

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCES

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE

LABORATORY OF MICROBIOLOGY

Activités antimicrobiennes des extraits des plantes *Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala* sur *Vibrio cholerae* et *Aeromonas hydrophila* isolés du cours d'eau « Olézoa »

Mémoire rédigé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie

Option : Microbiologie du Sol et Environnement



Présenté Par :

TAKOUKAM MBA Gaele

Matricule : 16O2140

Licenciée-ès Sciences

Sous la codirection

De :

NOAH EWOTI Olive Vivien

Maître de Conférences

Et de :

ZEBAZE TOGOUET S. Hubert

Professeur

Année 2023

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCES

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE

LABORATORY OF MICROBIOLOGY

Activités antimicrobiennes des extraits des plantes *Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala* sur *Vibrio cholerae* et *Aeromonas hydrophila* isolés du cours d'eau « Olézoa »

Mémoire rédigé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie

Option : Microbiologie du Sol et Environnement

Présenté Par :

TAKOUKAM MBA Gaelle

Matricule : **16O2140**

Licenciée-ès Sciences

Sous la codirection

De :

NOAH EWOTI Olive Vivien

Maître de Conférences

Et de :

ZEBAZE TOGOUET S. Hubert

Professeur

Année 2023

SOMMAIRE

DEDICACE	iii
REMERCIEMENTS	iv
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES ABREVIATIONS	ix
RESUME	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	3
I. GENERALITES SUR LES BACTERIES DES GENRES <i>Vibrio</i> et <i>Aeromonas</i>	3
I.1. GENRE <i>Vibrio</i>	3
I.1.1. Taxonomie.....	3
I.1.2. Caractères morphologiques et cultureux	3
I.1.3. Ecologie de <i>Vibrio cholerae</i>	4
I.2. GENRE <i>Aeromonas</i>	5
I.2.1. Taxonomie et description	5
I.2.2. Caractères morphologiques	6
I.2.3. Ecologie.....	7
I.2.4. Facteurs de virulences et pouvoir pathogène	7
I.3. GÉNÉRALITÉS SUR LES ANTIBIOTIQUES	8
I.3.1. Définition	8
I.3.2. Classification des antibiotiques et mode d'action	8
I.3.3. Mécanismes de résistances aux antibiotiques	9
I.4. GENERALITES SUR LES PLANTES	10
I.4.1. Généralités sur la plante <i>Bidens pilosa</i>	10
I.4.2. Généralités sur la plante <i>Moringa stenopetala</i>	12
I.4.3. Méthodes d'extraction des métabolites	15
I.5. MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE	15
I.5.1. Méthode de dilution en milieu liquide	15
I.5.2. Méthode d'incorporation dans la gélose	16
I.5.3. Méthode de diffusion par disques (aromatogramme)	16
I.6. GÉNÉRALITÉS SUR LES ÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES	16
I.6.1. Problématique de l'accès à l'eau potable	16
I.6.2. Méthodes de remédiation de la pollution microbologique.....	17
I.6.3. Méthodes classiques de traitement des eaux	17
I.6.4. Traitement par les extraits de plantes	18

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	19
II.1. MATERIEL	19
II.1.1. Site d'étude	19
II.1.2. Matériel végétal	19
II.1.3. Matériel microbiologique.....	20
II.1.4. Matériel chimique	21
II.2. METHODES	21
II.2.1. Détermination qualitative des composés chimiques de <i>Bidens pilosa</i> et de <i>Moringa stenopetala</i> susceptibles d'avoir des activités antibactériennes	21
II.2.2. Evaluation de l'influence de la concentration, de la température, la durée d'incubation sur l'activité antimicrobienne des plantes	26
II.2.3. Efficacité de l'activité des extraits de <i>Bidens pilosa</i> et de <i>Moringa</i> <i>stenopetala</i>	31
II.2.4. Analyse des données	33
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	34
III.1. RESULTATS	34
III.1.1. Métabolites secondaires des plantes susceptibles d'avoir des activités antibactériennes	34
III.1.2. Activité antibactérienne des extraits: évaluation de la concentration, la température et la durée d'incubation	37
III.1.3. Efficacité de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes	45
III.1.4. Corrélation «r» de Spearman entre les différentes variables considérées.....	46
III.1.5. Comparaisons des moyennes des données analysées	49
III.2- DISCUSSION	53
III.2.1. Screening phytochimique	53
III.2.2. Activité antibactérienne des extraits: évaluation de la concentration, la température et la durée d'incubation	54
III.2.3. Efficacité de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes à celle de l'antibiotique de référence: concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits des plantes	56
CONCLUSION RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	58
CONCLUSION	58
RECOMMANDATIONS.....	59
PERSPECTIVES	59
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	60

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

Ma mère NOUMESSI MARIE et Mon cher et tendre époux M. SIMO

CHRISTIAN STIVE

Pour vos encouragements et votre soutien sans relâche

REMERCIEMENTS

Je rends grâce à Dieu tout puissant par qui tout a été possible. Le présent travail constitue mes premiers pas dans le domaine de la recherche. Pour le mener à bien, j'ai eu recours à plusieurs personnes tant pour la logistique que pour les conseils et les discussions. Je reconnais ainsi le devoir de leur témoigner ma profonde gratitude. Je pense particulièrement :

A mon superviseur de mémoire **Pr. ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert** que je remercie de m'avoir accepté comme étudiante, pour sa disponibilité, son soutien infaillible, ses nombreux conseils, sa patience et sa rigueur scientifique ;

A mon encadreur de mémoire **Pr. NOAH EWOTI Olive Vivien**. Merci à vous professeur pour votre précieux temps, vos précieux conseils que vous m'avez prodigués dans l'avancée de nos travaux et pour l'intérêt constant que vous avez toujours manifesté à l'égard de mon travail ;

Au **Pr. ESSIA NGANG** Chef de Département de Microbiologie pour son implication dans le bon fonctionnement du département et pour avoir toujours mis à ma disposition des enseignements dans le but de parfaire ma formation ;

A mes enseignants du Département de Microbiologie dont la rigueur scientifique m'a guidé dans ma formation

Au **Dr NONO** de la faculté de Médecine des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I pour son assistance dans la caractérisation des métabolites secondaires

Au responsable de l'Herbier National du Cameroun qui m'a ouvert les portes de l'institution à sa charge pour l'identification des échantillons collectés sur le terrain ;

Aux **membres du jury** de ce mémoire, qui m'ont fait l'honneur de consacrer un peu de leur temps pour porter un regard à la fois critique et constructif à ce travail dans le but de l'améliorer ;

A toute l'équipe de recherche du Laboratoire d'Hydrobiologie et Environnement, notamment au :

- **Pr MOUNGANG Luciane Marlyse et Pr TAMSA ARFAO Antoine** pour les connaissances scientifiques et les conseils acquis à leurs côtés.
- Tous mes aînés de laboratoire, en particulier **Dr Claire Stéphane METSOPKENG, Yves POUTOUM YOGNE, Golda ZAME MEVA'A, Edith MOUAFO, Samuel BALENG et Pélagie LADIBE** pour leurs soutiens, leurs assistances, leurs conseils et leurs encouragements dans la réalisation de ce travail.

- Tous mes camarades de promotion : **Laura MANEWA, Sonia FATOU, Marina DONFACK, Audrey BOLDA, Saurelle, Junior AHANDA, Derrick KANOOU, Mohammed SANOUSI, Ginette DJUIKUOU,**

A mes ami(e)s **KAMDEM Ashley, DONFACK Anabelle, SONNA Carelle, MAWAMBE Marie Michelle, TAKEDO Christelle, NZONGAN Cédric** pour tout leur soutien et leurs encouragements dans la bonne marche de ce travail

A mes frères et sœurs **MBA Yannick, MBA Cédric, MBA Serge, MBA Yolande, MBA Franck et MBA Martial** pour leurs encouragements incessants et leur motivation ;

A tous ceux qui de près ou de loin m'ont soutenu dans la réalisation de ce travail et dont les noms n'ont pas été mentionnés. Je vous dis merci.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photographie de <i>Vibrio cholerae</i> bactérie, illustration 3D.	3
Figure 2 : Photographie des cellules de <i>Aeromonas hydrophila</i> au microscope électronique à balayage	7
Figure 3 : Mode d'action des antibiotiques	9
Figure 4 : Schéma illustrant les cibles d'antibiotiques et les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques.....	10
Figure 5 : Photographie de <i>Bidens pilosa</i>	11
Figure 6 : Feuilles de <i>M. stenopetala</i>	13
Figure 7 : Photographie des feuilles de la plante <i>M. stenopetala</i>	19
Figure 8 : Photographie des feuilles de la plante <i>Bidens pilosa</i>	20
Figure 9 : Protocole d'extraction par macération des extraits hydroéthanoliques et extraits aqueux.....	23
Figure 10 : Mise en évidence des composés chimique	25
Figure 11 : dispositif de filtration sous pression des extraits	29
Figure 12 : tubes à essai contenant les différentes concentrations d'extrait de <i>Bidens pilosa</i> et de <i>Moringa stenopetala</i>	30
Figure 13 : Photographie des colonies (A) <i>Aeromonas hydrophila</i> sur milieu ADA, (B) colonies de <i>Vibrio cholerae</i> sur milieu TCBS (Photo Takoukam, 2022).....	36
Figure 14 : Variation temporelle des densités cellulaires de <i>Aeromonas hydrophila</i> en présence des extraits aqueux et hydroéthanoliques de <i>Bidens pilosa</i> à 37°C et 44°C.	38
Figure 15 : Variation temporelle des densités cellulaires de <i>Aeromonas hydrophila</i> en présence des extraits aqueux et hydroéthanoliques de <i>Moringa stenopetala</i> à 37°C et 44°C.	40
Figure 16 : Variation temporelle des densités cellulaires de <i>Vibrio cholerae</i> en présence des extraits aqueux et hydroéthanoliques de <i>Bidens pilosa</i> à 37°C et 44°C.....	42
Figure 17 : Variation temporelle des densités cellulaires de <i>Vibrio cholerae</i> en présence des extraits aqueux et hydroéthanoliques de <i>Moringa stenopetala</i> à 37°C et 44°C.44	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. classification des bactéries du genre <i>Vibrio</i> selon.....	3
Tableau II. Classification des bactéries du genre <i>Aeromonas</i>	6
Tableau III : systématique de <i>Bidens</i>	11
Tableau IV : Rendements d'extractions et caractéristiques physiques des extraits.....	34
Tableau V : Criblage phytochimique des extraits de différentes plantes.....	35
Tableau VII : Résultats de quelques tests biochimiques réalisés sur.....	36
Tableau VII : Pourcentages d'inhibition (%) de la croissance de <i>Aeromonas hydrophila</i> en présence des extraits de la plante <i>Bidens pilosa</i>	39
Tableau VIII : Pourcentages d'inhibition (%) de la croissance de <i>Aeromonas hydrophila</i> en présence des extraits de la plante <i>Moringa stenopetala</i>	41
Tableau IX : Pourcentages d'inhibition (%) de la croissance de <i>Vibrio cholerae</i> en présence des extraits de la plante <i>Bidens pilosa</i>	43
Tableau X : Pourcentages d'inhibition (%) de la croissance de <i>Vibrio cholerae</i> en présence des extraits de la plante <i>Moringa stenopetala</i>	45
Tableau XI : Concentrations minimales inhibitrices (CMI), concentrations minimales bactéricides (CMB) en mg/ml des différents extraits sur les microorganismes testés	46
Tableau XII : Corrélations entre les densités microbiennes et les durées d'incubation pour chaque concentration d'extrait aqueux et hydroéthanolique des feuilles de <i>Bidens pilosa</i>	47
Tableau XIII : Corrélations entre les densités microbiennes et les durées d'incubation pour chaque concentration d'extrait aqueux et hydroéthanolique des feuilles de <i>Moringa stenopetala</i>	47
Tableau XIV : Corrélations entre les densités microbiennes et les concentrations d'extraits aqueux et hydroéthanolique des feuilles de <i>Bidens pilosa</i> pour chaque durée d'incubation.	48
Tableau XV : Corrélations entre les densités microbiennes et les concentrations d'extraits aqueux et hydroéthanolique de <i>Moringa stenopetala</i> pour chaque durée d'incubation.	49
Tableau XVI : Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les durées d'incubation pour chaque type d'extrait de feuilles de <i>Bidens pilosa</i>	49

Tableau XVII : Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les durées d'incubation pour chaque type d'extrait de feuilles de *Moringa stenopetala* .. 50

Tableau XVIII : Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les concentrations des extraits des feuilles de *Bidens pilosa* 51

Tableau XIX : Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les concentrations des extraits des feuilles de *Moringa stenopetala*..... 51

Tableau XX : Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les différents extraits..... 52

LISTE DES ABREVIATIONS

- ATB** : Antibiotique
BP : *Bidens pilosa*
CLSI : Clinical and Laboratory Standard Institute
CMB : Concentration Minimale Bactéricide
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
ddl : Degré de liaison
EA : Extrait aqueux
EHE : Extrait hydroéthanolique
HNC : Herbier National du Cameroun
INT : Iodonitrotétrazolium
MES : Matières en suspensions
MS : *Moringa stenopetala*
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PET : Polytéraphthalate d'éthylène
PI : Pourcentage d'Inhibition
SODIS : Pourcentage d'Inhibition
UFC : : Unité Formant Colonie
UV : UltraViolet

RESUME

La présence des microorganismes pathogènes dans l'eau de consommation serait susceptible d'engendrer diverses maladies à l'instar des gastro-entérites, du choléra et de la fièvre typhoïde. L'usage des extraits de plantes se présente comme une alternative aux méthodes de désinfection de l'eau. La présente étude vise de façon générale d'analyser l'activité antimicrobienne des extraits de *Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala* sur la cultivabilité de certains microorganismes aquatiques d'importance sanitaire. Les plantes ont été préalablement séchées, broyées puis soumises une extraction par macération. Les différents extraits préparés aux concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 g/l et incubés aux températures de 37°C et 44°C ont servi à la détermination des différentes activités antimicrobiennes par les méthodes d'étalement à la surface des milieux gélosés et de microdilution en milieu liquide réalisées sur deux espèces microbiennes isolées des eaux de l'environnement de Yaoundé *Aeromonas hydrophila* et *Vibrio cholerae*. Le criblage phytochimique a révélé la présence de divers métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les polyphénols, les saponosides, flavonoïdes entre autres. Les différents extraits ont présenté des activités variables sur les microorganismes aquatiques testés. L'extrait aqueux et hydroéthanolique a montré une activité remarquable (100 % d'inhibition entre 9h et 24h) sur *B. pilosa*. En ce qui concerne *M. stenopetala*, l'extrait hydroéthanolique a montré une activité remarquable sur *A. hydrophila* de même que l'extrait aqueux sur *V. cholerae*. Les taux d'inhibition de la cultivabilité cellulaire les plus élevées ont été enregistrées aux concentrations d'extrait de 1,5g/l et 2g/l. La température du milieu influence significativement l'inhibition bactérienne ($P < 0,05$), la meilleure activité a été observé à 44°C. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits variaient de 0,488 à 62,5 mg/ml. Les souches testées ont montré une activité vis-à-vis des extraits. L'extrait aqueux et hydroéthanolique de *Bidens pilosa* ont montré une meilleure activité avec un important effet bactéricide et les CMI ont varié entre 0,97 et 1,95 mg/ml pour *A. hydrophila* et entre 0,488 et 62,5 mg/ml pour *V. cholerae*. De même que l'extrait aqueux de *M. stenopetala* sur *V.cholerae* (CMI=0,488 mg/ml).

Les résultats obtenus justifient l'utilisation de ces plantes dans la réduction du flux de bactério-polluants contenus dans les eaux destinées à la consommation et dans le traitement des maladies hydriques.

Mots clés : Extraits, criblage phytochimique, activité antimicrobienne, traitement de l'eau, *Bidens pilosa*, *Moringa stenopetala*

ABSTRACT

The presence of pathogenic microorganisms in drinking water is thought to be responsible for certain diseases, such as gastro-enteritis, cholera and typhoid fever. The use of plant extracts is an alternative to other water disinfection methods. The general aim of the present study is to assess the activity of *Bidens pilosa* and *Moringa stenopetala* extracts to the cultivability of certain aquatic microorganisms of health importance. The *B.pilosa* samples were collected, then dried and ground respectively, before undergoing extraction by maceration. The various extracts prepared at concentrations of 0,5; 1; 1,5 and 2 g/L and stored at incubation temperatures of 37°C and 44°C were used to determine the different antimicrobial activities by agar surface spreading and liquid microdilution methods performed on two microbial species isolated from Yaoundé environmental waters: *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio cholerae*. Phytochemical screening revealed the presence of secondary metabolite classes such as alkaloids, polyphenols, saponosides, flavonoids and others. The different extracts showed variable activity on the aquatic microorganisms tested. The aqueous and hydroethanol extracts showed remarkable activity (100% inhibition between 9h and 24h) on *B.pilosa*. With regard to *M.stenopetala*, the hydroethanol extract showed remarkable activity against *A.hydrophila*, as did the aqueous extract against *V.cholerae*. The highest rates of inhibition of cell cultivability were recorded at an extract concentration of 1.5 g/l and 2 g/l. The temperature of the medium significantly influenced bacterial inhibition ($P < 0.05$), with the best activity observed at 44°C. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of the extracts ranged from 0.488 to 62.5 mg/ml. The strains tested showed some sensitivity to certain extracts. The aqueous and hydroethanol extracts of *Bidens pilosa* showed the best activity, with a significant bactericidal effect and MICs ranging from 0.97 to 1.95 mg/ml for *A. hydrophila* and from 0.488 to 62.5 mg/ml for *V. cholerae*. The same applies to the aqueous extract of *M.stenopetala* on *V.cholerae* (MIC=0.488mg/ml).

The results obtained justify the use of these plants to reduce the flow of bacterial pollutants contained in drinking water and in the treatment of water-borne diseases.

Key words: Extracts, phytochemical screening, antimicrobial activity, water treatment, *Bidens pilosa*, *Moringa stenopetala*

INTRODUCTION

L'accès à l'eau potable constitue un frein à l'amélioration de la santé des populations ceci malgré les programmes d'approvisionnement en eau et d'assainissement mis en place. En effet, un individu sur trois dans le monde (soit 2,4 milliards de personnes) vit toujours sans une installation d'assainissement adéquate, l'Afrique subsaharienne étant la plus touchée (OMS, 2009). En 2015, l'OMS affirme que l'eau est un vecteur important de la maladie hydrique. Au Cameroun particulièrement, l'insuffisance des moyens des municipalités locales ne permet pas d'assurer une distribution optimale de l'eau potable. Les populations sont de ce fait résignées à consommer des eaux de puits et de source dans l'ignorance totale de leurs qualités (Nola *et al.*, 1998 ; Noah Ewoti *et al.*, 2021 ; Baleng *et al.*, 2021).

Cette insuffisance amène les populations à se tourner vers d'autres sources alternatives d'approvisionnement en eau de qualité microbiologique douteuse telles les eaux issues de milieux lenticques (puits, sources, forages) et les rivières (Baleng *et al.*, 2021). D'autres études menées dans quelques sources et forages des villes de Yaoundé et de Douala ont montré qu'il existe un lien entre la contamination des différents points d'approvisionnement en eau et les maladies hydriques enregistrées dans les hôpitaux des dites zones notamment les gastro-entérites (Ako *et al.*, 2009 ; Noanja *et al.*, 2014. ; Baleng *et al.*, 2021).

Il peut être constaté amèrement que la situation est de plus en plus alarmante à cause de l'émergence de souches de microorganismes multi résistantes aux antibiotiques suite à l'utilisation abusive et non contrôlée de ceux-ci (Zaman *et al.*, 2017). Durant les décennies, des méthodes simples de désinfection sont souvent employées. Il s'agit entre autres de la désinfection chimique dont les résidus ont des effets sur la santé à court ou à moyen terme (Gamage et Zhang, 2010 ; Xarform Tabang, 2021). D'autres méthodes telle la désinfection physique de l'eau par irradiation solaire ou Solar Water Disinfection (SODIS), la filtration et l'ébullition qui modifie les propriétés organoleptiques de l'eau et devient désagréable à la consommation (Gamage et Zhang, 2010).

Pour remédier à cette situation, des méthodes de désinfection de l'eau par des extraits de plantes ont été proposées comme nouvelles alternatives dans le traitement des eaux de consommation. De même, ces dernières années, diverses ressources naturelles, en particulier les plantes médicinales ont été utilisées par la médecine traditionnelle pour lutter contre les maladies hydriques (Tawfeek *et al.*, 2021 ; Atrahimovich *et al.*, 2021). La richesse des plantes en métabolites secondaires et leur accessibilité justifient leurs usages en médecine traditionnelle par la population africaine (près de 80 %) qui parfois de façon concomitante font recours aux médicaments conventionnels (Tawfeek *et al.*, 2021). Ces plantes sont dotées de

plusieurs activités biologiques (antibactérienne, antifongique, antivirale, anti-inflammatoire et même antioxydante) (Ndoye, 2016 ; Nyegue *et al.*, 2017 ; Ngongang *et al.*, 2018 ; Moni, 2019). L'Afrique en général et le Cameroun en particulier regorge d'une grande variété de plantes naturelles, utilisées en médecine traditionnelle pour soigner plusieurs maladies. Ainsi, *Bidens pilosa* de la famille des *Astéracées* est une plante utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de la fièvre. De plus, le broyat des feuilles sert à accélérer la coagulation du sang dans les plaies fraîches et au traitement des otites. De même, cette décoction de poudre de feuilles est utilisée pour traiter les problèmes rénaux ; et une tisane à base de plante diminue les flatulences (Bartolomé *et al.*, 2013). Par ailleurs, *Moringa stenopetala* de la famille des *Moringacées* est utilisé dans le traitement des maladies inflammatoires et infectieuses (Ferreira *et al.*, 2007).

Malgré ces informations, l'on dispose de peu de données sur les classes des composés chimiques de ces plantes susceptibles d'avoir une activité antibactérienne. On sait peu de choses sur l'influence de la variation de la concentration et de la température sur la cultivabilité des bactéries isolées des eaux. De plus, la comparaison des extraits aqueux et des extraits hydroéthanoliques avec un antibiotique de référence n'a pas encore été élucidée.

La présente étude vise à étudier l'activité antimicrobienne des extraits de plantes *Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala* vis-à-vis des bactéries *Vibrio cholerae* et *Aeromonas hydrophila*. Il s'agit spécifiquement de :

- ❖ identifier qualitativement les composés chimiques de *Bidens pilosa* et de *Moringa stenopetala* susceptibles d'avoir des activités antibactériennes ;
- ❖ évaluer l'influence de la concentration, de la température et de la durée d'exposition sur la cultivabilité de ces cellules bactériennes en présence des différents extraits ;
- ❖ déterminer l'efficacité des extraits aqueux et hydroéthanolique de *Bidens pilosa* et de *Moringa stenopetala* sur l'inhibition bactérienne.

Le présent mémoire s'organise en trois chapitres. Le premier chapitre consistera à passer en revue l'essentiel des bactéries et des plantes choisies. Le second chapitre est une présentation du matériel et des méthodes expérimentales utilisés pour l'atteinte des objectifs. La présentation des principaux résultats, leur interprétation et leur discussion font l'objet du troisième chapitre. Une conclusion, des recommandations, perspectives et références bibliographiques terminent le document.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I. GENERALITES SUR LES BACTERIES DES GENRES *Vibrio* et *Aeromonas*

I.1. GENRE *Vibrio*

I.1.1. Taxonomie

V. cholerae est un bacille appartenant à l'embranchement des Proteobacteria, à la classe des γ -Proteobacteria, à l'ordre des Vibrionales et à la famille des Vibrionaceae (**Giovannoni et Rappé, 2000**). Le tableau I présente une classification des bactéries du genre *Vibrio* élaborée par l'ITIS (Système d'information taxonomique intégré).

