maître de Conférences*
Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR : MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (37)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
2	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
3	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
4	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
5	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
6	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
7	ATOUGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
8	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
9	BIGOGA DIAGA Jude	Maître de Conférences	En poste
10	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
11	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
12	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste
13	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
14	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
15	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
16	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
17	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
18	AKINDEH MBUH NJI	Chargée de Cours	En poste
19	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
20	DAKOLE DABOY Charles	Chargée de Cours	En poste
21	DJOKAM TAMO Rosine	Chargée de Cours	En poste
22	DJUIDJE NGOUNOU Marcelline	Chargée de Cours	En poste
24	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
25	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste

26	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
27	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
28	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
29	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
32	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
33	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Chargée de Cours	Inspecteur de Service MINESUP
34	PACHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargée de Cours	En poste

37	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
----	---------------------------------	------------	----------

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (44)

1	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
4	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>VDoyen/FMSB/UIYI</i>
5	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
6	KAMGANG René	Professeur	<i>C.S. MINRESI</i>
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>

13	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Maître de Conférences	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
14	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
15	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	En poste
20	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
16	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
17	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
18	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
19	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
21	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
22	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste

23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
24	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste

25	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
26	BILANDA Danielle Claude	Chargée de Cours	En poste
27	DJIOGUE Séfirin	Chargée de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
32	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
33	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
34	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargée de Cours	En poste
35	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
36	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
37	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
38	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
39	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
40	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste

43	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
44	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (27)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
4	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
5	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

6	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
7	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
8	DJOCGOUE Pierre François	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/UDs
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
14	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
15	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste

16	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
17	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
18	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
19	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
20	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
22	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
23	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste

24	NSOM ZAMO Annie Claude épouse PIAL	Chargée de Cours	<i>Expert national/UNESCO</i>
25	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste
26	DJEUANI Astride Carole	Assistante	En poste
27	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistante	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (32)

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

10	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KONG SAKEO	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
16	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	<i>Vice Chancellor/UB</i>
17	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste

20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NDI NSAMI Julius	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	Inspecteur de Service MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (32)			
1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDS
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	En poste
4	NKENGFAK Augustin Ephreïm	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Directeur/UN</i>
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste

8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ Rectorat/UYI</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service DPER</i>
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
11	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
13	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
15	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
17	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
18	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
20	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
21	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste

22	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
23	FOTSO WABO Ghislain	Chargé de Cours	En poste
24	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
25	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
26	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
27	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Chargé de Cours	En poste
28	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Chargé de Cours	Chef Service/MINESUP
29	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
31	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste

32	NGNINTEDO Dominique	Assistant	En poste
----	---------------------	-----------	----------

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

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

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

4	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	En poste
---	-----------------	-----------------	----------

5	DJAM Xaviera YOUHEP KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
7	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
8	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
10	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
11	KAMGUEU Patrick Olivier	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset/Ebolawa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EBELE Serge	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistante	En poste
23	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (28)

1	BITJONG NDOMBOL	Professeur	<i>En poste</i>
2	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste

3	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
4	EMVUDU WONO Yves S.	Maître de Conférences	<i>CD Info/ Chef division MINESUP</i>
5	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
6	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
7	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda

8	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
9	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
10	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
11	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
12	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
13	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
14	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
15	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
16	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
17	MBEHOU Mohamed	Chargé de Cours	En poste
18	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste

19	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
20	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
21	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
22	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
23	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
24	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
25	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
26	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
27	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (12)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMPM
2	ETOA François Xavier	Professeur	Chef de Département/FS/Uyi Recteur Université de Douala

3	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
4	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
5	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

8	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
9	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
10	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
11	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
3	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
4	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
5	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
6	NJOMO Donatien	Professeur	En poste
7	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
8	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
9	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
10	WOAFO Paul	Professeur	En poste

	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
--	---------------------	-----------------------	----------------

14	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
12	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
15	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Division. UN</i>
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA ENGO Serge Guy	Maître de Conférences	Director/Students/Affairs. UB
21	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
22	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
23	SAIDOU	Maître de Conférences	Sous Directeur/Minresi
24	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
25	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
26	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
27	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
28	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste

29	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
30	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
31	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
32	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
33	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
34	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
35	MEL'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	<i>En poste</i>
36	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
37	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
38	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
39	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

40	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
----	---------------	-----------	----------

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

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	MEDJO EKO Robert	Professeur	<i>Conseiller Technique/UYII</i>
5	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/UMa
10	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
11	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
12	NGOS III Simon	Maître de Conférences	DAAC/Uma
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	En poste
35	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
37	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
38	NGUEUTCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	CEA/MINRESI
39	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
36	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargée de Cours	En poste
40	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
41	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
42	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
43	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

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

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	5 (1)	12 (6)	19 (11)	1 (1)	37 (19)
BPA	12 (1)	10 (5)	20 (07)	2 (0)	44 (13)
BPV	5 (0)	10(2)	9 (04)	2(02)	26 (9)
CI	9(1)	9(2)	14 (3)	0 (0)	32 (6)
CO	7 (0)	14 (4)	10 (4)	1 (0)	32(8)
IN	2 (0)	1 (0)	13 (0)	10 (3)	26 (3)
MAT	2 (0)	4 (1)	19 (1)	2 (0)	27 (2)
MIB	2 (0)	5 (2)	5 (1)	0 (0)	12 (3)
PHY	10 (0)	17(2)	11 (3)	1 (0)	39 (5)
ST	7 (1)	15 (1)	21 (5)	1 (0)	43(7)
Total	61 (4)	97 (25)	141 (39))	19(6)	318 (75)

Soit un total de **318 (75)** dont :

- Professeurs **61 (4)**
- Maîtres de Conférences **97(25)**
- Chargés de Cours **141 (39)**
- Assistants **18(5)**

() = Nombre de Femmes

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS.....	i
TABLE DES MATIERES	xi
DEDICACE.....	xvii
REMERCIEMENTS.....	xviii
LISTE DES ABREVIATIONS	xxi
LISTE DES FIGURES.....	xxiii
LISTE DES TABLEAUX	xxv
LISTE DES PHOTOS.....	xxvi
LISTE DES ANNEXES	xxvii
RÉSUMÉ.....	xxviii
ABSTRACT	xxx
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE	5
I.1. GENERALITES SUR LA TUBERCULOSE.....	5
I.1.1. Définition et description	5
I.1.2. Etiologie.....	5
I.1.2.1. Taxonomie des Mycobactéries	5
I.1.2.2. Le complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
I.1.3. Epidémiologie dans le monde.....	7
I.1.3.1. En Afrique.....	8
I.1.3.2. Epidémiologie au Cameroun.....	8
I.1.4. Caractère bactériologique des bactéries du complexe	9
I.1.4.1. Morphologie et culture.....	9
I.1.4.2. Caractéristiques du génome de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....	9
I.1.4.3. Caractères particuliers de la paroi.....	12
I.1.5. Physiopathologie de la tuberculose.....	12
I.1.5.1. Pathogenèse.....	12
I.1.5.2. Tuberculose extra-pulmonaire	14
I.1.6. Diagnostic	15
I.1.6.1. Examen microscopique.....	15

I.1.6.2. Culture en milieu solide ou liquide	15
I.1.6.3. La radiographie	15
I.1.6.4. Diagnostic génique.....	16
I.1.7. Mesure de prévention de la tuberculose.....	17
I.1.8. Traitement aux antituberculeux et problèmes de résistance	17
I.1.8.1. Traitement aux antituberculeux	17
I.1.8.2. Mode d'action des antituberculeux	18
I.1.9. La résistance bactérienne aux antituberculeux et effets secondaires	22
I.1.9.1. La résistance naturelle.....	22
I.1.9.2. La résistance acquise aux antituberculeux	22
I.1.9.3. Effets secondaires des antituberculeux	23
I.1.9.4. Intérêt de la recherche de nouveaux antituberculeux.....	23
I.2. GENERALITES SUR LA MEDECINE TRADITIONNELLE ET PHYTOTHERAPIE ..	24
I.2.1. Médecine traditionnelle	24
I.2.1.1. Définition	24
I.2.1.2. Intérêt et mode d'utilisation	24
I.2.2. Phyto-aromathérapie	25
I.2.2.1. Définition	25
I.2.2.2. Importance et dangers de la phytothérapie	26
I.2.2.3. Les étapes du développement d'un phytomédicament	26
I.3. GÉNÉRALITÉS SUR LES HUILES ESSENTIELLES DES PLANTES ET LEURS PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.....	28
I.3.1. Hydrocarbures terpéniques	29
I.3.2. Terpenoïdes.....	29
I.3.3. Phénylpropènes	30
I.3.4. Techniques d'extraction des huiles essentielles.....	32
I.3.5. Méthodes d'analyse et d'identification des huiles essentielles.....	33
I.3.5.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	33
I.3.5.2. Couplage chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)	33
I.3.6. Mécanismes d'action antibactérienne des huiles essentielles.....	33
I.3.6.1. Action contre le <i>quorum sensing</i>	34
I.3.6.2. Action des HEs au niveau de la membrane plasmique	35
I.3.6.3. Action au niveau des biomolécules cellulaires (ADN, ARN et les protéines)	36

I.4. GENERALITES SUR LES METHODES D’EVALUATION DU MECANISME D’ACTION DES COMPOSES NATURELS.....	38
I.4.1. Méthodes d’évaluation du mécanisme d’action sur la paroi ou la membrane	39
I.4.2. Méthodes d’évaluation du mécanisme d’action sur le matériel génétique	39
I.4.3. Méthodes d’évaluation du mécanisme d’action sur la synthèse protéique	40
I.5. METHODES D’EVALUATION DE L’ACTIVITE ANTI-MYCOBACTERIENNE <i>IN</i> <i>VITRO</i>	40
I.5.1. Méthode qualitative	40
I.5.1.1. Méthode de dilution en milieu solide.....	40
I.5.1.2. Méthodes quantitatives	41
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	42
II.1. MATERIEL	42
II.1.1. Matériel pour la collecte des données de l’enquête ethnobotanique	42
II.1.2. Matériel végétal utilisé pour l’extraction des huiles essentielles	42
II.1.3. Matériel microbiologique	42
II.1.3.1. Souches microbiennes	42
II.1.3.2. Milieux de culture.....	42
II.1.4. Réactifs chimiques et antituberculeux de référence	43
II.1.5. Dosage spectrophotométrique au NanoDrop 1000.....	43
II.1.6. Extraction de l’ADN.....	43
II.1.7. Amplification par PCR	43
II.1.8. Électrophorèse de l’ADN extrait des cellules traitées aux HEs, de leurs amplicons et des cellules saines.....	44
II.2. METHODES.....	45
II.2.1 Etude ethnobotanique des espèces végétales utilisées dans le traitement de la tuberculose	47
II.2.1.1 Description de la zone d’étude	47
II.2.1.2. Collection des informations et échantillonnage des espèces végétales	49
II.2.1.3 Traitement des données ethnobotaniques	50
II.2.2. Extraction et détermination de la composition chimique des huiles essentielles	50
II.2.2.1. Extraction des huiles essentielles	51
II.2.2.2 Réalisation des combinaisons	51
II.2.2.3. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles et combinaisons.	52

II.2.3. Evaluation de l'activité antimycobactérienne détermination des paramètres d'inhibition (CMI et CMB).....	54
II.2.3.1. Préparation des solutions mères d'huiles essentielles/combinaisons et d'antituberculeux de référence	54
II.2.3.2. Repiquage des souches et préparation de l'inoculum.....	54
II.2.3.4. Détermination des paramètres d'inhibition CMB et CMI des HEs/combinaisons.....	55
II.2.4. Recherche des cibles cellulaires des huiles essentielles testées sur <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	58
II.2.4.1. Effet des huiles essentielles sur la paroi et la membrane de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	59
II.2.4.2. Effet des huiles essentielles sur l'ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	61
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	67
III.1. ETUDE ETHNOBOTANIQUE DES ESPECES VEGETALES UTILISEES POUR LE TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE.....	67
III.1.1 Résultat sur les éléments utilisés dans le diagnostic de la tuberculose	67
III.1.2. Connaissance sur les espèces végétales utilisées dans le traitement de la tuberculose	68
III.1.3. Amaryllidaceae.....	69
III.1.4. Annonaceae	71
III.1.5. Asteraceae	72
III.1.6. Pentadiplandraceae	74
III.1.7. Putranjivaceae	75
III.1.8. Myrtaceae	76
III.1.9. Lamiaceae.....	77
III.1.10. Zingibereceae	79
III.1.11. Connaissances sur les modes de préparation/voies administrations des recettes médicamenteuses et revue de littératures des espèces végétales recensées	81
III.1.12. DISCUSSION PARTIELLE	85
III.1.13. CONCLUSION PARTIELLE :	87
III.2. EXTRACTION ET DETERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES	87
III.2.1. Extraction des huiles essentielles	88
III.2.2. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles et leurs combinaisons.....	88
III.2.3. Discussion partielle	93

III.2.4. Conclusion partielle :	97
III.3. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMYCOBACTERIENNE DES HUILES ESSENTIELLES ET COMBINAISONS : DETERMINATION DES PARAMETRES D'INHIBITION (CMI ET CMB)	97
III.3.1. Discussion partielle	105
III.3.2. Conclusion partielle :	108
III.4. RECHERCHE DES CIBLES CELLULAIRES DES HUILES ESSENTIELLES SUR <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	108
III.4.1. Effets des huiles essentielles sur la paroi et la membrane des souches testées	108
III.4.2. Effets des huiles essentielles sur l'ADN des souches testées.....	112
III.4.3. Discussion partielle :	125
III.4.4. Conclusion partielle.....	130
III.5. DISCUSSION GENERALE :.....	131
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	134
CONCLUSION :	134
PERSPECTIVES :.....	135
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	136
ANNEXES.....	A

A LA MEMOIRE DE

Mon feu grand-père NDEDI BEONG Emmanuel et *ma feu maman* MAMI
NDEDI Madeleine

DEDICACE

A mon fils Francis De Lavoisier NDEDI DE MBOULE.

REMERCIEMENTS

La conception et la finalisation de cette thèse n'aurait été possible sans la collaboration et le soutien indéfectible de nombreuses personnes et institutions, que j'ai l'honneur et le plaisir de remercier.

Ma profonde gratitude va d'abord à l'endroit de mon Directeur, le **Professeur François-Xavier ETOA**, Chef de Département de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I. Ce fut pour moi un immense privilège de bénéficier de votre savoir averti, de votre encadrement scientifique.

Ce travail est également le résultat de l'encadrement et du soutien inestimable du **Professeure Maximilienne Ascension NYEGUE**, qui s'est impliquée de très près dans sa direction afin d'assurer son fond et sa forme, malgré ses multiples occupations académiques. Vos précieux conseils ont fait de moi une femme forte et déterminée tout au long de la réalisation de ce travail. Vous avez fait de moi votre premier enfant j'en suis consciente même si je n'ai pas toujours su être à la hauteur de vos attentes.

Je remercie grandement les **membres du jury** de cette thèse pour leur disponibilité et leurs critiques qui permettront d'améliorer ce travail.

J'ai une reconnaissance particulière à l'endroit du **Professeur Jean Justin ESSIA NGANG** pour tous les sacrifices entrepris pour le bon fonctionnement du Département de Microbiologie et notre formation académique en particulier.

J'exprime aussi ma profonde gratitude à **Professeure Chantal MENUT** de l'**Equipe « Glyco et Nanovecteurs pour le Ciblage Thérapeutique »** de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron de l'Université de Montpellier II, pour sa contribution sans aucune contrainte aux analyses chimiques de l'ensemble des huiles essentielles et combinaisons.

J'ai aussi une reconnaissance particulière au **Professeure Florentine Marie-Chantal NDOYE FOE** du Département de Biochimie, pour nos multiples échanges concernant la chimie des huiles essentielles et surtout, pour son soutien matériel.

Au **Professeure Véronique PENLAP BENG**, Chef de Laboratoire de Recherche pour la Tuberculose de l'Université de Yaoundé I, pour m'avoir donné accès à son laboratoire.

Je tiens par ailleurs à exprimer ma plus sincère reconnaissance au **Professeur Sara RIWOM ESSAMA** pour les encouragements, les dispositions particulières souvent prises pour me permettre d'avancer dans ces travaux.

Au **Docteur Jean Paul ASSAM ASSAM** qui a facilité l'acquisition des techniques de biologie moléculaire.

Au **Docteur Sarah EYANGO NGO NYOBE** Directrice de la recherche scientifique au Centre Pasteur du Cameroun et **Docteur NDONKENG NDONFACK Valérie** pour avoir accepté de superviser les travaux menés dans les Laboratoires du Service de Mycobactériologie.

Mes remerciements sont également adressés aux **Professeurs Sylvain Le Roy SADO et Dieudonné NWAGA** pour leurs nombreux conseils et leurs disponibilités lors de nos échanges.

Aux **Docteurs Maurice BODA, Jacky NDJIKI BIKOÏ, Roger TCHIKOUA et Blaise Pascal BOUGNOM** à qui, j'exprime une reconnaissance immense pour leurs conseils, encouragements et leur disponibilité constante lors de nos multiples échanges.

Au **Docteur VOUNDI OLUGU Steve Henri**, pour m'avoir formé depuis mon cycle de master. Je voudrais que tu puisses apprécier le produit de ton coaching.

Aux populations de Yabassi et Nkondjock, particulièrement ceux qui ont accepté de participer à l'étude ethnobotanique et m'ont permis de recenser les plantes utilisées dans le traitement de la tuberculose.

A tous les membres du **Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I** pour leur aide, leur amitié, ainsi que leur patience durant la réalisation de ce travail. Particulièrement à mes collègues de laboratoire devenus mes frères **Docteur AFAGNIGNI Alian Désiré, TCHAMGOUE NGALANI Eric, DJOVA Steve Valdi, NGONGANG TCHAMI Dimitri, KEGNE NGOMADGE Landry, NDIP Rosette et MANET Linda.**

A mes cadets de laboratoires **BETOTE BIBOUE Patrick, KAMELA KAMKA Herman, FEUDJIEU EGOUME Gaïzirène et BIHEU Rodolphe** pour l'aide précieuse apportée sur la paillasse.

A ma famille qui m'a toujours soutenue et dont l'estime est chère à mon cœur. Particulièrement à **Mme NGONGOU NZIMA Emilienne, mes sœurs NDEDI Jeanne Gisèle et NDEDI Anne Auriole** pour votre inestimable soutien.

Au père **Joseph Jules NKODO**, pour son accompagnement spirituel.

Enfin, à M. **MBOULE Alain Yves Valery** pour avoir toujours cru en moi, pour ton assistance et la joie que tu as su m'offrir à travers la motivation que m'a apporté **Francis de Lavoisier.**

LISTE DES ABREVIATIONS

- A. sativum** : *Allium sativum*
- ADN** : Acide Desoxyribonucléique
- ADS** : Albumine Dextrose Saline
- AFNOR** : Association Française de normalisation
- AFSSAPS** : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
- ARN** : Acide Ribonucléique
- ATP** : Adenosine Triphosphate
- BMR** : Bactéries Multi-Résistantes
- CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse
- CG/MS** : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
- CLSI** : *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CMB** : Concentration Minimale Bactéricide
- CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- D. gossweileri** : *Drypetes gossweileri*
- DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- dNTPs** : Désoxyribonucléotides Triphosphates
- E. giganteus** : *Echinops giganteus*
- EDTA** : *Ethylene Diamine Tetracetic Acid*
- FFNSC** : *Flavour and Fragrance Natural and Synthetic Compounds*
- GC** : Guanine et Cytosine
- HEs** : Huiles essentielles
- IDR** : Intra Dermo Réaction
- ISO** : *International Organization for Standardization*
- ITC** : Isothiocyanate
- M. phlei** : *Mycobacterium phlei*
- M. smegmatis** : *Mycobacterium smegmatis*
- M. tuberculosis** : *Mycobacterium tuberculosis*
- MBK** : Middlebrook
- MDR** : *Multi-Drug Resistant*

MR :	Multirésistant
NIST :	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
ODD :	Objectifs de Développement Durable
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
<i>P. brazzeana</i> :	<i>Pentadiplandra brazzeana</i>
PCR :	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI :	Iodure de propidium
PGRS :	<i>Polymorphic G+C Rich Sequence</i>
PNLT :	Programme National de Lutte contre la Tuberculose
R.D. du Congo :	République Démocratique du Congo
RIF :	Rifampicine
-SH :	Groupe thiol
SM :	Streptomycine
TB :	Tuberculose
UFC :	Unité Formant Colonie
UV :	Ultraviolet
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
MIRU :	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Taxonomie des mycobactéries.....	6
Figure 2 : Taux d'incidence mondiale de la tuberculose pour 100 000 Habitants en 2017	8
Figure 3 : Représentation du génome de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Le cercle extérieur indique l'échelle en megabases, 0 représente l'origine de réplication.....	10
Figure 4: Structure de la paroi cellulaire des BAAR.....	12
Figure 5: Pathogénèse de la tuberculose	13
Figure 6: Système de défense de la cellule hôte contre les Mycobactéries par production des espèce oxygénés (EOR) et azotés réactives	14
Figure 7: Bioactivation de l'Isoniazide	19
Figure 8: Formule de l'Ethambutol	19
Figure 9: Structure chimique de la Rifampicine	21
Figure 10: Schéma de dégradation des glucosinolates en fonction du pH du milieu	31
Figure 11: Cibles et effets des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne	35
Figure 12: Diagramme synoptique de la démarche méthodologique.....	46
Figure 13 : Localisation géographique des arrondissements du Nkam et de Nkondjock dans la région du Littoral-Cameroun	48
Figure 14: Mécanisme de réduction du Blue Alamar.....	55
Figure 15: Pourcentage d'utilisation des symptômes cliniques dans le diagnostique de la tuberculose	68
Figure 16: Répartition des pourcentages de différentes parties utilisées des plantes médicinales contre la tuberculose	81
Figure 17: Répartition des pourcentages des modes de préparations des recettes médicamenteuses pour le traitement de la tuberculose.....	82
Figure 18: Quantités de biomolécules de la souche H37Rv libérées dans le milieu extracellulaire à la CMI.....	109
Figure 19: Quantités de biomolécules de la souche H37Rv libérées dans le milieu extracellulaire à la CMB.	110
Figure 20: Quantités de biomolécules de l'isolat IS53 libérée dans le milieu extracellulaire à la CMI.	110
Figure 21: Quantités de biomolécules de l'isolat IS53 libérées dans le milieu extracellulaire à la CMB.....	111
Figure 22: Quantités de biomolécules de l'isolat IS310 libérées dans le milieu extracellulaire en fonction des différents traitements à la CMI.....	111
Figure 23: Quantités de biomolécules de l'isolat IS53 libérées dans le milieu extracellulaire en fonction des différents traitements à la CMB.	112

Figure 24: Quantité d'ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv en fonction des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles et de l'Ofloxacin testées.....	114
Figure 25: Quantité d'ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv en fonction des concentrations minimales bactéricides (CMB) des huiles essentielles et de l'Ofloxacin testées.....	114
Figure 26: Quantité d'ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> IS53 en fonction des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles et de l'Ofloxacin	115
Figure 27: Quantité d'ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> IS53 en fonction des concentrations minimales bactéricides (CMI) des huiles essentielles et de l'Ofloxacin testées.....	115
Figure 28: Quantité d'ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> IS310 en fonction des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles et de l'Ofloxacin testées.....	116
Figure 29: Quantité d'ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> IS310 en fonction des concentrations minimales bactéricides (CMB) des huiles essentielles et de l'Ofloxacin testées.....	116
Figure 30: Pourcentage d'expression du gène MIRU 04 de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en fonction des différents traitements en HES aux CMI	118
Figure 31: Pourcentage d'expression du gène MIRU 04 de <i>M. tuberculosis</i> IS H37Rv en fonction des différents traitements en HES aux CMB	118
Figure 32: Pourcentage d'expression du gène MIRU 04 de <i>M. tuberculosis</i> IS 53 en fonction des différents traitements en HES aux CMI	119
Figure 33: Pourcentage d'expression du gène MIRU 04 de <i>M. tuberculosis</i> IS 53 en fonction des différents traitements en HES aux CMB	119
Figure 34: Pourcentage d'expression du gène MIRU 04 de <i>M. tuberculosis</i> IS 310 en fonction des différents traitements en HES aux CMI	120
Figure 35: Pourcentage d'expression du gène MIRU 04 de <i>M. tuberculosis</i> IS 310 en fonction des différents traitements en HES aux CMB	120

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Mécanismes d'action antibactérienne de quelques HEs et quelques composés majoritaires	37
Tableau II: Récapitulatif de quatre plantes utilisées dans le traitement de la tuberculose	88
Tableau III: Séquence de l'amorce sens et anti sens du MIRU 04.....	44
Tableau IV: Composition du mélange réactionnel utilisé pour l'amplification (master mix)	63
Tableau V: Programme d'amplification.....	64
Tableau VI: Résultats de l'étude ethnobotanique des plantes et recettes utilisées dans le traitement de la tuberculose à Yabassi et Nkondjock	83
Tableau VII: Rendements d'extraction des différentes HEs de plantes	88
Tableau VIII: Composition chimique des HEs des racines de <i>P. brazzeana</i> , et <i>E. giganteus</i> des écorces de <i>D. gossweileri</i> et des bulbes d' <i>A. sativum</i> et des combinaison E1 ; E2 ; E3	91
Tableau IX: Résultats des paramètres d'inhibition des HEs et combinaisons sur les isolats et la souche de référence H37Rv	100
Tableau X: Proportions actives des HEs dans la combinaison E1	101
Tableau XI: Proportions actives des HEs dans la combinaison E2	102
Tableau XII: Proportions actives des HEs dans la combinaison E3	102
Tableau XIII: Résultats des FIC et FIC index des combinaisons d'HEs sur les isolats et la souche de référence H37Rv	104
Tableau XIV: Concentrations d'ADN extrait des mycobactéries exposées aux HEs	113
Tableau XV : Quantification d'ADN amplifiés des mycobactéries exposées aux HEs	117

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : Image de <i>M. tuberculosis</i> observée au microscope électronique à balayage (21228x)	9
Photo 2: Bulbes d' <i>Allium. cepa</i>	69
Photo 3: Gousses d' <i>Allium sativum</i>	70
Photo 4: Fruits secs de <i>Xylopia aethiopica</i>	71
Photo 5: Plant d' <i>Echinops giganteus</i>	72
Photo 6: Partie aérienne d' <i>Ageratum conyzoides</i>	73
Photo 7: Lianes (a) feuillage (b) et racines (c) de <i>P. brazzeana</i>	74
Photo 8: Feuillage (a) Tronc (b) et les écorces (c) de <i>D. gossweileri</i> dans un buisson	75
Photo 9: Feuilles sèches d' <i>Eucalyptus globulus</i>	76
Photo 10: Plantes d' <i>Ocimum gratissimum</i>	77
Photo 11: Tiges de <i>Thymus vulgaris</i>	78
Photo 12: Plant (a), fruits frais (b) et secs (c) d' <i>Aframomum danielli</i>	79
Photo 13: Plant (à gauche) et Rhizomes (à droite) de <i>Zingiber officinale</i>	80
Photo 14: Résultats des CMI des HEs de <i>P. brazzeana</i> et <i>D. gossweileri</i> sur la souche de référence H37Rv.	98
Photo 15: Profil gel d'agarose de l'ADN des cellules de <i>M. tuberculosis</i> non traitées aux HEs	121
Photo 16: Profil gel d'agarose de l'ADN des cellules de <i>M. tuberculosis</i> traitée à la CMI (b) et aux CMB (c) des HEs <i>P. brazzeana</i> , <i>A. sativum</i> , <i>E. giganteus</i> et <i>Ofloxacine</i> ..	122
Photo 17: Profil gel d'agarose de l'ADN des cellules de <i>M. tuberculosis</i> traitée à la CMI (d) et aux CMB (e) de <i>D. gossweileri</i>	124

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I : Fiche de l'enquete ethnobotanique.....	A
ANNEXE II : Résultats des analyses chromatographiques des HEs et combinaisons	B
ANNEXE III : Equipements de laboratoire	F
ANNEXE IV : Milieux de culture.....	F
ANNEXE V : Supplément nutritifs de culture et antituberculeux de référence	G
ANNEXE VI : Photos des résultats des paramètres d'inhibition	H
ANNEXE VII : Préparation des solutions chimiques.....	I
ANNEXE VIII : Résultats de l'analyse statistique.....	K
ANNEXE IX : Publications et communications scientifiques issus des travaux	L

RÉSUMÉ

Malgré la disponibilité des antibiotiques efficaces, l'émergence des résistances aux traitements maintient la tuberculose au rang des maladies les plus meurtrières. Cette situation alarmante suscite un besoin urgent d'une nouvelle alternative antimycobactérienne. Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antimycobactérienne et déterminer les cibles cellulaires des huiles essentielles (HEs) des quatre plantes utilisées pour traiter la tuberculose dans deux localités du Nkam (Littoral).

Une étude ethnobotanique est menée à Yabassi et Nkondjock sur les plantes médicinales utilisées dans le traitement de la tuberculose par interview et par la méthode dite de « boule de neige » puis, les HEs des espèces végétales sélectionnées sont extraites par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Ces HEs et leurs combinaisons sont analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur par ionisation de flamme (CPG-DIF) et par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Au terme de l'analyse des résultats de la composition chimique, trois triplets de combinaisons d'HEs de quatre espèces végétales sélectionnées sont réalisés dans les proportions V/V/V dont 1/2/1 pour la combinaison E₁ ; 1/1/2 pour la combinaison E₂ ; 1/1/2 pour les combinaisons E₃, celles-ci sont analysées par CPG-DIF et CPG-SM. L'activité antimycobactérienne des HEs, leurs combinaisons, de l'Ofloxacin[®] et celle de la Rifampicine[®] consistent à déterminer les paramètres d'inhibition (CMI_s et CMB_s) sur deux isolats cliniques (IS53 et IS310) de *Mycobacterium tuberculosis* et une souche de référence H37Rv en utilisant la méthode de microdilution en milieu liquide. Par ailleurs, l'effet des HEs sur les cibles cellulaires de *Mycobacterium tuberculosis* tel que la paroi et la membrane est mise en évidence par dosage spectrophotométrique au NanoDrop 1000 d'ADN, ARN et protéines libérés dans le milieu extracellulaire puis, les résultats sont statistiquement analysés en utilisant ANOVA. L'effet des HEs et l'Ofloxacin[®] aux CMI_s et CMB_s sur l'ADN total et sur le gène MIRU 04 obtenus par PCR d'ADN extrait des mycobactéries traitées est évalué par quantification de l'ADN et amplicon au NanoDrop 1000 suivi de leurs séparations par électrophorèse sur gel d'agarose.

Les résultats obtenus révèlent que sur 37 tradipraticiens interviewés, 14 ont une connaissance sur les plantes médicinales utilisées dans le traitement de la tuberculose ce qui a permis d'identifier douze espèces végétales appartenant à sept familles botaniques différentes. *Allium sativum*, *Drypetes gossweileri*, *Echinops giganteus* et *Pentadiplandra brazzeana* sont

les espèces végétales sélectionnées car sont utilisées seules dans une préparation médicamenteuse pour le traitement de la tuberculose alors que les autres sont utilisées en association avec une autre dans une recette. L'analyse des HEs des plantes sélectionnées montre que celles de *P. brazzeana* et *D. gossweileri* sont majoritairement composées d'isothiocyanate de benzyle respectivement à 91,3 % et 96,0 %, tandis que celle d'*A. sativum*, contient du trisulfure de 2-méthyl propyle (51,0 %), le trisulfure de méthyl allyle (12,8 %) et le sulfure de diallyle (11,1 %) tandis que celle d'*E. giganteus* contient le silphiperfol-6-ène (27,4 %), silphiperfolan-6- α -ol (11,3 %) et de persilphiperfol-7-ène (7,4 %). Dans les combinaisons d'HEs, l'isothiocyanate de benzyle présent à 91,3 % dans l'HE de *P. brazzeanza* est resté le composé majoritaire mais dans les proportions réduites 2,2 fois de moins dans la combinaison E1, 3,8 fois de moins dans la combinaison E2 et 2,5 fois de moins dans la combinaison E3. En outre, toutes les HEs montrent des bonnes activités antimycobactériennes en générale cependant, celle de *P. brazzeana* et de *D. gossweileri* montrent une plus forte activité bactéricide sur les trois souches testées avec respectivement des CMI de 4,88 $\mu\text{g/mL}$ et 9,76 $\mu\text{g/mL}$. Les combinaisons sont moins actives que les HEs et présentent des interactions antagonistes aux HEs avec des CMI variant entre 39,06 sur l'isolat IS53 et 156,25 sur l'isolat IS310 $\mu\text{g/mL}$. L'inhibition de la croissance de *M. tuberculosis* par les HEs est confirmée après la mesure d'une quantité significative de biomolécules variant de 70 à 506,1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ pour l'ADN, de 42 à 340 $\text{ng}/\mu\text{L}$ pour l'ARN et de $37 \cdot 10^4$ à $1650 \cdot 10^4$ $\text{ng}/\mu\text{L}$ protéines dans le milieu extracellulaire pour les cellules traitées aux HEs comparée à celles libérées par les cellules saines et traitées à l'Ofloxacin[®]. La présence des biomolécules intracellulaires dans le milieu extracellulaire à partir de leurs CMI illustre une fragilisation de la paroi et la lyse de la membrane. L'inhibition de la synthèse de l'ADN par les HEs et l'Ofloxacin[®] est mis en évidence par la réduction de la quantité d'ADN synthétisée pour les cellules traitées aux CMI et CMBs dont les concentrations varient entre 0,2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ et 7,4 $\text{ng}/\mu\text{L}$ comparé aux cellules saines dont les concentrations varient de 22,1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ à 40,0 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Cette inhibition est confirmée sur gel d'agarose par la présence des bandes d'ADN et du gène MIRU 04 pour les cellules saines ou encore celles traitées aux CMI et leurs absences pour les cellules traitées aux CMBs.

La paroi, la membrane et l'ADN bactérien sont les cibles cellulaires des HEs de quatre espèces végétales utilisées pour le traitement de la tuberculose dans les localités enquêtées.

Mots clés : Enquête ethnobotanique, Plantes médicinale camerounaises, Huiles essentielles, Combinaisons, Activité antimycobactérienne, Cibles cellulaires.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an airborne infection caused by complex bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Despite treatment and preventive (vaccine) measures that have been put in place, one-third of the world's population is infected by these bacteria. Recently, population became ill with multi-drug-resistant tuberculosis (resistant to Isoniazid and Rifampicin) and extensively drug-resistant TB with additional resistance to fluoroquinolones and injectable drugs (Amikacin, Kanamycin, Capreomycin). This shows an existing need to search for new molecules to prevent the spread of this infection.

This study aimed at carrying out an ethnobotanical survey of medicinal plants used to treat tuberculosis in two localities of Nkam sub-divisions and showed the effect of four essential oils (EOs) on some cellular targets of *Mycobacterium tuberculosis*. The essential oils were obtained by hydrodistillation using Clevenger apparatus and analyzed by gas chromatography coupled by Flamme Ionisator Detector (GC-FID) and gas chromatography associated coupled to mass spectrophotometry (GC-SM). Base on the chemical composition of the EOs, three triplicates of EOs's combinations were realized in proportion of (1/1/2), (1/2/1) and (2/1/1) using the manual book of aromatherapy and these combinations have been analysed by GC-FID and GC-MS. The inhibition parameters such as Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of EOs, their combinations, Ofloxacin and Rifampicin were determined against two clinical isolates IS53 and IS310 and the reference strain H37Rv by using microdilution methods. The impact of EOs on the cells membrane of *Mycobacterium tuberculosis* was evaluated by quantification of extracellular biomolecules (DNA, RNA and proteins) by spectrophotometry using NanoDrop 1000 and the results were statistically analysed by ANOVA one way. The effect on DNA and MIRU 04 gene of *M. tuberculosis* was tested by quantification of total DNA and amplicons of MIRU gene at the NanoDrop and separation on agarose gel electrophoresis of cells exposed at MIC and MBC of EOs and Ofloxacin.

The results of ethnobotanical survey included 37 traditional healers and 14 amongst had identified 12 plants used to treat tuberculosis in Yabassi and Nkondjock sub-divisions. These 12 plants belonging to 7 botanical families among which *Allium sativum*, *Drypetes gosseweileri*, *Echinops giganteus* and *Pentadiplandra brazzeana* were selected because they are used alone in a medical recipe to treat tuberculosis contrary to the others. The chemical

analysis of EOs revealed that benzyl isothiocyanate was present in both *Drypetes gossweileri* and *Pentadiplandra brazzeana* EOs at 91,3 % and 96,00 % respectively, while 2- methyl propyl trisulfide, methyl allyl trisulfide and diallyl sulfide were in *A. sativum* EO at 51,0 %; 12,8 % and 11,1 % respectively. The EO of *E. giganteus* showed the presence of tricyclic sesquiterpens silphiperfol-6-ene at 27,4 %; silphiperfolan-6- α -ol at 11,3 %, persilphiperfol-7-ene at 7,4 % and caryophyllene at 7,0 %. Benzyl isothiocyanate was the main compound in all the combinations but at lower percentage than in EO with the decrease in proportion of 2,2 times in E1, 3,8 times in E2 and 2,5 times in E3. The most active EO showed the MIC equal to 4.88 $\mu\text{g/mL}$ and 9.76 $\mu\text{g/mL}$ against H37Rv, IS53 and IS310 strains for *Drypetes gossweileri* and *Pentadiplandra brazzeana*. The least activity was observed for the OE of *E. giganteus* showed the MIC equal to 156,25 $\mu\text{g/mL}$ on the H37Rv cells or IS53 isolate and 312,5 $\mu\text{g/mL}$ on IS310 isolate. The interaction between EOs were all antagonists with MIC ranging from 39,06 to 156,25 $\mu\text{g/mL}$ against *M. tuberculosis*. The release of biomolecules was significant in treated cells at MIC of EOs compared to cells treated by Ofloxacin and untreated cells of *M. tuberculosis* showing lost of cell permeability. The inhibition effect of EOs against *M. tuberculosis* released significant quantities of DNA ranging from 70 to 506,1 $\text{ng}/\mu\text{L}$, RNA from 42 to 340 $\text{ng}/\mu\text{L}$ and proteins ranging from 37 to 1650 $10^4 \text{ ng}/\mu\text{L}$ proteins at MIC and MBC. The inhibition has been confirmed by observing no band of DNA in agarose profile of treated cells by EOs or Ofloxacin while a single band of DNA appearing for untreated cells. DNA and MIRU 04 gene inhibition were observed at MBC and confirmed by the decrease of DNA from 0,2 to 7,40 $\text{ng}/\mu\text{L}$ for total DNA and 4,10 to 282 $\text{ng}/\mu\text{L}$ for amplicon of MIRU 04 gene present at MIC but absent at MBC in treated cells.

The results obtained justified the traditional use of these plants for the treatment of respiratory diseases and tuberculosis in the two localities of Nkam sub-divisions.

Keys words: Ethnobotanical survey, Antimycobacterial activity, Essential oils, Combinations, Tuberculosis treatment, Cellular targets.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La pharmacopée constitue un réservoir de molécules bioactives exploitées par les firmes pharmaceutiques comme nouvelle source de médicaments dans les pays développés (**A Boire et al., 2013**). Au Cameroun en revanche, bien que la médecine traditionnelle soit la première source d'automédication par les populations, elle reste peu recommandable par les structures hospitalières ou pharmaceutiques à cause du manque de résultats scientifiques poussés justifiant son usage thérapeutique. Depuis 2006, notre équipe de recherche s'est focalisée dans la recherche des molécules bioactives issues des plantes aromatiques et médicinales du Cameroun. L'intérêt pour l'évaluation de l'activité antimycobactérienne des huiles essentielles (HE) des plantes médicinales de la pharmacopée camerounaise est né du fait que des solutions alternatives utilisant les HES ne cessent d'être valorisées dans les pays développés. Cependant, en Afrique et particulièrement au Cameroun où l'usage traditionnel des plantes est monnaie courante, cette solution n'est pas mise en pratique en milieu hospitalier.

Les HES des plantes utilisées en aromathérapie occupent une place de choix comme alternatives aux médicaments standards dans les pays tels que la France, l'Inde, la Chine, Madagascar et la plupart des pays du Maghreb où la médecine alternative est mise en valeur pour compléter la médecine conventionnelle (**Franchomme et Penoel 2011 ; Kaloustian et Hadji-minaglou 2012**). De plus en plus, elles sont utilisées comme agents bioactifs dans des dentifrices de marque, comme conservateurs dans les produits alimentaires et comme médicaments utilisés pour le traitement des affections des voies nasopharyngées. C'est le cas des capsules GAE de Naturactive® ou encore le spray Prohinel® des laboratoires Fables et Franchôme de France. Ainsi, un arsenal de travaux scientifiques a déjà justifié leurs propriétés préventives et curatives des maladies dues aux agents microbiens affectant les voies respiratoires au rang desquelles la tuberculose (**Franchomme et Penoel 2011 ; Kaloustian et Hadji-minaglou 2012 ; Horváth et Ács, 2015**).

La tuberculose pulmonaire est une maladie causée par les bacilles du complexe *Mycobacterium tuberculosis* qui infectent les poumons et engendrent l'inflammation des tissus conduisant à leurs nécroses (**Beggs, 2003**). Dans les pays africains où la prévalence est très élevée, elle est la troisième cause de morbidité et de mortalité avec 10 million de nouveau cas et 1,3 million de décès (**OMS, 2018**). En effet, malgré l'utilisation de la chimiothérapie, cette maladie reste propulsée au rang des plus meurtrières du monde soit à cause des échecs thérapeutiques conduisant à l'émergence des souches résistantes ou encore à cause des cas de co-infection au VIH-SIDA représentant un taux de 20 à 49 % (**OMS, 2018**). De plus,

l'utilisation des combinaisons d'antituberculeux pour le traitement de la tuberculose multi-résistante n'a pas pu ralentir l'émergence des souches ultrarésistantes dont le traitement nécessite l'usage d'une combinaison de neuf antituberculeux avec pour principal inconvénient une toxicité chronique sur les sujets sous antirétroviraux comme les patients VIH positifs (OMS, 2009). Cette préoccupation a poussé l'OMS à promouvoir la recherche des nouvelles solutions thérapeutiques plus efficaces et les plantes médicinales se sont avérées être une alternative intéressante aux antituberculeux de référence (OMS, 2018). L'utilisation de la chimiothérapie pour le traitement de la tuberculose est exclusivement axée sur la destruction du bacille tuberculeux moyennant un seul type de mécanisme d'action par antituberculeux contrairement aux HEs qui ont la capacité d'inhiber les bactéries par le biais de plusieurs mécanismes à la fois (Lambert *et al.*, 2001 ; Xu *et al.*, 2016). En plus, des propriétés antibactériennes, les HEs ont la capacité d'inhiber la mise en place d'autres pathologies issues du désordre métabolique telles que la production d'espèces oxygénées réactives et l'inflammation ce qui permet d'entrevoir les solutions alternatives plus efficaces en cas d'échec de l'antibiothérapie dans le traitement de la tuberculose (Franchomme et Penoel 2011 ; Kaloustian et Hadji-minaglou 2012 ; Horváth et Ács, 2015). Au Cameroun, très peu d'études ont répertorié les plantes utilisées dans le traitement de la tuberculose néanmoins, les évaluations des activités antimycobactériennes des plantes ont été envisagées par notre équipe de recherche depuis 2017 (Tiam *et al.*, 2017 ; Evina *et al.*, 2017). Malgré la prévalence alarmante de la tuberculose au Cameroun (soit 23 741 selon le programme national de lutte contre la tuberculose) et la richesse de la pharmacopée camerounaise en plantes médicinales peu de travaux ont répertorié celles utilisées pour le traitement de la tuberculose.

Par ailleurs, les études précédentes ont souvent démontré l'activité antimycobactérienne des extraits bruts, des composés purs et HEs des plantes mais très peu se sont intéressées à leur mode d'action (Tekwu *et al.*, 2012 ; Catia *et al.*, 2011 ; Evina *et al.*, 2017 ; Tiam *et al.*, 2017 Babii *et al.*, 2018). Les travaux révélant l'activité antimycobactérienne des HEs ont démontré que les composés tels que les sesquiterpéniques, les isothiocyanates et d'autres classes de composés allylés, présentent une bonne activité sur les souches sensibles et même multirésistantes de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) (Pinto *et al.*, 2009 ; Kurepina *et al.*, 2013 ; Sieniawska *et al.*, 2015). Ceux de Dwivedi *et al.* (2013) ont montré que le khusimol et l'acide khusenique deux sesquiterpènes de l'HE de *Vitiveria zizanoïdes*, inhibent les souches sensibles et résistantes de *M. smegmentis* et *M. tuberculosis* en se fixant sur les deux sous unités de l'ADN gyrase de *M. tuberculosis*. Les cellules de *M. tuberculosis*

traitées avec l'HE de *Mutellina purpurea* L et ses composés majoritaires (le bisabolol et le α -pinène) subissent une déformation morphologique qui serait responsable de la perte de l'intégrité membranaire (Sieniawska *et al.*, 2015). Cependant jusqu'à présent, aucune étude n'a porté sur les dommages cellulaires identifiant les cibles cellulaires des HEs des espèces végétales utilisées sur *M. tuberculosis*.

QUESTIONS DE RECHERCHE

- Quelles sont les plantes médicinales utilisées dans les localités du département du Nkam pour le traitement de la tuberculose ?
- Les composés chimiques présents dans les HEs des espèces végétales sélectionnées peuvent-ils inhiber la croissance de *M. tuberculosis* ?
- Les dommages cellulaires causés par les HEs des plantes utilisées se focalisent-elles sur la paroi, la membrane et le matériel génétique de *M. tuberculosis* ?

HYPOTHESES DU TRAVAIL

- Les tradipraticiens du département du Nkam utilisent les plantes médicinales pour le traitement traditionnel de la tuberculose.
- Les HEs des plantes médicinales contiennent des composés capables d'inhiber la croissance de *M. tuberculosis*.
- Les HEs ont pour cibles pour cibles la paroi, la membrane et le matériel génétique.

OBJECTIFS

L'objectif de ce travail est de déterminer l'activité antimycobactérienne des HEs de quelques espèces végétales utilisées dans le traitement de la tuberculose et de rechercher les dommages cellulaires permettant d'identifier leurs cibles cellulaires sur *M. tuberculosis*. Plus spécifiquement il s'agit de :

- Réaliser une étude ethnobotanique couplée à une revue de littérature des plantes utilisées pour le traitement de la tuberculose dans deux localités du Nkam (Cameroun-Littoral)
- Déterminer la composition chimique des HEs de quelques plantes sélectionnées et leurs combinaisons ;
- Evaluer l'activité antimycobactérienne des HEs et de leurs combinaisons sur *M. tuberculosis* ;
- Identifier leurs cibles cellulaires sur de *M. tuberculosis*.

Ce document qui résume l'essentiel de nos travaux comporte trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à une mini revue de littérature qui présente les généralités sur la tuberculose, la phytothérapie, les HEs et leurs propriétés biologiques, les méthodes d'évaluation de l'activité antimycobactérienne et les mécanismes d'action des composés naturels.

Le deuxième décrit le matériel et les méthodes qui ont conduit à la sélection des espèces végétales utilisées dans le traitement de la tuberculose dans deux localités du Nkam. A partir de ces plantes, les HEs sont extraites, les combinaisons réalisées et analysées par Chromatographie en phase gazeuse à détecteur par ionisation de flamme (CPG-FID) et Chromatographie en Phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). L'évaluation de leurs activités antimycobactérienne et l'identification des cibles cellulaires sur lesquelles elles agissent sur *M. tuberculosis*.

Le dernier chapitre présente les résultats obtenus, les discussions et les conclusions partielles.

CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE

CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE

I-1. GENERALITES SUR LA TUBERCULOSE

I.1.1. Définition et description

La tuberculose est une maladie infectieuse causée par les bactéries du Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) (Mathys, 2010). Ce bacille atteint principalement les poumons et se propage par le billet des gouttelettes inhalées qui diffusent dans l'air d'une personne malade à une personne saine ou d'aérosols formés au cours des manipulations des échantillons infectés (Mathys, 2010). Quelques bacilles inhalés suffisent pour établir l'infection qui se traduit par des signes divers, tels qu'une toux, expectoration accompagnée de douleur thoracique et/ou d'une fièvre nocturne en moyenne à 38 °C (Jimenez *et al.*, 2003). Le malade est aussi inquiété par des sueurs nocturnes profuses, un amaigrissement continu, une asthénie et les examens radiologiques montrant une nécrose des tissus pulmonaires ou autres organes infectés (Mathys, 2010). Cette infection aux causes diverses, peut également affecter la volaille, les bovins, les ovins et les animaux domestiques selon le type de mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (Jimenez *et al.*, 2003 ; Mostowy et Behr, 2005).

I.1.2. Etiologie

La tuberculose est causée par un bacille acidoalcoolo-résistant à croissance lente de la famille des mycobacteriacées. Ce sont des bactéries aérobies en forme de bâtonnets non sporulants qui résistent à la décoloration par l'acide ou l'alcool et dont l'ensemble forme un complexe appartenant à la famille des mycobacteriacées responsables de la tuberculose (Bloom et Small, 1998 ; Mostowy et Behr, 2005).

I.1.2.1. Taxonomie des Mycobactéries

Les mycobactéries se subdivisent en trois grandes espèces, notamment : les mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* ; les mycobactéries atypiques et les mycobactéries non cultivables. La figure 1 représente la taxonomie des mycobactéries et fait ressortir trois groupes de mycobactéries.

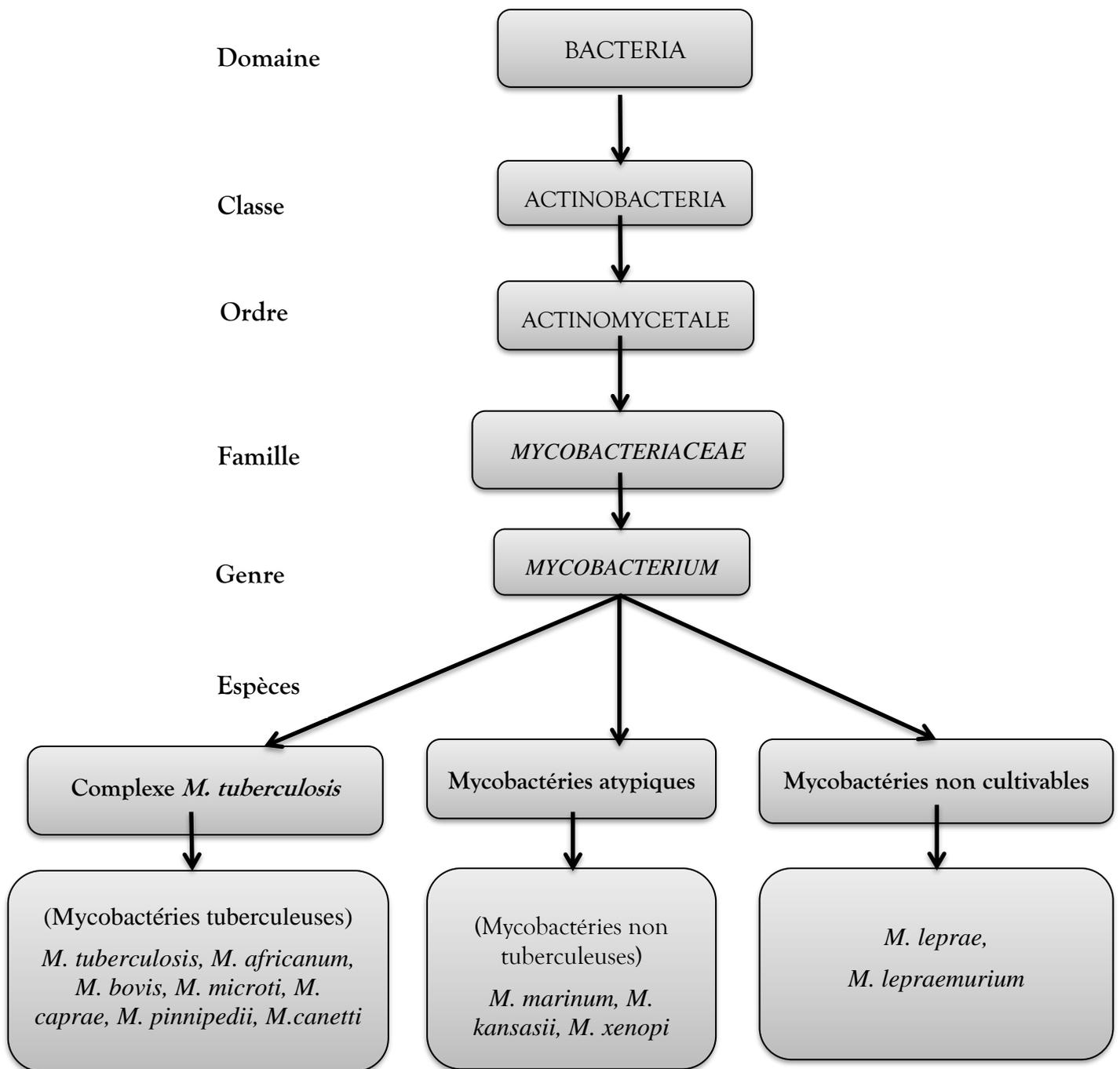


Figure 1 : Taxonomie des mycobactéries (Shinnick and Good, 1994).

I.1.2.2. Le complexe *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculose humaine est principalement causée par *M. tuberculosis* également appelé BK pour « Bacille de Koch » (**Jimenez et al., 2003**). Toutefois dans certains cas, d'autres mycobactéries du complexe peuvent également infecter l'Homme :

- *Mycobacterium africanum* : agent responsable le plus souvent de la tuberculose en Afrique de l'ouest (**Bonard et al., 2000**) ;
- *Mycobacterium bovis* : agent responsable de la tuberculose chez les bovins et parfois chez l'homme (**O'Reilly et Daborn, 1995**) ;
- *Mycobacterium canetti* : agent responsable de la tuberculose humaine (en particulier à Djibouti) (**Van Soolingen et al., 1997 ; Koeck et al., 2005**). L'homologie entre leur ADN est très élevée (>99,9 %) et leur transmissibilité par voie aérienne fait d'elle une maladie à caractère endémique (**Garnier et al., 2003 ; Smith et al., 2009**).

Une transmission indirecte est également possible lors de la consommation par l'Homme de certains animaux tels que les rongeurs, les chèvres et les mammifères marins infectés par *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, et *Mycobacterium pinnipedii* qui sont responsables de la tuberculose chez ces derniers (**Prodinge et al., 2002**).

I.1.3. Épidémiologie dans le monde

L'Organisation des Nations Unies (ONU) a adopté en 2015 les objectifs de développement durable (ODD) pour 2030. Une des cibles des ODD consiste à mettre un terme à l'épidémie mondiale de tuberculose. La Stratégie OMS pour mettre fin à la tuberculose en 2035, approuvée par l'assemblée mondiale de la Santé appelle à réduire de 90 % le nombre de décès par tuberculose et de 80 % le taux d'incidence de la maladie par rapport à 2015, (**OMS, 2018**).

Selon l'OMS en 2017, le nombre de cas de tuberculose est estimé à 10,0 millions dans le monde équivalent à 133 cas pour 100 000 habitants, dont 64 % sont de sexe masculin et 36 % de sexe féminin, parmi ces cas, 90 % sont des adultes et 10 % des enfants. Le nombre de décès enregistrés en 2017 est estimé à 1,3 million de cas. Cinq pays représentaient 56 % des nouveaux cas il s'agissait de l'Inde, de l'Indonésie, de la Chine, des Philippines et du Pakistan (**OMS, 2017**). La figure 2 ci-après montre que la majorité des cas de tuberculose en 2017 ont été enregistrés en Asie du Sud-Est soit 44 % de cas, suivie de l'Afrique 25 % et du Pacifique Ouest (18 %).

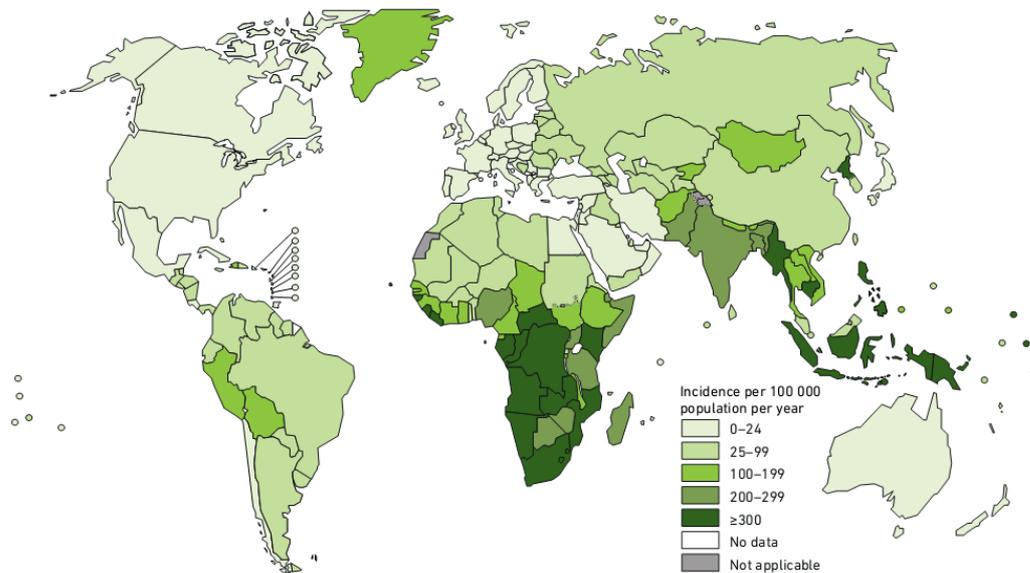


Figure 2 : Taux d’incidence mondiale de la tuberculose pour 100 000 Habitants en 2017 (OMS, 2018).

I.1.3.1. En Afrique

Selon l’OMS, l’incidence de la tuberculose en Afrique est estimée à 2 590 000 de cas dont 980 000 sont de sexe féminin et 1 620 000 de sexe masculin. 1 303 975 cas ont été enregistrés en 2016 et le nombre de décès observé est estimé à 737 000 cas (OMS, 2018).

I.1.3.2. Epidémiologie au Cameroun

Au Cameroun, la maladie a doublé entre 2002 (année où le Programme National de Lutte contre la Tuberculose « PNLT » a atteint une couverture nationale) et 2006, pour se stabiliser ensuite autour de 25.000 cas par an (Assam, 2012). Cette augmentation a entraîné une croissance du taux d’incidence de 77/100 000 en 2000 contre 91/100 000 en 2004 sur les 18 millions d’habitants (Assam, 2012). Selon le dernier rapport du Programme National de Lutte contre la Tuberculose de 2019, il a été enregistré 23 741 cas de tuberculeux dont les ¼ sont enregistrés dans la Région du Littoral et l’OMS a estimé que le taux de co-infection au VIH au Cameroun est situé entre 20 et 49 % (OMS, 2018 ; PNLT, 2019).

I.1.4. Caractère bactériologique des bactéries du complexe

I.1.4.1. Morphologie et culture

Pour une bonne visualisation des mycobactéries au microscope optique, il est nécessaire de réaliser la coloration de Ziehl-Neelsen dont le principe repose sur l'acidoalcoolo-résistance de la mycobactérie, c'est-à-dire sa capacité de résister à la décoloration par les acides et alcools après une coloration à base d'arylméthane, telle que la fuchsine de Ziehl (**Gangadharam et Droubi, 1981**). La Photo 1 montre l'image de *M. tuberculosis* en microscopie électronique à balayage (21228x) qui présente les bacilles tuberculeux sous forme de fins bâtonnets, de 2 à 4 µm de long et 0,3 à 0,5 µm de large, d'où le nom de « bacille ». Ils sont rectilignes ou légèrement incurvés, non sporulants et dépourvus de capsule (**Harshey et Ramakrishnan, 1977**). Ils se multiplient très lentement et leur temps de génération est environ de 20 heures (**Mathys, 2010**) en aérobiose à 36 °C. Les colonies apparaissent en quinze jours ou trois semaines et sont rugueuses, verruqueuses et de couleur beige (**Mathys, 2010**).

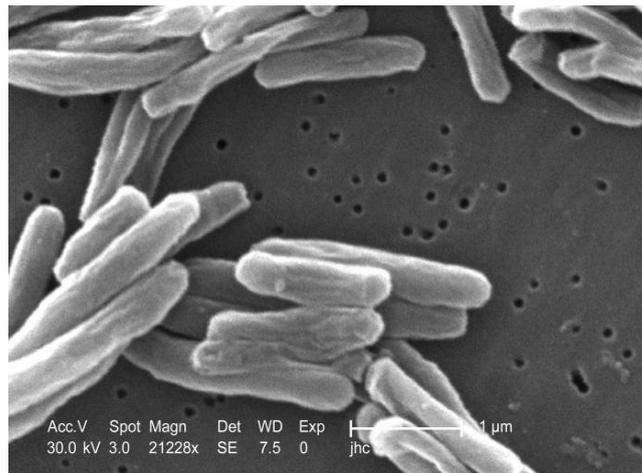


Photo 1 : Image de *M. tuberculosis* observée au microscope électronique à balayage (21228x) (**Harshey et Ramakrishnan, 1977**)

I.1.4.2. Caractéristiques du génome de *Mycobacterium tuberculosis* (Cole et al., 1998)

Le génome de la souche de référence H37Rv *M. tuberculosis* utilisée jusqu'à nos jours a été séquencé et annoté en 1998. Comme le montre la figure 3, il s'agit d'un génome constitué d'un chromosome unique et circulaire de 4.411.532 paires de bases, comprenant 3995 phases de lecture et formant environ 4000 gènes (figure 3). L'ADN de *M. tuberculosis* présente un taux élevé en guanine et en cytosine (65,6 %) sauf dans quelques régions particulières telles que les gènes qui codent pour les protéines transmembranaires. Une grande partie des gènes (6

% du génome) semble coder pour des enzymes impliqués dans la synthèse et la dégradation de lipides. Plus de 50 % des protéines codées ont des fonctions connues actuellement. L'homologie entre les ADN des différentes sous-espèces du MTBC est très élevée (>99,9 %) (**Garnier et al., 2003 ; Smith et al., 2009**) ce qui fait qu'il s'agit *stricto sensu* d'une seule espèce bactérienne. Cette restriction de la diversité nucléotidique peut être expliquée soit par une fidélité de réplication inhabituelle, soit par un système de réparation des erreurs très efficace, soit par une origine évolutive très récente, soit encore par un taux de mutation très faible compte tenu du style de vie de ce bacille (intracellulaire), aucune de ces raisons n'étant exclusive. Le génome est aussi caractérisé par l'utilisation du codon Guanine-Tyrosine-Guanine (GTG) comme codon d'initiation dans plus de 35 % des gènes.

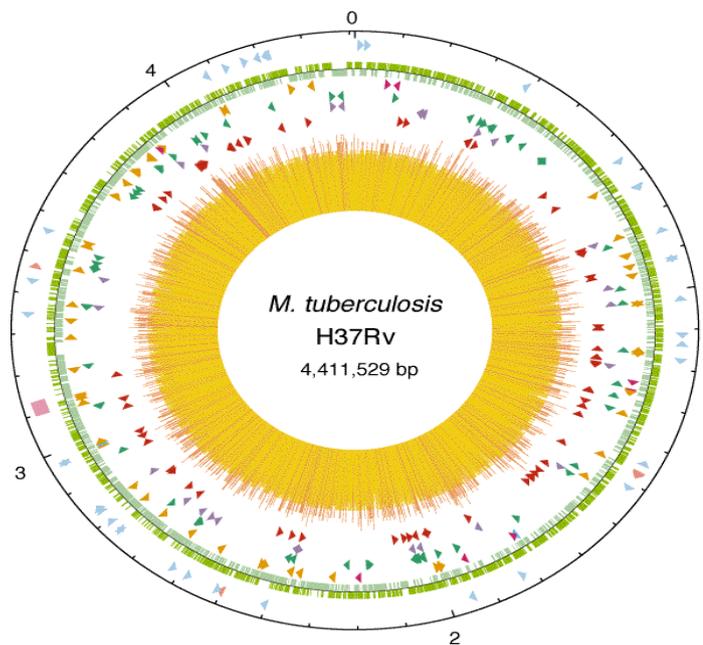


Figure 3 : Représentation du génome de *M. tuberculosis* H37Rv Le cercle extérieur indique l'échelle en megabases, 0 représente l'origine de réplication (**Cole et al., 1998**)

Le premier cercle de l'extérieur représente les positions des gènes codant des ARN stables (ARNt en bleu, les autres en rose) et la région « Direct Repeat » (carré rose); le second cercle de l'intérieur montre les séquences codantes par brin (dans le sens horaire, vert foncé; antihoraire, vert clair) ; le troisième cercle représente les séquences répétées (les séquences d'insertion en orange ; la famille REP13E12 en rose foncé; les prophages en bleu) ; le quatrième cercle montre les positions des membres de la famille des PPE (en vert) ; le cinquième cercle montre les membres de la famille des PE (en violets, à l'exclusion des PGRS) ; et le sixième cercle montre les positions des séquences PGRS (en rouge foncé). L'histogramme du centre représente le contenu en G+C, avec <65 % G+C en jaune, et > 65 % G+C en rouge. La figure a été générée avec le logiciel DNASTAR®.

I.1.4.2.1. Les marqueurs génétiques de *Mycobacterium tuberculosis*

Le génome de *M. tuberculosis* est aussi caractérisé par des séquences nucléotidiques particulières polymorphes utilisées comme des marqueurs génétiques d'évolution et/ou d'épidémiologie (Cole *et al.*, 1998). Ces marqueurs sont utilisés pour des études d'épidémiologie moléculaire, de classification ou de phylogénie. Parmi ces marqueurs génétiques, on trouve des séquences répétées (les CRISPR, les mini satellites ou les éléments d'insertion), des délétions ou insertions de courts ou de longs fragments d'ADN, des régions PE (Proline-Acide Glutamique) et PPE (Proline-Proline-Acide-Glutamique) ou tout simplement des variations nucléotidiques individuelles ou SNPs (Cole *et al.*, 1998). Des techniques de typages spécifiques du MTBC conçues pour la détermination de ces variations au niveau de ces marqueurs ont été développées telles que : la RFLP IS6110 (Van Embden *et al.*, 1993), qui fut longtemps la méthode de référence, le spoligotypage (Kamerbeek *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2010), les MIRU-VNTR (« Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeat ») (Supply *et al.*, 2000; Supply *et al.*, 2006) et depuis peu, la génomique comparative par séquençage de nouvelle génération (« Whole Genome Sequencing » - WGS/« Next Generation Sequencing » - NGS : séquençage du génome de nouvelle génération).

I.1.4.2.1.1. Les minisatellites MIRU-VNTR

Les MIRU-VNTR sont des séquences génomiques classées parmi les minisatellites sur différents locus dans le génome de *M. tuberculosis* nommées MIRU « Mycobacterial Interspersed Repetitive Units ». Ce sont des séquences nucléotidiques répétées en tandem sur 41 locus dans le génome de H37Rv et dont les tailles sont comprises entre 46 pb et 111 pb (Cole *et al.*, 1998). Le nombre de copies des motifs entre les différentes souches du complexe *M. tuberculosis* est très variable (Cole *et al.*, 1998). Les rôles des MIRU sont méconnus mais l'identification du nombre de copies des unités répétées en tandem des locus VNTR varie pour chaque souche de *M. tuberculosis* (Supply *et al.*, 2006). Les profils MIRU obtenus sont formés de la suite des chiffres concaténés correspondant chacun aux nombres de copies des unités répétées de chaque locus étudié. Ce nombre de répétition de MIRU 04 varie en fonction des souches de *M. tuberculosis* de 01 à 06 répétitions et pourrait avoir une taille des amplicons de 77 pb à 462 pb après séparation sur gel d'agarose (Supply *et al.*, 2000 ; Supply *et al.*, 2006). L'identification de ces locis ou amplicons joue un rôle important au cours de l'identification moléculaire des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*.

I.1.4.3. Caractères particuliers de la paroi

L'une des caractéristiques majeures des mycobactéries est la richesse de leur paroi en lipides (60 %) en particulier, en acides mycoliques et d'arabino-galactane (acides gras à longue chaîne). La figure 4 ci-dessous résume la composition de l'enveloppe des bactéries acidoalcoolo-résistants qui comprend la paroi constituée du peptidoglycane recouvert de lipides extractibles, arabino-galactane et des cires, de la capsule et la membrane plasmique (Pfyffer *et al.*, 2008).

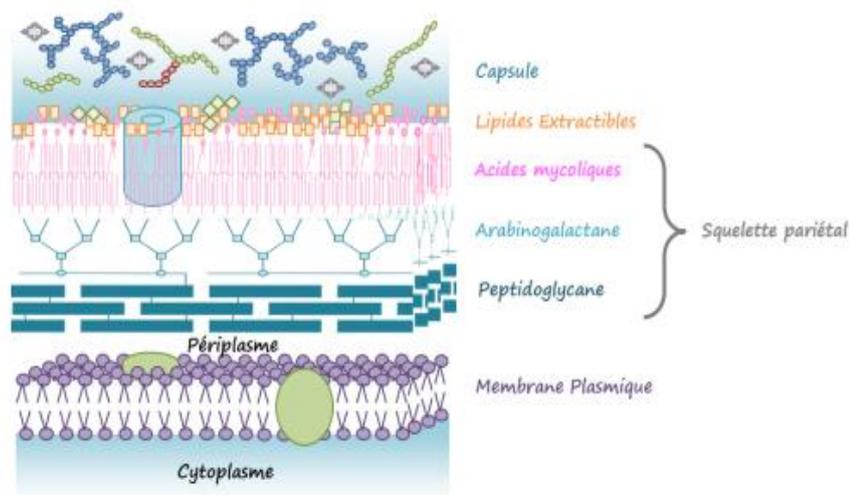


Figure 4: Structure de la paroi cellulaire des *M. tuberculosis* (Pfyffer *et al.*, 2003)

I.1.5. Physiopathologie de la tuberculose

La pathologie que développent les patients infectés par les bactéries du complexe MTB se caractérise par deux types de tuberculose. En fonction de l'organe cible où ces bactéries prolifèrent, on distingue les tuberculoses pulmonaires et extra-pulmonaires (Corbett *et al.*, 1999).

I.1.5.1. Pathogénèse

Au stade initial de tuberculose notamment à la porte d'entrée dans le poumon, *M. tuberculosis* exprime sa pathogénicité en s'internalisant à l'intérieur des macrophages alvéolaires qui l'ont phagocyté. La réaction locale aboutit en un peu plus d'un mois à une lésion histologique caractéristique : le granulome ou tubercule qui est constitué de cellules épithélioïdes et de cellules géantes multinuclées entourées d'une couronne lymphocytaire et

centrées par une zone de nécrose caséuse. La maladie reste localisée dans les poumons et peut s'y développer en deux phases : une primo-infection et une phase de réactivation (OMS, 2013).

- **Phase latente ou primo infection** : au cours de cette phase les bactéries vont se loger dans les alvéoles pulmonaires où elles seront internalisées par les macrophages et les cellules dendritiques. Par la suite elles vont se multiplier à l'intérieur des macrophages en libérant leur antigène et se disséminer vers les ganglions périphériques passant par le sang et la lymphe (Kaufmann, 2001).

- **Phase active ou de réactivation** : au cours de laquelle les symptômes commencent à apparaître. Ils surviennent lorsque le système immunitaire est affaibli. Les bacilles tuberculeux vont se multiplier jusqu'à surpasser l'action des leucocytes et éclater les macrophages dans lesquels ils sont internalisés. Le granulome éclate alors et libère les milliers de bacilles tuberculeux dans les poumons : c'est à ce moment que le sujet devient contagieux (Kaufmann, 2001).

La figure 5 résume le devenir d'un individu exposé aux bacilles tuberculeux. Il ressort de celui-ci qu'une fois exposés aux bacilles tuberculeux certains individus au système immunitaire efficace peuvent guérir de façon spontanée, d'autres par contre développent une tuberculose latente ou active.

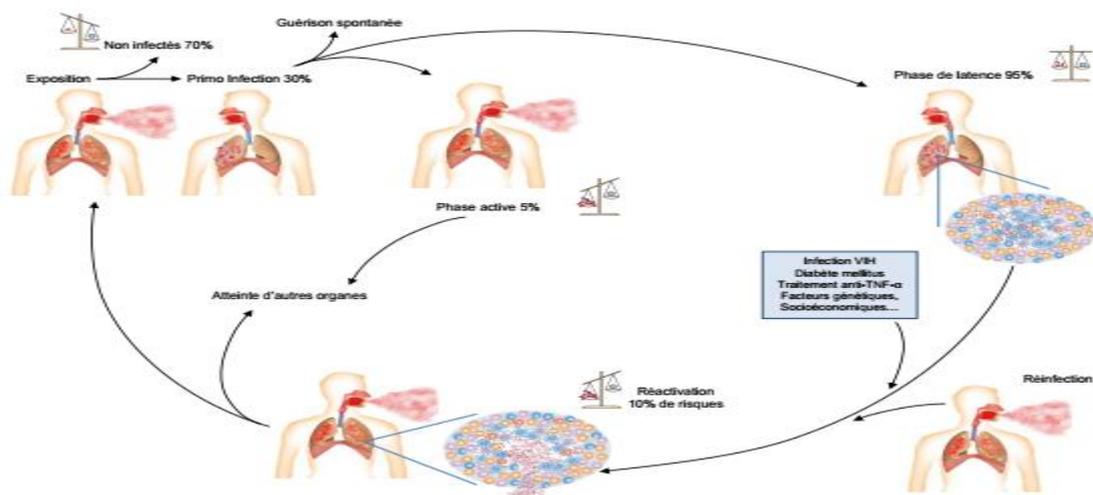


Figure 5: Pathogénèse et cycle de la tuberculose (Kaufmann, 2001)

- **Déclenchement de la réponse immunitaire et production des espèces oxygénées et inflammation** : une fois phagocyté au niveau des alvéoles pulmonaires, les principaux

mécanismes bactéricides utilisés par les macrophages contre les pathogènes reposent sur la production d'espèces oxygénées réactives (EOR) et d'espèces azotées (ENR), produites par deux enzymes, la NADPH phagocyte oxydase et la nitric oxide synthase iNOS comme illustrée par la figure 6 (Flannagan *et al.*, 2009). Ce mécanisme de défense va causer l'oxydation des protéines du bacille tuberculeux et aussi de la cellule présentatrice d'antigène : c'est l'inflammation des tissus.

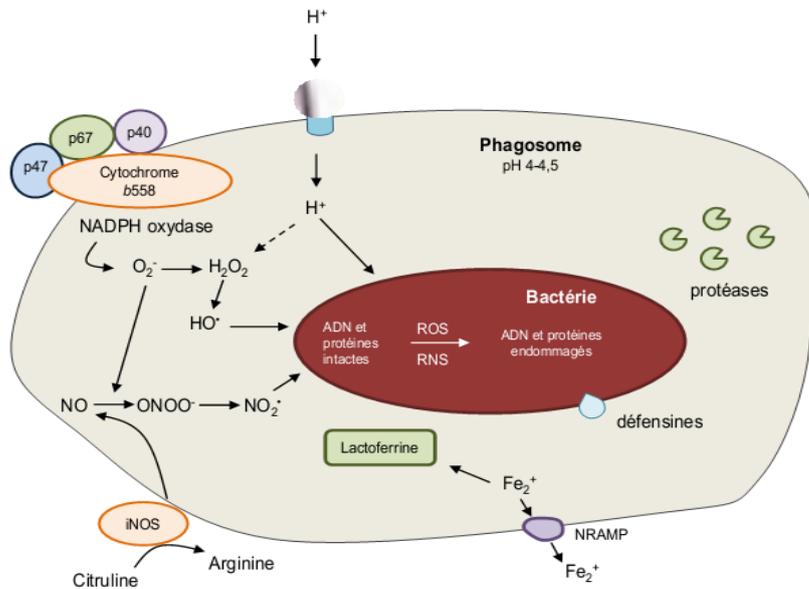


Figure 6: Système de défense de la cellule hôte contre les mycobactéries par production des espèces oxygénées (EOR) et azotées réactives (ENR) (Flannagan *et al.*, 2009)

I.1.5.2. Tuberculose extra-pulmonaire

La TB extra-pulmonaire résulte du transport des bacilles tuberculeux dans tout l'organisme en passant par le système lymphatique et sanguin pour y créer de nouveaux foyers infectieux (Hopewell et Jasmer, 2005). Les bacilles peuvent infecter différents organes du corps tels que les os, les reins, les ganglions, les méninges, l'intestin, la peau. Lorsque la TB est extra-pulmonaire, les symptômes peuvent varier en fonction de la région corporelle atteinte et la radiographie pulmonaire réalisée habituellement suite à la détection d'une réaction intradermique positive en utilisant les protéines atténuées du pathogène (Golden et Vikram, 2005). Les enfants en bas âge développent plus fréquemment des formes extra-pulmonaires de tuberculose. C'est le cas par exemple de la lymphadénite tuberculeuse, de la tuberculose pleurale, de la tuberculose génito-urinaire, de la tuberculose osseuse, de la méningite tuberculeuse et de la tuberculose miliaire (Goupi, 2007).

I.1.6. Diagnostic

I.1.6.1. Examen microscopique

Dans la démarche diagnostique de la tuberculose pulmonaire associée à des signes clinico-radiologiques, voire histologiques, l'examen direct renseigne sur le caractère bacillifère et donc contagieux du patient, permettant ainsi de conforter voire d'imposer l'isolement respiratoire du patient et de dépister les éventuels contacts. Cette étape clé repose le plus souvent sur une coloration fluorescente à l'Auramine, plus sensible que celle de Ziehl Neelsen (coloration de référence) (Steingart *et al.*, 2006). Les BAAR apparaissent sous forme de bacilles verts fluorescents sur fond rouge pour les frottis colorés à l'Auramine et rosés sur fond bleu après coloration de Ziehl Neelsen. Le résultat microscopique est un résultat quantitatif dénombrant le nombre de BAAR par frottis ou par champ selon la standardisation du *center for disease control and prévention* (CDC).

I.1.6.2. Culture en milieu solide ou liquide

Bien que la croissance des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* soit très lente, le diagnostic de tuberculose et la culture demeurent indissociables. Associée à une étape préalable de décontamination–fluidification pour les prélèvements provenant de cavités ouvertes, la culture reste la méthode la plus sensible. Elle permet également d'isoler la souche, support technique nécessaire à l'identification d'espèce et aux tests de sensibilité aux antituberculeux. La méthode la plus performante associe culture en milieu solide et liquide. Le seuil de détection est de 10 à 10² bacilles/mL d'échantillon biologique. Le délai de culture est fonction de la charge bactérienne et peut être corrélé aux résultats de l'examen direct. Les cultures en milieu solide se positivent en 2 à 6 semaines. La plupart des milieux liquides sont couplés à une détection automatique de la croissance (Parrish et Carroll, 2011).

I.1.6.3. La radiographie

La radiographie pulmonaire permet d'établir un bilan initial des lésions thoraciques de forme, de siège et de taille variable. L'aspect des lésions est sans rapport avec l'intensité de la maladie. La spécificité de la radiographie pour la tuberculose pulmonaire varie beaucoup selon différentes études (27 à 81 %). Il existe quatre types de lésions : le nodule, le tuberculome, l'infiltrat et la caverne. L'infiltrat se traduit comme des lésions débutantes de l'infection. Il se manifeste comme une partie peu opaque, hétérogène et étendue de l'imagerie radiographique. Le nodule est un granulome de taille variable, isolé ou groupé. Le tuberculome est un nodule

isolé pseudo-tumoral. La caverne est une région vide due à une perte de substance au sein d'un infiltrat à paroi épaisse. Dans sa forme pulmonaire, la TB se manifeste par la présence d'infiltrats et de nodules principalement localisés aux sommets des poumons et parfois associés à des cavernes.

I.1.6.4. Diagnostic génique

De nombreuses techniques, permettant la détection du complexe *M. tuberculosis* à partir des échantillons biologiques, ont été commercialisées et ont fait l'objet de nombreuses publications. Récemment, de nouveaux tests associant à la fois détection des bactéries CMT et détection de la résistance à certains antituberculeux ont été développés.

I.1.6.4.1. Test d'hybridation inverse sur bandelettes (MTBDR[®]plus, Hain LifeScience)

Le test Genotype[®] MTBDR (Hain Lifesciences, Nehren, Germany) est un test de détection rapide des mutations associées aux antituberculeux de seconde ligne qui repose exactement sur le même principe que le Genotype[®] MTBDRplus. Le test amplifie des régions des gènes *gyrA*, *rrs* et *embB* associés respectivement à la résistance à la Fluoroquinolone, à la Capréomycine/Kanamycine/Amikacine et à l'Ethambutol (EMB) (Hillemann *et al.*, 2009 ; Kiet *et al.*, 2010).

I.1.6.4.2. Test Xpert MTB/RIF[®]

Le Xpert[®] MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) est une plateforme de tests de diagnostic moléculaire de la TB et de détection moléculaire de la sensibilité à la RIF. Le Xpert[®] MTB/RIF se base sur l'amplification en temps réel de la région RRDR « *Rifampicin Resistance Determining Region* » et sur la détection des mutations dans cette région par l'hybridation de différentes sondes. La non détection de mutations sur cette région s'interprète comme la sensibilité à la RIF de la souche et réciproquement. La région RRDR est une courte séquence de 81 pb du gène *rpoB* présentant la majorité des mutations décrites actuellement responsables de la résistance à la RIF chez *M. tuberculosis*. Le Xpert[®] MTB/RIF fonctionne comme un système utilisant des cartouches uniques en vase clos avec des réactifs lyophilisés disponibles directement dans la cartouche. L'obtention des résultats est rapide (2h30). Les tests se font directement à partir de crachats de patients. La sensibilité et la spécificité sont élevées. L'excellente capacité du Xpert[®] MTB/RIF à identifier les mutations responsables de la résistance à la Rifampicine a été démontrée à plusieurs reprises par différentes études (Blakemore *et al.*, 2010 ; Helb *et al.*, 2010)

I.1.7. Mesure de prévention de la tuberculose

Le vaccin antituberculeux préparé à partir du Bacille de Calmette et Guérin (BCG) a été mis au point entre les années 1908 et 1921 à l'Institut Pasteur de Lille. Il est encore actuellement le seul vaccin antituberculeux disponible contre la TB humaine dans le monde (**Locht, 2008**). Le vaccin BCG est constitué de bacilles tuberculeux bovins atténués obtenus par 230 transferts successifs de la bactérie pathogène sur un milieu de culture à base de pommes de terre glycélinées, mélangé avec de la bile. Son injection se fait par voie intradermique. C'est un vaccin stimulant une réaction immunitaire à médiation cellulaire et humorale du sujet ne provoquant pas de pathologie (**Ait-Khaled *et al.*, 1999**). Le vaccin BCG confère une protection chez les enfants contre les formes graves de TB (extra pulmonaire ou méningée) mais est moins efficace pour les formes pulmonaires qui sont les plus fréquentes (**Colditz *et al.*, 1994**). Le vaccin n'empêche pas la survenue d'une primo-infection tuberculeuse ou la réactivation d'une TB pulmonaire latente (**WHO, 2004**).

I.1.8. Traitement aux antituberculeux et problèmes de résistance

I.1.8.1. Traitement aux antituberculeux

Les antibiotiques représentent le moyen le plus efficace contre les infections bactériennes. Ils ont une activité sélective et spécifique liée à un mécanisme d'action précis permettant leur utilisation dans le traitement de certaines infections, à l'instar de la tuberculose (**FAURES, 2010**).

Le traitement contre la TB a permis d'éviter 49 millions de décès dans le monde entre 2000 et 2015 (**OMS, 2016**). La multi-thérapie est préférée non seulement pour l'atténuation du risque d'émergence de résistance, mais également pour l'élargissement du spectre d'activité et le renforcement de l'effet bactéricide. Cependant, une chimiothérapie adéquate consiste en une association appropriée de médicaments, la prescription de ces médicaments à des doses adéquates et leur prise régulière par le patient (**OMS, 2009**).

Les principaux antituberculeux de référence utilisés pour traiter la tuberculose sont dits antituberculeux de première ligne, notamment :

- La Rifampicine[®] (RIF) ; l'Isoniazide[®] (INH) ; la Pyrazinamide[®] (PZA) ; l'Ethambutol[®] (EMB) et la Streptomycine[®] (SM).

Ceux de la deuxième ligne, dans lesquels l'on trouve :

- L'Amikacine® (AC) ; la Kanamycine® (KM) et les Fluoroquinolones® (FQ) comme l'Ofloxacin®.

Le traitement des souches MDR (Multi résistant) et XDR (Extrêmement résistant) nécessite jusqu'à 2 ans de prise médicamenteuse d'une combinaison des antituberculeux de 1ère et de 2nde ligne, souvent génératrice d'effets secondaires (Hill, 2002 ; OMS, 2009).

I.1.8.2. Mode d'action des antituberculeux

Le mode d'action de ces antituberculeux consiste à bloquer sélectivement une étape d'un mécanisme essentiel à la survie ou à la multiplication des micro-organismes. Ces molécules antibactériennes dans leur action, inhibent de façon spécifique une voie métabolique indispensable à la vie de la bactérie sans toutefois exercer un effet toxique sur l'organisme hôte. Selon leur mode d'action, les antibiotiques peuvent être classés en plusieurs catégories :

I.1.8.2.1. Les antituberculeux inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne

Ils bloquent la synthèse des constituants de la paroi en interférant dans certaines étapes clés de la synthèse du peptidoglycane. La paroi ainsi absente, la cellule explosera sous l'effet de la pression osmotique interne :

- Exemple 1 : l'Isoniazide®

L'Isoniazide (INH) est un antituberculeux de synthèse dont l'activité a été démontrée en 1952. Bien que sa structure soit relativement simple, son mécanisme d'action est assez complexe (Vilcheze et Jacobs, 2007). Les études ont montré qu'il exerce son activité en inhibant la synthèse des acides mycoliques de la paroi des mycobactéries. L'INH est une prodrogue nécessitant une étape préliminaire d'activation oxydante *in vivo* par la peroxydase KatG de *M. tuberculosis* comme le montre la Figure 7. L'implication de KatG a été mise en évidence par l'observation de sa perte d'activité dans des souches résistantes à l'INH puis confirmée par des études génétiques (Zhang *et al.*, 1954).

Le radical acyl formé se lie de manière covalente au cycle nicotinamide de la coenzyme NAD induisant la dissociation du NAD de l'InhA, menant à l'arrêt de la synthèse des acides mycoliques puis à une lyse cellulaire (Banerjee *et al.*, 1994). Cette inhibition entraîne une accumulation d'acide gras à longues chaînes dans le milieu lors d'un traitement. Ces résultats ont permis d'établir l'hypothèse que la cible de l'INH pourrait être impliquée dans l'élongation

des acides mycoliques (Mathys, 2010).

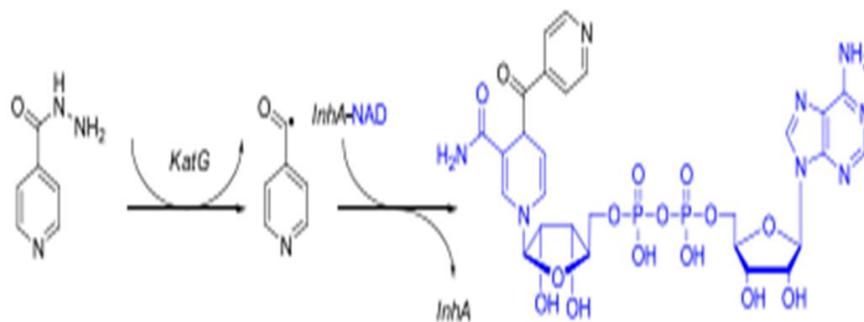


Figure 7: Bioactivation de l’Isoniazide (Banerjee *et al.*, 1994)

- **Exemple 2 :** L’ethambutol est un composé de synthèse découvert en 1956 pour ses propriétés antituberculeuses, très proche de l’INH à la fois par sa structure représentée par la figure 8 et par son mode d’action. En effet, après activation opérée dans ce cas par la monooxygénase EthA, l’ETH se lie avec InhA et inhibe la biosynthèse des acides mycoliques selon le même processus que l’INH (Banerjee *et al.*, 1994).

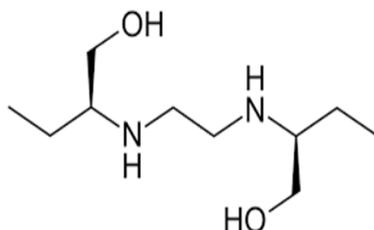


Figure 8: Formule de l’Ethambutol (Banerjee *et al.*, 1994)

I.1.8.2.2. Les antituberculeux inhibiteurs de la synthèse membranaire

Ce sont des antibiotiques de la famille des polypeptides tels que les Polymixines. Ces derniers se fixent sur les lipides membranaires des cellules en croissance et au repos, désorganisant ainsi leur bicouche phospholipidique membranaire (Bonfiglio et Furneri, 2001) :

- Exemple : le PA-824

Le PA-824 est une molécule ou prodrogue candidate de la classe des nitroimidazoles activée par la glucose-6-phosphate déhydrogénase (FGD1) F420-dépendante. La forme activée semble inhiber la synthèse de protéines et lipides de la paroi (Stover *et al.*, 2000, Manjunatha *et al.*, 2006). Une activité sur les bacilles tuberculeux dormants (non-réplicatifs) a été décrite par Singh *et al.*, en 2008.

I.1.8.2.3. Les antituberculeux agissant sur les acides nucléiques

Ce sont les antituberculeux qui affectent soit la synthèse de l'ADN soit celle des ARN (Meyer, 2007).

- Exemple 1 : les Fluoroquinolones (Ciprofloxacine, Ofloxacine et Lévofloxacine)

Les Fluoroquinolones, comme les autres quinolones, sont connues pour interagir simultanément avec deux cibles distinctes dans les cellules bactériennes à savoir les gyrases de l'ADN et les topoisomérase IV. Toutefois, comme *M. tuberculosis* ne possède pas de topoisomérase IV, une telle interaction duale n'est pas possible et les fluoroquinolones agissent donc dans ce cas précis uniquement par blocage du complexe gyrase/ADN. Les quinolones empêchent la progression de la fourche de réplication en formant un complexe stable quinolone/gyrase/ADN, bloquant ainsi le passage de l'ARN polymérase et conduisant à une terminaison prématurée de la transcription (Meyer, 2007) :

- Exemple 2 : le 5-Fluorouracil

Le 5-fluorouracil (5-FU) est un analogue de l'uracile, où l'hydrogène du C-5 a été substitué par un atome de fluorine. Les hypothèses retenues pour le mode d'action du 5-FU sont multiples (Adjei, 1999 ; Longley *et al.*, 2003). Le 5-FU pénètre rapidement dans les cellules eucaryotes par le même mécanisme de transport que celui de l'uracile et est métabolisé en fluorodéoxyuridine monophosphate (FdUMP), fluorodéoxyuridine triphosphate (FdUTP) et fluorouridine triphosphate (FUTP). Les métabolites FdUMP et FdUTP sont des inhibiteurs de la réplication et de la réparation de l'ADN alors que le FUTP est incorporé dans l'ARN et inhibe la traduction (Marsh et McLeod, 2001). De même, il est un inhibiteur de la thymidylate synthase (TS) qui altère le processus de méthylation du déoxyuridine monophosphate (dUMP) en thymidine monophosphate (dTMP) entraînant des effets létaux pour les cellules bactériennes (Marsh et McLeod, 2001 ; Bijnsdorp *et al.*, 2007).

I.1.8.2.4. Antituberculeux inhibiteurs de la synthèse protéique

Ils inhibent certaines étapes du processus de synthèse protéique. Ces substances agissent principalement au niveau des différentes sous-unités (30s ou 50s) du ribosome 70s des bactéries en renforçant la liaison entre les sous-unités, ce qui empêche la lecture de l'ARNm (Meyer, 2007) :

- Exemple : la Rifampicine

La Rifampicine (RMP) dont la formule développée est représentée par la figure 9 est un dérivé de la Rifamycine possédant une forte activité bactéricide. Elle est active à la fois sur les bacilles tuberculeux en croissance et ceux semi-dormants (non-divisants). Son mécanisme d'action a été démontré chez *E. coli*, *M. tuberculosis* et *M. smegmatis* (Levin et Hatfull, 1993) ; il a pour cible l'ARN polymérase ADN-dépendante, un oligomère constitué de 4 sous-unités ($\alpha 2\beta\beta'$) dont l'association avec la sous-unité sigma sur une région promotrice permet d'initier la transcription d'un gène. La fixation de la RMP sur la sous-unité β de l'ARN polymérase a pour effet de bloquer l'expression génique.

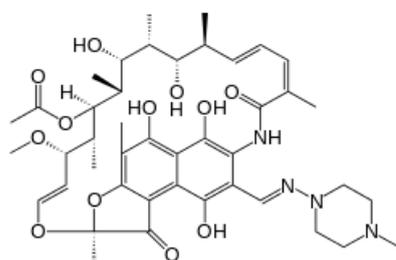


Figure 9: Structure chimique de la Rifampicine (Levin et Hatfull, 1993)

I.1.8.2.5. Antituberculeux comme inhibiteurs compétitifs

Ces molécules sont des analogues structuraux encore appelés anti-métabolites. Ils interfèrent avec les métabolites normaux de la cellule qui sont principalement : les acides aminés (le parafluorophénylalanine et le 1,2,3-triazole-3-alanines), analogues structuraux de l'alanine et de l'histidine respectivement, déstabilisent la protéine dans laquelle ils se trouvent (Mathys, 2010).

- Exemple : l'Acide para-aminosalicylique (PAS)

Découverte par Lehmann en 1943, le PAS est un analogue structural des sulfonamides. Les sulfonamides sont des analogues de l'Acide p-AminoBenzoïque (p-AAB), le substrat de la dihydroptéroate synthase (FolP1), catalysant la condensation du p-AAB et du 6-hydroxyméthyl-7,8-dihydropteridine pyrophosphate en 7,8-dihydroptéroate (DHP), qui est converti en dihydrofolate (DHF) et réduit par l'enzyme dihydrofolate réductase (DfrA) pour générer le cofacteur tétrahydrofolate (THF) et fonctionnent de ce fait comme inhibiteur compétitif des sulfamides (Nopponpunth *et al.*, 1999).

I.1.9. La résistance bactérienne aux antituberculeux et effets secondaires

La résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux est observée lorsque sa concentration minimale inhibitrice (CMI) est supérieure à la concentration sanguine maximale d'antituberculeux obtenue lors d'un traitement (**Philippon, 2001**). On distingue de ce fait, deux types de résistances développées par des souches de mycobactéries, l'une qui est naturelle et l'autre acquise, car due à l'emploi massif et incontrôlé d'antituberculeux.

I.1.9.1. La résistance naturelle

La résistance naturelle encore appelée résistance intrinsèque est observée lorsque des souches d'une même espèce sont résistantes aux antibiotiques. Cette résistance est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes) (**Lozniewski et al., 2010**).

Chez les mycobactéries, le phénotype « sensible » ou « résistant » à un antibiotique donné est spécifique d'espèce. Les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* sont naturellement résistantes aux principales familles d'antibiotiques tels que les β -lactamines, les macrolides, les cyclines, les sulfamides et les glycopeptides (**Vezeris et al., 2005 ; Mathys, 2010**). Les mycobactéries non tuberculeuses sont aussi naturellement résistantes à la plupart des antibiotiques efficaces sur *M. tuberculosis* tels que l'Isoniazide, la Pyrazinamide et l'Ethambutol (**Vezeris et al., 2005 ; Mathys, 2010**). La faible perméabilité de la paroi mycobactérienne est en général mise en cause pour expliquer le haut niveau de résistance naturelle des mycobactéries (**Jarlier et Nikaido, 1994**).

I.1.9.2. La résistance acquise aux antituberculeux

Cette résistance viendrait du fait que, contrairement aux autres bactéries pathogènes qui acquièrent leur résistance aux antibiotiques par transfert horizontal de plasmides ou transposons portant des gènes de résistance, l'acquisition de résistance chez *M. tuberculosis* provient presque toujours d'altérations spontanées des gènes chromosomiques spécifiques sous la forme de mutations ponctuelles non-synonymes, de délétions ou insertions (**Davies, 1998**). A ce jour, les mutations impliquées dans la résistance de *M. tuberculosis* aux antibiotiques ont été mises en évidence.

- Dans les gènes codant pour les protéines cibles de l'antibiotique, diminuant l'affinité de la cible pour la Rifampicine (RMP), l'Ethambutol (EMB) et les Fluoroquinolones (FQ) ;

- Dans un gène codant pour une enzyme impliquée dans l'activation de l'Isoniazide (INH) et de la Pyrazinamide (PZA), empêchant son passage de la forme prodrogue à la forme active (Somoskovi *et al.*, 2001 ; Veziris *et al.*, 2005).

I.1.9.3. Effets secondaires des antituberculeux (Sanofi-Aventis, 2009 ; OMS, 2009)

Les effets secondaires dus à la prise des antituberculeux sont généralement des troubles liés aux métabolismes du patient notamment,

- Une hépatite grave et voire fatale pouvant survenir lorsqu'on administre de l'Isoniazide, et ce, même après de nombreux mois de traitement. Le risque d'hépatite varie selon l'âge du patient.

- Troubles de l'appareil reproducteur et des seins : Gynécomastie.

- Troubles de la peau et des tissus sous-cutanés : Acné, syndrome de Stevens-Johnson, pemphigus, rash, dermatite exfoliatrice et éruptions cutanées, généralement liés à des réactions d'hypersensibilité.

- Troubles vasculaires : vascularite (liée à des réactions d'hypersensibilité).

- Troubles immunitaires : réactions d'hypersensibilité, telles que fièvre, éruptions cutanées, acné, dermatite exfoliatrice, syndrome de Stevens-Johnson, syndrome lupoïde, adénopathie, vascularite et réactions anaphylactiques.

- Troubles métaboliques et nutritionnels : carence en pyridoxine, pellagre, hyperglycémie et acidose métabolique.

- Troubles de l'appareil locomoteur et du tissu conjonctif : syndrome rhumatismal et syndrome lupoïde (en association avec des réactions d'hypersensibilité).

- Troubles du système nerveux : l'effet toxique le plus fréquent est une neuropathie périphérique.

I.1.9.4. Intérêt de la recherche de nouveaux antituberculeux

Un nouvel antituberculeux idéal doit être capable de :

- Réduire la durée du traitement : forte activité bactéricide, être très actif sur *M. tuberculosis* en latence,

- Cibler les souches MDR (Multi Drug Résistant) et XDR (Extensive Drug Résistant) : nouveau mécanisme d'action,

- Simplifier le traitement : combinaison de médicaments plus efficace pour en réduire le nombre,

- Ralentir la fréquence de prise : amélioration de la pharmacocinétique (comme une durée de $\frac{1}{2}$ vie plus longue),

- Être utilisé en parallèle de traitements, tels que l'anti-VIH : minimum d'interaction avec les autres médicaments,

C'est dans l'optique d'éradiquer la tuberculose que l'OMS préconise la recherche des candidats médicaments et principalement, ceux issus de la pharmacopée traditionnelle seraient une alternative intéressante (OMS, 2018). En Afrique, la médecine traditionnelle est parfois la seule source de soins abordable et accessible par laquelle les populations se soignent. De ce fait, les thérapies à base d'HEs de plantes pourraient constituer les armes biologiques de nouvelle génération pour lutter contre les infections microbiennes (A Boire *et al.*, 2013).

I.2. GENERALITES SUR LA MEDECINE TRADITIONNELLE ETPHYTOTHERAPIE

I.2.1. Médecine traditionnelle

I.2.1.1. Définition

L'OMS l'a définie comme étant « l'ensemble des connaissances, compétences et pratiques basées sur les théories, croyances et expériences auxquelles différentes cultures ont recours pour entretenir la santé ainsi que pour la prévenir, diagnostiquer, soulager des maladies physiques et mentales » (OMS, 1978). A l'heure actuelle cette pratique est largement utilisée dans les pays du Sud où elle génère des revenus non négligeables (Lusakibanza, 2012).

I.2.1.2. Intérêt et mode d'utilisation

Dans les pays en voie de développement, certaines localités manquent de structures hospitalières ce qui oblige les populations à exploiter les plantes médicinales présentes dans leur environnement comme source de médicaments. Aujourd'hui ces populations ont formulé ces plantes en médicaments ou recettes obtenues suivant le mode de préparation en fonction de l'effet recherché et les voies d'administration.

- **Les recettes obtenues par macération**

Ce sont des préparations des extraits obtenues par immersion du matériel végétal broyé frais ou sec dans un solvant généralement l'eau ou le mélange eau/alcool représenté par le vin de palme ou de raphia. Cette recette peut être prise par voie orale ou rectale selon la localisation de la maladie et l'organe affecté.

- **Les recettes obtenues par décoction**

Les décoctés résultent de l'immersion du matériel végétal broyé sec ou frais dans de l'eau ou un système solvant eau/éthanol (Vin de palme) suivie d'une ébullition du mélange. Cette recette peut être prise par voie orale ou rectale, par inhalation des vapeurs selon la localisation de la maladie et l'organe affecté.

- **Les recettes obtenues par infusion**

Ces recettes résultent de l'immersion du matériel végétal broyé sec ou frais dans de l'eau ou un système solvant eau/éthanol à chaud. Celle-ci peut être prise par voie orale ou rectale, par inhalation des vapeurs selon la localisation de la maladie et l'organe affecté.

I.2.2. Phyto-aromathérapie (Franchomme et Penoel, 2011 ; Kaloustian et Hadjiminaglou, 2012)

I.2.2.1. Définition

La phytothérapie et l'aromathérapie sont deux expressions qui désignent la médecine basée sur l'utilisation des extraits, les principes actifs naturels et les HEs de plantes pour le bien être en général, aussi bien dans la prévention que le traitement des maladies. On peut la distinguer en trois types de pratiques :

- Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'OMS, cette phytothérapie est considérée comme la médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement.

- Une pratique de prophylaxie déjà utilisée dans l'antiquité. C'est notamment le cas dans la cuisine, avec l'usage de la ciboulette, de l'ail, du thym, du gingembre ou simplement du thé vert. Une alimentation équilibrée et contenant certains éléments actifs étant une phytothérapie prophylactique.

- Une pratique basée sur les avancées et preuves scientifiques recherchées dans les extraits actifs des plantes. Cette pratique débouche suivant les cas sur la fabrication de médicaments pharmaceutiques ou médicaments traditionnels améliorés (MTA) ou de phytomédicaments.

I.2.2.2. Importance et dangers de la phytothérapie

La phytothérapie est une médecine alternative qui est complémentaire à la médecine conventionnelle et qui attire de plus en plus l'attention dans le contexte de l'offre de soins de santé et de la réforme du secteur sanitaire (**Dibong et al., 2011**). Dans les pays développés, elle gagne en popularité en occupant une place importante dans certains centres hospitaliers, dans l'automédication notamment avec l'utilisation des HEs et avec la production des phytomédicaments (**Hortvarth et Acs, 2015**). En effet, un des grands atouts de la phytothérapie par rapport à la médecine conventionnelle est l'exceptionnelle tolérance des plantes médicinales lorsqu'elles sont choisies en respectant les indications des posologies du fabricant ou du phytothérapeute ce qui permet de diminuer la fréquence d'apparition des effets secondaires au cours du traitement. La phytothérapie trouve sa justification dans la pharmacognosie qui explore l'aspect multidisciplinaire de la connaissance du végétal et de ses propriétés (**Prescrire, 2007 ; Gabbiche, 2009**). Cependant, certaines plantes contiennent des principes actifs qui peuvent être extrêmement toxiques à faible dose ou après association à une autre (**OMS, 1998**).

I.2.2.3. Les étapes du développement d'un phytomédicament

Le développement d'un médicament est un processus complexe, qui nécessite des investissements considérables qui sont regroupés en quatre grandes étapes. Ce processus commence par le choix des plantes ou composés actifs d'une plante qui peut se faire par diverses approches à savoir : l'approche aléatoire, l'approche chimiotaxonomique ou le criblage phytochimique, l'approche ethno-guidée, et la bio-informatique appliquée (**Igoli et al., 2005 ; Queiroz et al., 2009**).

La seconde étape est la réalisation des études précliniques c'est-à-dire l'évaluation de l'activité biologique *in vitro* et *in vivo* du médicament et dans ce cas précis, de l'activité antimicrobienne *in vitro* et *in vivo* s'accompagnent du mécanisme d'action du principe actif. Elle consiste aussi à évaluer l'efficacité et les effets indésirables du médicament plus précisément à étudier le devenir du médicament dans l'organisme et ses interactions avec l'organisme, en particulier son efficacité (pharmacologie) et sa toxicité éventuelle (toxicologie) sur des rats de laboratoire.

Lorsque les résultats des tests précliniques sont satisfaisants, la troisième étape consistera à réaliser des études cliniques sur des patients atteints d'affection ciblée (cas de la tuberculose dans notre étude) après formulation du principe actif. Cette troisième étape permet d'établir le rapport bénéfice/risque du médicament dans l'indication ciblée, à grande échelle à long terme, et de préciser les précautions d'emploi. Enfin la dernière étape qui est un dossier déposé auprès des autorités de santé pour obtenir l'autorisation de mise sur le marché (AMM) qui s'accompagne d'une pharmacovigilance du profil d'efficacité et de tolérance du médicament produit en évaluant ses effets dans des sous-groupes de patients spécifiques non étudiés auparavant, ou en le comparant à de nouveaux produits de référence. Cette phase se déroule en parallèle du suivi de sécurité du produit par les programmes de pharmacovigilance.

I.2.2.3.1. Choix des plantes pour le développement d'un phytomédicament

En Afrique, en particulier au Cameroun l'approche ethno-guidée est la stratégie la plus utilisée dans le choix des plantes pour le développement des médicaments à base de plantes non seulement parce que la majorité de la population a recours à la médecine traditionnelle mais aussi parce qu'elle est simple et moins coûteuse. Cette approche met en évidence, l'ethnobotanique, l'ethnomédecine et l'ethnopharmacologie. Récemment, l'ethnopharmacie a été structurée de manière à fournir une interface entre sciences pharmaceutiques et la phytothérapie populaire où les espèces de plantes médicinales peuvent être sélectionnées pour le développement de phytomédicaments (**Barbosa et al., 2011**).

L'ethnobotanique est l'approche la plus utilisée et la mieux élaborée. Par définition, l'ethnobotanique est l'exploration scientifique des plantes médicinales provenant des connaissances et pratiques traditionnelles que les différentes cultures utilisent à des fins thérapeutiques ou de diagnostic pour modifier l'état d'un organisme vivant (**Dos Santos et Fleurentin 1990 ; Barbosa et al., 2011**). Elle implique un travail sur le terrain qui consiste à mener des enquêtes auprès des tradipraticiens afin de recenser les plantes médicinales avec les pratiques médicales qui les accompagnent. En effet, l'ethnobotanique cherche à collecter l'information qui a conduit un peuple à utiliser des plantes précises dans le traitement d'une maladie spécifique. Cette information est très importante pour le développement de médicaments à base des plantes. D'autre part, cette stratégie met en œuvre un travail de laboratoire, qui grâce aux outils modernes de la pharmacologie, de la chimie et de la biologie, vise à mieux comprendre et à définir l'activité thérapeutique des substances testées (**Fleurentin et Balansard, 2002**). De plus, l'évaluation de la forme originale (extrait ou essences)

d'utilisation de la plante est déterminante pour l'élaboration de la formulation phytopharmaceutique (Barbosa *et al.*, 2011).

I.2.2.3.2. Phytomédicaments utilisés pour le traitement des affections des voies respiratoires et la tuberculose

En ce qui concerne les phytomédicaments utilisés pour le traitement des affections des voies respiratoires, les HEs sont les préparations médicamenteuses les plus sollicitées en raison de la voie d'administration qui est basée sur l'inhalation. Plus de vingt-cinq HEs de plantes sont utilisées dans la pharmacopée européenne pour le traitement des affections des voies respiratoires parmi lesquelles les HEs d'Eucalyptus (*Eucalyptus globulus* ou *Eucalyptus citriodora*), l'anise vert (*Anisi aetheraleum*), le thym (*Thymus vulgaris*), le thé vert (*Melaleuca aetheraleum*) et la menthe poivrée (*Mentha piperita*) (Pharmacopée Européenne, 2004). Dans la pharmacopée africaine par contre on trouve très peu d'informations sur leurs utilisations.

Plusieurs études cliniques ont permis de confirmer l'efficacité des phytomédicaments à base d'HEs comme le GelMyrteol[®] un médicament utilisé dans la médecine Allemande pour le traitement des bronchites et de la toux (Gillisen *et al.*, 2013, Paparoupa *et al.*, 2016). Il est constitué de Myrtol constituant principal des HEs de Myrte (plante du genre *Myrtus*) dont les activités antimicrobiennes ont déjà été prouvées (Havarth et Arc, 2015). En médecine traditionnelle chinoise la plante *Mosla dianthera* est employée pour soulager des maux de tête et des congestions nasales ; pour traiter la bronchite, la grippe, la toux et les pneumonies virales à Influenza (Lee *et al.*, 2006 ; Wu *et al.*, 2012). En France, les sprays aux HEs d'Arome[®] et Prorhinel[®] sont utilisés comme expectorants nasal et les capsules GAE Naturactive[®] à base d'HEs sont utilisées pour lutter contre les états grippaux. Du point de vue de leurs complexités en molécules chimiques, les HEs peuvent avoir plusieurs autres propriétés biologiques.

I.3. GÉNÉRALITÉS SUR LES HUILES ESSENTIELLES DES PLANTES ET LEURS PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Les HEs sont des mélanges complexes de composés volatiles et odoriférants, et produites par les plantes aromatiques et/ou médicinales en réponse à un stress environnemental ou à une activité physiologique normale. Elles sont constituées de différentes classes de composés tels que :

- Les hydrocarbures terpéniques
- Les terpenoïdes

- Les dérivés du phénylpropène et aliphatiques (**Breneton, 1999**).

I.3.1. Hydrocarbures terpéniques

Les composés terpéniques sont des composés à structure isoprénique, de formule chimique $(C_5H_8)_n$. Ils entrent dans les composés majeurs des HEs et sont présents sous forme d'hémiterpènes (C_5), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), triterpènes (C_{30}) et de tétraterpènes (C_{40}). Les terpènes sont actifs contre les levures, les virus et les bactéries (**Suresh et al., 1997**) ; plus spécifiquement les mycobactéries, par action du *trans*- β -caryophyllène, le *p*-cymène, le α -phéllandrène et le α -pinène (**Bueno et al., 2009**). Leur mécanisme d'action élucidé sur les mycobactéries montre des déformations morphologiques causées suite à l'augmentation de la perméabilité membranaire (**Cowan, 1999 ; Sieniawska et al., 2015**).

I.3.2. Terpenoïdes

Les terpenoïdes sont des terpènes dont le groupement méthyl a été substitué par un hétéro-groupement (généralement oxygéné) par une réaction enzymatique (**Caballero et al., 2003**). La présence d'un atome d'oxygène permet de diversifier les terpenoïdes en alcools, esters, aldéhydes, cétones, éthers et époxydes. Le thymol, le carvacrol, le linalol, le linalyl acétate, le citronellal et les citrals (neural et de géranial) (**Hyldgaard et al., 2012**). Les terpenoïdes sont actifs contre les levures, les virus et les bactéries (**Suresh et al., 1997**) ; plus spécifiquement les mycobactéries, par action du thymol, le *trans*- β -caryophyllène, le *p*-cymène, le α -bisobolol et le nérol (**Bueno et al., 2009**).

- **Les composés allylés**

Les composés allylés ou allyles soufrés sont des chaînes aliphatiques où sont incorporées un ou plusieurs atomes de soufre et majoritairement isolés d'*A. sativum*. **Viswanathan et al. (2014)**, ont montré que les gousses d'ail cultivées contenaient une substance appelée alliine. Lorsque les gousses sont moulues, l'alliine est enzymatiquement convertit en allicine sous l'effet de l'alliinase. L'allicine est interconvertit en dérivés d'allyle sulfides stables tels que l'ajoène, le disulfure de diallyle et le trisulfure de diallyle, qui sont pourvus d'activité biologique, en particulier antimycobactérienne (**Tripathi, 2009 ; Catia et al., 2011**). **Viswanathan et al. (2014)**, ont montré que l'allicine et l'ajoène inhibent la croissance des souches de *M. phlei*, *M. smegmatis* et *M. tuberculosis* H37Rv, aux CMI respectives de 15,625 $\mu\text{g/mL}$, 7,812 $\mu\text{g/mL}$ et 0,97 $\mu\text{g/mL}$ pour l'allicine, et de 39,06 $\mu\text{g/mL}$,

39,06 µg/mL et 19,53 µg/mL pour l'ajoène. **Viswanathan et al. (2014)** ont suggéré que leur effet antimicrobien serait dû à l'interaction spécifique avec le groupe thiol (-SH). Sur *M. tuberculosis*, l'allicine contrecarre l'infection de tuberculose par l'intermédiaire des effets anti-inflammatoires sur les cellules mononucléaires de l'hôte infectées par MTB et il augmenterait l'activité de la glutathion peroxydase induisant une diminution la production des espèces oxygénées réactives (EOR) et des médiateurs inflammatoires (TNF alpha) (**Hasan et al., 2006**).

- **Les sesquiterpènes triquinanes**

L'HE d'*Anemia tomentosa* en contient en majorité et son activité anti-mycobactérienne a été démontrée à la CMI de 100 µg/mL sur la souche de *M. tuberculosis* H37RV (**Pinto et al., 2009**). Celle de l'HE d'*Echinops giganteus* étudiée par **Menut et al. (1997)** dont la composition chimique lui est semblable contient majoritairement de sesquiterpènes triquinanes notamment le (-)-epi-presilphiperfolan-1-ol (30,6%), le silphiperfol-6-ène (14,7%), le presilphiperfolan-8-ol (8,3%) et le cameroonan-7-ol (4,4%) comme (**Menut et al., 1997 ; Pinto et al., 2009**). Le (-)-epi-presilphiperfolan-1-ol quant à lui, a montré une activité contre *M. tuberculosis* H37Rv avec une CMI de 120 µg/mL (**Pinto et al., 2009**). De façon particulière, le mécanisme d'action des sesquiterpènes lactones n'est pas complètement élucidé pour les mycobactéries néanmoins, ils perturberaient la structure membranaire des bactéries Gram négatifs et Gram positifs à travers leurs composants lipophiles en augmentant la perméabilité membranaire de ces bactéries (**Cowan, 1999**).

I.3.3. Phénylpropènes

Les phénylpropènes constituent un groupe de composés aromatiques synthétisés à partir de la phénylalanine. Ils tiennent leur nom du groupement phénolique et des 3 carbones du propène en substitution. Les phénylpropènes sont moins abondants que les dérivés terpéniques et comprennent des composés odorants tels que la vanille, l'eugénol, l'anéthol et l'estragole (**Hellal, 2011**). On classe aussi les dérivés des glycosinalates retrouvés dans les HEs de plantes tel que les *Brassicaceae* ; les *Pentadiplandraceae* tel que *Pentadiplandra brazzeana* et les *Putranjivaceae* tel que *Drypetes gossweileri*. Dans cette famille de composé d'HEs on retrouve :

- **Les composés dérivant de l'hydrolyse des glucosinolates**

Les glucosinolates, autrefois appelés hétérosides soufrés, ou thioglucosides, sont des composés organiques rassemblant autour d'un atome de carbone : un glucose par le biais d'une liaison avec un atome de soufre et un groupe sulfate, par l'atome d'azote du groupement oxime et d'une génine variable, dérivant d'un acide aminé (Ndoyé, 2001 ; Nyegue, 2006).

Les glucosinolates se retrouvent stockés dans les vacuoles des plantes où ils restent non actifs en l'absence d'une enzyme : la myrosinase. Lorsque le tissu de la plante est lésé, l'enzyme entre alors en contact avec le glucosinolate et déclenche l'hydrolyse enzymatique. Au cours du processus de l'hydrodistillation, les glucosinolates sous l'effet de la chaleur sont hydrolysés en produits dérivés qui subissent un réarrangement en fonction du pH réactionnel et du procédé d'extraction (Montaut *et al.*, 2017 ; Nyegue *et al.*, 2018).

- Si le pH est neutre, il se forme un isothiocyanate (ITC), très réactif, volatil, à forte odeur et à goût amer. C'est le produit d'hydrolyse dominant pour beaucoup d'espèces.
- Si le pH est acide, il se forme du nitrile.
- Lorsque le pH est basique il se forme majoritairement les thiocyanates.

La nature des produits d'hydrolyse dépend du type de glucosynolate, de la présence de réactants (ascorbates) et du pH du milieu (Nyegue *et al.*, 2018). La figure 10 résume les différents dérivés des glucosinolates obtenus en fonction du pH du milieu réactionnel.

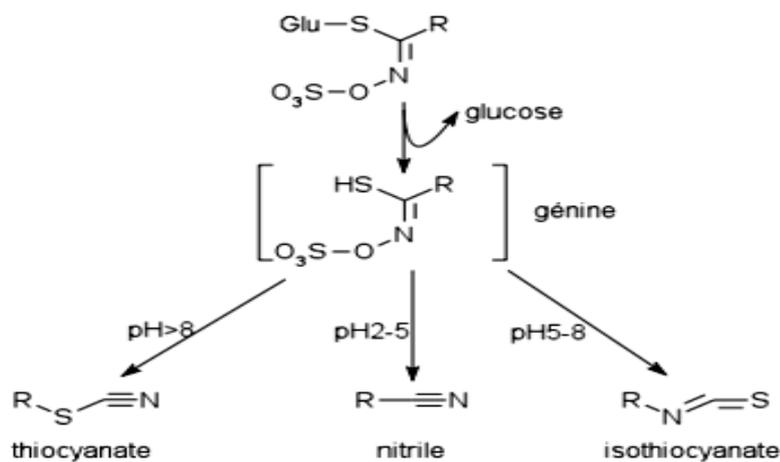


Figure 10: Schéma de dégradation des glucosinolates en fonction du pH du milieu (Sixue *et al.*, 2001).

De tous ces dérivés, les ITCs sont les plus réactifs et possèdent une structure R–N=C=S ou le radical (R) qui représente la partie aglycone hydrophobe variable (Adjélé, 2011). Ils ont montré une activité antibactérienne avec le phényléthyl-ITC sur *Escherichia coli* et *Clostridium difficile* (Adjélé, 2011). Kurepina *et al.* (2013), ont montré que les ITC possèdent une activité sur les souches de *M. tuberculosis* W, H37Rv, P et AB avec des CMI comprises entre 0,5 et 32 µg/mL. Le mécanisme par lequel les ITC inhibent les mycobactéries demeure inconnu. Néanmoins, la présence de groupes particuliers à l’instar des dérivés de thiocyanate, d’isothiocyanate et d’acétonitrile déterminerait l’activité de ces derniers (Kurepina *et al.*, 2013).

I.3.4. Techniques d’extraction des huiles essentielles (AFSSAPS, 2008)

Les techniques d’extraction des HEs sont nombreuses et leur mise en œuvre, plus ou moins facile. Certaines sont utilisées depuis longtemps par l’Homme, d’autres sont le résultat d’avancées récentes ; cependant toutes ont pour but de récupérer une substance ou une molécule pure à partir d’un mélange. En fonction du matériel végétal utilisé, on distingue plusieurs techniques d’extractions des HEs :

- **Extraction par hydrodistillation** : C’est la technique la plus employée à cause de sa simple faisabilité et son efficacité. Le principe général est basé sur le fait que les vapeurs d’eau pénètrent dans les tissus du matériel végétal et entraînent par la suite les composés volatils sous forme de vapeurs qui sont condensés dans le réfrigérant, pour être récupérés en phase liquide dans un vase florentin (ou essencier) constituant ainsi l’HE qui est séparée de l’eau par décantation.

- **Distillation sèche** : L’HE est obtenue par distillation des bois, d’écorces ou de racines, sans addition d’eau ou de vapeur d’eau.

- **Extraction par pression à froid** : C’est un mode d’extraction qui ne s’applique qu’aux agrumes (*Citrus sp.*). En effet il consiste à broyer à l’aide de presses, les zestes frais pour détruire les saccules ou des poches sécrétrices d’HE afin de libérer l’essence. Le mélange obtenu est appelé essence car on note la présence de plusieurs composés hydrosolubles.

- **L’enfleurage** : On étale des pétales de fleurs sur de la graisse. Celle-ci extrait les parfums et les odeurs de la plante et une fois saturée, elle est traitée à l’alcool. Celui-ci est ensuite évaporé sous vide. Il reste alors un résidu très parfumé qui servira à la fabrication des parfums. On distingue l’enfleurage à froid (pour les plantes délicates : jasmin, violette) de l’enfleurage à chaud (la graisse est chauffée entre 60 °C et 70 °C).

I.3.5. Méthodes d'analyse et d'identification des huiles essentielles

I.3.5.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est une technique de séparation qui permet la détermination quantitative et qualitative des constituants chimiques d'une substance. Il s'agit d'une technique d'analyse de mélange de composés volatils ou susceptibles d'être volatilisés sans être décomposés par une élévation de température.

I.3.5.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)

Le couplage CPG-SM permet une identification plus poussée des composés en tenant compte de leur structure moléculaire. En effet, dans cette technique, le détecteur du chromatographe est le spectromètre de masse. Cet appareil comprend également trois modules : une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur

1) **La source d'ions** est la partie du spectromètre où sont produits les ions gazeux ; elle est maintenue à une température élevée pour éviter la condensation de l'analyte.

2) **L'analyseur** est la partie qui possède quatre paramètres. A savoir : la résolution, la vitesse de balayage, la gamme de rapport (masse/charge) balayée et la transmission. L'analyseur grâce à ces paramètres sert à trier ou à séparer les ions en fonction de leur rapport m/z .

3) **Le détecteur** dont le rôle est de compter les ions en faisant correspondre leur rapport m/z et de fournir un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés. L'enregistreur est intégré à ce système pour traiter le signal et permettre la visualisation des spectres.

Durant tout ce processus, un système de calibrage est mis en place pour permettre l'étalonnage entre la grandeur réelle mesurée et le rapport m/z .

La comparaison de l'indice de rétention calculé et du spectre de masse avec les données de la littérature permet en général l'identification des composés (**Adams, 2012 ; NIST 2014**).

I.3.6. Mécanismes d'action antibactérienne des huiles essentielles

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles (**Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004**). De ce fait, les chercheurs se focalisent très souvent

sur les potentielles cibles cellulaires et les dommages que causent les HEs sur les cellules (Hend, 2009 ; Cai *et al.*, 2010 ; Lambert *et al.*, 2001 ; Xu *et al.*, 2016 ; Babii *et al.*, 2018). Les dommages varient de l'inhibition du *quorum sensing* à l'inhibition de la synthèse d'ADN, d'ARN, ATP et des protéines.

I.3.6.1. Action contre le *quorum sensing*

Le *quorum sensing* (QS), appelé encore phéromones bactériennes, est l'ensemble des molécules qu'utilisent les bactéries pour coordonner et assurer la communication entre elles. Cette communication assure un certain nombre de fonctions cellulaires telles que l'expression des facteurs de virulence, la bioluminescence, la sporulation, la formation de biofilms et la conjugaison (Troska, 2016 ; Cai *et al.*, 2010). L'expression de ces molécules n'aura lieu que lorsqu'une population bactérienne atteint un seuil de densité cellulaire significative, entraînant ainsi l'activation ou la répression des gènes et par conséquent, la population bactérienne capable d'exprimer ces autoinducteurs est appelée quorum (Bassler, 2002 ; Xu, 2016).

Parmi les HEs testées contre le QS, on trouve celles de la lavande, du clou de girofle et du romarin (Faleiro, 2011). Récemment, Luciardi *et al.* (2016) ont étudié l'activité antibiofilm et anti-QS de l'HE de *Citrus reticulata* en utilisant *Pseudomonas aeruginosa* comme modèle d'étude. Les résultats ont montré une inhibition de la formation de biofilm à la concentration de 0,1 mg/mL, une réduction de viabilité cellulaire de biofilm (41 %) et une diminution dans la production du système Acyl Homosérine Lactone ou AHL (33 %) (Myszka *et al.*, 2016). L'HE de *Thymus vulgaris* et ses composés majoritaires (carvacrol et thymol) ont été aussi testés pour leurs effets antibiofilms et anti-QS contre *Pseudomonas fluorescens* KM121. Les auteurs ont révélé une réduction significative de la production d'AHL, de la formation de biofilms et de la mobilité des flagelles, ce qui suggère que l'inhibition des gènes d'AHL et des flagelles empêche la formation de biofilms (Myszka *et al.*, 2016). Certains composés isolés des HE (chémotypes) se sont aussi montrés efficaces contre le QS. Par exemple, la cinnamaldéhyde a inhibé la bioluminescence chez *Vibrio harveyi* BB170 et l'eugénol chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Chromobacterium violaceum* à travers l'inhibition de la production des facteurs de virulence tels que le violacéine, l'élastase, la pyocyanine et le biofilm (Zhou *et al.*, 2006).

I.3.6.2. Action des HEs au niveau de l'enveloppe cellulaire

Beaucoup de mécanismes d'action sont attribués à l'interaction de composants des HEs avec les constituants de la membrane cellulaire (**Benchaar *et al.*, 2008**). Cependant, certaines souches bactériennes ont pu développer des mécanismes lui permettant de contrebalancer cet effet grâce à l'utilisation de la pompe ionique (**Cox *et al.*, 2001**). Mais l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires. Par ailleurs ce mécanisme reste complexe et difficile à cerner du point de vu moléculaire (**Carson *et al.*, 2002**). Néanmoins, quelques investigations sur le mécanisme d'action antimicrobienne des HEs ou de leurs constituants ont été menées :

Les HEs hydroxylées créent des perturbations enzymatiques et prennent pour cibles les enveloppes protectrices, le mésosome et le cytoplasme (**Bakkali *et al.*, 2008**). Les HEs peuvent passer par la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique des micro-organismes entraînant une perturbation de la structure de leurs différentes couches de polysaccharides, d'acides gras et de phospholipides (**Bakkali *et al.*, 2008**).

Le schéma général du mode d'action est résumé par la figure 11. Elle montre quelques effets et cibles des huiles essentielles. Il ressort de celle-ci trois cibles principales que sont : l'enveloppe (paroi et membrane plasmique), les acides nucléiques (ADN et ARN) et les protéines.

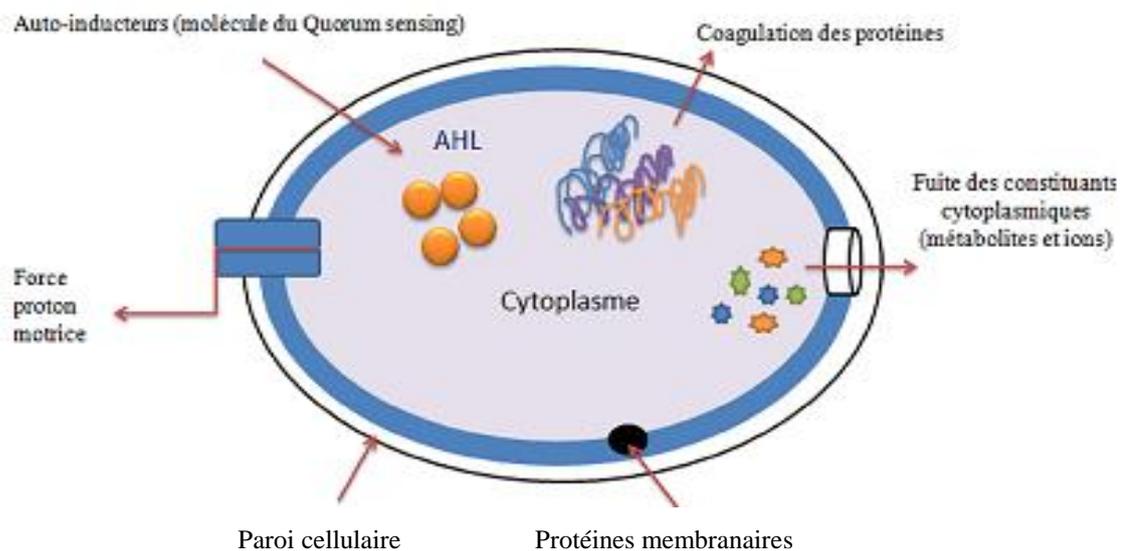


Figure 11: Cibles et effets des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (**Bouyahya *et al.*, 2017**)

De manière générale, après avoir franchi la paroi, les HEs entraînent une modification de la fluidité et une augmentation de la perméabilité membranaire qui conduit à des perturbations de l'intégrité et à une diminution du potentiel de la membrane. On note également une fuite d'ions intra-cellulaires (Di Pasqua *et al.*, 2007). La perméabilité des membranes provoquée par l'action des HEs est associée à une perte ionique et une réduction du potentiel membranaire (Ultée *et al.*, 2002 ; Turina *et al.*, 2006). Burt *et al.*, (2004) ont montré que le carvacrol provoque un effet inhibiteur chez *Bacillus cereus*. Cet effet réside dans une forte diminution de l'ATP intracellulaire, une réduction du potentiel membranaire et du pH intracellulaire ainsi qu'une influence sur le flux de potassium (intra et extracellulaire). Cette action témoigne de l'endommagement de la membrane cytoplasmique. Parmi les terpénoïdes, les mécanismes antibactériens du carvacrol et du thymol ont été les plus étudiés. De par leur capacité à se lier aux protéines membranaires, ils induisent des perturbations du fonctionnement et de l'intégrité membranaire à travers une augmentation de la perméabilité et la perte du potentiel énergétique (Xu *et al.*, 2008). Ils causent également un dysfonctionnement du cycle de Krebs et affecteraient plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse d'ATP (Di Pasqua *et al.*, 2010). Par ailleurs, leur groupement OH permet le transport transmembranaire des cations monovalents, permettant l'entrée des ions H⁺ et une fuite d'ion K⁺ à l'origine de la dépolarisation de la membrane bactérienne (BenArfa *et al.*, 2006). L'eugénol et le cinnamaldéhyde entraînent une perméabilité membranaire et une augmentation du transport des ions k⁺ et de l'ATP hors de la cellule.

Par ailleurs, de par son groupement OH, l'eugénol peut se fixer et affecter les propriétés des protéines fonctionnelles (ATPase, histidine carboxylase, amylase et protéases).

I.3.6.3. Action au niveau des biomolécules cellulaires (ADN, ARN et les protéines)

Le cinnamaldéhyde et les autres composés aldéhydiques ont la capacité de se lier à l'ADN et aux protéines intracellulaires par des liaisons de covalence. A des concentrations sub-létales, ils peuvent inhiber l'ATPase tandis qu'à des fortes concentrations, ils perturbent le fonctionnement membranaire et inhibent la cytodivision ; c'est le cas chez *B. cereus*. Selon Dwivedi *et al.* (2013), le khusimol et l'acide khusenique deux sesquiterpènes de l'huile essentielle de *Vitiveria zizanoides*, inhibent les souches sensibles et résistantes de *M. smegmentis* et *M. tuberculosis* en se fixant sur les deux sous unités de l'ADN gyrase. Certains constituants des HEs tels que les terpénoïdes et les composés phénoliques peuvent inhiber les enzymes cellulaires et compromettre le matériel génétique. Les dérivés d'isothiocyanates, moins fréquents dans les HEs, sont fortement antibactériens de par leur groupement R-N=C=S.

L'atome de carbone central hautement électrophile peut rapidement réagir avec l'oxygène, le sulfure et l'azote des centres nucléophiles conduisant respectivement à la formation des dérivés carbamates, thio-carbamates et thio-urée. Les isothiocyanates peuvent également cliver les ponts disulfures des protéines et attaquer les acides aminés libres (arginine) à travers les réactions d'oxydation. On note également une inhibition de certaines enzymes (Verma, 2003). Le tableau I résume quelques mécanismes d'action de quelques HEs et certains composés majoritaires. Il met en évidence les différentes cibles thérapeutiques à savoir l'enveloppe, le *quorum sensis* et les protéines.

Tableau I: Mécanismes d'action antibactérienne de quelques HEs et quelques composés majoritaires (Bouyahya *et al.*, 2017)

HEs ou leurs composés	Souches bactériennes	Mécanisme d'action ou dommages cellulaires	Références
1. Huiles essentielles			
<i>Cinnamomum verum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- Effondrement du potentiel membranaire, fuite de potassium - Inhibition de l'activité respiratoire	Bouhdid <i>et al.</i>, 2010
<i>Citrus reticulata</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- Inhibition de la formation de biofilm à la concentration de 0,1 mg/mL, - Inhibition de viabilité cellulaire de biofilm (41 %) - Une inhibition de production du système HLA (33 %)	Zhou <i>et al.</i>, 2013
<i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Eucalyptus radiata</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	- Inhibition de la formation du <i>quorum sensing</i>	Lius <i>et al.</i>, 2016
<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Escherichia coli</i>	- Coagulation du matériel cytoplasmique	Cox <i>et al.</i>, 1998
<i>Origanum compactum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- Effondrement du potentiel membranaire, fuite de potassium - Inhibition de l'activité respiratoire	Bouhdid <i>et al.</i>, 2009
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KM121	- Réduction significative dans la production de HLA, dans la formation de biofilm et dans la motilité des flagelles	Myszka <i>et al.</i>, 2016
2. Composés pur issus des huiles essentielles			
Carvacrol	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> O157 : H7, <i>Salmonella typhimurium</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	- Inhibition des toxines - Augmentation de la perméabilité cellulaire aux colorants nucléaires, - Dissipation du gradient pH, fuite des ions inorganiques	Ultee et Smid 2001 Lambert <i>et al.</i>, 2001

		- Altérations dans les compositions des acides gras et la morphologie cellulaire	Di Pasqua et al., 2010
		- Déviation du cycle de Krebs vers la fermentation et fuite de potassium	Cox et al., 198
		Désintégration de la membrane externe	
		- Libération du matériel cellulaire à l'extérieur	
		- Diminution de l'ATP intracellulaire	
Cinnamaldéhyde	<i>Vibrio harveyi</i> BB886	- Réduction de la bioluminescence (un effet <i>antiquorum sensing</i>)	Nui et al., 2006
Carvacrol et thymol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	- Augmentation de la perméabilité cellulaire aux colorants nucléaires, - Dissipation du gradient pH, fuite des ions inorganiques	Lambert et al., 2001
Eugénol,	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Escherichia coli</i> O157: H7	- Altérations dans les compositions des acides gras et la morphologie cellulaire - Inhibition de la production des facteurs de virulence tels que le violacéine, l'élastase, la pyocyanine et le biofilm	Di Pasqua et al., 2010 Zhou et al., 2006
Thymol	<i>Escherichia coli</i> O157 : H7 et <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Escherichia coli</i> O157 : H7 et <i>Salmonella typhimurium</i>	- L'effet sur les protéines impliquées dans la division cellulaire - Désintégration de la membrane externe - Libération du matériel cellulaire à l'extérieur - Diminution de l'ATP intracellulaire	Di Pasqua et al., 2010 Gill et Holley 2006

I.4. GENERALITES SUR LES METHODES D'EVALUATION DU MECANISME D'ACTION DES COMPOSES NATURELS

Une fois qu'un candidat antimicrobien est sélectionné, l'étape suivante consiste à démontrer son action sur les structures bactériennes telles que la paroi, la membrane, le matériel génétique, et/ou la synthèse des protéines. Cette démonstration du mécanisme d'action d'une substance vis-à-vis d'un germe est habituellement faite par des tests phénotypiques en utilisant plusieurs outils moléculaires ou la microscopie (**Santos et al., 2016**). Dans les méthodes utilisées en technologies moléculaires on a l'étude génomique, transcriptomique, protéomique et métabolique et dans la microscopie l'optique et 'électronique. Ce pendant le mécanisme d'action démontré peut être spécifique et approfondi ou illustratif suivant la méthode utilisée et la cible recherchée. Au final, le mécanisme est déduit par comparaison des dommages induits sur les cellules saines et sur cellules traitées aux concentrations de l'antimicrobien égale, inférieur et supérieur à la CMI (**Santos et al., 2016**).

I.4.1. Méthodes d'évaluation du mécanisme d'action sur la paroi ou la membrane

Pour mettre en évidence les dommages au niveau de la paroi ou la membrane, on peut révéler l'altération morphologique de la membrane cellulaire. On peut à cet effet, utiliser la microscopie électronique et/ou à fluorescence couplée à un colorant fluorescent tel que le bromure d'éthidium ou l'iodure de propidium (**Santos et al 2016 ; Babii et al., 2018**). Ces méthodes permettent d'observer une altération des membranes (lyse) des cellules traitées avec l'antimicrobien à tester d'une part et d'autre part, des membranes uniformes et sans lyse pour les cellules traitées au diméthylsulphoxide pris comme témoins négatif **Jayanta et Kwang-Hyun (2016)**.

Alternativement, divers tests sont effectués pour évaluer l'intégrité de la membrane. Un test simple mesure la fuite de matériel cellulaire qui absorbe à la longueur d'onde de 260 et 280 nm. En effet, les acides nucléiques, les composés associés (tels que les pyrimidines et les purines) et les protéines ont une absorbance maximale de lumière UV à cette longueur d'onde. L'augmentation de ce matériel dans le surnageant indique une paroi cellulaire et/ou une membrane endommagée (**Santos et al., 2016**).

Les colorants fluorescents sont également largement utilisés pour évaluer l'intégrité de la membrane, comme l'iodure de propidium (PI), et le bromure d'éthidium (EB). Ces composés fluorescents s'intercalent dans l'ADN s'ils réussissent à traverser la membrane et cela se fait si celle-ci a perdu son intégrité (**Santos et al, 2016 ; Babii et al 2015 ; Babii et al., 2018**).