Tableau I. classification des bactéries du genre *Vibrio* selon (**Rachida Mersni., 2015**)

Règne	Bactéria
Division	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Vibrionales
Famille	Vibrionaceae
Genre	<i>Vibrio</i>
Espèce	<i>Vibrio cholerae</i>

I.1.2. Caractères morphologiques et cultureux

I.1.2.1. Caractères morphologiques

Vibrio cholerae est un bacille Gram négatif, non sporulé, en forme de bâtonnet droit très souvent incurvé (dits en "virgule") de 0,5 à 0,8 μm de diamètre sur 2 μm de longueur, mobile dans les milieux liquides grâce à un flagelle polaire (Monotriche) (figure 1).



Figure 1 : Photographie de *Vibrio cholerae* bactérie, illustration 3D (iStock, Photos ; 2012).

I.1.2.2. Caractères cultureux

Vibrio cholerae est une bactérie mésophile, anaérobie facultative, chimio-organotrophe. Elle peut utiliser le métabolisme respiratoire ou fermentatif. Sur les géloses alcalines (pH= 9,6) ou sur certains milieux sélectifs tels que les milieux TCBS (Thiosulfate-Citrate Bile salt-Sucrose agar), les colonies apparaissent jaunes (saccharose +), transparentes comme du verre et avec des contours réguliers ; elles sont “oxydase positive”, capables de réduire les nitrates en nitrites ; elles fermentent le glucose sans formation de gaz, ce qui les différencie des *Pseudomonas* (Holt *et al.*, 2000).

I.1.3. Ecologie de *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae prolifère dans les milieux aquatiques ; il vit en saprophyte dans les eaux douces (rivières et lacs), mais est également présent dans les eaux de mer et des estuaires. Il est capable de coloniser les organismes marins tels que les poissons, les crustacés, les éponges, les algues et les organismes formant le zooplancton (Anonyme, 2007). *V. cholerae* est très sensible à la température, à l'ionisation, et est moyennement halotolérante (capable de s'adapter à de très forte concentration en sel). En effet, son développement est optimal entre 30 °C et 37 °C. Il supporte bien les faibles températures (10 °C), mais ne survit qu'un à deux jours à 28-30 °C et 1 à 5 jours à 4 °C dans les produits secs (céréales, biscuits) (ICMSF, 1996). Le pH de croissance varie de 7 à 10 (Alcalophile), la multiplication étant inhibée à pH acide (pH = 6). Il présente une tolérance au NaCl (Halotolérantes 1-3 %), mais est inhibé à 7 % de NaCl. Au Cameroun, dans plusieurs régions et dans la ville de Mélong en particulier une épidémie du choléra sévit depuis plusieurs mois. Les décès sont de plus en plus enregistrés. Les facteurs principaux d'exposition des ménages au choléra sont notamment les difficultés d'accès à l'eau potable, le non-respect des règles d'hygiène (Mbella MR *et al.*, 2023).

I.1.3.1. Pathogénicité et facteurs de virulences

I.1.3.1.1. Pathogénicité

Cette bactérie en elle-même n'est pas pathogène. L'acquisition des caractères pathogènes de *V. cholerae* serait le fruit de l'inclusion dans le génome bactérien de génomes viraux (Calia *et al.*, 1998 ; Bhattacharya *et al.*, 2016 ; Pham *et al.*, 2018 ; Hounmanou *et al.*, 2019). Deux bactériophages sont impliqués et confèrent au *V. cholerae* un ensemble de caractères de virulence, incluant des facteurs favorisant sa fixation sur la muqueuse intestinale et une toxine provoquant les symptômes du choléra. La capacité d'une souche de *V. cholerae* à provoquer le

choléra chez l'homme dépend donc de deux ensembles de gènes appelés îlots de pathogénicité provenant des bactériophages VPI Φ et CTX Φ (Waldor et Mekalanos, 1996).

Le choléra est une maladie résultant de l'ingestion du vibron cholérique. Le bacille peut être présent dans l'eau ou dans les aliments (Racault *et al.*, 2019). Les aliments contaminés peuvent avoir été souillés par les selles des malades ou de porteurs sains, mais peuvent également être naturellement contaminés (consommation de crustacés ou mollusques ; Rabbani et Greenough, 1999). La contamination peut également avoir lieu de personne à personne à partir de selles, vomissements (Rafique *et al.*, 2016).

I.1.3.1.2. Facteurs de virulences

Après injection, le vibron cholérique s'implante dans la lumière de l'intestin grêle grâce à la présence de complexes pili-TCP (assimilable à de l'adhésine), situés à l'extrémité polaire du corps bactérien, près du flagelle et se multiplie. Ces multiplications sont favorisées par les facteurs tels que le groupe sanguin, la dose infectante élevée ($>10^8$) et la basse acidité gastrique (Blake, 1993). Le syndrome diarrhéique est dû à la sécrétion dans l'intestin grêle d'une exotoxine thermolabile ; la toxine cholérique (CT) formée de deux sous unités B qui active l'adenylylase causant un accroissement de l'AMP cyclique dans les entérocytes ; ce qui explique la fuite d'eau et des sels hors des tissus de l'hôte. *Vibrio cholerae* produit aussi la mucinase, une enzyme permettant aux cellules d'adhérer à la muqueuse intestinale, l'action combinée de la toxine et de la mucinase lui confiant son pouvoir pathogène (Morris *et al.*, 1985).

I.2. GENRE *Aeromonas*

I.2.1. Taxonomie et description

I.2.1.1. Taxonomie

Pendant longtemps, le genre *Aeromonas* n'était composé que de deux groupes, séparés d'après la température optimale de croissance et la mobilité. Un groupe mésophile et mobile, représenté par *Aeromonas hydrophila* (optimum thermique 35-37°C) et un groupe psychrophile et non mobile, représenté par *A. salmonicida* (optimum thermique 22-25°C) (Martin-Carnahan *et al.*, 2005 ; Matyar *et al.*, 2007). Le tableau II présente une taxonomie des bactéries du genre *Aeromonas* selon Ry Stanier, (1943).

Tableau II. Classification des bactéries du genre *Aeromonas* (**Ry Stanier,1943**)

Règne	Bacteria
Division	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Aeromonadales
Famille	Aeromonadaceae
Genre	<i>Aeromonas</i>
Espèce	<i>Aeromonas hydrophila</i>

I.2.1.2. Description

Actuellement, les espèces du genre *Aeromonas* sont classées parmi les bactéries à Gram négatif, anaérobies facultatifs, en forme de courts bâtonnets et ne formant pas de spores (**Roberts et al., 1996**). Parmi ces espèces, *Aeromonas hydrophila* est la plus étudiée à cause de sa présence dans les aliments (**Radu et al., 2003**), l'eau (**Asmat et Gires, 2002**), l'estuaire (**Odeyemi et al., 2012**), sa résistance aux antibiotiques et sa capacité à causer des infections chez l'homme et chez les animaux (**Evangelista-Barreto et al., 2010**). D'après Adams et Moss (**2000**) et Kirov (**2003**), *Aeromonas hydrophila* réalise la catalase et oxydase positif, fermente le glucose, mobile grâce à un unique flagelle polaire. Cette bactérie a été identifiée comme agent causatif de maladies humaines telle la septicémie, la méningite, les infections de blessure par suite d'exposition à l'environnement marin contaminé et la diarrhée (**Evangelista-Barreto et al., 2010**). En outre, ils sont également isolés des aliments, des animaux et de divers processus infectieux chez l'homme. (**Ana Fernandez et Maria José, 2020**).

I.2.2. Caractères morphologiques

Aeromonas hydrophila se présente généralement au microscope électronique à balayage sous forme de bâtonnet. C'est donc un bacille mobile à flagellation péritriche (**Hochedez et al., 2010**). *A. hydrophila* vit sous l'influence du stress environnementaux et notamment la salinité du milieu, *Aeromonas hydrophila* est capable d'adopter plusieurs morphologies pour survivre dans ces conditions. On note entre autres, les formes sphérique et allongée (**Pianetti et al., 2009**) (Figure 2).



Figure 2 : Photographie des cellules de *Aeromonas hydrophila* au microscope électronique à balayage (Science Photo Library ; 2020).

I.2.3. Ecologie

Les bactéries du genre *Aeromonas* sont très ubiquitaires des environnements aquatiques et terrestres. Plusieurs études ont montré la capacité des espèces *Aeromonas* à survivre dans différents types d'eaux. Ainsi, les *Aeromonas* prolifèrent dans les sols et dans l'eau douce, les eaux usées, les eaux marines et l'eau potable (**Figueira et al., 2011**). Elles ont également été isolées sous forme de biofilms dans les systèmes de distribution des eaux usées et dans la nappe phréatique. Ce genre de bactérie peut être également détecté dans différents aliments dont principalement les crustacés, les poissons, les viandes, le lait et les crudités (**Fontes et al., 2012**).

I.2.4. Facteurs de virulences et pouvoir pathogène

I.2.4.1. Facteurs de virulences de *Aeromonas hydrophila*

Les facteurs contribuant à la virulence incluent les toxines, les protéases, les hémolysines, les lipases, les adhésines, et plusieurs enzymes hydrolytiques. Ces facteurs de virulence sont présents sous deux formes : Les produits extracellulaires (protéines cytotoxiques, cytolitiques et hémolytiques) et les structures cellulaires (pili, flagelle, protéines membranaires, lipopolysaccharides et capsules) (**Pin et al., 1995**).

I.2.4.2. Pouvoir pathogène de *Aeromonas hydrophila*

Le pouvoir pathogène de *A. hydrophila* s'exprime principalement chez les Poissons et Batraciens (**Santos et al., 1999**). Chez l'homme, depuis quelques années, le secteur de la santé publique reconnaît *Aeromonas hydrophila* comme un agent pathogène opportuniste. On l'a incriminé comme agent pathogène possible de la gastroentérite, de la septicémie, de la colite et de la méningite. On l'isole aussi souvent dans des infections de plaies subies en milieu aquatique (**Krovacek et al., 1992 ; Gavriel et al., 1998 ; Alavandi et al., 1998 ; Trower et**

al., 2000). On l'a aussi incriminé dans des infections extra-intestinales à l'exemple des infections cutanées (**Hickman-Brenner *et al.*, 1998**) et respiratoires (**Janda et Sabbott, 1998**). Les enfants, les personnes âgées et celles dont le système immunitaire est compromis sont les plus à risque d'infection (**Merino *et al.*, 1995**).

I.3. GÉNÉRALITÉS SUR LES ANTIBIOTIQUES

I.3.1. Définition

Selon **Turpin et Velu (1957)**, un antibiotique est tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, à coefficient chimio thérapeutique élevé dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des virus, des microorganismes ou même de certains êtres pluricellulaires (**Coyen *et al.*, 2008**).

Ces substances inhibent la croissance bactérienne et perturbent ainsi leur métabolisme ou en agissant spécifiquement sur une étape essentielle du développement de ce dernier, mais elles sont dépourvues de toxicité pour les autres cellules (humaines ou animales). Quelques antibiotiques peuvent être bactériostatiques ou bactéricides dans certaines circonstances et à certaines concentrations (**Walsh, 2003**). On distingue plusieurs classes d'antibiotiques.

I.3.2. Classification des antibiotiques et mode d'action

Les antibiotiques sont classés de plusieurs manières, notamment selon le site et le mode d'action sur les microorganismes. Selon leurs modes d'action sur les microorganismes, on distingue quatre familles d'antibiotiques agissant principalement sur la membrane cytoplasmique, la paroi bactérienne, la synthèse des protéines et la synthèse des acides nucléiques. La figure 3 est une illustration du résumé du mode d'action des antibiotiques sur les bactéries Gram- et Gram+ (**Calop *et al.*, 2012**). Il ressort que quelque soit l'appartenance à Gram, certains antibiotiques à l'instar des polymixine et des Daptomycine agissent sur la membrane plasmique.

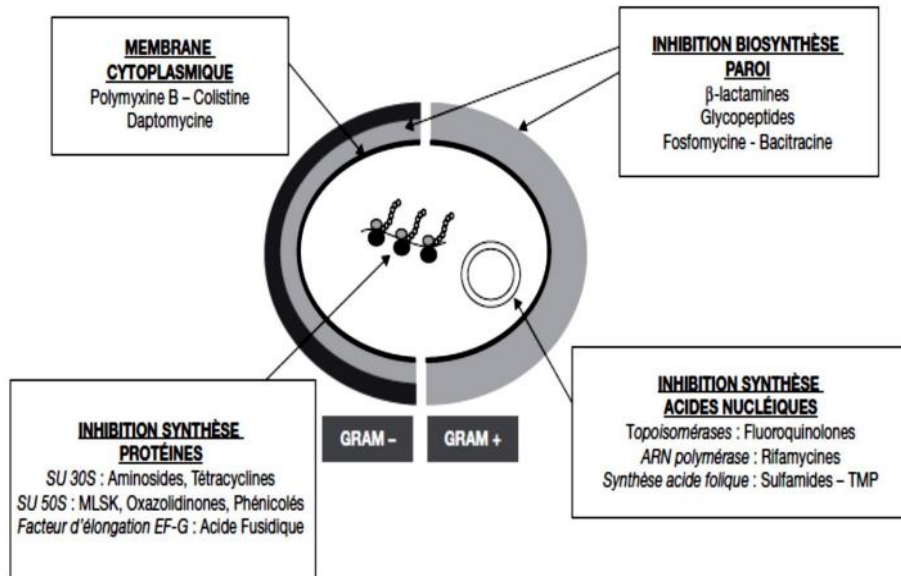


Figure 3 : Mode d'action des antibiotiques (Calop *et al.*, 2012).

I.3.3. Mécanismes de résistances aux antibiotiques

L'émergence et la propagation de la résistance aux antibiotiques sont le résultat d'une pression sélective exercée par les agents antimicrobiens et de la dissémination de micro-organismes résistants (Munita *et al.*, 2016 ; Nas, 2017). La résistance à un antibiotique est d'origine génétique, peut être chromosomique ou extra-chromosomique (plasmide). Elle est dite naturelle si ce caractère est présent chez toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre ; ou acquise si elle n'est présente que chez certaines souches d'une espèce habituellement sensible (Munita *et al.*, 2016). De ce fait la cellule bactérienne peut s'opposer à l'action de l'antibiotique soit par inactivation de ce dernier, soit en diminuant sa perméabilité membranaire aux niveaux des porines ou en limitant sa disponibilité par une pompe efflux, ou encore par modification de la cible d'action (Munita *et al.*, 2016).

Les mécanismes de résistance développés par les bactéries en réponse sur la pression de sélection par les antibiotiques sont variés. Les modes de résistance connus sont résumés dans la figure 4 ci-après qui présente les cibles potentielles des antibiotiques ainsi que les mécanismes de résistance mis en jeu par les bactéries (Lozniewski *et al.*, 2010). Avec le problème de résistance bactérienne, il devient plus qu'urgent d'avoir recours à un autre type de traitement, à savoir la phytothérapie.

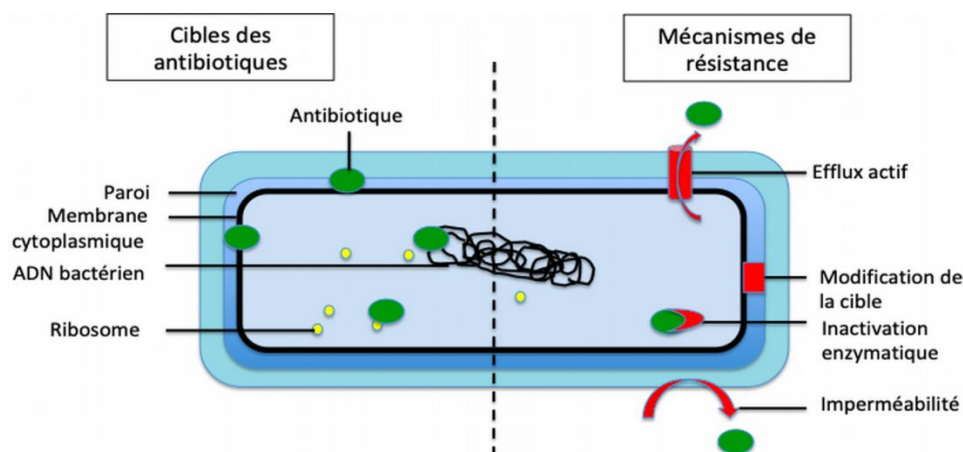


Figure 4 : Schéma illustrant les cibles d'antibiotiques et les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques (Lozniewski., 2010).

I.4. GENERALITES SUR LES PLANTES

I.4.1. Généralités sur la plante *Bidens pilosa*

I.4.1.1. Description botanique

Bidens pilosa est une plante herbacée vivace dressée largement répandue dans les régions tempérées et tropicales. Régions portant des feuilles opposées vertes qui sont dentelées, lobées ou disséquées. Elle a des fleurs blanches ou jaunes. Elle possède de nombreux noms communs dont Sornet ou herbe à aiguilles, Mdudu, Ntsohoho, piquant noir ou bident hérissé (figure 5). La hauteur moyenne de croissance est de 60 cm et un maximum de 150 cm dans les environnements favorables. (Young *et al.*, 2010).

Cette plante se développe bien dans un sol modérément sec. Cependant, il peut pousser dans des zones arides ; terre de basse à haute altitude et se propage par les graines (Bartolome *et al.*, 2013). Dû à sa nature à croissance rapide, dans les années 1970, l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) a activement promu sa culture en Afrique (FAO,1997). Inversement, en raison de son caractère invasif affinité, *B. pilosa* est généralement considérée comme une adventice. Selon Mvere (2004). *B. pilosa* est une adventice cosmopolite, originaire de l'Amérique du Sud et commun dans toutes les régions tropicales et subtropicales du monde.



Figure 5 : Photographie de *Bidens pilosa* (Muller, 1860)

I.4.1.2. Taxonomie

Le *Bidens pilosa* est une espèce de plantes à fleurs de la famille des *Asteraceae* avec plus de 240 espèces différentes. Le tableau III présente la classification de *B. pilosa* (Bairwa *et al.*, 2010).

Tableau III : systématique de *Bidens* (Bairwa *et al.*, 2010)

Règne	plantae
Sous-règne	Tracheobiota
Superdivision	Spermatophytes
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Asterales
Genre	<i>Bidens</i>
Espèce	<i>Bidens pilosa</i>

I.4.1.3. Habitat et distribution

Bidens pilosa est utilisée comme plante médicinale dans diverses régions d'Afrique, d'Asie, d'Amérique et des régions tropicales. Il est omniprésent dans le Comté d'Elgeyo Marakwet où l'on utilise traditionnellement la sève des feuilles broyées pour accélérer la coagulation du sang dans les plaies fraîches, décoction de feuilles pour le traitement des maux de tête et sève de la plante pour traiter les otites. **Bartolome *et al.*, 2013** ont rapporté que dans les zones côtières du Kenya, on utilise l'extrait de feuille de cette plante pour traiter la rate enflée chez les enfants et un mélange de feuilles séchées broyées, de savon et de piment comme insecticide pour lutter contre la mineuse des feuilles et autres insectes.

I.4.1.4. Activités biologiques

En Ouganda, cinq usages médicinaux différents sont connus. La sève des feuilles broyées sert à accélérer la coagulation du sang dans les plaies fraîches ; une décoction de feuilles est utilisée pour traiter les maux de tête ; la sève de la plante est mise dans l'oreille pour traiter une infection de l'oreille ; une décoction de poudre de feuilles est utilisée pour traiter les problèmes rénaux ; et une tisane à base de plante diminue les flatulences (**Bartolomé et al., 2013**). D'autres recherches se sont concentrées sur les caractéristiques anti-cancéreuses de *B. pilosa* (**Lewu et Afolayan., 2009**). Des chercheurs de Taiwan ont rapporté qu'un simple extrait à l'eau chaude d'aiguilles espagnoles pourrait inhiber la croissance de cinq souches de leucémie humaine et murine à moins de 220g par ml in vitro (**Chang et al., 2008 ; Cortés-Rojas., 2013**).

I.4.1.5. Composition chimique

Les propriétés antimicrobiennes de *B. pilosa* ont été attribuées à un groupe de produits chimique appelés poly acétylènes, qui comprend un produit chimique appelé phénylheptatriyne. Celle-ci phytoconstituants ont montré une forte activité in vitro contre les virus, animaux, des bactéries, des levures et des moisissures en très petite quantités (**Bartolome et al., 2013**).

I.4.1.6. Effets thérapeutiques de la plante

De nombreuses études antérieures ont démontré que l'extrait de *Bidens pilosa* avait des propriétés antioxydantes, antibactériennes, anti-inflammatoires, anticancéreuses et antiallergiques (**Rabe et Van Staden, 1997 ; Horuchi et Seyama, 2006 ; Xin et al., 2021**). Les feuilles de *B. pilosa* sont des sources potentielles d'antioxydants et des agents antimicrobiens qui peuvent trouver une application dans le traitement des conditions de diarrhée bactérienne (**Shandukani et al., 2018**). Il a été démontré que l'huile essentielle de *Bidens pilosa* possède des propriétés antioxydantes et est appliquée dans la préservation de la qualité des aliments dans le nord du Cameroun (**Goudoum et al., 2016**).

I.4.2. Généralités sur la plante *Moringa stenopetala*

I.4.2.1. Taxonomie

Moringa est le seul genre des Moringacées, famille apparentée aux Brassicacées, néverdier en français. En effet, Agardh (1825) pense que cette plante appartient à la classe des Equisetopsida, c'est-à-dire des plantes sans fleurs. En 1866, Hackel les range dans le règne des plantae et le sous-règne des Viridaeplantae c'est-à-dire des plantes vertes. **John et al., 2011**

soulignent que le Moringa fait partie de l'infra-règne des Streptophyta dans le domaine des Biota. Cette plante a été rangée dans la Clade des Tracheophyta, Spermatophyta en plantes à graines, la sous classe des Magnoliidae, le super -ordre des Dicotyledons, l'ordre des Brassicales, la famille des Moringaceae, le genre Moringa avec deux espèces : *Moringa oleifera* et *Moringa stenopetala*. Environ 33 espèces ont été signalées dans la famille des Moringacées (Arora *et al.*, 2013 ; Laleye *et al.*, 2015).

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Brassicales

Famille : Moringaceae

Genre : *Moringa*

Espèce : *Moringa stenopetala*

I.4.2.2. Description botanique

Moringa stenopetala est un Petit arbre atteignant 10 m de haut pour un tronc de 100 cm de diamètre environ, elle est renflée et en forme de bouteille, l'écorce peut être blanchâtre, gris pâle, argentée ou noirâtre, les feuilles alternes de 55 cm de long (figure 6). En plus d'être comestible, toutes les parties de *Moringa* ont été déployées pour soigner d'innombrables maladies, c'est pour cette raison, qu'elle fut appelée "Miracle Tree" (Mbikay, 2012). Au Cameroun deux espèces majeurs sont cultivées : *Moringa oleifera* et *Moringa stenopetala*.



Figure 6 : Feuilles de *M. stenopetala* (Augustin kondo, 2008)

I.4.2.3. Habitat et distribution géographique

Les *Moringa* sont des arbres polyvalents largement répandus qui auraient des propriétés nutritionnelles, thérapeutiques et prophylactiques avec plusieurs applications industrielles. Ils

peuvent être cultivés dans divers sols, y compris les régions tropicales et subtropicales chaudes, humides, sèches, sauf dans des conditions saturées d'eau. Les Moringa prolifèrent dans les sols d'argile alcaline et de limon sableux qui sont considérés comme les meilleurs milieux pour cette espèce en raison de leur bon drainage (**Ramachandran et al., 1980**). Ils sont maintenant cultivés dans tout le Moyen-Orient, presque toute la ceinture tropicale et ils ont été introduits en Afrique de l'Est depuis l'Inde au début du 20^e siècle.