I.4.2. Méthodes d'évaluation du mécanisme d'action sur le matériel génétique

L'action d'un composé sur l'intégrité de l'ADN peut être évaluée par analyse de liaison à l'ADN, dans laquelle un échantillon d'ADN purifié (ADN plasmidique habituel) est mélangé avec différentes concentrations du composé testé. Après une période d'incubation, la réaction est soumise à une analyse électrophorétique (**Santos et al 2016**).

La mise en évidence du mécanisme d'action des HEs sur l'ADN par comptage du nombre de bandes présents sur le gel après électrophorèse a été menée par **Hend (2009) ; Xu et al., (2016)**. Le profil électrophorèse est réalisé dans le but de conclure à une éventuelle inhibition et fragmentation de l'ADN des cellules exposées aux CMI par comparaison du nombre de bandes présentes sur le gel électrophorétique des cellules non traitées.

I.4.3. Méthodes d'évaluation du mécanisme d'action sur la synthèse protéique

Pour étudier les effets d'un antimicrobien sur les protéines, deux méthodes peuvent être utilisées :

- La méthode d'incorporation de précurseurs radioactifs de la synthèse des protéines qui sera par la suite mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (**Santos *et al.*, 2016**).
- La méthode de quantification par mesure des spots après électrophorèse sur gel de polyacrylamide (**Deracinois, 2012 ; Xu *et al.*, 2016**).

I.5. METHODES D'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-MYCOBACTERIENNE IN VITRO

La détermination des activités anti-mycobactériennes peut se faire par plusieurs méthodes. Le choix des tests à effectuer pour ladite évaluation dépend non seulement de la nature de la substance à tester, de celle du microorganisme mais aussi des paramètres recherchés.

Bueno (2012) a regroupé ces tests en deux catégories, notamment : ceux permettant de déterminer la présence ou non des substances à activité antimicrobienne (tests qualitatifs) et d'autres permettant de déterminer les paramètres d'inhibition (CMI et CMB) d'un extrait vis-à-vis d'un germe (tests quantitatifs).

I.5.1. Méthode qualitative (méthode de dilution en milieu solide)

Les dilutions décimales réalisées en milieu 7H9+ADS (Albumine, Dextrose, Saline) à partir d'une culture mycobactérienne sont déposées sur différentes géloses de milieu 7H11+ADS coulées en pente dans les tubes à essai, contenant des doses croissantes d'antibiotiques. Après 5 à 6 semaines d'incubation à 37 °C, l'absence ou la présence d'une croissance est notée. Ces méthodes sont généralement utilisées pour le screening de l'activité en milieu solide et permettent aussi de déterminer la concentration de la solution mère à tester (**Bueno, 2012**).

I.5.2. Méthodes quantitatives

I.5.2.1. Méthode de dilution en milieu liquide

Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes des substances d'intérêts selon une progression géométrique de raison 2. Selon que la série de dilution des échantillons à tester est réalisée dans une série de tubes ou de cupules sur microplaque contenant du milieu middlebrook 7H9, on parlera de macrodilution ou de microdilution respectivement. L'inoculum mycobactérien est distribué dans chaque tube ou cupule contenant l'échantillon à tester. Un tube ou une cupule dépourvue d'échantillon à tester sert de témoin de croissance. Après incubation, la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est indiquée par le tube ou cupule qui contient la plus faible concentration en échantillon testé inhibant toute croissance visible du germe. La croissance mycobactérienne se traduit par le trouble du milieu ou par le changement de couleur d'un indicateur coloré et/ou d'oxydoréduction préalablement introduit dans le milieu (Cos *et al.*, 2006 ; CLSI, 2011).

I.5.2.2. Méthode du BacT/ALERT®3D (Bio-Mérieux, France)

Pour cette technique, l'inoculum mycobactérien (d'une densité comprise entre 0.5 et 1 Mc Farland) est injecté dans des flasques *BacT/ALERT*® dans lesquelles a été préalablement injectée la solution de reconstitution (MB/BACT® Reconstitution Solution, Bio-Mérieux) et l'échantillon à tester (à différentes concentrations). Les fioles sont ensuite introduites dans l'automate *BacT/ALERT*® 3D, équipé d'un détecteur colorimétrique. En cas de croissance, le dégagement de dioxyde de carbone (CO₂) produit par les mycobactéries provoque un changement de coloration du senseur colorimétrique situé à la base du flacon, détecté par la machine. Cette technologie permet une détection précoce de la croissance mycobactérienne (Angeby *et al.*, 2003).

I.5.2.3. Méthode du E-test® (AB BIODISK)

La technique du *E-test*® repose sur l'utilisation de bandelettes imprégnées de concentrations croissantes d'antibiotique. Des boîtes contenant le 7H11+ADS sontensemencées à l'aide d'un écouvillon préalablement imprégné d'inoculum correspondant au standard 1 Mc Farland. Lorsque la surface de la gélose est sèche, une bandelette *E-test*® y est déposée et les boîtes sont incubées à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une croissance mycobactérienne. La présence éventuelle d'une ellipse d'inhibition de croissance autour de la bandelette est notée. La CMI est interprétée comme la concentration au niveau de laquelle

l'ellipse d'inhibition de croissance mycobactérienne se détermine. Son coût relativement élevé, limite son usage aux laboratoires hautement équipés ou encore lors des mesures rapides de façon précise des CMI des antibiotiques (**Wanger et Mills, 1996**).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIEL

II.1.1. Matériel pour la collecte des données de l'enquête ethnobotanique

L'étude ethnobotanique est effectuée en utilisant un questionnaire (Annexe I) et un registre permettant de rapporter les résultats de chaque interview sous forme de tableau. Chaque interview fait ressortir le nom vernaculaire ou commun de chaque espèce végétale, la partie utilisée, les modes de préparation et d'administration, les autres pathologies que ces espèces soignent et les espèces végétales auxquelles elles sont associées pour le traitement de la tuberculose. Les chemises cartonnées ont servi pour la fixation des plantes récoltées au cours de la collecte des échantillons pour une identification à l'Herbier National du Cameroun.

II.1.2. Matériel végétal utilisé pour l'extraction des huiles essentielles

Le matériel végétal est constitué de quelques espèces végétales sélectionnées au cours de l'enquête. L'identification des plantes s'est faite, à l'Herbier National de Yaoundé par comparaison aux spécimens conservés.

II.1.3. Matériel microbiologique

II.1.3.1. Souches microbiennes

Les tests sont réalisés sur deux isolats cliniques : l'isolat IS53 dont le profil de sensibilité par génotypage (*Lineprobe Assay*, Hain) a montré au cours d'une étude antérieure qu'il est sensible à tous les antituberculeux de première ligne et l'isolat IS310 dont le profil de sensibilité est inconnu enfin la souche de référence H37Rv de code ATCC (*American Type Culture Collection*) 27294. Tous ces isolats sont conservés au Laboratoire de Recherche sur la Tuberculose du Centre de Biotechnologie de l'Université de Yaoundé I.

II.1.3.2. Milieux de culture

Deux milieux de culture sont utilisés :

- Le milieu gélosé Löwenstein Jensen, coulé en pente dans les tubes à essai pour les repiquages et l'isolement des souches.

- Le milieu liquide Middlebrook (Mbk) 7H9 supplémenté de 2 % de glycérol, 0,05 % v/v de tween et de 10 % d'OADC (*Oleic Acid Dextrose Catalase*, Beckton Dickson) et de PANTA (*Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimethoprim, and Azlocillin*, Beckton

Dickson) pour les cultures en milieu liquide et la détermination des paramètres d'inhibition (CMI et CMB) (Middlebrook et Cohn, 1958). Ces milieux sont préparés, puis stérilisés à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. L'ajout de 10 % d'OADC et du PANTA s'est fait de façon aseptique après stérilisation du milieu.

II.1.4. Réactifs chimiques et antituberculeux de référence

Nous avons utilisé deux molécules de référence pour la réalisation des tests antimycobactériens.

- Rifampicine[®] utilisé comme antituberculeux de première ligne
- Ofloxacin[®] utilisé comme antituberculeux de seconde ligne
- Le Blue Alamar pris comme révélateur de la croissance bactérienne ; le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 5 % et le tween 80 à 6 % ont servi pour la dilution des HEs

II.1.5. Matériel pour le dosage spectrophotométrique au NanoDrop 1000

NanoDrop 1000 (Thermoscientific) est utilisé pour le dosage quantitatif des biomolécules comme l'ADN, l'ARN et les protéines. Une micropipette de P10 des emboues stériles de 10 µL. Des Eppendorff de 1,5 mL de capacité contenant 50 µL de suspension de cellules de *M. tuberculosis* saines, exposées aux CMIs et CMBs des HEs et de l'Ofloxacin[®]. Une solution Tris EDTA et un papier Joseph.

II.1.6. Matériel pour l'extraction de l'ADN

Le kit d'extraction QIAamp[®] DNA Mini kit de la société Qiagen est utilisé pour l'extraction de l'ADN (Cat. N^o51 306). Ce kit contient : le tampon de lyse (ASLB), les tampons de lavage (AL, SW1, SW2 buffers), l'enzyme protéinase K, le tampon de suspension (AEB). Le matériel supplémentaire utilisé est constitué des tubes Eppendorff stériles de 1,5 mL de capacités, des emboues stériles de 100 µL et de 1000 µL de capacités, des gangs stériles, d'un masque de protection de type FFP3, des micropipettes de 100 µL et de 1000 µL, de l'agitateur électrique type vortex, d'une centrifugeuse non réfrigérée à vitesse de rotation allant de 1000 rpm et 13000 rpm, le bain-marie, des portoirs, d'un chronomètre et d'un congélateur de -20 °C.

II.1.7. Matériel pour l'amplification par PCR

Pour amplifier les gènes, une solution stock (PCR master Mix) contenant les amorces MIRU 04 pour l'amplification de l'ADN de la société Eurofins, MWG Operon : (N^o : H37302 46-52 87-20/480), l'enzyme Taq DNA polymérase HotStar Taq[®] de la société HAIN life

sciences (LOT : 151039708), les 2-désoxynucléotides triphosphates (dNTP), la solution du chlorure de magnésium pour biologie moléculaire (*MgCl₂ molecular biology grade*), le tampon de PCR commercialisé (*10×PCR buffer*). Ladite solution est préparée sous une hotte à UV et l'échantillon à amplifier dans le mélange sous la hotte à flux laminaire. La PCR est effectuée en utilisant les tubes Eppendorf stériles de 1,5 mL de capacité, les tubes de PCR stériles de 200 µL de capacité, les emboues stériles de 10 µL et 200 µL de capacité, un appareil de PCR simple et un Thermocycleur (Thermoscientific). Le tableau suivant présente la séquence sens et anti sens du gène MIRU 04 amplifié dans cette étude et sa taille.

Tableau II: Séquence de l'amorce sens et anti sens du MIRU 04 (Supply, 2006)

Sens	Séquences	Taille du gène
Amorce sens	5'GCGCGAGAGCCCGAACTGC3'	77 pb
Amorce anti sens	3'GCGCAGCAGAAACGCCAGC5'	

II.1.8. Matériel pour l'électrophorèse de l'ADN extrait des cellules traitées aux HEs, de leurs amplicons et des cellules saines

Le gel d'électrophorèse est préparé en utilisant le tampon Tris-borate-EDTA (1X TBE, pH 8,2), la poudre d'agarose pour biologie moléculaire (*low melting agarose molecular biology grade*), le bromure d'éthidium, la plaque de préparation du gel, et les peignes, le bleu de bromophénol, l'appareil d'électrophorèse en système de gel horizontal. Des marqueurs de poids moléculaire de 1200-100 pb pour la séparation des amplicons et 12-1 Kb pour la séparation de l'ADN total.

II.2. METHODES

La méthodologie expérimentale permettant une compréhension de l'ensemble du travail est résumée sous forme de diagramme schématique illustré par la figure 12 ci-dessous.

Le travail débute avec une étude ethnobotanique qui permet de collecter les informations sur la base d'une interview adressée aux tradipraticiens ayant une connaissance sur les espèces végétales utilisées pour le traitement de la tuberculose. Cette étude a pour but de collecter les informations sur les symptômes identifiés dans le diagnostic de la tuberculose par les tradipraticiens, les espèces végétales et les parties utilisées lors du traitement de la tuberculose, les modes de préparations et les voies d'administrations des recettes médicamenteuses. Une fiche est établie pour consigner toutes les informations reçues des personnes interviewées.

Dans la seconde phase du travail, quatre espèces végétales sont sélectionnées parmi celles recensées durant l'étude ethnobotanique. Sur la base des données obtenues de l'enquête ethnobotanique, les HEs des quatre espèces végétales retenues sont extraites par hydrodistillation ensuite, leurs compositions chimiques et celles des combinaisons sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse (CPG-FID) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).

La troisième partie consiste à déterminer les paramètres d'inhibition des HEs et de leurs combinaisons sur la souche de référence de *Mycobacterium tuberculosis* H37RV et deux isolats cliniques dont IS53 sensible et IS310 de sensibilité inconnue. Pour chaque HE, il a fallu déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales bactéricides (CMB). Les CMI et CMB associées à l'interaction des HEs combinées sont ensuite recherchées.

Dans la quatrième partie des cibles cellulaires des HEs sont recherchées sur la souche de référence de *Mycobacterium tuberculosis* H37RV et deux isolats cliniques IS53 et IS310. Les effets des HEs aux CMI et CMB sur l'enveloppe bactérienne (la paroi et la membrane) de *Mycobacterium tuberculosis* s'évalue par dosage spectrophotométrique de l'ADN, de l'ARN et des protéines présent dans le milieu extérieur au Nanodrop 1000. L'impact des HEs aux CMI et CMB sur l'ADN est démontré après extraction d'ADN et visualisation des bandes de migration d'ADN extrait d'une part et d'amplicons du gène MIRU 04 obtenu par PCR sur gel.

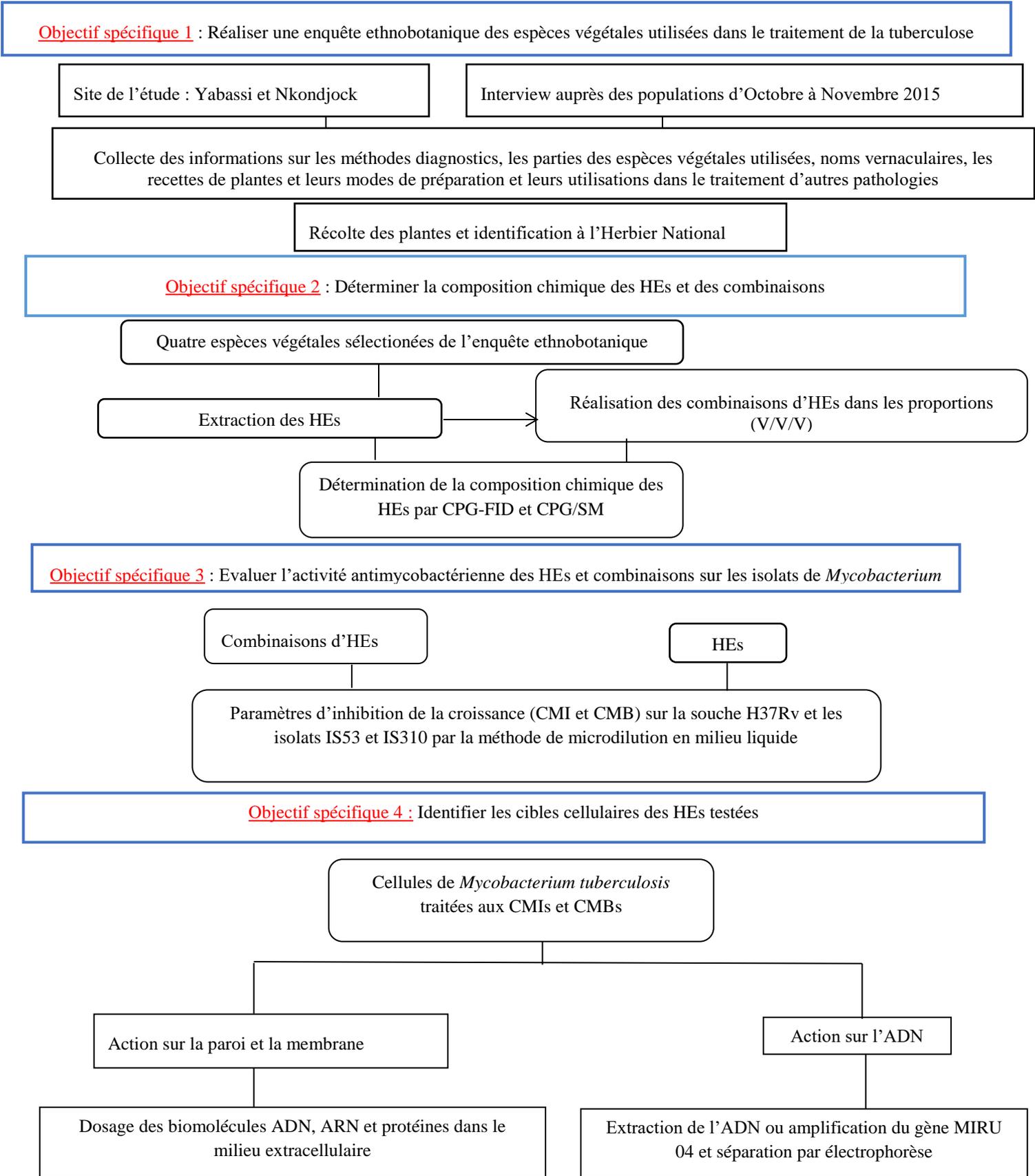


Figure 12: Diagramme synoptique de la démarche méthodologique

II.2.1. Etude ethnobotanique des espèces végétales utilisées dans le traitement de la tuberculose

II.2.1.1. Description de la zone d'étude

Situé entre le 4°0-5°10 Latitude Nord et 9°35-10°35 Longitude Est, le Nkam est l'un des quatre départements que constitue la région du Littoral (CUVC, 2018). Il est constitué de cinq arrondissements comme le montre la figure 13 ci-dessous et est drainé par trois affluents du Wouri que sont la Makombè, la Dibamba et le Nkam. Avec un climat tropical humide aux températures situées entre 23 °C et 29 °C, la pluviométrie annuelle du Département du Nkam est de 2900 à 3000 mm ce qui a favorisé la mise en place d'un sol lithoferralitique (CUVC, 2018). Le relief est constitué d'une vaste forêt de type tropicale humide car la flore constitue plus de 80 % de la végétation avec plusieurs espèces d'arbres. La population s'élève à 66, 979 mille habitants pour 6291 km² de superficie et les langues principales sont le Bassa de Yabassi, le Banen, le Mbiam, le Bodiman, le Banya, l'Ewodi, Badem, le Mbang, le Dibom, le Moya et le Douala (INSC, 2001 ; CUVC, 2018). L'essentiel des activités socioéconomiques se focalise sur la chasse, la pêche, l'agriculture et l'élevage. Comme dans la plupart des arrondissements du Cameroun, ces populations utilisent les plantes médicinales au quotidien parfois au détriment de la médecine conventionnelle. Selon le rapport du Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNLT) énoncé durant la journée internationale de la tuberculose le 23 Mars 2019, la prévalence de la tuberculose dans la région du Littoral représente le quart de la population nationale infectée par la tuberculose. Notre étude est restreinte dans les arrondissements de Yabassi et Nkondjock. Nous avons tout d'abord rencontré les chefs des villages ou quartier pour avoir leur permission et quelques orientations. La figure 13 est une localisation géographique du Département du NKAM en général et les localités de Yabasi et Nkondjock où a lieu l'enquête ethnobotanique.

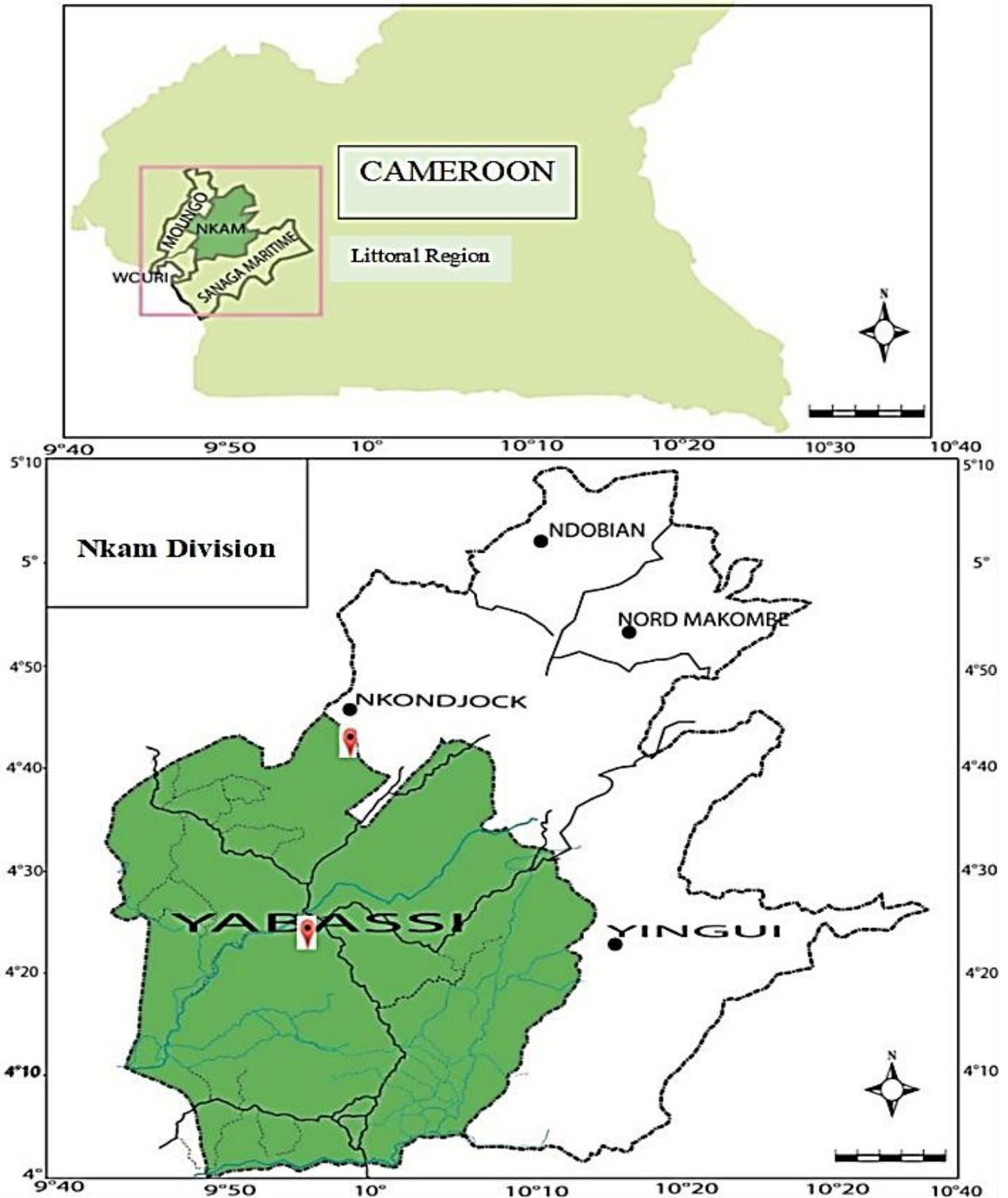


Figure 13 : Localisation géographique des arrondissements de Yabassi et de Nkondjock dans la région du Littoral-Cameroun (CUVC, 2018)

II.2.1.2. Collecte des informations et échantillonnage des espèces végétales

La collecte des données de l'enquête ethnobotanique est réalisée à travers des séries de questions adressées sous forme d'interviews durant la période d'Octobre à Novembre 2015. Elle a consisté à identifier les espèces végétales utilisées par les tradipraticiens pour le traitement de la tuberculose dans lesdites localités. Un questionnaire semi structuré est adressé à chaque répondant (tradipraticien). La méthode dite « boule de neige » qui consiste à demander aux tradipraticiens interviewés d'indiquer si possible d'autres thérapeutes fiables à interviewer est utilisée pour augmenter la taille de l'échantillon (**Martin, 1995 ; Jovel *et al.*, 1996**). Les grandes lignes du questionnaire ont permis de recueillir des informations sur les éléments utilisés pour le diagnostic de la tuberculose, les noms vernaculaires ou communs des espèces végétales utilisées dans le traitement de la tuberculose, leurs modes de préparations et d'administrations et enfin leurs utilisations (voir Annexe I). L'approche vers les populations est facilitée par l'accord des chefs de villages ou de quartier. Le canal de communication est soit le français soit une des langues locales. Trois critères ont permis de sélectionner la population cible de l'étude et établi les bases sûres des informations recherchées :

➤ **Critère d'inclusion**

- Toute personne en âge adulte ayant accepté librement de participer à l'étude après explication de l'intérêt de notre travail et ayant des connaissances sur les espèces végétales utilisées dans le traitement de la tuberculose à base de plante médicinale.

➤ **Critère d'exclusion**

- Toute personne en âge adulte ayant accepté librement de participer à l'étude après explication de l'intérêt de notre travail mais n'ayant aucune connaissance sur les espèces végétales utilisées dans le traitement de la tuberculose.

II.2.1.3. Traitement des données ethnobotaniques

Les informations sur les éléments utilisés pour le diagnostic de la tuberculose ont permis de déterminer les méthodes de diagnostic. Les noms vernaculaires ont facilité l'identification et la récolte des espèces végétales, parties utilisées. Le mode d'utilisation en combinaison aux autres ou non, l'identifier de la méthode de préparation et la voie d'administration (Jovel *et al.*, 1996 ; Betti, 2004).

A l'issue de l'enquête ethnobotanique, les fréquences des signes cliniques utilisés pour le diagnostic de la tuberculose, des parties des plantes utilisées, du mode de préparation des recettes sont calculés par la formule décrite par **Scrauf et Schanchez (2008)** ci-dessous pour faciliter l'interprétation des résultats.

$$FC (\%) = n/N \times 100$$

Légende : FC : Fréquence d'utilisation des espèces végétales dans une recette ; n : Nombre de citation N : Nombre de tradipraticiens interviewés

Au cours de l'enquête ethnobotanique, toutes les espèces végétales sont récoltées ou achetées dans les marchés, puis identifiées à l'Herbier National du Cameroun. Cette identification est couplée à une revue de la littérature des activités biologiques des espèces végétales répertoriées. Pour évaluer l'activité antimycobactérienne, les espèces végétales utilisées en combinaison avec d'autres pour le traitement de la tuberculose sont exclues et celles utilisées sans association pour le traitement de la tuberculose sont sélectionnées,

II.2.2. Extraction et détermination de la composition chimique des huiles essentielles

Les plantes sélectionnées au cours de l'enquête ethnobotaniques sont récoltées dans différentes localités du Cameroun en raison des grandes quantités recherchées pour l'extraction de leurs HEs.

II.2.2.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des HEs des espèces végétales sélectionnées lors de l'enquête ethnobotanique est réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un appareillage de type Clevenger suivant les normes internationales **NF ISO 212** et **AFNOR 2007**.

Principe :

Le principe général de cette méthode est basé sur la volatilité des composés présents dans le matériel végétal immergé dans de l'eau susceptibles d'être entraînés par les vapeurs d'eau et de leurs condensations dans le réfrigérant pour être repartie en deux phases : la phase aqueuse et la phase huileuse, généralement moins dense dans une colonne ou essencier (**AFSSAPS, 2008**).

Protocole :

La partie de la plante utilisée est pesée, broyée, immergée dans de l'eau et soumise à une hydrodistillation à l'aide d'un appareillage de type Clevenger. Ce dispositif est constitué d'un alambic en inox de 30 L et au-dessus duquel est fixé un appareillage de type Clevenger. L'hydrodistillation s'est déroulée pendant 5 heures, au bout desquelles l'HE est recueillie, séchée au sulfate de sodium anhydre et conservée à basse température (4 °C) (**Agnainiet et al., 2003**). Les rendements d'extraction (Rdt %) sont calculés suivant la formule ci-après :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de l'HE (g)}}{\text{Masse du matériel végétal (g)}} \times 100$$

II.2.2.2. Réalisation des combinaisons

Trois triplets de combinaisons sont réalisés entre les HEs dans les proportions (1/2/1) ; (2/1/1) et (1/1/2) (V/V/V) sur la base des modèles de prescription et d'utilisation des huiles essentielles en aromathérapie (**Kaloustian et Hadji-minaglou, 2012**). L'analyse de la composition chimique des combinaisons est faite dans le but de ressortir la quantité et le type de composés majoritaires retrouvés dans chaque combinaison. La réalisation des combinaisons permet d'expérimenter la modulation des caractères organoleptiques et de l'activité antimycobactérienne comparé à celle des HEs testée individuellement.

II.2.2.3. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles et combinaisons

II.2.2.3.1. Analyses des huiles essentielles par CPG-FID et CPG-SM

Les HEs extraites et combinaisons ont été analysées par CPG-FID et CPG/SM pour déterminer leurs compositions qualitatives et quantitatives, afin de ressortir les composés qui justifieraient l'action antimicrobienne des HEs et combinaisons sur le bacille de koch mais aussi d'identifier ceux ayant des actions au niveau des cibles cellulaires afin de faciliter la compréhension du mécanisme d'action. Ces analyses sont effectuées à l'Université de Montpellier II grâce à la collaboration entreprise avec l'équipe Glyco et Nanovecteurs pour le Ciblage Thérapeutique, de l'Institut Max Mousseron.

II.2.2.3.2 Détermination de la composition chimique des huiles essentielles (Kemegne *et al.*, 2018)

➤ Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée au détecteur par ionisation de flamme (CPG-FID)

Principe :

La technique de CPG-FID repose sur la séparation de composés volatils ou susceptibles d'être volatilisés par chauffage d'une HE. Les différents constituants du mélange, préalablement vaporisés au niveau de l'injecteur sont élués dans une colonne par un gaz vecteur à des vitesses différentes selon leur affinité pour la phase stationnaire ou pour la phase mobile et détectés en sortie de colonne. L'enregistreur signale une succession de pics, caractérisés chacun par un temps de rétention et une aire proportionnelle à la quantité du composé dans l'échantillon d'HE.

Protocole :

Les analyses sont effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse de type TRACE 1300 Thermo Scientific équipé de deux colonnes capillaires en silice ; une colonne apolaire de TG-5MS (5 % phenyl methylpolysiloxane), 30 cm x 0,25 mm de diamètre intérieur et 0,25 µm d'épaisseur de film et une colonne polaire TG-WAWMS (polyéthylène glycol), colonne capillaire de 30 m x 0,25 mm de diamètre intérieur et 0,25 µm d'épaisseur du film. Le gaz vecteur est l'azote (N₂) avec un débit constant de 0,5 mL/min une injection de 2 µL d'une solution d'HE diluée au 10/100 diethyl ester, l'injecteur en mode a été split 1 : 20 réglé à 220 °C, le détecteur réglé à 250 °C et un programme de température de 60 à 220 °C à raison de 3 °C/min puis maintenu à 220 °C pendant 17 min. les informations sur l'ordre d'élution des

composés et leurs pourcentages sont obtenus grâce au profil chromatographique de la colonne capillaire DB-5. Le calcul des indices de rétention linéaire (il varie peu avec la température sur une même colonne mais varie en fonction du type de colonne) de chaque composé (IRL) est déterminé par rapport au temps relatif d'une série de n-alcane puis, calculés par la formule ci-dessous (Adams, 2012).

$$\text{IRL} = 100 \left(\frac{\text{Tr}(i) - \text{Tr}(n)}{\text{Tr}(n+1) - \text{Tr}(n)} \right) + 100 \times n$$

Légende : IRL = Indices de rétention linéaire ; Tr(i) = Temps de rétention du composé inconnu ; Tr(n) = Temps de rétention du n-alcane directement élué avant i ; Tr (n+1) = Temps de rétention du n-alcane directement élué après i.

▪ Analyse par couplage CPG/MS

Principe :

➤ Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer les structures moléculaires. Elle consiste à séparer en fonction du rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, les fragments chargés issus d'une molécule soumise à un phénomène d'ionisation.

Protocole :

Cette dernière est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Agilent 5977 série MSD équipé de deux colonnes capillaires en silice : une colonne apolaire HP-5 MS (30 m x 250 µm de diamètre intérieur et 0,25 µm d'épaisseur du film), (5 % phenyl-methylpolysiloxane) et une colonne polaire HP-ONNOWAX (20 m x 250 µm de diamètre intérieur et 0,25 µm d'épaisseur du film). Le détecteur de masse est de type quadripôle, la température source était de 230 °C et celle du quadripôle de 150 °C. Le programme de température a été 60 °C pendant 2 minutes, 60 à 240 °C à raison de 3 °C/min puis maintenu à 240 °C pendant 8 minutes. La température de l'injecteur est de 240 °C et la température de transfert de 250 °C. Le gaz vecteur est l'Hélium avec un débit de 0,7 mL/min, et une injection de type split 20 :1 (1µL d'une solution d'HE est diluée à 10 % de dichlométhane) et l'énergie d'ionisation utilisée est de 70 eV (electromutiplier 1000 eV, rand de masse 33 à 400 amu, taux de balayage 1,56 scan/s. L'identification des composés est basée sur la comparaison des indices de rétention relatifs aux composés authentiques et/ou aux composés issus des données publiées

de la littérature (Adams, 2012) et par appariement de leurs spectres de masse obtenus aux échantillons authentiques et /ou ceux de la banque de données NIST14, FFNSC 2.L et ESSENCES L.

II.2.3. Evaluation de l'activité antimycobactérienne et détermination des paramètres d'inhibition (CMI et CMB)

Cette partie est réalisée au Centre Pasteur du Cameroun et au Laboratoire de Recherche sur la tuberculose/Centre Biotechnologique de l'Université de Yaoundé I.

II.2.3.1. Préparation des solutions mères d'huiles essentielles/comбинаisons et d'antituberculeux de référence

Les solutions test d'HEs de chaque plante sont préparées à des concentrations variantes de 10 000, 5 000, 2 000 et 500 µg/mL pour le screening de l'activité et à la concentration de 10000 µg/mL pour les paramètres d'inhibition. En effet pour préparer 10 000 µg/mL, dans un flacon en verre, 20 µL d'HE sont solubilisés dans le mélange tween 80-DMSO (V/V) constitué de 216,8 µL d'une solution de tween 80 (11 %) et de 100 µL d'une solution de DMSO (5 %), 1663,2 µL d'eau distillée sont ajoutées pour un volume final de 2000 µL.

Deux solutions de 1000 µg/mL d'Ofloxacin[®] et de Rifampicin[®] sont préparées par dissolution de 3 mg de chaque antibiotique dans 3 mL de diméthylsulfoxyde DMSO à 7 %, (v/v).

II.2.3.2. Repiquage des souches et préparation de l'inoculum

II.2.3.2.1. Repiquage des souches

Pour chaque souche, trois tubes sont utilisés. Les cellules préalablement conservées dans un milieu liquide à -22 °C sont retirées du congélateur et homogénéisées dans le bouillon. L'ensemencement se fait par inondation à l'aide d'une pipette pasteur sur le milieu Lohenstein Jensen coulé en pente. En effet, deux à trois gouttes de l'inoculum sont déposées sur la pente du milieu conservé puis étalées en remuant légèrement les tubes. Les tubes sont ensuite scellés avec leurs vis puis, sont desserrés de façon à permettre l'évaporation de l'excès de liquide.

L'observation des cultures est hebdomadaire. La première semaine, les tubes séchés sont vérifiés et vissés à fond. Les mycobactéries se divisant une fois toutes les 20 heures, les premières colonies sont apparues 2 semaines après la mise en culture. Les tubes sont incubés pendant 21 jours.

II.2.3.2.2 Préparation de l'inoculum

Pour préparer l'inoculum, les colonies pures de *M. tuberculosis* sont prélevées à l'aide d'une anse en plastique sur un milieu gélosé Lowenstein Jensen coulé en pente et ensemencées dans un bouillon Mbk 7H9 supplémenté en glycérol (2 %) et tween (0.05 %, v/v). La densité optique (DO) est lue à 550 nm et comprise entre 0,45 et 0,55 permettant de standardiser l'inoculum mycobactérien concentré à $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Middlebrook et Cohn, 1958).

II.2.3.4. Détermination des paramètres d'inhibition CMB et CMI des HEs/combinaisons

Un screening de l'activité antimycobactérienne est effectué par mise en contact de l'inoculum avec des solutions d'HEs préparées à des concentrations de 10 000 $\mu\text{g/mL}$, 5 000 $\mu\text{g/mL}$, 2000 $\mu\text{g/mL}$, et 500 $\mu\text{g/mL}$ pendant 7 jours à 37 °C. L'activité anti-mycobactérienne des HEs et des antituberculeux (Ofloxacin[®] et Rifampicine[®]) est évaluée par la méthode de dilution en milieu liquide (microdilution) (CLSI, 2011). Le Blue Alamar est utilisé pour la révélation de la croissance ou de l'absence de croissance des cellules exposées à des concentrations décroissantes d'HEs après incubation. Cette évaluation consiste à déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Concentrations Minimales Bactéricides (CMBs) par méthode de microdilution à l'aide d'une microplaque de 96 puits.

Principe :

Cette méthode colorimétrique est basée sur la capacité qu'ont les cellules viables à métaboliser la résazurine, forme oxydée du Blue Alamar par réduction en résorufine forme réduite de Blue Alamar. Le mécanisme réactionnel de réduction est présenté par la figure 14 ci-après.

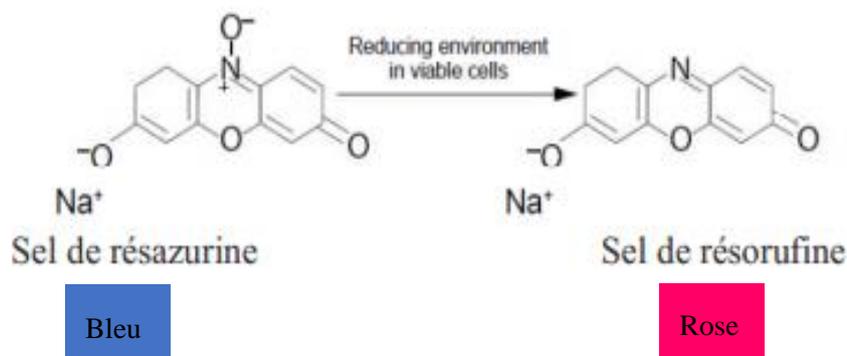


Figure 14: Mécanisme de réduction du Blue Alamar (Lancaster et Fields, 1996)

L'indicateur redox Blue Alamar sous forme oxydé (résazurine), de couleur bleue est réduit en présence des cellules mycobactériennes en croissance en forme réduite (résorufine) de coloration rose ou rouge. Lorsque la croissance des cellules mycobactériennes est complètement inhibée par une HE ou la combinaison, la coloration bleue est maintenue (**Lancaster et Fields, 1996**).

Protocole :

Chaque puits d'une microplaque de 96 puits reçoit un volume de 100 μL du milieu 7H9+10 % OADC et PANTA supplémenté de 2 % de glycérol et 0,05 % v/v de tween 80. Par la suite sont introduits 100 μL de solutions d'HEs/combinaison dans les trois premiers puits de la ligne 1 (puits tests A, B et C) et à partir de ces puits, des dilutions successives suivant une progression géométrique de raison 2 sont réalisées dans le sens allant de 1 à 12 jusqu'au onzième puit ; la gamme de concentration variant de 5000 $\mu\text{g/mL}$ à 4,88 $\mu\text{g/mL}$. En fin un volume de 100 μL d'inoculum mycobactérien est introduit dans chaque puit. Ainsi, le volume final est de 200 μL dans chaque puit la gamme de concentration variant de 2500 $\mu\text{g/mL}$ à 2,44 $\mu\text{g/mL}$. Tous les essais sont effectués en triple. Dans une quatrième colonne après le triple, on utilise un test témoin négatif de l'activité des HEs/combinaison dont les puits contiennent le milieu de culture 7H9 et les HEs aux concentrations décroissantes de 2500 $\mu\text{g/mL}$ à 2,44 $\mu\text{g/mL}$. La Rifampicine[®] et l'Ofloxacin[®], sont pris comme antibiotiques de référence et testés avec le même protocole que celui des HEs mais où les solutions mères d'Ofloxacin et de Rifampicine préalablement préparées font varier les concentrations finales de 250 $\mu\text{g/mL}$ (pour les puits de la ligne 1) à 0,244 $\mu\text{g/mL}$ (pour les puits de la ligne 11).

La douzième ligne de la microplaque est utilisée comme témoin positif de la croissance mycobactérienne des cellules non exposées aux HEs. La microplaque est scellée avec son couvercle et recouverte d'un papier parafilm puis incubée à 37 °C pendant 7 jours. Après incubation, la croissance mycobactérienne est mise en évidence par ajout de 20 μL d'une solution de Blue Alamar dans les puits de deux colonnes tests sur les trois colonnes, les puits de la troisième colonne ont servi à la détermination de la CMB. L'ensemble est réincubé à 37 °C pendant 1 jour. Le changement de coloration du milieu du bleu au rose indique la croissance. La CMI est définie comme la plus petite concentration en extrait, pour laquelle il n'y a pas eu croissance mycobactérienne visible (**CLSI, 2011**).

Pour la détermination des CMBs, 50 μL des puits de la troisième colonne test dont les concentrations sont supérieures ou égales à la CMI sont repiqués dans 150 μL de milieu 7H9 contenu dans les puits d'une microplaque et incubé à 37 °C pendant 7 jours, puis la croissance

mycobactérienne est mise en évidence par ajout de 50 µL d'une solution de Blue Alamar dans chaque puits des trois colonnes tests. L'ensemble est réincubé à 37 °C pendant un jour. La CMB est définie comme la plus faible concentration en HEs pour laquelle aucune croissance visible du germe n'est observée (CLSI, 2011). L'expérience est réalisée en triple.

➤ **Profil bactériologique des HEs et combinaisons (Fauchère et Avril, 2002)**

Le rapport CMB/CMI a permis de déterminer le profil bactériologique d'une substance testée. Ce rapport a permis de classer l'activité des HEs et des antituberculeux de références comme suit :

- Les substances dites « Bactéricides », lorsque ce rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 2.
- Les substances dites « Bactériostatiques », lorsque ce rapport CMB/CMI est compris entre 4 et 16.
- Les substances dites « Tolérantes », lorsque ce rapport CMB/CMI est supérieur à 16

Pour chacune des combinaisons, les valeurs des CMIs déterminées ont permis de calculer les Fractions de Concentrations Inhibitrices de chaque HE (FCI) par rapport aux CMIs des HEs prises individuellement, selon la formule suivante :

$$FCI_{(A)} = \frac{CMI_{(A/B/C)}}{CMI_{(A)}} \qquad FCI_{(B)} = \frac{CMI_{(B/A/C)}}{CMI_{(B)}}$$

$$FCI_{(C)} = \frac{CMI_{(C/A/B)}}{CMI_{(C)}}$$

Avec :

FCI_(A) = Fraction de Concentration Inhibitrice de l'HE A

FCI_(B) = Fraction de Concentration Inhibitrice de l'HE B

FCI_(C) = Fraction de Concentration Inhibitrice de l'HE C

CMI_(A/B/C) = Concentration Minimale Inhibitrice de l'HE A combiné à l'HE B et C

CMI_(B/A/C) = Concentration Minimale Inhibitrice de l'HE B combiné à l'HE A et C

CMI_(C/A/B) = Concentration Minimale Inhibitrice de l'HE C combiné à l'HE A et B

CMI_(A) = Concentration Minimale Inhibitrice de l'HE A

CMI_(B) = Concentration Minimale Inhibitrice de l'HE B

CMI_(C) = Concentration Minimale Inhibitrice de l'HE C

Par la suite, les index de Fractions de Concentration Inhibitrices (FCI_{index}) sont calculés suivant la formule ci-dessous (Yan *et al.*, 2015).

$$FCI_{index (A/B/C)} = FIC (A) + FIC (B) + FIC (C)$$

Les effets des combinaisons d'HEs sont classés comme étant synergiques si $FCI_{index} \leq 0,5$, additif si $0,5 \leq FCI_{index} \leq 1,5$, indifférent si $FCI_{index} = 2$ ou antagoniste si $2 < FCI_{index}$ (Yan *et al.*, 2015).

II.2.4. Recherche des cibles cellulaires des huiles essentielles testées sur *Mycobacterium tuberculosis*

Cette partie est réalisée dans le but de déterminer les cibles cellulaires sur lesquelles les HEs agissent afin d'expliquer l'effet inhibiteur de la croissance de *Mycobacterium tuberculosis*. Pour ce fait, une meilleure connaissance du bacille tuberculeux, de son génome et sa structure est importante. Il est question de mettre en évidence les dommages cellulaires induits par les HEs sur les mycobactéries (la souche H37Rv, les isolats IS53 et IS310) en utilisant les méthodes de quantification spectrophotométriques des biomolécules présents dans le milieu extracellulaire et analyse des profils d'ADN et des amplicons établis par migration électrophorétique sur gel d'agarose (Lambert *et al.*, 2001 ; Hend, 2009 ; Sieniawska *et al.*, 2015 ; Xu *et al.*, 2016 ; Sawicki *et al.*, 2018a ; Sawicki *et al.*, 2018b).

L'étude s'est essentiellement centrée sur trois cibles potentielles à savoir :

- La paroi
- La membrane plasmique
- L'ADN

Cette partie fait ressortir la capacité qu'ont les HEs (constituées de plusieurs molécules) à agir sur plusieurs cibles ou sites d'action à la fois afin de montrer leur efficacité par rapport à celle des molécules d'antituberculeux qui sont prises comme des références dans le traitement de la tuberculose.

II.2.4.1. Effet des huiles essentielles sur la paroi et la membrane de *Mycobacterium tuberculosis*

Cette partie est réalisée au *Laboratory for Tuberculosis Research* du Centre Biotechnologie de l'Université de Yaoundé I. Durant la détermination des paramètres d'inhibitions, 50 μL de suspension mycobactérienne sont prélevés dans trois puits correspondants aux concentrations inhibitrices (CMI et CMB) après 7 jours d'incubation à 37 °C. Un témoin négatif (inoculum et le milieu) est utilisé pour comparer les effets obtenus avec le test ; un témoin blanc (contenant le milieu) pour le calibrage et l'antituberculeux de référence est l'Ofloxacin[®] (le milieu, inoculum et l'Ofloxacin). Le témoin milieu + HE n'est pas réalisé en raison de la capacité du Nanodrop à détecter la présence des composés absorbants tels que les phénols à 240 nm.

Les précédentes études mettent en évidence les dommages exercés par des substances antimicrobiennes sur l'enveloppe (paroi et membrane) par dosage spectrophotométriques à 260 nm et 280 nm pour justifier la sortie des acides nucléiques et les protéines des cellules (**Cox et al., 1998 ; Ultee et Smid, 2001 ; Lambert et al., 2001 ; Di Pasqua et al., 2010**). Par contre dans la méthode de dosage des biomolécules aux NanoDrop 1000, les quantités libérées sont directement exprimées sous forme de concentrations en ng/ μL pour les acides nucléiques et en g/mL pour les protéines (**Desjardins et Conklin, 2010**). En effet, le NanoDrop 1000 est un spectrophotomètre à spectre complet (220-750 nm) qui mesure 1 μL d'échantillon à haute précision et reproductibilité. Il utilise une technologie de rétention d'échantillon brevetée basée uniquement sur la tension de surface pour contenir l'échantillon en place (**Desjardins et Conklin, 2010**). Le contenu des 50 μL est homogénéisé au vortex avant quantification par dosage spectrophotométrique au Nanodrop 1000.

Principe :

La quantification au Nanodrop 1000 repose sur la capacité qu'ont les biomolécules telles que les acides nucléiques et les protéines à absorber la lumière à la longueur d'onde située entre 260 nm et 280 nm. Cette absorption est proportionnelle à la quantité de biomolécules présente dans l'échantillon à tester. En effet, le système de rétention NanoDrop microvolume (*Thermo Scientific NanoDrop*) combine les fonctions de technologie des fibres optiques et les propriétés naturelles de tension de surface pour capturer et retenir des quantités infinies d'échantillon. Par ailleurs, le système utilise la longueur des trajets plus courts, ce qui résulte d'une large gamme de mesures de concentration d'acides nucléiques, éliminant la nécessité d'effectuer des

dilutions et réduisant le volume d'échantillon requis pour l'analyse spectroscopique (Desjardins et Conklin, 2010). La présence des composés phénoliques dans un échantillon est mise en évidence par le calcul rapport 240/280 ce qui permet de donner l'allure d'une courbe représentant un échantillon impur dont les pics d'absorption minimal sont mis en évidence à 220 et maximal 260 nm. En absence des composés phénoliques la courbe de quantification donne l'allure d'un échantillon pure qui absorbe à 230 et 260 nm (Desjardins et Conklin, 2010).

Protocole

Après ouverture du logiciel de l'appareil, le paramètre à mesurer est sélectionné (ADN double brin, ARN, ou protéines). L'essai à blanc est réalisé dans le but de calibrer l'appareil, cette opération s'effectue par dépôt d'1 µL du milieu 7H9 préparé sur la partie inférieure optique et le bras de levier est abaissé puis l'opération « *blank* » est sélectionnée. Cette opération est faite deux fois selon les recommandations données par l'appareil. Une fois le calibrage terminé, les deux surfaces optiques sont nettoyées avec du papier absorbant et il s'en suit la mesure de la quantité des différents paramètres présents dans les échantillons. Puis, 1 µL d'échantillon est pipeté et déposé sur la partie inférieure optique, le bras de levier abaissé et l'opération « *measured* » est sélectionné et les concentrations apparaissent exprimées en ng/mL pour les acides nucléiques et en mg/mL pour les protéines. Après chaque mesure, l'opération de calibrage est effectuée.

Le rapport de l'absorbance de l'échantillon à 260 et à 280 nm est utilisé pour évaluer la pureté par rapport à l'ADN. Un échantillon dont le ratio est compris entre 1,8 et 2 est généralement considéré comme « pur » pour l'ADN ; si le rapport est sensiblement inférieur, il peut indiquer la présence de protéines, de phénol ou d'autres contaminants qui absorbent fortement à 280 nm (Desjardins et Conklin, 2010).

Les résultats du NanoDrop permettent ainsi, de déduire l'effet sur la diminution de la rigidité de la paroi et de la perméabilité membranaire due à la présence de biomolécules dans le milieu extracellulaire comparé aux quantités libérées par les cellules saines (Lambert *et al.*, 2001).

➤ **Analyses statistiques**

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes des quantités de biomolécules libérées en fonction des traitements (HE ou Ofloxacine[®] ou cellules saines) en utilisant le Tableur Microsoft Excel 2010. Les différentes moyennes obtenues sont soumises à une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur à l'aide du logiciel SPSS version 20.0 suivi de la

comparaison des concentrations des biomolécules des cellules saines et celles des cellules traitées aux CMI et CMBs par le test Turkey. Les différences sont significatives pour les valeurs $P < 0,05$.

II.2.4.2. Effet des huiles essentielles sur l'ADN de *Mycobacterium tuberculosis*

Des échantillons issus des résultats de la microdilution, 100 μL des cellules traitées aux CMI et CMBs sont prélevées puis conservés dans les cryotubes à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ avant l'évaluation des effets sur l'ADN. L'ADN est extrait puis quantifié au Nanodrop afin de comparer les quantités d'ADN produites par les cellules saines et par les cellules traitées aux HEs ou l'Ofoxacine[®]. Ces quantités d'ADN extraites ont aussi servi à l'amplification du gène MIRU 04 par PCR et déterminer le taux d'expression du gène MIRU 04 pour la mise en évidence de l'inhibition de l'ADN par les HEs (Sawicki *et al.*, 2018a ; Sawicki *et al.*, 2018b).

II.2.4.2.1. Extraction de l'ADN

L'ADN des cellules de chaque échantillon conservé dans les cryotubes est extrait en utilisant le kit QIAamp[®] DNA Mini kit, Qiagen.

Principe :

Il repose sur la rétention des molécules d'ADN présentes dans un lysat sur une membrane de silice ceci en quatre étapes : la lyse des cellules dans l'échantillon, la fixation de l'ADN génomique du lysat cellulaire à la membrane d'une colonne de centrifugation et le lavage de la membrane et l'élution de l'ADN génomique à partir de la membrane.

Protocole :

Dans un tube de lyse (LT) fourni dans le kit, nous avons introduit, 10 μL de protéase Qiagen (QP), 100 μL d'échantillon et 100 μL de tampon de lyse (AL). Le Mélange est énergiquement homogénéisé au vortex pendant 15 secondes. Il s'en suit une incubation pendant 10 minutes à $56\text{ }^\circ\text{C}$ en suite, 100 μL d'éthanol sont ajoutés et mélangés au vortex pendant 15 secondes puis centrifuger pendant 1 minute à 6 000 x g. Le lysat obtenu est transféré vers la colonne de centrifugation et ensuite transféré dans un nouveau tube de lavage fourni (WT), 250 μL de tampon de lavage sont ajoutés (AW1) et centrifugés pendant 1 minute à 6 000 x g, la colonne de centrifugation est transférée dans un nouveau tube WT où 250 μL de tampon de lavage 2 (AW2) sont ajoutés et centrifugés pendant 1 minute à vitesse maximale de 20 000 tr/min. La colonne de centrifugation est transférée de nouveau dans un tube WT et il s'en suit une centrifugation pendant 3 minutes à vitesse maximale (environ 20 000 x g ou 14 000 tr/min). Cette colonne de centrifugation est ensuite placée dans un tube d'élution (ET) et 100 mL de

tampon d'éluion (AE) sont ajoutés et le mélange incubé pendant 1 minute puis centrifugé pendant 1 minute à 6 000 x g.

L'ADN total extrait des cellules traitées aux CMI et aux CMBs et celui des cellules saines est reparti en deux lots dont le premier n'ayant subi aucune amplification est conservé à - 20 °C et est utilisé pour recherche les effets des HEs sur l'ADN total. Le deuxième lot a subi une amplification par PCR en utilisant l'amorce MIRU 04 un gène microsatellite VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) de 77 pb dont le nombre de répétitions en tandem sur le génome de *Mycobacterium tuberculosis* varie entre 02 et 06 (Supply *et al.*, 2000). L'amorce du gène MIRU 04 est utilisée dans le but de mettre en évidence les dommages causés par l'action des HEs sur ce gène spécifique empêchant son amplification et aussi de maximiser la possibilité de visualisation des bandes de migrations de l'ADN bactérien (l'intensité) après électrophorèse sur gel d'Agarose (Hend, 2009 ; El-Tablawy et Araby, 2017 ; Sawicki *et al.*, 2018a).

II.2.4.2.2. Amplification par PCR et détermination du taux d'expression du gène MIRU 04

La PCR est une technique d'amplification de l'ADN *in vitro*, elle permet l'obtention d'un très grand nombre de copies d'une séquence de l'amorce choisie.

Principe :

Le principe de la PCR se base sur l'amplification d'une séquence d'ADN particulière en un nombre de copies suffisant pour assurer la détection. Pour cela sont utilisés des amorces nucléotidiques sélectionnées pour leur spécificité vis-à-vis de l'ADN à détecter. Chaque brin d'ADN est copié grâce aux amorces et à une polymérase thermostable, ensuite chaque copie est utilisée comme une nouvelle matrice (Huard *et al.*, 2003). Cette amplification est réalisée en trois étapes suivantes :

- **Dénaturation de l'ADN par chauffage permet de séparer les deux brins :** cette période s'est effectuée à une température de 95 °C, dite température de dénaturation. À cette température, l'ADN matriciel, qui sert de matrice au cours de la réplication, est dénaturé car les liaisons hydrogènes ne peuvent pas se maintenir à une température supérieure à 80 °C et l'ADN double-brin est ainsi dénaturé en ADN simple-brin (ADN monocaténaire).

- **Hybridation des amorces aux extrémités de la séquence :** la température est de 55 °C, dite température d'hybridation des amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider.

- **Elongation grâce à l'action de l'ADN polymérase** : celle-ci s'est effectuée à une température de 72 °C, dite température d'élongation. À cette température, la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténares pour catalyser la réplication en utilisant les désoxyribonucléosides triphosphates présents dans le mélange réactionnel. Les régions de l'ADN matriciel en aval des amorces sont ainsi sélectivement synthétisées.

La dénaturation initiale est une étape de chauffage qui permet de dérouler l'ADN matriciel double brins en cassant les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique et de dénaturer les enzymes autres que la Taq polymérase qui pourraient se trouver dans la solution. L'élongation terminale est une étape qui permet à la Taq polymérase de corriger les erreurs grâce à son activité 3'-5' exonucléasique

Protocole :

La réaction de polymérisation en chaîne est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend l'ADN extrait (ADN total), la Taq polymérase, les amorces et les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) dans une solution tampon. Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température réitérées plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur (appareil qui comporte une enceinte où l'on dépose les tubes échantillons et dans lequel la température peut varier, très rapidement et précisément, de 0 à 100 °C par effet Peltier). L'appareil permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de paliers de température (IFREMER, 2009). Les quantités des différents réactifs sont réparties dans le tableau suivant :

Tableau III: Composition du mélange réactionnel utilisé pour l'amplification (master mix)

Réactifs	Volume pour une réaction (µL)	Volume pour 30 réactions (µL)
Eau de PCR	9,12	273,60
dNTPs	4	120
Tampon 10X	0,80	24
Solution Q 5X	1,20	36
Amorce sens	0,40	12
Amorce antisens	0,40	12
Taq polymerase	0,08	2,40
MgCl ₂	2	60
Total	18	540

Par la suite, 18 μL du master mix préparé sont répartis dans des microtubes et 5 μL d'ADN extrait des cellules sont ajoutés. Le mélange réactionnel de 23 μL ainsi constitué est déposé dans le thermocycleur programmé selon les conditions d'amplification reportées dans le tableau V.

Tableau IV: Programme d'amplification du gène MIRU 04

Phases	Temps	Température	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	15mn	95 °C	
Dénaturation	1mn	95 °C	
Hybridation	1mn	55 °C	30 cycles
Elongation	30 sec	72 °C	
Elongation terminale	5mn	72 °C	
Conservation		+4 °C	

Légende : mn : minute et sec : seconde

Les culots d'ADN total extrait et d'amplicons des cellules n'ayant subies aucun traitement (sain) et ceux des cellules traitées aux CMIs et CMBs sont dosés au NanoDrop 1000 dans le but d'évaluer leurs puretés. Le calibrage au NanoDrop 1000 est effectué avec la solution d'éluion pour la quantification d'ADN extrait et avec l'eau de PCR pour l'ADN amplifié. La quantité d'ADN libérée par les cellules traitées aux HEs est comparée à celle libérée par les cellules témoins n'ayant subies aucun traitement et celle traitées avec l'Ofloxacin[®] dans le but de montrer l'action inhibitrice de la synthèse d'ADN. Le taux d'expression du gène MIRU 04 a été déterminé par calcul du pourcentage d'amplification du gène qui exprime le rapport de la concentration d'amplicons issus de l'ADN des cellules exposées aux CMIs et CMBs HEs/ la concentration d'amplicons issus de l'ADN des cellules saines comme le présente la figure ci-après.

$$\% \text{ d'amplification MIRU 04} = \text{CAct} / \text{CAcs} \times 100$$

CAct = Concentration d'amplicons des cellules traitées aux HEs ; **CAcs** = concentration d'amplicons issus de l'ADN des cellules saines.

II.2.4.3.3. Séparation de l'ADN génomique et les amplicons du MIRU 04

Les extraits d'ADN non amplifiés et des amplicons des cellules témoins dites saines, des cellules traitées aux valeurs des concentrations correspondants aux CMI et CMBs de l'Ofloxacin[®] et/ou des HEs ont subi une séparation par électrophorèse sur gel d'agarose selon la méthode décrite par **Sambrook *et al.*, (1989)**.

Principe :

Cette technique est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation se fait à travers la matrice du gel d'agarose où les molécules de plus petites tailles vont se déplacer plus vite que celle de tailles supérieures de la cathode vers l'anode (**Sambrook *et al.*, 1989**).

Protocole :

Dans cette méthode, le gel d'Agarose 1,5 % a été préparé en mélangeant le tampon Tris borate-EDTA (TBE 1x, pH 8,2) et la poudre d'Agarose à raison de 1,5 g d'Agarose pour 100 mL de tampon. 1 µL de la solution de Bromure d'éthidium à 0,5 µg/mL est ajouté et le mélange est homogénéisé et placé dans le four à micro-onde (100-150 °C), l'agitation est faite de temps en temps jusqu'à dissolution complète de l'Agarose. La solution ainsi préparée a été ensuite laissée à température ambiante (25 °C) pour refroidissement. Le gel est coulé lentement dans le support de gel sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne. Après solidification (15-20 min), le gel laissé sur le support est placé dans la cuve d'électrophorèse contenant le tampon TBE 1x en positionnant les puits du côté de la cathode (pôle noir) et le peigne délicatement enlevé pour ne pas endommager les puits

Sur une feuille de parafilm, 5 µL d'ADN extrait ou d'amplicons sont mélangés avec 2,5 µL de tampon de charge (0,25 % de bleu de bromophénol et 0,25 % de xylène cyanol dans du glycérol à 30 % dans de l'eau distillée). Les échantillons et les marqueurs de poids moléculaire de 1 Kb pour la séparation d'extrait d'ADN total et 100 pb pour les amplicons adéquat sont chargés séparément dans les puits du gel. Les fils sont branchés une fois la cuve fermée, puis mis sous tension. La migration a été effectuée à 120 V dans du tampon TBE 1x et arrêtée après 30 min. Les bandes d'ADN extrait et les produits d'amplification ont été visualisés après séparation par électrophorèse sur gel d'Agarose 1,5 %.

I.2.4.3.4. Analyse des profils d'ADN génomique et des amplicons du MIRU 04 sur gel d'Agarose

Après migration sur le gel, les bandes d'ADN fluorescentes sont visualisées sous lampe UV et photographiées. Les profils des bandes d'ADN sur gel d'Agarose des cellules traitées aux CMIs et CMBs des HEs sont comparés à celles du témoin négatif contenant les cellules saines et du témoin positif contenant les cellules traitées avec l'Ofloxacin[®] inhibiteur de la synthèse d'ADN. La présence d'une bande d'ADN sur le profil gel Agarose des cellules saines révèle l'absence des dommages sur l'ADN alors que l'absence de cette bande sur le profil des cellules traitées montre l'inhibition de la synthèse de l'ADN et/ou une fragmentation de l'ADN (**Xu et al., 2016**).

La présence et l'intensité de fluorescence des amplicons du gène MIRU 04 de taille variante entre 77 pb et 462 pb indiquent l'absence des dommages sur le gène. Lorsque les profils de séparation d'ADN étaient différents de celles des cellules saines c'est-à-dire l'intensité faible ou absence de bande d'ADN, on conclut que les HEs ou l'Ofloxacin[®] ont inhibé la synthèse d'ADN (**Hend, 2009 ; Xu et al., 2016 ; El-Tablawy et Araby, 2017**).

L'intensité de fluorescence des bandes d'ADN amplifiées varie en fonction du nombre de brins d'ADN qui portent le gène MIRU 04 (soit le pourcentage d'amplification) et le site de fixation des amorces durant l'amplification par PCR. Une fluorescence faible des bandes d'ADN par rapport à celles des cellules saines indique une inhibition de la synthèse alors que l'absence de bande d'ADN par rapport à celles des cellules saines indique l'absence total des sites de fixation donc, une inhibition de la synthèse et fragmentation d'ADN au niveau du site d'amplification du gène MIRU 04.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. ESPECES VEGETALES UTILISEES DANS LE TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE

L'étude ethnobotanique a inventorié 37 tradipraticiens ayant acceptés de répondre à nos questions. Nous avons regroupé les réponses aux interviews en trois parties dont la première ressort les éléments utilisés pour le diagnostic de la tuberculose, deuxième les espèces végétales utilisées dans le traitement de la tuberculose et la dernière le mode de préparation des recettes médicamenteuses et une mini revue de littérature des activités biologiques des espèces végétales recensées. De cet échantillon de 37 personnes ayant accepté de participer aux interviews, quatorze ont des connaissances sur les espèces végétales utilisées dans le traitement de la tuberculose.

III.1.1. Éléments utilisés dans le diagnostic de la tuberculose

Les informations collectées des tradipraticiens montrent que tous les tradipraticiens utilisent deux éléments pour statuer sur l'état tuberculeux d'un patient. En effet, tous considèrent un malade tuberculeux comme étant toute personne ayant obtenu un résultat diagnostiqué positif par un médecin. Par contre sur la base des symptômes semblables à ceux des malades déjà diagnostiqués à l'hôpital, certains tradipraticiens considèrent un malade tuberculeux comme toute personne dont les symptômes majeurs comprennent : une toux accompagnée d'une douleur thoracique lors des expectorations datant de plus de deux mois minimum et les crachats sanguinolents/purulents. Ils sont accompagnés des symptômes mineurs tels que les amaigrissements/perte d'appétit et sueur et céphalées nocturnes. La figure 15 ci-après représente le pourcentage de citation des symptômes utilisés par les tradipraticiens pour diagnostiquer la tuberculose. L'analyse de cette figure montre que 100 % des tradipraticiens considèrent la toux persistante et 71 % les crachats sanguinolents comme les symptômes majeurs ou alertant de la tuberculose alors que l'amaigrissement et les céphalées respectivement à 64 % et 21 % comme des symptômes mineurs. Ces symptômes sont importants car après au moins trois (03) mois de traitements, le suivi de l'évolution de la maladie ou l'efficacité du traitement est mise en évidence par la régression de certains de ces symptômes ce qui permet de temps à autre à certains tradipraticiens de demander un diagnostic médical pour besoin de confirmation.

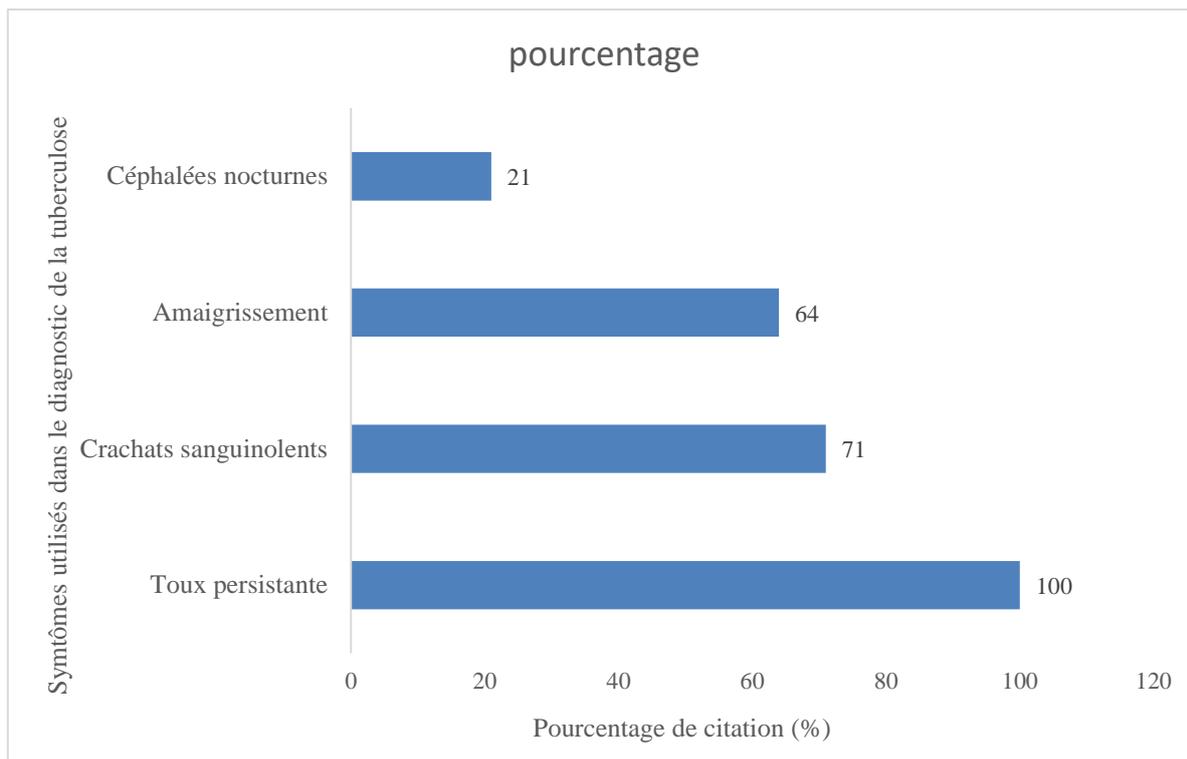


Figure 15: Fréquence d'utilisation des symptômes par les tradipraticiens pour le diagnostic de la tuberculose au cours de l'enquête ethnobotanique

III.1.2 Connaissance sur les espèces végétales utilisées dans le traitement de la tuberculose

Des interviews réalisées, les informations recueillies montrent douze espèces végétales recensées comme étant celles administrées au cours du traitement contre la tuberculose. On note parmi elles *Ageratum conyzoides* Line ; *Eucalyptus globulus* Labill ; *Ocimum gratissimum* Line. et *Zingiber officinale* Roscoe récoltées aux voisinages des habitations, *Aframomum danielli* Hook.f dans la forêt. *Thymus vulgaris* Line, *Allium sativum* L. ; *Allium cepa* L. ; *Drypetes gosseweileri* S. Moore ; *Pentadiplandra brazzeana* Baill ; *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. Rich. et *Echinops giganteus* A. Rich . Ces plantes sont photographiées (Photo 2 à 14). Il ressort de l'identification à l'Herbier National que les douze espèces végétales recensées appartiennent à sept familles botaniques différentes dont les plus utilisées sont les Amaryllidacées (02) ; Lamiacées (02) ; Asteracées (02) et Zingiberacées (02). Les photos des plantes citées et les parties utilisées ont été couplées aux résultats de l'identification à l'Herbier National comme le présente la série de photographies 2 à 14 suivante.

III.1.3. Amaryllidaceae

Allium cepa (Oignons)



Photo 2: Bulbes d'*Allium cepa* (Photo Moni)

Systematique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Liliidae*

Ordre : *Liliales*

Famille : Amaryllidaceae

Genre : *Allium*

Nom binomial : *Allium cepa* L.

Noms communs : Oignons en Français et « onion » en Anglais

Noms vernaculaires : « Malang » en Bassa ou « Ndjanga » en Yabassi

Description botanique

L'ognion ou *Allium cepa* (Photo 2) est une plante herbacée cultivée annuellement ou biennuellement. La floraison a lieu la deuxième année. Ses feuilles de couleur verte sont cylindriques, creuses (ce qui distingue cette espèce du poireau et de l'ail). La tige florale dressée est également creuse. Le bulbe est relativement gros, de forme sphérique, parfois plus ou moins aplati. Les fleurs petites (de 4 à 5 mm de large), de couleur blanche ou verte, sont regroupées en une ombelle sphérique, en position terminale sur la tige. Le fruit est une capsule s'ouvrant par trois valves, libérant chacune généralement deux graines.

Allium sativum L. (Ail)



Photo 3: Gousses d'*Allium sativum* (Photo Moni)

Systématique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Liliidae*

Ordre : *Liliales*

Famille : *Amaryllidaceae*

Genre : *Allium*

Nom binomial : *Allium sativum* L.

Noms communs : Ail en Français et « garlic » en Anglais

Description botanique (Bachmann, 2008)

Allium sativum (Photo 3) est une plante herbacée, bulbeuse et vivace assez grande à nombreuses feuilles engainant le bas de la tige. Elle mesure 5 à 12 cm de hauteur avec des fleurs groupées en ombelles et de couleur blanche ou rose. La multiplication végétative est plutôt la règle par le biais des bulbes formés à la base de la tige. Ces bulbes sont composés de 3 à 20 bulbilles (gousses) arquées appelés caïeux, entourées d'une tunique parcheminée. L'ail cultivé se divise en deux sous-espèces connues sous le nom d'ail à tige dure (ophioscorodon) et ail à tige molle (*sativum*).

III.1.4. Annonaceae

Xylopia aethiopica (Dunal) A. Rich



Photo 4: Fruits secs de *Xylopia aethiopica* (**Photo Moni**)

Systematique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Liliidae*

Ordre : *Magnaliales*

Famille : *Annonaceae*

Genre : *Xylopia*

Nom binomial: *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich

Nom commun: Ethiopian pepper

Noms vernaculaires : « Ekui » en Ewondo ; « Mboutou » en Banganté

Description botanique

Xylopia aethiopica (Photo 4) est un arbre de 15 à 45 m de hauteur et 60 à 75 cm de diamètre, à la base et haut de 50 cm à 1 m. Les fruits sont à pédicelle épais, long de 1 à 1,5 cm. Ces méricarpes sont légèrement étranglés entre les graines, déhiscent sur la face externe, glabres. Ils renferment 4 à 9 graines verticales ellipsoïdes-oblongues, longues de 5 à 6 mm, larges de 2 à 3 mm, à tégument brun luisant.

III.1.5. Asteraceae

Echinops giganteus var. *lelyi* A. Rich



Photo 5: Plant d'*Echinops giganteus* (Photo Moni)

Systematique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Asterales*

Famille : *Asteraceae*

Genre : *Echinops*

Nom binomial : *Echinops giganteus* var. *lelyi* A. Rich

Nom commun : Geant japonaise

Noms vernaculaires : « Tchémgang » en Bafoussam ; « Kankan » en Haoussa ; « Kahgoh » ou encore « Teugem » en Bafou

Description botanique (Menut *et al.*, 1997)

Echinops giganteus (Photo 5) est une herbe robuste, subligneuse à la base, annuelle ou biennale atteignant 1 à 1,20 m de hauteur totale. Les feuilles sont alternes, oblongues, lancéolées, pennatilobées, avec un acumen très pointu terminant chaque lobe, et la face de dessous grisâtre. Son habitat est dans les prairies d'altitude ou de savane soudano-sahélienne (Abdou *et al.*, 2010). Les racines d'*Echinops giganteus* sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle du Cameroun et du Nigeria pour le traitement de diverses maladies telles que les maladies du cœur et les troubles gastriques, pour calmer les maux d'estomac, la fièvre jaune et réduire les crises d'asthme.

Ageratum conyzoides Line



Photo 6: Partie aérienne d'*Ageratum conyzoides* (**Photo Moni**)

Systématique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Asterales*

Famille : *Asteraceae*

Genre : *Ageratum*

Nom binomial: *Ageratum conyzoides* Line.

Noms communs : Roi des herbes (Cameroun)

Noms vernaculaires: « Nyada Elog » en Ewondo; « Ewud'a nyo na yo » en Douala

Description botanique :

Ageratum conyzoides (Photo 6) est une plante de la famille des Asteraceae native de l'Amérique tropicale, mais qu'on retrouve actuellement en abondance en zone équatoriale et subtropicale africaine. C'est une plante herbacée dressée, ayant une taille de 30 à 80 cm, poilue et plus ou moins branchue. Sa tige est robuste et hérissée de poils. Les fleurs sont groupées en petites têtes, d'abord de couleur bleu-violacée pâle, puis blanche. Ces têtes sont associées en bouquets terminaux compacts (**Okunade, 2002**). Au Cameroun, *A. conyzoides* communément appelé « Roi des herbes » se rencontre dans plusieurs types d'écosystème. Il est caractérisé par des propriétés invasives dues à sa capacité d'adaptation particulière et à sa rapidité de croissance (**Batish et al., 2006**).

III.1.6. Pentadiplandraceae

Pentadiplandra brazzeana Baill.



Photo 7: Lianes (a) feuillage (b) et racines (c) de *Pentadiplandra brazzeana* (Photo Moni)

Systematique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous classe : *Dilleniidae*

Famille : *Pentadiplandraceae*

Genre : *Pentadiplandra*

Nom binomial : *Pentadiplandra brazzeana* Baill

Noms vernaculaires : « Mgba ndick » en Ewondo ; « Guipi » en Bobili ; « Osika » en Batéké ; « Difeuh » Bangangté ; « Tcham » en Bangantou ; Kiémo « Kako ».

Description botanique :

Pentadiplandra brazzeana (Photo 7) est un arbuste ou liane glabre de 3 à 20 m de haut. Les feuilles sont longuement elliptiques, oblongues, obovales à lancéolées, aigües ou arrondies à la base, obtuses et longuement acuminées. Elles mesurent 5 à 15 cm de long, 1 à 7 cm de large et possèdent entre 6 et 11 paires de nervures latérales. Les inflorescences en grappes atteignent 2 cm de long. Les fleurs sont blanches et tachetées de rouge ou de bleu. Les fruits sont de baies globuleuses, de 2 à 4 cm de diamètre, rouges tachetées de blanc à maturité. C'est une espèce localisée en Afrique Centrale, assez commune, dans les forêts primaires (Mabberley, 1997). C'est une plante très répandue et assez commune (anciennes cultures, forêts secondaires, forêt primaires). Son aire s'étend du Cameroun au Congo et à l'Angola (Mabberley, 1997).

III.1.7. Putranjivaceae

Drypetes gossweileri S. Moore



Photo 8: Feuillage (a) Tronc (b) et les écorces (c) de *Drypetes gossweileri* dans un buisson (Photo Moni)

Systematique

Règne : *Plantae*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Euphorbiales*

Famille : *Euphorbiaceae*

Genre : *Drypetes*

Nom binomial : *Drypetes gossweileri* S. Moore

Noms vernaculaires : « Olelang » en Ewondo ; « Nkot » en Bassa

Description botanique (Tchinda et Sob, 2008)

Drypetes gossweileri (Photo 8) est un arbre dioïque, à fût droit, avec une taille moyenne de 30 à 42 m de haut et 120 cm de diamètre, souvent cannelé de façon irrégulière. Son écorce verte grisâtre à verte jaunâtre, avec des taches brunes rougeâtres et noirâtres plus ou moins rugueuses à nombreuses lenticelles, dégage une forte odeur à la coupe. Ses Feuilles sont alternes et simples, ses stipules sont petites et les pétioles atteignant 2 cm de long et un limbe de forme allongée de 10 à 24 cm x 3 à 9 cm.

III.1.8. Myrtaceae

Eucalyptus globulus Labill. (Eucalyptus)



Photo 9: Feuilles sèches d'*Eucalyptus globulus* (Photo Moni)

Systématique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Equisetopsida*

Sous-classe : *Magnoliidae*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Myrtaceae*

Genre : *Eucalyptus*

Nom binominal : *Eucalyptus globulus* Labill

Description botanique

L'*Eucalyptus* (Photo 9) est un bel arbre originaire de l'Europe principalement de l'Espagne. Il fait environ 30 à 35 mètres de hauteur, avec un tronc droit, lisse et grisâtre. Au Cameroun l'*Eucalyptus* est principalement cultivé dans la région de l'Ouest où ses feuilles sont utilisées pour soigner les infections de l'appareil respiratoire et la toux.

III.1.9. Lamiaceae

Ocimum gratissimum Line



Photo 10: Plantes d'*Ocimum gratissimum* (Photo **Moni**)

Systematique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Equisetopsida*

Sous-classe : *Magnoliidae*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Ocimum*

Nom binominal : *Ocimum gratissimum* Line

Nom commun : Basilic africain ;

Noms communs : « Messep » en Ewondo ; le « Massep » en Bassa ou Yabassi

Description botanique :

Ocimum gratissimum (Photo 10) est une plante de la famille des *Lamiaceae*, arbrisseau odoriférant très peu lignifiée, atteignant 150 cm. Les feuilles sont opposées, ovales à marge dentée, longue de 10 cm environ. Les inflorescences sont groupées en épis de petites fleurs à corolles blanches. C'est une plante originaire de l'Inde mais actuellement cultivée dans toute l'Afrique intertropicale (**Prabhu et al., 2009**). Au Cameroun, il est courant de retrouver quelques tiges dans les alentours des habitations et les jardins botaniques. La plante est connue sous le nom usuel de basilic africain et de « Messep » en langue vernaculaire Ewondo.

Thymus vulgaris Line



Photo 11: Tiges de *Thymus vulgaris* (Photo Moni)

Systematique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Thymus*

Nom binomial : *Thymus vulgaris* Line

Nom commun : Thym

Description botanique :

Thymus vulgaris (Photo 11) est un sous-arbrisseau vivace, touffu et très aromatique de 7 à 30 cm de haut, d'un aspect grisâtre ou vert-grisâtre. Ses tiges, ligneuses à la base supérieure, sont presque cylindriques, très rameuses, regroupées en touffe ou en buisson très dense. Elles sont rampantes, dressées ou redressées, tortueuses dans leur partie inférieure, velues et blanches tout autour chez les jeunes rameaux. Les feuilles sont très petites, ovales, lancéolées, à bord roulés en dessous, à nervures latérales distinctes, optues au sommet. *Thymus vulgaris*, préfère les climats doux et les terrains bien drainés, ensoleillés ; il supporte bien la dessiccation. Sur cent variétés de thym qui existent, *Thymus vulgaris* est l'espèce la plus répandue. Au Cameroun, cette plante se cultive dans les jardins potagers ; on la retrouve autour des cases d'habitation surtout dans la région de l'Ouest où elle est employée comme aromate en cuisine. Outres ses

vertus culinaires comme aromate, le thym possède de multiples autres propriétés : son infusion est utilisée contre les maux de l'appareil respiratoire (toux, bronchite, asthme).

III.1.10. Zingibereceae

Aframomum daneilli Hook f.



Photo 12: Plant (a), fruit frais (b) et secs (c) d'*Aframomum daneilli* (Photo Moni)

Systematique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Liliopsida*

Sous-classe : *Zingiberidae*

Ordre : *Zingiberales*

Famille : *Zingiberaceae*

Genre : *Aframomum*

Nom binomial : *Aframomum daneilli* Hook f.

Noms : « Ndong » en Bassa ou en Yabassi

Description botanique :

Aframomum daneilli (photo 12) est une plante d'environ 3, 50 m de haut que l'on retrouve dans les taillis de forêt frais, mais non humides ni marécageux. Ses fleurs sont jaune, le fruit est une capsule rouge ovoïde trilobulaire, arrondie à sa base et pointue à l'apex, les graines sont grossièrement pyramidales et à surfaces lisses.

Zingiber officinale Roscoe



Photo 13: Plant (à gauche) et Rhizomes (à droite) de *Zingiber officinale* (**Photo Moni**)

Systematique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Liliopsida*

Sous-classe : *Zingiberidae*

Ordre : *Zingiberales*

Famille : *Zingiberaceae*

Genre : *Zingiber*

Nom binomial : *Zingiber officinale* Roscoe

Nom commun : Gingembre

Description botanique :

Zingiber officinale (Photo 13) est une plante vivace herbacée de la famille des *Zingiberaceae*, espèce à rhizomes articulés en segment tuberculeux. La tige aérienne peut atteindre 1 m de hauteur, les feuilles linéaires lancéolées et odorantes ont environ 20 cm de longueur. Les fleurs sont blanches et jaunes ponctuées de rouge sur les lèvres. Originaire d'Asie, le gingembre est actuellement cultivé dans toutes les zones tropicales où il est très utilisé comme épice et condiment ainsi que pour ses nombreuses vertus thérapeutiques (**Ndoyé, 2001**).

III.1.11. Connaissances sur les modes de préparation/voies d'administrations des recettes médicamenteuses et revue de littératures des espèces végétales recensées

Des plantes inventoriées lors de l'enquête, les plus fréquemment utilisées dans le traitement de la tuberculose sont aussi utilisées comme épices. Parmi elles on a : *Zingiber officinale* (13) ; *Allium sativum* (11) ; *Eucalyptus globulus* (07) ; *Aframomum danielli* (06) et *Allium cepa* (06). Cependant, les parties utilisées de ces plantes varient d'une plante à une autre. Nous avons noté entre autres, des rhizomes, des graines fruits, des parties aériennes des feuilles et des écorces. La figure 16 illustre la représentativité des parties utilisées et montre que les feuilles et les rhizomes des plantes sont les plus utilisées et représentent plus de 50 % du pourcentage d'utilisation.

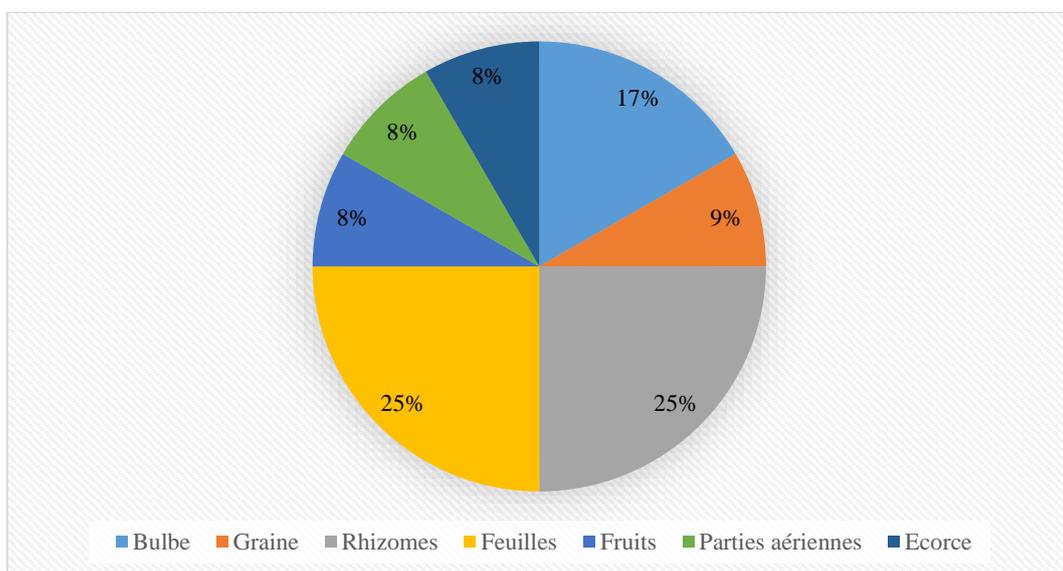


Figure 16: Pourcentages de différentes parties des plantes médicinales utilisées pour traiter la tuberculose dans le Nkam

La plupart des tradipraticiens interviewés déclarent préparer des recettes médicamenteuses en associant au moins deux plantes pour le traitement de la tuberculose. Cependant, les informations collectées montrent qu'*Allium sativum*, *Pentadiplandra brazzeana*, *Drypetes gossweileri* et *Echinops giganteus* sont les plantes qu'ils utilisent chaque fois sans association avec une autre pour formuler une recette.

Les modes de préparation médicamenteuses recensés sont de trois types, les décoctions, les macérations et les infusions. Le calcul des fréquences du mode de préparation des recettes est présenté par la figure 17 ci-après. Il met en évidence que la décoction à 58,3 % est le principal mode de préparation des recettes médicamenteuses comparé à la macération et l'infusion qui représentent respectivement 25 % et 16,7 %. Ces recettes sont administrées

principalement par voies orales ou minoritairement par inhalation.

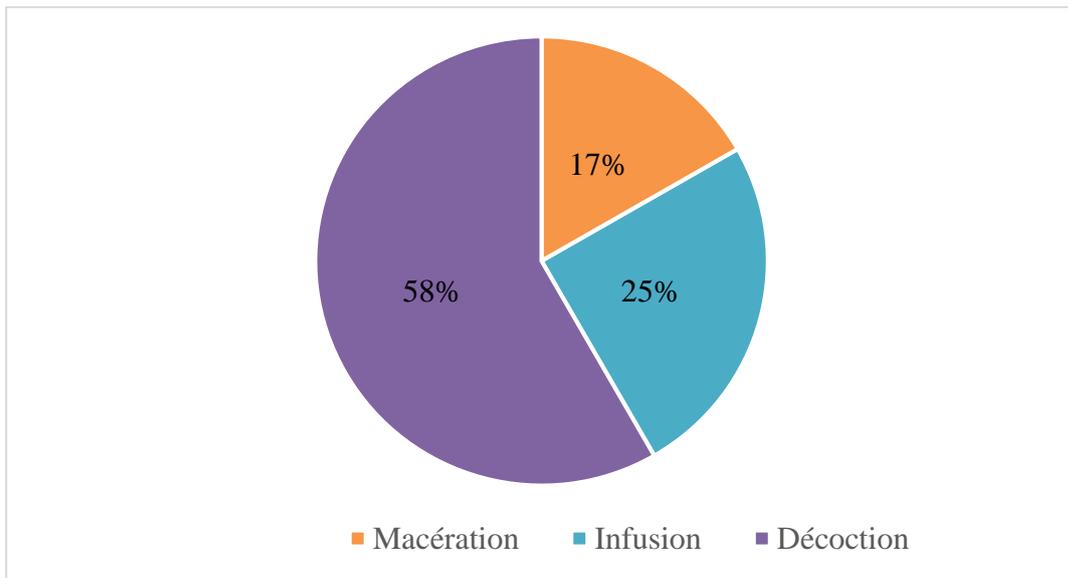


Figure 17: Répartition des pourcentages des modes de préparations des recettes médicamenteuses pour le traitement de la tuberculose

Tous les résultats de l'enquête ethnobotanique sont regroupés dans le Tableau VI. Il résume les informations sur chaque espèce végétale collectée. Une mini revue de littérature de quelques activités biologiques des HEs et/ou extraits mais aussi quelques maladies qu'elles peuvent soigner y a été additionnée. Il ressort de la revue que les espèces végétales recensées possèdent des activités biologiques diverses parmi lesquelles les activités anti-inflammatoires, antioxydantes, non cytotoxiques, antimycobactériennes, anti-germinatrices des spores et lavicides. De façon particulière, les activités biologiques des huiles les plus mentionnées dans la littérature sont celles présentant leurs propriétés réparatrices des désordres métaboliques telles que les activités anti-inflammatoires, antioxydantes et non cytotoxiques. Parmi toutes les activités citées il n'est pas fait mention des activités antimycobactériennes des HEs de certaines de ces espèces végétales parmi lesquelles *P. brazzeana*, *E. giganteus* et *D. gosseweleri*.

Les informations de l'enquête révèlent aussi que la majorité des plantes sont utilisées pour d'autres maladies notamment celles affectant les voies respiratoires telle que la bronchite (05), la toux et (04), infections pulmonaires (03), pneumonie (02), rhume et asthme (01). Mais aussi autre utilisation comme antipoison (01), spasme (01), céphalée (01) et diarrhées (01).

Tableau V: Résultats de l'étude ethnobotanique des plantes et recettes utilisées dans le traitement de la tuberculose à Yabassi et Nkondjock

Noms des familles	Plantes	Partie de la plante et code d'identification	Noms communs ou locaux	Autres usages	Recette et voie d'administration	Activités biologiques associées	Fréquence d'utilisation (%)
Amaryllidaceae	<i>Allium cepa</i> L.	Bulbes 25742/SRF	« Ndjanga »	Traitement de la toux ; infections pulmonaires et utilisé comme épices	En décoction avec <i>Zingiber officinale</i> , <i>Allium sativum</i> par voie orale	Anti-inflammatoire et antioxydante des huiles essentielle (Ndoye et al., 2016).	9.0
	<i>Allium sativum</i> L.	Bulbes 44810/HNC	Ail or Garlic	Traitement des pneumonies, bronchites et utilisé comme épice	Par macération ou décoction avec <i>Zingiber officinale</i> par voie orale	Antioxydante ; anti-inflammatoire et antimycobactérienne des huiles essentielle (Viswanathan et al., 2014 Ndoye et al., 2016).	16.7
Annonaceae	<i>Xylopia aethiopica</i> (Dunal) A. Rich.	Graines des fruits 59700/HNC	Ethiopian pepper	Traitement de la toux, bronchite et utilisé comme épice	En décoction avec <i>Echinops giganteus</i> par voie orale	Antibactérienne des huiles essentielle (Nyegue et al., 2017) et antioxydante et antimycobactérienne des extraits aqueux (Etoundi et al., 2010 ; Tekwu et al., 2011).	4.5
Asteraceae	<i>Echinops giganteus</i> A. Rich.	Rhizomes 23647/ SRF/CAM	Giant Japanese	Calme les spasmes ; réduit l'asthme et utilisé comme épice.	En décoction <i>Xylopia aethiopica</i> par voie orale	Cytotoxicité et antimycobactérienne des extraits méthanolique (Kuete et al., 2011 ; Tekwu et al., 2012) ; et antilavicide des huiles essentielles (Pavela et al., 2016).	7.6
	<i>Ageratum conizoides</i> Line	Feuilles 9503/SRF/CAM	Rois des herbes	Traitement du rhume ; Calme les spasmes ; le mal d'estomac et soigne les plaies	En macération avec <i>Aframamum danielli</i> et <i>Allium sativum</i> par voie orale	Antibactérienne et anti-germinatrice des huiles essentielles (Voundi et al., 2015).	1.5
Pentadiplandraceae	<i>Pentadiplandra brazzeana</i> Baill.	Racines 42918/HNC	Mgba ndick	Aphrodisiaque ; traitement des affections pulmonaires et utilisé comme épice.	En décoction pour une administration par voie orale	Antimycobactérienne des extrait méthanolique (Tekwu et al., 2012) et antifongique des huiles essentielles (Nyegue, 2006).	7.6
Putranjivaceae	<i>Drypetes gosseweileri</i> S. Moore	Ecorces 25749/SRF/CAM	Nkot	Traitement des diarrhées et infections pulmonaires	En décoction pour une administration par voie orale	Antioxydante ; anti-inflammatoire (Ndoyé et al., 2016) ; antibactérienne et, germinatrice des	4.5

Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Feuilles 4077/SRFK	Eucalyptus	Traitement de la toux ; bronchite	En décoction avec <i>Zingiber officinale</i> et <i>Allium sativum</i> et du miel pour une administration par voie orale	huiles essentielles sur les spores de <i>Bacillus</i> (Voundi et al., 2015). Activité antibactérienne de l'huile essentielle (Nyegue et al., 2017).	7.6
Lamiaceae	<i>Ocimum gratissimum</i> Line.	Feuilles 5817/SRF/CAM	Massep	Traitement des céphalées ; bronches ; infections vaginales ou pulmonaires	En décoction avec <i>Eucalyptus globulus</i> and <i>Zingiber officinale</i> pour une administration par voie orale et inhalation	Antibactérienne et anti-germinatrice des huiles essentielles sur les spores de <i>Bacillus</i> (Voundi et al., 2015).	6.0
	<i>Thymus vulgaris</i> Line.	Partie aeriene 25746/SRF/CAM	Thym	Rhume et affection bronchopulmonaire ; utilisé comme épice	En infusion avec <i>Ocimum gratisimum</i> , <i>Zingiber officinale</i> et <i>Aframamum danielli</i> pour une administration par voie orale et inhalation	Antibactérienne (Nyegue et al., 2017) et anti-germinatrice des huiles essentielles sur les spores de <i>Bacillus</i> (Voundi et al., 2015).	3.0
Zingiberaceae	<i>Aframomum danielli</i> Hook.f	Fruits 43130/HNC	Ndong	Utilisé comme épice ; antipoison ; réduit l'effet de l'alcool pneumonie	En infusion avec <i>Ocimum gratisimum</i> , <i>Zingiber officinale</i> et <i>Thymus vulgaris</i> pour une administration par voie orale	Antilarvicide des huiles essentielles (Pavela et al., 2016).	6.0
	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe.	Rhizome 43125/HNC	Ndjinger	Toux ; affections bronchopulmonaires	Macération avec <i>Ocimum gratisimum</i> et <i>Eucalyptus globulus</i> pour une administration par voie orale	Antibactérienne et anti-germinatrice des huiles essentielles sur les spores de <i>Bacillus</i> (Voundi et al., 2015).	19.7

III.1.12. Discussion partielle

Des résultats relatifs aux quatorze tradipraticiens interviewés lors de l'enquête ethnobotanique, il ressort que douze espèces végétales sont utilisées pour le traitement de la tuberculose dans les deux localités enquêtées du Nkam. Ce nombre d'espèces végétales recensé pourrait paraître peu représentatif mais en effet, la faible prévalence de la tuberculose dans les deux localités enquêtées et nombre réduit de tradipraticiens interviewés (quatorze des trente-sept personnes) soit 37,83 % serait un facteur limitant de la représentativité de nos résultats. Par contre, dans l'étude ethnobotanique des espèces végétales utilisées dans le traitement de la tuberculose réalisée dans trois districts de la province de Limpopo en Afrique du Sud, l'interview de 52 tradipraticiens a permis de recenser 21 espèces végétales appartenant 18 familles botaniques (**Semenya et al., 2013**). Cette différence viendrait du fait que l'Afrique du Sud est un pays à forte prévalence en tuberculose par rapport au Cameroun d'où l'écart dans la représentativité des résultats sur le nombre d'espèces végétales utilisées et de tradipraticiens enquêtés. De même, les tradipraticiens sont souvent très réservés en ce qui concerne les enquêtes ethnobotaniques. Cette réticence est d'autant plus remarquable lorsqu'elle implique les connaissances sur les plantes médicinales. En effet, les recettes médicamenteuses et les connaissances sur l'usage des plantes médicinales constituent un secret quelque fois familial qui ne se confie qu'à une tierce personne que lorsque le dépositaire le veut (**Ilumbe et al., 2010**). De plus, les plantes médicinales constituent auprès des tradipraticiens une matière première pour la production d'un des médicaments traditionnellement améliorés et une source de revenu financière pour leur famille.

Les symptômes majeurs les plus recherchés par les tradipraticiens dans le diagnostic de la tuberculose sont : une toux persistante et crachats sanguinolents accompagnés des céphalées nocturnes et des amaigrissent comme symptômes mineurs. L'importance de ces symptômes survient lors du suivi de l'évolution de la maladie mais, aussi lors de l'évaluation de l'efficacité du traitement en fonction du temps. En effet, après au moins trois mois de traitement, les tradipraticiens évaluent l'efficacité du traitement en observant l'évolution des symptômes notamment la disparition du mucus et du sang dans les crachats, la reprise du poids et diminution des douleurs thoraciques. Pour le confirmer, certains demandent un diagnostic médical au patient.

Les Amaryllidacées (02) ; Lamiacées (02) ; Asteracées (02) et Zingiberacées (02) sont les familles botaniques les plus utilisées par les tradipraticiens interviewés. Ces familles botaniques font partir des plus citées par les auteurs des études ethnobotaniques des espèces

végétales utilisées dans le traitement des maladies affectant les voies respiratoires (**Focho et al., 2009 ; Mpondo et al., 2017**). Aussi, une revue de littérature des activités biologiques des espèces végétales de ces familles botaniques a montré qu'elles présentent les propriétés antimycobactérienne et bactérienne (**Ngupta et al., 2015 ; Anochie et al., 2018**). En outre, l'étude menée par **Ilumbe et al. (2014)** a inventorié 353 plantes médicinales appartenant à 90 familles botaniques utilisées dans le traitement de diverses maladies parmi les qu'elles celles recenser dans notre étude. Egalement, ces familles font partir des plus riches en espèces végétales et leurs HEs en composés bioactifs tels que les sesquiterpènes lactones et chromène II des Astéracées, les dérivés allylés des Amaryllidacées, le citral et zingibrène des Zingibéracées, le thymol et le menthol des Lamiacées très appréciés pour leurs propriétés odoriférantes et/ou expectorants des voies respiratoires (**Nyegue, 2006 ; Horváth et Ács, 2015 ; Ndoyé et al., 2016**).

En ce qui concerne le mode de préparation des recettes médicamenteuses, la décoction et la macération sont les plus utilisées. En effet, l'eau est le solvant par excellence et disponible gratuitement auprès des populations pour la préparation des médicaments à base des plantes. Du point de vue chimique, l'eau est le solvant hydrophile non toxique qui extrait le plus de soluté.

Les tradipraticiens proposent des recettes en majorité constituées d'au moins deux plantes pour le traitement de la tuberculose. Cette technique de prescription est décrite par de nombreux autres auteurs car celle-ci permettrait d'augmenter l'efficacité de la recette médicamenteuse (**Zerbo et al., 2010 ; Ilumbé et al., 2014 ; Mpondo et al., 2017**). Le plus souvent, le traitement de diverses maladies par la médecine traditionnelle se focalise sur le traitement de divers symptômes liés à la maladie. En effet, plusieurs plantes répertoriées dans notre étude sont également citées dans une étude ethnobotanique des espèces végétales utilisées dans le traitement des affections des voies respiratoires menée dans onze localités de la région du Centre. Des 192 plantes listées, 162 sont utilisées en association avec au moins une autre plante (**Mpondo et al., 2017**).

III.1.13. Conclusion partielle :

L'enquête ethnobotanique révèle que quatorze des trente-sept tradipraticiens interviewés font usage des plantes médicinales dans le traitement de la tuberculose. De l'interview des quatorze répondants nous retenons que :

- ✓ Les tradipraticiens utilisent le résultat du diagnostic médical fait par un médecin ou les symptômes telle que la toux persistante et les crachats purulents/sanguinolents datant d'au moins deux mois pour diagnostiquer la tuberculose.
- ✓ Douze espèces végétales appartenant à sept familles botaniques sont utilisées dans le traitement de la tuberculose.
- ✓ Les plantes les plus mentionnées dans le traitement de la tuberculose sont *Zingiber officinale*, *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Echinops giganteus* et *Eucalyptus globulus*. Ces plantes sont prescrites dans des recettes obtenues pour la plupart par décoction, macération et infusion.
- ✓ La majorité des plantes est utilisée en association avec au moins une autre pour le traitement de la tuberculose excepté celles d'*Allium sativum*, *Drypetes grosseweileri*, *Echinops giganteus* et *Pentadiplandra brazzeana*.

III.2. COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES

De l'enquête ethnobotanique, 04 plantes ont été sélectionnées *Allium sativum*, *Drypetes grosseweileri*, *Echinops giganteus* et *Pentadiplandra brazzeana* parce qu'elles ne sont pas utilisées en association pour le traitement de la tuberculose. Ces plantes sont celles avec lesquelles nous avons évalué l'activité antimycobactérienne et déterminé les cibles cellulaires des HEs sur les différentes souches de *Mycobacterium tuberculosis* choisies. Elles sont regroupées dans le tableau VI ainsi que, les parties utilisées, les dates et lieux de récolte.

Tableau VI: Récapitulatif de quatre plantes utilisées dans le traitement de la tuberculose

Familles des plantes	Espèces utilisées	Parties récoltées	Date et lieu de récolte	Code à l'Herbier national
Putranjivaceae	<i>Drypetes gossweileri</i>	Ecorces fraîches	Mars 2016, Gwei (Edéa)	25749/SRF/Cam
Pentadiplandraceae	<i>Pentadiplandra brazzeana</i>	Racines fraîches	Juin 2016, Bamendjou (Ouest)	42918/SRF/Cam
Amarylidaceae	<i>Allium sativum</i>	Gousses sèches	Mars 2016, Marché Mokolo (Yaoundé)	25742/SRF/Cam
Asteraceae	<i>Echinops giganteus</i>	Racines fraîches	Janvier 2016, Bafou (Ouest)	23647/SRF/Cam

III.2.1 Extraction des huiles essentielles

Le tableau VII ci-dessous présente pour chaque HE, le rendement d'extraction (%). Il ressort de celui-ci que les rendements en HEs obtenus par hydrodistillation des échantillons végétaux varient de 0,04 % à 0,30 % respectivement pour les HEs de *P. brazzeana* et *E. giganteus*.

Tableau VII: Rendements d'extraction des différentes HEs de plantes

Plantes	Rendements (%)
Pb	0,04
Dg	0,13
As	0,20
Eg	0,30

Légende : Pb : *P. brazzeana* ; Dg : de *D. gossweileri* ; As : *A. sativum* ; Eg : *E. giganteus*.

III.2.2. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles et leurs combinaisons

La composition chimique des HEs extraites et leurs combinaisons est déterminée grâce aux calculs des indices de rétentions obtenus à partir des temps de rétention présents sur les pics des composés du chromatogramme. Ces indices ont permis d'identifier les composés volatils dans les HEs de *P. brazzeana*, *E. giganteus*, *D. gossweileri* et *A. sativum* et les combinaisons par comparaison avec celui des composés de la littérature et des bases de données. Les indices de rétention relatifs aux composés identifiés sont reportés dans le tableau VIII ci-dessous. Il

ressort de celui-ci que les HEs de *P. brazzeana* et *D. gossweileri* appartenant à deux familles différentes ont montré un profil chimique similaire notamment avec une abondance en dérivés isothiocyanate dont l'isothiocyanate de benzyle à 91,3 % et 96,0 % respectivement . Plus spécifiquement, l'analyse CPG/SM de l'HE des racines de *P. brazzeana* a révélé neuf composés identifiés que sont l'isothiocyanate de benzyle (91,1 %), le phénylacétonitrile (3,5 %), le *p*-méthoxyisothiocyanate de benzyle (3,3 %), le benzaldéhyde (0,6 %), le *p*-méthoxybenzaldéhyde (0,2 %), la benzophénone (0,1 %), le *p*-méthoxyphénylacétone (0,1 %), le *p*-méthoxyphénylacétonitrile (0,1 %) et l'alcool *p*-anisique (0,1 %). De ces composés nous avons noté un pourcentage total de 3,6 % en dérivés *p*-methoxy. Celui des écorces de *D. gossweileri* a indiqué la présence de quatre composés dont en plus de l'isothiocyanate de benzyle, le phénylacétonitrile (3,1 %), le benzaldéhyde (0,2 %) et le sulfure de benzyle (0,2 %) et une absence des composés *p*-methoxy.

L'HE d'*Echinops giganteus* qu'ant à elle est constituée de 40 composées dont majoritairement les triperpènes cycliques tels que le silphiperfol-5-ène (27,4 %), silphiperfolan-6- α -ol (11,3 %), silphiperfolène (7,4 %) 7-épi-silphiperfol-5-ène (6,0 %) et caryophyllène (7,0 %).

Dans l'HE d'*Allium sativum*, 22 composés ont été identifiés et étant exclusivement constitués de composés allylés. Aussi, l'analyse de la composition chimique de l'HE d'*A. sativum* a révélé qu'elle est constituée de trisulfure de 2-méthyl propyle (51,0 %), le trisulfure de méthyl allyle (12,8 %), le sulfure de diallyle (11,1 %) et le disulfure de triallyle (8,4 %) comme composés majoritaires.

Après avoir combiné les HEs, de *P. brazzeana*, d'*A. sativum* et d'*Echinops giganteus*, les composés précédemment présents dans chaque HE sont dilués dans les proportions $\frac{1}{4}$; $\frac{1}{4}$ et $\frac{1}{2}$ dans la combinaison E₁, $\frac{1}{4}$; $\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{4}$ dans la combinaison E₂ $\frac{1}{2}$; $\frac{1}{4}$ et $\frac{1}{4}$ dans la combinaison E₃. L'analyse de la composition chimique de celles-ci montre que l'isothiocyanate de benzyle est présent dans toutes les combinaisons à des proportions plus faibles que dans l'HE de *P. brazzeana*. Dans la combinaison E₁ (Pd :1/Eg :2/As :1), les dérivés phénylpropanoïdes représentent 45,7 % de l'huile et les composés majoritaires sont l'isothiocyanate de benzyle (41,9 %), 2- trisulfure de méthyl propyle (6,6 %), silphiperfolène (5,2 %) et le sulfure d'allyle (4,3 %). En ce qui concerne la composition chimique de la combinaison E₂ (Pd :1/Eg :1/As :2), 34,6 % de dérivés allylés ont été identifiés mais comme composés majoritaires nous avons, l'isothiocyanate de benzyle (24,3 %), le sulfure d'allyle (11,4 %), le silphiperfol-5-ène (16,9 %). Alors que l'isothiocyanate de benzyle (36,0 %),

silphiperfol-5-ène (27,8 %), trisulfure de 2- méthylpropyle (5,8 %) et le phénylacétonitrile (4,5 %) sont identifiés dans la combinaison E₃ (Pd :2/Eg :1/As :1) avec les sesquiterpènes oxygénés constituants 35,4 % de la combinaison. Cette composition chimique montre que l'activité antimycobactérienne des combinaisons pourra bien être influencée par la proportion et de la classe chimique des composés majoritaires (lead compound) qui les constituent.

Tableau VIII: Composition chimique des HEs des racines de *P. brazzeana*, et *E. giganteus* des écorces de *D. gossweileri* et des bulbes d'*A. sativum* et des combinaison E₁ ; E₂ ; E₃

Composés identifiés	IRL	IRLa	Pourcentages des composés (%)						
			<i>Pb</i>	<i>Eg</i>	<i>Dg</i>	<i>As</i>	<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>
1,2 Dithiolane	821	–	–	–	–	0,2	0,1	0,2	0,1
Sulfure de méthyl propényle	927	–	–	–	–	0,1	–	–	2,3
Sulfure de diallyle	862	–	–	–	–	0,2	2,4	4,6	0,3
1,2 Dithiolène	927	–	–	–	–	0,1	–	–	–
α-Pinène	932	939	–	0,1	–	–	–	–	–
Benzaldéhyde	948	960	0,6	–	0,2	–	–	0,2	–
β-Pinène	957	977	–	0,7	–	–	–	–	–
Sulfure d'allyle	981	–	–	–	–	11,1	4,3	11,4	3,7
(E) Sulfure de 2-prop-1-ène-1-allyle	996	–	–	0,1	–	0,3	–	–	–
Disulfure de méthyle allyle	1001	–	–	–	–	0,6	0,4	0,3	–
Disulfure de méthyle propyle	1040	–	–	–	–	5,0	4,3	–	0,1
(E) β-Ocinène	1044	1037	–	0,1	–	–	–	–	–
4-Méthyle-1,2,3-trithiolane	1057	–	–	–	–	0,4	0,1	0,5	–
Disulfide (E)-1-propényle allyle	1112	–	–	–	–	0,5	–	–	–
Phénylacétonitrile	1121	1138	3,5	–	3,1	–	3,8	5,8	4,5
<i>p</i> -Méthoxybenzaldéhyde	1151	–	0,2	–	–	–	–	–	–
Alcool <i>p</i> -anisique	1163	–	0,1	–	–	–	–	–	–
Trisulfure de 2-Méthylpropyle	1202	–	–	–	–	51,0	6,6	12,3	5,8
2-Venyl-4H-1,3-dithiine	1210	–	–	–	–	0,4	–	–	0,7
Trisulfure méthyle allyle	1261	–	–	–	–	12,8	–	3,5	2,0
Trisulfure de diallyle	1279	–	–	–	–	0,4	–	–	–
γ-Terpinène	1322	–	–	0,1	–	–	–	–	–
Isothiocyanate de benzyle	1326	–	91,3	–	96,0	–	41,9	24,3	36,0
Silphiperfol-5-ène	1330	1328	–	27,4	–	–	1,5	16,9	27,8
Persilphiperfol-7-ène	1333	1336	–	0,2	–	–	–	–	–
Trisulfure d'allyle propyle	1334	–	0,1	–	–	0,9	–	–	–
γ-Elemène	1339	1338	–	0,3	–	–	–	–	–
Silphiperfolène	1341	1347	–	7,4	–	–	5,2	–	–
7-épi-Silphiperfol-5-ène	1353	1348	–	6,0	–	–	3,9	–	–
α-Cubebène	1364	1351	–	1,0	–	–	–	–	–
Silphiperfol-6-ène	1374	1379	–	2,0	–	–	–	0,9	1,1
Modheph-2-ène	1380	1383	–	3,5	–	–	–	–	–
<i>p</i> -Méthoxyphénylacétone	1381	–	0,1	–	–	–	–	–	–
α-Isocomène	1385	1383	–	2,5	–	–	–	–	–
5-Méthyl-1,2,3,4-tetrathiane	1402	–	–	–	–	2,2	–	–	–

β -Longipinène	1403	1400	-	0,9	-	-	-	-	-
β -Isocomène	1406	1408	-	2,3	-	-	-	-	-
(E) Caryophyllène	1417	1419	-	<u>7,0</u>	-	-	-	-	-
Disulfure de triallyle	1441	-	-	-	-	<u>8,4</u>	3,8	1,8	-
α -Humulène	1450	1452	-	2,4	-	-	-	-	-
(E) β -Farnesène	1466	1456	-	0,1	-	-	-	-	-
Silhiperfolan-6- α -ol	1508	1507	-	<u>11,3</u>	-	-	<u>5,9</u>	-	1,6
<i>p</i> -Méthoxyisothiocyanate de benzyle	1515	-	3,3	-	-	-	-	-	-
Cameroonan-7- α -ol	1516	1511	-	4,3	-	-	-	-	-
Sesquicinéole	1520	1519	-	1,0	-	-	-	-	-
Silhiperfolan-7- β -ol	1526	1520	-	0,3	-	-	-	-	-
Napsan-4-ol	1533	1531	-	2,8	-	-	-	1,2	0,8
Silhiperfolan-6- β -ol	1551	1547	-	0,4	-	-	-	-	-
1,4-Dihydro-2,3-benzoxathium-3-oxide	1573	-	-	-	-	0,2	-	-	-
Prénopsan-8-ol	1574	1577	-	5,0	-	-	2,8	4,0	4,1
Persilhiperfolan-8-ol	1585	1586	-	4,4	-	-	1,9	2,0	-
Oxide d'humulène	1595	-	-	0,2	-	-	-	-	-
β -Atlantol	1607	1608	-	0,3	-	-	-	-	-
α -épi-Cadinol	1639	1640	-	0,6	-	-	-	-	-
α -Muurolol	1645	1646	-	0,3	-	-	-	-	-
α -Cadinol	1654	1654	-	0,2	-	-	-	-	-
β -épi-Bisabolol	1670	1671	-	0,2	-	-	-	-	-
(Z) γ -Atlantol	1692	1694	-	0,2	-	-	-	-	-
(2Z, 6E) Farnesol	1734	1743	-	0,3	-	-	-	-	-
Disulfure de (E)-1-propenyl-2-thiopenten-3-yle	1642	-	-	-	-	1,3	-	-	-
Tetrasulfure de 2-propenyle	1649	-	-	-	-	0,7	-	-	-
Tetrasulfide de diallyle	1701	-	-	-	-	1,3	-	-	-
α -Bisabolol	1779	-	-	0,2	-	-	-	-	-
4-méthyl-1,2,3,5,6-plutathiopane	1805	-	-	-	-	0,2	-	-	-
Sulfure de benzyle	1818	-	-	-	0,2	-	-	-	-
Benzophénone	1845	-	0,1	-	-	-	-	-	-
Cyclo octasulfure	1869	-	-	-	-	0,2	-	-	-
Total identifiés (%)			98,7	96,1	99,5	98,4	88,9	89,9	87,9

Légende : IRL : Indice de rétention linéaire du composé IRLa : Indice de Rétention Linéaire d'Adams du composé X ; Pb : *Pentadiplandra brazzeanna* ; Eg : *Echinops giganteus* ; Dg : *Drypetes gosseweileri* ; As : *Allium sativum* E₁, E₂, E₃ : Combinaisons.

III.2.3. Discussion partielle

Après extraction de l'HE des racines de *P. brazzeana* nous avons obtenu un rendement de 0,04 %. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par **Ndoyé (2001)** et **Nyegue (2006)**, dont les rendements oscillent dans l'intervalle de 0,02 et 0,20 % pour les racines récoltées dans les localités d'Abonbang et de Yaoundé. Ce résultat justifie le fait qu'il aurait une relation claire liant le lieu et la période de récolte de cette plante aux rendements d'extraction comme l'avait déjà mentionné **Nyegue (2006)**. Par contre, le rendement d'extraction de l'HE des écorces de *D. gossweileri* (0,13 %) diffère de ceux obtenus par **Eyélé et al. (1997)** (0,20 %) ; **Agnaniet et al. (2003)** (0,19 %) et **Ndoyé et al. (2016)** (0,04 %). Celui de l'HE des gousses d'*A. sativum* (0,20 %) est le même que celui obtenu par **Mnayer et al. (2014)** mais diffère de ceux obtenus par **Khadri et al. (2010)** et **Lawrence (2011)** qui sont respectivement, 0,09 % et le double (0,4 %) du rendement obtenu.

Cette différence dans le rendement d'extraction serait due à l'impact exercé par les facteurs environnementaux tel que le type de sol, le climat, fortement dépendant du lieu de récolte et de la période de récolte. Elle pourrait aussi être relative aux facteurs propres à la plante tels que le cycle végétatif de la plante et l'état du matériel végétal mais aussi, au procédé d'extraction et le temps d'hydrodistillation (**Bruneton, 1999 ; Satyal et al., 2017 ; Nyegue et al., 2018**).

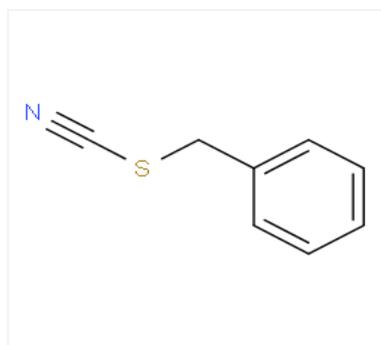
La composition chimique des HES des plantes analysées dans ce travail a déjà fait l'objet d'au moins un travail scientifique ce qui nous a permis de comparer les composés identifiés et leurs proportions par rapport à ceux de la revue de la littérature.

Les HES de *P. brazzeana* et *D. gossweileri*, deux plantes appartenant à deux familles différentes ont présenté une abondance en dérivés isothiocyanates dont l'isothiocyanate de benzyle à 91,3% et 96,0% respectivement. Cette prédominance en isothiocyanate avait aussi été notée dans les HES d'écorces de *D. gossweileri* récoltées dans les localités du Gabon et de la République Centrafricaine dans les proportions similaires à celles obtenues dans nos travaux (**Mvé-mba et al., 1997 ; Ndoyé et al., 2016**). De même, **Voundi et al. (2015)** ont également montré que dans les écorces de *D. gossweileri* récoltées à Ntongo, localité du Centre Cameroun, les proportions de ces composés étaient semblables aux nôtres. A l'inverse, **Agnaniet et al. (2003)** ont montré que l'HE d'écorces de *D. gossweileri* récoltées dans une autre localité du Gabon, contenait comme composé majoritaire le phénylacétonitrile (73.7 %). En ce qui concerne l'HE de *P. brazzeana* d'autres études ont montré que les racines récoltées à Olembé dans la région du Centre-Cameroun (**Nyegue, 2006**) ont présenté le même profil avec des

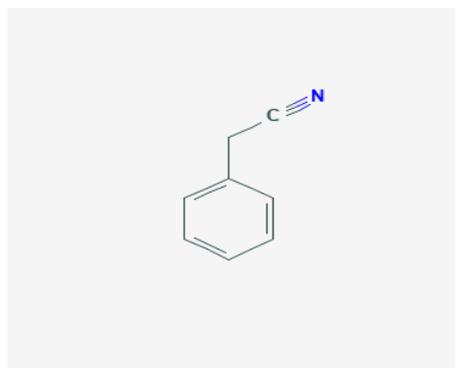
concentrations différentes.

La prédominance de ces composés majoritaires dans les HEs de *P. brazzeana* et *D. gossweileri*, deux plantes de familles différentes des *Pentadiplandraceae* et les *Putranjivaceae*, est due à leur richesse en un glucosinolate de même type appelé glucosinolate de benzyle ou glucopropaeoline et glucosinolate (pour l'abondance en isothiocyanate de benzyle) de paramethoxybenzyle ou glucoaubrietine (pour les dérivés methoxy-) (Montaut *et al.*, 2017).

En effet, selon Nyegue *et al.*, (2018) ces glucosinolates se décomposent au cours du processus d'hydrodistillation sous l'effet de la chaleur et du pH légèrement basique (Ph = 5-8) pour donner les dérivés d'isothiocyanates représentant environ 95 % de l'HE extraite dont le majoritaire est l'isothiocyanate de benzyle. Contrairement aux résultats présents, la dominance en phénylacétonitrile dans les échantillons d'écorces de *D. gossweileri* récoltées dans une autre localité du Gabon serait due au pH acide (pH = 2) du milieu dans lequel le matériel végétal est immergé au cours du processus d'hydrodistillation (Sexue, 2006 ; Nyegue *et al.*, 2018). Les deux composés retrouvés majoritairement dans les HEs de *P. brazzeana* et *D. gossweileri* sont présentés par les structures chimiques suivantes :



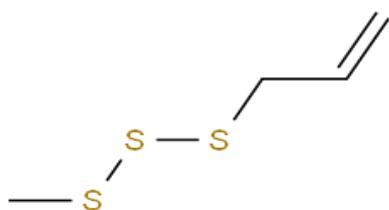
Isothiocyanate de benzyle



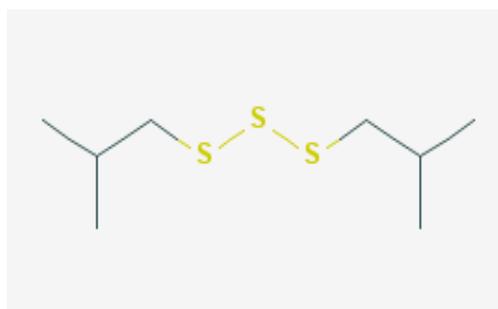
Phénylacétonitrile

L'HE d'*A. sativum* est exclusivement constituée de dérivés allylés. Cette exclusivité en dérivés allylés retrouvés dans l'HE d'*A. sativum* pourrait s'expliquer par l'abondance des bulbes d'ail en substance appelée alliline substance très instable produite au cours de l'hydrodistillation sous l'effet de la chaleur pour donner les dérivés sulfures plus stables. En effet, lorsque les gousses sont écrasées, l'alliline est convertie en allicine sous l'effet de l'alliinase qui est par la suite interconverti en ces différents dérivés allylés (Benkeblia et Lanzotti, 2007 ; Catia *et al.*, 2011 ; Viswanathan *et al.*, 2014). Cette présence majoritaire de dérivés allylés a aussi été révélée par Ndoyé *et al.* (2016) dans les échantillons d'HE des bulbes d'*A. sativum* récoltés à Garoua mais à des proportions plus faibles que celles de la présente

étude. De plus, les travaux de **Mnayer *et al.* (2014)** ont également révélé la présence de disulfure de diallyle (37,9 %), suivi du trisulfure de diallyle (28,1 %) et du trisulfure de méthylallyle (7,26 %) qui représentent plus de la moitié des constituants de l'HE de ladite étude. L'étude menée par **Khadri *et al.* (2010)** en Algérie, a montré que le trisulfure de méthylallyle (34.61 %) et le disulfure de diallyle (31.65 %) étaient les principaux composés de l'HE des bulbes d'*A. sativum*. Cependant, toutes ces études mettent en exergue la présence du disulfure de méthylallyle dans les différents profils chimiques et à des proportions variables (**Khadri *et al.*, 2010 ; Mnayer *et al.*, 2014 ; Ndoyé *et al.*, 2016**). En outre, **Satyral *et al.* (2017)** ont démontré que plusieurs profils chimiques des HES d'*A. sativum* révélaient la présence de disulfure de diallyle et trisulfure de diallyle comme principaux constituant mais que les quantités seraient fonction de la méthode d'extraction des HES d'*A. sativum* et du lieu de récolte de la plante. Les structures chimiques ci-après représentent les composés majoritaires identifiés dans l'HE d'*A. sativum*.



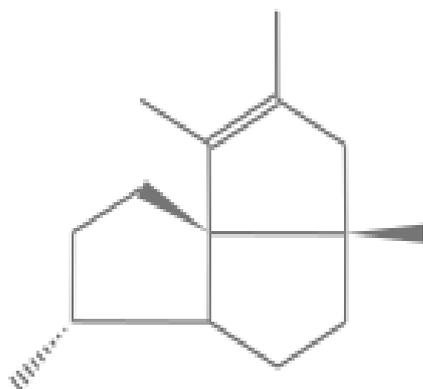
Trisulfure de 2-méthylpropyle



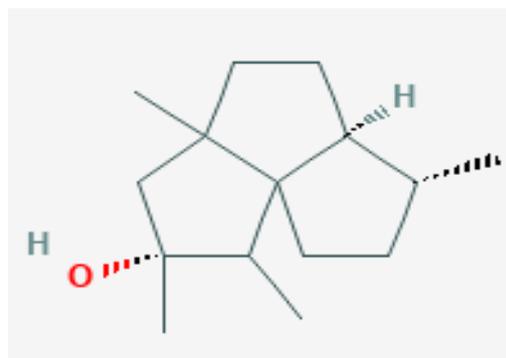
Trisulfure de méthyle allyle

Dans l'HE d' *E. giganteus*, 40 composés volatils sont identifiés. Les composés majoritaires sont les sesquiterpènes tricycliques tels que le silphiperfol-5-ène (27,4 %), silphiperfolan-6- α -ol (11,3 %), silphiperfolène (7,4 %) 7-épi-silphiperfol-5-ène (6,1 %) et caryophyllène (7,0 %). Les deux premiers composés dont les structures chimiques sont illustrées à la page suivante ont également été retrouvés majoritairement lors des travaux réalisés par **Menut *et al.* (1997)** avec des proportions respectives de 26,9 % et 9,4 % et dans les travaux de **Pavela *et al.* (2016)** avec des proportions respectives de 23,0 % et 22,7 %. L'abondance de cette classe de composés aurait pour origine le cation caryophyllényle dont le réarrangement sous l'effet de la chaleur qui aboutirait à la formation de ces molécules elles même précurseurs des autres. C'est ce qui expliquerait leur prépondérance dans les HES de certaines des plantes de la famille *Asteraceae* ou du genre *Anemia* (**Menut *et al.*, 1997 ; Pinto *et al.*, 2009**). En effet, dans le cas des glucosinolates présents dans *P. brazzeana* et *D.*

gossweileri comme l'ont démontré **Montaut et al. (2017)** et **Nyegue et al. (2018)**, ou de celui de l'allicine dans *Allium sativum*, nous pensons qu'il y aurait une molécule commune présente dans les plantes d'*Echinops giganteus* et *Anemia tomentosa* dont la dégradation au cours du processus de l'hydrodistillation aboutirait à ces sesquiterpènes tricycliques et c'est ce qui expliquerait leur abondance dans leurs HEs.



Silphiperfol-5-ène



Silphiperfolan-6- α -ol

Sur la base des résultats de la composition chimique des HEs, nous avons réalisé les combinaisons en excluant l'HE de *D. gossweileri* à cause de sa composition et de son activité quasi identique à celle de *P. brazzeana*. En ce qui concerne la composition chimique des combinaisons d'HEs, on peut donc dire que les composés majoritaires de chaque HE ont été dilués au cours de la réalisation des combinaisons. En effet, l'isothiocyanate de benzyle présent à 91,3 % dans l'HE de *P. brazzeana* est le composé majoritaire des trois combinaisons avec des proportions réduites à 41,9 % donc 2,2 fois plus faible dans E₁ ; à 24,3 % soit 3,8 fois plus faible dans la combinaison E₂ et 36 % soit 2,5 fois dans la combinaison E₃. Par contre, la présence de l'isothiocyanate combiné aux dérivés allylés ou les sesquiterpènes tricycliques dans les proportions différentes dans chaque combinaison pourrait fortement moduler leurs activités comparées à celle des HEs testées individuellement. De nombreuses recettes médicamenteuses utilisées en aromathérapie associent plusieurs HEs. Ces combinaisons sont souvent réalisées dans le but de rechercher des d'éventuels effets synergiques entre HEs mais surtout pour la complémentarité des différentes activités biologiques et des qualités organoleptiques. **Voundi** en **2017** a montré que l'isothiocyanate de benzyle présent dans l'HE de *D. gossweileri* prise comme conservateur dans les jus de fruits présente une bonne activité antibactérienne sur *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearotherophilus* et anti-germinatrice de leurs spores mais, procure

un gout piquant et une odeur irritante au produit alimentaire qui le rend non acceptable par le panel de consommateurs. Dans la présente étude, l'isothiocyanate de benzyle est dilué dans la combinaison avec les dérivés allylés et les sesquiterpènes. Cette dilution a permis de moduler les caractères organoleptiques et l'activité biologique de l'ensemble des HEs dans les combinaisons.

III.2.4. Conclusion partielle :

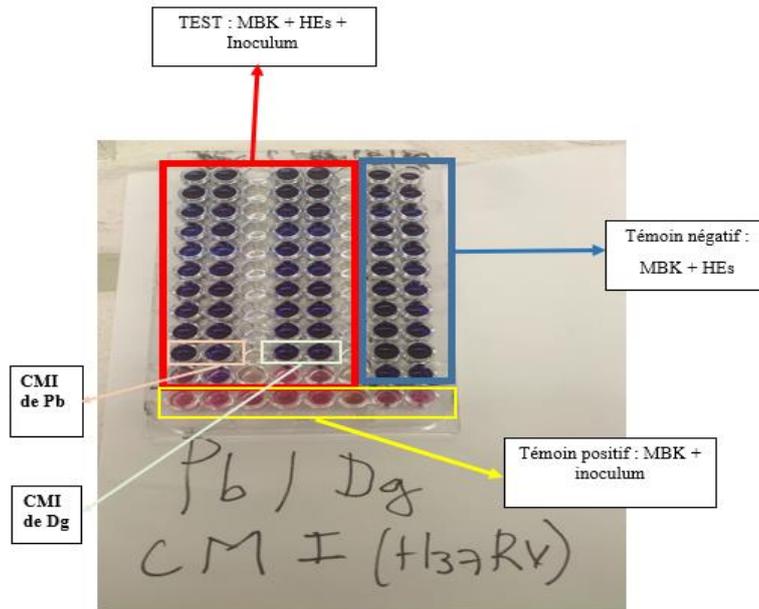
Des résultats de l'analyse de la composition chimique des HEs et combinaisons nous pouvons dire que les composés identifiés sont atypiques à ceux couramment rencontrés dans les HEs usuelles.

- ✓ L'HE d'*Allium sativum* contient les dérivés allylés tels que le trisulfure de 2-méthylpropyle (51,0 %) et le trisulfure de méthyl allyle (12,8 %). Celle de *Pentadiplandra brazzeana*, et *Drypetes gossweileri* respectivement l'isothiocyanate de benzyle (91,3 % et 96,0 %) et le phenylacetonitrile (3,5 % et 3,1 %) et celle d'*Echinops giganteus* contient les sesquiterpènes tricycliques tels que silphiperfol-5-ène (27,4 %), et le silphiperfolan-6- α -ol (11,3 %).
- ✓ Les combinaisons contiennent toutes l'isothiocyanate de benzyle comme composé majoritaire mais dans les proportions réduites à 2,2 fois dans E₁, 3,8 fois dans E₂ et 2,5 fois dans E₃ par rapport à l'HE de *P. brazzeana*.
- ✓ La réalisation des combinaisons a permis d'associer l'isothiocyanate de benzyle aux dérivés allylés et aux sesquiterpènes dans des proportions différentes capables d'influencer les qualités organoleptiques et l'activité antimycobactérienne des HEs individuelles.

III.3. ACTIVITE ANTIMYCOBACTERIENNE DES HUILES ESSENTIELLES ET COMBINAISONS

L'évaluation de l'activité antimycobactérienne d'une substance commence par la recherche des paramètres d'inhibition CMI_s et CMB_s. Si les résultats du screening de l'activité antimycobactérienne montrent que toutes les HEs sont actives aux différentes concentrations testées, la recherche des CMI_s a permis de qualifier leurs activités et le rapport CMI/CMB de donner leurs efficacités. Ces montrent que toutes les HEs et leurs combinaisons ont présenté des propriétés antimycobactériennes. La Photo 14 illustre le résultat de la CMI de *P. brazzeana* et *D. gossweileri* sur la souche de référence H37Rv obtenu après 7 jours d'incubation à 37 °C

et ajout du Blue Alamar. Le Blue Alamar est initialement bleu, les puits ayant conservé cette couleur après ajout sont ceux dont la croissance microbienne est inhibée à des concentrations 2500 µg/mL à 4,88 µg/mL pour Pb et Dg les puits ayant eu un changement de coloration (rose ou rouge) indiquent une croissance de *M. tuberculosis* (les puits de la ligne 12 par exemple). En conclusion les CMI des HEs de *P. brazzeana* et *D. gossweileri* sont égales à 4,88 µg/mL sur la souche H37Rv.



Légende : Pb (*P. brazzeana*); Dg (*D. gossweileri*); HEs : huiles essentielles ; MBK : Middlebrook

Photo 14: Résultats des CMI des HEs de *P. brazzeana* et *D. gossweileri* sur la souche de référence H37Rv.

L'analyse du tableau XI montre que toutes les HEs ont inhibé la croissance de *M. tuberculosis* avec des CMI qui varient entre 4,88 µg/mL à 156,25 µg/mL. L'HE d'*E. giganteus* est celle qui présente la plus petite activité sur les deux isolats cliniques et sur la souche de référence H37Rv avec des CMI entre 156,25 µg/mL sur l'isolat IS3 et la souche H37Rv et 312,5 µg/mL sur l'isolat IS310 tandis que les HEs de *P. brazzeana* et de *D. gossweileri* sont celles qui ont montré les plus fortes activités avec des CMI variant de 4,88 µg/mL la souche H37Rv et l'isolat IS310 et à 9,76 µg/mL sur l'isolat IS53 µg/mL.

Des deux isolats cliniques testés par rapport à la souche de référence, nous constatons que IS53 est sensible à la fois à l'Ofloxacin et à la Rifampicine tandis que l'isolat IS310 est résistant à la Rifampicine, antituberculeux de première ligne avec une CMI de 125 µg/mL par comparaison avec la souche de référence H37Rv et l'isolat IS53 sensibles à la CMI de 0,48

µg/mL. Une grande attention est portée sur l'isolat IS310 car bien qu'étant résistant à la Rifampicine, les HEs montrent une forte activité avec des CMI de 4,88 µg/mL pour *D. gossweileri*, 9,76 µg/mL pour *P. brazzeana* et 39,06 µg/µL pour *A. sativum* soit des activités respectives de 32,02 fois ; 16 fois et 4 fois plus forte que celle de la Rifampicine.

Les paramètres ont permis de calculer le rapport CMB/CMI caractérisant une action bactéricide, bactériostatique ou de déterminer la « tolérance » des bactéries. Toutes les HEs utilisées sont bactéricides sur la souche H37Rv tandis que sur l'isolat clinique IS53, *P. brazzeana* est la seule huile bactériostatique. Pour l'isolat clinique IS310, *E. giganteus* montre une bactéricidie tandis que les HEs *D. gossweileri*, *A. sativum* quant à elles montrent un effet bactériostatique avec une tolérance à l'HE *P. brazzeana*.

Tableau IX: Paramètres d'inhibition des HEs et leurs combinaisons sur les isolats et la souche de référence H37Rv

HEs et Combinaisons	H37Rv				Isolat IS53				Isolat IS310			
	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	Rap CMI/CMB	Activité	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	Rap CMI/CMB	Activité	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	Rap CMI/CMB	Activité
Pb	4,88	9,76	2	Bactéricide	4,88	78,12	16	Bactériostatique	9,76	625	32	Tolérante
Dg	4,88	9,76	2	Bactéricide	9,76	39,0625	4	Bactériostatique	4,88	78,12	16	Bactériostatique
As	78,12	156,25	2	Bactéricide	39,06	78,125	2	Bactéricide	39,06	625	16	Bactériostatique
Eg	156,25	312,50	1	Bactéricide	156,25	312,5	2	Bactéricide	312,50	1250	4	Bactériostatique
E1	78,12	156,25	2	Bactéricide	156,25	156,25	1	Bactéricide	156,25	156,25	1	Bactéricide
E2	78,12	156,25	2	Bactéricide	78,12	625	8	Bactériostatique	156,25	312,5	2	Bactéricide
E3	156,25	1250	8	Bactériostatique	39,06	78,12	2	Bactéricide	156,25	156,25	1	Bactéricide
OX	31,25	62,50	2	Bactéricide	62,50	125	2	Bactéricide	7,81	7,81	1	Bactéricide
RIF	0,48	1,95	2	Bactéricide	0,48	1,95	2	Bactéricide	125	250	2	Bactéricide

Légende : **Pb** (*P. brazzeana*); **Dg** (*D. gossweileri*); **As** (*A. sativum*); **Eg** (*E. giganteus*); **OX** (Ofloxacine); **RIF** (Rifampicine); **HEs** : huiles essentielles ; **rap** : rapport CMB/CMI ; E1, E2, E3 = Combinaisons d'HEs

En ce qui concerne l'activité des combinaisons d'HEs, les tableaux X, XII et XIII résument leurs paramètres d'inhibition sur la souche de référence H37Rv et les isolats IS53 et IS310. Il ressort de ceux-ci que les combinaisons présentent des activités antimycobactériennes plus faibles que celles des HEs testées individuellement. La plus forte activité de *P. brazzeana* testée individuellement est passée de 4,88 et 9,76 µg/mL à 39,06 et 78,12 µg/mL dans les combinaisons soit une réduction au 1/3 et 1/4 de l'activité. La combinaison la plus active est E2 car ses CMI sont plus faibles et varient entre 78,12 µg/mL sur la souche de référence et l'isolat IS53 à 156,25 µg/mL sur l'isolat IS310. Des deux isolats testés par rapport à la souche de référence, l'isolat IS310 est le plus résistant aux combinaisons avec les CMI exclusivement à 156,25 µg/mL. Nous constatons également que plus la proportion en HE de *P. brazzeana* augmente, plus l'activité des deux autres HEs augmente. C'est le cas dans la combinaison E3 (50 % d'HE de *P. brazzeana*) où les proportions inhibitrices des deux autres HEs varient entre 9,76 µg/mL et 39,05 µg/mL alors que dans E1 et E2 (25 % d'HE de *P. brazzeana*), elles varient entre 19,52 µg/mL et 78,12 µg/mL.

Le tableau X montre que les fractions ou proportions actives des HEs dans la combinaison E1. Il en ressort que la proportion active en HE de *P. brazzeana* (25 % dans la combinaison) a une faible activité (19,52 µg/mL à 39,06 µg/mL) comparé à l'HE testée individuellement (de 4,88 µg/mL à 9,76 µg/mL) alors que l'HE de *E. giganteus* à 50 % dans la combinaison est plus active (19,52 µg/mL à 78,12 µg/mL) que son HE testée individuellement (156,25 µg/mL à 312,5 µg/mL). Nous pouvons dire qu'il y a eu potentialisation de l'HE d'*E. giganteus* par celle de *P. brazzeana*.