I.4.2.4. Activités biologiques

Moringa est décrite comme une plante médicinale, thérapeutique et surnommée dans beaucoup de sociétés comme : « arbre miracle », qui soigne plus de 300 maladies. De plus, *Moringa* a également des attributs médicinaux surprenants, notamment dans le traitement des maladies inflammatoires et infectieuses (**Ferreira et al., 2007**). Il est également utilisé en cosmétiques-parfums et la coiffure. Les huiles sont particulièrement efficaces dans la fabrication de savon produisant une mousse. Le tourteau, considéré comme impropre à l'alimentation animale en raison de la forte teneur en alcaloïdes et saponines, est principalement utilisé comme engrais (**Panda et al., 2008**).

I.4.2.5. Composition chimique

Les qualités nutritionnelles des feuilles de Moringa sont importantes. Elles sont une excellente source de protéines dont les teneurs moyennes varient entre 19 à 35 % de matière sèche (MS) (**Olugbemi et al., 2010**). Les feuilles ont une teneur élevée en fibres, notamment en cellulose brute variant de 9,13 à 28,2 % MS (**Pamo et al., 2005**). Elles possèdent les 10 acides aminés essentiels à l'Homme (**Laleye et al., 2015**). Ayant une teneur relativement élevée en énergie métabolisable, 2273 et 2978 kcal/kg MS (**Makkar et Becker, 1997**). Elles contiennent une très grande concentration en vitamines A (6,8 mg), B (423 mg), C (220 mg) etc. Sont riches en β -carotène (**Fuglie, 2002**). Et en minéraux (fer, calcium, zinc, sélénium, etc.).

I.4.2.6. Effets thérapeutiques de la plante

Les feuilles de Moringa peuvent être utilisées pour la prévention et la correction de la malnutrition en raison de leurs qualités nutritionnelles exceptionnelles (**Saint-sauveur et Broin, 2010**). De ce fait, les populations incluent les feuilles de Moringa dans la formulation de la poudre infantile à base de ces feuilles comme complément alimentaire des nourrissons (**Madi et al., 2012**).

Il a aussi été indiqué que les extraits des feuilles et des racines de *Moringa stenopetala* induisent significativement l'inhibition totale et parfois partielle de *Staphylococcus aureus* dans l'eau aux seuils de 1 à 5% (Metsopkeng *et al.*, 2020).

I.4.3. Méthodes d'extraction des métabolites

I.4.3.1. La macération

Elle consiste à laisser tremper une plante sèche dans un solvant approprié pendant plusieurs heures, jours, voire semaines. L'intérêt de la macération est généralement la conservation des principes actifs durant le procédé (Sophie et Eherhart, 2003).

I.4.3.2. La décoction

La décoction est une méthode d'extraction des principes actifs d'une préparation généralement végétale par dissolution dans un solvant approprié (généralement l'eau). Ce qui suppose que ces substances ne soient pas thermolabiles. Elle s'applique généralement aux parties les plus dures des plantes : racines, graines, écorce, bois. Elle consiste à introduire la partie de la plante sollicitée dans de l'eau, à la suite de quoi le mélange est porté à ébullition et maintenu à une température constante pendant un temps variable, généralement entre deux et quinze minutes (Sophie et Eherhart, 2003).

I.4.3.3. L'infusion

L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant que l'on laisse refroidir. Le solvant n'est pas nécessairement de l'eau, cela peut être également une huile ou un alcool (Sophie et Eherhart, 2003).

I.5. MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE

L'évaluation de l'activité antibactérienne peut se faire à travers plusieurs méthodes, notamment celles permettant de déterminer ou non la présence de substances à activité antimicrobienne (tests qualitatifs) et d'autres permettant la détermination des paramètres d'inhibition (CMI et CMB) d'un extrait vis-à-vis d'un germe (tests quantitatifs) (Bueno, 2012).

I.5.1. Méthode de dilution en milieu liquide

Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes des substances d'intérêt 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 le milieu de culture, on parlera ici de macro dilution ou micro

dilution respectivement. L'inoculum bactérien est par la suite 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 la cupule qui contient la plus faible concentration en échantillon testé inhibant toute croissance visible de la bactérie étudiée. La croissance bactérienne se traduit par le trouble du milieu ou par le changement de coloration d'un indicateur coloré et/ou d'oxydoréduction préalablement introduit dans le milieu (Cos *et al.*, 2006 ; CLSI, 2021).

I.5.2. Méthode d'incorporation dans la gélose

Elle consiste à mélanger la substance d'intérêt dont on veut évaluer l'activité antibactérienne avec le milieu de culture et ensuite le couler dans des boîtes de pétri. Après solidification, le milieu est inoculé du microorganisme puis incubé à 37°C. La particularité de cette méthode est que l'incorporation de la substance est faite à différentes concentrations et les diamètres d'inhibition sont mesurés à la fin du temps d'incubation puis les pourcentages d'inhibition sont calculés comparativement à la croissance en absence de substance inhibitrice (Rios *et al.*, 1988 ; Toodou, 1990 ; Nyegue *et al.*, 2006).

I.5.3. Méthode de diffusion par disques (aromatogramme)

Elle consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque substance diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine une zone d'inhibition en fonction de la concentration de l'antibiotique ou de la substance (Toure, 2015).

I.6. GÉNÉRALITÉS SUR LES ÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES

I.6.1. Problématique de l'accès à l'eau potable

L'accès à l'eau potable demeure un problème préoccupant dans plusieurs régions du monde. Constituant fondamental de la vie, l'eau demeure au centre de toute activité humaine : l'agriculture, la production industrielle, la pêche, le tourisme, la production d'énergie (hydro-électricité). En effet, sur 13.600 millions de Km³ d'eau qui couvre la planète, l'eau douce représente seulement 0,014% disponible sous forme d'eau de surface (Moudallal, 1997). Cette faible disponibilité met aujourd'hui, un tiers de l'humanité dans une situation dite de « stress hydrique », avec moins de 1700m³ d'eau douce disponibles par habitant et par an. L'eau douce est donc une denrée rare. En plus de cette rareté, l'eau fait face à de nombreux problèmes parmi lesquels la pollution due à l'explosion démographique, rendant la question de

l'approvisionnement en eau de plus en plus préoccupante chaque jour (**UN-Water, 2006**). C'est à cet effet qu'au cours du premier Forum Mondial de l'eau qui s'est tenu à Marrakech au Maroc en 1997, les pays ayant participé ont exprimé leur crainte sur la rareté et la qualité de l'eau de consommation. Cette mauvaise qualité de l'eau, responsable de nombreuses maladies hydriques, est due à la présence des protozoaires, des virus ou des bactéries et à la détérioration de certains de ses paramètres physico-chimiques (**OMS, 2004**).

I.6.2. Méthodes de remédiation de la pollution microbiologique

La technique fréquemment utilisée pour remédier à la contamination microbiologique est la désinfection au travers de divers produits ou substances. Ainsi, la désinfection est une opération au résultat momentané permettant de tuer ou d'inactiver les micro-organismes portés par un milieu inerte (**Catherine du peyron., 2011**).

I.6.3. Méthodes classiques de traitement des eaux

Les méthodes classiques de traitement sont multiples parmi lesquelles : la désinfection thermique, la filtration, la chloration et la désinfection solaire. Toutes ces méthodes ont pour but de rendre une eau potable sur le plan bactériologique sans toutefois éliminer les autres organismes vivants et ainsi garantir la santé de l'Homme via l'élimination des microorganismes potentiellement pathogènes. Le résultat de ces opérations ne se limitent qu'aux microorganismes déjà présents dans le milieu au moment du traitement (**Boutaleb, 2007**). Les gammes de techniques pour cette méthode sont relativement étendues. Elle va des moyens chimiques au travers des réactifs oxydants (le chlore et l'ozone, entre autres) aux moyens physiques (le rayonnement UV et l'augmentation de la température). Il existe :

- La chloration qui est une méthode chimique de désinfection utilisant divers types de chlore ou des substances contenant du chlore pour oxyder et désinfecter l'eau (**safewater, 2017**) tels que : l'acide hypochloreux ; les chloramines ; le gaz-chlore ; l'hypochlorite de calcium ; L'hypochlorite de sodium. Le chlore est la méthode la plus utilisée dans la désinfection. Lorsque qu'on utilise des doses assez suffisantes, elle élimine tous les microorganismes en trente minutes (**Madigan et Martinko., 2007**). Toutefois, lorsque le chlore est en présence de la matière organique, il génère des sous-produits cancérigènes tels que : les trihalométhanes (**Gamage et Zhang., 2010**) ;
- La désinfection de l'eau par ébullition qui consiste à porter l'eau à l'ébullition pendant quelques minutes. Pendant cette opération, les pathogènes viraux, parasitaires et bactériens sont inhibés (**Sunda, 2012**). Son inconvénient est le fort coût énergétique qu'il engendre ; la rendant

insoutenable sur le plan économique et environnemental. Toutefois, cette méthode dénature le caractère organoleptique de l'eau en la rendant fade à la consommation ;

- La désinfection solaire de l'eau (SODIS) est une méthode alternative de traitement de l'eau au niveau des ménages. En effet, de l'eau contaminée est remplie dans des bouteilles transparentes en polytéréphtalate d'éthylène (PET) et exposée en plein soleil pendant 6 heures. Durant l'exposition au soleil, le rayonnement UV-A et la température élevée conduisent à l'élimination de 99,99% des virus et bactéries générateurs de maladies diarrhéiques. La variation de l'intensité de l'UV-A due aux conditions climatiques et journalières remet en cause l'efficacité de cette méthode (**Meierhofer et Landolt., 2008**).
- La filtration : malgré le fait qu'elle soit efficace, elle ne permet pas d'éliminer tous les microorganismes présents. De plus, le dispositif de filtration nécessite une maintenance attentive car, les filtres doivent être régulièrement inspectés et remplacés. D'où pour améliorer le traitement, certaines personnes optent pour chauffer l'eau après filtration (**Howard, 2004**).

I.6.4. Traitement par les extraits de plantes

La méthode de désinfection de l'eau par les substances organiques naturelles est une alternative aux méthodes conventionnelles. L'utilisation des plantes à cet effet tire son origine de leurs effets thérapeutiques exploités depuis des millénaires. Depuis les travaux d'**Atinkson (1946) et Mela (1950)** sur les propriétés antibactériennes des plantes pour tenter de donner une base scientifique à ces pratiques empiriques, plusieurs autres études ont été conduites. C'est ainsi que les études ont révélé que les plantes médicinales comportent de nombreux composés bioactifs comme les flavonoïdes capables d'agir sur les bactéries à l'état planctoniques (**Donadiou, 2008**). L'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de plantes a révélé que les extraits aqueux de *Cassia occidentalis*, *Cassia alata*, *Carica papaya* et de *Coleus kilimandschari* présentent un effet photo sensibilisateur (**Sunda, 2012**). On a également noté qu'en présence de lumière, l'extrait (d'*Artemisia annua*) inhibe la croissance d'*Enterococcus faecalis* en milieu aquatique (**Mobili et al., 2015**). Lutgen et Michels (2008) ont noté que l'effet bactéricide ou bactériostatique d'*Artemisia annua* serait lié aux groupements peroxydes de l'artémisinine. Il a aussi été indiqué que les extraits de feuilles et de racines de *Moringa stenopetala* induisent significativement l'inhibition totale et parfois partielle de *staphylococcus aureus* dans l'eau aux seuils de 1 à 5% (**Metsopkeng et al, 2020**). De même l'extrait hydroéthanolique de *Albizia zygie* inhibe la croissance de *salmonella typhi* et serait efficace dans la réduction des bactério-polluants contenus dans les eaux destinées à la consommation (**Poutoum Yogne et al., 2023**).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIEL

II.1.1. Site d'étude

Il s'agissait d'une étude expérimentale effectuée en microcosme aquatique au laboratoire, menée entre les mois de Juin et Novembre 2022. Les extractions aqueuses et celles hydroéthanoliques, les profils phytochimiques, ainsi que les tests microbiologiques ont été réalisés au laboratoire d'Etudes Précliniques Animales et Pharmacotoxicologie du Département de Pharmacotoxicologie et Pharmacocinétique de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I et le laboratoire d'Hydrobiologie et Environnement du Département de Biologie et Physiologie Animales, de la Faculté des Sciences, de la même Université.

II.1.2. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé était constitué des feuilles de *Moringa stenopetala* et *Bidens pilosa*. Ces plantes ont été choisies en raison de leurs usages courant en médecine traditionnelle et en alimentation dans les sociétés africaines, notamment dans le traitement biologique des eaux (Aberra *et al.*, 2011). Le choix a également été établi par la présence potentielle dans leurs différents extraits des groupes de métabolites à activités bactéricides (Marsh, 2003 ; Moore *et al.*, 2005 ; Donadieu, 2008).

II.1.2.1. *Moringa stenopetala*

Les feuilles de *Moringa stenopetala* ont été récoltées au mois de décembre 2021 dans la région du Centre Cameroun plus précisément dans le quartier Damas (coordonnées géographiques 3°48'51,5'' de latitude Nord et 11°27'27,1'' de longitude Est). L'échantillon identifié, a été confirmé et déposé à l'Herbier National du Cameroun sous le numéro de la collection N° 67475/HNC.



Figure 7 : Photographie des feuilles de la plante *M. stenopetala* (photo Takoukam, 2022)

II.1.2.2. Bidens pilosa

Les feuilles de *Bidens pilosa* ont été récoltées au mois de Janvier 2022 dans la région du Centre Cameroun plus précisément dans la localité de Nyom (coordonnées géographiques 3°58'53',328 de latitude Nord et 11°30'9,04932de longitude Est). L'échantillon récolté a par la suite été identifié en comparaison avec l'échantillon de l'Herbier National du Cameroun sous le numéro d'identification N° 14921/HNC.



Figure 8 : Photographie des feuilles de la plante *Bidens pilosa* (photo Takoukam, 2022)

II.1.3. Matériel microbiologique

II.1.3.1. Les microorganismes

Les bactéries utilisées dans cette étude sont *Vibrio cholerae* et *Aeromonas hydrophila*. Ces microorganismes ont été choisis en raison de leur résurgence dans les maladies hydriques, leur intérêt en santé publique ainsi que pour leur capacité à indiquer la qualité microbiologique des eaux destinées à la consommation (Rodier, 2009 ; Mobili *et al.*, 2015 ; Njiki *et al.*, 2016 ; OMS, 2017). Ces deux espèces ont été isolées du cours d'eau Olézoa, plus précisément derrière l'amphithéâtre 1001 de l'Université de Yaoundé I puis identifiées. Elles ont ensuite été conservées dans les milieux appropriés pour des analyses ultérieures.

II.1.3.2. L'antimicrobien de référence

L'antimicrobien utilisé pour cette étude a été de la Levofloxacin ® 500 mg. Il s'agit d'un antibiotique de référence.

II.1.3.3. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés tout au long de ce travail ont été les milieux spécifiques. Il s'agit de :

- ❖ La gélose TCBC (*Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose*) pour isoler *Vibrio cholerae*
- ❖ La gélose ADA (*Ampiciline Dextrine Agar*) pour isoler *Aeromonas hydrophyla*
- ❖ Du Bouillon Mueller Hinton (BMH) 610034 *Liofilchem Italy* pour la réalisation des tests d'inhibition

II.1.4. Matériel chimique

II.1.4.1. Solvants

Les solvants nécessaires à l'extraction ont été l'eau et l'éthanol à 70% pour permettre d'obtenir le maximum des substances actives solubles dans l'eau et dans l'alcool (**Poutoum Yogne et al., 2023**).

II.1.4.2. Réactifs pour le screening phytochimique

Pour la réalisation du screening phytochimique, il a été utilisé les réactifs et kits suivants :

- ❖ L'acide sulfurique 2% et le réactif de Mayer pour le test des alcaloïdes ;
- ❖ De l'eau distillée, du chlorure ferrique 2% pour le test des phénols et polyphénols ;
- ❖ De l'acide chlorhydrique, des morceaux de magnésium pour le test des flavonoïdes ;
- ❖ Du chlorure de méthylène, de la solution d'anhydride acétique et de l'acide sulfurique pour le test des triterpènes et stéroïdes ;
- ❖ De l'eau distillée pour le test des saponines ;
- ❖ De l'acide chlorhydrique 1%, de l'eau distillée et solution de chlorure ferrique pour le test des tanins ;
- ❖ Du chloroforme, de l'éther et de la soude 10% pour le test des anthraquinones.

II.2. METHODES

II.2.1. Détermination qualitative des composés chimiques de *Bidens pilosa* et de *Moringa stenopetala* susceptibles d'avoir des activités antibactériennes

II.2.1.1. Préparation des extraits

Deux types d'extrait ont été utilisé, à savoir l'extrait aqueux et l'extrait hydro éthanolique. La méthode d'extraction utilisée a été la macération qui est une opération consistant à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire ses principes actifs. Les différentes extractions ont été effectuées selon la méthode préconisée par **Romani et al (2006)**.

II.2.1.1.1 Préparation des extraits aqueux

500g du broyat des feuilles de *B. pilosa* et de *M. stenopetala* ont été mélangés à 5000ml d'eau distillée respectivement pendant 48h et remué matin et soir. Le macérât obtenu a été filtré successivement à l'aide du coton et du papier Whatman n° 4. 4328ml et 4845ml de filtrat de feuille des différentes plantes obtenues ont été séchés à l'étuve à une température de $45 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à évaporation totale de l'eau. Après séchage nous avons 65,77g feuilles de *Bidens pilosa* et 57,86g de feuilles de *Moringa stenopetala* ont été obtenu des extraits aqueux. Les extraits obtenus sous forme pâteuse ont été introduits dans les flacons en verre stériles puis conservé au frais.

II.2.1.1.2. Préparation des extraits hydro éthanoliques

La figure 9 présente le protocole d'extraction par macération des extraits aqueux et hydroéthanoliques des différentes plantes. Pour l'obtention des extraits hydroéthanoliques, les solvants utilisés étaient l'éthanol à 70° et l'eau distillée. 500g du broyat des feuilles ont été macérés respectivement à 5000 mL du mélange éthanol /eau distillée dans les proportions 70/30, pendant 48 h et remué matin et soir. Le macérât obtenu a été filtré successivement à l'aide du coton hydrophile et du papier Whatman n°4. 4984ml et 4979ml de filtrat des feuilles des différentes plantes ont été séchés au rotavapo dans un premier temps, ensuite à l'étuve à une température de $45 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à évaporation totale du solvant. Après séchage, 64,95g feuilles de *Bidens pilosa* et 54,1g de feuilles de *Moringa stenopetala* ont été obtenus des extraits éthanoliques. Les extraits obtenus sous forme pâteuse ont été introduits dans les flacons en verre stériles puis conservé au frais.

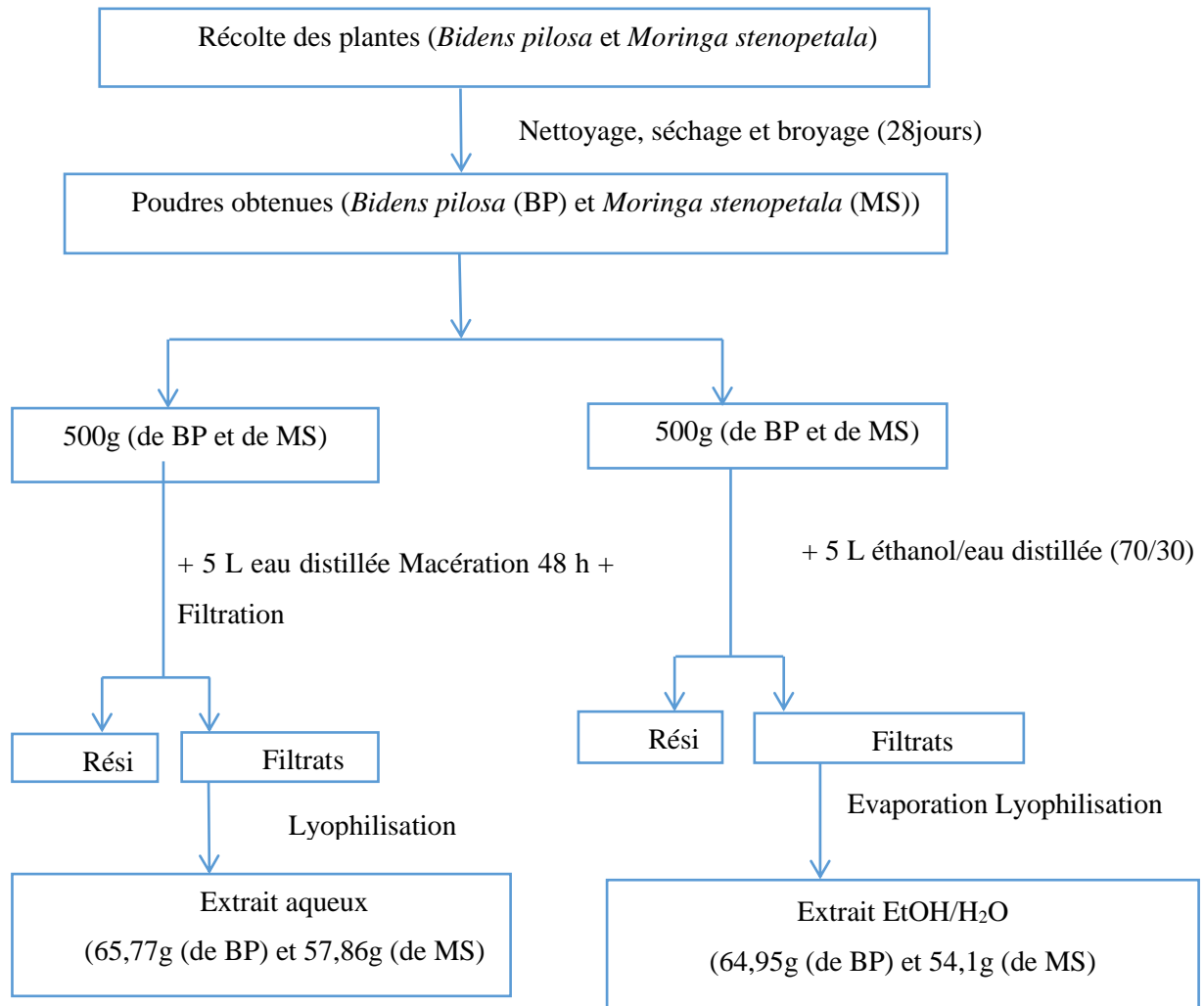


Figure 9 : Protocole d'extraction par macération des extraits hydroéthanoliques et extraits aqueux.

Les rendements de chaque extrait ont été obtenus à l'aide de la formule :

$$R (\%) = \left(\frac{\text{Masse de l'extrait}}{\text{Masse matière végétal}} \right) \times 100$$

R= rendement

II.2.1.2. Criblage phytochimique

Le screening phytochimique est un test qualitatif permettant de mettre en évidence les composés chimiques (composés bioactifs) se trouvant dans un produit végétal. Le principe du criblage phytochimique est basé sur la formation des complexes insolubles, utilisant respectivement des réactions de précipitation et de coloration, dues à la formation d'une conjugaison ou d'une insaturation dans la molécule. L'intensité de la coloration ou le degré de

turbidité sera ainsi proportionnel à la quantité de complexes formés (Harbone, 2001 ; Nguessan *et al.*, 2009 ; Alilou *et al.*, 2014 et Mbayo *et al.*, 2015).