Tableau X: Proportions actives des HEs dans la combinaison E1

HE/comбинаisons	Proportion des HES	CMI (µg/mL)			CMB (µg/mL)		
		H37Rv	IS53	IS310	H37Rv	IS53	IS310
Pb	25 %	19,52	19,52	39,06	39,06	156,25	78,125
As	25 %	19,52	19,52	39,06	39,06	156,25	78,125
Eg	50 %	39,06	39,06	78,12	78,12	312,5	156,25

Légende : Pb (*P. brazzeana*); As (*A. sativum*); Eg (*E. giganteus*) **HEs :** huiles essentielles ; E1, = Combinaison d'HEs

Parlant des proportions actives des HEs dans la combinaison E₂, elles sont consignées dans le tableau XI ci-après. L'analyse de celui-ci montre que la proportion en HE d'*A. sativum* (50 % dans la combinaison) est moins active (39,06 µg/mL à 78,12 µg/mL) que celle de l'HE testée individuellement (de 19,52 µg/mL à 39,06 µg/mL) alors que l'HE *E. giganteus* dans la combinaison est plus actives (19,52 µg/mL à 39,06 µg/mL) que son HE testée individuellement (156,25 µg/mL à 312,5 µg/mL) soit des activités 2 et 4 fois plus élevées. La proportion en HE de *P. brazzeana* est moins active que l'HE testée individuellement de 4,88 µg/mL et 9,76 µg/mL à 39,06 µg/mL et 78,12 µg/mL dans la combinaison soit une réduction au 1/3 et 1/4 de l'activité. On peut aussi dire que l'activité de l'HE d'*E. giganteus* dans la combinaison est potentialisée par l'HE d'*A. sativum* alors qu'elle a réduit celle de *P. brazzeana*.

Tableau XI: Proportions actives des HEs dans la combinaison E2

HE/combinaisons	Proportion des HES	CMI (µg/mL)			CMB (µg/mL)		
		H37Rv	IS53	IS310	H37Rv	IS53	IS310
Pb	25 %	19,52	19,52	39,06	39,06	156,25	78,12
As	50 %	39,06	36,06	78,12	78,12	312,5	156,25
Eg	25 %	19,52	19,52	39,06	39,05	156,25	78,12

Légende : Pb (*P. brazzeana*) ; As (*A. sativum*); Eg (*E. giganteus*) HES : huiles essentielles ; E2 = Combinaison d'HEs

Dans la combinaison E₃, les proportions actives sont réparties comme le montre le tableau XII. L'analyse de celui-ci révèle que la proportion en HE de *P. brazzeana* (50 % dans la combinaison) est encore moins active (39,06 µg/mL à 156,25 µg/mL) que celle de l'HE testée individuellement car les CMI varient entre 4,88 µg/mL et 9,76 µg/mL. Par contre les proportions en HE d'*E. giganteus* et *A. sativum* dans la combinaison est plus actives (9,76 µg/mL à 39,06 µg/mL) notamment sur l'isolat IS53 avec les activités à 9,76 µg/mL par rapport à son HE testée individuellement (156,25 µg/mL à 312,5 µg/mL) soit des activités 2 à 4 fois plus élevées. Nous pouvons dire que l'activité de l'HE d'*E. giganteus* et d'*A. sativum* dans la combinaison sont potentialisées par celle de *P. brazzeana*.

Tableau XII: Proportions actives des HEs dans la combinaison E3

HE/combinaisons	Proportion des HES	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			CMB ($\mu\text{g/mL}$)		
		H37Rv	IS53	IS310	H37Rv	IS53	IS310
Pb	50 %	78,12	19,52	78,12	625	39,06	78,12
As	25 %	39,06	9,76	39,05	156,25	19,52	39,06
Eg	25 %	39,06	9,76	39,06	156,25	19,52	39,06

Légende : **Pb** (*P. brazzeana*); **As** (*A. sativum*); **Eg** (*E. giganteus*) **HES** : huiles essentielles ; E3 = Combinaison d'HEs

En ce qui concerne les interactions entre les combinaisons d'HEs, le tableau XII regroupe leurs CMIs, leurs fractions de concentrations inhibitrices (FIC) et leurs index de fraction des concentrations inhibitrices (FIC_{index}) qui ont permis de définir les interactions sur la souche de référence H37Rv et les isolats IS53 et IS310. Il ressort de celui-ci que les combinaisons ont présenté des interactions antagonistes car les indexes de fractions inhibitrices varient entre 12,52 et 36,49. D'après **Yan et al. (2015)**, si l'index FCI > 2 , l'interaction est dite antagoniste. L'HE de *P. brazzeana* est la moins active des HEs en combinaison dont les FCI varient entre 12,42 et 20,52 sur l'isolat IS310 et 8 à 35 sur la souche de référence et l'isolat IS53. L'HE d'*E. giganteus* est celle ayant présentée une activité élevée dans les combinaisons notamment avec des FCI d'ordre de 0,24 à 1. Nous pouvons comprendre que les HEs de *P. brazzeana* et d'*A. sativum* ont potentialisé celle d'*E. giganteus* alors que celle d'*E. giganteus* a réduit celle de *P. brazzeana*.

Tableau XIII: Résultats des FIC et FIC index des combinaisons d'HEs sur les isolats et la souche de référence H37Rv

Combinaisons		H37Rv				IS53				IS310			
HES		MIC	FIC	FIC _{index}	Interaction	MIC	FIC	FIC _{index}	Interaction	MIC	FIC	FIC _{index}	Interaction
		Combinaison				Individuel	Combinaison				Individuel	Combinaison	
Pb	E1	78,12	16	17,49	Antagoniste	156,25	32	36	Antagoniste	156,25	8	12,42	Antagoniste
	E2	78,12	16	17,49	Antagoniste	78,12	16	18,41	Antagoniste	156,25	8	12,42	Antagoniste
	E3	156,25	32	35	Antagoniste	39,06	8	9,24	Antagoniste	156,25	16	20,52	Antagoniste
As	E1	78,12	1	17,49	Antagoniste	156,25	4	36,49	Antagoniste	156,25	4	12,52	Antagoniste
	E2	78,12	1	17,49	Antagoniste	78,12	2	18,49	Antagoniste	156,25	4	12,52	Antagoniste
	E3	156,25	2	35	Antagoniste	39,06	1	9,24	Antagoniste	156,25	4	20,52	Antagoniste
Eg	E1	78,12	0,49	35	Antagoniste	156,25	0,49	36	Antagoniste	156,25	0,52	12,52	Antagoniste
	E2	78,12	0,49	17,49	Antagoniste	78,12	0,49	18,41	Antagoniste	156,25	0,52	12,52	Antagoniste
	E3	156,25	1	17,49	Antagoniste	39,06	0,24	9,24	Antagoniste	156,25	0,52	20,52	Antagoniste

Légende : Pb (*P. brazzeana*); Dg (*D. gossweileri*); As (*A. sativum*); Eg (*E. giganteus*); OX (Ofloxacine); RIF (Rifampicine); HEs : huiles essentielles ; rap : rapport CMB/CMI ; E1, E2, E3 = Combinaisons d'HEs.

III.3.1. Discussion partielle

Le résultat de l'évaluation de l'activité antimycobactérienne a montré que toutes les HEs des quatre plantes sélectionnées ont présenté des activités antimycobactériennes. Ce résultat permet de justifier leur utilisation par les populations et par les tradipraticiens du Nkam dans le traitement de la tuberculose. D'autre part si toutes les HEs inhibent la croissance de *M. tuberculosis* c'est parce qu'elles contiennent des composés antimicrobiens tels que l'isothiocyanate de benzyle présent dans les HEs de *P. brazzeana* et de *D. gossweileri* ; les dérivés allylés dans l'HE d'*A. sativum* et les sesquiterpènes tricycliques dans l'HE d'*E. giganteus* (Cowan, 1999 ; Adolphe, 2006 ; Sülsen *et al.*, 2016).

L'isothiocyanate de benzyle agit par le biais de son groupement isothiocyanate en clivant les ponts disulfures ; en attaquant les centres nucléophiles (-SH, -NH₂ et -OH) et en oxydant les acides aminés libres ce qui se traduirait par des dommages sur les protéines et les acides nucléiques (Wilson, 2011 ; Hyldgaard *et al.*, 2012). Selon la classification des activités antibactériennes, une HE a une activité forte si sa CMI < à 100 µg/mL ; moyenne ou modérée si sa CMI est comprise entre 1000 µg/mL > CMI > 100 µg/mL et faible si sa CMI > 1000 µg/mL (Aligiannis *et al.*, 2001). De toutes les HEs testées, celles de *P. brazzeana* et *D. gossweileri* ont présenté des fortes activités avec des CMIs de 4,88 µg/mL et 9,76 µg/mL sur l'ensemble des trois mycobactéries testées. De ce point de vue on peut qualifier l'activité des HEs de *P. brazzeana* et *D. gossweileri* comme étant forte sur les deux isolats testés mais avec des effets bactériostatiques et forte par action bactéricide sur la souche de référence H37Rv. Cette similitude dans l'activité de ces deux HEs serait due à leurs compositions chimiques quasi identiques car dans ces deux HEs, l'isothiocyanate de benzyle et le phényl acétonitrile ont des proportions respectives de 91,3 % et 3,5 % dans *P. brazzeana*, et 96, 0 % et 3,1 % dans *D. gossweileri*. Par ailleurs, la forte activité viendrait principalement de l'action inhibitrice de l'isothiocyanate de benzyle. Il a été démontré que les isothiocyanates de benzyle ou les substances qui en possèdent présentent des fortes activités antimicrobiennes notamment celle des HEs de *D. gossweileri* sur quatre spores de *Bacillus* avec des CMIs allant de 4,88 µg/mL à 9,76 µg/mL (Voundi *et al.*, 2015). Celle de l'HE de *P. brazzeana* a présentée des activités sur quatre levures du genre *Candida* avec des CMIs allant de 7,81 µg/mL à µg/mL 62,3 µg/mL (Kamela, 2017 ; Voundi, 2017). Par ailleurs, les activités antiinflammatoires et antioxydantes sont un atout majeur en plus pour décrire l'efficacité de ces HEs (Ndoyé *et al.*, 2016). En comparant cette activité à celle de la Rifampicine, nous pouvons estimer que les activités des HEs de *P. brazzeana*, et de *D. gossweileri* sont respectivement 12,8 et 25,6 fois plus efficaces

in vitro que la Rifampicine[®] sur IS310 résistant (car la CMI de la RIF est de 125 µg/mL). Ces HEs pourraient servir comme source potentielle de nouveaux agents antituberculeux, en cas d'échec des traitements à certains médicaments antituberculeux ou tout simplement pour limiter l'apparition des résistances.

Par ailleurs l'HE d'*A. sativum* a inhibé la croissance de *M. tuberculosis* avec une CMI de 78,125 µg/mL sur l'isolat IS53, la souche H37Rv et avec une CMI de 39,06 µg/mL sur l'isolat IS310. Cette activité serait due à la présence des dérivés allylés dans l'HE. Selon **Miron et al. (1999)**, les composés allylés interagissent par leurs groupes thiol (SH) en induisant de dommages sur les protéines et les acides nucléiques. Du point de vu de l'activité, nous pouvons classer l'activité de l'HE d'*A. sativum* comme étant modérée car les CMIs sont comprises entre 1000 et 100 µg/mL. Les résultats sur l'étude des activités antimycobactériennes des différents extraits d'*A. sativum* menée par **Viswanathan et al. (2014)** ont montré que la fraction à l'acétate d'éthyle d'*A. sativum* (riche en ajoène) est active sur la souche H37Rv de *M. tuberculosis* à des CMIs variant entre 19,53 µg/mL et 39,06 µg/mL alors que celle de son extrait aqueux riche en allicin est active à des CMIs variants de 0,97 µg/mL et 1,95 µg/mL. Par contre, l'HE d'*A. sativum* testée sur la souche H37Rv entraine l'inhibition de 97,4 % de colonie à 80 mg/mL (**Viswanathan et al. 2014**). La forte activité des fractions à acétate d'éthyle et aqueux par rapport à celle de l'HE viendrait du fait qu'en plus des composés hydrophobes constitués de dérivés sulfides ces extraits d'*A. sativum* contiennent le joème et l'allicine, composés allylés au groupement sulfoxydes plus actifs (**Viswanathan et al. 2014**). Même si l'activité antimycobactérienne de l'HE d'*A. sativum* est plus faible par rapport à celle des antituberculeux testés, le potentiel antiinflammatoire, antioxydant et son spectre d'action sur les bactéries du genre *Staphylococcus* résistant à la Mécicilline, *Eschericia*, *Bacillus* est un atout majeur qui la rend plus intéressent comme antimicrobien (**Hasan et al., 2006 ; Viswanathan et al., 2014 ; Ndoyé et al., 2016**).

L'activité de l'HE d'*Echinops giganteus* est la plus faible dans l'ensemble avec des CMIs variants de 156,25 µg/mL à 312,5 µg/mL. Cette activité serait liée à l'action combinée des composés majoritaires tels que le silphiperfol-6-ène, le persilphiperfolan-7-ène, le 7-épi-silphiperfol-5-ène et le Silphiperfolan-6- α -ol dont l'activité antimycobactérienne sur *M. tuberculosis* H37Rv testée à partir des fractions extraites de l'HE d'*Anemia tomentosa* donne les CMIs variant de 100 µg/mL à 120 µg/mL (**Pinto et al., 2009**). L'extrait méthanoïque de cette plante testée sur les souches de référence a montré des meilleures activités avec des CMIs de 16 µg/mL sur la H37Rv et H37Ra (**Tekwu et al., 2012**). Cette différence proviendrait de la

forte activité antimycobactérienne de composés hydrosolubles extraits par le méthanol par rapport aux composés lipophiles de l'HE. Certains sesquiterpènes comme ceux retrouvés dans l'HE d'*Echinops giganteus* peuvent inhiber la synthèse du peptidoglycane et augmenter la perméabilité membranaire selon (Cowan, 1999).

En général, la capacité d'une plante à inhiber la croissance microbienne ou la différence d'activité qui existe entre l'HE d'une même espèce de plante serait influencée par la classe chimique et la concentration de composés retrouvés dans chaque HE (De Nicola *et al.*, 2012 ; Ndoyé *et al.*, 2016).

L'activité antimycobactérienne des combinaisons d'HEs est plus faible que celle des HEs testées individuellement à cause des interactions antagonistes des différentes classes de composés chimiques. Cette baisse d'activité pourrait aussi s'expliquer par le fait que l'isothiocyanate de benzyle présent dans l'HE de *P. brazzeana* et responsable de la forte activité antimycobactérienne, est passé de 91,3 % dans l'HE individuelle à 41,9 % soit 2,2 fois plus faible dans la combinaison E1 ; 5,4 fois plus faible dans la combinaison E2 ; 2,5 fois plus faible dans la combinaison E3. En effet, les CMI de l'HE de *P. brazzeana* lorsque testée individuellement varient entre 4,88 µg/mL et 9,76 µg/mL alors que celles des combinaisons sont réduites au 1/3 et 1/4 (avec les CMI allant 39,06 µg/mL à 156,25 µg/mL). Les travaux antérieurs ont montré que le bisabolol, un sesquiterpène testé individuellement sur *M. tuberculosis* avait une CMI de 16 µg/mL alors que la CMI de l'HE dans laquelle elle a été extraite était 4 fois plus faible donc plus active montrant que l'activité de l'ensemble de l'HE est synergique par rapport à celle du bisabolol (Sieniawska *et al.*, 2015).

Dans l'ensemble, l'HE de *P. brazzeana* a potentialisé l'activité des HEs d'*A. sativum* et d'*E. giganteus* car plus la concentration en *P. brazzeana* augmente plus la combinaison est active. Le fait que les résultats de la composition chimique des combinaisons d'HEs n'aient pas révélé la présence des composés néoformés donc aucune interaction chimique entre composés, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle les sesquiterpènes d'*E. giganteus* et les dérivés allylés d'*A. sativum* auraient réduits l'action inhibitrice de l'isothiocyanate de benzyle. L'HE de *P. brazzeana* testée individuellement entraîne l'inhibition des trois souches de *M. tuberculosis* testées à des concentrations (CMI) de 4,88 et 9,76 µg/mL mais une fois combinée aux deux autres HEs, les CMI oscillent entre 19,52 et 39,05 µg/mL. En effet, de ces trois classes de composés que sont les isothiocyanates, les dérivés allylés et les sesquiterpènes tricycliques, les sesquiterpènes sont les plus hydrophobes. Ce caractère plus lipophile

faciliterait leur passage à travers la paroi et bicouche membranaire lipidique ; ce qui expliquerait l'entrée retardée et l'action de réduite l'isothiocyanate de benzyle mois lipophile. C'est la raison pour laquelle plus la concentration en *P. brazzeana* augmente plus la combinaison est active mais, plus il y a des sesquiterpènes plus l'activité de la combinaison diminue.

III.3.2. Conclusion partielle :

Au regard des résultats *in-vitro* du potentiel antimycobactérien des HEs sur la souche de référence H37Rv, des isolats IS53 et IS310, nous notons que :

- ✓ Toutes les HEs ont inhibé la croissance de *M. tuberculosis* avec des CMI allant de 4,88 µg/mL à 312,5 µg/mL.
- ✓ Les HEs les plus actives sont celles de *P. brazzeana* et de *D. gossweileri* qui ont présenté les CMI de 9,76µg/mL et 4,88µg/mL sur l'isolat IS310 résistant à la Rifampicine. L'activité la plus faible est celle d'*Echinops giganteus* dont les CMI sont de 156, 25 µg/mL et 312, 50 µg/mL.
- ✓ L'activité des combinaisons d'HEs est faible par rapport à celle des HEs testées individuellement car les interactions sont toutes antagonistes avec des CMI variant de 39,06 µg/mL à 156,25 µg/mL.
- ✓ L'HE de *P. brazzeana* a potentialisé celle de l'HE d'*Echinops giganteus* dans les combinaisons.

III.4. CIBLES CELLULAIRES DES HUILES ESSENTIELLES SUR *MYCOBACTERIUM tuberculosis*

III.4.1 Effets des huiles essentielles sur la paroi et la membrane des souches testées

Toutes les HEs montrent un effet sur la paroi et la membrane à partir de leurs CMI. Ces dommages sur la paroi et la membrane sont marqués par la libération des biomolécules (ADN, ARN et protéines) dans le milieu extracellulaire que l'on a quantifié par spectrophotométrie au NanoDrop 1000.

Les résultats obtenus sont présentés par les histogrammes des figures 18, 19, 20, 21, 22 et 23 qui mettent en évidence des grandes quantités de biomolécules intracellulaires libérées dans le milieu extracellulaire dès leurs CMI et qui se sont accentuées aux CMBs avec une différence significative ($P < 0,05$). Cette libération significative révèle que toutes les huiles essentielles ont rompu l'intégrité membranaire. En effet, les protéines, l'ADN et l'ARN

cellulaire sont détectés dans le milieu extra cellulaire pour les cellules traitées aux HEs à des concentrations allant respectivement de $67,4 \times 10^4$ ng/ μ L à $1650,2$ ng/ μ L pour les protéines, de 70 ng/ μ L à $506,1$ ng/ μ L et pour l'ADN et de $8,7$ ng/ μ L à $340,2$ ng/ μ L pour l'ARN. Chez les cellules traitées par l'Ofloxacin, ces molécules varient de $0,1 \times 10^4$ ng/ μ L à 1×10^4 ng/ μ L pour les protéines ; de 0 ng/ μ L à $0,3$ ng/ μ L pour l'ADN et de 0 ng/ μ L pour l'ARN alors que chez les cellules témoins non traitées, les quantités en biomolécules sont significativement faibles. Toutes les HEs ont montré un effet sur la membrane et la paroi à partir de leur CMI. Les protéines sont les plus libérées alors que l'ARN est la molécule la moins retrouvée dans le milieu extra cellulaire.

Les figures 18 et 19 ci-après représentent l'ensemble des histogrammes montrant la quantité de biomolécules (ADN, ARN et protéines) de la souche H37Rv libérée dans le milieu extracellulaire. En effet, pour la souche de référence H37Rv, la quantité d'ADN présent dans le milieu extracellulaire varie de $91,2$ ng/ μ L pour l'HE d'*A. sativum* à $366,7$ ng/ μ L pour l'HE d'*E. giganteus* tandis que celle d'ARN varie de $42,0$ ng/ μ L pour l'HE d'*A. sativum* à $194,7$ ng/ μ L pour l'HE d'*E. giganteus* et celle des protéines de $840,2 \times 10^4$ ng/ μ L pour l'HE d'*A. sativum* à 1063×10^4 ng/ μ L pour l'HE de *D. gossweileri*. Les quantités de biomolécules libérées aux CMI, sont significativement inférieures à celles des CMB.

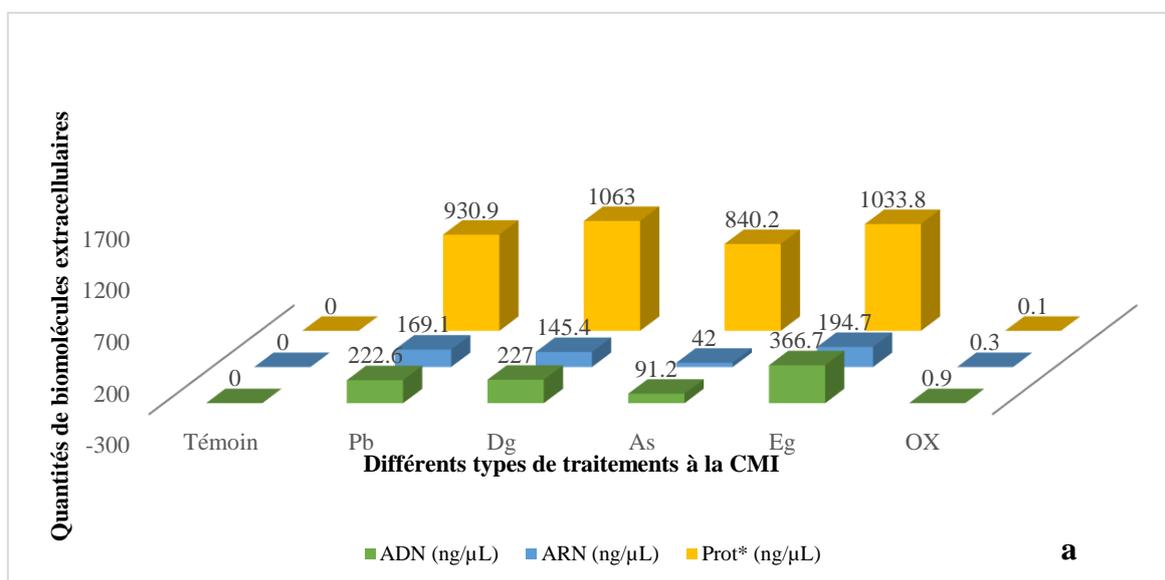


Figure 18: Quantités de biomolécules de la souche H37Rv libérées dans le milieu extracellulaire à la CMI.

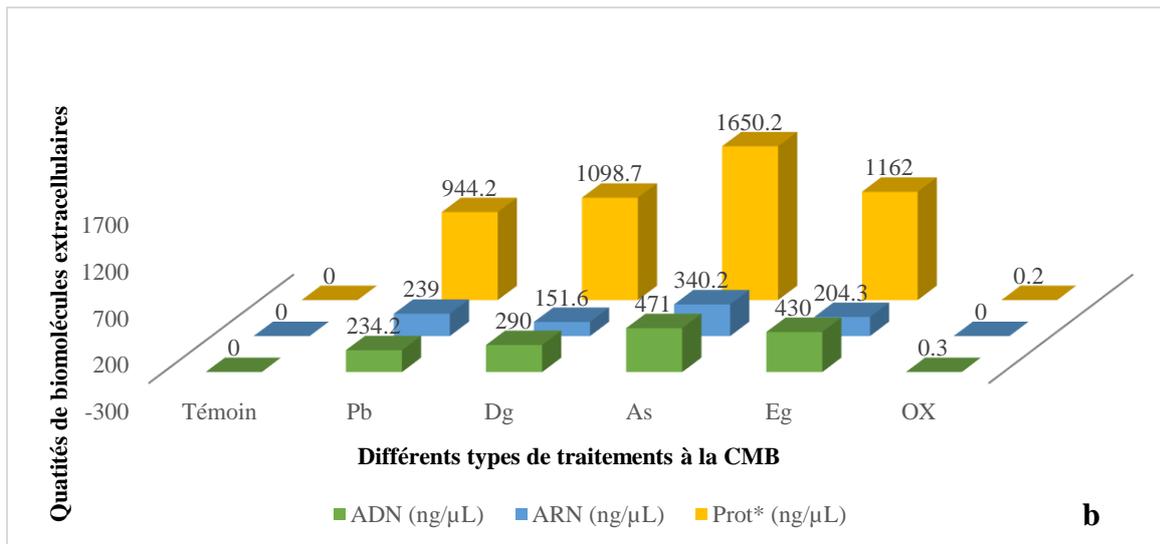


Figure 19: Quantités de biomolécules de la souche H37Rv libérées dans le milieu extracellulaire à la CMB.

Pour l'isolat IS 53, les histogrammes des figures 20 et 21 montrent que la quantité d'ADN varie de 117,5 ng/μL pour l'HE d'*E. giganteus* à 218,3 ng/μL pour l'HE de *D. gossweileri* alors que celle d'ARN varie de 67,3ng/μL pour l'HE de *P. brazzeana* à 96,5 ng/μL pour l'HE de *D. gossweileri* et celle des protéines de $389,3 \times 10^4$ ng/μL pour l'HE de *P. brazzeana* à $922,0 \times 10^4$ ng/μL pour l'HE de *D. gossweileri*.

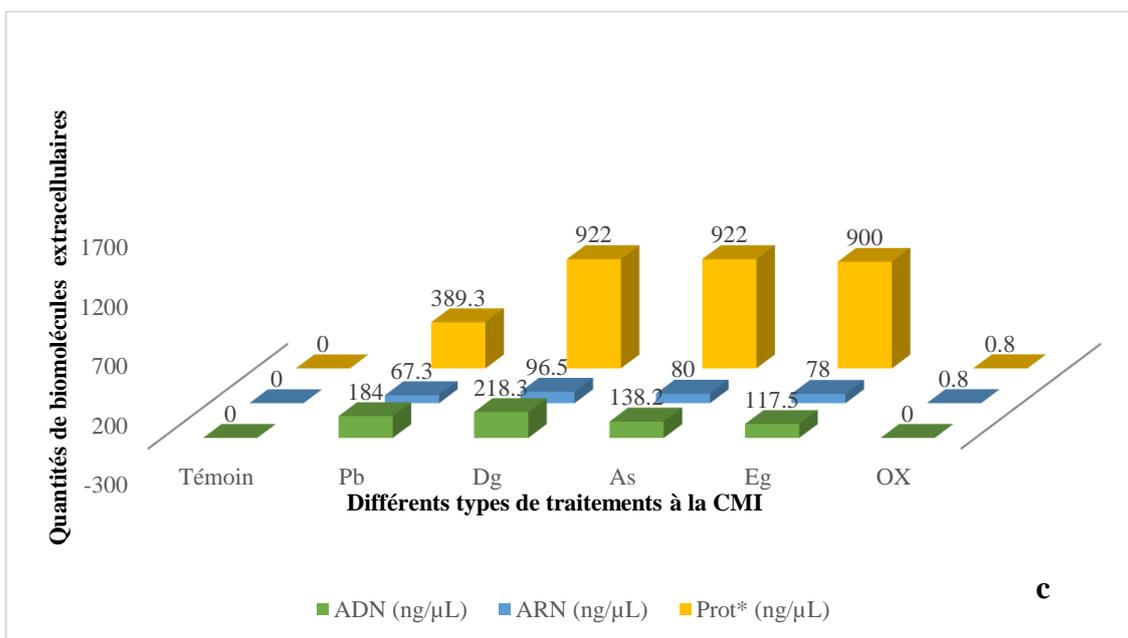


Figure 20: Quantités de biomolécules de l'isolat IS 53 libérées dans le milieu extracellulaire à la CMI.

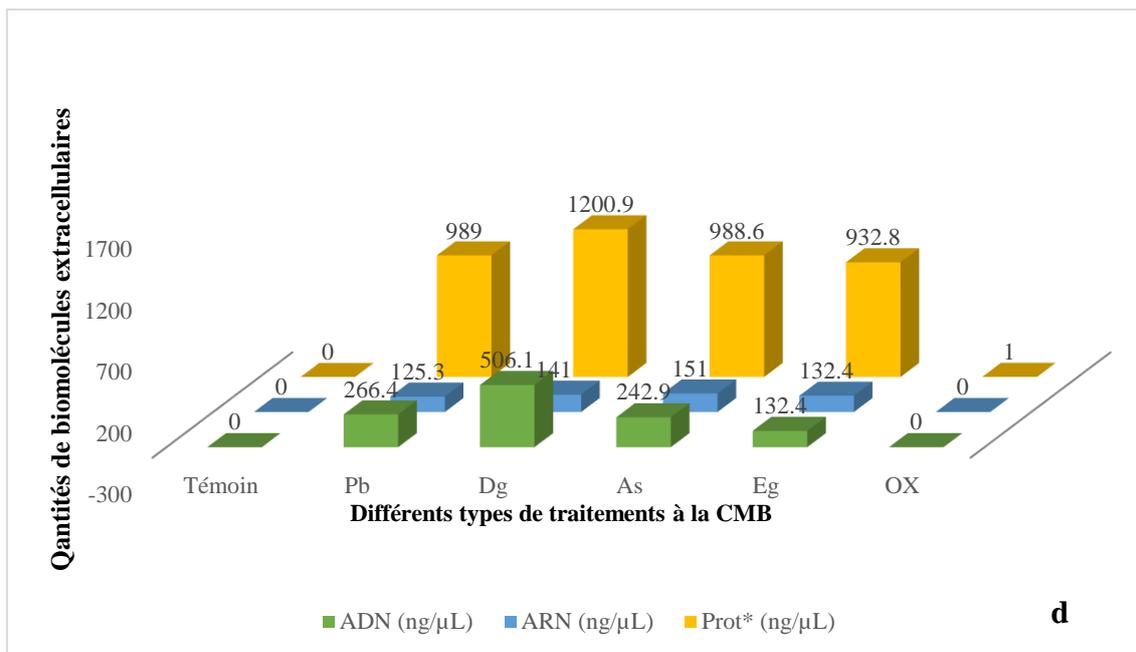


Figure 21: Quantités de biomolécules de l'isolat IS 53 libérées dans le milieu extracellulaire à la CMB.

D'après l'analyse des histogrammes de la figure 22 et 23 l'isolat IS 310 a libéré moins de biomolécules donc le plus résistant aux traitements aux HEs et à l'antibiotique, la quantité d'ADN varie de 89,9 ng/ à 476,3 ng/μL avec l'HE d'*A. sativum*, la quantité d'ARN de 36,5 ng/μL pour l'HE d'*A. sativum* à 334,7 ng/μL pour l'HE d'*E. giganteus* et la quantité de protéines de 125×10^4 ng/μL pour l'HE de *P. brazzeana* à $564,3 \times 10^4$ ng/μL pour *E. giganteus*.

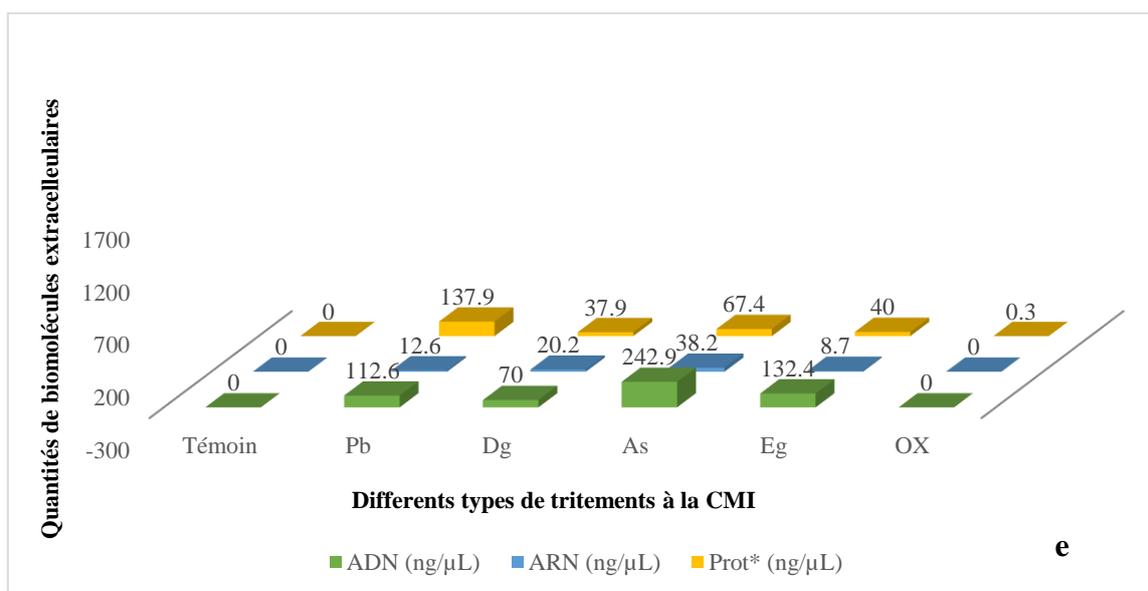


Figure 22: Quantités de biomolécules de l'isolat IS 310 libérées dans le milieu extracellulaire en fonction des différents traitements à la CMI.

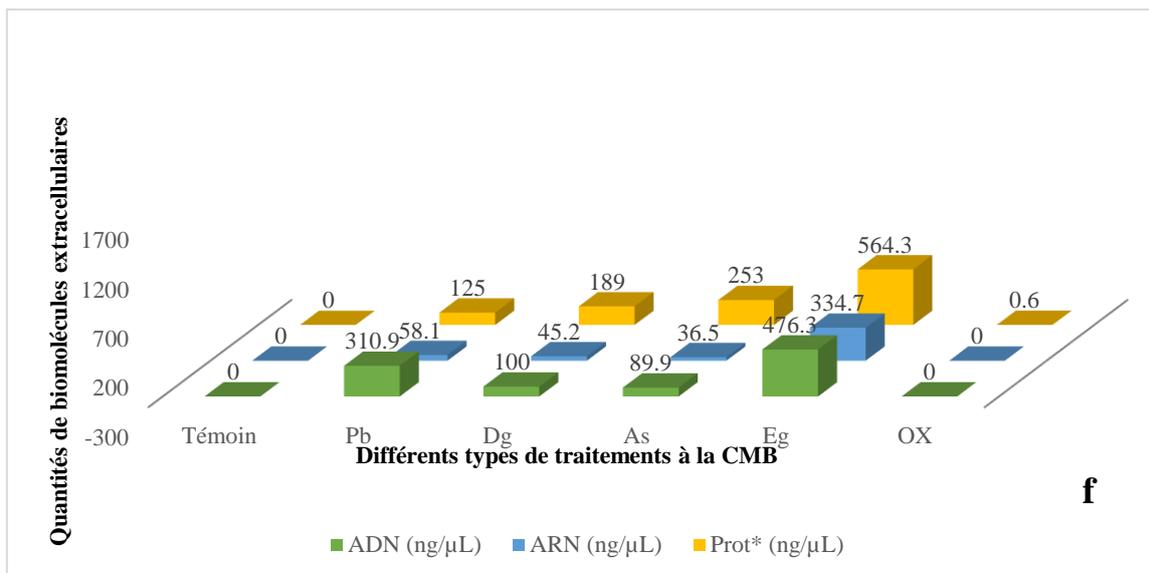


Figure 23: Quantités de biomolécules de l'isolat IS53 libérées dans le milieu extracellulaire en fonction des différents traitements à la CMB.

Légende : T (Témoin) ; Pb (Traitement à l'HE de *P. brazzeana*); Dg (*D. gossweileri*); As (*A. sativum*); Eg (*E. giganteus*); OX (ofloxacine); Prot* : protéines ; * les valeurs sont multipliées par 10^4

III.4.2. Effets des huiles essentielles sur l'ADN des souches testées

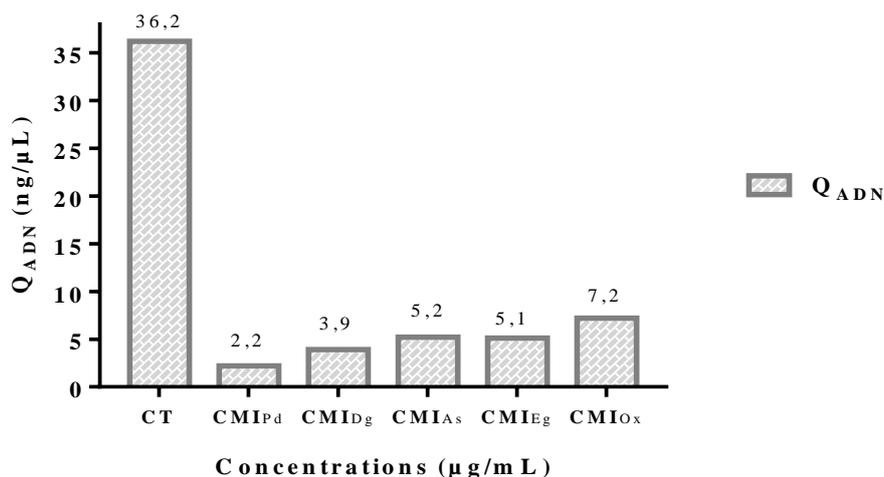
L'ADN total synthétisé par les cellules saines et celui synthétisé par les cellules traitées aux CMI et CMBs des HEs et Ofloxacine a été quantifié ; le résultat est consigné dans le tableau XIV. Il ressort de celui-ci que ces quantités d'ADN extraits des cellules n'ayant reçu aucun traitement sont plus élevées (22,10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sur IS53 à 40,00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sur IS310) que celles extraites des cellules ayant été traitées par les HEs et l'OX (2,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sur H37Rv à 7,78 $\text{ng}/\mu\text{L}$ sur IS310). Pour les cellules traitées aux HEs et à l'Ofloxacine, les quantités d'ADN extraites sont plus élevées aux CMI qu'aux CMB. Comparées à la concentration d'ADN des cellules issues du traitement à l'Ofloxacine, les concentrations en ADN des cellules traitées aux HEs sont plus élevées.

Tableau XIV: Concentrations d'ADN extrait des souches testées

Concentration	Type de traitement	H37Rv		IS 53		IS 310	
		ADN (ng/μL)	Pureté	ADN (ng/μL)	Pureté	ADN (ng/μL)	Pureté
Cellules saines (CS)	Aucun	36,20	1,80	22,10	1,81	40,00	1,80
CMI	Pb	2,20	1,84	4,70	1,80	6,20	2,00
	Dg	3,90	1,88	4,10	1,90	3,90	1,98
	As	5,20	1,90	4,60	1,80	3,51	1,80
	Eg	5,10	1,86	7,40	1,83	1,70	1,80
	OX	7,20	1,82	5,40	1,81	7,78	1,82
CMB	Pb	0,20	1,80	1,70	1,82	4,10	1,81
	Dg	0,50	1,81	0,70	1,86	5,01	1,87
	As	1,50	1,80	4,30	1,91	1,40	1,81
	Eg	2,20	2,00	3,60	1,89	1,30	1,91
	OX	2,10	1,80	1,10	1,80	6,98	1,85

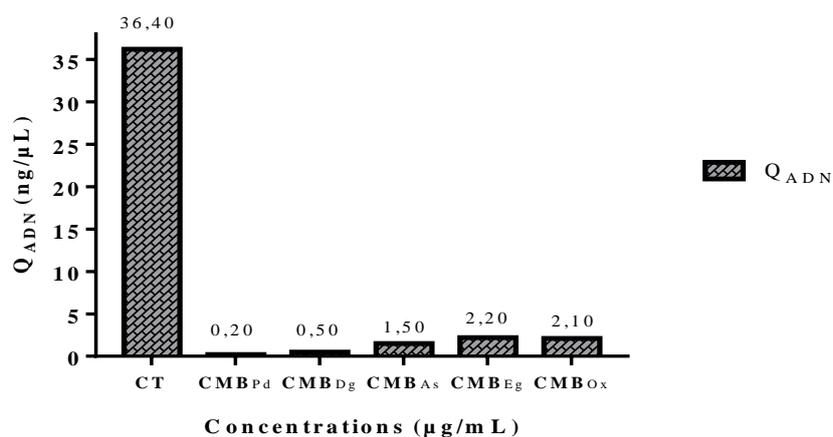
Légende : **Pb** : traitement à l'HE de *P. brazzeana* ; **Dg** : traitement à l'HE de *D. gosseweileri* ; **As** : traitement à l'HE de *A. sativum* ; **Eg** : traitement à l'HE d'*E. giganteus* ; **OX** : traitement à l'Ofloxacine.

Les quantités d'ADN synthétisées par les souches de référence H37Rv ou traitées aux HEs et Ofloxacine aux CMI et CMBs sont représentées par les histogrammes de figures 24 et 25. L'analyse de ces histogrammes montre qu'il y a eu plus d'ADN synthétisé par les cellules saines (36,2 ng/μL) que par les cellules traitées aux CMI (2,2 à 7,2 ng/μL) ou aux CMB (0,2 à 2,10 ng/μL) des HEs et Ofloxacine. Révétons cependant que les cellules traitées aux HEs de *P. brazzeana* et *D. gosseweileri* ont des quantités d'ADN les plus faibles. Dans l'ensemble, les quantités d'ADN plus faibles aux CMI qu'aux CMBs traduisent la relation dose-effet sur l'inhibition de la synthèse d'ADN.



Légende : **Pb** : traitement à l'HE de *P. brazzeana* ; **Dg** : traitement à l'HE de *D. gossweileri* ; **As** : traitement à l'HE de *A. sativum* ; **Eg** : traitement à l'HE d'*E. giganteus* ; **Ox** : traitement à l'Ofloxacin **CT** : cellules saines.

Figure 24: Quantité d'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en fonction des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles et de l'Ofloxacin testées.

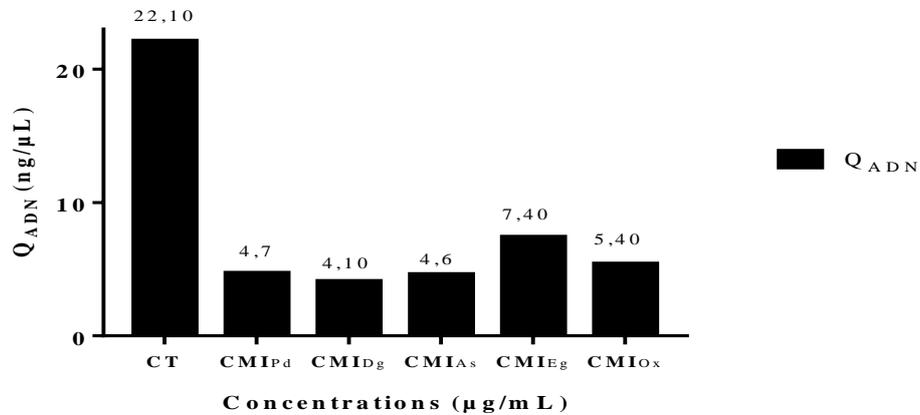


Légende : **Pb** : traitement à l'HE de *P. brazzeana* ; **Dg** : traitement à l'HE de *D. gossweileri* ; **As** : traitement à l'HE de *A. sativum* ; **Eg** : traitement à l'HE d'*E. giganteus* ; **Ox** : traitement à l'Ofloxacin **CT** : cellules saines.

Figure 25: Quantité d'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en fonction des concentrations minimales bactéricides (CMB) des huiles essentielles et de l'Ofloxacin testées.

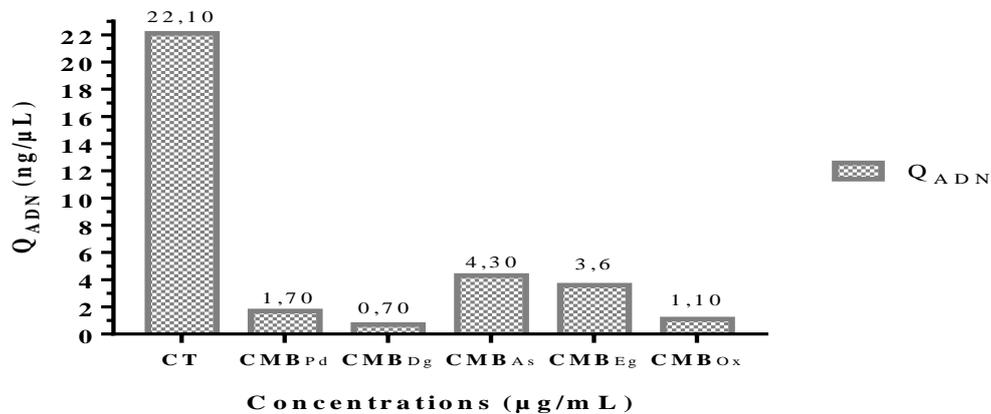
En ce qui concerne la quantité d'ADN synthétisée par les cellules IS53 elle est représentée par les figures 26 et 27. En général, elle est égale à 22,2 ng/μL chez les cellules saines mais, est plus élevée aux CMI avec des concentrations de 4,1 ng/μL avec l'HE de *D. gossweileri* à 7,4 ng/μL pour l'HE d'*E. giganteus* aux CMB avec les quantités d'ADN qui

varient entre 0,70 et 4,30 ng/μL. Cependant, ces quantités sont plus élevées que celles produites par la souche de référence.



Légende : **Pb** : traitement à l'HE de *P. brazzeana* ; **Dg** : traitement à l'HE de *D. gossweileri* ; **As** : traitement à l'HE de *A. sativum* ; **Eg** : traitement à l'HE d'*E. giganteus* ; **Ox** : traitement à l'Ofloxacine **CT** : cellules saines.

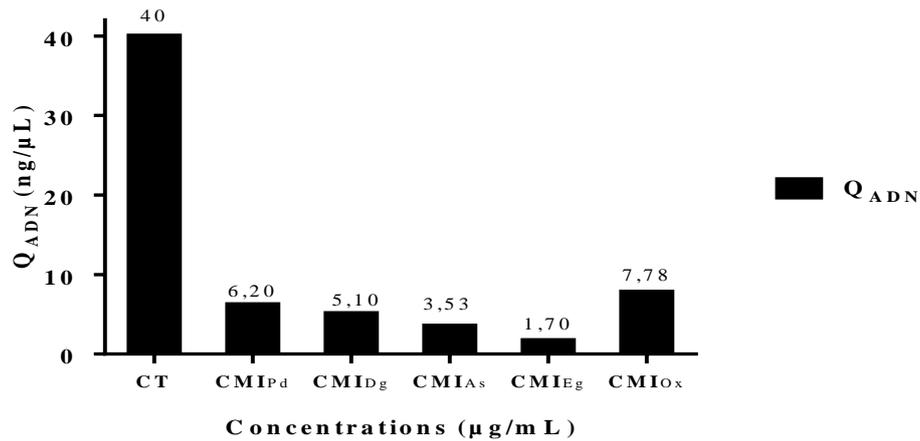
Figure 26: Quantité d'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* IS 53 en fonction des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles et de l'Ofloxacine



Légende : **Pb** : traitement à l'HE de *P. brazzeana* ; **Dg** : traitement à l'HE de *D. gossweileri* ; **As** : traitement à l'HE de *A. sativum* ; **Eg** : traitement à l'HE d'*E. giganteus* ; **Ox** : traitement à l'Ofloxacine **CT** : cellules saines.

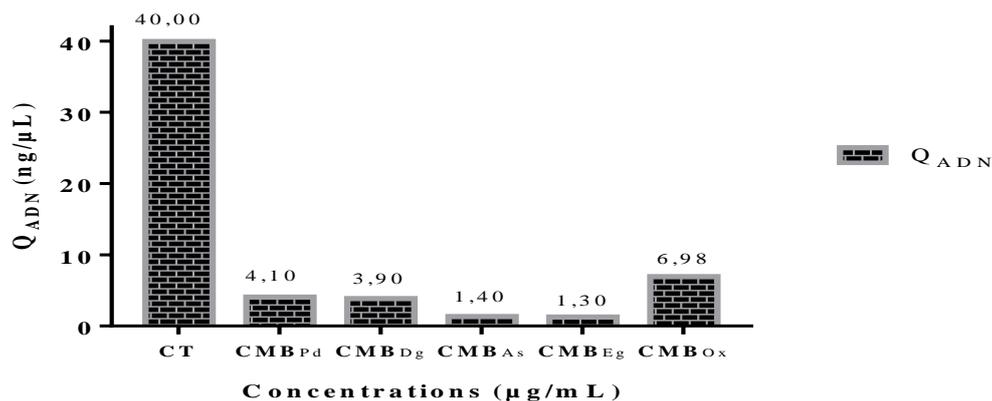
Figure 27: Quantité d'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* IS 53 en fonction des concentrations minimales bactéricides (CMB) des huiles essentielles et de l'Ofloxacine testées.

Les histogrammes des figures 28 et 29 traduisent la variation des quantités d'ADN synthétisées par les cellules IS 310. De l'analyse de ces histogrammes il en ressort que la synthèse d'ADN a été réduite pour les cellules traitées aux HEs et l'Ofloxacine de la même façon que celles de la souche H37Rv et l'IS 310. La seule différence est que les HEs ayant plus induit l'inhibition de la synthèse d'ADN sont celles d'*A. sativum* et *D'E. giganteus*.



Légende : Pb : traitement à l'HE de *P. brazzeana* ; Dg : traitement à l'HE de *D. gossweileri* ; As : traitement à l'HE de *A. sativum* ; Eg : traitement à l'HE d'*E. giganteus* ; Ox : traitement à l'Ofloxacine CT : cellules saines.

Figure 28: Quantité d'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* IS 310 en fonction des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles et de l'Ofloxacine testées.



Légende : Pb : traitement à l'HE de *P. brazzeana* ; Dg : traitement à l'HE de *D. gossweileri* ; As : traitement à l'HE de *A. sativum* ; Eg : traitement à l'HE d'*E. giganteus* ; Ox : traitement à l'Ofloxacine CT : cellules saines.

Figure 29: Quantité d'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* IS 310 en fonction des concentrations minimales bactéricides (CMB) des huiles essentielles et de l'Ofloxacine testées.

En ce qui concerne la mise en évidence de la synthèse ou l'inhibition du gène MIRU 04 par amplification, nous avons mesuré les concentrations en amplicons pour les cellules saines et les cellules traitées. Les résultats sont consignés dans le tableau XV ci-après. Ces résultats illustrent que la concentration en amplicons est plus élevée pour les cellules saines (954,20 μg/μL à 1000,00 μg/μL sur IS310) que pour les cellules traitées aux HEs et l'Ofloxacine (22,9 μg/μL sur H37Rv à 282,0 ng/μL sur H37Rv).

Tableau XV : Quantification d'ADN amplifiés des souches testées

Concentration	Type de traitement	H37Rv		IS53		IS310	
		ADN (ng/μL)	Pureté	ADN (ng/μL)	Pureté	ADN (ng/μL)	Pureté
Cellules saines	Aucun	954,20	1,80	977,00	1,81	1000,00	1,80
CMI	Pb	22,90	1,84	29,00	1,80	28,20	2,00
	Dg	70,00	1,88	20,00	1,90	26,90	1,98
	As	28,50	1,90	22,60	1,80	27,90	1,80
	Eg	32,50	1,86	37,40	1,83	20,00	1,80
	OX	282,00	1,82	189,00	1,81	162,50	1,82
CMB	Pb	11,10	1,80	7,70	1,82	7,20	1,81
	Dg	9,80	1,81	4,10	1,86	11,90	1,87
	As	6,90	1,80	5,60	1,91	4,90	1,81
	Eg	5,10	2,00	7,40	1,89	12,80	1,91
	OX	9,10	1,80	7,00	1,80	9,70	1,85

Légende : **Pb** : traitement à l'HE de *P. brazzeana* ; **Dg** : traitement à l'HE de *D. gossweileri* ; **As** : traitement à l'HE de *A. sativum* ; **Eg** : traitement à l'HE d'*E. giganteus* ; **OX** : traitement à l'Ofloxacine).

En effet, des quantités issues de l'amplification du gène MIRU 04 consignées dans le Tableau XV, nous avons calculé le pourcentage d'amplification du gène par rapport à celui des cellules saines de la souche de référence et les isolats IS 53 et IS 310. Le résultat est représenté par les histogrammes des figures 30 à 36. L'analyse des histogrammes montre que le pourcentage d'inhibition du gène MIRU 04 est plus faible lorsque l'on traite les cellules aux HEs et à l'Ofloxacine.

Des histogrammes des figures 30 et 31, il ressort que les cellules de la souche de référence traitées aux HEs ont moins synthétisé le gène MIRU 04 que les cellules saines. Cependant les quantités d'amplicons sont plus élevées pour les cellules exposées aux CMI (2,3 à 29,36 %) qu'aux CMB (0,54 à 1,16 %). La quantité d'amplicon étant proportionnelle à la concentration en ADN de départ, on peut alors dire que la synthèse d'ADN a été inhibée.

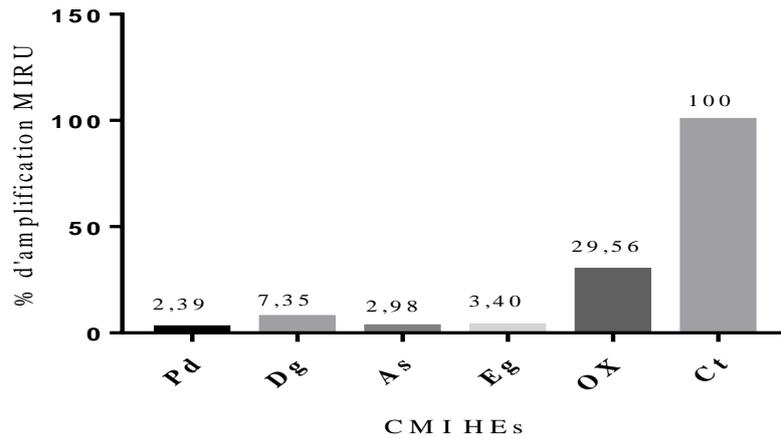


Figure 30: Pourcentage d'amplification du gène MIRU 04 de *M. tuberculosis* H37Rv en fonction des différents traitements en HEs aux CMI

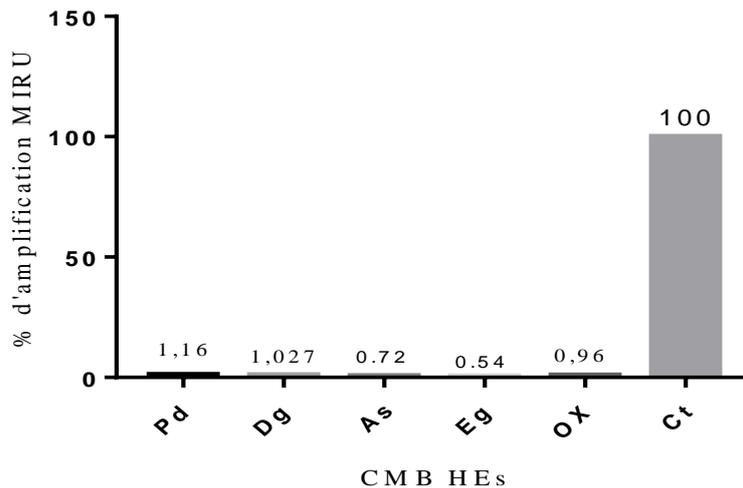


Figure 31: Pourcentage d'amplification du gène MIRU 04 de *M. tuberculosis* IS H37Rv en fonction des différents traitements en HEs aux CMBs

Les figures 32 et 33 représentent les pourcentages de synthèse du gène MIRU 04 par L'isolat IS 53 exposé aux HEs et à l'Ofloxacine. Ces figures montrent que tout comme la souche de référence, les pourcentages de synthèse du gène MIRU 04 sont faibles pour les cellules traitées aux HEs et l'Ofloxacine. Cependant, par rapport aux cellules exposées aux HEs de la souche de référence, les pourcentages de synthèse du gène MIRU 04 sont plus faibles

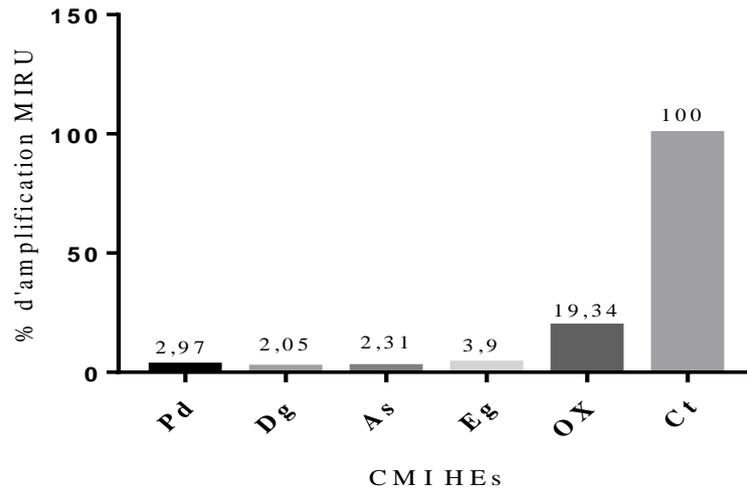


Figure 32: Pourcentage d'amplification du gène MIRU 04 de *M. tuberculosis* IS 53 en fonction des différents traitements en HES aux CMI

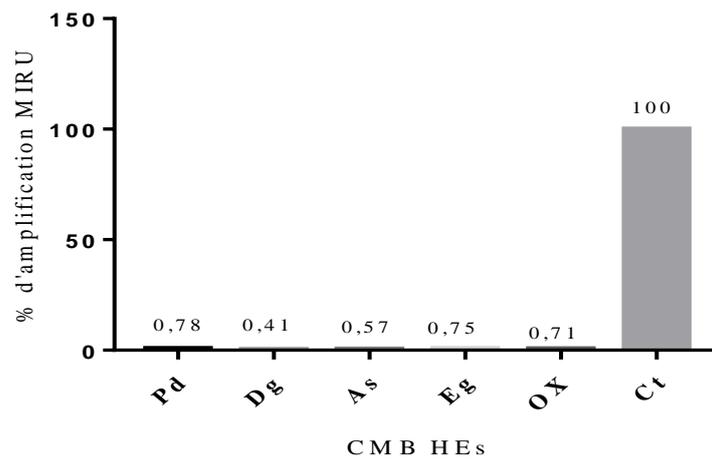


Figure 33: Pourcentage d'amplification du gène MIRU 04 de *M. tuberculosis* IS 53 en fonction des différents traitements en HES aux CMIBs

Les figures 34 et 35 représentent le pourcentage de synthèse du gène MIRU 04 par les cellules de l'isolat IS 310 aux CMI et aux CMB. Tout comme l'Isolat IS 53, la synthèse de ce gène est réduite par rapport aux cellules de la souche de référence mais plus encore que celles des cellules saines.

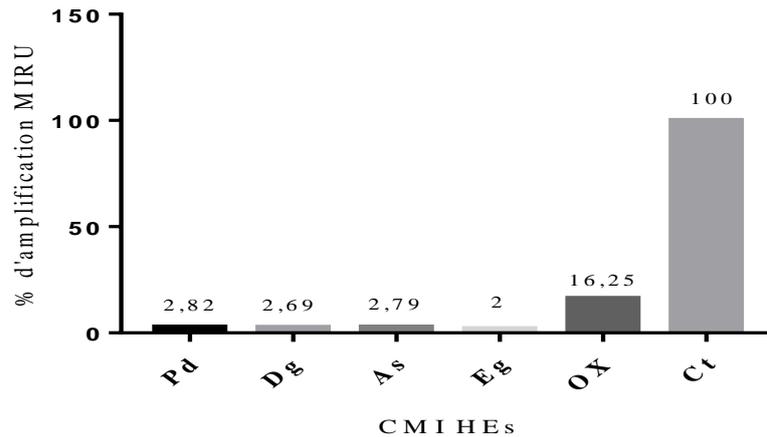


Figure 34: Pourcentage d'amplification du gène MIRU 04 de *M. tuberculosis* IS 310 en fonction des différents traitements en HES aux CMIs

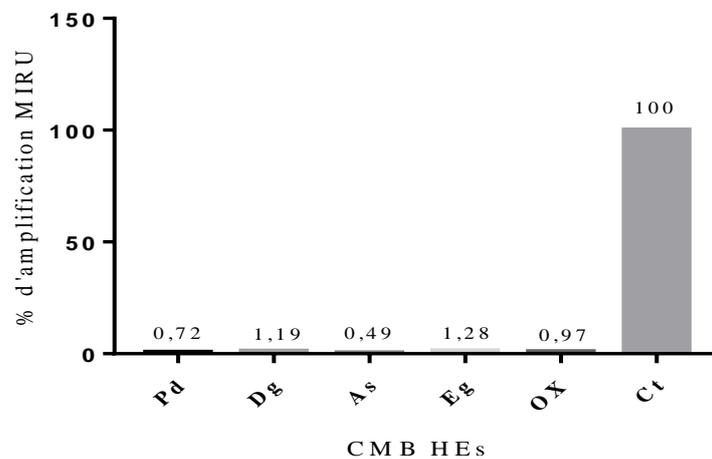
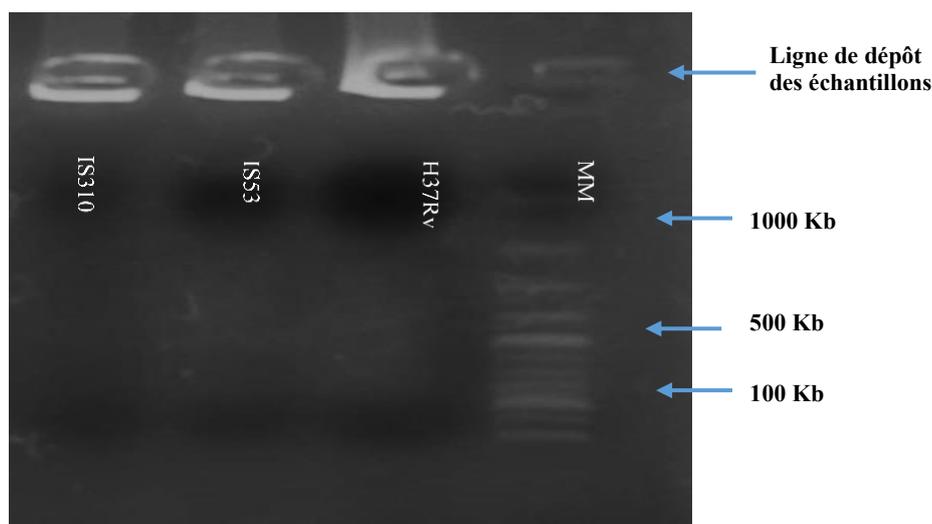


Figure 35: Pourcentage d'amplification du gène MIRU 04 de *M. tuberculosis* IS 310 en fonction des différents traitements en HES aux CMBs

Pour confirmer la mise en évidence des dommages sur la molécule d'ADN, nous avons visualisé le profil de migration sur gel d'Agarose pour les cellules saines et les cellules traitées aux HES. Celui des cellules saines (témoins) montre des bandes d'ADN de la souche de référence H37Rv et des deux isolats IS 53 ; IS 310 dans les puits de la ligne de dépôt des échantillons comme illustré par la photo 15. Cette présence de bande unique d'ADN reflète l'absence des dommages sur l'ADN alors que l'intensité de fluorescence est proportionnelle aux concentrations d'ADN soit 36, 20 ng/μL d'ADN pour la souche de référence ; 22,10 ng/μL pour IS53 et 40,00 ng/μL pour IS310.

ADN des cellules H37Rv, IS53 et IS310 non traitées aux H.E



MM = marqueur de poids moléculaire ; H37Rv, IS53 et IS310 = cellules non traitées

Photo 15: Profil gel d'agarose de l'ADN des cellules de *M. tuberculosis* non traitées aux HEs

La visualisation des bandes d'ADN et d'amplicons après traitements sur gel d'agarose a été mise en évidence par les photos 16 et 17. Une fois exposé aux CMI et aux CMBs des HEs et l'Ofloxacin, l'ADN extrait et non amplifié des cellules H37Rv traitées n'apparaît plus dans les puits de la ligne de dépôt et ne laisse apparaître aucune bande d'ADN fluorescente sur profil gel d'agarose comme l'illustre les images (b, b1) et (c, c1) de la photo 16. Pourtant le dosage au NanoDrop montre des quantités d'ADN plus faibles (2,10 ng/μL à 7,78 ng/μL) que celles des cellules saines (22,10 ng/μL à 36,20 ng/μL).

Néanmoins, la recherche du gène MIRU 04 après amplification de chaque ADN des cellules traitées aux CMI met en évidence la présence des amplicons de taille 462 paires de base pour les cellules de référence H37Rv n'ayant reçues aucun traitement. Ces amplicons du MIRU 04 de 462 pb sont aussi présents sur le profil d'ADN des cellules de la souche de référence H37Rv traitées aux CMI des HEs de *P. brazzeana*, *A. sativum*, *E. giganteus* et de l'OX révélant que ce gène n'a pas été totalement endommagé sous l'action des HEs aux CMI photo (b1). Par contre, une fois les souches traitées aux CMBs, la recherche des amplicons du gène MIRU 04 n'a révélé aucune bande d'ADN de 462 pb pour les cellules traitées avec les quatre HEs et avec l'OX montrant une action inhibitrice des HEs sur la portion de ce gène (c1). Cette action a été confirmée avec le dosage au NanoDrop des amplicons dont les quantités sont passées de la gamme de 20,00 ng/μL à 282,50 ng/μL aux CMI et de 4,10 ng/μL à 12,80 ng/μL aux CMBs.

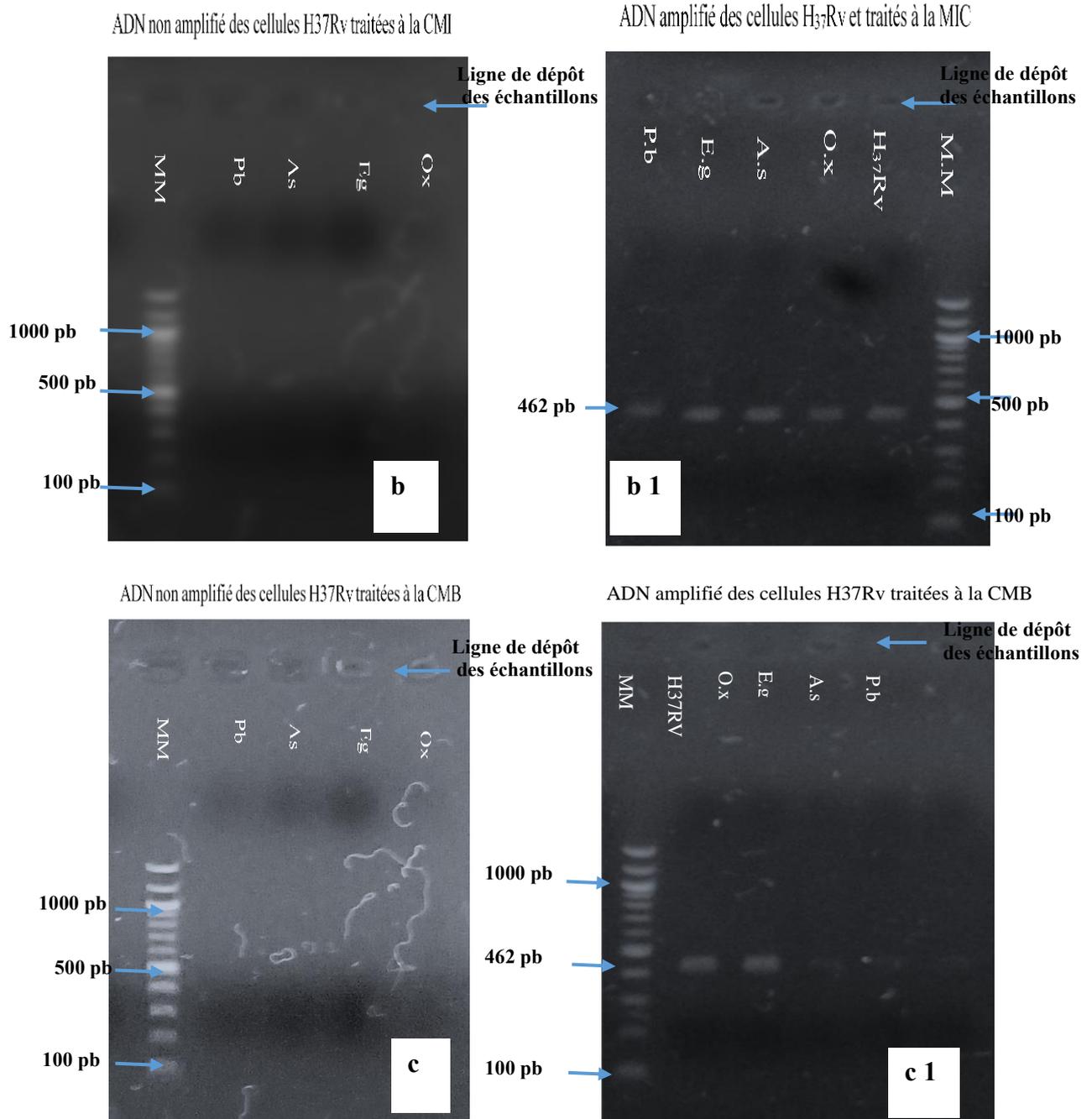
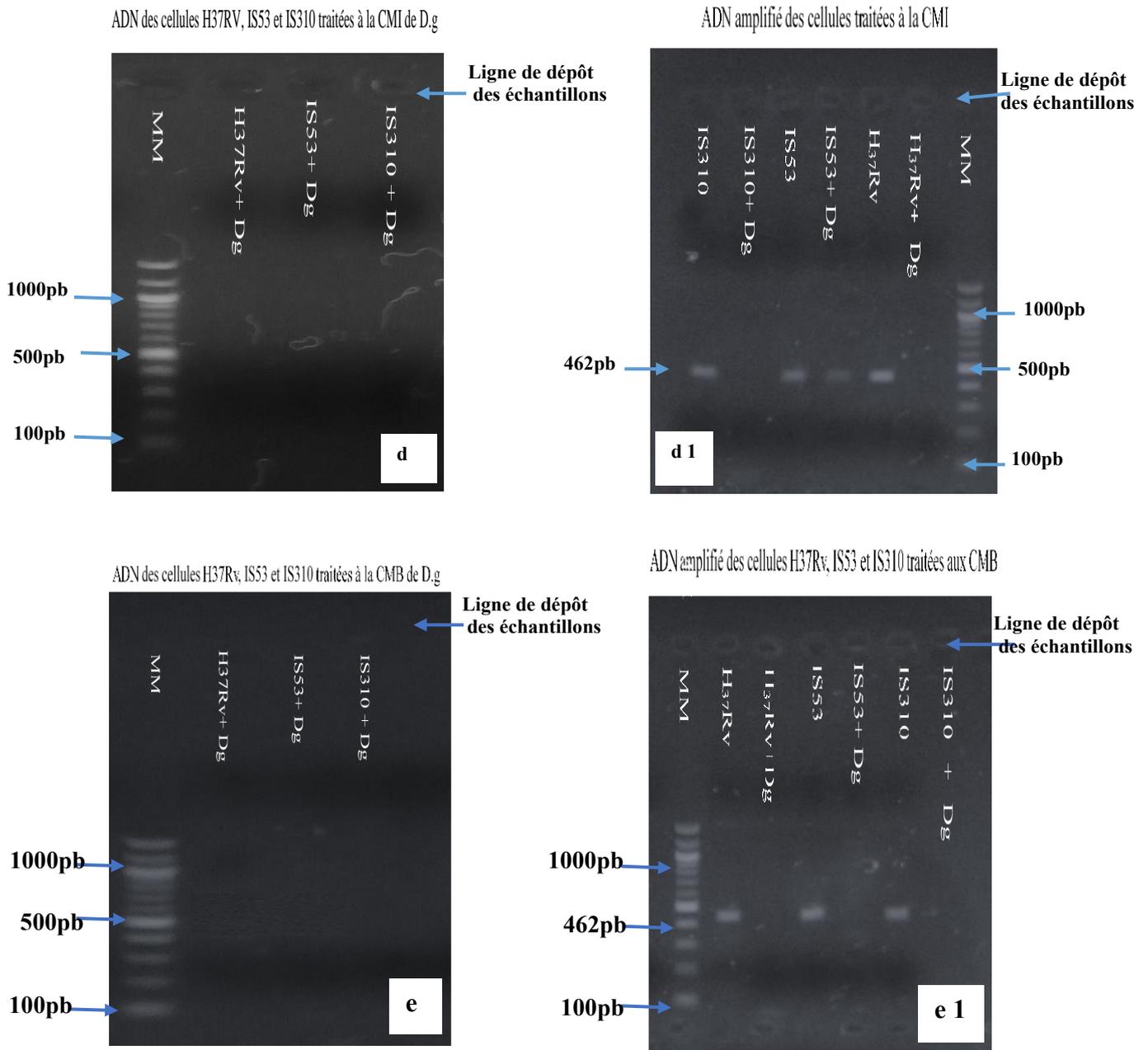


Photo 16: Profil gel d'agarose de l'ADN des cellules de *M. tuberculosis* traitée à la CMI (b et b1) et aux CMB (c et c1) des HEs *P. brazzeana*, *A. sativum*, *E. giganteus* et Ofloxacine

En ce qui concerne les résultats de l'HE de *D. gosseweileri* sur l'ADN de la souche de référence et les deux isolats cliniques, nous avons obtenu le même résultat que ceux des autres HEs sur la la souche H37RV. En effet, exposées aux CMI et aux CMBs de l'HE de *D. gosseweileri*, l'ADN extrait et non amplifié des cellules H37Rv, IS53 et IS 310 n'apparaît pas

dans les puits de la ligne de dépôt et ne laisse apparaître aucune bande d'ADN fluorescente sur profil gel d'agarose comme l'illustre les images (d, d1) et (e, e1) de la Photo 17. Pourtant la quantification au Nanodrop montre des quantités d'ADN plus faibles que celles des cellules saines variant de 3,9 à 4,10 ng/μL aux CMI et de 0,80 à 5,01 ng/μL aux CMB. Cependant, la recherche du gène MIRU 04 après amplification de cet ADN met en évidence la présence des amplicons du MIRU 04 d'une taille de 462 paires de base (06 répétitions du gène MIRU 04) pour les cellules de référence H37Rv, IS53 et IS310 n'ayant reçues aucun traitement et les cellules traitées aux CMI des HE de *D. gossweileri* révélant que ce gène n'a pas été totalement endommagé sous l'action des HE et l'OX à leurs CMI photo (b1). Mais une fois traitées aux CMB, la recherche des amplicons du gène MIRU 04 n'a révélé aucune bande d'ADN de 462 pb pour les cellules traitées l'HE montrant une action destructrice sur la portion de ce gène (c1). Cette action a été confirmée avec la quantification au Nanodrop des amplicons dont les quantités sont passées de la gamme 3,9 à 4,10 ng/μL aux CMI et de 0,80 à 5,01 ng/μL aux CMB.



MM = marqueur de poids moléculaire ; H37Rv +Dg, IS53 + Dg et IS310 + Dg = cellules traitées avec l'HE de *D. gossweileri*

Photo 17: Profil gel d'agarose de l'ADN des cellules de *M. tuberculosis* traitées à la CMI (d et d1) et aux CMB (e et e1) de *D. gossweileri*

III.4.3. Discussion partielle :

La recherche de l'efficacité des HEs de plante et la détermination des cibles cellulaires sont des défis majeurs pour la valorisation de l'aromathérapie. Si les études antérieures menées par **Ndoyé *et al.*, (2016)** ; **Voundi (2017)** et **Kamela (2017)** ont mis en évidence les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-germinatrice et antifongique des HEs des plantes étudiées, les résultats de ce travail montrent pour la toute première fois l'activité antimycobactérienne des HEs de *P. brazzeana*, *D. gosseweileri* et *E. giganteus*. Mais aussi ils révèlent les dommages causés par les HEs sur trois cibles cellulaires potentielles. Ces dommages rendent facile la compréhension du mécanisme mis en place pour inhiber la mycobactérie. Dans notre étude, nous avons observé une diminution de la rigidité de la paroi, une perte de la perméabilité membranaire et une inhibition de la synthèse et/ou d'une possible fragmentation de l'ADN.

La quantification des biomolécules au Nanodrop 1000 a permis la mise en évidence d'une quantité significative d'ADN, ARN et protéines dans le milieu extracellulaire des cellules traitées aux HEs comparées aux cellules saines ($P < 0,05$). Nous pouvons dire que les quatre HEs auraient fragilisé deux cibles : la paroi par diminution de sa rigidité et la membrane plasmique par perturbation de l'intégrité et échange membranaire. La membrane bactérienne constitue une barrière physiologique et de ce fait, joue un rôle dans la protection et le maintien de l'homéostasie cellulaire puisqu'elle contrôle l'entrée et la sortie de plusieurs substances. Cependant, la principale caractéristique des molécules présentes dans les HEs est leur hydrophobicité qui leurs confèrent la capacité de traverser la paroi lipidique riche en acide mycolique et à provoquer au niveau de la membrane cytoplasmique une perturbation du potentiel et une désorganisation des phospholipides qui s'accompagnent d'une perte d'ions, d'ATP, biomolécules intracellulaires et une perte de sa propriété sélective (**Lambert *et al.*, 2001** ; **Xu *et al.*, 2016**). Ce caractère lipophile des HEs les rend capables de s'accumuler entre les phospholipides, entraînant des changements de conformation et éventuellement un manque de régulation de la membrane cellulaire, ce qui perturbe ainsi le transport membranaire des substances nutritives (**Cox *et al.*, 2001**). Cette altération de la propriété sélective de la membrane due à la présence de substances antibactériennes peut conduire à la lyse complète et pourrait de ce fait être fatal pour la bactérie qui verra alors son métabolisme arrêté et son contenu cytoplasmique relargué dans le milieu extracellulaire. On peut penser que c'est ce qui explique la grande quantité de ces biomolécules dans le milieu extracellulaire pour les cellules traitées aux HEs par rapport aux cellules saines.

Lorsque la perte de matériel est trop importante, cela va entraîner une déformation morphologique du cytoplasme de la bactérie conduisant à sa mort par lyse cellulaire (**Guinoiseau, 2010**). Les composés des HEs tels que l' α -pinène et le limonène respectivement à 8 $\mu\text{g/mL}$ et 64 $\mu\text{g/mL}$ induisent des modifications morphologiques sur *Mycobacterium tuberculosis* ce qui entraîne la déstabilisation de sa paroi qui finit par inhiber sa croissance (**Sieniawka et al., 2015**). Par contre la quantité élevée de biomolécules (ADN, ARN et protéines) dans le milieu extracellulaire libérées par les cellules ayant été traitées aux CMBs des HEs par rapport à celles traitées à la CMI des HEs s'explique par le fait que les dommages cellulaires induits par les HEs sont proportionnels aux concentrations à tester. Ce scénario serait semblable à la relation dose-effet réponse en ce sens que l'activité est corrélée à la concentration active en HE. En effet **Rhayour (2002)** a montré que la libération du contenu cellulaire absorbant à 260 nm augmente progressivement en fonction de la concentration en HE ce qui se traduit par l'ampleur des dommages observés. **Xu et al. (2016)** ont aussi fait le même constat sur les cellules de *Staphylococcus aureus* avec l'HE du clou de girofle testée à 1/2x CMI ; 1xCMI et 2xCMI dont l'activité a conduit à une modification de la morphologie bactérienne suivie d'une lyse cellulaire seulement à partir de la CMI.

La résistance de l'isolat IS310 aux traitements HEs a été marquée par des quantités d'ADN, ARN et protéines significativement inférieures par rapport à celles de la souche de référence et celles de l'isolat IS53 sensibles à la Rifampicine. Cette résistance aux traitements proviendrait de son phénotype résistant à la Rifampicine marqué par une CMI équivalente à 125 $\mu\text{g/mL}$ soit 284 fois plus élevée que celle de la souche de référence et l'isolat IS53 (4,88 $\mu\text{g/mL}$).

Concernant l'évaluation de l'effet des HEs sur l'ADN, les résultats obtenus après extraction d'ADN nous montrent que les rapports de l'absorbance à 260 nm/280 nm sont compris entre 1,8 et 2,0 ce qui permet de conclure que les culots d'ADN total extraits obtenus sont purs. Ces quantités d'ADN total extraites des cellules saines sont supérieures à celles des cellules traitées aux CMI des HEs et l'OX. Ce résultat explique l'effet inhibiteur de la synthèse d'ADN induit par l'action des HEs et de l'OX. Sur la souche H37Rv n'ayant subi aucun traitement après 7 jours d'incubation, nous avons quantifié 36,20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ d'ADN alors que pour les souches exposées aux CMI des HEs, ces concentrations oscillent entre 2,20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ pour *P. brazzeana* et 7,20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ pour *E. giganteus* (Tableau XIV). Plus la concentration en HEs est élevée, plus les quantités d'ADN total des cellules traitées diminuent ; en effet, le passage des HEs à travers la bicouche lipidique a perturbé l'intégrité membranaire entraînant la perte d'une quantité acide nucléique conduisant à des dysfonctionnements dans la synthèse de l'ADN et

l'inhibition de la croissance cellulaire. Ces résultats renforcent aussi l'hypothèse selon laquelle après avoir traversées la membrane, les HEs ont interagi par le biais des réactions chimiques pour inhiber indirectement la synthèse d'ADN par inhibition enzymatique, ou directement par fragmentations de la molécule d'ADN. L'inhibition ou la fragmentation de l'ADN est confirmée après la quantification du gène MIRU 04 situé sur l'ADN extrait dont la concentration est de 954,20 ng/μL pour les cellules saines de H37Rv et entre 22,90 à 70,00 ng/μL pour ses cellules traitées aux CMI des HEs. Selon **Royet en 2012**, la fragmentation d'un gène spécifique sur l'ADN par un quelconque traitement physique ou chimique empêche la réaction d'amplification par PCR de se dérouler ce qui explique pourquoi les quantités d'amplicons du gène MIRU 04 chez les cellules traitées aux CMI et CMB des HEs sont plus faibles que celles des cellules saines.

Les résultats de l'électrophorèse sur gel d'Agarose permettent de visualiser les dommages induits par les HEs. Ces dommages peuvent se traduire par la présence de plusieurs fragments d'ADN de taille différentes et fluorescentes ou non sur le profil gel d'Agarose ou par l'absence des amplicons du gène MIRU 04 sur le profil. De l'analyse des résultats, nous avons révélé une fluorescence d'ADN total dans les puits pour les cellules n'ayant reçues aucun traitement, mais une absence de fluorescence pour les cellules ayant été traitées par les HEs et à l'OX. La fluorescence dans les puits de dépôts d'échantillon peut s'expliquer par le fait que l'ADN des cellules saines est resté intact (sans dommage) alors que celui des cellules traitées aux HEs a été inhibé voir fragmenté en fragments de petites tailles de faible concentration ne permettant d'apercevoir la fluorescence. En effet, ces fragments qui migrent rapidement peuvent traverser le gel car la vitesse de migration des fragments d'ADN est fonction de leur taille, les fragments de grandes tailles restent plus proche des puits et ceux de petites tailles s'éloignent plus des puits (**Sambrook et al., 1989**). Dans le même ordre d'idée, le dosage au NanoDrop a montré que les concentrations en ADN des cellules saines varient entre 40,0 ng/μL et 22,10 ng/μL alors que pour les cellules traitées elle varient entre 7,78 et 1,1 ng/μL ce qui permet d'expliquer pourquoi il n'y a pas de fluorescence sur le profil des cellules traitées.

L'absence d'ADN sur le profil gel agarose chez les cellules traitées aux CMI des HEs montre une inhibition de la réplication d'ADN mais l'absence de ces bandes après traitement aux CMB des HEs met en évidence une fragmentation de l'ADN total (Figures 16 b et c). Ce résultat est confirmé par la présence sur gel d'agarose des bandes d'amplicons du gène MIRU 04 de taille 462 pb qui révèlent absence des dommages sur ce gène après traitements des cellules H37Rv aux CMI des HEs et leurs absences après traitement aux CMB des HEs. On peut donc

dire ici que l'ADN total des cellules exposées aux CMBs des HEs n'a pas été amplifié à cause de l'absence du site de fixation des amorces du gène MIRU 04 suite à une fragmentation de l'ADN alors que celui des cellules saines ou traitées aux CMI est en bon état d'où l'a fixation des amorces et amplification du gène MIRU 04. Dans le même ordre d'idée, le dosage au NanoDrop a montré qu'aux CMI les concentrations en ADN varie entre 7,78 ng/μL et 2,20 ng/μL alors qu'aux CMBs elle varient entre 6,98 et 0,2 ng/μL ce qui permet d'expliquer pourquoi il n'y a pas de fluorescence sur le profil des cellules traitées. En outre, l'acide khusenique et le khusimol deux sesquiterpènes de l'HE de *Vetiveria zizanoides* inhibent la synthèse d'ADN des cellules mycobactériennes en se fixant sur deux sous unités de l'ADN gyrase pour empêcher la réplication (**Dwivedi et al., 2013**). Les travaux récents ont montré qu'après traitement aux concentrations de 1/2x CMI ; 1xCMI et 2xCMI en l'HE du clou de girofle, l'ADN de *Staphylococcus aureus* commence à subir une fragmentation à partir des CMI qui s'accroît aux CMBs (**Xu et al., 2016**).

La recherche du gène MIRU 04 a montré que les profils de migration des amplicons des cellules traitées aux CMI sont différents par rapport à celles traitées aux CMBs des HEs. Cette différence viendrait du fait que le gène MIRU 04 n'a pas été endommagé aux CMI des HEs et Ofloxacin mais aux CMB pour des HEs qui serait due à une absence d'amplification causée par la fragmentation de l'ADN matrice de l'amplification **Royet (2012)** et **Lorenz (2012)**. En effet l'Ofloxacin inhibe la synthèse de l'ADN à la CMI mais, cause plutôt une fragmentation de l'ADN à des concentrations élevées (CMB), résultat de l'inhibition de la croissance par bactéricidie (**Fillion et al., 2012**). L'inhibition de la synthèse d'ADN nous permet de conclure aussi sur leur action au niveau de l'inhibition de la synthèse de l'ARN et des protéines. En effet, l'inhibition de la synthèse d'ADN entraîne une inhibition de la transcription (synthèse de l'ARN) et une inhibition de la traduction (synthèse des protéines) (**Adolphe, 2006**).

Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les HEs, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs dommages induits sur différentes cibles cellulaires (**Guinoiseau, 2010**) ce qui est démontré dans ces résultats car toutes les HEs utilisées ont montré une action sur la paroi, sur la membrane et sur le matériel génétique (**Guinoiseau, 2010**). Selon **Carson et al., (2002)** le mode d'action des HEs dépend en premier lieu de la nature chimique et des interactions des composants actifs que comporte celle-ci. Néanmoins si toutes les HEs ont présenté un même mécanisme sur l'inhibition de la croissance de *M. tuberculosis*, cela n'a pas été le cas de l'Ofloxacin dont la quantification des molécules dans le milieu extracellulaire était comparable à celle des cellules saines mais dont

l'effet sur l'ADN est similaire à celui des HEs. En ce qui concerne la mise en place du mécanisme de l'inhibition de *M. tuberculosis* peut le scénario suivant être émit : les HEs ont traversé la paroi mycobactérienne grâce à leurs propriétés lipophiles puis, elles ont induit au niveau de la bicouche lipidique une perturbation de la perméabilité membranaire qui aurait entraîné une perte de biomolécules conduisant à la perturbation de la perméabilité membranaire et le relargage d'ADN, l'ARN et protéines intracellulaire dans le milieu extracellulaire aux CMI. Ce relargage de biomolécules étant proportionnel aux dommages sur la membrane, l'inhibition de sa fonction de barrière sélective qui en résulte aurait aussi conduit à la lyse bactérienne aux CMBs. L'exposition de l'ADN aux HEs après lyse bactérienne a entraîné une inhibition de sa synthèse aux CMI celle-ci matérialisée par une baisse en concentration d'ADN après extraction et amplification ce qui est confirmé par l'absence des bandes d'ADN et des sites de fixation des amorces empêchant la formation des amplicons du gène MIRU 04 aux CMBs.

Plusieurs molécules présentes dans les HEs ont des interactions avec les biomolécules des cellules microbiennes. Pour les plantes de *P. brazzeana* et *D. gossweileri* leurs HEs ont montré une action sur la paroi, la membrane et sur l'ADN de *M. tuberculosis*. Plusieurs études ont montré que les produits issus de la dégradation des glucosinolates tel que les isothiocyanates agissent par le biais de dommages membranaires et par l'inhibition d'enzymes cytoplasmiques pour conduire à un dérèglement de la synthèse d'acide nucléique et des protéines (**Adolphe, 2006**). La fixation de l'hypothiocyanite entraîne une modification du gradient de pH et une fuite d'ions potassium et d'acides aminés. Il en résulte une perturbation des activités cellulaires faisant intervenir des protéines, une inhibition de la chaîne respiratoire et un dérèglement de la synthèse d'ADN et d'ARN et l'inhibition de la synthèse des protéines (**Adolphe, 2006**). En effet, les isothiocyanates sont connus pour avoir un effet antimicrobien élevé dû à leur groupement R-N=C=S. L'atome de carbone central fortement électrophile dispose d'une grande réactivité avec les centres nucléophiles (thiols, -NH₂ et -OH). A cet effet, il peut facilement cliver les liaisons disulfures des protéines, attaquer les acides aminés libres et inhiber les enzymes par les liaisons oxydatives (**Wilson, 2011 ; Hyldgaard et al., 2012**).

En ce qui concerne l'HE d'*A. sativum*, l'allicine qui est le composé allylé présent dans *A. sativum* est interconverti en dérivés sulfides stables tels que le trisulfure de 2-méthylpropyle, le sulfure de méthyle, le sulfure de diallyle, le disulfure de diallyle et le trisulfure de diallyle. Ces composés entraînent l'inhibition de la synthèse de l'ADN des protéines et une inhibition immédiate et totale de la synthèse de l'ARN des bactéries (**Miron et al., 1999**). L'action sur la

membrane et la paroi des composés allylés n'est pas clairement élucidée. Selon **Miron et al. (1999)**, ces composés pénètrent librement à travers la bicouche de phospholipides membranaires des microorganismes et interagissent avec les groupes SH des biomolécules. L'effet de l'HE d'*A. sativum* sur la membrane et la paroi des mycobactéries pourrai s'expliquer par la présence d'autres composés qui pourraient avoir des effets sur la membrane.

L'HE d'*E. giganteus* comme toutes les autres a également montré une action sur la membrane, sur la paroi et sur l'ADN. L'analyse de sa composition chimique a montré qu'elle était majoritairement constituée de sesquiterpènes. Selon **Cowan**, les sesquiterpènes perturberaient la structure membranaire des microorganismes à travers leurs composants lipophiles (**Cowan, 1999**) ce qui est démontré dans notre étude. **Sülsen, (2016)** a montré qu'ils entraînent une induction de la mort cellulaire par apoptose sur le protozoaire *Trypanosoma cruzi*. Différents effets permettent d'observer et de quantifier des phénomènes spécifiques de l'apoptose telles que la perturbation de l'intégrité de la membrane plasmique, une diminution du potentiel membranaire des mitochondries et une fragmentation de l'ADN des cellules de *Trypanosoma cruzi* (**Sülsen et al., 2016**).

III.4.4. Conclusion partielle

La mise en évidence des dommages cellulaires a permis de justifier leur effet antimycobactérien et d'identifier leurs cibles cellulaires sur *M. tuberculosis*. A l'issue de cette partie, nous pouvons retenir que :

- ✓ Toutes les HEs induisent les mêmes dommages sur la cellule de *Mycobacterium tuberculosis*. L'action des HEs a permis d'identifier trois cibles cellulaires.
- ✓ Les HEs entraînent la lyse de la membrane plasmique ce qui a favorisé la rupture de la paroi bactérienne.
- ✓ Les HEs ont induisent l'inhibition de la synthèse de l'ADN de la souche de référence H37Rv aux CMI et fragmentent aux CMBs.

III.5 DISCUSSION GENERALE :

La tuberculose est une maladie endémique dont la prévalence dans les pays africains est très élevée, elle est la troisième cause de morbidité et de mortalité (OMS, 2018). L'utilisation abusive et anarchique de la chimiothérapie pour le traitement de la tuberculose a fait surgir de nouvelles souches multi et ultra résistantes aux traitements suscitant une recherche permanente de nouvelles molécules thérapeutiques plus efficaces et les HEs des plantes se sont avérées être une alternative intéressante (A Boire *et al.*, 2013 ; OMS, 2018). La médecine traditionnelle est le traitement de premier choix pour au moins 80 % des africains qui souffrent des maladies courantes. Elle est aussi, considérée comme le patrimoine socioculturel existant depuis plusieurs générations et perpétué jusqu'à nos jours (Elujoba *et al.*, 2005). Plusieurs études ethnobotaniques, et ethnopharmacologiques sur les plantes utilisées pour le traitement des maladies affectant les voies respiratoires ont été menées mais, peu ont été répertoriées celles utilisées dans le traitement de la tuberculose (Focho *et al.*, 2009 ; Dibong *et al.*, 2011 ; Mpondo *et al.*, 2017). Le présent travail qui recense douze espèces végétales utilisées dans le traitement de la tuberculose est l'un des premiers qui apporte un plus d'informations sur l'utilisation des plantes médicinales dans les deux localités du Département du Nkam où l'enquête a été menée. La démarche utilisée dans cette thèse vise à utiliser les connaissances de la pharmacopée traditionnelle à travers l'enquête ethnobotanique menée et un gain de temps dans le processus de recherche des principes actifs et de développement d'un médicament.

La recherche des HEs ou d'extrait de plantes est donc d'actualité vu l'incidence des résistances aux antibiotiques et la mortalité causée par les infections bactériennes. L'essor de l'aromathérapie dans les filières pharmaceutiques a montré que les HEs peuvent être utilisées comme complémentaires ou alternatives aux médicaments conventionnels (Kaloustian et Hadji-minaglou 2012 ; Horváth et Ács, 2015 ; Papparoupa et Gillissen, 2016). En effet dès leurs extractions du matériel végétal, les HEs peuvent être directement utilisées comme médicament d'où l'intérêt de déterminer toujours leur composition chimique après extraction. Aussi, le mode de prescription ou d'utilisation des HEs généralement fait en aromathérapie sous forme de combinaison d'HEs contribue à la recherche des effets synergiques sur leurs activités biologiques et leurs caractères organoleptiques (Kaloustian et Hadji-minaglou 2012 ; Horváth et Ács, 2015). Autant donc dire que la présence d'isothiocyanates de benzyle, des dérivés allylés et des sesquiterpènes tricycliques dans les HEs de *D. gossweileri*, *P. brazzeana*, *A. sativum* et *E. giganteus* a diversifié encore plus les propriétés biologiques des combinaisons réalisées (Menuet *et al.*, 1997 ; Ndoyé *et al.*, 2016 ; Nyegue *et al.*, 2018). Cette diversité

structurale des composés chimiques des HEs fait d'elles un outil efficace dans la recherche des médicaments que ce soit en les utilisant seuls ou en association avec d'autres dans le traitement des maladies comme c'est le cas réalisé dans ce travail (**Kuete et al., 2013**).

Les résultats de l'activité antimycobactérienne ont montré que les HEs *D. gossweileri*, *P. brazzeana* présentent de fortes activités à des concentrations de 4,88 µg/mL et 9,76 µg/mL sur les souches testées. Ce résultat est d'autant plus intéressant car aucune étude antimycobactérienne de ces HEs n'a été démontrée au paravent. De plus, les propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes de ces HEs montrent qu'elles peuvent piéger les radicaux libres formés et inhiber l'inflammation des tissus induite par *Mycobacterium tuberculosis* au cours du processus infectieux (**Ndoyé et al., 2016**). Au regard, des multiples autres activités antibactériennes et fongiques que présentent les HEs testées, on peut affirmer que contrairement aux antituberculeux conventionnels elles peuvent traiter plusieurs maladies en une seule prise ce qui justifie leurs usages en pharmacopée pour le traitement de diverses maladies dans les localités où l'enquête a été menée (**Adjélé, 2011 ; Kurepina et al., 2013**).

Les antibiotiques exercent l'inhibent la croissance bactérienne en agissant à trois niveaux : au niveau de la paroi ou la membrane, au niveau de la synthèse des acides nucléiques et les protéines. Par contre l'un des critères clés de l'efficacité de HEs est leur complexité en molécules bioactives qui leur confèrent un mécanisme d'action beaucoup plus diversifié que celui des molécules d'antibiotiques. Cette complexité en molécules bioactives est le facteur qui explique leurs capacités à agir chacune sur une cible différente comme c'est le cas des polythérapie d'antibiotiques (**Tawari et al., 2009**). L'action antibactérienne de l'HE dépend à la fois des composés majoritaires, des effets synergiques et/ou additifs et des composés mineurs qui y sont présents (**Mourey et al., 2002**). Par ailleurs, peu de travaux ont été réalisés sur l'activité antimycobactérienne des HEs des plantes médicinales et la plupart de ces résultats sont restés figés sur les tests révélant la présence ou l'absence d'un effet antibactérien sans aborder le mode d'action par lequel elles exerceraient leur effet bactéricide ou bactériostatique. Les résultats de cette étude font partir des premières mettant en exergue l'activité des HEs des plantes locales utilisées pour le traitement de la tuberculose d'une part mais aussi d'autre part d'avoir une idée du mécanisme d'action par lequel elles exercent l'activité antibactérienne. Toutes les HEs ont entraîné une libération significative des acides nucléiques et protéines dans le milieu extracellulaire justifiant la fragilisation de la paroi ou la perte de l'intégrité membranaire conduisant à la lyse mycobactérienne à cause de leurs caractères lipophiles qui les rendent capables de pénétrer dans la paroi lipidique et la double couche phospholipidique

puis d'attaquer la molécule d'ADN. Une fois que les HEs ont traversé la membrane, elles ont interagi par le biais des réactions chimiques directement en fragmentant la molécule d'ADN ce qui explique l'absence du gène MIRU 04 pour les cellules traitées aux CMB des HEs ou indirectement en inhibant le processus biochimique (inhibition enzymatique) qui conduit à sa synthèse d'où l'absence des bandes d'amplicons du MIRU 04 sur gel d'agarose pour les cellules traitées. L'ensemble de ces effets inhibiteurs sur la cellule mycobactérienne montre un mécanisme d'action diversifié des HEs et leurs nombreuses autres activités biologiques font des HEs de *D. gossweileri* et *P. brazzeana* des potentiels candidats médicaments contre la tuberculose si les tests de cytotoxicité révèlent leurs innocuités aux doses thérapeutiques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION :

La tuberculose est un problème majeur de santé publique dans les pays en développement et surtout dans les zones tropicales. La lutte antituberculeuse implique l'utilisation des antituberculeux de référence dont l'action inhibitrice fait face aux phénomènes de résistance et multirésistance qui montrent la nécessité de rechercher des alternatives thérapeutiques dans le traitement de cette maladie. Nous avons au cours de ce travail évalué les propriétés antimycobactériennes et identifié trois cibles cellulaires qui justifient l'inhibition de *Mycobacterium tuberculosis* par les HEs de quelques espèces végétales utilisées pour le traitement de la tuberculose dans deux localités du NKAM. Il ressort que :

- Les tradipraticiens de Yabassi et Nkondjock interviewés utilisent les plantes médicinales pour le traitement de la tuberculose. Des 14 interviews réalisées dans deux localités du Nkam, il en ressort que 12 plantes sont utilisées dans le traitement de la tuberculose. La majorité étant utilisée en association avec au moins une autre pour le traitement de la tuberculose excepté *P. brazzeanna*, *D. gossweileri*, *A. sativum* et *E. giganteus*.
- Les dérivés d'isothiocyanates sont présents dans les HEs de *P. brazzeanna* et *D. gossweileri*, les dérivés allylés dans celle d'*A. sativum* et sesquiterpènes tricycliques dans celle *E. giganteus*. Les combinaisons ont permis d'associer ces différentes classes de composés chimiques des HEs.
- Toutes les HEs ont présenté des propriétés antimycobactériennes mais les plus actives sont celles de *P. brazzeanna* et *D. gossweileri*. Contrairement aux HEs, les combinaisons sont moins actives car leurs interactions sont toutes antagonistes à l'action des HEs testées individuellement. Ces propriétés proviennent du mélange complexe en composés antimicrobiens contenu dans les HEs.
- Toutes les HEs des plantes testées agissent à la fois sur la paroi bactérienne, la membrane cytoplasmique et enfin l'ADN de *M. tuberculosis* importants pour sa survie et sa multiplication.

PERSPECTIVES :

Les résultats de ce travail révèlent que les HEs pourraient constituer des preuves d'une possible alternative aux antituberculeux de référence notamment en cas d'échec thérapeutique. Une motivation de plus pour étendre la recherche vers des perspectives visant à formuler un phytomédicament à base d'HEs des plantes testées qui pourra être utilisé dans le traitement de la tuberculose. En effet, si les HEs montrent une activité antimycobactérienne effective notamment en agissant sur trois cibles cellulaires de *M. tuberculosis*, nous envisageons par la suite,

- ✓ Evaluer *in vitro* la toxicité des HEs de *P. brazzeanna* et *D. gossweileri* sur les cellules rénales, hépatiques et pulmonaires et ensuite *in vivo* sur un modèle animal.
- ✓ Evaluer l'activité antituberculeuse *in vivo* des HEs sur un modèle animal.
- ✓ Formuler un phytomédicament à base d'HE *P. brazzeanna* et *D. gossweileri* pour le traitement de la tuberculose.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A Boire N., Riedel S., Parrish N.M. Essential Oils and Future Antibiotics: New Weapons against Emerging 'Superbugs'? *Journal of Ancient Diseases and Preventive Remedies*, 1: 105 (2013).

Abbruzzese M.R., Delaha E.C., Garagusi V.F. Absence of antimycobacterial synergism between garlic extract and antituberculosis drugs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 8 (2) : 79-85 (1987).

Abdou B.A., Njintang Y.N., Scher J., Mbofung C.M.F. Phenolic compounds and radical scavenging potential of twenty Cameroonian spices. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1: 213–224 (2010).

Adams R.P. Identification of essential oils by Gas Chromatography Quadrupole Mass Spectroscopy. 4th Edition *Allured Publishing Corporation Carol Stream* (2012).

Adjei A.A. A review of the pharmacology and clinical activity of new chemotherapy agents for the treatment of colorectal cancer. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 48 : 265-277 (1999).

Adjélé E.W. Recherche d'isothiocyanates à intérêt fonctionnel et technologique chez les Brassicacées. Thèse en Chimie Analytique de l'Université de Strasbourg, France (2011).

Adolphe Y. Etude du fonctionnement du système lactoperoxydasique et validation de son effet inhibiteur vis-à-vis de la flore du poisson. Thèse de Doctorat Université de Lorraine, France (2006).

AFNOR (Association Française de la Norme). Huiles essentielles, Echantillonnage. *Normes internationales NF ISO 2212 du 20 mai NFT 75 A* (2007).

AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé). Recommandations relatives aux critères de qualités des huiles essentielles (2008). <http://www.afssaps.santé.fr>. Consulté le 24 Juillet 2015.

Agnaniet H., Agrebi A., Bikanga R., Makani T., Lebibi J., Casabianca H., Morère A., Menut C : Essential oil of *Plectranthus tenuicaulis* leaves from Gabon, source of (R), (E)-6,7-Epoxyocimène. An unusual chemical composition within the Genus *Plectranthus*. *Natural Product Communication*, 6(3): 409-416 (2011).

Agnaniet H., Mounzeo H., Menut C., Bessière J., M Criton M. The essential oil of *Rinorea subintegrifolia* O. Ktze and *Drypetes gossweileri* S. Moore occurring in Gabon. *Flavour Fragrance Journal*, 18, 207 - 210 (2003).

Ait-Khaled N., Enarson D.A., T.B.I. Stop. Tuberculose : manuel pour les étudiants en médecine (1999). https://tbrieder.org/publications/books_french/students_fr.pdf. Consulté le 17 Mai 2017 à 9h 16.

Alianni N., Kalpotzakis E., Mitaku S., Chinou I.B. Composition and anti microbial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 4168-4170 (2001).

Anochie P.I., Ndingkokhar B., Bueno J., Anyiam E.F., OssaiChidi L.N., Onyeneke C.E. Onyeozirila A.C. African medicinal plants that can control or cure Tuberculosis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Developmental Research*, 4 (1) : 1-8 (2018).

Arpino P., Prévot A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. In : Masson (eds), Paris (1995).

Assam A.J.P. Etude de la résistance et de la diversité génomique dans le cas de la tuberculose pulmonaire au Cameroun : Région du centre, Ouest, Sud, et Est. Thèse de Doctorat Ph.D en Biochimie ; Université de Yaoundé I (2012).

Azevedo N.R., Campos I.F., Fereira H.D., Prtes T.A., Santos S.C., Seraphin J.C., Paula J.R., Ferri P.H. Chemical variability in the essential oil of *Hyptis Suaveolens*. *Phytochemistry*, 57: 733 -736 (2001).

Babii C, Mihalache G, Bahrin L.G, Neagu A-N, Gostin I, Mihai C.T., Sarbu L-G, Birsa L.M., Stefan M. A novel synthetic flavonoid with potent antibacterial properties: In vitro activity and proposed mode of action. *PLoS ONE*, 13 (4) (2018).

Babii C., Bahrin L.G., Neagu A.N., Gostin I., Mihasan M., BirsaL. M., Stefan M. Antibacterial activity and proposed action mechanism of a new class of synthetic tricyclic flavonoids. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072, (2015).

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446– 475 (2008).

Banerjee A., Dubnau E., Quemard Annaik., Balasubramanian V., Um K.S., Theresa Wilson T., Collins D., de Lisle G., William R., Jacobs J. InhA, a gene encoding a target for

isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 263 (5144): 227-230, (1994).

Barbosa W. L. R., Soares do Nascimento M., Lucianna do Nascimento P., Costa Maia F. L., Sousa A. J. A., Silva J. O. C. Jr, Monteiro M. M. and Ribeiro de Oliveira D., Chapter 1: Selecting medicinal plants for development of phytomedicine and use in primary health care; in bioactive compounds in phytomedicine, Edited by Iraj Rasooli, Published by Intech, Janeza Tradine 9, 51000 Rijeka, Croatia, ISBN 978-953307-805-812 (2011).

Bassler BL Small talk: cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*, 109: 421-424 (2002).

Batish D.R, Singh H.P., Kaur S., Kohli R.K. Phytotoxicity of *Ageratum conyzoides* residues towards growth and nodulation of *Cicer arietinum*. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 113: 399-401. (2006).

Baysal A.H., Molva C., Unluturk S. UV-C light inactivation and modeling kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in white grape and apple juices. *International Journal of Food Microbiology*, 166: 494-498 (2013).

Beggs., C.B., Noakes C.J., Sleight P.A., Fletcher L.A., Siddiqi K. The transmission of tuberculosis in confined spaces: an analytical review of alternative epidemiological models. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*, 7: 1015-1026 (2003).

BenArfa A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters of Applied Microbiology*, 43: 149 - 154. (2006).

Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D, McAllister T.A., Beauchemin K.A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science Technology*, 145: 209-228 (2008).

Benkeblia N, Lanzotti V. Allium thiosulfinates: chemistry, biological properties and their potential utilization in food preservation. *Food*, 1 (2):193–201 (2007).

Betti J.L. Medicinal plants sold in Yaoundé markets, Cameroon. *African Study Monographs*, 23 (2): 47-64, 2004.

Bijnsdorp I.V., Comijn E.M., Padron J. M., Gmeiner W. H., Peters G.J. Mechanisms of action of FdUMP[10]: metabolite activation and thymidylate synthase inhibition. *Oncology Reports*, 18: 287-291 (2007).

Blakemore R., Story E., Helb D., Kop J., Banada P., Owens M.R., Chakravorty S., Jones M., Alland D. 2010. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *Journal of clinical microbiology* 48: 2495-2501 (2010).

Bonard F. Complexe of mycobacterium tuberculosis and responsables agents of tuberculosis. *Infectious disease*, 23 : 34-41 (2000).

Bloom B.R., Small P.M. The evolving relation between humans and *Mycobacterium tuberculosis*. *New England Journal of Medicine*, 338 (10) : 677-678 (1998).

Bonfiglio G., Funeri P.M. Novel streptogramin antibiotics. *Expert Opinion Investigation Drugs*, 10: 185-198 (2001).

Bouhdid S., Abrini J., Zhuri A., Espuny M.J., Manresa A. Investigation of Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1558–1568 (2009).

Bouyahya A., Bakri Y., Et-Touys A., Talbaoui A., Khouchlaa A., Charfi S., Abrini J., Dakka N. Resistance to Antibiotics and Mechanisms of Action of Essential Oils against Bacteria. *Phytothérapie*, 1-11 (2017).

Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} Edition Tec et Doc. Lavoisier, Paris 406-426 (1999).

Bueno J. Antitubercular *in vitro* drug discovery: tools for begin the search, understanding tuberculosis - New approaches to fighting against drug resistance. *Dr. Pere-Joan Cardona (Ed.)*, pp 1-23. ISBN: 978-953-307-948-6 (2012).

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- A review. *International Journal of Food Microbiology*, 9: 223-253 (2004).

Burt S.A, Vlieland R., Haagsman H.P., Veldhuizen E.J.A. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* 0157:H7 by addition of food stabilizer. *Journal of Food protection*, 68: 919-927 (2005).

Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Amsterdam, *Academic Press*, (2003).

Cai Y., Wang R., An M.M. Iron-depletion prevents biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through twitching motility and *quorum sensing*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 37-41 (2010).

Caillet S., Lacroix M. Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69 : 2961–2969 (2006).

Caillet S., Lacroix M. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. *INRS-Institut Armand-Frappier, (RESALA)*, Canada. P :1- 8 (2007).

Carson C. F., Rilley T.V., Bosque F. Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 264-269 (2002).

Casella S., Leonardi M., Melai B., Fratini F., Pistelli L. The Role of Diallyl Sulfides and Dipropyl Sulfides in the in vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Garlic, *Allium sativum* L, and Leek, *Allium porrum* L. *Phytothera pies Responses*, 27 (1): 380-383 (2012).

Catia D., Alessia F., Andrea G. The potential role of garlic (*Allium sativum*) against the multi-drug resistant tuberculosis pandemic: a review. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 47 (4): 465-473 (2011).

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae* and other aerobic actinomycetes. Approved-second edition M24-A2, Wayn (2011).

Colditz G. A., Brewer T. F., Berkey C. S., Wilson M. E., Burdick E., Fineberg H. V., Mosteller F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 271: 698-702 (1994).

Colditz G.A., Brewer T.F., Berkey C.S., Wilson M.E., E. Burdick E., H.V. Fineberg H.V., Mosteller F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. *Jama*, 271: 698-702 (1994).

Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E., Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth

T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S., Barrell B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393 (6685): 537-544 (1998).

Corbett E.L., Churchyard G.J., Clayton T., Herselman P., Williams B., Hayes R., Mulder D., DeCock K.M. Risk factors for pulmonary mycobacterial disease in South African gold miners: a case control study. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 159 (1): 94-99 (1999).

Cowan M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564-582 (1999).

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, 91 : 492-499 (2001).

Cox SD., Gustafson JE., Mann C.M., Markham J.L., Liew Y.C., Hartland R.P., Bell H.C., Warmington J.R., Wyllie S.G. Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Letters of Applied Microbiology*, 26: 355–358 (1998).

CVUC (Commune et Ville Unies du Cameroun). <http://cvuc-uccc.com/national/index.php/fr/carte-communale/region-de-lextreme-nord?view=category&id=141>. Consulté le 15 Janvier à 11h 10 (2019).

Daffe M., Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in microbial physiology*, 39: 131-203 (1998).

Davies J. Antibiotic resistance in mycobacteria. In: Genetics and Tuberculosis. D. J. Chadwick., G. Cardew (eds). Chichester: John Wiley, 195-208 (1998).

De Nicola G.R., Nyegue M.A., Montaut S., Iori R., Menut C., Tatibouet A., Rollin P., Ndoyé C. et Amvam Z.H. Profile and quantification of glucosinolates in *Pentadiplandra brazzeana* Baillon. *Phytochem*, 73(1) : 51-56 (2012).

Deracinois B. Analyse protéomique différentielle des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique : identification de protéines induites par les cellules gliales. Thèse de doctorat, université d'Artois, France (2012).

Deschaseaux : Epidémiologie moléculaire de la tuberculose : études des souches de *Mycobacterium tuberculosis* par la technique IS6110-RFLP (10)105. Thèse de doctorat, université Henri Poincaré, France (2005).

Desjardins., Conklin P. D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*, 45, (2010).

Di Pasqua R., Betts G., Hoskins N., Edwards M., Ercolini D., Mauriello G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55: 4863-4870 (2007).

Di Pasqua R., Mamone G., Ferranti P., Ercolini D., Mauriello G. Changes in the proteome of *Salmonella enteric* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics*, 10 :1040–1049 (2010).

Dibong S.D., Mpondo M.E., Ngoye A., Kwin N.F., Betti J.L. Ethnobotanique et phytomédecines des plantesmédicales vendues sur les mmarchés de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 37 : 2496-2507 (2011).

Djibo A.K. Analyse des huiles essentielles de quelques plantes de la flore du Burkina Fasso appartenant aux familles des Lamycees et des Poaceae. Thèse doctorat université d’Auvergne, France. (2000).

Dos Santos J.R. et Fleurentin J. L’ethnopharmacologie, une approche pluridisciplinaire dans Ethnopharmacologie : sources, méthodes, objectifs. Actes du 1er Colloque Européen d’Ethnopharmacologie, Metz, 22-25 mai. Ed. ORSTOM : 26-39 (1990).

Dounias E. *Pentadiplandra brazzeana* Baill. In: Schmelzer, G.H., Gurib-Fakim, A. (Editors). Prota 11(1): Medicinal plants/Plantes médicinales 1. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen (2008).

Dwivedi G.R., Shikha G., Sudeep R., Komal K., Anirban P., Jay P.T., Dharmendra S., Ashok S., Nandan S., Mahendra P.D., Santosh K.S. Tricyclic Sesquiterpenes From *Vetiveria zizanoides* (L.) Nash as Antimycobacterial Agents. *Chemical and Biology Drug Design*, 82: 587–594 (2013).

Elujoba E.R., Kelbessa E., Hail Y. An ethnobotanical study of medicinal plants in Mana Angetu Disrict, Southeastern Ethiopia. *Journal of Ethnobiology and ethnomedicine* 4: 23-30 (2005).

El-Tablawy S.Y., Araby E. Impact of Marjoram (*Origanum marjorana* L.) Essential Oil on Some Virulence Factors and DNA Integrity of Multidrug Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 12 (3): 63-71 (2017).

Etoudi CB, Kuate D, Ngondi JL, Oben J. Anti-amylase anti-lypase and antioxidant effects of aqueous extracts of some cameroonian spices. *Journal of Natural Products*, 3: 41-43 (2010).

Eyéélé M.C., Menut C., Bessière J.M., Lamaty G., Nzé Ekekang L., Denamganai J. Aromatic Plants of Tropical Central Africa: Benzyl isothiocyanate as major constituent of bark essential oil of *Drypetes gossweileri* S. Moore. *Journal of Essential Oil Response*, 9: 367-370 (1997).

Faleiro M.L. The mode of antibacterial action of essential oils. In: Méndez-Vilas A (ed) Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. *Ed Brown Walker Press*, Boca Raton FL USA, pp 1143–1156 (2011).

FARE : Fonds des Affections Respiratoires Diagnostic et traitement de la tuberculose : manuel pratique, recommandations destinées au corps médical. *FARES asbl*, pp 13-25 (2010).

Fauchère J.L., Avril J.L. Bactériologie générale et médicale. Eds *Ellipses* ; rue Bargue 75740 Paris cedex 15. 165p. (2009).

Fillion A., Pantel A., Veziris N., Aubry A. Fluoroquinolone and drug-resistant tuberculosis. *La Lettre de l'Infectiologue* Tome XXVII - n° 1. P 20-23 (2012).

Flannagan R. S., G. Cosio., S. Grinstein., Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature reviews Microbiology*, 7 : 355 (2009).

Fleurentin J., Balansard G. L'intérêt de l'ethnopharmacologie dans le domaine des plantes médicinales. *Médecine Tropicale*, 62: 23-28 (2002).

Focho D. A, Nkeng E. A. P, Fonge B. A, Fongod A. N, Muh C. N, Ndam T. W., Afegenui A. Diversity of plants used to treat respiratory diseases in Tubah, northwest region, Cameroon. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3 (11) : 573-580 (2009).

Franchomme P., Jallois R., Penoel D. Aromathérapie exactement (Encyclopédie de l'utilisateur thérapeutique des extraits aromatique). Eds *Roger Jollois*, 21-74; 190-245; 347-434 (2011).

Gangadharam, P. R., Droubi A. J. Identification of mycobacteria by smear examination of the culture. *Tubercle*, 62 : 123-127 (1981).

Garnier, T., Eiglmeier K., Camus J.C., Medina N., Mansoor H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayes R., Keating L., Wheeler P.R., Parkhill J., Barrell B.G., Cole S.T., Gordon S.V. Gomez-Reino J.J., Carmona L., Valverde V.R., Mola E.M., Montero M.D. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active surveillance report. *Arthritis and Rheumatology*, 48 (8): 2122-2127 (2003).

Gahbiche D.A. Medication errors: the importance of safe dispensing. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 7 : 34-39 (2006).

Gill A.O., Holley R.A. Disruption of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Lactobacillus sakei cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 1-9 (2006).

Gillissen A., Th. Wittig., M. Ehmen H., Krezdorn G de Mey C. A multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial on the efficacy and tolerability of GeloMyrtol® forte in acute bronchitis. *Drug Development. Research*, 63:19-27 (2013).

Golden M.P., Vikram H.R.: Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *American Family Physician* 72 : 1761-1768 (2005).

Goupi E.R. Extra-pulmonary tuberculosis infections: an overview aspect of disease. *Journal of Respiratory Disease*, 11: 34-40 (2007).

Guinoiseau E. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat, université de Corse, France (2010).

Harshey, R. M., Ramakrishnan T. Rate of ribonucleic acid chain growth in Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Journal of Bacteriology*, 129: 616-622 (1977).

Hasan N., Yusuf N., Toossi Z., Islam N. Suppression of Mycobacterium tuberculosis induced reactive oxygen species (ROS) and TNF- α mRNA expression in human monocytes by allicin. *FEBS Letters*, 580 : 2517-22 (2006).

Helb, D., Jones M., Story E., Boehme C., Wallace E., Ho K., Kop J., Owens M.R., Rodgers R., Banada P. 2010. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin

resistance by use of on-demand, near-patient technology. *Journal of clinical microbiology*, 48: 229-237 (2010).

Hellal Z. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus* : Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Diplôme de Magister en Sciences Alimentaires, Université Mouloud Mameri de Tizi-ouzou, Algerie (2011).

Hend A.H. Monitoring of Antimicrobial Activity of Essential Oils Using Molecular Markers. *The Open Biotechnology Journal*, 3: 103-107 (2009).

Hill V. Phylogéographie mondiale des bacilles tuberculeux : contribution des outils moléculaires et bioinformatiques, et caractérisation des lignées génotypiques pour des études épidémiologiques et phylogénétiques. Thèse de doctorat, université des Antilles et de la Guyane, France (2012).

Hillemann D., Rüsç-Gerdes S., E. Richter. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 47 ; 1767-1772 (2009).

Hindlet P., Lemaitre F. Les antituberculeux. *Médicaments tome 3* : 944-960 (2013).

Hopewell P.C. et Jasmer R.M. Overview of clinical tuberculosis. In: Tuberculosis and the tubercle bacillus. In Cole S.T., Eisenach K.D., McMurray D.N., Jacobs W. R. *Eds Washington*, D.C: ASM Press, 15-31, (2005).

Horváth G., Ács K. Essential oil in the traitement of respiratory tract diseases highlighting their role in bacterial infections and their anti-inflammatory action: Review. *Flavour Fragrance Journal*, 30: 331–334 (2015).

Huard R.C., Lazzarini L.C.O., Butler W.R., Van S.D., Ho J.L. PCR-Based method for differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *Journal of clinical microbiology*, 41(4): 1637-1650 (2003).

Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3: 1-12 (2012).

IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) : Principe de l'amplification par PCR. <http://www.bibliomer.com/>. Consulté le 25 mai 2017 à 16 h 35 (2009).

Ilumbe S. Contribution à l'étude des plantes medicinales dans les traitements des hémorroïdes par les pygmés Twa et leurs voisins Oto de Bikoro en RDC *Journal of ethnopharmacology*, 12 : 23-27 (2010).

Igoli J.O., Tor-ananyi T.A., Usman S.S, Oluma H.O.A., Igoli N.P. Folk medicine of Igbu Benue Valley of Nigeria. In *Recent progress in medicinal plants*. Vol 7 eds VK Singh JN Govil S., Hoashm Shigh G. 327-338. Science and technic publication USA 23:327-338 (2005).

INSC (Institut National de la Statistique Cameroun). Annuaire statistique du Cameroun 2004. Publié dans *statoids* le 27 Avril (2009).

Jarlier V., H. Nikaido, Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 123: 11-18 (1994).

Jayanta K.P., Kwang-Hyun B. Antibacterial Activity and Action Mechanism of the Essential Oil from *Enteromorpha linza* L. against Foodborne Pathogenic Bacteria. *Botanical Studies*, 56:13 (2016).

Jimenez A., Meckes A., Ramirez M., Torres R., Luna-Herrera J. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytotherapy Research*, 17: 903–908 (2003).

Jovel B.S., Cabanillos J., Towers G.H.N. An ethnobotanical study of the traditional medicine of the Metizo people of Suni, Loreto Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, 53 (3): 149-156 (1996).

Kalembe D., Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medical Chemistry* 10 : 813–829 (2003).

Kaloustian J., Hadji-minaglou F. La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie (Entre science et tradition pour application médicale raisonnée). Collection phytothérapie pratique ; *Springer Paris* : 12, 101-113, 162 p (2012).

Kamela K.H.T. Effet de trois huiles essentielles et de leurs combinaisons sur la croissance des levures responsables des candidoses. Mémoire de Master en Biochimie, Université de Yaoundé I, Cameroun. (2017).

Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., Agterveld M.V., Soolingen D.V., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., Embden J.V. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 907-914 (1997).

Kaufmann S. H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Review in Immunology* 1: 20-30 (2001).

Kemegne G.A, Nyegue M.A, Sado K.S.R, Etoa F-X and Menu C. Mangifera indica bark essential oil: chemical composition and biological activities in comparison with aqueous and ethanol extracts. *Natural Product Communications*, 13 (7) : 903-990 (2018).

Kesbi A. Etude des propriétés physicochimique et évaluation l'activité biologique des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* dans la région de ouargla. Mémoire de fin d'études, université Kasdi Marbah Ouargla, Algérie. 55-60 (2011).

Khadri S., Boutefnouchet N., et Dekhil M. Antibacterial activity evaluation of *Allium sativum* essential oil compared to different *Pseudomonas aeruginosa* strains in Eastern Algeria. *Science Study and Response*, 11(4): 421-428 (2010).

Kiet, V.S., Lan N.T.N., An D.D., N.H. Dung N.H., Vinh Chau N. van., Chinh N.T., Farrar J., M. Caws M. Evaluation of the MTBDRsl test for detection of second-line-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*, 48: 2934-2939 (2010).

Koeck J.L., Bernatas J.J, Gerome P., Fabre M., Houmed A., Herve V., Teyssou R. Epidemiology of resistance to antituberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from adenopathies in Djibouti. Prospective study carried out in 1999. *Medecine tropicale*, 62 (1): 70-72 (2009).

Kuete v., Krusche B., Youns M., Voukeng I., Fankam A.G., Tankeos S., Lanmata S., Efferth T. Cytotoxicity of some Cameroonian spices and selected medicinal plant extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 134 (3): 803-812 (2011).

Kuete V., Sandjo L.P., Wiench B., Efferth T. Cytotoxicity and modes of action of four Cameroonian dietary spices ethno-medically used to treat cancers: *Echinops giganteus*, *Xylopiya aethiopica*, *Imperata cylindrical* and *Piper capense*. *Journal Ethnopharmacology*, 149: 245–25 (2013).

Kurepina N., Kreiswirth B.N., Mustaev A., Growth inhibitory activity of natural and synthetic isothiocyanates against representative human microbial pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 115 (4) : 943-954 (2013).

Labioud R. Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. Thèse de doctorat, université de Badji Mokhtar-Annaba, Algérie. (2016).

Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 453-462 (2001).

Lancaster M.V., Fields R.D. Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents. *US Patent No 5*: 501,959 (1996).

Lawrence R. Antioxidant activity of garlic essential oil (*Allium Sativum*) grown in north Indian plains. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(3): 51-54 (2011).

Lee D.H., Kim S.H., Eun J.S., Shin T.Y. Mosla dianthera inhibits mast cell-mediated allergic reactions through the inhibition of histamine release and inflammatory cytokine production. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 216(3) : 479-484 (2006).

Lehotay S.J., Hajslova. Application of gas chromatography in food analysis. *Trends in Analytical Chemistr*,; 21: 686-697 (2002).

Levin M.E., Hatfull G.F. *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Molecular Microbiology*, 8: 277-285 (1993).

Locht C. Clinical used of whole genome sequencing for *Mycobacterium tuberculosis* and duplex-*mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Mycobacteriology*, 23/ 150-160 (2006).

Longley D. B., Harkin D. P., Johnston P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3: 330-338 (2003).

Lorenz T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63 (2012).

Lozniewski A., Rabaud C., Nancy B. Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Infections associées aux soins* : 4-5 (2010). <http://nosobase.chu->

f. Consulté le 27 Septembre 2018 18h 03.

Luciardi M.C., Blázquez M.A., Cartagena E. Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* LWT. *Food Sciences and Technology*, 68: 373-380 (2016).

Luís A., Duarte A., Gominho J., Domingues F., Doarte A.P. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Indian Crop Production*, 79: 274–82 (2006).

Lusakibanza M.F. Ethnobotanique des peuples de la forêt d'Afrique équatoriale. *Journal of ethnopharmacology*, 25: 45-49 (2012).

Manjunatha U.H., Boshoff H., Dowd C.S., Zhang L., Norton T. J. Albert J. E., Daniels L., Dick T., Pang S. S., Barry 3rd C. E. Identification of a nitroimidazooxazine-specific protein involved in PA-824 resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 431-436 (2006).

Marbberley D.J. The plant book, a portable dictionary of the vascular plant. 2nd edition, Cambridge University Press (1997).

Marsh S., McLeod H. L. Thymidylate synthase pharmacogenetics in colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 1: 175-178 discussion 179-181 (2001).

Martin G.J. Ethnobotany. A methods manual. Londres Royaume-Uni, Chapman and Hall 93 (1995).

Mathys V. Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux agents anti-tuberculeux. Thèse de Doctorat, Université Libre de Bruxelles. Belgique (2010).

Mayola E. Etude des mécanismes de mort cellulaire et de résistance des cellules cancéreuses pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques : modèle du mélanome. Thèse doctorat, université de Paris-Sud, France. (2011).

Mbo M.J.P., Dimoke F., Mwengelelwa G., Kayembe T.C. Niveau de connaissance de la tuberculose par les patients tuberculeux nouvellement diagnostiqués à Kisangani, RDC. *Kismed*, 6 (1): 131-137 (2015).

Menut C., Lamaty G., Weyerstahl P., Marschall H., Seelmann I., Amvam Z.P.H. Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XXXI. Tricyclic sesquiterpenes from the root essential oil of *Echinops giganteus* var. *lelyi* C. D. Adams. *Flavour and Fragrance Journal*, 12: 415-421 (1997).

Messanga R.E, Ngonu B.D.S, Abouem A.Z.A, Mbabi N.N, Moni N.E.D.F, Betote D.P.H, Nyegue M.A. Atchadé A.D.T, Pegnyemb D.E, Bochet C.G, Koert U. Rauvolfianine, a new antimycobacterial glyceroglycolipid and other constituents from *Rauvolfia caffra*. *Sond (Apocynaceae)*. *Natural Product Research*, ISSN: 1478-6419, 1478-6427 (2017).

Messiaen C.M., Rouamba A. *Allium sativum* L. [Internet] Record from PROTAU. Grubben, G.J.H. et Denton, O.A. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands. (2004) <<http://www.prota4u.org/search.asp>> Visité le 4 Octobre (2017).

Meyer G. Antibiotics-protein synthesis, nucleic acid synthesis and metabolism. <http://faculty.ksu.edu.sa/5115/Module%20561%20%20561/Antibiotics>, (2007). Consulté le 25 mai 2017.

Middlebrook G., Cohn M.L. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. *American Journal of Public Health*, 48: 844-853 (1958).

Millet J. Evaluation de marqueurs génétiques du complexe *Mycobacterium tuberculosis* combinée à l'utilisation d'outils bioinformatiques : apport en épidémiologie et phylogénie de la tuberculose. Thèse doctorat université des Antilles et de la Guyane, France (2011).

Miron T., Rabinkov A., Mirelman D., Wilchek M., Weiner L. The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. (1999) www.elsevier.com/locate/bba.

Mnayer D., Fabiano-Tixier A.S., Petitcolas E., Hamieh T., Nehme N., Ferrant C., Fernandez X., Chemat F. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essential oils from the Alliaceae family. *Molecules*, 19: 2034-2053 (2014).

Molina-Salinas G.M., Ramos-Guerra M.C., VargasVillarreal J., Mata-Cardenas B.D., Becerril-Montes P et SaidFernandez S. Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensiacernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Medical Research*, 37 (1): 45-49 (2006).

Montaut S., De Nicola G.R., Agnani H., Issembe Y., Rollin P., Menut C. Probing for the presence of glucosinolates in three *Drypetes* spp (*Drypetes euryodes* Hein) Hutch, *Drypetes gossweileri* S. Moore, *Drypetes laciniata* Hutch) and two *Rinorea* spp. (*Rinorea subintegrifolia* O. Ktze and *Rinorea Woermanniana* (Buther) Engl) from Gabon. *Natural Product Research*, 31: 308-313 (2017).

Mostowy S. et Behr M.A. The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Chest Medicine*, 26 (2) : 207-212 (2005).

Mourey A, Canillac N (2002) Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*, 13: 289-92 (2002).

Mpondo M.E, Vandi D., Ngouondjou F.T., Mvogo O.P.B., Embolo E.E., Dibong S.D. Contribution des populations des villages du centre Cameroun aux traitements traditionnels des affections des voies respiratoires. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 3 : 5223-5242 (2017).

Muther L. Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant. Thèse doctorat université d'Auvergne, France (2015).

Mvélé-Mba, Menut C, Bessière, Lamaty G, Nzé EL, Denamganai J. Plantes aromatiques de l'Afrique centrale tropicale. XXIX. L'isothiocyanate de benzyle comme constituant majeur de l'huile essentielle d'écorce de *Drypetes gossweileri* S. Moore. *Journal of Essential Oil Research*, 9: 367-370 (1997).

Myszka K., Schmidt M.T., Majcher M. Inhibition of *quorum sensing*-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds. *International Biodeterior Biodegradation*, 114 : 252–259 (2016).

Ndoye F., Tchingang T.F., Nyegue A.M., Abdou J.P., Yaya A.J., Tchinda A.T., Essame J.O. et Etoa F.X. Composition chimique, propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires in vitro des huiles essentielles de quatre plantes diététiques et médicinales du Cameroun. *Bio Med Central Complementary and Alternative Medicine*, 16 : (2016).

Ndoyé F.C. Etude chimique et évaluation des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des huiles essentielles d'espèces aromatiques tropicales en provenance d'Est du Cameroun. Thèse de doctorat, université de Montpellier II. France (2001).

N Gupta M.J., Appiah-Opong R., Nyarko A.K., Yeboah-Manu D., Addo P.G.A. Medicinal plants used to treat TB in Ghana. *International Journal of mycobacteriology*, 4 : 116-123 (2015).

Niu S., Afre S. Gilbert E.S. Sub-inhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with *quorum sensing*. *Letter of Applied Microbiology*, 43 : 489–494 (2016).

NIST: National Institute of Standards and Technology. WebBook of Chemistry: Standard Reference Database. Number 69; 2014. Accessed 09 Nov 2015-12 Jan 2016.

Nopponpunn V., Sirawaraporn W., Greene P.J., Santi D.V. Cloning and expression of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* dihydropteroate synthase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181: 6814-6821 (1999).

Noudogbessi J-P., Gary-Bobo M., Adomou A., Adjalan E., Alitounou G.A., Avlessi F., Garcia M., Sohounhloe D.C.K. Menut C. Comparative chemical study and cytotoxicity activity of *Uvariadendron angustifolium* essential oils from Benin. *Natural Product Communication*, 9 (2) : 261-264 (2014).

Nyegue M. A., Montaut S., De Nicola G. R., Pollin P. Menut C. Applying the hydrodistillation process to *Pentadiplandra brazzeana* Bail. Root : a chemical assessment. *Natural products research*, ISSN : 1478-6427 (2018).

Nyegue M.A. Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de quelque plantes aromatiques et/ou médicinales du Cameroun : évaluation de leurs activités antiradicalaires, antiinflammatoires et antimicrobiennes. Thèse de doctorat, université de Montpellier II et université de Yaoundé I. Cameroun (2006).

Okunade A.D. *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Fitoterapia*, 73: 1-16. (2002).

OMS : Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. (2018).

OMS : Global tuberculosis report. WHO/HTM/TB/2017.23 : ISBN 978-92-4-156551-6 (2017).

OMS : Rapport sur la lutte contre la tuberculose dans le monde. [www.who.int-global_report](http://www.who.int/global_report), 6 : (2016).

OMS. 2004. BCG vaccine. WHO position paper. Relevé épidémiologique hebdomadaire/Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations= Weekly epidemiological record/Health Section of the Secretariat of the League of Nations 79:27.

OMS. Réglementation des médicaments à base de plantes : la situation dans le monde. WWHO/TRM/98.1 (1998).

OMS. Treatment of tuberculosis guidelines 4th ed: antitubercular agents, administration and dosage, tuberculosis, pulmonary, drug therapy, national health programs, patient compliance and Guidelines. ISBN 978 92 4 154783 3 (2009).

O'Reilly, L. M., Daborn C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercule and Lung Disease* 76 Suppl 1: 1-46 (1995).

Parrish N.M., Carroll KC. Role of clinical mycobacteriology laboratory in diagnosis and manageoftuberculosis inlow-prevelence setting. *Journal of clinical micriobiology*, 21 (1): 123-135 (2011).

Paparoupa M., Gillissen A. Is Myrtol® Standardized a New Alternative toward Antibiotics? *Pharmacognosy Reviews*, 10 (20): 143–146 (2016).

Pavela R., Filippo M., Mbuntcha H., Woguem V., Dongmo F.H.P., WomeniH.M., Azefack T.L., Barboni L., Nicoletti M., Canale A. et Benelli G. Traditional herbal remedies and dietary spices from Cameroon as novel sources of larvicides against filariasis mosquitoes ? *Parasitology Response*, 115 : 4617–4626 (2016).

Peyron L. et Naves Y.R. Lexique des termes et expressions utilisées dans les industries des matières premières aromatiques (les huiles essentielles). *Rivista italiana. E.P.P.O.S*, 59: 550-564 (1997).

Pfyffer G.E., Brown-Elliott B.A., Wallace J., Richard J. *Mycobacterium*: general characteristics, isolation and staining procedures. In *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed, 1: 532– 559 (2003).

Pharmacopée Européenne, 5th Edn, Vol. 2. Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe: Strasburg, France, 1004,1108, 1570, 2206, 2534, 2569 (2004).

Pinto S.C., Leitão G.G., Oliveira D.R., Bizzo H.R., Ramos D.F., Coelho T.S., Silva P.E., Lourenço M.C and Leitão S.G. Chemical Composition and Antimycobacterial Activity of the

Essential Oil from *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* *Natural Product Communication*, 4 (12) : 1675-1678 (2009).

PNLT : Rapport de l'enquête la prévalence de la tuberculose au Cameroun en 2018. A l'occasion de la journée nationale de lutte contre la tuberculose, Douala (2019).

Prabhu K.S., Lobo R., Shirwaikar A.A., Shirwaikar A. *Ocimum gratissimum* : A review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. *The Open Complementary Medicine Journal*, 1: 1-15 (2009).

Prescrire. Drug awards progress for patients. *Review Prescrire* 28 : 85-90 (2007).

Prodinge W.M., Eigentler A., Allerberger F., Schonbauer M., Glawischnig W. Infection of red deer, cattle and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 2270–2272 (2002).

Queiroz R.E., Vazquez F.M., Suarez M.A., Perez A. Medicinal plants used in Barros Aereas Badajoz Province (Spain). *Journal of ethnopharmacology* 155 (2): 81-85 (2005).

Ratnakar P., Murthy S. Preliminary studies on the antitubercular activity and the mechanism of action of the water extract of garlic (*Allium sativum*) and its two partially purified proteins (garlic defensin). *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 11(1) : 37-41 (1996).

Rhayour K. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* Thèse de doctorat, université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc. (2002).

Ross S. F., Chang S., Kotik A.N., Nadler M., Neuwirth Z., Sundstrom D.V et Thompson N.H. *In Vitro* Mechanism of Inhibition of Bacterial Cell Growth by Allicin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32 (12) : 1763-1768 (1998).

Royet D. Caractérisation des dommages à l'échelle d'une bactérie et de l'ADN après une irradiation photon. Mémoire de Master, université Blaise Pascal (2012).