II.2.1.2.1- Recherche des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir du réactif de Dragendorff (iodo-bismuthate de potassium) et de Mayer (réactif iodomercurique). A 20 ml de solution mère, on ajoute 4 mL d'acide sulfurique 10 %. On transfère par la suite 5 ml de solution obtenue dans trois tubes numérotés 1 à 3. Dans le tube 1, on ajoute trois gouttes du réactif de Mayer et on laisse agir pendant 15 minutes. La présence d'alcaloïdes est mise en évidence par l'apparition d'un précipité blanc jaune ou jaune clair. Dans le tube 3, on ajoute trois gouttes du réactif de Dragendorff, l'apparition d'un précipité jaune-orangé indique la présence des alcaloïdes. Le tube 2 sert de témoin négatif.

II.2.1.2.2- Mise en évidence des phénols totaux

Les polyphénols ont été recherchés par le test au chlorure ferrique (FeCl₃). Dans un tube contenant 2 ml d'extrait, on ajoute quatre gouttes d'une solution de perchlorure de fer dilué à 10 %. L'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence des polyphénols.

II.2.1.2.3- Mise en évidence des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été recherchés par le test de Shinoda. A 2 ml d'extrait, on ajoute 1 ml de méthanol 50 %, puis quelques copeaux de magnésium et ensuite quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré. Il va se produire une réaction exothermique effervescente avec apparition des colorations :

- Rose orangé : présence des flavones ;
- Rose violacé : présence des flavanones ;
- Rouge : présence des flavonols et flavanonols ;
- Coloration moins intense pour la présence des hétérosides flavoniques ;
- Test négatif pour les chalcones.

II.2.1.2.4- Mise en évidence des tanins

Les tanins ont été recherchés en utilisant le réactif de Stiasny (acide chlorhydrique/formol) à 30 %. A 5mL d'extrait, on ajoute deux à trois gouttes du réactif de Stiasny (acide chlorhydrique/formol (2 :3)). L'apparition d'un précipité brun est caractéristique de la présence des tannins.

II.2.1.2.5- Mise en évidence des anthocyanes

Dans un tube à essai contenant 5 ml d'extrait, on ajoute 1 ml de méthanol et cinq gouttes d'acide chlorhydrique concentrée. L'apparition d'une coloration orange traduit la présence des anthocyanes.

II.2.1.2.6- Mise en évidence des anthraquinones

A 1 ml d'extrait, on ajoute 1 ml d'acide sulfurique. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence d'anthraquinones.

II.2.1.2.7- Mise en évidence des triterpènes et stéroïdes

Les triterpènes et stéroïdes ont été recherchés par le test de Liebermann-Buchard. Dans un tube contenant 1ml de méthanol, dissoudre 5 mg d'extrait et on ajoute 0,2 ml des réactifs suivants : chloroforme, anhydride acétique glacial, acide sulfurique concentré. L'apparition de la coloration violette ou verdâtre est caractéristique des triterpènes et des stéroïdes respectivement.

II.2.1.2.8- Recherche des saponines

L'extrait a été dilué dans 5 ml d'eau distillé. Après homogénéisation, le mélange obtenu est chauffé pendant 5 minutes jusqu'à ébullition. La présence des saponines s'est traduite par l'apparition d'une mousse persistante après 1 minute.

II.2.1.2.9- Test d'identification des hétérosides cardiotoniques

A 2 ml d'extrait, on ajoute 1 ml d'acide acétique glacial, puis une à deux gouttes de FeCl_3 et 1 ml d' H_2SO_4 concentré. L'apparition d'un anneau brun à l'interface indiquera la présence des hétérosides cardiotoniques. Un anneau violet pourra également apparaître sous l'anneau brun.

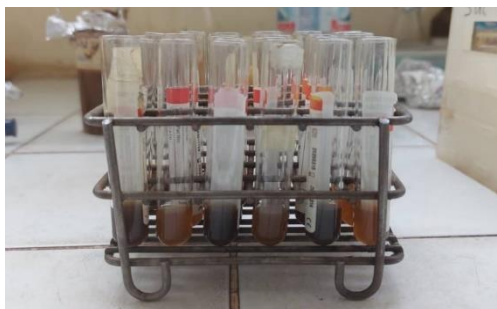


Figure 10 : Mise en évidence des composés chimique (TAKOUKAM Gaelle, 2022)

II.2.2. Evaluation de l'influence de la concentration, de la température, la durée d'incubation sur l'activité antimicrobienne des plantes

II.2.2.1. Isolement, identification et préparation des suspensions des microorganismes

II.2.2.1.1. Isolement et identification des bactéries

La technique d'étalement en boîtes de pétri et la technique de filtration sur membrane ont été utilisées pour la collecte des souches de bactéries dans les échantillons d'eau issus de l'environnement plus précisément dans le cours d'eau Olézoa (Yaoundé) dans des flacons en verre stériles de 250 mL (Holt *et al.*, 2000).

Vibrio cholerae a été isolé sur le milieu gélosé TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose), incubé à la température de 37°C pendant 24 à 48 heures. Les colonies jaunes ont été cultivées sur la gélose ordinaire et coulées en pente pour les analyses biochimiques.

L'isolement de *Aeromonas hydrophyla* a été effectué par la technique des membranes filtrantes sur le milieu gélosé ADA (*Ampiciline Dextrine Agar*), coulé en boîte de Pétri et incubé à la température de 37°C pendant 24 heures. Les colonies jaunes, ont été repiquées sur la gélose ordinaire coulée en pente pour les analyses biochimiques.

❖ Examen macroscopique

L'observation macroscopique a consisté en la description des caractères culturels des bactéries exprimées sur les colonies, à savoir : la taille, l'aspect, la forme, la couleur, les contours et la configuration de la surface de la colonie.

❖ Examen microscopique

L'examen microscopique a consisté en l'observation à l'état frais des colonies et observation du frotti coloré.

❖ Observation à l'état frais

L'observation à l'état frais a permis d'apprécier la mobilité ou l'immobilité des bactéries (Marchal *et al.*, 1991). Elle consiste à déposer une goutte de la suspension bactérienne entre la lame et la lamelle, puis observer au microscope à l'objectif 40X à sec et sous faible éclairage.

❖ Observation du frottis coloré

La technique qui a été utilisée ici est celle de la double coloration de Gram qui fait agir successivement les colorants. Elle a été réalisée sur les différentes colonies selon les étapes suivantes

- 1^{ère} étape : la coloration de la paroi bactérienne par le violet de Gentiane ou le cristal violet
- 2^{ème} étape : le mordantage avec le lugol qui a pour but de renforcer la fixation du violet de gentiane ou cristal violet ;
- 3^{ème} étape : la décoloration par l'alcool à 95°C dont la durée d'application est comprise entre 10 à 30 secondes ;
- 4^{ème} étape : la contre coloration avec la fushine. Cette étape permet de colorer les bactéries en rouge.

La coloration de Gram permet de distinguer les bactéries à Gram positif qui ne subissent pas l'action de l'alcool-acétone et conservent la couleur violette, des bactéries Gram négatives qui subissent l'action du mélange alcool-acétone et prennent la couleur rouge de la fuchsine. Elle permet également de déterminer le mode de regroupement, la morphologie et la structure de la paroi.

❖ Tests biochimiques ou enzymatiques

L'identification biochimique des espèces bactériennes repose sur la révélation de certains aspects particulièrement significatifs et stables du métabolisme des familles, genres ou espèces étudiés. Il s'agit d'un ensemble de réactions dont les résultats équivalent au phénotype et révèlent la configuration génétique propre du taxon considéré. Ces tests peuvent être regroupés en trois grands ensembles : les tests de base, les tests d'orientation et les tests différentiels (**Rodier et al., 2009**).

- **Recherche de la catalase**

La catalase a été révélée en déposant sur une lame en verre propre et stérile, une colonie bactérienne en présence de H₂O₂. La réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement d'oxygène (**Mezaache, 2012**). La présence du peroxyde d'hydrogène, dont l'accumulation est toxique pour la bactérie est évitée et l'oxygène est libéré sous forme de gaz.

- **Recherche de l'oxydase**

Ce test est essentiel pour orienter l'identification des bacilles et coques à Gram négatif. A l'aide d'une pipette pasteur, une colonie isolée et jeune de 18-24 h a été prélevée, ensuite déposée sur un disque d'oxydase puis frottée doucement sur le disque. Le développement ou non de la couleur violette a été observé après 10 à 15 mn (**MAST, 2007**).

- **Recherche de la production d'indole**

Certaines bactéries dégradent le tryptophane en indole grâce à une enzyme appelée tryptophanase. Dans une eau peptonée exempte d'indole (riche en tryptophane), quelques gouttes d'une suspension bactérienne dense ont été ajoutées et incubée 24 h à 37° C. Après 24 h, 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs ont été ajoutées. La réaction positive se traduit par la formation d'un anneau rouge (**Guillaume, 2004**).

- **Recherche de l'arginine-dihydrolase (ADH)**

Dans un tube à essai contenant 45 mL de milieu ADH, deux gouttes de suspension bactériennes ont été ajoutées et incubé à 37 °C pendant 24 h. Le résultat positif s'exprime par le virage de la couleur au violet (**Guillaume, 2004**).

- **Test sur milieu Kligler Hajna**

La gélose Kligler a été utilisée pour différencier les bacilles à Gram négatif. Elle permet la recherche de trois caractères biochimiques : la fermentation du glucose et lactose avec production d'acide (jaune) au niveau de la pente pour le lactose et au niveau du culot pour le glucose. La production d'H₂S s'exprime par un noircissement alors que, la production du gaz s'exprime par des bulles d'air. Les tubes contenant le milieu Kligler coulé en pente ont été ensemencés au moyen d'une aiguille en piquant le culot et en striant la surface de la pente. Ensuite, incubés entre 18 à 24 h à une température de 35 ± 2 °C (**Becton et Dickinson, 2014**).

- **Test de Citrate de Simmons**

Le but de ce test est de savoir si la bactérie utilise le citrate comme source de carbone. La surface de la gélose a été ensemencée en strie, puis incubée pendant 48 h à 35°C. La transformation du triacide (acide citrique) en diacide par décarboxylation oxydative donne un pH élevé qui se traduit par un virage au bleu vif (**Mast, 2016**).

- **Test sur milieu Mannitol-Mobilité**

Ce milieu étudie deux caractères que sont : La fermentation du mannitol et la mobilité. La méthode consiste à ensemencer par piqûre centrale et incubé à 37°C pendant 24 h. Le mannitol s'exprime avec la coloration jaune. La mobilité s'exprime par l'apparition d'un trouble au milieu de la gélose dû à la diffusion des bactéries à partir de la ligne d'ensemencement.

II.2.2.1.2. Préparation des suspensions des différents microorganismes

Les bactéries ont été activées sur la gélose ordinaire coulée en pente dans les tubes à essai stériles. Pour la préparation d'inoculum des bactéries. Les suspensions des différents microorganismes ont été réalisées sur des cultures âgées de 18 à 24 h, introduites dans une solution stérile de NaCl (8,5g /l) et comparées au standard 0,5 McFarland (0,5ml de 0,48 mol / l BaCl₂, 2H₂O à 1,175% p / v) La concentration des bactéries dans la suspension mère a été de l'ordre de 2 x10⁵ UFC/ml. Par la suite, 0,1 ml de la suspension bactérienne a été prélevé à l'aide d'une pipette stérile et introduit dans les tubes à essai contenant 10 ml de solutions d'extrait aqueux et hydroéthanolique de *Bidens pilosa* et de *Moringa stenopetala* de concentration connue et dans 10 ml d'eau physiologique uniquement pour la solution témoin. Cette opération a été réalisée en condition stérile autour d'un bec Bunsen avec un diamètre de 30cm et un rayon de sécurité de 15cm afin de limiter toute contamination (Tamsa, 2017).

II.2.2.2. Préparation des solutions d'extrait

Pour chaque extrait, les solutions ont été préparées dans un volume de 100 ml aux concentrations de 2 mg/ml, 1,5mg/ml, 1 mg/ml et 0,5 mg/ml à partir de l'eau physiologique stérile. Les solutions préparées ont tout d'abord été filtrées sur coton hydrophile ensuite sur papier WHATMAN stérile et enfin au travers d'une membrane filtrante de porosité 0,45 µm ceci autour d'un bec Bunsen afin de limiter toute. Le dispositif de filtration sous pression des extraits est présenté sur la figure ci-dessous.

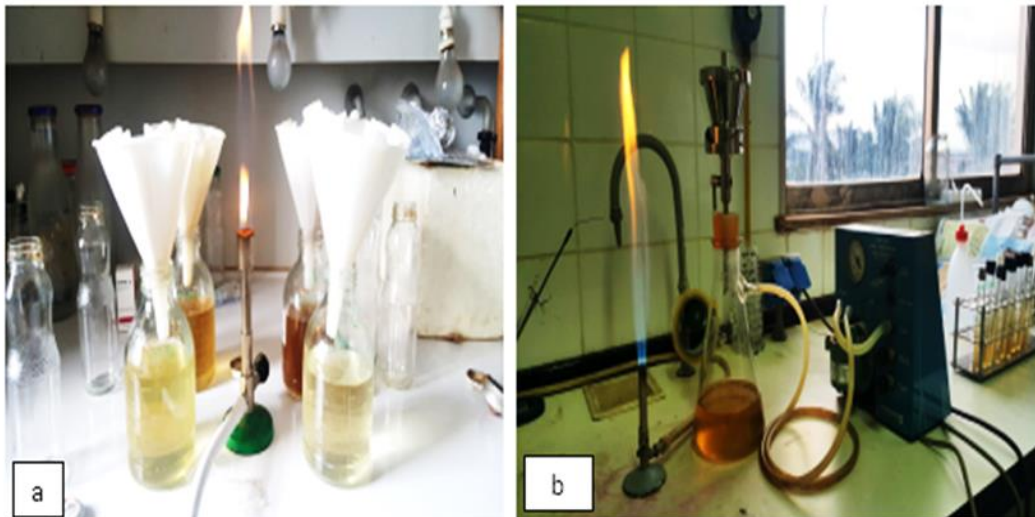


Figure 11 : dispositif de filtration sous pression des extraits (source présente étude) : (A) filtration sur papier whatmann; (B): filtration sous vide avec une membrane en nitrate de cellulose de porosité 0,45µm.

II.2.2.3. Répartition des tubes en fonction d'espèce de bactérie, du type d'extrait de la plante et de la température d'incubation

Après l'inoculation des espèces de bactéries dans 80 tubes à essai préalablement stérilisés à 121°C à l'autoclave pendant 15min, puis étiquetés contenant chacun une solution d'extrait de la plante. Ces derniers ont été reparties en 6 lots représentant les 2 espèces microbiennes et les 4 extraits (aqueux et hydroéthanoliques) des deux plantes. Soit 18 tubes pour *Vibrio cholerae* 18 tubes pour *Aeromonas hydrophila*. Chaque lot était constitué par des quadruplets de 11 tubes représentant les extraits de chaque plante étudié (11 tubes pour l'extrait hydro et 11 tubes pour l'extrait aqueux de la plante *Moringa stenopetala* ; 11 tubes pour l'extrait hydro et 11 tubes pour l'extrait aqueux de la plante *Bidens pilosa*) qui tous étaient incubés aux températures 37°C et 44°C. Les analyses ont été faites après 3h, 6h, 9h et 24h de séjours des microorganismes dans l'extrait aqueux. Le même processus a été appliqué pour l'extrait hydroéthanoliques. La figure 12 montre les solutions de l'extrait de *Bidens pilosa* et de *Moringa stenopetala* dans les tubes à essai incubés à l'étuve.



Figure 12 : tubes à essai contenant les différentes concentrations d'extrait de *Bidens pilosa* et de *Moringa stenopetala* (photo Takoukam, 2022)

II.2.2.4. Analyse microbiologique

Les analyses microbiologiques ont porté sur l'aspect quantitatif, réalisées en conditions stériles à côté d'une flamme de bec-bunsen. Elles ont été effectuées après 3 h, 6 h, 9 h et 24h d'incubation, en prélevant après homogénéisation 100 µl de l'échantillon à analyser qui a été par la suite étalé à la surface du milieu de culture spécifique (gélose TCBS pour *Vibrio cholerae* et gélose ADA pour *Aeromonas hydrophila*). Le milieu a été préalablement séché dans une étuve à 44 °C selon la technique d'étalement en surface (**Diagnostic Pasteur, 1987**). La durée d'incubation a été de 24 h pour *V. cholerae* et *A. hydrophila* à la température 37°C. Le dénombrement de germes viables isolés a été effectué par comptage direct sur boîte de pétri à

l'aide d'un compteur de colonie de marque OSI. Les abondances bactériennes ont été exprimées en Unités Formants Colonies (UFC).

II.2.3. Efficacité de l'activité des extraits de *Bidens pilosa* et de *Moringa stenopetala*

II.2.3.1. Détermination des paramètres d'inhibition

II.2.3.1.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits d'intérêts

La CMI est définie comme la plus petite concentration d'extrait de plante, ayant inhibée la croissance bactérienne (CLSI, 2021). L'iodonitrotétrazolium chloride (INT) a été utilisé pour la révélation de la croissance des cellules exposées à des concentrations décroissantes des extraits d'intérêt après incubation.

La méthode de microplaque décrite par (Newton *et al.*, (2002) a été utilisée. Un volume de 100µl du bouillon Mueller Hinton a été introduit dans tous les 96 puits de la microplaque comme indiqué par (Jennifer Andrew, 2001. Newton *et al.*, 2002) (Naïtali et Dubois Brissonnet ,2017).

Pour déterminer les CMI, une préparation de la solution mère d'extrait de concentration 500 mg/ml a été réalisé dans un volume de 5ml d'eau physiologique stérile. Le mélange obtenu a été homogénéisé au vortex ensuite, 5 ml du mélange a été prélevé puis filtré sur une membrane de porosité 0,20 µm. La solution mère de l'antibiotique de concentration 500mg/ml a été préparée dans un volume de 5 ml d'eau physiologique. Dans les puits des colonnes 1, 2 et 3 correspondants aux réplifications, il a été introduit une série de volume de 100 µl de solution mère d'extrait diluée, successivement afin d'obtenir une gamme de neuf concentrations allant de 500 à 0,488 mg/ml.

A partir d'une culture jeune de 24h sur milieu gélosé coulé en pente, une suspension microbienne de chaque germe a été préparée dans de l'eau physiologique stérile (NaCl, 8,5%) en ajustant la turbidité à celle de la solution de 0,5 Mac Farland (soit $1,5 \times 10^8$ UFC/ml pour les bactéries (Kuate *et al.*, 2010)). 100 µl de chaque inoculum a été par la suite introduit dans chaque puits, pour un volume final de 200 µL par puits. Le control positif a été placé dans les colonnes 11 et 12. Ce contrôle positif constitué de la lévofloxacine, a été préparé dans les mêmes conditions que l'extrait et testé à une concentration de 08 dilutions successives comprises entre 500 à 0,976 mg/ml (Houssou *et al.*, 2010). Le contrôle négatif a été constitué d'un mélange (milieu de culture + inoculum bactérien dans les proportions (1/1 ; V/V)). Les puits contenant uniquement le milieu de culture ont été réservées au contrôle de stérilité. Les

microplaques ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24h. Après incubation, la révélation de la croissance bactérienne a été faite à l'aide de l'iodonitrotétrazolium chloride (INT) dont le principe est basé sur la capture de protons émis par des enzymes déshydrogénases présentes sur la membrane des bactéries vivantes (Houssou *et al.*, 2018). 40 µl de la solution d'INT ont ainsi été introduits dans chacun des puits de la microplaque. Après métabolisation du glucose, un virage du milieu au rose-rouge, après 30 min de ré-incubation révèle une insuffisance de la concentration du métabolite pour inhiber la croissance bactérienne. Dans le puits non coloré et contenant la plus faible quantité de métabolite secondaire, la concentration de l'extrait correspondant à la CMI (Houssou *et al.*, 2018). La CMI correspond à la concentration du puits non coloré en rouge et dans lequel il y a la plus faible quantité de métabolite secondaire. Les tests ont été répétés en triplicata.

L'interprétation des résultats a été effectuée en se basant sur les travaux de Kuete, (2010). En effet, Il a été établi par celui-ci que pour les extraits de plantes, l'activité antibactérienne est significative lorsque la CMI < 100 µg/ml, modéré lorsque 100 µg/ml < CMI ≤ 625 µg/ml et faible lorsque CMI > 625 µg/ml. Cependant, pour les extraits issus des parties comestibles de la plante, l'activité sera considérée comme forte lorsque sa CMI < 100 µg/ml, significative lorsqu'elle sera 100 µg/ml < CMI ≤ 512 µg/ml, modérée elle est 512 µg/ml ≤ CMI ≤ 2048 µg/ml, faible lorsque la CMI > 2048 µg/ml, et tout simplement inactive si la CMI > 10 mg/ml.

II.2.3.1.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) des extraits

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) est la plus petite concentration d'antimicrobien ayant laissé subsister au plus 0,01 % de survivants de l'inoculum initial ou la concentration minimale ne présentant aucune croissance bactérienne (Oussou *et al.*, 2008). Le protocole utilisé est celui préconisé par (Marmonier, 1990 ; Okou, 2012). Un volume de 150µl de milieu (Mueller Hinton Broth) stérile a été introduit dans les puits d'une autre microplaque, elle aussi stérile et différente de celle des CMI. Ensuite nous avons ajouté 50µl d'extrait prélevé dans les puits correspondant aux CMI obtenues. Nous avons prélevé également 50µL d'extrait dans les puits qui ont précédé celles ayant la CMI (ISO standard 20766-1 : 2006). Le contrôle de stérilité a été constitué de 200µl de milieu (Mueller Hinton Broth). Le contrôle positif a été constitué de la Lévofoxacine, traitée comme les extraits. Le contrôle négatif a été le milieu sans extrait. La CMB a été représenté par le puits correspondant à la plus faible concentration d'extrait qui n'a montré aucune croissance bactérienne visible (CE 1997 ; Okou *et al.*, 2015).

- **Signification du rapport CMB/CMI**

Les rapports CMB/CMI ont permis de confirmer, respectivement le caractère bactériostatique ou bactéricide des extraits testés. Lorsque ce rapport est supérieur à 4, l'extrait est dit bactériostatique. Si ce rapport est inférieur à 4, l'extrait est considéré comme bactéricide pour les bactéries. (Oussou *et al.*, 2008, Abedini 2013).

- $CMB/CMI \leq 4$, extrait bactéricide
- $4 < CMB/CMI < 16$, extrait bactériostatique
- $CMB/CMI > 16$: l'extrait est dit tolérant vis-à-vis du microorganisme mis en présence.

II.2.4. Analyse des données

Les variations temporelles des abondances des cellules microbiennes exprimées en UFC/100 mL ont été représentées par des histogrammes à l'aide du logiciel Microsoft® Excel 2016. Les pourcentages d'inhibition (PI) après action des extraits sur différentes souches ont été calculés selon la formule suivante décrite par Garcia-Ripoll (Tamsa., 2017) :

$$PI = \left(\frac{N_0 - N_n}{N_0} \right) \times 100$$

Où N_0 = Abondance des cellules bactériennes dans l'eau physiologique (témoin) ; et

N_n = Abondance des cellules bactériennes après action de l'extrait.

Les degrés de liaison entre les abondances microbiennes et durées d'incubation pour chaque concentration d'extrait d'une part, et entre les abondances microbiennes et les concentrations d'extrait pour chaque durée d'incubation, ont été évalués par les tests de corrélations « r » de Spearman. Les comparaisons des moyennes de données ont été réalisées à l'aide du test H de Kruskal-Wallis et le test T de Wilcoxon. Toutes ces analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel R.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

III.1.1. Métabolites secondaires des plantes susceptibles d'avoir des activités antibactériennes

III.1.1.1. Rendements d'extraction et caractérisation des extraits obtenus

Les différentes extractions réalisées nous ont permis d'obtenir les extraits aqueux et hydroéthanoliques des feuilles de *Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala*. Les résultats des caractéristiques physiques et du rendement d'extraction de chaque extrait sont consignés dans le tableau IV ci-dessous. Le rendement d'extraction varie de 10,82 à 13,15%. La plus grande valeur de rendement a été obtenue avec l'extrait aqueux de *Bidens pilosa* (13,15%) et la plus faible avec l'extrait hydroéthanolique de *Moringa stenopetala* (10,82%).

Tableau IV : Rendements d'extractions et caractéristiques physiques des extraits.

Solvants	Masses de la poudre(g)		Masses de l'extrait (g)	Rendements (%)	Caractéristiques physiques
H₂O	<i>M.stenopetala</i>	500	57,86	11,57	Verte et aspect solide
	<i>B. pilosa</i>	500	65,77	13,15	Marron verdâtre
EtOH/H₂O (70/30)	<i>M.stenopetala</i>	500	54,1	10,82	Verte et aspect solide
	<i>B. pilosa</i>	500	64,95	12,99	Marron sombre

III.1.1.1.2. Criblage phytochimique

Un test qualitatif de mise en évidence des différents groupes de métabolites secondaires susceptibles d'être responsables de l'activité antimicrobienne a été réalisé et les résultats sont présentés dans le tableau V. il ressort dans l'ensemble que quelques soit l'extrait et la plante considéré, on note la présence des alcaloïdes, polyphénols, tanins et flavonoïdes entres autres (Tableau V). Le métabolite anthocyanine est absent dans les extraits de la plante *M. stenopetala*. Le même résultat a été obtenu avec le métabolite anthraquinone dans tous les extraits de *B. pilosa* et *M. stenopetala*.

Tableau V : Criblage phytochimique des extraits de différentes plantes

Composés chimiques	Extraits aqueux		Extraits hydroéthanoliques	
	<i>B. pilosa</i>	<i>M. stenopetala</i>	<i>B. pilosa</i>	<i>M. stenopetala</i>
Alcaloïdes	+	+	+	+
Polyphénols	+	+	+	+
Tanins	+	+	+	+
Saponines	+	+	-	+
Flavonoïdes	+	+	+	+
Triterpènes	+	+	+	+
Stéroïdes	+	+	+	+
Anthocyanines	+	-	+	-
Anthraquinones	-	-	-	-

Légende : (+) Présence du composé ; (-) Absence du composé

III.1.1.1.3. Observations macroscopique des bactéries isolées et identification des différentes souches microbiennes

Les différentes souches utilisées pour l'évaluation des activités antimicrobiennes ont été isolées du cours d'eau « Olézoa » de la ville de Yaoundé.

❖ Observation macroscopique des colonies

- **Croissance sur milieu ADA**

L'isolement de *Aeromonas hydrophila* sur milieu de culture ADA, a permis d'observer des colonies se présentant sous forme circulaire à bord régulier de 2 à 3 mm de diamètre et de couleur jaunes (Figure 13a).

- **Croissance sur milieu TCBS**

L'isolement de *Vibrio cholerae* sur milieu TCBS a permis d'observer des colonies de *Vibrio cholerae* présentant une forme circulaire à bord régulier de 1 à 3 mm de diamètre et de couleur jaunes (Figure 13b). La coloration de Gram des frottis des différentes colonies isolées a montré au microscope optique des bacilles de coloration Gram négative.

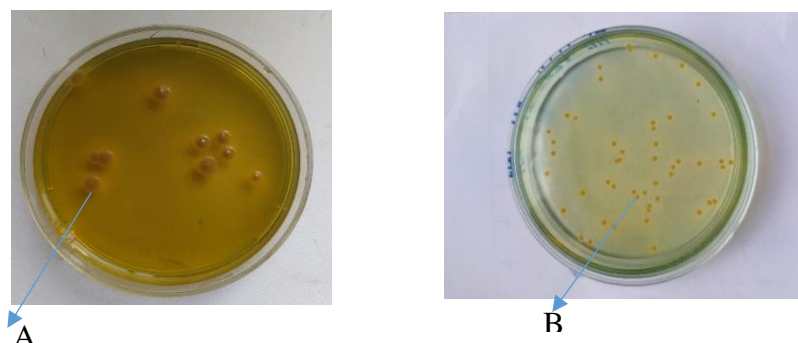


Figure 13 : Photographie des colonies (A) *Aeromonas hydrophila* sur milieu ADA, (B) colonies de *Vibrio cholerae* sur milieu TCBS (Photo Takoukam, 2022).

❖ Identifications biochimiques (Recherche des enzymes spécifiques)

Les tests biochimiques effectués sur *A. hydrophila* et *V. cholerae* sont consignés dans le tableau VII. Dans l'ensemble, il a été observé que ces deux espèces montrent des réactions qui témoignent la présence des enzymes catalase, oxydase ainsi qu'une réaction positive à leur mobilité sur le milieu mannitol-mobilité coulé en tube. Ces deux espèces produisent des gaz qui forment des bulles sur le kigler-Hajna. Elles ne réduisent pas les substrats tels que le lactose ou glucose (Tableau VII).

Tableau VII : Résultats de quelques tests biochimiques réalisés sur

Propriétés biochimiques	<i>A. hydrophila</i>	<i>V. cholerae</i>
Catalase	+	+
Oxydase	+	+
Mobilité	+	+
Uréase	-	-
Indole	+	+
Citrate de Simmons	+	+
H ₂ S	+	-
Gaz	+	+
Lactose	-	-
D- Manitol	+	+
ADH	+	+
ODC	-	-
LDC	+	-
ONPG	+	+

+ : test positif ; - : test négatif

III.1.2. Activité antibactérienne des extraits: évaluation de la concentration, la température et la durée d'incubation

III.1.2.1. Variation temporelle des abondances de *Aeromonas hydrophila* et pourcentages d'inhibition en présence des extraits des plantes *Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala* aux températures 37°C et 44°C

❖ Variation temporelle des abondances de *Aeromonas hydrophila* en présence des extraits de *Bidens pilosa* aux températures 37°C et 44°C

En présence des extraits aqueux et hydroéthanoliques de *Bidens pilosa*, les densités cellulaires *A. hydrophila* observées ont diminué dans l'ensemble en comparaison aux témoins l'eau physiologique (NaCl : 0,85%). Ainsi, avec l'augmentation de la concentration des extraits hydroéthanolique des feuilles de *Bidens pilosa* les abondances cellulaires de *Aeromonas hydrophila* à 37°C ont fluctué de 309 à 130 ; 320 à 136 ; 333 à 76 et de 289 à 56 (UFC/100 ml), aux périodes d'incubation de 3h, 6h, 9h et 24h respectivement. Aucune baisse totale des densités à toutes les concentrations et à la température 37°C n'a été observé. Par contre, une diminution totale de la densité est obtenue aux concentrations 1,5g/l et 2 g/l à 3h avec l'extrait aqueux à la température 37 °C.

Lorsque la concentration de l'extrait aqueux de *Bidens pilosa* augmente, on assiste à une diminution des abondances cellulaires de *Aeromonas hydrophila* de 276 à 3 ; 236 à 6 ; 159 à 1 et 31 à 0 (UFC/100 ml), respectivement à la température 44°C. Ces résultats se traduisent par une baisse générale de ces abondances à toutes les concentrations et en fonction de la concentration et du temps d'incubation.

Les meilleures diminutions de croissances ont été observées avec l'extrait aqueux de *B. pilosa* à 44°C après 3h d'incubation aux concentrations 1 g/l et 2 g/l (figure 13).

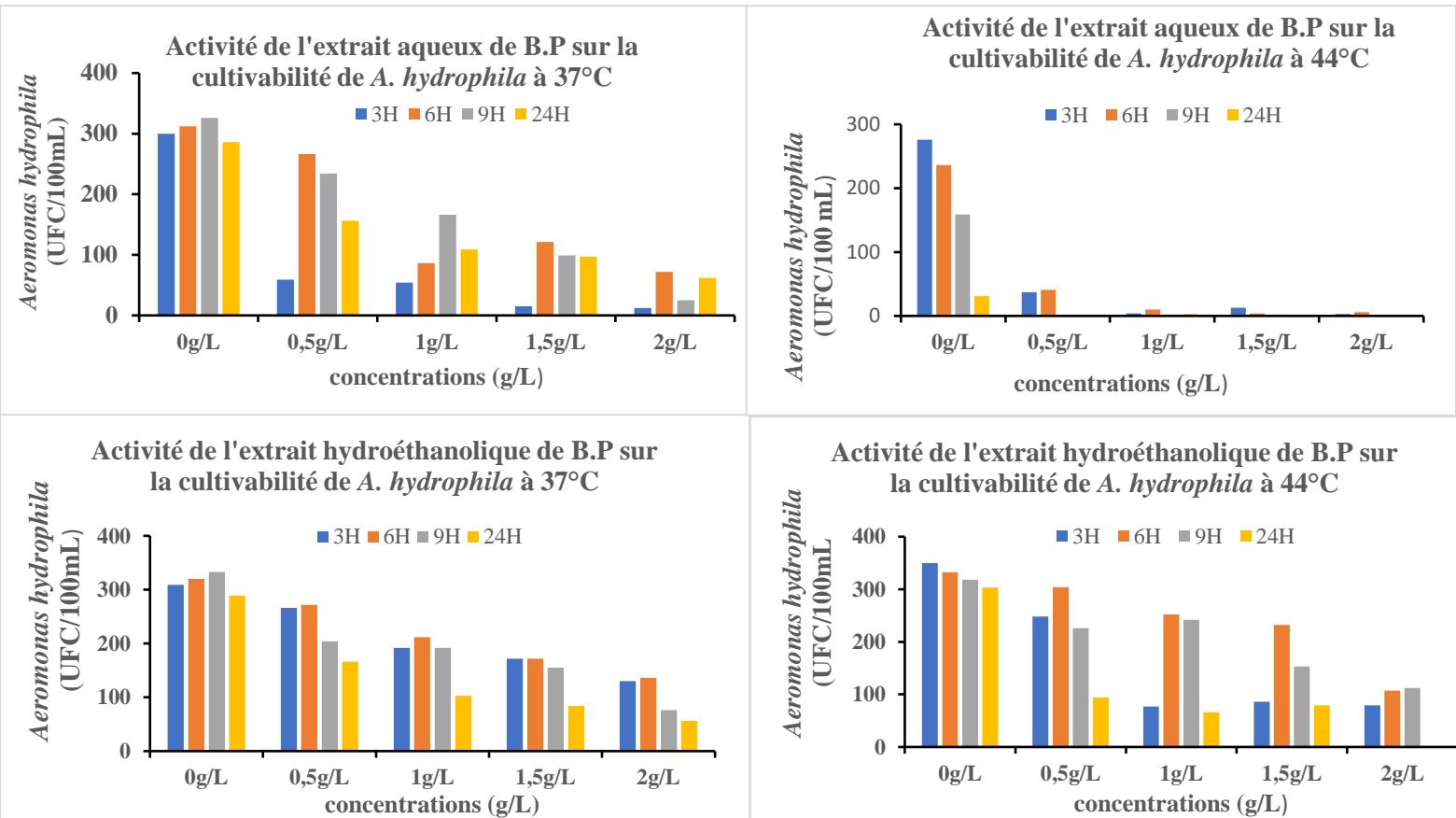


Figure 14 : Variation temporelle des densités cellulaires de *Aeromonas hydrophila* en présence des extraits aqueux et hydroéthanoliques de *Bidens pilosa* à 37°C et 44°C.

❖ Pourcentages d'inhibition des abondances de *Aeromonas hydrophila* en présence des extraits de *Bidens pilosa* aux températures 37°C et 44°C

Les pourcentages d'inhibition de la croissance de *A. hydrophila* pour chaque type d'extrait de *Bidens pilosa* ont été calculés après chaque température et durée d'incubation (tableau VII). Ces pourcentages d'inhibition ont oscillé entre 4,91 et 100 %. Le meilleur pourcentage d'inhibition (100%) a été obtenu avec l'extrait aqueux de *Bidens pilosa* après 3h d'incubation à la température 44°C aux concentrations 1,5g/l et 2g/l ainsi qu'avec l'extrait hydroéthanolique à la concentration 2g/l à 24h.

Tableau VII : Pourcentages d'inhibition (%) de la croissance de *Aeromonas hydrophila* en présence des extraits de la plante *Bidens pilosa*

Température et durée d'incubation		Types d'extrait de plante, concentrations pondérales considérées et pourcentage d'inhibition (%) d' <i>Aeromonas hydrophila</i>							
		Extrait aqueux de <i>B. pilosa</i>				Extrait hydroéthanolique de <i>B. pilosa</i>			
Température d'incubation	Durée d'incubation	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l
37°C	3H	85,12	86,5	96,25	97	42,31	19,87	48,19	60,84
	6H	35,43	79,24	70,75	82,40	44,82	56,99	65,11	72,51
	9H	40,44	65,12	79,09	94,74	52,88	55,65	64,20	82,44
	24h	63,38	74,53	77,11	85,32	4,91	5,08	6,14	36,87
44°C	3H	93,57	99,30	97,74	99,56	57,24	86,72	85,17	81,55
	6H	82,83	95,97	98,30	97,45	14,12	28,81	34,46	69,77
	9H	99,37	99,05	98,74	99,68	22,00	42,22	63,39	73,15
	24h	96,72	90,16	100	100	76,64	83,60	80,37	100

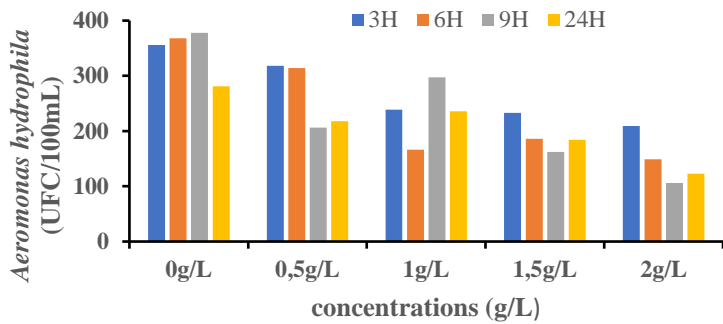
❖ Variation temporelle des abondances de *Aeromonas hydrophila* en présence des extraits de *Moringa stenopetala* aux températures 37°C et 44°C

Avec l'augmentation de la concentration de l'extrait aqueux du *Moringa stenopetala*, à 37°C il a été observé par rapport aux témoins une diminution des abondances des cellules de *Aeromonas hydrophila*. Ils ont varié entre 360 et 184 ; 320 et 76 ; 287 et 67 ; 272 et 38 (UFC/100 ml), respectivement aux temps d'incubation (3h, 6h, 9h et 24h) (figure 14). Il a été noté en générale une baisse de ces abondances en fonction du temps d'incubation. Mais aucune inhibition totale à toutes les concentrations et températures n'a été observé. Avec l'extrait hydroéthanolique de la même plante à 37°C, une baisse considérable est obtenue à la concentration 2 g/l à 24h.

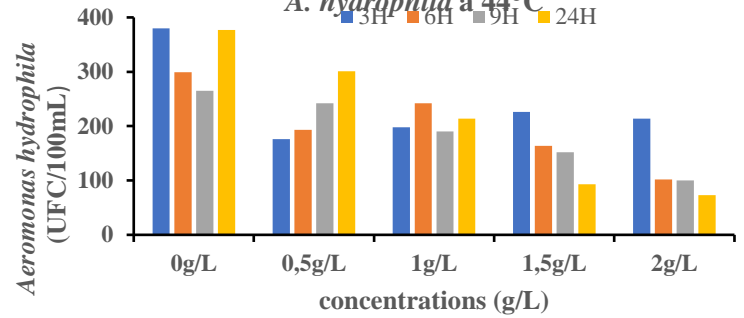
Par rapport à la variation croissante de la concentration de l'extrait aqueux du *Moringa stenopetala* à 44°C, il apparait dans le milieu une diminution des abondances de ces cellules de *Aeromonas hydrophila*. Ces abondances ont diminué entre 340 et 98 ; 320 et 20 ; 310 et 80 ; 221 et 42 (UFC/100 ml), à la température 44°C. Il apparait en générale une baisse des abondances des cellules par rapport au control, mais entre 3 - 24h aucune inhibition totale n'a été relevée à toutes les concentrations et temps de contact.

Les meilleures diminution de croissances ont été observées avec l'extrait hydroéthanolique de *M.stenopetala* à 44°C après 3h d'incubation aux différentes concentrations.

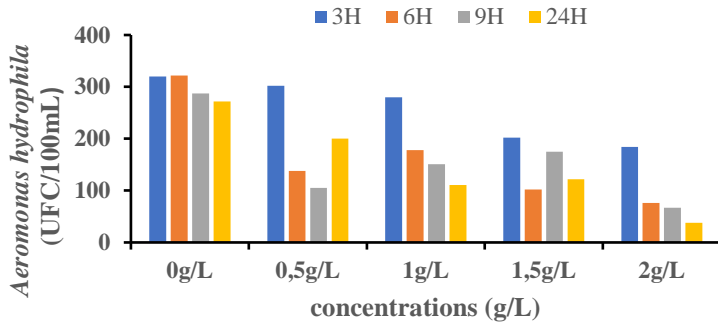
Activité de l'extrait aqueux de M.S sur la cultivabilité de *A. hydrophila* à 37°C



Activité de l'extrait aqueux de M.S sur la cultivabilité de *A. hydrophila* à 44°C



Activité de l'extrait hydroéthanolique de M.S sur la cultivabilité de *A. hydrophila* à 37°C



Activité de l'extrait hydroéthanolique de M.S sur la cultivabilité de *A. hydrophila* à 44°C

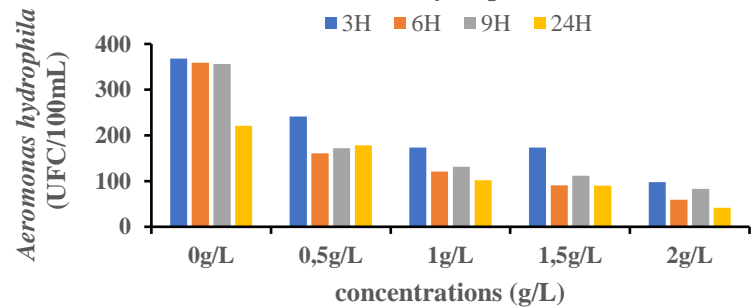


Figure 15 : Variation temporelle des densités cellulaires de *Aeromonas hydrophila* en présence des extraits aqueux et hydroéthanoliques de *Moringa stenopetala* à 37°C et 44°C.

❖ Pourcentages d'inhibition de *Aeromonas hydrophila* en présence des extraits de *Moringa stenopetala* aux températures 37°C et 44°C

Les pourcentages d'inhibition de la croissance de *A. hydrophila* ont été calculés pour chaque type d'extrait *Moringa stenopetala* à chaque température et durée d'incubation (tableau VIII). Ces pourcentages d'inhibition varient dans l'ensemble de 2,94% obtenu après 3h d'incubation à la concentration de 0,5 g/l en présence de l'extrait aqueux à 89,78% observé en présence de l'extrait hydroéthanolique après 24h d'incubation à la concentration 2 g/l. l'inhibition est la plupart du temps plus marquée en présence d'extrait hydroéthanolique de *M. stenopetala*.

Tableau VIII : Pourcentages d'inhibition (%) de la croissance de *Aeromonas hydrophila* en présence des extraits de la plante *Moringa stenopetala*

Température et durée d'incubation		Types d'extrait de plante, concentrations pondérales considérées et pourcentage d'inhibition (%) d' <i>Aeromonas hydrophila</i>							
		Extrait aqueux de <i>M. stenopetala</i>				Extrait hydroéthanolique de <i>M. stenopetala</i>			
Température d'incubation	Durée d'incubation	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l
37°C	3H	2,94	32,95	34,64	11,92	45,50	60,05	71,18	73,75
	6H	14,67	54,89	49,45	59,51	73,46	65,90	80,45	85,34
	9H	21,42	45,50	57,14	71,95	78,33	68,89	63,96	86,24
	24h	19,33	50,93	61,74	74,42	46,23	70,16	67,06	89,78
44°C	3H	69,65	65,86	61,03	63,10	51,60	65,26	65,26	80,32
	6H	61,32	52,50	67,13	79,55	64,92	73,63	80,17	85,14
	9H	47,83	59,13	67,31	78,49	51,68	63,20	68,53	76,68
	24h	47,83	62,91	83,88	87,34	19,45	53,84	59,27	80,54

III.1.2.2. Variation temporelle des abondances de *Vibrio cholerae* et pourcentage d'inhibition en présence des extraits des plantes *Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala* aux températures 37°C et 44°C

❖ Variation temporelle des abondances de *Vibrio cholerae* en présence des extraits de *Bidens pilosa* aux températures 37°C et 44°C

Il a été obtenu que quand la concentration de l'extrait aqueux de *Bidens pilosa* augmente, on assiste à une diminution des abondances cellulaires de 320 à 208 ; 328 à 98 ; 308 à 106 et 270 à 123 (UFC/100 ml), à la température 37°C respectivement. En présence de l'extrait hydroéthanolique à la même température, les abondances les plus faibles ont été de 200, 111, 122 et 38 (UFC/100 ml) après 24h d'incubation aux concentrations de 0,5 g/l, 1 g/l, 1,5 g/l, et 2 g/l respectivement.

Il a été en général noté que les abondances ont été parfois rares après un temps d'exposition de 24h, à la concentration 2 g/l quel que soit le type d'extrait et à la température 44°C. En présence de l'extrait hydroéthanolique à 44°C, les abondances cellulaires de *V. cholerae* les plus faibles ont été de 50, 44, 22, 16 et 0 (UFC/100 ml) aux concentrations de 0,5 g/l, 1 g/l, 1,5 g/l, et 2 g/l respectivement (figure 15).