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Gel electrophoresis of DNA. In: Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (Eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor*, NY, USA, chapter 6 (1989).

Sanofi Canada. Antibiotique antituberculeux : action et pharmacologie clinique. N° 126678 (2009). <http://products.sanofi.ca/fr/rifater.pdf>. Consulté le 23 Avril 2017 à 8h 14.

Santos B.S., Silva L.C.N., Silva T.D., Rodrigues J.F., Grisotto M.A., Correia M.T., Napoleão T.H., Silva M.V. et Paiva P.M. Application of omics technologies for evaluation of antibacterial mechanisms of action of plant-derived products. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1466 (2016).

Satyral P., Craft J.D., Dosoky N.S., Setzer W.N. The Chemical Compositions of the Volatile Oils of Garlic (*Allium sativum*) and Wild Garlic (*Allium vineale*). *Foods*, 6 (63): 10 (2017).

Sawicki R., Golus J., Przekora A., Ludwiczuk A., Sieniawska E., Ginalska G. Antimycobacterial Activity of Cinnamaldehyde in a *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) Model. *Molecules*, 23 (9): 2381 (2018a).

Sawicki R., Sieniawska E., Swatko-Ossor M., Golus J., Ginalska G. The frequently occurring components of essential oils beta elemene and R-limonene alter expression of dprE1 and clgR genes of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Food and Chemistry Toxicology*, (2018b).

Semenya S.S., Maroyi A. Medicinal plants used for the treatment of tuberculosis by Bapedi traditional healers in three districts of the Limpopo province, South Africa. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine*, 10 (2) : 316-323 (2013).

Shinnick T.M., Good R.C. Mycobacterial taxonomy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13(11): 884-9011 (1994).

Sieniawska E., Swatko-Ossor M., Sawicki R., Ginalska G. Morphological Changes in the Overall *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra Cell Shape Cytoplasm Homogeneity due to *Mutellina purpurea* L. Essential Oil and Its Main Constituents. *Medical Principles and Practice*, 24: 527–532 (2015).

Singh R., Manjunatha U., Boshoff H.I., Ha Y. H., Niyomrattanakit P., Ledwidge R., Dowd C. S., Lee I. Y., Kim P., Zhang L., Kang S., Keller T. H., Jiricek J., Barry C. E. 3rd, PA-824 kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by intracellular NO release. *Science* 322: 1392-1395 (2008).

Sixue C., Andreasson E. Update on glucosinolate metabolism and transport. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39 (9) : 743-758 (2001).

Smallfield B. Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop Food Research*, 45-49 (2003).

Smith, N. H., Hewinson R.G., Kremer K., Brosch R., Gordon S.V. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, 7 : 537-544 (2009).

Somoskovi A., Parsons L. M., M. Salfinger, The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respiratory Research*, 2: 164-168 (2001).

Steingart I, Dufront A., Behr M.A. The rise and fall of the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Trends Microbiology*, 19 : 156-161(2006).

Stover C.K., Warren P., VanDevanter D.R., Sherman D.R., Arain T.M., Langhorne M.H., Anderson S.W., Towell J.A., Yuan Y., McMurray D. N., Kreiswirth B.N., Barry C. E., Baker W. R. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature*, 405: 962-966 (2000).

Sülßen V.P., Puente V., Papademetrio D., Batlle A., Martino V.S., Frank F.M. Mode of Action of the Sesquiterpene Lactones Psilostachyin and Psilostachyin C on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, 11(3): (2016).

Supply P.E., Mazars S., Lesjean., Vincent V., Gicquel B., Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiology*, 36 (3): 762–771 (2000).

Supply P. Multilocus variable number of Tandem Repeat genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*: technical guide; Institute de Biologie/Institut Pasteur de Lille (2006).

Suresh B., Sriram S., Dhanaraj S.A., Elango K., Chinnaswamy K. Anticandida activity of *Santolima chamaecyparissus* volatile oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 55: 151-159 (1997).

Tchinang K.T.F., Ndoyé F.C., Nyegue M.A. Caractérisation des huiles de *Pentadiplandra brazzeana* Baill (*Capparidaceae*) et évaluation de leurs activités antifongiques sur *Trichophyton rubrum*. *Biosciences Proceedings*, 19 : 87-89 (2013).

Tchinda A.T., Sob V.S.T. *Drypetes gossweileri* S. Moore. In : Schmelzer, G.H. and Gurib-Fakim, A. (Editeurs). Prota 11(1) : Medicinal plants/Plantes médicinales 1. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen (2008).

Tekwu E.M. Caractérisation phénotypique et génotypique de la résistance des souches de *Mycobacterium tuberculosis* et activité antimycobactérienne de quelques plantes médicinales Camerounaise. Thèse de doctorat, université de Yaoundé I, Cameroun (2014).

Tekwu M.E., Askun-Tulin., Kueté V., Nkengfack AE., Nyasse B., Etoa F-X., Penlap B.V. Antibacterial activity of selected Cameroonian dietary spices ethno medically used against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 142: 374-382 (2012).

Tene M., Tane P., Sondengam B.L., Connolly J.D. Lignans from the roots of *Echinops giganteus*. *Phytochemistry*, 65: 2101-2105 (2004).

Teuma D.S.C. Etude de la diversité génétique dans le complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans le département du Noun, région de l'Ouest Cameroun par la technique MIRU-VNTR. Thèse de doctorat, université de Douala, Cameroun (2016).

Tiam E.R., Ngono B.D.S., Abouem A Zintchem A., Mbabi N.N, Moni N.D.F., Betote D.P.H, Nyegue M.A, Atchadé A.T, Pegnyemb D.E, Bochet C.G, Koert U. Secondary metabolites from *Triclisia gillettii* (De Wild) Staner (Menispermaceae) with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Natural Product Research*, ISSN: 1478-6419, 1478-6427 (2017).

Tawari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnel C.P. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, 57: 5987-6000 (2009).

Troska J.E. Evolution of microbial quorum sensing to human global quorum sensing: an insight into how gap junctional intercellular communication might be linked to the global metabolic disease crisis. *Biology*, (Basel) 5:29 (2016).

Ultee A., Kets E.P.W., Alberda M., Koekstra F.A., Smid E.J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archaeology Microbiology*, 174: 233-238 (2002).

Ultee A., Smid EJ Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64: 373-378 (2001).

Van Embden J.D., Cave M.D., Crawford J.T., Dale J.W., Eisenach K.D., Gicquel B., Hermans P., Martin C., McAdam R., Shinnick T.M. Strain identification of *Mycobacterium*

tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinic Microbiology*, 31(2) :406-409 (1993).

Van Soolingen D., Hoogenboezem T., De Haas P.E., Hermans P.W., Koedam M.A., Teppema K.S., Brennan P.J., Besra G.S., Portaels F., Top J., Schouls L.M., Van Embden J.D. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: Characterization of an exceptional isolate from Africa. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 1236–1245 (1997).

Verma R.P. Synthesis and reactions of 3-oxobutyl isothiocyanate (OB ITC). *European Journal of Organic Chemistry*, 2003 (3): 415-420 (2003).

Veziris, N., E. Cambau, W. Sougakoff, Robert J., Jarlier V. Resistance to antituberculous drugs. *Archives of Pediatric*, 12 Suppl 2: S102-109 (2005).

Vilcheze C., Jacobs W. R. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annual Reviews of Microbiology*, 61: 35-50 (2007).

Viswanathan V., Phadatare A.G., Mukone A. Anti-mycobacterial and antibacterial activity of *Allium sativum* bulbs. *Indian Journal of Pharmacology Sciences*, 3: 256-261 (2014).

Voundi O.S.H, « Etudes des huiles essentielles des plantes pour le contrôle des spores de Bacillus dans les produits alimentaires » Ph.D thesis in Biochemistry, University of Yaoundé I, Cameroun (2017).

Voundi S.O., Nyegue M.A., Lazar I., Raducanu D., Ndoye F.C., Stamate M. et Etoa F-X. Effect of essential oils on germination and growth of some pathogenic and spoilage spore-forming bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(6): 3-7 (2015).

Wanger A., Mills K. Testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to ethambutol, isoniazid, rifampin, and streptomycin by using E-test. *Journal of Clinic Microbiology*, 34: 1672-1676 (1996).

Wilson A.E. Recherche d'isothiocyanates à intérêt fonctionnel et technologique chez le Brassicacées. Thèse de Doctorat 3ème cycle, Université de Strasbourg, France (2011).

Wu Q., Wang W., Dai X., Wang Z. Y., Shen Z. H., Ying H. Z et Yu C. H. Chemical compositions and anti-influenza activities of essential oils from *Mosla dianthera*. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2): 668-671 (2012).

Xu G.M. Relationships between the regulatory systems of *quorum sensing* and multidrug resistance. *Frontiers in Microbiology*, 7: 95 (2016).

Xu J., Zhou F., Ji B.P., Pei R.S., Xu N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letter in Applied Microbiology*, 47, 174 - 179. (2008).

Xu J-G., Liu T., Hu Q-P., Cao X-M. Chemical composition, antibacterial properties and mechanism of action of essential oil from Clove Buds against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 21: 1194 (2016).

Yan L., Zhang L., Yang H., Xiao H. *In Vitro* Synergism Testing of three antimicrobial agents against multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Checkerboard Method. *Journal of Molecular Pharmaceutics Org Process Research*, 3 (2015).

Yano H., N. Okitsu., T. Hori., O. Wantanabe., E. Hatagishi., A. Suzuki., M. Okamoto., A. Ohmi., M. Suetake., S. Sagai., T. Kobayashi et H. Nishimura. Detection of respiratory viruses in nasopharyngeal secretions and middle ear fluid from children with acute otitis media. *Acta oto-laryngologica*, 129 (19) (2009).

Zerbo P., Millogo-Rasolodimby J., Noucouлма-Ouedraogo O.G., Van Damma P. Contribution à la connaissance des plantes médicinales utilisées dans les soins infantiles en pays San, au Burkina Faso. *International Journal of Chemistry and Science*, 1: 262-274 (2010).

Zhang A., Pei R.S., Xu S, Ying H. Z et Yu C. Genetic resistance of mycobacterium tuberculosis to Isoniazid due to mutation of KatG gene. *Journal of Microbiology response*, 23 :34-42 (1954).

Zhang Y. et Yew W.W. Mécanismes de la résistance aux médicaments chez *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*, 13 (11): 1320-1330 (2009).

Zhou L., Zheng H., Tang Y., Yu W. et Gong Q. Eugenol inhibits quorum sensing at sub-inhibitory concentrations. *Biotechnology and Letter*, 35: 631–791 (2013).

ANNEXES

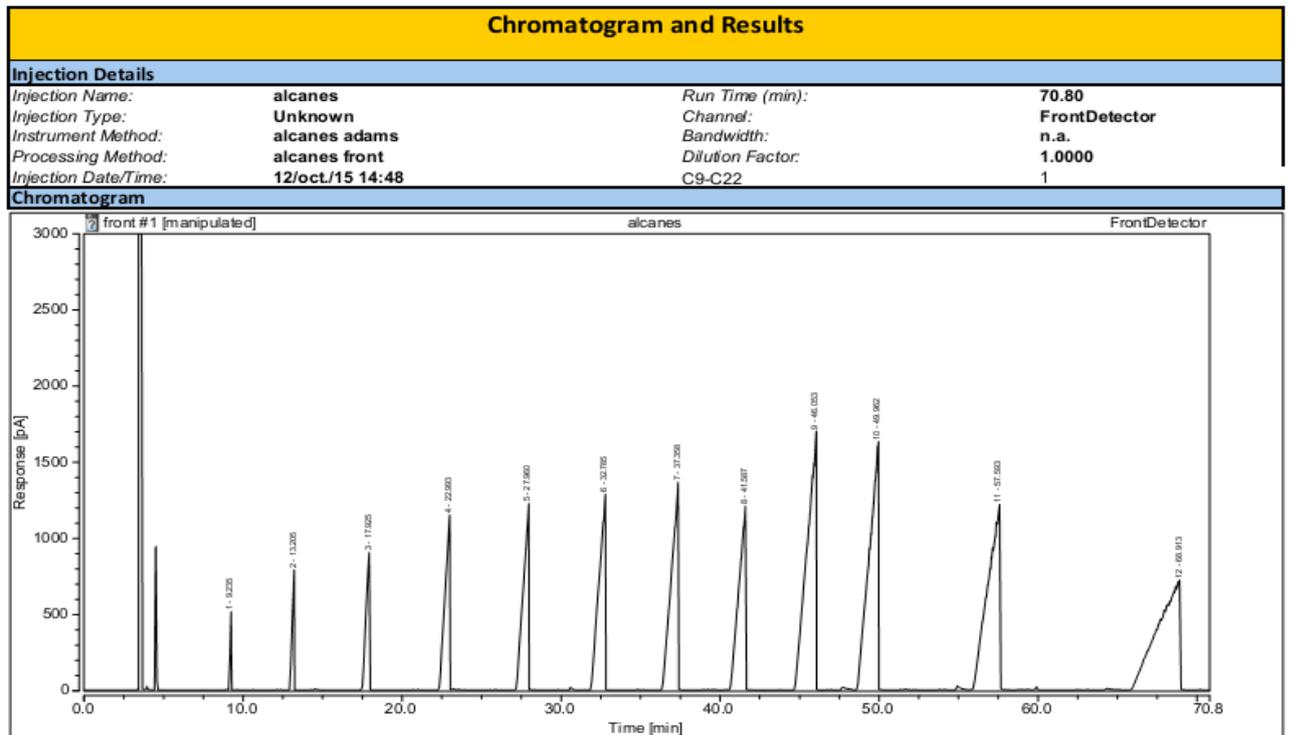
ANNEXES

ANNEXE I : Fiche de l'enquete ethnobotanique

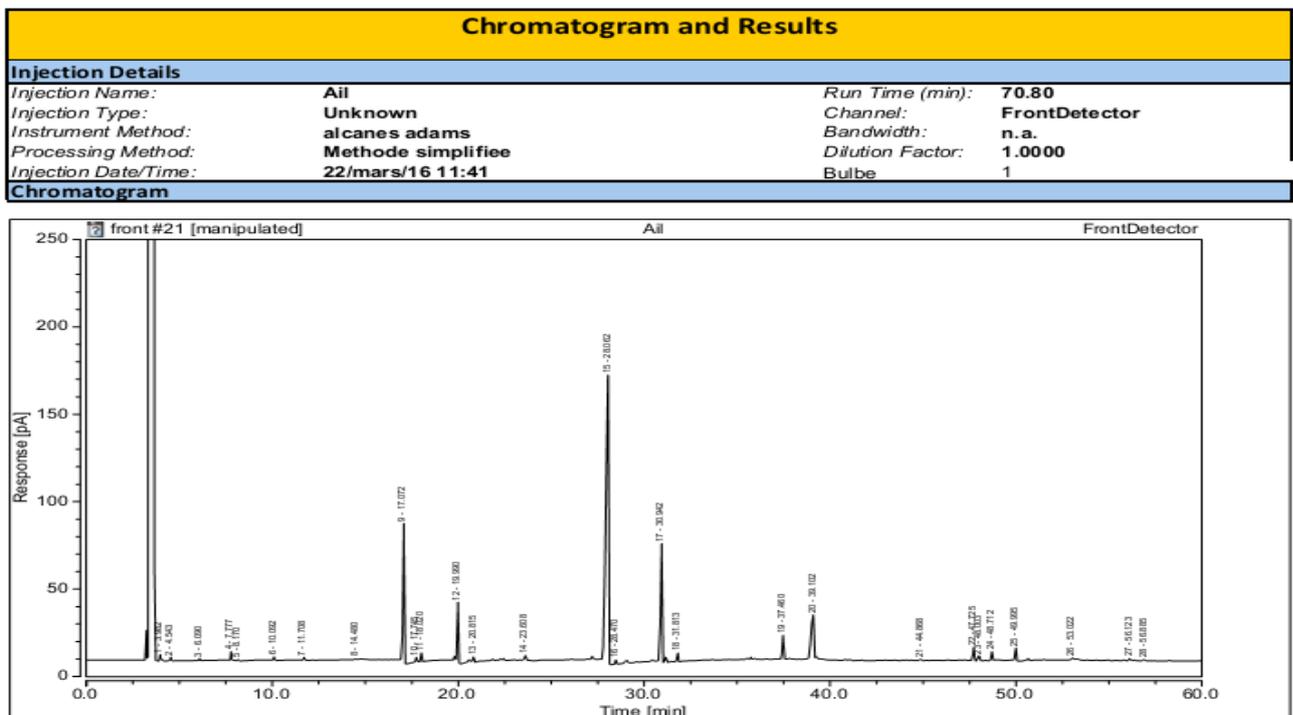
I-1	Date et lieu de l'interview	____/____/_____ JJ/ MM/ AA
	Code/nom du tradiprticien	_____/
	Localité de résidence	_____/
	Avez-vous des connaissances sur les plantes médicinales ?	_____/
	Quel métier exercerez-vous à l'égard de l'utilisation des plantes	_____/
	Avez-vous déjà traité un malade tuberculeux à base de plantes médicinale ?	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
	Comment le diagnostic a-t-il été posé ?	-Si par un médecin : ____/ -Si par le tradipraticien : Quels sont les symptômes relatifs à la maladie ? _____/
	Quels sont les plantes que vous utilisées dans le traitement de la tuberculose ?	-Noms vernaculaires :_____/
		- Noms communs :_____/
		-Partie de la plante utilisée :_____/
		-Méthode de préparation :_____/
		-Voie d'administration :_____/
		- Duré possible du traitement ; ____/
	Autres utilisations des espèces de plantes utilisées	

ANNEXE II : Résultats des analyses chromatographiques des HEs et combinaisons

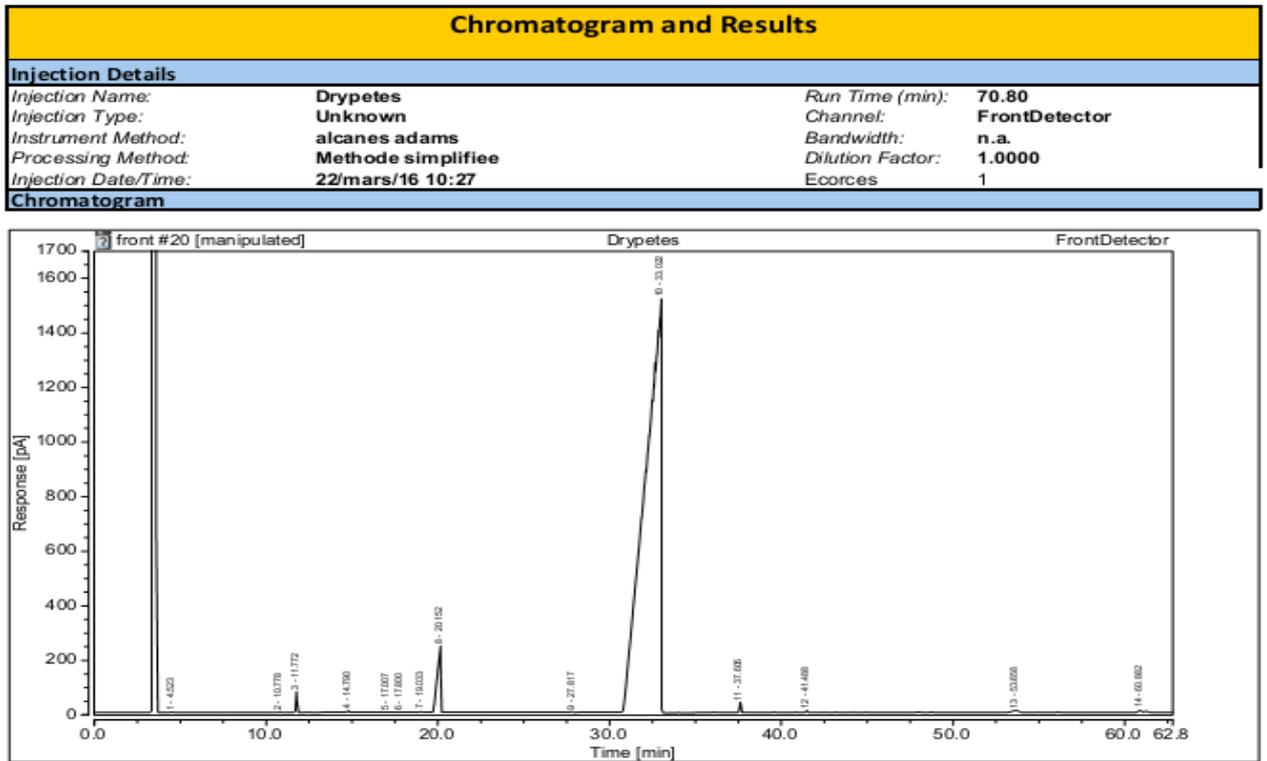
Annexe II.1 : Chromatogramme des alcanes a C9.....C18, C20, C22.



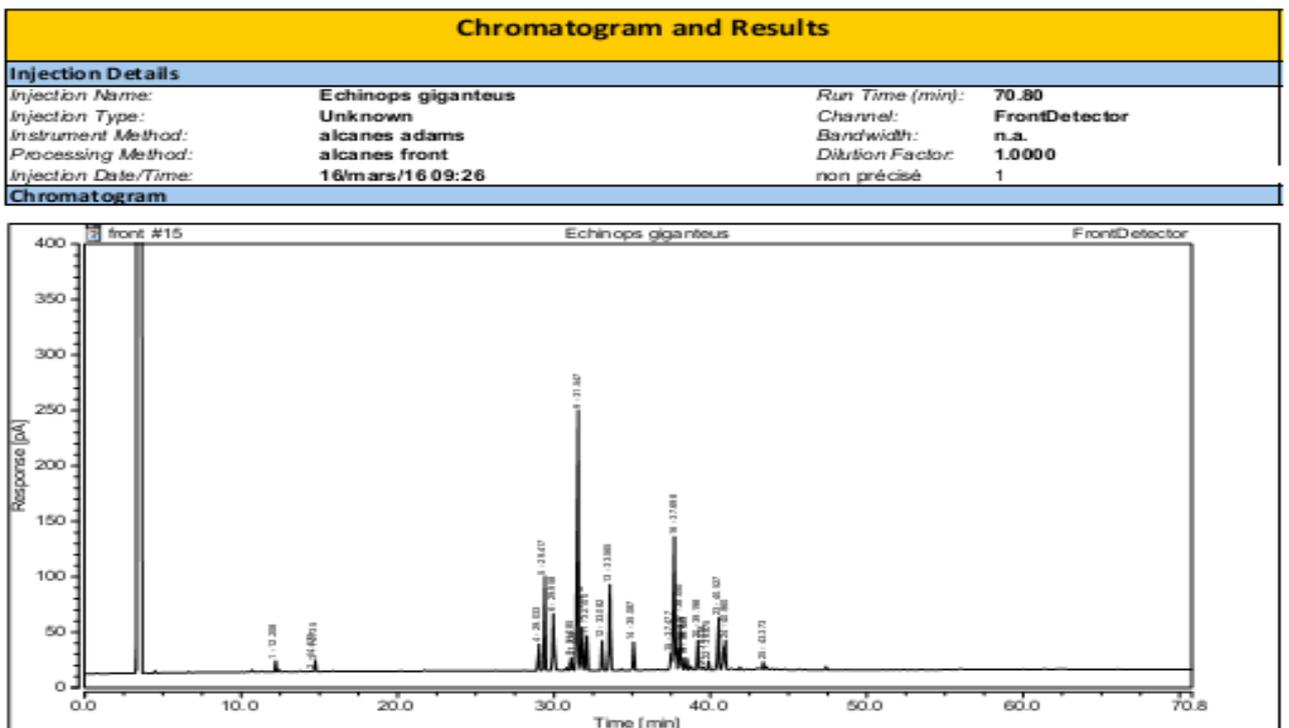
Annexe II.2: Chromatogramme d'*Allium sativum*



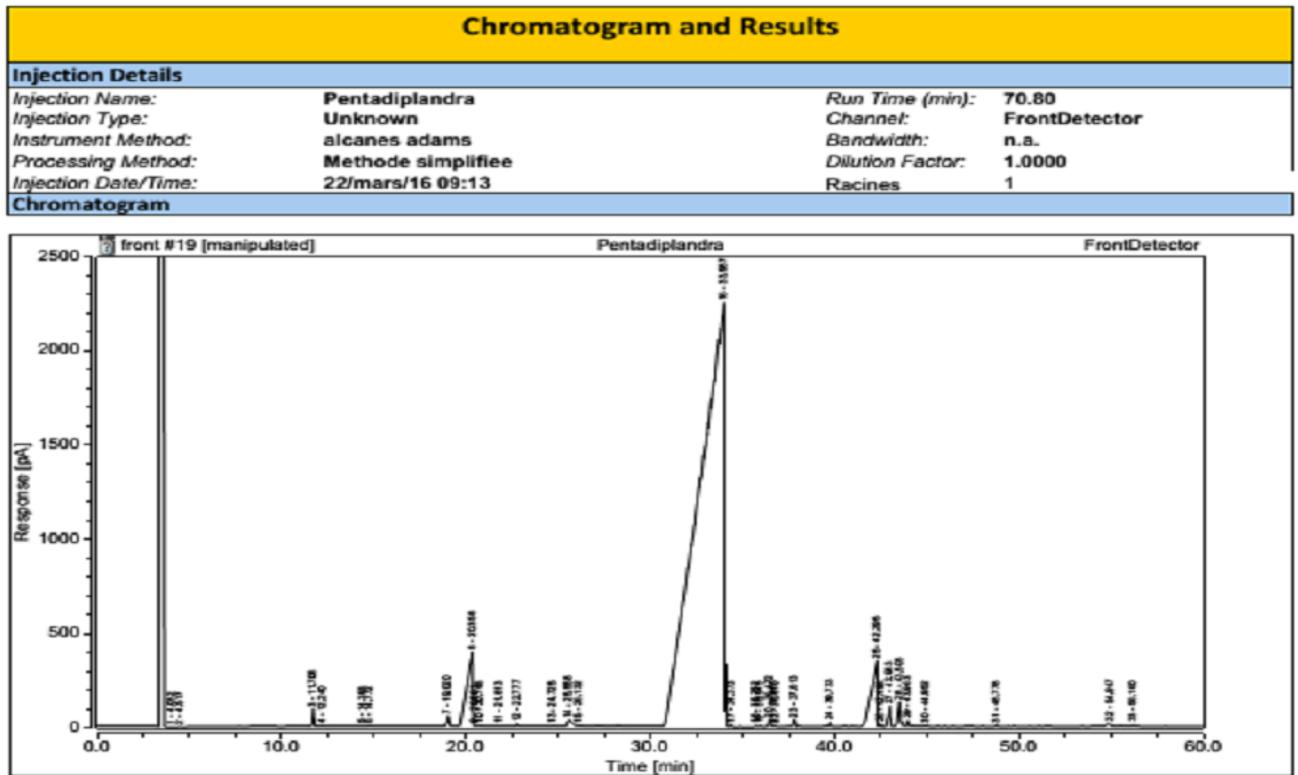
Annexe II.1 : Chromatogramme de *Drypetes gosseweileri*



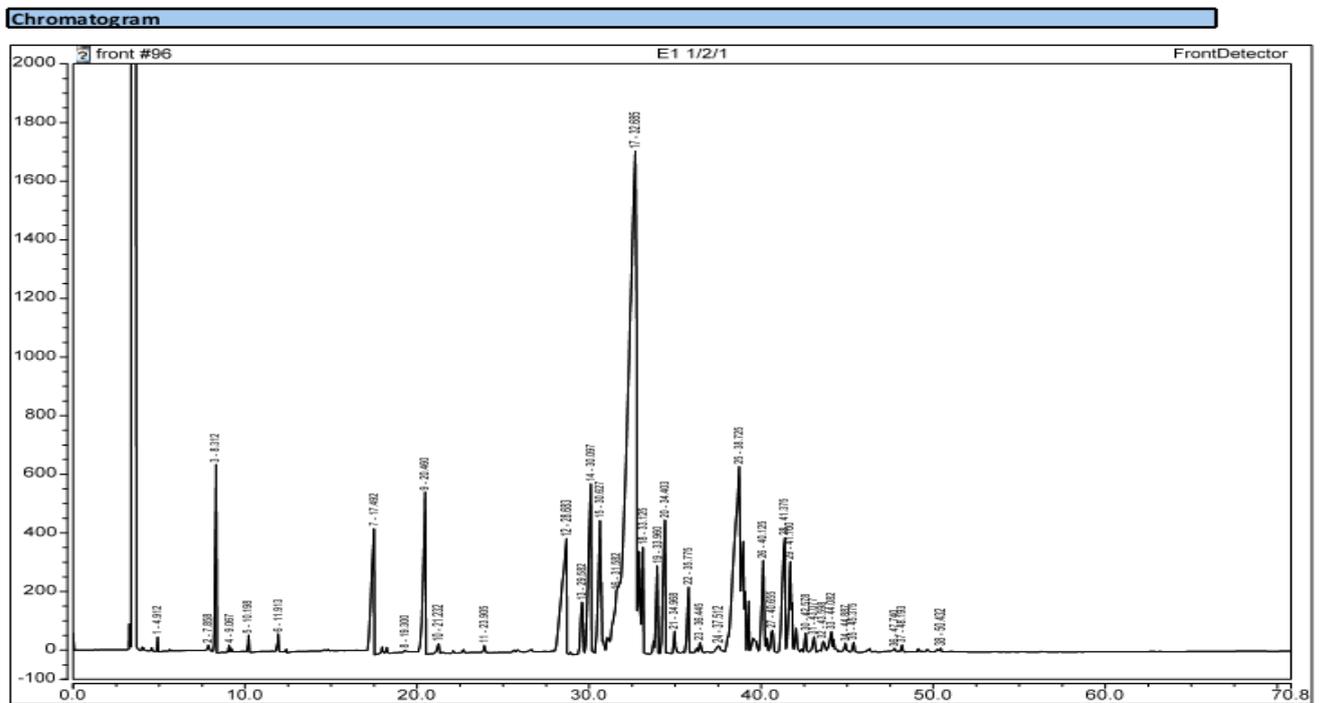
Annexe II.3 Chromatogramme d'*Echinops giganteus*



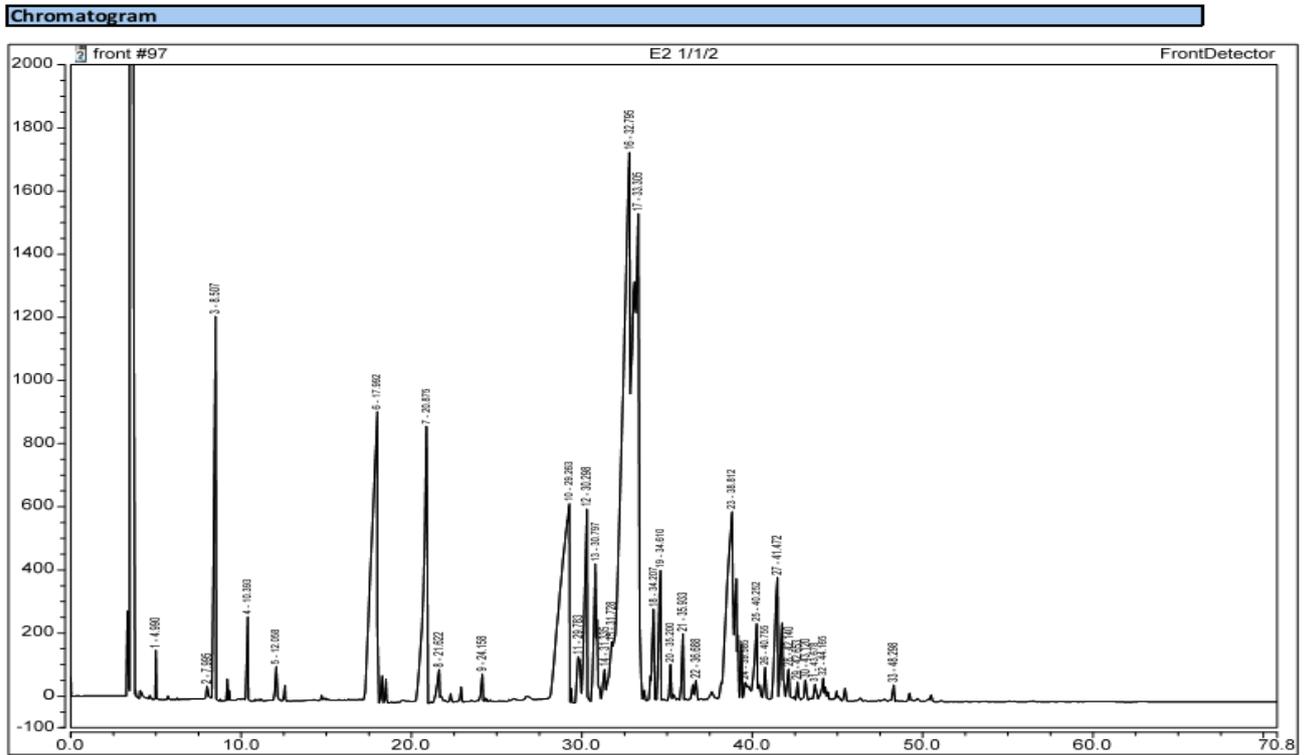
Annexe II.4 Chromatogramme de *Pentadiplandra brazzeana*



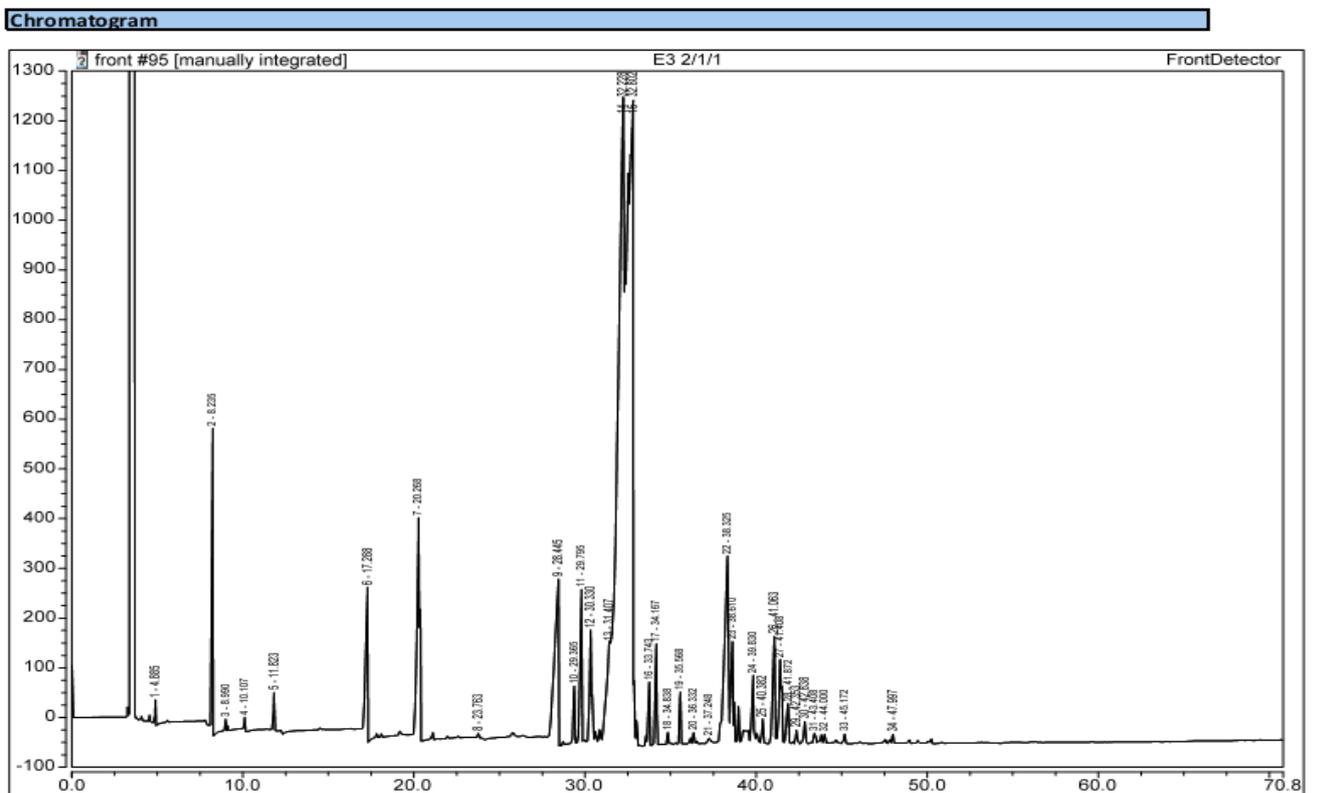
Annexe II.5 Chromatogramme de la combinaison E1



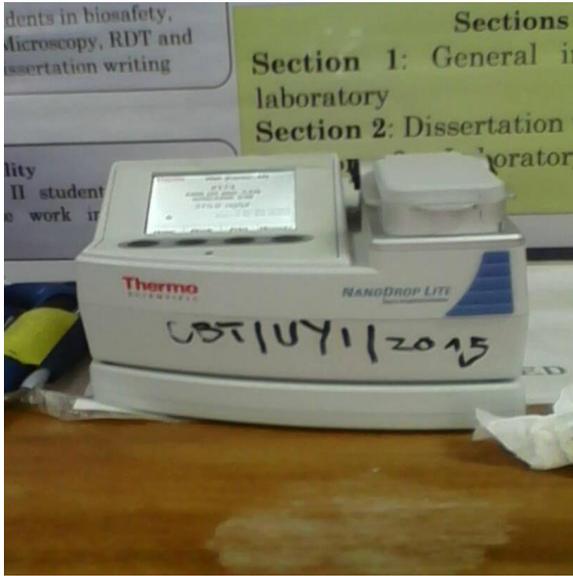
Annexe II.6 Chromatogramme de la combinaison E2



Annexe II.5 Chromatogramme de la combinaison E3



ANNEXE III : Equipements de laboratoire



Spectrophotomètre : NanoDrop 1000
(THERMO SCIENTIFIC)



Dépôt d'1 μ L d'échantillon

- Chromatographe type Varian série CP 3380 : Analyse des HES par CPG
- Chromatographe de type Hewlett-Packard (GC 5890 série II) : Analyse des HES par CPG/SM

ANNEXE IV : Milieux de culture

- **Milieu Lowenstein Jensen Medium Base**

L-Asparagine	3,60 g/L
Monopotassium phosphate	2,40 g/L
Magnesium sulphate	0,24 g/L
Magnesium citrate	0,60 g/L
Potato starch, soluble	30,00 g/L
Malachite green	0,40 g/L



• **Milieu Middlebrook 7H9 Broth Base**

Ammonium sulphate	0,50 g/L
Disodium phosphate	2,50 g/L
Monopotassium phosphate	1,00 g/L
Sodium citrate	0,05 g/L
Magnesium sulphate	0,10 g/L
Calcium chloride	0,0005 g/L
Zinc sulphate	0,001 g/L
Copper sulphate	0,001 g/L
Ferric ammonium chloride	0,04 g/L
L-Glutamic acid	0,50 g/L
Pyridoxine	0,001 g/L
Biotine	0,0005 g/L

pH final at 25°C: 66 ± 0,2



ANNEXE V : Supplément nutritifs de culture et antituberculeux de référence

OADC (pour 500 mL)

Oleic acide.....	0,025g
Fraction d'albimine bovine.....	2,50g
Catalase.....	0,002g
Dextrose (D-glucose)	1,00g
Clorure de sodium.....	0,425g

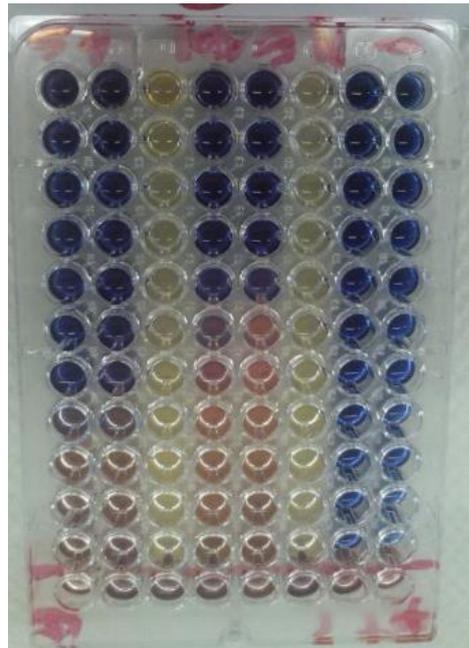
Rifampicine: N° GS030035, e. v. Germany

Ofloxacin: N° GS030093, e. v. Germany

ANNEXE VI : Photos des résultats des paramètres d'inhibition



CMI de *P. brazzeana* et de *D. gossweileri* sur l'isolat sensible IS53



CMI d'*A. sativum* et d'*E. giganteus* sur la souche H₃₇Rv



CMB de *P. brazzeana* et de *D. gossweileri* sur la souche H₃₇Rv

ANNEXE VII : Préparation des solutions chimiques

➤ Préparation de la solution de révélation de croissance

Peser 0.05 g de sel de résazurine introduire dans un flacon recouvert de papier aluminium pour éviter le contact avec la lumière car la solution de résazurine est photosensible et ajouter 100 mL d'eau distillée et homogénéiser.

➤ Préparation des solutions pour l'extraction

• Préparation de la Protéase QIAGEN

Ajouter 1,2 mL de solvant de protéase(PS) dans le flacon de protéase, QIAGEN (QP) lyophilisée et mélanger avec précaution. Pour éviter que le mélange ne mousse, mélanger en retournant plusieurs fois le flacon. Vérifier que la Protéase QIAGEN(QP) est entièrement dissoute.

• Préparation du tampon de lavage 1

À l'aide d'une éprouvette, ajouter 25 mL d'éthanol (96 à 100 %) dans le flacon contenant 19 mL de tampon de lavage 1 (AW1) concentré. Conserver le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué à température ambiante (15 à 25 °C).

• Préparation du tampon de lavage 2

À l'aide d'une éprouvette, ajouter 30 mL d'éthanol (96 à 100 %) dans le flacon contenant 13 mL de tampon de lavage 2 (AW2) concentré. Conserver le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué à température ambiante (15 à 25 °C).

➤ Préparation de la solution d'élution

La solution d'élution a été préparé en diluant 50 µL de tampon d'élution (AE) dans 100 µL d'eau. Cette solution a aussi été utilisée pour le blanc lors da mesure de la quantité d'ADN extrait.

➤ **Préparation des solutions pour électrophorèse :**

- **Préparation du TBE 10X (Tris-Borate-EDTA 10 fois concentré) (250 mL)**

Peser respectivement 15,15 g de Tris de base, 7,725 g d'acide borique et 0,93 g de Na²⁺ EDTA et dissoudre les poudres dans 150 mL d'eau distillée contenue dans un grand b cher. Homogénéiser le mélange puis compléter le volume   250 mL avec de l'eau distillée (en ajoutant 100 mL d'eau distillée). Conserver à température ambiante.

- **Tampon TBE 1X (Tris-Borate-EDTA 1 fois concentré) (1L)**

Mesurer 100 mL de TBE 10X et ajouter 900 mL d'eau distillée. Recouvrir à l'aide du papier aluminium et conserver à température ambiante.

- **Solution de dNTP 10 Mm (500  L)**

A partir de 100 Mm de chaque dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) prélever respectivement 50  L et introduire dans un cryotube, ajouter 300 L d'eau de PCR. Homogénéiser la solution, étiqueter et conserver à - 20 C.

ANNEXE VIII : Résultats de l'analyse statistique

Paramètres	Echantillons	H37Rv			IS53			IS310		
		ADN ng / μ L	ARN ng / μ L	Prot* ng/mL	ADN ng/mL	ARN ng/mL	Prot* ng/mL	ADN ng/mL	ARN ng/mL	Prot* ng/mL
CMI	T+	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	Pb	222,6 \pm 1,32 ^c	169,1 \pm 1,47 ^b	930,9 \pm 12,39 ^d	184 \pm 2,51 ^d	67,3 \pm 1,00 ^b	389,3 \pm 1,61 ^f	112,6 \pm 1,10 ^d	12,6 \pm 0,70 ^b	137,9 \pm 1,81 ^f
	Dg	227 \pm 3,05 ^c	145,4 \pm 4,80 ^b	1063 \pm 6,5 ^c	218,3 \pm 1,41 ^d	96,5 \pm 1,01 ^b	922 \pm 1,52 ^f	70 \pm 1,00 ^d	20,2 \pm 0,11 ^b	37,9 \pm 0,27 ^f
	As	91,2 \pm 2,21 ^d	42 \pm 1,52 ^b	840,2 \pm 3,35 ^f	138,2 \pm 6,08 ^d	80 \pm 2,62 ^b	922 \pm 1,00 ^f	242,9 \pm 0,52 ^c	38,2 \pm 0,27 ^b	67,4 \pm 1,07 ^e
	Eg	366,7 \pm 8,54 ^c	194,7 \pm 4,25 ^b	1033,8 \pm 6,58 ^f	117,5 \pm 1,25 ^d	78 \pm 1,15 ^b	900 \pm 1,52 ^f	132,4 \pm 0,80 ^d	8,7 \pm 0,06 ^b	40 \pm 0,57 ^f
	OX	0,9 \pm 0,10 ^a	0,3 \pm 0,15 ^a	0,1 \pm 0,01 ^a	0 \pm 0,00 ^a	0 \pm 0,00 ^a	0,8 \pm 0,15 ^a	0 \pm 0,00 ^a	0 \pm 0,00 ^a	0,3 \pm 0,01 ^a
CMB	Pb	234,2 \pm 3,16 ^c	239 \pm 3,00 ^c	944,2 \pm 1,36 ^e	266,4 \pm 1,02 ^e	125,3 \pm 0,08 ^c	989 \pm 2,08 ^g	310,9 \pm 1,15 ^e	58,1 \pm 0,60 ^c	125 \pm 1,00 ^g
	Dg	290 \pm 5,03 ^d	151,6 \pm 2,02 ^b	1098,7 \pm 4,44 ^f	506,1 \pm 2,96 ^e	141 \pm 1,52 ^c	1200,9 \pm 1,20 ^g	100 \pm 0,43 ^e	45,2 \pm 0,76 ^c	189 \pm 1,00 ^g
	As	471 \pm 2,64 ^c	340,2 \pm 1,67 ^c	1650,2 \pm 8,59 ^g	242,9 \pm 1,36 ^e	151 \pm 2,51 ^b	988,6 \pm 0,58 ^g	89,9 \pm 1,64 ^d	36,5 \pm 0,50 ^b	253 \pm 1,52 ^f
	Eg	430 \pm 5,03 ^d	204,3 \pm 2,24 ^b	1162 \pm 3,60 ^g	132,4 \pm 1,70 ^e	132,4 \pm 1,10 ^c	932,8 \pm 0,92 ^g	476,3 \pm 0,50 ^e	334,7 \pm 0,95 ^c	564,3 \pm 0,50 ^g
	OX	0,3 \pm 0,14 ^a	0 \pm 0,00 ^a	0,2 \pm 0,15 ^a	0 \pm 0,00 ^a	0 \pm 0,00 ^a	1 \pm 0,05 ^a	0 \pm 0,00 ^a	0 \pm 0,00 ^a	0,6 \pm 0,15 ^a

Légende : **Pb** : *P. brazzeana* ; **Dg** : *gossweileri* ; **HEs** : huiles essentielles ; **MBK** : Middlebrook ; **témoin +** : témoin positif (H37Rv, IS53 ou IS310); **Prot** : protéines ; * : valeur du tableau multipliée par 10⁴ ; \pm : plus ou moins ;

ANNEXE IX : PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES ISSUES DES TRAVAUX

Publications issues de la thèse :

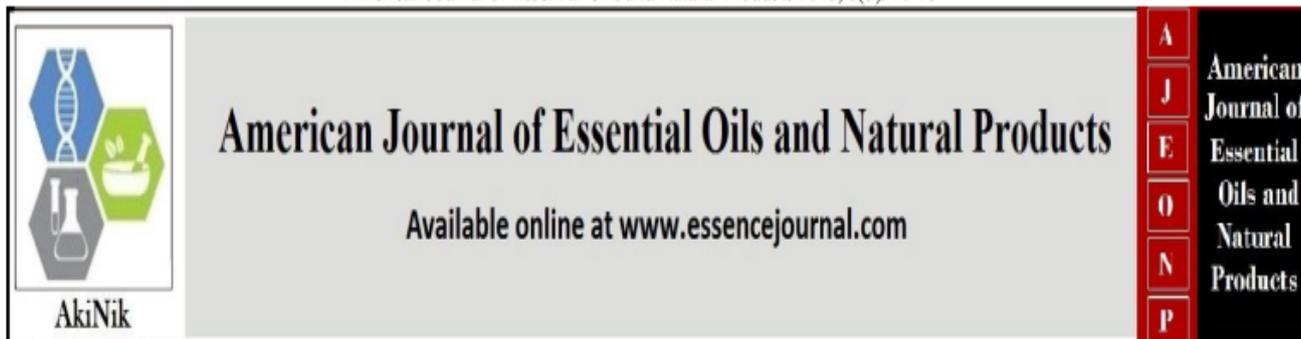
1. Esther Del Florence Moni Ndedi, Jean Paul Assam Assam, Maximilienne Ascension, Nyegue, Gaizirène Egoume Feudjieu, Veronique Penlap Beng and François–Xavier Etoa (2018). Anti-mycobacterial efficacy of three essential oils from medicinal plants currently used traditionally to treat tuberculosis in Cameroon. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*; 6 (3): 10-18

2. Esther D.F Moni Ndedi., Maximilienne A. Nyegue, Jean Paul. Assam. Assam, G.E Feudjieu, V.P Beng and F-X Etoa. Cytotoxicity effects of essential oil from *Drypetes gossweileri* S. Moore stem barks on cells membrane and DNA of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 2019; 9 (2-s): 319-324.

Communications scientifiques :

MONI N.E.D.F., NYEGUE M.A, ASSAM ASSAM J.P., FEUDJIEU E.G, BETOTE D. P.H, PENLAP B.V and ETOA F–X. Effects of essential oil from *Drypetes gossweileri* S. Moore stem barks on cells membrane and DNA of *Mycobacterium tuberculosis*. Cameroon Bioscience 2018. 18_HEA_POS 31.

MONI N.E.D.F. NYEGUE M.A, EYANGO S, DONKENG V, BETOTE D. P.H and ETOA. F–X . *In vitro* anti-inflammatory and antimycobacteriology activities of *Echenops giganteus* essential oils against two multiresistant isolates of *Mycobacterium*. *Annual Congress of The European Society of Mycobacteriology*. Dans la première partie de la catégorie New treatment concepts à Dresden ; Allemagne du 01 au 04 Juillet 2018 OP-17.



ISSN: 2321-9114

AJEONP 2018; 6(3): 10-18

© 2018 AkiNik Publications

Received: 05-05-2018

Accepted: 09-06-2018

Esther Del Florence Moni Ndedi

Department of Microbiology, Faculty of
Science, University of Yaounde I, P.O.
Box 812, Yaounde, Cameroon

Jean Paul Assam Assam

(1) Department of Microbiology, Faculty
of Science, University of Yaounde I,
P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon

(2) Laboratory for Tuberculosis
Research, The Biotechnology Centre,
University of Yaounde I, P.O. Box 812,
Yaounde, Cameroon

Anti-mycobacterial efficacy of three essential oils from medicinal plants currently used traditionally to treat tuberculosis in Cameroon

Esther Del Florence Moni Ndedi, Jean Paul Assam Assam, Maximilienne Ascension, Nyegue, Gaizirène Egoume Feudjieu, Veronique Penlap Beng and François-Xavier Etoa

Abstract

The designed study carries out an ethnopharmacology survey of medicinal plant used to treat tuberculosis and asses the anti-mycobacterial efficiency of three of their plant essential oils against three strains of *Mycobacterium tuberculosis*. The ethnopharmacological study was carried out in two localities of Nkam

EFFECTS OF ESSENTIAL OIL FROM *DRYPETES GOSSWEILERI* S. Moore STEM BARKS ON CELLS MEMBRANE AND DNA OF *Mycobacterium tuberculosis*

Esther D.F.N Moni,^{1,2,*} Maximilienne A. Nyegue,^{1,3} Jean P.A. Assam,² Gaïzirène E. Feudjieu,^{1,2} Patrick H.D. Betote,^{1,2} Veronique B. Penlap,² François–Xavier Etoa¹

¹ Department of Microbiology, Faculty of Science, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon.

² Laboratory for Tuberculosis Research, The Biotechnology Centre, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon.

³ Equipe glyco et nanovecteurs pour le ciblage thérapeutique, University of Montpellier, IBMM UMR 5247 CNRS-UM. 15 avenue Charles Flahault, BP 14491, FR-34093 Montpellier Cedex 5, France.

Esther D.F.N Moni; Corresponding author: estherdel@rocketmail.com

Abstract

In the recent years, the proliferation of multi-drug-resistant and extensively drug-resistant TB suggest that efforts are requiring to found alternative treatments. The designed study aimed to show the cytotoxicity effect of essential oils from *Drypetes gossweileri* stem barks on *Mycobacterium tuberculosis* cell membrane and DNA. The essential oils have been obtained by hydrodistillation using Clevenger apparatus and analyzed by gas chromatography and gas chromatography associated with mass spectrophotometry. The inhibition parameters were determined against two clinical isolates IS53 and IS310 and the reference strain H37Rv using microdilution methods. The impact of essential oils on *Mycobacterium tuberculosis* membrane integrity was evaluated by spectrophotometric quantification of intracellular biomolecules (DNA, RNA and proteins) present in extracellular medium using NanoDrop 1000 apparatus. The effect on DNA molecules was performed by PRC amplification using MURU 04 primer and gel agarose electrophoresis of exposed cells at Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC). The results revealed benzyl isothiocyanate and benzylcyanide at 91.3% and 3.1% respectively as main compounds of essential oil from *Drypetes gossweileri* stem barks. This essential oil exhibited strong activity with MIC ranging from 4.88 µg/mL against H37Rv and IS310 to 9.76 µg/mL against IS53. Membrane integrity of treated cells has been losen with a significant release of DNA, ARN and proteins in

extracellular medium. Proteins were the most released biomolecule 370.9 to 10630.0 ng/ μ L at MIC concentration which increased from 1890.0 to 12000.9 ng/ μ L at MBC. DNA fragmentation was already observed for cells treated at MIC for H37Rv and IS310 and at MBC for all cells. These results obtained in this study, justify the traditional use of this plant in the treatment of respiratory diseases.

Key words: Antimycobacterial, Cells integrity, DNA fragmentation, Essential oil



AkiNik

American Journal of Essential Oils and Natural Products

Available online at www.essencejournal.com

A
J
E
O
N
P
American
Journal of
Essential
Oils and
Natural
Products

ISSN: 2321-9114
AJEONP 2018; 6(3): 10-18
© 2018 AkiNik Publications
Received: 05-05-2018
Accepted: 09-06-2018

Esther Del Florence Moni Ndedi
Department of Microbiology, Faculty of
Science, University of Yaounde I, P.O.
Box 812, Yaounde, Cameroon

Jean Paul Assam Assam
(1) Department of Microbiology, Faculty
of Science, University of Yaounde I,
P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon
(2) Laboratory for Tuberculosis
Research, The Biotechnology Centre,
University of Yaounde I, P.O. Box 812,
Yaounde, Cameroon

Maximilienne Ascension
(1) Department of Microbiology, Faculty
of Science, University of Yaounde I,
P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon
(2) Equipe glyco et nanovecteurs pour le
ciblage thérapeutique, University of
Montpellier, IBMM UMR 5247 CNRS-
UM. 15 avenue Charles Flahault, BP
14491, FR-34093 Montpellier Cedex 5,
France

Nyegue
(1) Department of Microbiology, Faculty
of Science, University of Yaounde I,
P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon
(2) Equipe glyco et nano vecteurs pour le
ciblage thérapeutique, University of
Montpellier, IBMM UMR 5247 CNRS-
UM. 15 avenue Charles Flahault, BP
14491, FR-34093 Montpellier Cedex 5,
France

Gaizirène Egoume Feudjieu
(1) Department of Microbiology, Faculty
of Science, University of Yaounde I,
P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon
(2) Laboratory for Tuberculosis
Research, The Biotechnology Centre,
University of Yaounde I, P.O. Box 812,
Yaounde, Cameroon

Veronique Penlap Beng
Laboratory for Tuberculosis Research,
The Biotechnology Centre, University of
Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde,
Cameroon

François-Xavier Etoa
Department of Microbiology, Faculty of
Science, University of Yaounde I, P.O.
Box 812, Yaounde, Cameroon

Correspondence:
Maximilienne Ascension
(1) Department of Microbiology, Faculty
of Science, University of Yaounde I,
P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon
(2) Equipe glyco et nanovecteurs pour le
ciblage thérapeutique, University of
Montpellier, IBMM UMR 5247 CNRS-
UM. 15 avenue Charles Flahault, BP
14491, FR-34093 Montpellier Cedex 5,
France

Anti-mycobacterial efficacy of three essential oils from medicinal plants currently used traditionally to treat tuberculosis in Cameroon

Esther Del Florence Moni Ndedi, Jean Paul Assam Assam, Maximilienne Ascension, Nyegue, Gaizirène Egoume Feudjieu, Veronique Penlap Beng and François-Xavier Etoa

Abstract

The designed study carries out an ethnopharmacology survey of medicinal plant used to treat tuberculosis and asses the anti-mycobacterial efficiency of three of their plant essential oils against three strains of *Mycobacterium tuberculosis*. The ethnopharmacological study was carried out in two localities of Nkam Division where plants specimens were collected. Three plants were selected, and their essential oils were obtained by hydrodistillation and analysed by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Anti-mycobacterial activity of these essential oils was evaluated against four resistant isolates using the microdilution method. Twelve plants were collected; the most used were *Drypetes gossweileri* S. Moore (*Putranjivaceae*), *Pentadiplandra brazeana* Baill (*Pentadiplandraceae*) and *Allium sativum* L (*Amaryllidaceae*). Benzyl isothiocyanate was the major component in *D. gossweileri* and *P. brazeana* essential oils at 91.27% and 96.00% respectively and with 2-methylpropenyl trisulfide at 51.02% methylallyl trisulfide (12.8%), diallyl sulfide (11.1%) for *A. sativum*. The essential oils of *A. sativum* and *P. brazeana* essential oil exhibited it higher activity with minimum inhibitory concentrations (MIC) of 78.12 µg/mL and 312.50 µg/mL against extensively resistant isolate while highest activity of *D. gossweileri* was against Isoniazid resistant isolate with MIC of 156.25 µg/mL. The results justified the traditional usage of these plant by Nkam populations for treating tuberculosis cases.

Keywords: Ethnopharmacological survey, essential oils, anti-mycobacterial efficacy

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an airborne infectious disease caused by the complex of *Mycobacterium tuberculosis* bacteria which generally affects lungs [1, 2]. The World Health Organization (WHO) estimated 9.3 million new cases and 13.7 million chronic active cases responsible for 1.7 million deaths worldwide yearly [3]. Despite the progress in TB diagnosis, treatment and prevention efforts, the proportion of TB cases living with HIV is still on rise in Africa region where about 81% of people had been notified among men, women and children [3]. The cause being that, the majority of *Mycobacterium* species are resistant to the most widely used therapeutic agents in TB treatment. Thus, there is an urgent need for new efficient antimycobacterial agents to replace or supplement those currently used. Plant components have received considerable attention as potential anti-TB agents during the last years with recent reviews showing their anti-mycobacterial potency [4]. Most *in vitro* and *in vivo* studies presented the therapeutic effect of new plant components against resistant and non-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [5, 6, 7]. In Cameroon, many people often used auto medication by plant traditional medicines to avoid the expensive cost of drugs or illness recidivism; such plants should be identified and screened in the basis of traditional knowledge to show their efficacy in the treatment of TB. Some reports mentioned the antimicrobial effects of Cameroonian plant but just few have been focusing on their antimycobacterial and fewer on the antimycobacterial activities of their essential oils [8, 9, 10]. This work reports the *in vitro* antimycobacterial evaluation of three essential oil plants identified during an ethnopharmacological survey carried out in two localities of Nkam Division in Littoral Region of Cameroon.

2. Materials and methods

2.1. Ethnopharmacological survey

2.1.1. Area of study

Between 4°0-5°10 Latitude North and 9°35-10°35 Longitude East, the Nkam Division is one of the four Departments that constitute the Littoral region in Cameroon and has five subdivisions as show in Figure 1. It is localized along three rivers: the Makombè, Nkam and Dibamba with the predominant soil is rich in iron lithosol covered by a huge forest vegetation. This site has high humidity climate with an average temperature between 23 and 29 °C and annual precipitation between 2900 and 3000 mm. It covers an area of 6291 km² with total population of 66,979 inhabitants, and as in many other localities of Cameroon, people use plant traditional medicine more than conventional medicine. The study has been carried out in two localities of Nkam Division Yabassi and Nkondjock subdivisions, with the accord of the traditional rulers (chiefs and quarter heads) permitting or support our study.

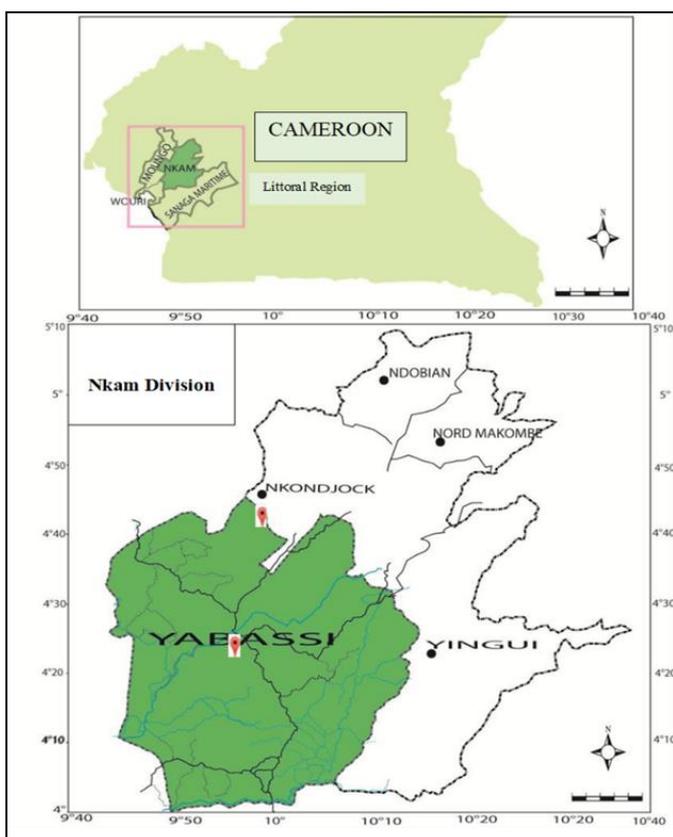


Fig 1: Geographical localization of Nkam and Nkondjock subdivisions in Littoral Region

2.1.2. Collection of ethnopharmacological information and plant sampling

The ethnobotanical information of plant specimens traditionally use for the treatment of tuberculosis were collected using the method described by Jovel *et al.*, consisting of general conversation and question aires [11]. The respondents were traditional healers, herb sellers and other villagers who had practical knowledge in the use (recipe and administration route) of medicinal plants for the treatment of tuberculosis uses. Data collected included some vernacular or local names of plants, parts of the plant used and the methods of preparation and administration. The specimens of medicinal plants indicated by informants were collected during the period of October and November 2015, identified

at the National Herbarium. The frequency of the plants commonly used was calculated and the essential oils of the most recurrent plants were extracted and subjected to antimycobacterial tests.

2.2. Essential oil extraction Procedure

The essential oils of each plant material were extracted by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus for 5 h then, dried over anhydrous sodium sulfate and further stored at 4 °C until used. The extraction yields were calculated as the ratio of the mass of essential oil to the mass of the starting plant material expressed as a percentage.

2.3. Chemical Analysis of essential oils

2.3.1. Essential oils Analysis

Essential oils were analyzed by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS) as described by Agnani *et al.* [12].

2.3.2. Gas Chromatography (GC). GC

Analysis was performed on a Varian gas chromatograph, model CP-3380, with flame ionization detector containing two silica capillary columns: HP5 J&W Agilent (5%-Phenylmethylpolysiloxane) capillary column (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film) and Supelcowax 10 (polyethylene glycol) fused capillary column (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film); N₂ was the carrier gas at 0.8 mL/min; injection type 0.1 μL of pure sample, split ratio 1:100; injector temperature 220 °C, detector temperature 250 °C; temperature program 50-200 °C at 5 °C/min, then kept at 200 °C for 10 min. The linear retention indices of the components were determined relative to the retention times of a series of n-alkanes. The entire set up was coordinated by Chromeleon (version 7.4) software system that ensured its functioning and follow-up of the chromatographic analysis.

2.3.3. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS). GC-MS

Analyses were performed using a Hewlett Packard 5890 II gas chromatograph, interfaced with a quadrupole detector (Model 5972) and equipped with a HP-5 MS capillary column (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 μm). Helium was the carrier gas, at a flow rate of 0.6 mL/min. Injector and MS transfer line temperatures were 220 °C and 250 °C, respectively. The oven program temperature was the same as that used in the GC-FID analyses. Diluted samples (10:100 in CH₂Cl₂, v/v) of 1 μL were injected manually and in a split mode (1:100). The MS was operated in the EI mode at 70 eV, in the m/z range 35–300; electron multiplier 1460 eV; scan rate, 2.96 scan/s.

2.3.4. Qualitative Analysis

The identification of the constituents was assigned on the basis of a comparison of their relative retention indices, calculated with reference to a series of n-alkanes (C₉–C₂₂), and their mass spectra with those of the standards (for main components). Those found in the literature and supplemented by the NBS75K database and Wiley 7th NIST 2014 EPA/NIH Mass Spectral Library Upgrade (provided by Hewlett Packard with the GC/MS control and data processing software) [13, 14].

2.4.5. Quantitative Analysis

The percentage composition of the essential oils was computed by the normalization method from the GC-FID peak areas, assuming an identical mass response factor for all compounds [13, 14].

2.4. Anti-mycobacterial Activities

2.4.1. Chemical Reagents and Solvents

Glycerol and Tween 80 were purchased from Sigma-Aldrich (France). The Middlebrook 7H9 OADC supplement and Alamar Blue were purchased from Becton Dickinson (USA). All other reagents and solvents were of analytical grade.

2.4.2. Essential oils and Anti-tuberculosis

Drugs Solutions. Stock solutions of essential oils were dissolved in the 7% tween 80 solution at the concentration of 20000 µg/ mL. Stock solutions were kept at -20 °C until use. Standard anti-tuberculosis agents: Isoniazid (INH) and Rifampicin (RIF) were procured from commercial source (Becton Dickinson and company Spark, U.S.A). Stock solutions were prepared in sterile distilled water at 1000 µg/mL and sterilized by filtering through 0.20 µm membrane filter (Minisart).

2.4.3. Mycobacterium Strains and Growth Conditions

Four *Mycobacterium tuberculosis* is resistant strains were used for this study. Two of them, AC₄₅ an Isoniazid resistant strain and AC₇₉ a Rifampicin resistant strain, were isolated from patients in a tuberculosis surveillance framework in the South region of Cameroon. Their sensitivity to antibiotics has been provide using Line Probe Assay genotype (Hain Life science kits) test at the Laboratory for Tuberculosis Research of the Biotechnology Centre of University of Yaoundé I. Meanwhile *M. tuberculosis* is multi-resistant MJ and extensively drug resistant strain (XDR) UJ was provided by *Centre Pasteur du Cameroun*. They have been isolated from patients in the tuberculosis surveillance program of PNLT in the course of the year 2016 (*Programme National de Lutte Contre la Tuberculose*) and the sensitivity to first line and second line antibiotics was obtain using antibiogram in automatized system Bactec MGIT 960 culture. These bacterial strains were maintained on slants of both Löwenstein Jensen medium and Löwenstein Jensen medium supplemented with pyruvate (Himedia, India).

2.4.4. Preparation of Inoculum for Biological Assay

From this solid media cultures, a suspension was prepared in Middlebrook 7H9 broth lot N°0000203601 (Himedia, India), containing 0.2% v/v glycerol, 0.05% v/v tween 80 (Sigma-Aldrich, France) and 10% v/v of Middlebrook 7H9 OADC supplement (*oleic acid-albumin-dextrose-catalase*; Becton Dickinson, USA). The suspension was adjusted to turbidity compared to a 0.5 McFarland standard (10⁵–10⁷CFU/mL). Prior to antimycobacterial assay, the absence of contamination was confirmed by culturing in the Brain and Heart Infusion (BHI) agar medium and using Ziehl-Neelsen staining [15, 16].