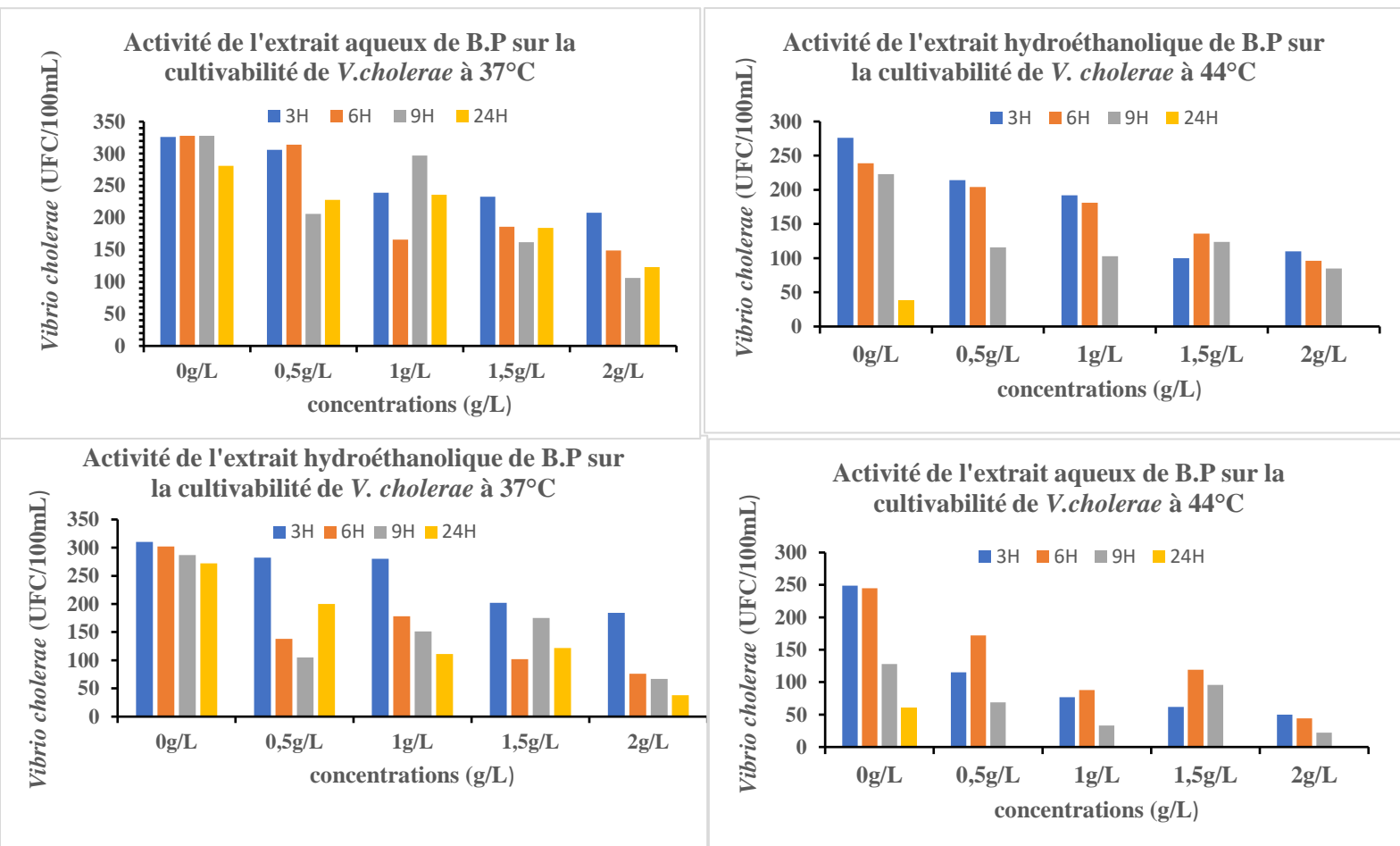


Figure 16 : Variation temporelle des densités cellulaires de *Vibrio cholerae* en présence des extraits aqueux et hydroéthanoliques de *Bidens pilosa* à 37°C et 44°C.

❖ **Pourcentage d'inhibition des abondances de *Vibrio cholerae* en présence des extraits de *Bidens pilosa* aux températures 37°C et 44°C**

Les pourcentages d'inhibition de la croissance de *Vibrio cholerae* ont été calculés pour chaque type d'extrait de *Bidens pilosa* et pour chaque température et durées d'incubations (tableau IX). Il en ressort dans l'ensemble que le pourcentage d'inhibition le plus élevé (100%) a été obtenu avec l'extrait aqueux et l'extrait hydroéthanolique aux concentrations 0,5g/l-2g/l après 24 h d'incubation à la température de 44°C. Toutefois, il est à constater que dans l'ensemble, les pourcentages d'inhibition diminuent après 6h et 9h quelque soit la concentration de l'extrait de *B. pilosa* considérée à 44°C.

Tableau IX : Pourcentages d'inhibition (%) de la croissance de *Vibrio cholerae* en présence des extraits de la plante *Bidens pilosa*

Température et durée d'incubation		Types d'extrait de plante, concentrations pondérales considérées et pourcentage d'inhibition (%) de <i>Vibrio cholerae</i>							
		Extrait aqueux de <i>B. pilosa</i>				Extrait hydroéthanolique de <i>B. pilosa</i>			
Température d'incubation	Durée d'incubation	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l
37°C	3H	42,76	66,35	23,27	75,47	25,90	31,36	15,45	55
	6H	54,12	75,25	64,17	76,28	30,29	56,03	42,62	79,22
	9H	51,57	65,26	54,38	80,35	28,59	57,38	30,46	82,05
	24h	21,77	53,22	28,22	74,19	72,46	97,82	100	100
44°C	3H	66,17	77,35	81,76	85,14	43,08	48,93	20,21	70,61
	6H	29,93	64,15	51,52	82,07	39,82	46,60	30,38	71,68
	9H	46,30	74,31	25,29	82,87	47,98	53,81	44,39	61,88
	24h	100	100	100	100	100	100	100	100

❖ Variation temporelle des abondances de *Vibrio cholerae* en présence des extraits de *Moringa stenopetala* aux températures 37°C et 44°C

En présence de l'extrait aqueux du *Moringa stenopetala*, les abondances cellulaires par rapport au témoin ont généralement diminué de 208 à 7 ; 150 à 3 ; 44 à 0 et de 32 à 0 (UFC/100 ml), à la température 44°C. Lorsque l'extrait aqueux à 37°C est testé, la densité de *V. cholerae* a été parfois rare après 24h d'incubation lorsque la concentration de l'extrait est de 2 g/l.

Les abondances cellulaires dans les différentes concentrations de l'extrait hydroéthanolique du *Moringa stenopetala* par comparaison aux témoins, ont diminué de 214 à 12 ; 176 à 3 ; 100 à 0 ; 112 à 16 (UFC/100 ml), à la température 44°C. Les résultats montrent que la cultivabilité des bactéries est rare lorsque les concentrations de l'extrait sont de 0,5 g/l et 2 g/L, à la température 44°C après 3h respectivement. Ce même résultat a été observé à la concentration de l'extrait de 2g/L après 24h d'incubation, et à la température de 37°C (figure 16).

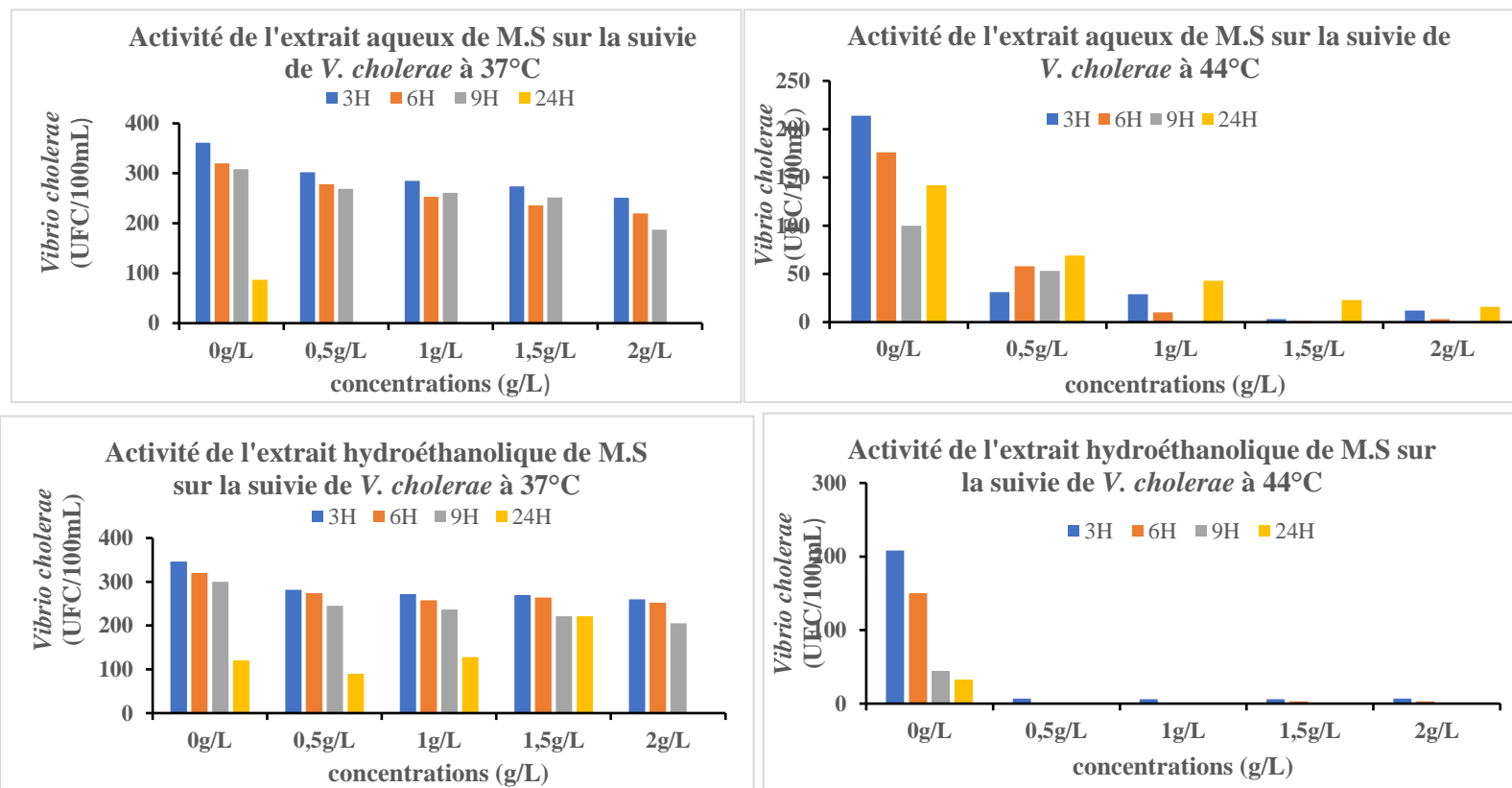


Figure 17 : Variation temporelle des densités cellulaires de *Vibrio cholerae* en présence des extraits aqueux et hydroéthanoliques de *Moringa stenopetala* à 37°C et 44°C.

❖ Pourcentages d'inhibition de *Vibrio cholerae* en présence des extraits de *Moringa stenopetala* aux températures 37°C et 44°C

Les pourcentages d'inhibition de la croissance de *Vibrio cholerae* ont été calculés pour chaque type d'extrait de *Moringa stenopetala*, pour chaque température et durées d'incubations (tableau X). Il en ressort que les meilleurs pourcentages d'inhibitions (100%) ont été obtenu en présence de l'extrait aqueux aux concentrations 0,5 g/l, 1g/l 1,5 g/l et 2g/l à 44°C et après après 9h et 24h d'incubation respectivement, de même aux concentrations 1 g/l, 1,5 g/l et 2 g/l à 37°C à 9h d'incubation. On note également qu'en présence de l'extrait hydroéthanolique aux concentrations comprises entre 0,5g/l, 1 g/l et 2g/l après 24 h d'incubation à 44°C et à 2g/L à 37°C des pourcentages d'inhibition sont de 100% (tableau X).

Tableau X : Pourcentages d'inhibition (%) de la croissance de *Vibrio cholerae* en présence des extraits de la plante *Moringa stenopetala*.

Température et durée d'incubation		Types d'extrait de plante, concentrations pondérales considérées et pourcentage d'inhibition (%) de <i>Vibrio cholerae</i>							
		Extrait aqueux <i>M. stenopetala</i>				Extrait hydroéthanolique <i>M. stenopetala</i>			
Température d'incubation	Durée d'incubation	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l
37°C	3H	86,94	90,76	99,04	96,33	5,86	1,02	1,05	1,06
	6H	66,76	94,31	99,43	98,57	2,54	14,60	4,51	1,23
	9H	47	100	100	100	6,29	25,56	1,59	5,99
	24h	51,05	69,71	83,80	88,73	25	7,08	4,16	100
44°C	3H	97,14	97,36	97,36	97,14	23,54	26,17	38,78	9,41
	6H	99,33	100	98,33	98	4,21	6,28	1	15
	9H	100	100	100	100	16,64	15,82	14,07	39,13
	24h	100	100	100	100	100	100	99,83	100

III.1.3. Efficacité de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes

III.1.3.1. Concentrations minimales inhibitrices (CMI), concentrations minimales bactéricides (CMB) et des extraits de feuilles *Bidens pilosa* et de *Moringa stenopetala*

Le calcul des CMI et CMB montre dans l'ensemble que les résultats varient en fonction du type d'extrait et de la plante. Les différents extraits ont montré de bonnes activités antimicrobiennes sur tous les microorganismes testés avec des CMI allant de 0,488 à 62,5 mg/ml. La CMI calculée a révélé que comparativement aux deux types d'extraits utilisés dans l'étude, l'extrait aqueux des deux plantes a montré une meilleure activité antimicrobienne sur *Vibrio cholerae* avec des CMI de 0,488 mg/ml. Cette activité a été faible lorsqu'on considère l'extrait hydroéthanolique de *Bidens pilosa* avec une valeur de 62,5 mg/ml. De plus, aucune activité antimicrobienne n'a été observée avec l'extrait hydroéthanolique de *Moringa stenopetala*. La lévofloxacine utilisée comme antibiotique de référence a présenté une activité antibactérienne sur l'ensemble des souches testées avec des CMI allant de 0,488 mg/ml sur *A. hydrophila* à 1,953 mg/ml sur *V. cholerae*. Les CMI des extraits aqueux et hydroéthanoliques des différentes plantes et de l'antibiotique sont présentées dans le tableau XI.

Tous ces paramètres ont permis de calculer le rapport CMB/CMI caractérisant une action bactéricide, bactériostatique ou tolérante vis-à-vis des bactéries utilisées pour tester les extraits. L'extrait aqueux et hydroéthanolique de *Bidens pilosa* était bactéricide sur l'ensemble des souches. L'extrait aqueux et hydroéthanolique de *Moringa stenopetala* était bactériostatique sur *Aeromonas hydrophila* et bactéricide sur *Vibrio cholerae* avec l'extrait aqueux alors que, l'extrait hydroéthanolique de *M. stenopetala* n'a eu aucune activité sur la

souche *Vibrio cholerae*. L'antibiotique de référence était quant à lui bactéricide sur *Aeromonas hydrophila* mais bactériostatique sur *Vibrio cholerae*.

Tableau XI : Concentrations minimales inhibitrices (CMI), concentrations minimales bactéricides (CMB) en mg/ml des différents extraits sur les microorganismes testés

Antimicrobiens	Paramètres d'inhibition (mg/mL)	Souches bactériennes	
		<i>A. hydrophila</i>	<i>V. cholerae</i>
Extrait aqueux de <i>Bidens pilosa</i>	CMI	0,976	0,488
	CMB	0,488	0,976
	CMB/CMI	0,5	2
	Activité	Bactéricide	Bactéricide
Extrait hydroéthanolique de <i>Bidens pilosa</i>	CMI	1,953	62,5
	CMB	1,953	125
	CMB/CMI	1	2
	Activité	Bactéricide	Bactéricide
Extrait aqueux de <i>Moringa stenopetala</i>	CMI	1,953	0,488
	CMB	7,812	0,488
	CMB/CMI	4	1
	Activité	Bactériostatique	Bactéricide
Extrait hydroéthanolique de <i>Moringa stenopetala</i>	CMI	1,953	/
	CMB	31,25	/
	CMB/CMI	16	/
	Activité	Bactériostatique	Absente
Levofloxacin	CMI	0,488	1,95
	CMB	0,488	7,81
	CMB/CMI	1	4
	Activité	Bactéricide	Bactériostatique

III.1.4. Corrélations «r» de Spearman entre les différentes variables considérées

III.1.4.1. Corrélations entre les densités microbiennes, températures et les concentrations d'extrait à chaque durée d'incubation

❖ **Corrélations entre les densités microbiennes et les durées d'incubation pour chaque concentration d'extrait aqueux et hydroéthanolique de *Bidens pilosa***

Les coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les abondances des microorganismes et les concentrations d'extrait de *Bidens pilosa* à chaque durée d'incubation, température et type d'extrait ont été calculés et sont présentés dans le tableau XII. Il en ressort qu'aucune corrélation significative n'a été observée entre les densités de *Vibrio cholerae* aux différents types d'extrait et température à l'exception de l'extrait aqueux au temps d'incubation

9h à 37°C. L'augmentation de la durée d'incubation de l'extrait aqueux de *Bidens pilosa* a entraîné une diminution significative ($p < 0,05$ et $p \leq 0,01$) des cellules bactériennes de *Aeromonas hydrophila* à toutes les températures après 3h, 6 h, 9 h et 24 h d'incubation ; il en est de même avec l'extrait hydroéthanolique au temps 6h et 9h.

Tableau XII : Corrélations entre les densités microbiennes et les durées d'incubation pour chaque concentration d'extrait aqueux et hydroéthanolique des feuilles de *Bidens pilosa*

Souches bactériennes	T°	Durée d'incubation <i>Bidens pilosa</i> extrait aqueux				Durée d'incubation <i>Bidens pilosa</i> extrait hydroéthanolique			
		3h	6h	9h	24h	3h	6h	9h	24h
<i>Vibrio cholerae</i>	37°C	-0.71	-0.34	-0.82*	-0.13	-0.70	-0.24	-0.82	-0.17
	44°C	-0.50	-0.24	-0.52	-0.17	-0.56	-0.22	-0.52	-0.17
<i>Aeromonas hydrophila</i>	37°C	-0.94**	-0.90*	-0.97**	-0.94**	-0.79	-0.97**	-0.95*	-0.48
	44°C	-0.87*	-0.91*	-0.75	-0.91*	-0.81	-0.90*	-0.99**	-0.78

*= corrélation significative à $P < 0,05$; **= corrélation significative à $P < 0,01$; ddl= 2

❖ Corrélations entre les densités microbiennes et les durées d'incubation pour chaque concentration d'extrait aqueux et hydroéthanolique de *Moringa stenopetala*

Les coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les abondances des microorganismes et les concentrations d'extrait de *Moringa stenopetala* à chaque durée d'incubation, température et type d'extrait ont été calculés et sont présentés dans le tableau XIII. Il en ressort que, les abondances des cellules de *A. hydrophila* diminuent significativement ($p < 0,05$ et $p \leq 0,01$) avec la hausse des concentrations d'extraits aqueux de *M. stenopetala* à chaque durée d'exposition ; exception faite pour les extraits aqueux à 3h de 37°C et 44°C. Aucune corrélation significative n'a été observée entre les durées d'incubation des extraits hydroéthanoliques de *M. stenopetala* sur *Vibrio cholerae* à 37°C et 44°C. Une corrélation significative et négative a été obtenue à 24h avec l'extrait aqueux de *V. cholerae* à 37°C.

Tableau XIII : Corrélations entre les densités microbiennes et les durées d'incubation pour chaque concentration d'extrait aqueux et hydroéthanolique des feuilles de *Moringa stenopetala*

Souches bactériennes	T°	Durée d'incubation <i>Moringa stenopetala</i> extrait aqueux				Durée d'incubation <i>Moringa stenopetala</i> extrait hydroéthanolique			
		3h	6h	9h	24h	3h	6h	9h	24h
<i>Vibrio cholerae</i>	37°C	-0.80	-0.87*	-0.52	-0.95**	-0.79	-0.51	-0.85	-0.38
	44°C	-0.68	-0.79	-0.79	-0.92*	-0.79	-0.51	-0.85	-0.38
<i>Aeromonas hydrophila</i>	37°C	-0.11	-0.91*	-0.99**	-0.98**	-0.96**	-0.88*	-0.74	-0.98**
	44°C	-0.57	-0.90*	-0.97**	-0.98**	-0.95**	-0.95**	-0.95**	-0.95**

*= corrélation significative à $P < 0,05$; **= corrélation significative à $P < 0,01$; ddl=2

III.1.4.2. Corrélations entre les densités microbiennes et les durées d'incubation pour chaque concentration d'extrait

❖ Corrélations entre les densités microbiennes et les concentrations d'extraits aqueux et hydroéthanolique de *Bidens pilosa* pour chaque durée d'incubation

Les coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les densités microbiennes pour chaque concentration d'extrait de *Bidens pilosa* à chaque type d'extrait, température et durée d'incubation ont été calculés. L'augmentation de la durée d'incubation a entraîné une diminution significative et négative ($p < 0,05$ et $p \leq 0,01$) de *A. hydrophila* en présence de l'extrait aqueux aux concentrations 1,5-2g/l (44°C) et de l'extrait hydroéthanolique aux concentrations 1-1,5 g/l (37°C). Entraînant l'inhibition des abondances de cellules cultivables de toutes les souches des microorganismes considérées. Par moment il a été observé des corrélations, non significatives et positives avec *V. cholerae* pour les deux types extraits à 44°C et avec l'extrait hydroéthanolique de *A. hydrophila* à 37°C (tableau XIV).

Tableau XIV : Corrélations entre les densités microbiennes et les concentrations d'extraits aqueux et hydroéthanolique des feuilles de *Bidens pilosa* pour chaque durée d'incubation.

Souches bactériennes	T°	Concentration <i>Bidens pilosa</i> extrait aqueux					Concentration <i>Bidens pilosa</i> extrait hydroéthanolique				
		0 g/l	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l	0 g/l	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l
<i>Vibrio cholerae</i>	37°C	-0.43	-0.62	-0.92*	-0.54	-0.70*	-0.53	-0.62**	-0.92*	-0.44	-0.40**
	44°C	0.27	0.35	0.72	0.62	0.32	0.27*	0.65*	0.92	0.62	0.72
<i>Aeromonas hydrophila</i>	37°C	0.21	0.19	0.43	0.47	0.55	-0.90	-0.01	-0.99**	-0.99**	-0.73
	44°C	-0.97*	-0.74	-0.29	-0.99**	-0.97*	-0.29	-0.89	-0.45	-0.44	-0.96*

*= corrélation significative à $P < 0,05$; **= corrélation significative à $P < 0,01$; ddl=2

❖ Corrélations entre les densités microbiennes et les concentrations d'extraits aqueux et hydroéthanolique de *Moringa stenopetala* pour chaque durée d'incubation

Les coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les densités microbiennes pour chaque concentration d'extrait de *Moringa stenopetala* à chaque type d'extrait, température et durée d'incubation ont été calculés. Par moment il a été observé des corrélations, non significatives et positives avec *V. cholerae* et *A. hydrophila* à 37°C de l'extrait aqueux.

De même, des corrélations significatives et négatives ($p < 0,05$ et $p \leq 0,01$) ont été notées entre la densité microbienne et l'augmentation de la durée d'incubation pour les concentrations

1,5 et 2g/l de *V.cholerae* (extrait aqueux) à 44°C ; 2g/l de *A.hydrophila* (extrait hydroéthanolique) à 37°C (tableau XV).

Tableau XV : Corrélations entre les densités microbiennes et les concentrations d'extraits aqueux et hydroéthanolique de *Moringa stenopetala* pour chaque durée d'incubation.

Souches bactériennes	T°	Concentration <i>Moringa stenopetala</i> extrait aqueux					Concentrations <i>Moringa stenopetala</i> extrait hydroéthanolique				
		0 g/l	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l	0 g/l	0,5 g/l	1 g/l	1,5 g/l	2 g/l
<i>Vibrio cholerae</i>	44°C	-0.97*	-0.29	-	-0.99**	-0.97*	-0.63	-0.62	-0.92*	-0.84	-0.90*
	37°C	0.21	-0.65	0.29	-0.37	0.07	-0.90	-0.18	-0.99**	-0.96*	-0.12
<i>Aeromonas hydrophila</i>	44°C	0.30	0.94*	0.07	-0.96*	-0.78	-0.98**	-0.35	-0.82	-0.61	0.05
	37°C	0.99**	0.66	0.35	0.38	-0.65	-0.91	-0.14	-0.88	-0.39	-0.98**

*= corrélation significative à P < 0,05 ; **= corrélation significative à P < 0,01 ; ddl=2

III.1.5. Comparaisons des moyennes des données analysées

Les comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les durées d'incubation pour chaque type d'extrait, entre les concentrations d'extrait et entre les différents types d'extraits ont été réalisées à l'aide du test H de Kruskal-Wallis et le test T de Wilcoxon.

III.1.5.1. Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les températures et les durées d'incubation pour chaque type d'extrait

Des variations significatives des densités ont été observées aux différentes durées d'incubation pour les différents extraits, bactéries et températures de la plante *Bidens pilosa*. Une variation significative (p<0,05) a été observée avec l'extrait hydroéthanolique de *A. hydrophila* à 44°C et aux temps d'incubation 3h et 9h avec les différents extraits aux températures 37°C et 44°C pour les deux microorganismes (tableau XVI). Le même résultat a été observé avec *V. cholerae* après 24h d'incubation sur l'extrait aqueux.

Tableau XVI : Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les durées d'incubation pour chaque type d'extrait de feuilles de *Bidens pilosa*

Souches bactériennes	<i>Bidens pilosa</i>	Température	Durée			
			3h	6h	9h	24h
<i>Vibrio cholerae</i>	Extrait aqueux	37°C	P=0,010*	P=0,452	P=0,071*	P=0,084
		44°C	P=0,995	P=0,300	P=0,030*	P=0,019*
	Extrait hydroéthanolique	37°C	P=0,042*	P=0,960	P=0,094	P=0,091
		44°C	P=0,017*	P=0,126	P=0,559	P=0,321
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Extrait aqueux	37°C	P=0,050*	P=0,002*	P=0,001*	P=0,434
		44°C	P=0,250	P=0,250	P=0,023*	P=0,091
	Extrait hydroéthanolique	37°C	P=0,003*	P=0,021*	P=0,434	P=0,059
		44°C	P=0,018*	P=0,026*	P=0,003*	P=0,050*

*= P < 0,05 ; ddl=4

❖ Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les durées d'incubation pour chaque type d'extrait de feuilles de *Moringa stenopetala*

Les valeurs des coefficients de significativité ont été observées aux différentes durées d'incubation pour les différents extraits, bactéries et températures de la plante *Moringa stenopetala*. Une variation significative ($p < 0,05$) a été observée avec l'extrait aqueux pour *A. hydrophila* à 44°C. Des variations significatives des densités ont été observées entre 6h, 9h et 24h d'incubation des deux extraits de la plante sur *V. cholerae* et *A. hydrophila* (tableau XVI).

Tableau XVII : Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les durées d'incubation pour chaque type d'extrait de feuilles de *Moringa stenopetala*

Souches bactériennes	<i>Moringa stenopetala</i>	Température	Durée			
			3h	6h	9h	24h
<i>Vibrio cholerae</i>	Extrait aqueux	37°C	P=0,001*	P=0,042*	P=0,001*	P=0,004*
		44°C	P=0,255	P=0,020*	P=0,037*	P=0,111
	Extrait hydroéthanolique	37°C	P=0,022*	P=0,860	P=0,044*	P=0,081
		44°C	P=0,002*	P=0,001*	P=0,001*	P=0,001*
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Extrait aqueux	37°C	P=0,250	P=0,062	P=0,001*	P=0,004*
		44°C	P=0,013*	P=0,001*	P=0,003*	P=0,005*
	Extrait hydroéthanolique	37°C	P=0,002*	P=0,021*	P=0,459	P=0,059
		44°C	P=0,250	P=0,023*	P=0,0091*	P=0,022*

*= $P < 0,05$; ddl=4

III.1.5.2. Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les températures et les concentrations pour chaque type d'extrait

❖ Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les concentrations des extraits de *Bidens pilosa*

Les valeurs moyennes des abondances des microorganismes enregistrées dans différentes concentrations et type d'extrait de *Bidens pilosa* à chaque période d'incubation ont été comparées entre elles. Il a été noté que les abondances des cellules diffèrent significativement ($p < 0,05$) avec l'extrait aqueux et l'extrait hydroéthanolique pour *A. hydrophila* à 44°C ; ainsi que à la concentration 2g/l pour toutes les températures et à chaque type d'extrait (tableau XVIII).

Tableau XVIII : Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les concentrations des extraits des feuilles de *Bidens pilosa*

Souches bactériennes	<i>Bidens pilosa</i>	Température	Concentration				
			0	0,5	1	1,5	2
<i>Vibrio cholerae</i>	Extrait aqueux	37°C	P=0,031*	P=0,002*	P=0,001*	P=0,004*	P=0,005*
		44°C	P=0,071	P=0,007*	P=0,001*	P=0,005*	P=0,024*
	Extrait hydroéthanolique	37°C	P=0,052	P=0,860	P=0,044*	P=0,001*	P=0,001*
		44°C	P=0,019*	P=0,020*	P=0,021*	P=0,007*	P=0,008*
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Extrait aqueux	37°C	P=0,250	P=0,002*	P=0,001*	P=0,004*	P=0,005*
		44°C	P=0,001*	P=0,003*	P=0,003*	P=0,004*	P=0,008*
	Extrait hydroéthanolique	37°C	P=0,002*	P=0,021*	P=0,459	P=0,059	P=0,012*
		44°C	P=0,001*	P=0,003*	P=0,040*	P=0,008*	P=0,005*

*= P < 0,05 ; ddl=5

❖ Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les concentrations des extraits de *Moringa stenopetala*

Les abondances des cellules diffèrent significativement (p<0,05) ceci avec la température d'incubation, le type d'extrait de la plante *M. stenopetala*. Une variation significative (p<0,05) a été observée avec l'extrait hydroéthanolique pour *A. hydrophila* à 44°C, de même que des différences non significatives ont été notées (tableau XIX).

Tableau XIX : Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les concentrations des extraits des feuilles de *Moringa stenopetala*

Souches bactériennes	<i>Moringa stenopetala</i>	Température	Concentration				
			0	0,5	1	1,5	2
<i>Vibrio cholerae</i>	Extrait aqueux	37°C	P=0,006*	P=0,021*	P=0,459	P=0,059	P=0,012*
		44°C	P=0,038*	P=0,002*	P=0,001*	P=0,004*	P=0,001*
	Extrait hydroéthanolique	37°C	P=0,007*	P=0,0259	P=0,355	P=0,180	P=0,307
		44°C	P=0,052	P=0,860	P=0,044*	P=0,001*	P=0,001*
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Extrait aqueux	37°C	P=0,002*	P=0,021*	P=0,459	P=0,059	P=0,012*
		44°C	P=0,250	P=0,002*	P=0,001*	P=0,004*	P=0,005*
	Extrait hydroéthanolique	37°C	P=0,250	P=0,002*	P=0,001*	P=0,004*	P=0,005*
		44°C	P=0,008*	P=0,015*	P=0,013*	P=0,005*	P=0,020*

*= P < 0,05 ; ddl=5

III.1.5.3. Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les différents extraits.

Des résultats présentés dans le tableau XX, il ressort que des différences significatives (P<0,05) ont été observées entre les moyennes des densités microbiennes et les différents extraits au contact de *V. cholerae*, *A. hydrophila* pour les différents extraits de *Moringa*

Activités antimicrobiennes des extraits des plantes Bidens pilosa et Moringa stenopetala sur Vibrio cholerae et Aeromonas hydrophila isolés du cours d'eau « Olézoa »

stenopetala. L'extrait aqueux et hydroéthanolique de *B. pilosa* auraient une bonne activité au contact de *A. hydrophila* mais pas d'activité au contact de *V. cholerae* (tableau XX).

Tableau XX : Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les différents extraits.

Souches bactériennes		<i>Bidens pilosa</i>	<i>Moringa stenopetala</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	Extrait aqueux	0,832	0,007*
	Extrait hydroéthanolique	0,979	0,016*
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Extrait aqueux	0,035*	0,045*
	Extrait hydroéthanolique	0,022*	0,009*

*Différence significative à $P < 0,05$ ddl= 3

III.2- DISCUSSION

III.2.1. Screening phytochimique

Les résultats obtenus dans la présente étude ont mis en évidence une forte activité antimicrobienne des extraits aqueux et éthanoliques testés (*Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala*) contre les bactéries isolées de l'environnement. Comme solvants d'extraction, il a été utilisé de l'éthanol à 70% et l'eau distillée. Les rendements d'extraction obtenus par macération de 500g de poudre des feuilles de *B. pilosa* était de 13,15% et de 12,99% pour l'extrait aqueux et hydroéthanolique. Ces résultats sont proches par ceux obtenus par (Ngoupayo *et al.*, 2019). Les rendements de *M. stenopetala* était de 11,57% et de 10,82%. Les différents extraits sont de plus en plus débarrassés de macromolécules et moins solubles aux solvants utilisés pour ne contenir que des molécules bioactives et solubles à ces solvants (Okou *et al.*, 2018). La nature du solvant serait elle aussi à l'origine de l'extraction des principes actifs qui confèrent des propriétés antibactériennes aux extraits utilisés (Ngoupayo *et al.*, 2015). Cette différence de rendement peut également être due au type de solvant utilisé.

Les résultats du criblage phytochimique, ont révélé la présence des composés chimiques tels que les polyphénols, flavonoïdes, tanins, triterpènes, stérols, alcaloïdes dans les extraits aqueux et hydroéthanolique de *B. pilosa*. Ce résultat est similaire à celui obtenu par (Chafila-Moine *et al.*, 2023) qui avaient rapporté la présence de ces composés dans l'extrait aqueux et éthanoliques de la même plante. Cependant, les résultats de Ngoupayo *et al.*, 2019, n'ont pas montré la présence de tanins et anthocyanes et de tanins et quinones dans l'extrait aqueux et dans l'extrait hydroéthanolique.

Les composants mis en évidence dans les extraits *M. stenopetala* sont les tanins, les composés terpéniques, flavonoïdes, alcaloïdes, stéroïdes, saponines, phénols, coumarines et les anthraquinones. Au cours de cette étude il a été relevé l'absence de certains métabolites secondaires tels que les anthraquinones et les anthocyanines recherchés. Ceci corrobore avec les résultats des travaux menés par Kasolo *et al.* (2010) en Ouganda, Dzatam *et al.* (2016) au Cameroun et Millogho-Kone *et al.* (2013) au Burkina-Faso sur les extraits méthanoliques, éthanol-eau et au chlorure de méthylène respectivement.

Cette variation de métabolites secondaires observée pourrait être liée à la diversité des sols, le climat, le solvant, la méthode d'extraction et le degré de maturation de la plante lors de la récolte. A cet effet, Falleh *et al.*, 2008 et Podsedek (2007) ont noté que les températures élevées, l'exposition solaire, la maturation à la récolte et les conditions de stockage affectent la biosynthèse des métabolites secondaires.

III.2.2. Activité antibactérienne des extraits: évaluation de la concentration, la température et la durée d'incubation

L'activité antimicrobienne des différents extraits des deux plantes étudiées a été évaluée sur deux souches microbiennes (*A. hydrophila* et *V. cholerae*). Des variations temporelles des abondances des cellules microbiennes en présence des extraits sur les espèces microbiennes testées ont été observées. Ces variations étaient mises en exergue entre autres par les concentrations des extraits, du type d'extrait, de la température et des durées d'incubation

❖ Activité des extraits de *Bidens pilosa*

Les extraits aqueux et hydroéthanolique ont montré une activité bactérienne contre les souches bactériennes étudiées avec les pourcentages d'inhibition variant atteignant 100% (15,45% à 100% pour *V. cholerae* et 14,12 à 100% pour *A. hydrophila*). Ainsi, la diminution des densités microbiennes était significativement et négativement corrélée ($P < 0,05$) à l'augmentation des concentrations des extraits sur les espèces étudiées. Les différences observées entre les résultats obtenus pour chaque type d'extrait pourraient être liées à leur composition en métabolites secondaires et aux caractéristiques des espèces testées ; les saponines possèdent une propriété antibactérienne avec leur mode d'action attribué à leur capacité à provoquer une fuite de protéines et de certaines enzymes des cellules bactériennes (Tamil SA *et al.*, 2011). La présence des flavonoïdes et des alcaloïdes dans les feuilles de *B. pilosa* ayant un effet bactéricide significatif et lui conférerait des propriétés antioxydantes, antifongiques et antivirales (Ajanaku chritiana *et al.*, 2018 ; Anglini *et al.*, 2021). L'extrait aqueux et hydroéthanolique a montré une activité remarquable (100 % d'inhibition à 24h) avec des différences significatives ($P < 0,05$) qui augmentait avec les différentes concentrations d'extrait et les durées d'incubation sur *A. hydrophila* aux concentrations 1,5 et 2g/l à 44°C. Ces résultats sont similaires à ceux de Tassou *et al.*, 2000 et Tsuchiya et Linuma 2000 qui ont montré que plus la concentration d'extrait était élevée, plus la quantité de protéines qui s'échappaient de la cellule était importante et que cette fuite pouvait provoquer des dommages fonctionnels à la membrane plasmique. Soutenant ainsi l'utilité de cette plante dans le traitement de la diarrhée et la dysenterie chez les tribus Yoruba du Sud-Ouest du Nigéria (Omotanwa Alli *et al.*, 2023) qui avait obtenu le même résultat avec *Salmonella typhi* et *Escherichia coli*.

❖ **Activité des extraits de *Moringa stenopetala***

Une réduction importante des microorganismes en présence des extraits aqueux et éthanoliques de *Moringa stenopetala* a été notée, avec les gammes de concentrations choisies. Ainsi, la diminution des densités microbiennes était significativement et négativement corrélée ($P < 0,05$) à l'augmentation des concentrations et de la durée de contact des extraits aqueux et hydroéthanolique sur les espèces *A. hydrophila* et de *V.cholerae*. Ces résultats se rapprochent de ceux de **Mashiar et al. (2009)** et **Nigussie et al. (2021)** dans lesquels l'efficacité d'une poudre était obtenue respectivement à partir de l'extrait éthanolique et méthanolique des feuilles de *M. oleifera*. Il en n'est de même des travaux de **(Metsopkeng et al., 2019)**, dans l'utilisation des concentrations des graines de *Moringa oleifera* pour le traitement de la microflore bactériennes contenu dans l'eau. Certains travaux sur les feuilles de *Moringa stenopetala* ont révélé une action inhibitrice sur l'alpha amylasique et l'alpha glucosidasique **(Adisakwattana et al., 2011)** ralentissant le transport du glucose à travers l'épithélium intestinal. Ce résultat pourrait être lié à la présence dans cet extrait d'alcaloïdes et de flavonoïdes qui agiraient par un mécanisme de toxicité sur les bactéries, soit par inhibition des enzymes hydrolytiques, par perturbation des fonctions des protéines membranaires, ou par inhibition de l'ADN gyrase **(Wink, 2015)**. Ainsi les biomolécules responsables de cette activité anti alpha amylasique sont les alcaloïdes **(Pan et al., 2003)**. Les alcaloïdes des extraits aqueux de *Lantana camara*, *Cymbopogon stratus* et de *Hibiscus rosa simentis* sont cités par plusieurs auteurs comme ayant un effet bactéricide remarqué **(Davenport, 2006)**. En effet, des ressources végétales riches en composés polyphénoliques, flavonoïdes, protéines, bêta-carotène, calcium, potassium, vitamines comme dans les feuilles de *Moringa oleifera* Lam. (Moringacées) peuvent être utilisées pour la prévention de nombreuses pathologies **(Gülçin, 2012)**.

Il en ressort que l'inhibition bactérienne significative ($P < 0,05$) de l'extrait aqueux et hydroéthanolique des deux plantes a été observé sur *A. hydrophila* et *V. cholerae* à 44°C par rapport à 37°C, la température est l'un des paramètres explicatifs des changements dans l'abondance bactérienne. Il influence indirectement la productivité bactérienne en modifiant les propriétés physiques et chimiques de leur environnement. Dans cette étude, la température apparaît comme un facteur important impliqué dans l'inhibition cellulaire. Cette température d'incubation augmente l'efficacité des extraits de *Moringa stenopetala*, l'inhibition étant considérable à la température psychrophile **(Mauguin et al., 2004)**. Certains auteurs ont montré que dans des conditions psychrophiliques, les bactéries présentent une résistance aux extraits

de plantes (Tamsa Arfao, 2017). Une augmentation de la température serait liée à une augmentation de la vitesse des réactions métaboliques et biochimiques. D'où de fortes inhibitions observées à la température 44 °C avec *A. hydrophila* et *V. cholerae*.

III.2.3. Efficacité de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes à celle de l'antibiotique de référence: concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits des plantes

Les concentrations minimales inhibitrices des différents extraits de la plante *Bidens pilosa* variaient de 0,488 à 62,5 mg/ml. Tous les extraits de *B. pilosa* ont présenté une bonne activité antimicrobienne bactéricide sur les bactéries testées. Ce résultat diffère des travaux de Oweyemi *et al.*, 2017. En effet, ces auteurs montrent une sensibilité de l'extrait aqueux contre *Salmonella typhi* et *Shigella* avec des CMI allant de 50mg/ml à 512 mg/ml. Ces différences pourraient s'expliquer par l'utilisation dans leurs travaux de l'éthanol à 90% reconnu pour ses propriétés bactériostatiques lors de l'extraction des métabolites secondaires. D'autre part, l'extrait hydroéthanolique a été actif sur les microorganismes testés avec des CMI allant de 1,953mg/ml à 62,5mg/ml, ces résultats corroborent avec ceux de Nguyen *et al.*, 2022 qui ont travaillé avec les extraits éthanoliques et ont obtenu les CMI allant de 0,625mg/ml à 1,250mg/ml avec *A. hydrophila*. Ceci parce que les extraits hydroéthanolique de *B. pilosa* présentent des phytoconstitués tels que des phénols, des flavonoïdes, des saponines, des stéroïdes et des terpènes (Chafra-Molina *et al.*, 2023).

Les concentrations minimales inhibitrices des différents extraits de la plante *Moringa stenopetala* variaient de 0,488 à 62,5 mg/mL, Pour *Vibrio cholerae* seul l'extrait aqueux a montré la valeur la plus faible de la CMI (0,488 mg/mL). L'activité est marquée par la présence de la molécule 4H-1-benzopyran-4 one issus de la famille des coumarines et responsable de l'activité antibactérienne, également la protéine l'Oxazolidine E (Das *et al.*, 2005 ; Al-Majed *et al.*, 2017, Bhagat *et al.*, 2019). Un effet bactériostatique sur *A. hydrophila* avec l'extrait aqueux et hydroéthanolique a été obtenu. L'extrait hydroéthanolique de *Moringa stenopetala* par contre n'a montré aucune activité sur *Vibrio cholerae*, cela peut être dû à la résistance de ces souches face à cet extrait avec le problème de multirésistance (Hnich, 2017). En général les valeurs CMI de l'antibiotique de référence (la lévofloxacine) pour les bactéries sont plus faibles comparées à celle des extraits témoignant ainsi leur efficacité avérée. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la lévofloxacine est un produit synthétique qui possède une activité antimicrobienne spécifique sur les microorganismes. Elle inhibe l'ADN gyrase et les topoisomérase IV des cellules bactériennes G⁺ et G⁻ (Hnich, 2017). L'activité antimicrobienne

atténuée obtenue avec les extraits de plantes serait la résultante de la présence de plusieurs métabolites secondaires révélées par le screening chimique et qui pourraient avoir une action antagoniste entre elles. Les rapports CMB/CMI ont montré à la fois des effets bactéricides et bactériostatiques. Les extraits qui ont eu des effets bactéricides sont les plus recommandés en ce sens que les bactéries ne sont pas inhibées mais tués lors du traitement de l'eau.

**CONCLUSION RECOMMANDATIONS ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION

Parvenu au terme de ce travail qui consistait à étudier l'activité antimicrobienne des extraits de plantes *Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala* vis-à-vis des bactéries *Vibrio cholerae* et *Aeromonas hydrophila* isolés des milieux aquatiques. Les facteurs mis en exergue, dans cette étude ont été la concentration des extraits, le temps de contact des microorganismes dans la solution d'extrait, le type d'extrait et la température d'incubation, il ressort que :

- Le screening phytochimique des extraits de nos deux plantes à savoir *Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala* a montré la présence d'une variété de familles de métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les phénols, les polyphénols, les tanins, les saponines, les flavonoïdes, les triterpènes et les stéroïdes jouant chacun un rôle important dans le traitement de nombreuses maladies ;
- Les différents extraits ont présenté des activités variables sur les microorganismes aquatiques testés. L'extrait aqueux et hydroéthanolique a montré une activité remarquable (100 % d'inhibition entre 9h et 24h) sur *B.pilosa*. En ce qui concerne *M. stenopetala*, l'extrait hydroéthanolique a montré une activité remarquable sur *A. hydrophila*. Un résultat similaire a été observé pour l'extrait aqueux de cette même plante sur *V. cholerae*. Les taux d'inhibition de la cultivabilité cellulaire les plus élevées ont été enregistrées pour les concentrations d'extrait de 1,5g/l et 2 g/l.
- La température du milieu influence significativement l'inhibition bactérienne ($P < 0,05$), la meilleure activité a été observé à 44°C.
- Les souches testées ont montré une activité vis-à-vis des extraits. L'extrait aqueux et hydroéthanolique de *Bidens pilosa* ont possédé une meilleure activité avec un important effet bactéricide et les CMI qui variaient entre 0,97 et 1,95 mg/ml pour *A. hydrophila* et entre 0,488 et 62,5 mg/ml pour *V. cholerae*. De même que l'extrait aqueux de *M. stenopetala* sur *V. cholerae* (CMI=0,488mg/ml).

Ces résultats montrent que l'utilisation traditionnelle de *Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala* dans le traitement de l'eau et des maladies infectieuses pourrait être une alternative.

RECOMMANDATIONS

➤ **Aux populations**

De renforcer la mise en œuvre des moyens de potabilisation des eaux destinées à la consommation et de respecter les règles d'hygiène de base.

➤ **Aux Pouvoirs Publics**

De promouvoir le système d'alimentation et d'assainissement en eau et/ou d'aménager des sources/puits destinées à la consommation.

➤ **Au Ministère de la Recherche Scientifique et de l'Innovation**

De contribuer au financement des projets de recherche des étudiants portant sur les plantes médicinales.