2.4.5. In vitro Anti-mycobacterial Assessment of Essential oils

The geometric serial broth micro dilution method was carried out according to the Microplate Alamar Blue Assay (MABA) described previously by Collins and Franzblau and modified by Jimenez-Arellanes *et al.* [17, 18]. Stock solution was then added to Middlebrook 7H9 broth to reach final samples concentrations ranging from 10000 µg/mL to 156.25 µg/mL. Serial dilutions were inoculated with mycobacteria inocula (10⁶ cells/mL prepared from the Middlebrook 7H9 Broth) to obtained concentration ranging from 2500 µg/mL to 78.15

µg/mL. Each of the 96-wells microtiter plates was mixed and incubated at 37 °C for 7 days. Positive controls consisted of Rifampicin and Isoniazid at 250 µg/mL to 7.815 µg/mL and negative controls was contained no drugs and blank contained no inoculum and nor drug. The concentration of tween 80 in the assay was maintained at a concentration to ensure that the effect on bacterial growth was minimal. Upon incubation periods, 20 µL of 0.02% resazurin salt solution were added to individual wells and the plates reincubated for one additional day and checked for colour change. Change in resazurin color from blue to pink indicated reduction of the indicator and thus bacterial growth.

The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of samples at which the microorganism did not demonstrate growth [19]. All the experiments were repeated three times using Isoniazid (INH) and Rifampicin (RIF) were used as antibiotic of reference.

2.4.6. Determination of anti-mycobactericidal effect

Mycobactericidal effect of essential oils and standard drugs on pathogens was determined by dilution methods [19]. The Minimal Bactericidal Concentrations (MBC) of promising essential oils was assessed by sub-culturing MIC test microtiter plates on Middlebrook broth 7H9 medium. The MBC was considered as highest dilution or lowest concentration at which no growth occurred in the medium. The anti-mycobacterial effect was deemed bactericidal or bacteriostatic depending on the ratio: MBC/MIC. Indeed, if MBC/MIC=1-2, the effect is bactericidal and if MBC/MIC=4-16, the effect is bacteriostatic [18].

3. Results & Discussion

3.1. Ethnobotanical survey

The ethnopharmacological survey included 14 respondents and yielded 12 species of plants from 07 families (Table 1). All the plant collected during the conversation with the respondents were available; most of them were found in the forest, around the home or brought from local market. Plants and plant parts mentioned by the respondents are outlined in Table 1. The results showed that most of the plant are used in association with others for treating tuberculosis except *Allium sativum* (bulb) *Pentadiplandra brazzeana* (roots) and *Drypetes gosseweileri* (stem barks) which usually being used alone. The most representative family of plant species were *Lamiaceae* (02); *Amaryllidaceae* (02); *Asteraceae* (02) and *Zingiberaceae* (02). A previous study carried out by Mpondo *et al.*, around eleven localities of Center region of Cameroon reported 192 plants used to treat respiratory diseases with 162 used in association with at least two plants [20]. This is probably due to the fact that, traditional treatments used by local population usually focus in the treatment of related symptoms associated to diseases. In fact, in our report we also found that *Zingiber officinale*, *Eucalyptus globulus*, *Ocimum gratissimum*, *Xylopiya aethiopica* and *Allium* are also prescribed in association with other plant to cure tuberculosis and their related symptoms as report by Betti and Mpondo *et al.* [20, 21]. We also found during the conversation that these same plants could also treat respiratory diseases related to tuberculosis such as cough and lung infections.

A. sativum and *A. cepa* (bulb), *E. globulus* (leaves), *A. daniellii* (seeds) and *Z. officinale* (rhizomes) were the meanwhile the main way of recipe for preparing and administering herbal remedies was decoctions or macerations for oral rout.

Table 1: The ethnobotanical survey of medicinal plants used to treat tuberculosis in two localities of Nkam divisions

Family names	Plant samples	Part of plant and identification codes	Common or Local names	Other local use	Recipe and admiration route	Previous screened activity	Number of plant citation
Amaryllidaceae	<i>Allium cepa</i> L.	Bulbs 25742/SRF	Ndjanga	Cough; lung diseases and spice	Decoction associate with <i>zingiber</i> , <i>Allium sativum</i> for oral route	Anti-inflammatory antioxidant activities of essential oils [22]	6
	<i>Allium sativum</i> L.	Bulbs 44810/HNC	Ail or Garlic	Lung diseases such as pneumonias, broncho pulmonary and spice	Maceration when alone or decoction when associate with <i>zingiber</i> for oral route	Antioxidant, anti-inflammatory activities of essential oils [22]	11
Annonaceae	<i>Xylopi aethiopica</i> (Dunal) A. Rich.	Seeds of fruits 59700/HNC	Ethiopian pepper	Treatment of cough, bronchitis; spice	Decoction with <i>Echinops giganteus</i> plant for oral route	Antibacterial activity of essential oil [10] antioxidant effects of aqueous extract [23].	3
Asteraceae	<i>Echinops giganteus</i> A. Rich.	Rhizomes 23647/SRF/CAM	Giant Japanese	Calm stomach ache and reduces asthma attacks spice.	Decoction associated with <i>Xylopi aethiopica</i> for oral route	Cytotoxicity of rhizome crude methanol extract [24]; antilavical activity of essential oils [25]	5
	<i>Ageratum conizoides</i> Line	Leaves 9503/SRF/CAM	Rois des herbes	Cough, stomach acheand wounds	Maceration or associated with <i>Aframamum danielli</i> and <i>Allium sativum</i> plant for oral route	Antibacterial and anti-germinative effect of essential oil [26]	1
Pentadiplandraceae	<i>Pentadiplandra brazzeana</i> Baill.	Roots 42918/HNC	Mgbandick	Aphrodisiac; spice; symptom of lung diseases	Used alone through decoction for oral route	Antimycobacterial activity of Methanolicextract against <i>M. tuberculosis</i> [81]; antifungal activity of essential oil [27]	5
Putranjivaceae	<i>Drypetesgosseweileri</i> S. Moore	Stem barks 25749/SRF/CAM	Nkot	Treat diarrhea; lung infections	Used alone through decoction for oral route	Antioxidant, anti-inflammatory [22] and antibacterial, germinative effects of essential oil [26]	3
Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulu s</i> Labill.	Leaves 4077/SRFK	Eucaluptus	Cough; bronchopulmonary attacks	Used with <i>Zingiber</i> and <i>Allium sativum</i> in decoction for oral route	Antibacterial effect of the essential oils [10]	7
Lamiaceae	<i>Ocimum gratissimum</i> Line.	Leaves 5817/SRF/CAM	Massep	Head ache; vaginitis bronchitis and lung infections	Decoction with <i>Eucalyptus</i> and <i>Zingiber</i> for oral and inhalation route	Antibacterial, anti-germinative effects of essential oil [26]	4
	<i>Thymus vulgaris</i> Line.	Aerial part 25746/SRF/CAM	Thyme	Cough;bronchopulmonary disorders; spice	Infusion with <i>Ocimum gratisimum</i> , <i>Zingiber</i> and <i>Aframamum danielli</i> for oral route and inhalation	Antibacterial and anti-germinative effects of essential oils [10, 26]	2
Zingiberaceae	<i>Aframomum danielli</i> Hook.f	Fruits 43130/HNC	Ndong	Spice; antipoison reduced alcohol effect and pnemonia	Infusion with <i>Ocimum gratisimum</i> , <i>Zingiber</i> and <i>Thymus vulgaris</i> for oral route	Antilarvicidal activities of essential oil [25].	6
	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe.	Rhizome 43125/HNC	Ndjinger	Cough;bronchopulmonary infection	Maceration, with <i>Ocimum gratisimum</i> and <i>Eucalyptus globulus</i> for oral route	Antibacterial and anti-germinative effects of essential oil [26]	13

3.2. Extraction Yields of the Essential oils.

The essential oils extraction from *A. sativum* bulbs produced the highest yield (0.2%) compared to those extracted from *D. gossweileri* stem-barks and *P. brazzeana* roots which yields 0.13% and 0.04% respectively. The difference between the extraction yields could be due to the impact of site and period of harvest. Nyegue *et al.* demonstrated that the extraction yield of essential oils of *P. brazzeana*, obtained by hydrodistillation can be influenced by the hydrodistillation time and hydrolysis mechanisms involving chemical skeleton of the gene, the pH and ascorbates level in the environmental conditions [28]. Montaut *et al.*, 2017 showed that the quantity of glucosinolates present in plant are broken down during hydrodistillation to give the ITC compounds of entire essential oil. These glucosinolates can vary in plants and influence the extraction yields of essential oils according to some factors such as vegetative cycle of plants, their genetic and soil environment [29]. The bulbs of *A. sativum* gave a yield of 0.2% which was similar to those found in previous studies conducted by Mnayer *et al.*, but higher than those found by Khadri *et al.*, (0.4%); Lawrence and Lawrence (0.09%) [30, 31, 32]. The difference between extraction yields would be due to the impact of site and period of harvest, duration of hydrodistillation and conditions of the plant materials. The soil type, vegetative cycle of plants and climate are the factors that can also influence the extraction yields of essential oils.

3.3. Chemical Composition of Essential oils.

The results from the chemical analysis of essential oils of *P. brazzeana* roots, *D. gossweileri* stem barks and *A. sativum* bulbs are presented in Table 2. This table showed aromatic compounds correlated with their relative percentage. The results of our investigation showed that *P. brazzeana* essential oil contained nine compounds representing 99.9% of the total essential oil where benzylisothiocyanate (91.3%) was the main compound as described by Ndoye *et al.* but at different percentage [22]. Analysis of the chemical compositions of the essential oil of *D. gossweileri* stem barks revealed five compounds representing 99.7% of the total essential oil and benzylisothiocyanate (96.0%) was the main component as in *P. brazzeana* essential oil. Similarly, the essential oils obtained from *D. gossweileri* shoots harvested in the Central Africa Republic and Gabon were analysed by Mvé-Mba *et al.* it appears from this work that their chemical composition is particularly simple, with only three constituents: benzyl isothiocyanate representing an amount of 54 to 94% and accompanied by benzyl cyanide and benzylaldehyde [33].

Instead of benzyl isothiocyanate, p-methoxybenzyl derivatives were present in *P. brazzeana* essential oil and absent in *D. gossweileri* indicating the presence of a lower quantity of p-methoxybenzylglucosinolate of which according to Nyegue *et al.*, and Montaut *et al.*, is broken down during hydrodistillation to give these derivatives [28, 29]. *P. brazzeana* roots and *D. gossweileri* stem barks have in common a higher percentage of glucosinolate type compounds (benzyl glucosinolate) which justified the presence of benzyl isothiocyanate as common main derivative component in their essential oils [29]. Even if many studies confirmed benzylisothiocyanate at 99.7% as the main compounds of *P. brazzeana* roots essential oils, Nyegue in 2006 has reported that from the two samples of *P. brazzeana* roots harvested at Nsimeyong and Mount Eloundem (centre region of Cameroon) 4-methoxybenzylcyanide (47.7%) and benzylcyanide (55.0%) respectively were identified in their essential oils [27]. This can be explained in part that 4-methoxybenzylcyanide and benzylcyanide from the degradation of 4-methoxybenzyl glucosinolate and benzyl glucosinolate respectively reason why present in higher proportion in these two samples. Sometimes in aqueous media during the hydrodistillation at different pH, there is a high instability of arylaliphaticisothiocyanate compounds which can yield to these two compounds as reported by Nyegue *et al.* and De Nicola *et al.* describe [28, 34].

Concerning *A. sativum* bulbs essential oil, 22 components were identified, representing 99.4% of the total essential oil. The five major components of this oil were 2-methylpropenyl trisulfide (51.0%), allyl methyl trisulfide (12.8%), dimethyl trisulfide (11.1%), diallyl trisulfide (8.4%) and allylpropyl disulfide (5.0%). The chemical profile of essential oil from *A. sativum* bulbs showed 96.6% of allyl derivatives showing an accordance with results obtained by Mnayer *et al.*, and Ndoye *et al.*, but where diallyldisulfide and diallyltrisulfide represented 38.0% and 41.7% respectively [22, 30]. The variation of major compounds found in essential oil from *A. sativum* could depend to the geographical origin, type of climate and soil as Table 2 shown. Moreover, Satyal *et al.* put in evidence that the chemical profile of *A. sativum* essential oil could have slide modifications depending to the process by which it is extracted [35]. In fact, the GC-MS analysis of essential oils of *A. sativum* bulbs extracted by three different process showed the majority presence of diallyltrisulfide ranging from 10.3 to 2.8%, diallyl disulphide 12.2 to 4.4%, allyl methyl trisulfide 13.2 to 7.9% and allyl (E) -1- propenyl disulfide 11.6 to 7.9% [35].

Table 2: Major components of *A. sativum* essential oil according to its geographical origin

Compounds (%)	Geographical origin					
	Spain [36]	Egypt [37]	Serbia [38]	Tunisia [39]	France [30]	Greece [40]
Diallyl sulfide	-	-	-	-	6.6	-
Diallyl disulfide	20.8	25.2	28.1-49.1	49.1	37.9	23.1-28.4
Diallyltrisulfide	33.4	21.1	30.4-33.6	30.4	28.1	18.2-22.1
Diallyltetrasulfide	-	-	-	-	4.1	-
Allyl methyl trisulfide	4.4	-	-	-	3.7	8.5-11.2
Allyl methyl disulfide	19.2	23.8	17.8	-	7.3	16.3-17.5
Allyl (E)-1-propenyl disulfide	5.2	-	-	-	-	-

Table 4: Relative percentages of constituents of essential oils from *D. gossweileri* stem-barks, *P. brazzeana* roots and *A. sativum* bulbs.

N°	Components	LRI	Relative percentage (%)			Identification methods	
			LRI	<i>P. brazzeana</i> roots	<i>D. gossweileri</i> stem barks		<i>A. sativum</i> bulbs
1	1, 2-Dithiolane	821	–	–	–	0.2	GC,RI
2	Diallylsulphide	862	–	–	–	0.2	GC,RI
3	Methylpropyl disulfide	927	–	–	–	0.1	GC,RI
4	Benzaldehyde	948	960	0.6	0.2	–	GC,RI,MS
5	Diallylsulphide	981	–	–	–	11.1	GC,RI
6	(E)-1-Allyl-2-prop-1-en-1-yl sulfide	996	–	–	–	0.3	GC,RI
7	Allyl methyl disulfide	1001	–	–	–	0.6	GC,RI
8	Methyl propyl disulfide	1040	–	–	–	5.0	GC,RI,MS
9	4-Memethyl-1,2,3-thiolane	1057	–	–	–	0.4	GC,RI,MS
10	Allyl (E)-1-propenyldisulfide	1112	–	–	–	0.5	GC,RI
11	Benzylcyanide	1121	1138	3.6	3.1	–	GC,RI
12	p-Methoxybenzaldehyde	1151	–	0.2	–	–	GC,RI,MS
13	p-Methoxybenzylalcohol	1163	–	0.1	–	–	GC,RI,MS
14	2-Methylpropenyl trisulfide	1202	–	–	–	51.0	GC,RI
15	2-Venyl-4H-1,3-dithiine	1210	–	–	–	0.4	GC,RI
16	Methylallyl trisulfide	1261	–	–	–	12.8	GC,RI
17	Diallyl trisulfide	1279	–	–	–	1.0	GC,RI
18	Benzylisothiocyanate	1326	–	91.3	96.0	–	GC,RI,MS
19	p-Methoxybenzylcyanide	1334	–	0.1	–	0.9	GC,RI
20	p-Methoxyphenylacetone	1380	–	0.1	–	–	GC,RI
21	5-Methyl-1, 2, 3, 4-tetrathiane	1402	–	–	–	2.2	GC,RI
22	Triallyl disulphide	1441	–	–	–	8.4	GC,RI
23	p-Methoxybenzylisothiocyanate	1515	–	3.3	–	–	GC,RI
24	1,4-Dihydro-2,3-benzoxathium-3-oxide	1573	–	–	–	0.2	GC,RI
25	Propylallyl sulphide	1642	–	–	–	1.3	GC,RI
26	2-propenyl tetrasulfide	1649	–	–	–	0.7	GC,RI
27	Diallyl tetrasulfide	1701	–	–	–	1.3	GC,RI
28	4-methyl-1, 2, 3, 5, 6-plutathiopane	1805	–	–	–	0.2	GC,RI
29	Dibenzyl sulphide	1818	–	–	0.2	–	GC,RI
30	Benzophenone	1845	–	0.2	–	–	GC,RI
31	Methyl linolenate	1869	–	–	–	0.2	GC,RI
32	Cylooctasulfur	2004	–	–	0.6	–	GC,RI
	Total of compounds			99.9	99.7	99.4	

N°: elution order given on apolar column (HP-5); LRI: Linear Retention Index on apolar (HP-5) column; Identification methods: GC, identification based on co-injection with authentic sample; RI: Retention Indices; MS: identification based on comparison of mass spectrum with literature data; %: relative percentage; (–): not found.

3.3. Antimycobacterial Assay

The essential oils from *P. brazzeana*, *D. gossweileri* and *A. sativum* were evaluated against four resistant strains of *M. tuberculosis*. The results presented on Table 5 which showed anti-mycobacterial activity against resistant strains *M. tuberculosis* not significant as far as each strain is concerned with MICs ranging from 156.25 to 2500 µg/mL on AC45 and AC79; 78.12 to >5000 µg/mL on UJ [42]. Out of these essential oils, *D. gossweileri* exhibited its higher anti-tuberculosis activities on both the Isoniazid and Rifampicin resistant strains with MICs values of 156.25 and 1250 µg/mL respectively. The essential oil obtained from *P. brazzeana* roots and *A. sativum*, exhibited its higher anti-mycobacterial activity against the UJ strain with MIC of 312.5 µg/mL and 78.125 µg/mL respectively. Based on this result, these activities justified by the presence of antibacterial compounds in each essential oil such as isothiocyanate compounds and allyl sulfide compounds.

In fact, some study report that synthetic isothiocyanate compounds (ITC) exhibited significant activity against H37Rv *M. tuberculosis* and three resistant strains with the MIC ranging from 0.5 to 32 µg/mL [42]. Voundi *et al.*, put in evidence the inhibitory effect of *D. gossweileri* essential oil against four species of *Bacillus* and reported MIC ranging from 0.4 to 9.7 µg/mL and anti-germinative effect against all these *Bacillus* at 2 µg/mL [26]. Even though the mechanism by

which the ITC inhibits mycobacterial growth is still unknown, we can attribute the mycobacterial inhibition of the essential oil from *P. brazzeana* and *D. gossweileri* to compounds such as benzyl isothiocyanate, benzylcyanide and p-methoxybenzylisothiocyanate. It has been suggested that isothiocyanate groups can covalently cross-link to a cellular target [43]. The isothiocyanate derivatives have a very strong antimicrobial effect due to the R-N=C=S group in the molecule. This group has a high electrophilic central carbon, which can easily react with nucleophilic centers. Furthermore, it could cleave the disulfide bonds of proteins and attack free amino acids by oxidative reaction [44, 45].

Concerning the *A. sativum* essential oil, the results obtained showed a weak activity against MDR (MJ); AC45 and AC79 isolates with MIC of 5000 µg/mL and 2500 µg/mL respectively with significant activities against XDR (UJ) with MIC of 78.12 µg/mL. *A. sativum* essential oil showed higher activity than those reported by Viswanathan *et al.*, in a previous study against *M. tuberculosis* H37Rv, with a reduction of 97.40% of colony at 80000 µg/mL [46]. The inhibitory effect observed could be attributed to diallyl disulfide; diallyl trisulfide and their synergistic interaction between the compounds within the essential oil. Organosulfur compounds act by inducing membrane protein and lipid denaturation. The lipophilic properties of these compounds showed their ability to cross through the wall membrane of mycobacteria, induce

inhibition of DNA replication and perturbation of membrane proton motive force, loss of energy substrate (glucose, ATP) leading directly to death by lysis of bacteria [47]. Another mechanism attributed to the synergistic effects of the major

compounds and those represented in trace amounts is action could be the inhibition of amylase and protease production, which the toxin production by the bacteria, electron flow and result in coagulation of the bacterial cell content [48].

Table 3: Plant materials used for anti-mycobacterial activity, MICs and MBCs values of their essential oil, against resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* AC₄₅, AC₇₉, MJ and UJ.

Essential oils	Inhibition parameters (µg/mL)	AC ₄₅	AC ₇₉	MJ	UJ
<i>D. gossweileri</i>	MIC	156.25	1250	>5000	>5000
	MBC	2500	>5000	n.d	n.d
	MBC/ MIC	16	n.d	n.d	n.d
<i>P. brazzeana</i>	MIC	625	1250	2500	312.50
	MBC	2500	2500	5000	625
	MBC/ MIC	4	2	2	2
<i>A. sativum</i>	MIC	2500	2500	5000	78.12
	MBC	2500	>5000	>5000	312.50
	MBC/ MIC	1	n.d	n.d	4
Rifampicin	MIC	0.97	>1000	>1000	>1000
	MBC	7.81	n.d	n.d	n.d
	MBC/ MIC	8	n.d	n.d	n.d
Isoniazid	MIC	n.d	3.90	n.d	n.d
	MBC	n.d	15.625	n.d	n.d
	MBC/ MIC	n.d	4	n.d	n.d

MIC: minimal inhibitory concentration; MBC: minimal bactericidal concentration; >5000: not showing inhibition even at the highest test concentration of 5000 µg/mL; n.d: not determined; AC₄₅: Isoniazid resistant *M. tuberculosis* strain; AC₇₉: Rifampicin resistant *M. tuberculosis* strains; MJ: MDR *M. tuberculosis* strain and UJ: XDR *M. tuberculosis* strain.

4. Conclusion

The emergence and spread of multi-drugs resistant strains around the world making the control of tuberculosis difficult and looking for alternative or complementary as plant components solution could ameliorate this situation. *D. gossweileri*, *P. brazzeana* and *A. sativum* used by the population of Nkam division to treat tuberculosis showed anti-mycobacterial potential. The results obtained in this study can serve as a preliminary base results for ethnopharmacological research about used medicinal plant and their *in vitro* activity. Therefore, more attention should be given to research about the efficacy of Cameroonian aromatic and medicinal plants against the complex *Mycobacterium tuberculosis* is which could yield to information improvising the existence of this therapeutic practices.

5. Appendix

GC: Gas Chromatography; GC/MS: Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry; HIV: Human Immunodeficiency Virus; HBV: Human B Virus; HCV: Human C Virus; INH: Isoniazid; MABA: Microplate Alamar Blue Assay; MBC: Minimal Bactericidal Concentrations; MDR: Multi Drug Resistant; MIC: Minimum Inhibitory Concentration; OADC: Oleic acid–Albumin–Dextrose–Catalase; RIF: Rifampicin; TB: Tuberculosis; XDR: Extensively Drug Resistant; WHO: World Health Organization.

6. Acknowledgments

We are profoundly grateful to population of Nkam Division, the Biotechnology Centre of University of Yaounde I (Cameroon), Dr VOUNDI OLOGU Steve Henri for their assistance during the GC and GC/MS of essential oils, the Cameroon National Herbarium and the Institute of Biomolecules Max Mousseron (France) for their technical support.

7. References

1. WHO. World Health Organization. Memorandum No.

104 (May). Geneva.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> www.who.int/tb/publications/global_report/ 2008; 2009. Accessed, 2016.

- Mathys V. Contribution to the understanding of the molecular mechanisms of resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to anti-Tuberculous agents. Free University of Bruxelles: Belgium; 2010, 283.
- WHO. Global tuberculosis report. Geneva: World Health Organization, 2016. [http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2016_main_text.pdf.] Visited on 2017.
- Santhosh RS, Suriyanarayanan B. Plants: A Source for New Antimycobacterial Drugs. *Planta Med* 2014; 80:9-21.
- Zhang L, Li R, Li M, Qi Z, Tian J. *In vitro* and *in vivo* study of anti-tuberculosis effect of extracts isolated from *Ranunculi Ternati Radix*. *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases* 2014; 31:336-342.
- Messanga RE, NgonoBikobo DS, Abouem A Zintchem A, Mbabi NN, Moni NEDF, Betote DPH, *et al.* Rauvolfianine, a new antimycobacterial glyceroglycolipid and other constituents from *Rauvolfia caffra*. *Sond (Apocynaceae)*. *Natural Product Research*, 2017; ISSN: 1478-6419, 1478-6427.
- Woolhiser LK, Hoff DR, Marietta KS, Orme IM, Lenaerts AJ. Testing of Experimental Compounds in a Relapse Model of Tuberculosis Using Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Gene-Disrupted Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009; 53:306-308.
- Tekwu ME, Askun-Tulin, Kueté V, Nkengfack AE, Nyasse B, Etoa F-X, Antibacterial activity of selected Cameroonian dietary spices ethno medically used against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Ethnopharmacology* 2012; 142:374-382.
- Tiam ER, Ngono BDS, Auguste Abouem A Zintchem A, Mbabi NN, Moni NDF, Betote DPH, Nyegue MA, Atchadé AT, Pegnyemb DE, Bochet CG, Koert U.

- Secondary metabolites from *Triclisia gilletii* (De Wild) Staner (*Menispermaceae*) with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*.) *Natural Product Research*, 2017. ISSN: 1478-6419, 1478-6427.
10. Nyegue MA, Moni NEDF, Ndoyé-Foé F, Etoa F-X, Menut C. Bioactivity of essential oils from medical plants of Cameroon and their combination against infant diarrhea induced by bacteria. *African Journal of Traditional and Complementary Alternative Medicine*. 2017; 6:27-37.
 11. Jovel BS, Cabanillos J, Towers GHN. An ethnobotanical study of the traditional medicine of the Metizo people of Suni, Loreto Peru. *Journal of Ethnopharmacology*. 1996; 53(3):149-156.
 12. Agnanié A, Mounzeo H, Menut C, Bessière JM, Criton M. The essential oils of *Rinorea sub integrifolia* O. Ktze and *Drypetes osweileri* S. Moore occurring in Gabon. *Flavour and Fragrance Journal*. 2003; 18(3):207-210.
 13. NIST: National Institute of Standards and Technology. *Web Book of Chemistry: Standard Reference Database*. Number, 2014, 69. [Accessed 09 Nov 2015-12 Jan 2016].
 14. Adams RP. *Identification of essential oils by Gas Chromatography Quadrupole Mass Spectroscopy*. 4th edition, Carol Stream: Allured Publishing Corporation Illinois USA, 2012, 804.
 15. Hasan N, Yusuf N, Toossi Z, Islam N. Suppression of induced reactive oxygen species (ROS) and TNF- α mRNA expression in human monocytes by allicin. *FEBS Letters*. 2006; 580(10):2517-2522.
 16. Molina-Salinas GM, Ramos-Guerra MC, Vargas-Villarreal J, Mata-Cardenas BD, Becerril-Montes P, Said-Fernandez S. Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensiacernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Medical Research*. 2006; 37(1):45-49.
 17. Collins LA, Franzblau SG. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997; 41(15):1004-1009.
 18. Jimenez-Arellanes A, Meckes M, Ramirez R, Torres J, Luna-Herrera J. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants. *Phytotherapy Research*. 2003; 17(6):903-908.
 19. Clinical, Laboratory Standards Institute (C.L.S.I.). *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests methods for antimicrobial susceptibility testing for bacteria isolated from animals-Approved standard-Third edition – CLSI document M11-A7- Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2007.*
 20. Mpondo ME, Vandi D, Ngouondjou FT, Mvogo OPB, Embolo EE, Dibong SD. Contribution des populations des villages du centre Cameroun aux traitements traditionnels des affections des voies respiratoires. *Journal of Animal & Plant Sciences*. 2017; 5223-5242.
 21. Betti JL. Medicinal plants sold in Yaoundé markets, Cameroon. *African Study Monographs*. 2002; 23(2):47-64.
 22. Ndoyé FC, Tchintang TF, Nyegue MA, Abdou JP, Gbaweng AJ, *et al.* Chemical composition, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2016; 16:117.
 23. Etoudi CB, Kuaté D, Ngondi JL, Oben J. Anti-amylase anti-lypase and antioxidant effects of aqueous extracts of some cameroonian spices. *Journal of Natural Products*, 2010; 3:41-43.
 24. Kuaté v, Krusche B, Youns M, Voukeng I, Fankam AG, Tankeos S, *et al.* Cytotoxicity of some Cameroonian spices and selected medicinal plant extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011; 134(3):803-812.
 25. Pavela R, Maggi F, Mbuntcha H, Woguém V, Dongmo FHP, Womeni HM, *et al.* Traditional herbal remedies and dietary spices from Cameroon as novel sources of larvicides against filariasis mosquitoes? *Parasitology Response*. 2016; 115(12):4617-4626.
 26. Voundi SO, Nyegue MA, Lazar I, Raducanu D, Ndoyé FC, Stamate M, *et al.* Effect of Essential Oils on Germination and Growth of Some Pathogenic and Spoilage Spore-Forming Bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2015; 12(6):3-7.
 27. Nyegue MA. Chemical and biological properties of the essential oils of some aromatic and/or medicinal plants of Cameroon: evaluation of their antiradical, anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Universities of Montpellier II and Yaounde I: France/Cameroon; In French*, 2006.
 28. Nyegue MA, Montaut S, De Nicola GR, Pollin P et Menut C. Applying the hydrodistillation process to *Pentadiplandra brazzeana* Bail. Root: a chemical assessment. *Natural products research*, 2018. ISSN: 1478-6427, 4.
 29. Montaut S, De Nicola GR, Agnanié H, Issembe Y, Rollin P, Menut C. Probing for the presence of glucosinolates in three *Drypetes* spp (*Drypetes euryodes* Hiern), *Drypetes gossweileri* S. Moore, *Drypetes laciniata* Hutch.) and two *Rinorea* spp. (*Rinorea sub integrifolia* O. Ktze and *Rinorea Woermanniana* (Buttner) Engl) from Gabon. *Natural Product Research*. 2017; 31:308-313.
 30. Mnayer D, Fabiano-Tixier AS, Petitcolas E, Hamieh T, Nehme N, Ferrant C, *et al.* Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essential oils from the Alliaceae family. *Molecules*, 2014; 19(12):20034-20053.
 31. Khadri S, Boutefnouchet N, Dekhil M. Antibacterial activity evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* strains in Eastern Algeria. *Scientific Study and Research* 2010; 11(4):421-428.
 32. Lawrence R, Lawrence K. Antioxidant activity of garlic essential oil of *Allium sativum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2011; 1(3):51-54.
 33. Mvélé-Mba, Menut C, Bessière, Lamaty G, Nzé EL, Denamganai J. Aromatic Plants of Tropical Central Africa. XXIX. Benzyl isothiocyanate as major constituent of bark essential oil of *Drypetes gossweileri* S. Moore. *Journal of Essential Oil Research*. 1997; 9(3):367-370.
 34. De Nicola GR, Nyegue MA, Montaut S, Iori R, Menut C, Tatibouet A, *et al.* Profile and quantification of glucosinolates in *Pentadiplandra brazzeana* Baillon. *Phytochemistry*, 2012; 73:51-56.
 35. Satyal P, Craft JD, Dosoky NS, William N. Setzer. The Chemical Compositions of the Volatile Oils of Garlic (*Allium sativum*) and Wild Garlic (*Allium vineale*). *Foods* 2017; 6(63):10.
 36. Rao PGP Rao LJ, Raghavan B. Chemical composition of essential oils of garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Spices and Aromatic Crops*. 1999; 8(1):41-47.

37. Romeilah RM, Fayed SA, Mahmoud GI. Chemical compositions, antiviral and antioxidant activities of seven essential oils. *Journal of Applied Sciences Research*. 2010; 6(1):50-62.
38. Kocić-Tanackov S, Dimić G, Levic J, Tanackov I, Tepić A, Vujčić B, *et al.* Effects of onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) essential oils on the *Aspergillus versicolor* growth and sterigmatocystin production. *Journal of Food Science*, 2012; 77(5):278-284.
39. Chekki RZ, Snoussi A, Hamrouni I, Bouzouita N. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of *Tunisian garlic (Allium sativum)* essential oil and ethanol extract. *Med. Journal of Chemistry*. 2014; 3(4):947-956.
40. Kimbaris AC, Siatis NG, Daferera DJ, Tarantilis PA, Pappas CS, Polissiou MG. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason. Sonochem*. 2006; 13(1):54-60.
41. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004; 35:275-280.
42. Tajima H, Kimoto H, Taketo Y, Taketo A. Effects of synthetic hydroxyl isothiocyanates on microbial systems. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 1998; 62(3):491-495.
43. Wilson AE. Recherche d'isothiocyanates à intérêt fonctionnel et technologique chez le Brassicacées. [Thèse de Doctorat]. Université de Strasbourg, France, (In French.), 2011.
44. Hyltdgaard M, Mygind T, Meyer R. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 2012; 3:1-12.
45. Catia D, Alessia F, Andrea G. The potential role of garlic (*Allium sativum*) against the multi-drug resistant tuberculosis pandemic: A review. *Ann Ist Super Sanità*. 2011; 47(4):465-473.
46. Viswanathan V, Phadataré AG, Mukne A. Anti-mycobacterial and Antibacterial Activity of *Allium sativum* Bulbs. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014; 76(3):256-261.
47. Green E, Samie A, Obi CL, Bessong PO, Ndip RN. Inhibitory properties of selected South African medicinal plants against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 130(1):151-157.
48. Ratnakar P, Murthy S. Purification and mechanism of antitubercular principle from garlic (*Allium sativum*) active against isoniazid susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 1995; 10(1):34-8.

Available online on 15.04.2019 at <http://jddtonline.info>

Journal of Drug Delivery and Therapeutics

Open Access to Pharmaceutical and Medical Research

© 2011-18, publisher and licensee JDDT, This is an Open Access article which permits unrestricted non-commercial use, provided the original work is properly cited



Open Access

Research Article

Effects of Essential oil from *Drypetes gossweileri* S. Moore stem barks on Cell Release and DNA Synthesis of *Mycobacterium tuberculosis*

Moni Ndedi Esther Del Florence^{1*}, Nyegue Maximilienne Ascension^{1,3}, Assam Assam Jean Paul^{1,2}, Betote Diboue Patrick Hervé^{1,4}, Feudjieu Egoume Gaizirène^{1,2}, Penlap Beng Veronique², and Etoa François-Xavier¹

¹ Department of Microbiology, Faculty of Science, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon;

² Laboratory for Tuberculosis Research, The Biotechnology Centre, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon;

³ Equipe glyco et nanovecteurs pour le ciblage thérapeutique, University of Montpellier, IBMM UMR 5247 CNRS-UM. 15 avenue Charles Flahault, BP 14491, FR-34093 Montpellier Cedex 5, France;

⁴ Laboratory of Pharmacology, Centre For Research on Medicinal Plants and Traditional Medicine, Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies, P.O. Box 13033, Yaounde, Cameroon;

ABSTRACT

Background: In the recent years, the proliferation of multi-drug-resistant and extensively drug-resistant strain to tuberculosis (TB) suggests that efforts are required to find alternative treatments. The designed study aimed to show the effects of essential oils (EO) from *Drypetes gossweileri* stem barks on *Mycobacterium tuberculosis* cell membrane release and DNA synthesis. **Methods:** The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) were determined against two clinical isolates (IS53 and IS310) and the reference strain H₃₇Rv ATCC 27294 using microdilution method. The effect of essential oil on cell membrane release of *Mycobacterium tuberculosis* was evaluated by measuring DNA, RNA and proteins release in extracellular medium using NanoDrop 1000 spectrophotometer to show the membrane integrity lose. The effect on DNA was performed by measuring genomic DNA and amplicons of MIRU 04 sequence produced when treated at MICs and MBCs concentrations to put in evidence the inhibitory effect of EO during DNA synthesis. **Results:** The results revealed that EO from *Drypetes gossweileri* stem barks exhibited strong activity with MIC ranging from 4.88 µg/mL against H₃₇Rv and IS310 to 9.76 µg/mL against IS53. The significant release of DNA, RNA and proteins in extracellular medium were observed for treated cells at MIC and MBC concentrations compare to untreated cells. The most quantified biomolecules were proteins with concentration ranging from 370.9 10⁴ ng/µL to 10630.0 10⁴ ng/µL released at MIC concentration which increased from 1890.0 10⁴ ng/µL to 12000.9 10⁴ ng/µL at MBC. The inhibitory effect of DNA synthesis by EOs enhanced lower quantity of DNA for all treated cells at MIC and MBC compare to untreated cells. The results obtained in this study enabled the identification of two cellular targets (cell membrane and DNA) of EO from *D. gossweileri* stem barks on *M. tuberculosis*.

Keywords: Antimycobacterial, Cells release, DNA inhibition, Essential oil.

Article Info: Received 25 Feb 2019; Review Completed 05 April 2019; Accepted 09 April 2019; Available online 15 April 2019



Cite this article as:

Moni NEDF, Nyegue MA, Assam Assam JP, Betote DPH, Feudjieu EG, Penlap BV, Etoa FX, Effects of Essential oil from *Drypetes gossweileri* S. Moore stem barks on Cell Release and DNA Synthesis of *Mycobacterium tuberculosis*, Journal of Drug Delivery and Therapeutics. 2019; 9(2-s):319-324 <http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v9i2-s.2644>

*Address for Correspondence:

Moni Ndedi Esther Del Florence, Department of Microbiology, Faculty of Science, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon;

INTRODUCTION

Antibiotic resistance remains a considerable problem for tuberculosis (TB) treatment, despite the introduction of new antitubercular drugs into therapy¹. This situation is very alarming and drug therapy research is an urgent need in the process of management and control of tuberculosis treatment². Therefore, efforts are required to search for new molecules to prevent the spread of the disease. In Africa, applications of traditional knowledge or use of plant extracts in medicinal practices can provide an excellent database for the potential identification of sources new lead compounds with bioactive properties in the field of anti-TB

agents. An ethnobotanical survey on anti-TB potential of medicinal plants have been reported and *Drypetes gossweileri* S. Moore is one of the twelve used in two localities of Nkam Division (Littoral region of Cameroon)³. *Drypetes gossweileri* S. Moore is a dioic plant of the *Euphorbiaceae* family with an average size of about 30 to 40 meters⁴. Several parts of plants are also used in traditional medicine to treat fever, malaria, intestinal worms and respiratory infections in Central Africa⁵. Glucosinolates are sulfur-containing compounds found in stem barks such as glucosinalbin (4-hydroxybenzyl) and glucotropaeollin (benzyl glucosinolate)⁶. These glucosinolates compounds give isothiocyanate, nitrile and thiocyanate derivatives

through enzymatic pathway depending on pH. Isothiocyanates compounds (ITC) released during extraction of essential oil by hydrodistillation process are the most abundant and reactive compounds^{7,8}. Some researchers argued that isothiocyanates derivatives play protective role in plant and many studies focus on the medical properties in cancer prevention and food preservatives⁹⁻¹². Furthermore, natural and synthetic isothiocyanates have showed antibacterial activities against *Escherichia coli*, *Clostridium difficile* and antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* W, H₃₇Rv, P and AB strains^{3,13-16}. In addition to that, essential oil from *D. gossweileri* stem barks has several biological activities such as antigerminative effect on *Bacillus* spore, antioxidant, antiinflammatory and antimycobacterial activity against resistant strains^{3,4,12}. Though high number of studies on the EOs activities have been performed on the investigation of its specific bacterial target (s), no previous studies have yet reported the cellular targets of *D. gossweileri* plant or its causing effects on *Mycobacterium tuberculosis*¹⁷. Nevertheless, Sieniawka *et al.*, demonstrated that the essential oil from *Mutellina purpurea* L. and its main constituents at MIC might exert morphological changes in the overall *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra cell shape and cytoplasm homogeneity¹⁸. Dwivedi *et al* in 2013 proved that khusenic acid and khusimol two sesquiterpenes of *Vetiveria zizanioides* essential oil showed their antimycobacterial activity by binding to mycobacterial 2Y3P and 1E11 subunits of DNA gyrase¹⁹. Based on the results of our previous findings on the antimycobacterial activity of essential oil from *D. gossweileri* stem barks³, the present investigation was to show its effects on *Mycobacterium tuberculosis* membrane integrity and DNA synthesis.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and chemical Analysis of essential oil

Drypetes gossweileri stem barks were identified at Cameroon National Herbarium under the code 25749/SRF/CAM during a previous study carried out by Moni *et al*³. The essential oil was obtained by hydrodistillation using Clevenger apparatus and analysed by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography associated with Mass Spectrometry (GC-MS) as describe by Moni *et al*.

Anti-mycobacterial Activities

Chemical Reagents and Solvents

Glycerol and Tween 80 were purchased from Sigma-Aldrich (France). The Middlebrook 7H9 OADC supplement and Alamar Blue were purchased from Becton Dickinson (USA).

Essential oils and Anti-tuberculosis

Drugs solutions. Stock solutions of essential oils were dissolved in the 7 % tween 80 solution at the concentration of 10 000 µg/mL. Stock solutions were aliquot and kept at -20 °C until use. Standard anti-tuberculosis drugs at 1000 µg/mL: Ofloxacin (OFX) N°GS030093 (TTM e.v, Germany) and Rifampicin (RIF) N°GS030035 (TTM e.v, Germany).

Mycobacterium Strains and Growth Conditions

Three *Mycobacterium tuberculosis* strains were used for this study; the H37Rv ATCC 27294 and two clinical isolates The IS53 and IS310. The sensitivity of IS53 to antibiotic has been provided using Line Probe Assay genotype (Hain Livfescience kits) test at the Laboratory for Tuberculosis Research of the Biotechnology Centre of University of Yaounde I during a previous work meanwhile the sensitivity profile of *M. tuberculosis* IS310 was unknow. These bacterial strains were maintained on slant of both Löwenstein Jensen

medium and Löwenstein Jensen medium supplemented with pyruvate (Himedia, India).

Preparation of Inoculum for Biological Assay

From this solid media cultures, a suspension was prepared in Middlebrook 7H9 broth lot N°0000203601 (Himedia, India), containing 0.2 % v/v glycerol, 0.05 % v/v tween 80 (Sigma-Aldrich, France) and 10 % v/v of Middlebrook 7H9 OADC supplement (*oleic acid-albumin-dextrose-catalase*; Becton Dickinson, USA). The suspension was adjusted to turbidity compared to a 0.5 McFarland standard (10⁵-10⁷ cfu/mL). Prior to antimycobacterial assay, the absence of contamination was confirmed by culturing in the Brain and Heart Infusion (BHI) agar medium²⁰.

In vitro Anti-mycobacterial Assessment of Essential oils

The geometric serial broth microdilution method was carried out according to the Microplate Alamar Blue Assay (MABA) as described previously by Collins and Franzblau and modified by Jimenez-Arellanes *et al.*^{21,22}. A stock solution was then added to Middlebrook 7H9 broth to reach final samples concentrations ranging from 5 000 µg/mL to 4.88 µg/mL. Serial dilutions were inoculated with mycobacteria inocula (10⁶ cells/mL prepared from the Middlebrook 7H9 Broth) to obtain concentration ranging from 2500 µg/mL to 2.44 µg/mL. Each 96 wells microtiter plates were mixed and incubated at 37 °C for 7 days. Rifampicin® and Ofloxacin® at 250 µg/mL to 0.244 µg/mL were used as reference. Upon incubation periods, 20 µL of 0.02 % resazurin salt solution were added to individual wells and the plates reincubated for additional 1 day and checked for colour change. Change in resazurin colour from blue to pink indicated reduction of the indicator and thus bacterial growth.

The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of samples at which the microorganism did not demonstrate growth²³.

The Minimal Bactericidal Concentrations (MBC) of promising essential oils was assessed by sub-culturing MIC test microtiter plates on Middlebrook broth 7H9 medium. The MBC was considered as highest dilution or lowest concentration at which no growth occurred in the medium.

Effects of essential oil from *D. gossweileri* on cell release and DNA synthesis *M. tuberculosis*

Effect on cell release

The leakage of biomolecules was determined in a previous study using spectrophotometric quantification of absorbents materials at 260 nm for nucleic acids and 280 nm for proteins²⁵. In this study, the biomolecules release by *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, clinical isolate IS53 and IS310 was determined by quantification of cellular materials released in extracellular medium, especially DNA, RNA and proteins using NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific)²⁵. Essential oil from *D. gossweileri* stem barks at the MIC and MBC concentration was added to the bacterial inoculum (10⁷cfu/mL) in sterilized Middlebrook 7H9 supplemented by 10 % of OADC (V/V) and then incubated at 37 °C. After seven days, 100 µL of mycobacterial samples were collected, homogenized and the supernatant was measured using NanoDrop 1000 spectrophotometer. All the measurements were performed in triplicate.

Statistical analysis

The statistical analysis was evaluated using SPSS software (version 20.0). One-way analysis of variance (ANOVA) was performed. The difference in DNA, ARN and proteins

released at MIC and MBC of EO were evaluated using Turkey test. The significant difference was $P < 0.05$ and the data were expressed as mean \pm SD.

Effect of EO from *D. gossweileri* on DNA synthesis

The effect on DNA synthesis was performed using DNA inhibition assay evaluated by quantification of total DNA and amplicons of MIRU 04 gene using NanoDrop 1000 Spectrophotometer. After seven days of culture at 37 °C with essential oil from *D. gossweileri* at MIC and MBC concentrations, total DNA was isolated from 50 μ L of *Mycobacterium tuberculosis* H37RV, IS53 and IS310 using QIAamp DNA Mini kit (Qiagen 51306, Germany). To show the effect of EO on DNA at MIC and MBC concentrations, the genomic DNA extracted were quantified using NanoDrop 1000. The ratio of absorbance at 260 and 280 nm was used to assess the purity of DNA. When the ratio at 260/230 was appreciably lower than the range of 1.8-2.2, this was indicated the presence of co-purified contaminants ²⁵. Inhibition effect was detected if the quantity of DNA from treated cells was lower than quantity of untreated cells.

Effect of EO from *D. gossweileri* on MIRU 04 gene

The MIRU 04 gene was amplify by PCR using MIRU 04 forward sequence 5'-GCGGAGAGCCCGAAGTGC-3' (H37302 46-52-87-20/480 Eurofins) and total DNA extracted. To show the effect of EO on MIRU 04 gene, its amplicons were quantified using Nanodrop 1000. When the ratio at 260/230 was appreciably lower than the range of 1.8-2.2, this was indicated the presence of co-purified contaminants ²⁵. The inhibition effect was detected if the quantity of DNA from treated cells was lower than untreated cells.

RESULTS

Antimycobacterial activity

The analysis of inhibitory activities showed that EO from *D. gossweileri* stem barks is more active against all *M. tuberculosis* strains used for the test with activity at 4.88 μ g/mL against H37Rv, IS310 and at 9.76 μ g/mL against IS53 as present in Table 1. These activities are bactericidal against H37Rv and bacteriostatic against the two isolates.

Table 1: Inhibition parameters of EO from *D. gossweileri* and Ofloxacin against *M. tuberculosis*

Strain	EO		Ofloxacin		Rifampicin	
	Inhibition parameters (μ g/mL)		MIC	MBC	MIC	MBC
H37Rv	4.88	9.76	31.25	62.50	0.48	1.95
IS53	9.76	39.06	62.50	125	0.48	1.95
IS310	4.88	78.12	7.81	7.81	125	250

Legend: MIC = Minimal inhibitory Concentration; MBC = Minimal Bactericidal concentration

2.2 Effects of essential oil from *D. gossweileri* on *M. tuberculosis*

2.2.1 Effects of essential oil from *D. gossweileri* on cell release

The cellular targets of EOs from plants in bacteria are scarce and the specific mechanism of action is still not completely

understood. The quantities of biomolecules (nucleic acid and proteins) present in extracellular medium are used to identify alterations of the cell membrane permeability. These quantities of biomolecules released by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, IS53 and IS310 exposed at MIC and MBC of essential oil concentrations are reported in figures 1, 2 and 3 below.

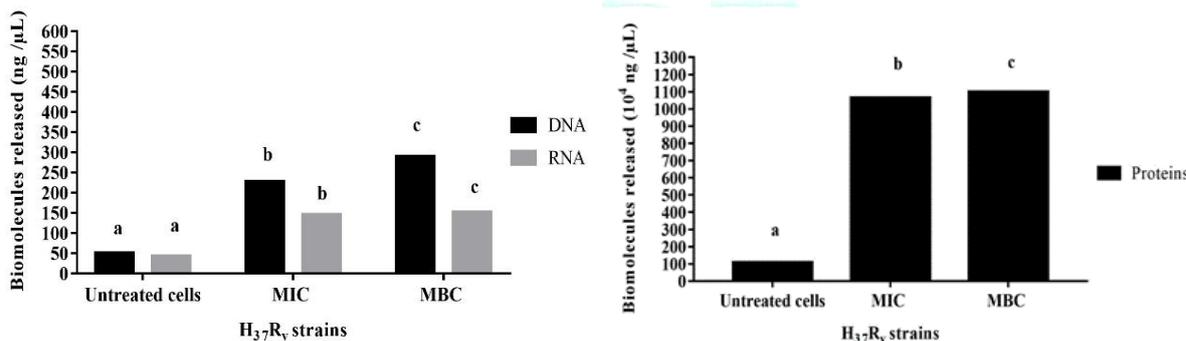


Figure 1: Quantity of biomolecules released by H37Rv treated with *D. gossweileri* EO

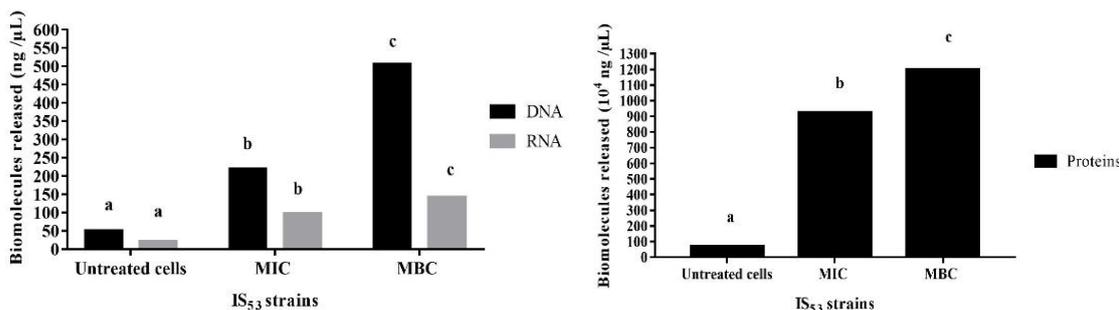


Figure 2: Quantity of biomolecules released by IS53 treated with *D. gossweileri* EO

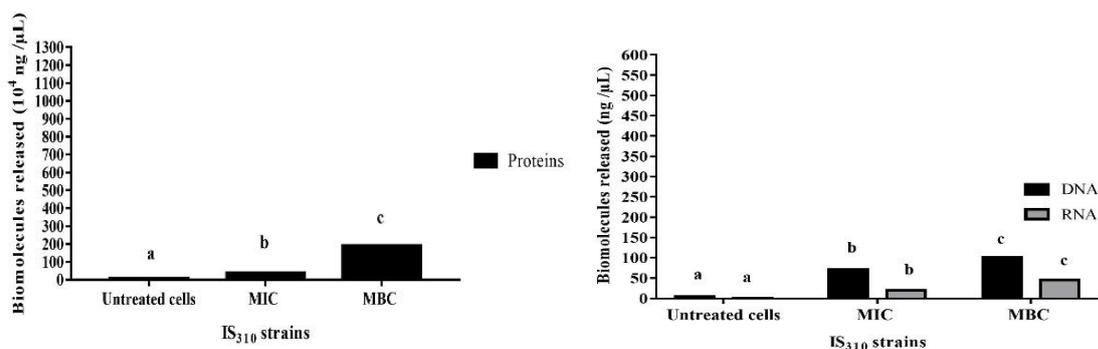


Figure 3: Quantity of biomolecules released by IS310 treated with *D. gossweileri* EO

The results showed that significant quantity of DNA, ARN and proteins was present in extracellular medium for treated cells at MIC concentration which increase at MBC concentration compared to untreated cells ($P < 0,05$). Proteins are the most released constituents with concentrations ranging from $5 \cdot 10^4 \pm 0.6$ ng/μL for IS310 to $107 \cdot 10^4 \pm 2.4$ ng/μL for H37Rv in untreated cells and from $37.9 \cdot 10^4$ ng/μL ± 0.27 for IS310 to $1200.9 \cdot 10^4 \pm 1.20$ ng/μL for IS53 in treated cells. Nucleic acids are released in extracellular medium with concentrations ranging from 70 ± 1 ng/μL at MIC in IS310 to 506 ± 2.03 ng/μL at MBC in IS53 for DNA and from 20.2 ± 0.11 ng/μL at MIC in IS310 to 151.6 ± 2.02 ng/μL at MBC in H37Rv for RNA.

2.3 Effects of essential oil from *D. gossweileri* on DNA synthesis

Regarding the effect of *D. gossweileri* essential oil on *M. tuberculosis* DNA synthesis, the results are presented by the series of figures 4 to 6. The analysis of these figures showed that the quantities of DNA and MIRU 04 amplicons are low for treated cells than untreated cells. In H37Rv, EO from *D. gossweileri* reduced DNA synthesis at concentration of 2.2 ng/μL at MIC, 0.2 ng/μL at MBC and reduced the amplification of MIRU gene to 70.0 ng/μL at MIC and 9.80 ng/μL at MBC. In IS53, the concentrations of DNA were ranging from 4.10 ng/μL at MIC, 0.70 ng/μL at MBC and reduced the amplification of MIRU 04 gene to 20.0 ng/μL at MIC and 4.10 ng/μL at MBC. In IS310, the concentrations of DNA were ranging from 5.01 ng/μL at MIC, 3.90 ng/μL at MBC and reduced the amplification of MIRU 04 gene to 26.90 ng/μL at MIC and 11.90 ng/μL at MBC.

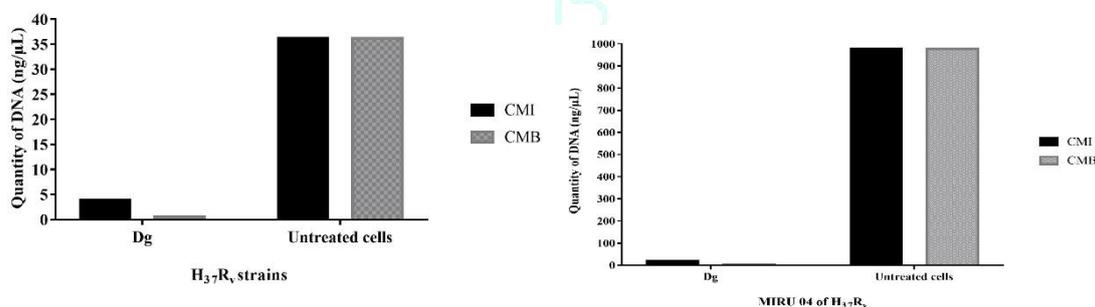


Figure 4: Inhibitory of DNA and MIRU 04 gene synthesis by EO from *D. gossweileri* on H37Rv

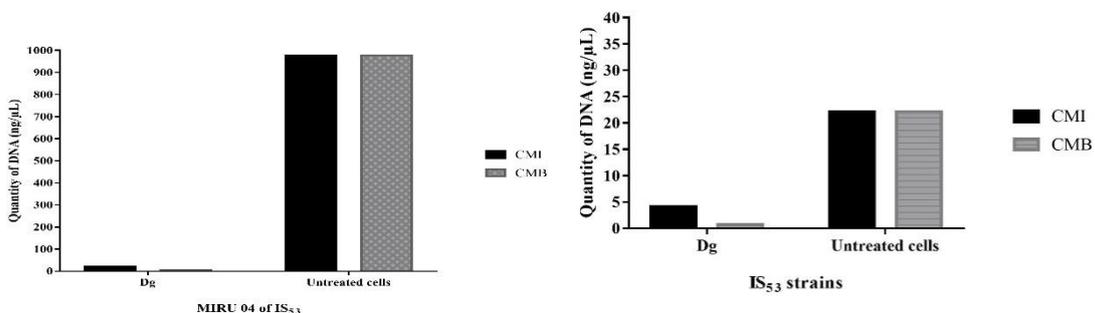


Figure 5: Inhibitory of DNA and MIRU 04 gene synthesis by EO from *D. gossweileri* on IS53

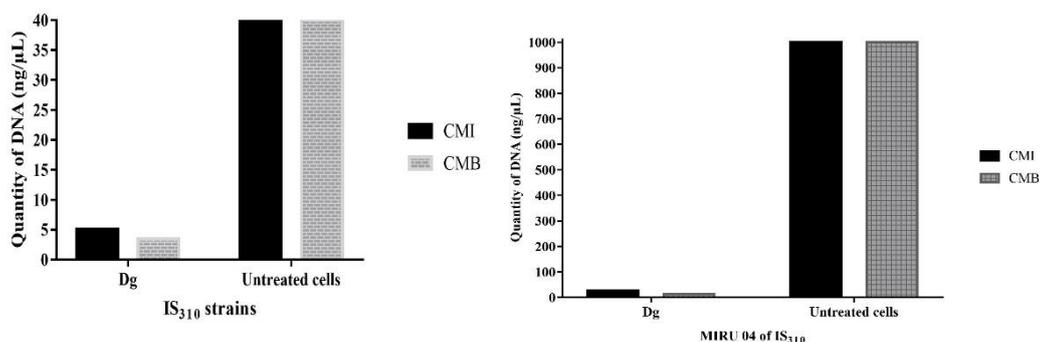


Figure 6: Inhibitory of DNA and MIRU 04 gene synthesis by EO from *D. gossweileri* on IS310

DISCUSSION

Antimycobacterial activity

Moni *et al* showed in a previous study that EO from *D. gossweileri* stem barks presented no activities against multi drug resistant and extensive drug resistant isolates MJ and UJ with MIC > 5000 μg/mL, less active against Isoniazid resistant isolate AC₇₉ with MIC of 1250 μg/mL, moderate against Rifampicin resistant isolate AC₄₅ with MIC 156, 25 μg/mL. EO from *D. gossweileri* stem barks exhibited antibacterial against four *Bacillus* species and antigerminative against their spore forming bacteria with bacteriostatic activities^{5, 7}. The activities are related to synergistic action of all compounds found in essential oil. Voundi, (2017) showed that *D. gossweileri* stem barks essential oil is more active than its lead compound benzyl isothiocyanate against germinative spores of four *Bacillus* species with MIC ranging from 4.88 to 9.72 μg/mL^{11, 12}. Although the antibacterial properties of essential oils *D. gossweileri* stem barks and their components have been reviewed against bacteria in the past, it has been suggested that isothiocyanates can covalently cross-links to cellular target like proteins or amino acids causing oxidation reactions^{11, 26}.

Effects of essential oil from *D. gossweileri* on *M. tuberculosis*

These results indicated that alterations of cytoplasmic membrane and may be cell wall occurred and leading to the loss of cell constituents such as protein and nucleic acids. In fact, the cytoplasmic membrane has a very important role in the maintenance of cellular homeostasis, as it controls the input and output of intracellular components. DNA, RNA and proteins are usually high in intracellular compartment of cell, their presence in extracellular medium means that membrane permeability has been loosen. Antimycobacterial studies of some essential oils compounds reveal that they caused morphological changes in the overall *Mycobacterium tuberculosis* cell shape and cytoplasm homogeneity resulting in destabilization of cell wall¹⁸. According to previous studies, due to their hydrophobicity and antibacterial properties, essential oils can disrupt the cell wall membrane causing the permeabilization, loss of ion or molecules and reduce membrane potential²⁴. More ever, EOs components can cause structural alterations of the outer envelope with promoting release of cellular biomolecules²⁷. Therefore, we concluded that one of the antimycobacterial effect of essential oil from *D. gossweileri* on *M. tuberculosis* was the alteration of membrane and cell wall then, leakage of intracellular absorbent materials which finally resulted in the bacterial death.

The quantities of DNA, RNA and proteins released by IS310 isolate exposed to *D. gossweileri* stem barks EO are lower

than those released by H37Rv and IS53 cells. This result reveals that IS310 isolate is more resistant to essential oil action compared to H37Rv and IS53 isolate. In fact, the activity of essential oil against this isolate is equal to those of reference strain H37Rv at MIC value but it lethal concentration is three times more than those of reference strain. More ever, the MIC value of Rifampicin at 125 μg/mL against IS310 is more than 32 μg/mL an indicating parameter of its resistant phenotype²⁸.

Since the concentrations of DNA produced by normal cells are 36. 20 ng/μL for H37Rv, 22,10 ng/μL for IS53 and 40.0 ng/μL for IS310, the concentrations of DNA in treated cells were ranging from 3.90 ng/μL for H37Rv to 5.10 ng/μL for IS310 at MIC, and reduced the amplification of MIRU 04 gene to 26.90 ng/μL and 70.0 ng/μL at MIC. This inhibition is correlated to the low quantities of DNA in treated cells which cannot allow the visualization in gel agarose profile compare to untreated. Since the concentrations of DNA produced by normal cells are 36. 20 ng/μL for H37Rv, 22,10 ng/μL for IS53 and 40.0 ng/μL for IS310, the concentrations of DNA in treated cells were ranging from 4. 10 ng/μL at MIC, 0.70 ng/μL at MBC and reduced the amplification of MIRU 04 gene to 20.0 ng/μL at MIC and 4.10 ng/μL at MBC cells. The effect of EO from *D. gossweileri* on MIRU 04 gene confirmed the hypothesis of DNA inhibition and may be a possible fragmentation action of DNA justified by the absence of MIRU 04 amplicons in treated cells but not visualized in agarose gel. Our results confirmed that some active constituents in *D. gossweileri* EO interfered directly or indirectly on DNA synthesis. Previous studies explained that isothiocyanates compounds have a very strong antimicrobial effect due to the R-N=C=S group in the molecule which can covalently cross-links to a cellular target²⁶. These covalent links on DNA can lead to DNA synthesis inhibition or alterations. Therefore, we concluded that another effect of essential oil from *D. gossweileri* stem barks against *M. tuberculosis* was inhibition of bacterial DNA synthesis. Many studies highlighted the action of EO from plants on DNA inhibition^{29, 30, 31}. Xu *et al.* demonstrated that the EO of clove buds at MIC might exert an inhibitory action of DNA replication leading to antibacterial action²⁷. Furthermore, Dwivedi *et al* in 2013 showed that khusenic acid and khusimol two sesquiterpenes of *Vetiveria zizanoides* essential oil got their antimycobacterial activity by binding with the Mycobacterial 2Y3P and 1E11 subunits of DNA gyrase¹⁹.

CONCLUSIONS

The results are important as the effects of essential oil from *D. gossweileri* on *Mycobacterium tuberculosis* was not reported previously. The effects show that essential oil from *D. gossweileri* presents significant antimycobacterial activity against virulent strain H37Rv and two isolates IS53 and IS310 of *M. tuberculosis*. Essential oil from *D. gossweileri*

inductivity is due to action of essential oil on cell membrane lysis and DNA inhibition. Essential oil from *D. gossweileri* cause alteration significant release of DNA, RNA and protein by *M. tuberculosis* at MIC and MBC.

Author Contributions: For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used "conceptualization, M.N.E.D.F. and N.M.A.; methodology, M.N.E.D.F. and A.A.J.P.; validation, N.M.A., A.A.J.P. and M.N.E.D.F.; formal analysis, B.D.P.H.; investigation, F.E.G.; writing—original draft preparation, M.N.E.D.F. and B.D.P.V.; supervision, P.B.V.; and E.F.-X.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We are profoundly grateful to the Biotechnology Centre of University of Yaounde I (Cameroon) for technical support and to Mr Djova Steve Valdi for his technical assistance and statistical analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

REFERENCES

- Zignol MC. Twenty years of global surveillance of antituberculosis-drug resistance. *N Engl J Med* 2016; 375: 1081–1089.
- WHO. (2018). Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Moni EDFN, Assam AJP, Nyegue MA, Feudjieu GE, Penlap BV, Etoa F-X. 2018. Anti-mycobacterial efficacy of three essential oils from medicinal plants currently used traditionally to treat tuberculosis in Cameroon. *American Journal of Essential Oil and Natural Products*. 6: 10-18.
- Ndoye F, Tchinnang TF, Nyegue A Abdou JP, Yaya AJ, Tchinda AT, Essame JO, Etoa FX. Chemical composition, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2016; 16: 117.
- Tchinda AT, Sob VST. *Drypetes gossweileri* S.Moore. In: Schmelzer, G.H. and Gurib-Fakim, A. (Editeurs). *Prota* 2008; 11(1) Medicinal plants/Plantes médicinales 1. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen).
- Montaut S, De Nicola GR, Agnanié H, Issembe Y, Rollin P, Menut C. Probing for the presence of glucosinolates in three *Drypetes* spp (*Drypetes euryodes* Hein) Hutch, *Drypetes gossweileri* S. Moore, *Drypetes laciniata* Hutch) and two *Rinorea* spp. (*Rinorea subintegriifolia* O. Ktze and *Rinorea Woermanniana* (Buther) Engl) from Gabon. *Natural Product Research* 2017; 31: 308-313.
- Nyegue MA, Montaut S, De Nicola GR, Pollin P, Menut C. Applying the hydrodistillation process to *Pentadiplandra brazzeana* Bail. Root: a chemical assessment. *Natural Product Research* 2018; ISSN: 1478-6427.
- Eyélé MC, Menut C, Bessière JM, Lamaty G, Nzé EL, Denamganai J. Aromatic Plants of Tropical Central Africa: Benzyl isothiocyanate as major constituent of bark essential oil of *Drypetes gossweileri* S. Moore. *Journal of Essential Oil Response* 1997; 9: 367-370.
- Traka M. and Mithen R. Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemical Review* 2009; 8 (1): 269-282.
- Blažević I, S. Montaut, F. Burčul, P. Rollin. Glucosinolates: novel sources and biological potential" In: K. G. Ramawat and J.-M. Mérillon, editors, Reference series in phytochemistry glucosinolates, 1st ed. Cham: Springer International Publishing 2017; 3-60.
- Adjélé EW. « Recherche d'isothiocyanates à intérêt fonctionnel et technologique chez les Brassicacées » Ph.D thesis in Analytical Chemistry, University of Strasbourg France 2011 ; 45-98.
- Voundi SO, Nyegue MA, Lazar I, Raducanu D., Ndoye F.C., Stamate M. et Etoa F-X. Effect of essential oils on germination and growth of some pathogenic and spoilage spore-forming bacteria. *Food borne Pathogens Diseases* 2015 ; 12: 3-7.
- Voundi O.S.H. Etudes des huiles essentielles des plantes pour le contrôle des spores de *Bacillus* dans les produits alimentaires. Ph.D thesis in Biochemistry, University of Yaoundé I 2017 ; 175.
- Kurepina N, Kreiswirth BN, Mustaev A. Growth inhibitory activity of natural and synthetic isothiocyanates against representative human microbial pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 2013; 115: 943-954.
- Tchinang KTF, Ndoyé FC, Nyegue MA. Caractérisation des huiles de *Pentadiplandra brazzeana* Bail (*Capparidaceae*) et évaluation de leurs activités antifongiques sur *Trichophyton rubrum*. *Biosciences Proceedings* 2013 ; 19 : 87-89.
- Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, Talalay P, Lozniewski A. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumours. *Proc Natl. Acad. Scien U.S.A.* 2002 ; 99 (11): 7610-615.
- Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46:1914–1920.
- Sieniawska E, Swatko-Ossor M, Sawicki R, Ginalska G. Morphological changes in the overall *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra cell shape cytoplasm homogeneity due to *Mutellina purpurea* L. essential oil and its main constituents. *Medical Principles and Practice* 2015; 24: 527–532.
- Dwivedi GR, Shikha G, Sudeep R, Komal K, Anirban P, Jay PT, Dharmendra S, Ashok S, Nandan S, Mahendra PD, Santosh KS. Tricyclic Sesquiterpenes From *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash as Antimycobacterial Agents. *Chemical and Biology Drug Design* 2013; 82: 587-594.
- Hasan N, N. Yusuf, Z. Toossi, Islam N. Suppression of induced reactive oxygen species (ROS) and TNF- α mRNA expression in human monocytes by allicin. *FEBS Letters* 2006 ; 580: 2517-2522.
- Collins LA, Franzblau SG. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 1997; 41: 1004-1009.
- Jimenez A, Meckes A, Ramirez M, Torres R, Luna-Herrera J. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phototherapy Research* 2003; 17: 903-908.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae* and other aerobic actinomycetes. Approved-second edition M24-A2 Wayne, 2011.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 2001; 91: 453-462.
- Desjardins, Conklin PD. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments* 2010; 45.
- Tajima H, Kimoto H, Taketo Y, Taketo A. Effects of synthetic hydroxyl isothiocyanates on microbial systems. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 1998; 62: 491-495.
- Zang Y, Yew WW. Mechanism of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *International journal of tuberculosis and lungs diseases* 2009; 13: 1320-1303.
- Hend AH. 2009. Monitoring of Antimicrobial Activity of Essential Oils Using Molecular Markers. *Open Biotech. J.* 3: 103-107.
- Xu J-G, Liu T, Hu Q-P and Cao X-M. 2016. Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 21: 1194 doi:10.3390.
- Abdullah BA, Husamuldeen SMS, Al-Taii NA. Antimicrobial activity and evaluation of genetic effects of olive leaves using molecular techniques, *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2018; 6: 1493-1495.
- El-Tablawy SY, Araby E. Impact of Marjoram (*Origanum marjorana* L.) Essential Oil on Some Virulence Factors and DNA Integrity of Multidrug Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 2017; 12: 63-71.