PERSPECTIVES

Dans la continuité de ce travail, il est envisagé de :

- Déterminer l'activité des extraits de *B. pilosa* et *M. stenopetala* sur d'autres souches microbiennes multirésistantes ;
- Déterminer l'effet de l'association des extraits des plantes avec des classes antibiotiques/antifongiques ;
- Effectuer des études de toxicité des extraits

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aberra M., Workinesh et Tegene N. (2011).** Effects of feeding *Moringa stenopetala* leaf meal on nutrient intake and growth performance of Rhode Island Red chicks under tropical climate. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 14: 485-492.
- Adisakwattana S., Jiphimai P., Prutanopajai P., Chanathong B., Sapwar S et Ariyapitipan T. (2011).** Evaluation of alpha-glucosidase, alpha-amylase protein glycation inhibitory activities of edible plants. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 61: 295-305.
- Ajanaku C., Echeme J., Mordi R., Balade O., Okoye S., Hassana J., Ejulude O.(2018).** In Vitro Antibacterial, phytochemical, antimycobacterial activities and GC-MS analyses of *Bidens Pilosa* leaf extract. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 8 (1): 721-725.
- Ajeegah A. G., Foto S. M., Wouafo M., Moyou R. S., Nola M., Monkiedje A., Ngassam P., Zebaze Togouet., Kemka N. (2005).** Distribution of *Giardia* sp cysts in the Mfoundi water basin (Cameroon): influence of some physico-chemical factors of the medium. *Journal of the Cameroon Academy of Sciences*, 5 (2-3): 85-90.
- Ana Fernandez-Bravo et Maria José Figueras. (2020).** Microorganismes ;8(1) ; 129
- Angelini P., Matei F., Flores GA., Pellegrino RM., Vuguziga L., Venanzono R., Tirillini B., Emiliani C., Orlando G., Menghin L., (2021).** Metabolomic profiling, Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Bidens pilosa*, 9,903.
<https://doi.org/10.3390/pr9060903>
- Arora D.S., Onsare J.G et Kaur H. (2013).** Bioprospecting of Moringa (Moringaceae): Microbiological perspective, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1: 193-215.
- Atrahimovich D., Harris R., Eitan, R., Cohen M and Khatib, S. (2021).** Galantamine quantity and alkaloid profile in the bulbs of *Narcissus tazetta* and Daffodil cultivars (Amaryllidaceae) grown in Israel. *Metabolites*, 11(3)..
- Bairwa K., Kumar R., Sharma R.J., R.K. (2010).** An updated review on *Bidens Pilosa* L. *Der pharma Chemica*, 2(3), 325-337
- Baleng S.D., Noah Ewoti O.V., Koji E., Tamsa Arfao A., Mougang L.M., Tuekam Kayo R.P., Kolkossok Badouana U., Poutoum Yogne Y., et Nola M (2021).** Qualité microbiologique et physicochimique de quelques cours d'eau de l'arrondissement de Nkolafamba (région du centre, Cameroun)

- Baleng S.D., Noah Ewoti O.V., Song Ronny.,Tagne Morelle., Nola Moise .(2022).** Spatio-temporal variation of bacteria of the *Vibrio* and *Pseudomonas* genera in some underground water points developed in the locality of Ombessa (Department of Mbam-et-Inoubou, Center-Cameroon). <https://doi.org/10.53430/ijrsru.2022.4.2.0144>
- Bartolome A.P., Villasenor I.M., et Yang W.C (2013).** *Bidens pilosa*. (Asteraceae): botanical properties, traditional uses, phytochemistry and pharmacology Evidence-based complementary and alternative medicine
- Bhattacharya D., Dey S., Pazhani G. P., Ramamurthy T., Parande M. V., Kholkute S. D., Roy S.(2016).** *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant and emergence of Haitian ctxB variant in the strains isolated from South India. *Medical Microbiology and Immunology*, 205(2), 195–200.
- Boutaleb N. (2007).** **Etude de la formation de biofilms sur les matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eaux potables.** Thèse de Doctorat, Université de Bretagne-sud, 194 p.
- Broin M. (2005).** Compositions nutritionnelles des feuilles de *Moringa Stenopetala*. CTA, 5p. Disponible sur <http://www.moringanews.org>.
- C.L.S.I (Clinical Laboratory Standards Institute). (2021).** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard m27-a9, wayne. *Clinical and Laboratory Standards Institute* ; 32 : 12-28
- CA –SFM. (2021).** Étude de la sensibilité aux antimicrobiens ; recommandations 2021 : <http://www.sfm-microbiologie.org/pages/7-70p> consulté en Novembre 2022.
- Calop J., Limat S., Fernandez C et Aulagner G. (2012).** Pharmacie clinique et thérapeutique. 4ème édition. Paris : Elsevier Masson., 145p.
- Chafla-Moina A., Silva DL. (2023).** In Vitro evaluation of the antibacterial effect of extracts of *Bidens Pilosa* Y *Eryngium foetidum*; 55 : 109-119
- Chang S., Chiang C., Chen C., Liu T., Wang C., and Lin C. (2001).** Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. minor (Blume) Sherff and Houttuynia cordata Thunb. *The American journal of Chinese medicine*, 29(02),303-312.
- Chemweno Timothy K. (2018).** Propriétés antimicrobiennes, composition phytochimique et cytotoxicité de *Launaea cornuta*, *Maesa lanceolata* et *Bidens pilosa*. Thèse : University of Eldoret.
- Cortés-Rojas D.F., Chagas-Paula D.A., Da Costa F.B., Souza C.R., et Oliveira W.P. (2013).** Bioactive compounds in *Bidens pilosa*. Populations: a key step in the standardization of pytopharmaceutical preparation. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(1), 28-35

- Cruz-carrillo, Anastasia ; Rodriguez N., Natalia et Carlos Eduardo. (2010).** Evaluation de l'effet antibactérien des extraits de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* et *Silybum marianum* : 117-124 p
- Diagnostics Pasteur. (1987).** Milieux et réactifs de laboratoire. Microbiologie et immunologie, 3^e édition, Paris
- Dinzedi M.R. (2015).** Activités antibactériennes de extraits de *Terminalia catappa* et *Thonningia sanguinea* sur *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* multirésistantes d'origine humaine. Thèse de Doctorat de l'Université Félix Houphouët Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, 133 p.
- Dzotam J.K., Touani K.F and Kuete V. (2016).** Antibacterial and antibiotic-modifying activities of three food plants (*Xanthosoma mafaffa* Lam., *Moringa oleifera* (L.) Schott and *Passiflora edulis* Sims) against multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria. *BioMedical Central Complementary and Alternative Medicine* 16 (9), 2-8.
- El Amrani K. (2007).** La pollution de l'eau et ses impacts. Formation de formateurs « eau et développement durable ». ALMAE, 36 p.
- Etame-Loe G., Ngoule CC., Mbome B., Pouka KC., Ngene JP., Yinyang J., Okalla C., Ngaba GP., Dibong SD. (2018).** Contribution à l'étude des plantes médicinales et leurs utilisations traditionnelles dans le département du Lom et Djerem (Est, Cameroun). *Journal of Animal and plant Sciences*.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray B.N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly.C. (2008).** Phenolic composition of *Cynarara cardunculus* L. Organs, and their Biological Activities.. *Biology Reports*, 33 (1), 372-379.
- FAO (1997).** Agriculture Food and Nutrition for Africa. A resource Book for Teachers of Agriculture, publishing Management Group, FAO Information Division, Rome Italy.
- Ferreira P.M.P., Carvalho A.F.F.U., Sousa D.F., Ferreira J.M., Martins A.R., Martins A.M.C and Queiroz M.G.R. (2007).** Water extract of *Moringa oleifera* seeds: a toxicological approach. *Revista Eletrônica Pesquisa Médica* 1 (4): 45- 53.
- Fontes M. C., Martins C., Martinez-Murcia A. J, Saavedra M. J., (2012).** Phylogenetic diversity of *Aeromonas* from “Alheira,” a traditional Portuguese meat product. *Foodborne PathogDis* 9(8):713–718
- Gamage J., Zhang Z. (2010).** Application of photocatalytic disinfection, *International journal of photoenergy*. 7 (6): 48-50.
- Goudoum A., Abdou A., Ngamo L., Ngassoum M. (2016).** Antioxidant activities of essential oil of *Bidens pilosa* (Linn.Var.Radita) used for the preservation of food qualities in North Cameroon, 671-678.

- Gülçin I. (2012).** Antioxidant activity of food constituents: an overview, *Archeology Toxicology* 86 (3): 345-391.
- Harbone J.B. (1998).** *Phytochemical method: a guide to modern technique of plants*. Third edition. ISBN: 0412-57260-5.32p.
- Hnich, H. (2017).** La résistance bactérienne : mécanismes et méthodes de détection au laboratoire. Thèse pour l'obtention de diplôme doctorat en médecine. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, 149 p.
- Holt J. G., Krieg N.R., Sneath P. HA., Staley J. T., Williams S. T. (2000).** *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th edition Lipponcott Williams and Wilkins, Philadelphia. 787p.
- Houssou R., Fatondji F., Gbaguidi Kpoviessi S., Sonounameto E Latifou L., Sanni A., Moudachirou M.J.P and Accrombessi G.C.(2010).** Synthesis, Characterisation and Study of Antimicrobial activities of the Semicarbazone and the Thiosemicarbazone of the Carvone, *Journal of Society Ouest-Africa Chemistry* 30: 11-17.
- Houssou Raymond Fatondji, Kpoviessi S., Gbaguidi F., Chabi S.K., Gbenou J., Coffi G., Accrombessi, Moudachirou M and Poupaert J. (2018).** Synthesis, Characterization and Antimicrobial Properties of Some 1,3,4-thiadiazolines. *American Journal of Applied Chemistry* 6 (2). 64-70.
- Integrated Taxonomic Information System (ITIS). (2016).** *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King and H. Rob. Taxonomic Serial No: 37034, Geological Survey, VA, USA
- Islam M., Sirajul, Zaman, M. H., Islam, M. S., Ahmed N., Clemens J. D. (2020).** Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae*. *Vaccine*, 38, A52–A62.
- ISO. 2006.** Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices – Part 1. Geneva: International Organization for Standardization
- Jennifer M et Andrew. (2001).** Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48: 5-16
- Kasolo N.J., Bimenya G.S., Ojok L., Ochieng J and Ogwal-Okeng W.J. (2010).** Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Uganda rural communities *Journal of Medicinal Plants Research* 4 (9): 753-757.
- Kuete V. (2010).** Potential of Cameroonian plants and Derived products against microbial infections: A review. *Plant medicinal*, 76:1479-1491.
- Lai, B.Y., Chen, T.Y., Huang, S.H., Kuo, T.F., Chang, T.H., Chiang, C.K., and Chang, C.L.T. (2015).** *Bidens Pilosa* Formulation Improves Blood Homeostasis and β - Cell

Function in Men: A pilot study. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.15p.

- Laleye O.A.F., Ahissou H., Olounlade AP., Azando E.V.B et Laleye A.(2015).** Etude bibliographique de trois plantes antidiabétiques de la flore béninoise : *Khaya senegalensis* (Desr) A. Juss (Meliaceae), *Momordica charantia* Linn (Cucurbitaceae) et *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 9 (5): 2682-2700.
- Lewu B., Afolayan, J. (2009).** Ethnomedicine in South Africa: The role of weedy species. *African Journal of Biotechnology*, 8(6).
- Lozniewski A., Rabaud C. (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques, Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux–Infections associées aux soins, Centre de Coordination des Comités de lutte Contre les Infection, Sud-Est, Nancy ; 4 p.
- Madi O P., Bourou S et Noé W. (2012).** Utilisation et importances socio-économiques du *Moringa oleifera* lam. En zone de savanes d’Afrique central.cas de la ville de Moribga au Nord-Cameroun. *Journal of Applied Biosciences* 60 :4421-4432.
- Marsh K., Foley W., Cowling A and Wallis I. (2003).** Differential susceptibility to *Eucalyptus* secondary compounds explains feeding by the common ringtail (*Pseudocheirus peregrinus*) and common brushtail possum (*Trichosorus vulpecula*) *Journal of Comparative Physiology B*, 173: 69-78.
- Martin-Carnahan A., Joseph S. J., (2005).** *Genus I Aeromonas*. In: Brenner D. J., Krieg N. R., Staley T.J. editions. Bergey’s manual of systematic bacteriology. New York: Springer- Verlag, P. 557–578.
- Mbella MR., Danadam S., Tchissabou KM. (2023).** Resurgence d’une maladie hydrique dans la ville de Mélong le cholera, *revue espace géographique* 73-74
- McFarland J. (1907).** Nephelometer an instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of America Medical Association* 14 (117): 6-8.
- Meierhofer R., Landolt G. (2008).** Factors supporting the sustained use of solar water disinfection- Experiences from a global promotion and dissemination programme. *Water and Sanitation in Development and Disaster Relief*, 164-170.
- Metsopkeng C. S., Lontsi D. C., Noah Ewoti O. V., MOUNGANG L.M., NANA P. A, TAMSA ARFAO A., al. (2019).** *Moringa oleifera* seeds extract activity on Enteropathogenic *Escherichia coli* and *Aeromonas hydrophila* cells in aquatic microcosm. *Journal of Application. Biotechnology*. 7(2), 13-30.

- Metsopkeng CS, Nougang ME, Nana PA, Tamsa Arfao A, NGO Bahebeck P, Lontsi Djimeli C, Eheth JS, Noah Ewoti OV, Moungang LM, Agbor GA, Perriere F, Sime-Ngando T, Nola M (2020).** Comparative study of *Moringa stenopetala* root and leaf extracts against the bacteria *Staphylococcus aureus* strain from aquatic environment *Scientific African* **10**: e00549. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00549>
- Mezaache S. (2012).** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de pseudomonas isolées de la rhizosphère Université de Toulouse, 19 p.
- Mobili, O., Lontsi, D., Tamsa, A., Nougang, M., Allahdin, O., Noah, O., Mabingui, J., Bricheux, G., Simé-Ngando, T. et Nola, M. (2015)** Synergistic effect of light, pH and Artemisia annua extract on Enterococcus faecalis in aquatic microcosms. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 3:62-72
- Moni N.E.D.F. (2019).** Huiles essentielles de quatre plantes utilisées dans le traitement de la tuberculose dans deux localités du Nkam (Littoral): activité antimycobactérienne et cibles cellulaires. Thèse Université de Yaoundé I, Cameroun, 78 p.
- Munita M et Arias A. (2016).** Mechanisms of Antibiotic Resistance. In: Kudva IT, Cornick NA, Plummer PJ, Zhang Q, Nicholson TL, Bannantine JP éditeurs. Virulence mechanisms of bacterial pathogens, *Fifth Edition American Society of Microbiology*, P.481-511.
- Ndoye Foe Florentine M. C., Nyegue Maximilienne A., Kamdem Sylvain L. S., Riwom H. S. Essama., Etoa F-X. (2016).** Chemical composition, antioxidant effects and antimicrobial activities of some spices' essential oils on food pathogenic bacteria. *African Journal of Biotechnology*; 15(16): P. 649-656.
- Nenaah G. (2013).** Antimicrobial activity of *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29 (7): 1255-1262.
- Nestor J., Lutgen P et Schosser P. (2006).** Mise en œuvre de la méthode de stérilisation de l'eau SODIS en Colombie, *Revue Technique Luxembourgeoise*. 3 :151-152.
- Newton S. M., Lau C., Gurcha S. S., Besra G. S., Wright C. W. (2002).** The Evaluation of Forty-Three Plant Species for in vitro Antimycobacterial Activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 57–63.
- Ngongang T.D., Nyegue M.A., Djondji M.F., Ngonsu K.H., Moni N.E., Etoa F-X. (2018).** *In vivo* assessment of four essential oils against bacterial species isolated from

patients with oral infection. *Asian Journal of Research in Biological and Pharmaceutical Science*; 6(2): 44-57.

Ngoupayo J., Nteme Ebene M.S., Mushagalusa Kasali F., Mpondo Mpondo E., (2015). Phytochemical screening and antibacterial properties from extract of *Alchornea cordifolia* (Schumach. &Thonn.) Müll. *Arg. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4 (3): 176-180.

Ngoupayo J., Nteme Tsayo F.E., Sipowo Tala V., Kouamouo J., (2019). Chemical screening and identification of secondary metabolites by HPLC-MS-UV and antimicrobial activity of *Bidens Pilosa* (Asteraceae) extracts. *Arg. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(4): 1001-1006.

Nigussie D., Davey, G., Legesse B.A., Fekadu A. and Makonnen, E. (2021). Antibacterial activity of methanol extracts of the leaves of three medicinal plants against selected bacteria isolated from wounds of lymphoedema patients. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03183-0>.

Njiki A., Kamgang-Youbi G., Laminsi S., Lontsi C. D., Payom G., Nola M. and Ngameni E. (2016). Gliding arc discharge-assisted biodegradation of crystal violet in solution with *Aeromonas hydrophila* strain. *International Journal of Environmental Science and Technology* 13: 263-274.

Nyegue M.A. (2006). Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques et médicinales du Cameroun, thèse, Univ. Montpellier II, France.

Nyegue M.A., Moni N.E.D.F., Ndoyé-Foé F., Etoa F-X., Menut C. (2017). Bioactivity of essential oils from medical plants of Cameroon and their combinaison agains infant diarrhea induced by bacteria. *African Journal of Traditional and Complementary Alternernative Medecine*; 6:27-37.

Odeyemi A. O., Asmat A., Usup G., (2012). In vitro antimicrobial activity of *Aeromonas* spp. isolated from estuary using different screening protocols. *In International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*,3 (2): 428 - 433.

Okou (2018). Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de feuilles de *solanum torvum swartz* (*solonaceae*) sur la croissance in vitro de 3 souches d'entérobactéries

Omotanwa AN., Ekeleme IK., Jibril EO., Danladi NA., Smart OO. (2023). Antibacterial activity and phytochemical screening of some medicinal plant extracts against bacteria isolated from food materials sold in Keffi, Nasarawa state, Nigeria. *GSC Biological and pharmaceutical Sciences*, 22(01): 321-329.

- OMS 2004:** Guidelines for drinking water quality. OMS Recommandations éd, Geneva, 233p.
- OMS 2009 :** Statistiques Sanitaires Mondiales, 149 p
- OMS. (2017).** The World Intellectual Property Organization. Quality guidelines for drinking water fourth ed. incorporating the first Geneva additive: World Health Organization: CC BY-NC-SA 3.0 IGO; <http://www.who.int/about/licensing>.
- Ouedraogo S., Jean H., Bañuls L., Ouédraogo R., Godreuil S. (2017).** Emergence et diffusion de la résistance aux antibiotiques en Afrique de l'Ouest : facteurs favorisants et évaluation de la menace. *Médecine et Santé Tropicales* ; 27 : 147-154.
- Oussou K.R., Yolou S., Boti J.B., Guessennd K.N., Kanko C., Ahibo C., Casanova J. (2008).** Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*, 24 (1): 94-103.
- Owoyemi O.O., Muftau K.O. (2017).** Phytochemical screening and Antibacterial activities of *Bidens Pilosa L.* and *Tridax procumbens L.* on skin pathogens. *International Journal of Modern Biology and Medecine*, 8(1): 24-46.
- Panda S.K., Horie T., Kaneko T., Sugimota G., Sasano S., Shibasaka M and Katsuhara M. (2008).** Mechanisms of Water transport mediated by PIP aquaporins and Their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots. Oxford Journals: *Plant and Cell physiology* 52 (4): 663-675.
- Pan G.Y., Huang Z.J., Wang G.J., Fawcett J.P., Liu X.D., Zhao X.C., Sun J.G and Xie Y.Y. (2003).**The anti-hyperglycaemic activity of berberine arises from a decrease of glucose absorption. *Planta Medica* 69: 632-636. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-41121>.
- Pham T. D., Nguyen T. H., Iwashita H., Takemura T., Morita K., Yamashiro T. (2018).** Comparative analyses of CTX prophage region of *Vibrio cholerae* seventh pandemic wave 1 strains isolated in Asia. *Microbiology and Immunology*, 62(10), 635–650.
- Podsdek A. (2007).** Natural Antioxidants and Antioxidant Capacity of Brassica Vegetables: A Review *LWT*, 40,1-11.
- Poumayea N., Mabinguia J., Iutgen D.P et Etbiganc M. 2012.** Contribution to the clarification of surface water from the *Moringa oleifera*: case M'Poka River to Bangui, Central African Republic. *Chemical engineering research and design* .90 :2346-2352.
- Poutoum, Y. Y., MOUNGANG, L. M., Kweyang, B. P. T., Fonkui, T. Y., Meva'a, G. R. Z., Njeunkam, A.D., Rabiou, M. S. A. I., & Nola, M. (2023).**Evaluation of the Efficacy of Albizia zygia Extracts on Bacterial Inhibition in Aquatic Microcosm. *Journal of Geoscience and Environment Protection*, 11, 227-241.

- Prescott L.M,Harley J.P,Klein D (2010).** Microbiologie. 2ème Edition Francaise. De Boeck Université
- Racault M. F., Abdulaziz A., George G., Menon N., Jasmin C., Punathil, M., McConville K., Loveday,B., Platt T., Sathyendranath S., Vijayan V. (2019).** Environmental reservoirs of Vibrio cholerae: Challenges and opportunities for ocean-color remote sensing. *Remote Sensing*,11(23).
- Rachida M., Yosra B., Viannev P., Etien C. (2015).** Factors other than metalloprotease are required for full virulence of French Vibrio tubiashi isolates in oyster larvae. *Journal of Microbiology* 161 (5), 997-1007
- Rafique R., Rashid M., Monira S., Rahman Z. (2016).** Transmission of Infectious Vibrio cholerae through Drinking Water among the Household Contacts of Cholera Patients (CHoBI7Trial).7,1–10.
- Rodier J., Legube B., Merlet N., Mialocq J.C., Leroy P., Houssin M., Lavison G., Bechemin C., Vincent M., (2009).** L'analyse de l'eau. Dunod, 9e édition, Paris, 1579p.
- Ry Stanier.(1943).** A note on the taxonomy of proteus hydrophilus. *Journal of bacteriology* 46(2): 213-214
- Shandukani PD., Tshidini SC., Masoko P., Moganedi KM.(2018).** Antibacterial activity and in situ efficacy of Bidens Pilosa Linn and Dichrostachys cinerea wight arn extracts against common diarrhea causing Waterborne bacteria. <https://doi.org/10.1186/s12906.2022.018.22309>
- Sunda Makuba T, Musele Kalulu N, Mbala Mola P. (2017).** Contribution à la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec des extraits de plantes. *International Journal of Biological and Chimical Sciences* 11(1): 305-312
- Sunda Makuba T.(2012).** Contribution à la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec des extraits de plantes. Thèse pour l'obtention du grade de docteur en sciences, Université de Liège. 156 p.
- Tamil SA., Dinesh MG., Satyan RS., Chandrasekaran B., et Rose C. (2011).** Les extraits de feuilles et de graines de Bixa orellana L. exercent une activité antimicrobienne contre les pathogènes bactériens. *Journal of Applied Pharmaceutical.Sciences*, 1:116–120
- Tamsa A., Noah Ewoti O.V., Onana F.M., Lontsi Djimeli C., Tchakonté S and Djafsia B. (2020).** The combined effect of *Eucalyptus microcorys* plant extract and light on enteropathogenic *Escherichia coli* survival in aquatic microcosm. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 9(5):1003-1008,
- Tamsa A.A. (2017).** Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Eucalyptus microcorys* Müller, 1860 sur la cultivabilité de quelques bactéries d'importance sanitaire. Thèse de Doctorat PhD, Université de Yaoundé 1 (Cameroun), Faculté des Sciences, Département de

Biologie et Physiologie Animales, Laboratoire d'Hydrobiologie et Environnement, 237p.

- Tassou C.C., Koutsoumanis K., Nychas, G.J.E. (2000).** Inhibition of Salmonella enteritidis and staphylococcus aureus in Nutrient Broth by Mint Essential Oil. Food Research International,33, 273-280.
- Tawfeek N., Mahmoud F., Hamdan I., Sobeh M., Farrag N., Wink M et El-Shazly M. (2021).** Phytochemistry, Pharmacology and Medicinal Uses of Plants of the Genus Salix: An Updated Review. Frontiers in Pharmacology, 12 : 1-30p.
- Toure D. (2015).** Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de Côte d'Ivoire, Chimie organique. Thèse Université Felix Houphouët Boigny, Côte d'Ivoire. Français. NNT : 29/2015. Tel-01222964
- Vezzulli L., Pruzzo C., Huq A., Colwell R. R. (2010).** Environmental reservoirs of Vibrio cholerae and their role in cholera. *Environmental Microbiology Reports*, 2(1), 27–33.
- Win M., Abdul-Hamid A., Baharin B., Anwar F., Sabu M.C and Mohd S. 2011.** Phenolic compounds and antioxidant activity of peanut's skin, hull, raw kernel and roasted kernel flour. *Pakistan Journal of Botanic*, 43(3): 1635-1642.
- Xin Y. J., Choi, S., Roh K. B., Cho E., Ji, H., Weon J. B., Park D., Whang W. K., Jung, E. (2021).** Anti-inflammatory activity and mechanism of isookanin, isolated by bioassay-guided fractionation from *Bidens pilosa* L. *Molecules*, 26(2), 255.
- Young H., Hsu J., Yang W. (2010).** *Bidens pilosa* L. and its medicinal use. Recent Progress in Medicinal Plants Drug Plant II.
- Zaman B., Hussain A., Nye R., Mehta V., Mamun T et Hossain N. (2017).** A Review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus*, 9(6): 12-22p.
- Zhang B., Zou T., Lu YH., Wen Wang J., (2010).** Stimulation of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* hairy roots by oligogalacturonides. *African Journal of Biotechnology*, 9(23), 3437-3442.