



**HAL**  
open science

**EFFICACITE ET SPECTRE D'ACTIVITE DES  
EXTRAITS DE MITRACARPUS SCABER Zucc. ex  
Schult + Scult.f. (Rubiaceae) ET DE L'ACIDE  
FUSIDIQUE SUR LES BACTERIES COCCI GRAM  
POSITIF**

Constantin Obou Okou

► **To cite this version:**

Constantin Obou Okou. EFFICACITE ET SPECTRE D'ACTIVITE DES EXTRAITS DE MITRACARPUS SCABER Zucc. ex Schult + Scult.f. (Rubiaceae) ET DE L'ACIDE FUSIDIQUE SUR LES BACTERIES COCCI GRAM POSITIF. Pharmacologie. Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire); N°ORDRE 741/2012, 2012. Français. NNT: . tel-02417073

**HAL Id: tel-02417073**

**<https://theses.hal.science/tel-02417073>**

Submitted on 18 Dec 2019

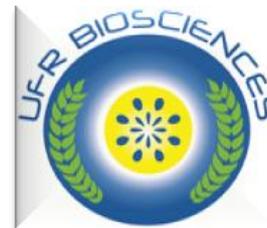
**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE  
*Union-Discipline-Travail*

Ministère de l'Enseignement supérieur  
et de la Recherche Scientifique



Laboratoire de Pharmacodynamie  
Biochimique

Année Universitaire  
2012 - 2013

# THESE

Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de  
l'Université Félix HOUPHOUËT- BOIGNY

**SPECIALITE : PHARMACOLOGIE DES SUBSTANCES NATURELLES**

**Option : BIOCHIMIE - PHARMACOLOGIE**

Numéro d'ordre  
741/2012

**OKOU OBOU CONSTANTIN**

## THEME

EFFICACITE ET SPECTRE D'ACTIVITE DES  
EXTRAITS DE *Mitracarpus scaber* Zucc. ex Schult  
+ Scult.f. (Rubiaceae) et de l'acide fusidique SUR  
LES BACTERIES COCCI GRAM POSITIF

### Commission du jury

M. TOURE Seikou Amadou	Professeur Titulaire UFHB	Président
M. DJAMAN Allico Joseph	Professeur Titulaire UFHB	Directeur
M. KOUAME Patrice	Professeur Titulaire UNA	Rapporteur
Mme KACOU N'Douba Adèle	Professeur Titulaire UFHB	Examinatrice
M. OTOKORE Dama Albert	Maître de conférences UFHB	Examineur
M. ZIRIHI Guédé Noël	Maître de Conférences UFHB	Rapporteur

Soutenue publiquement  
Le Mercredi 12 Décembre  
2012

# TABLE DES MATIERES

	Page
<b>Introduction</b>	1
<b>Revue bibliographique</b>	6
<b>1- Généralités sur les cocci Gram positif</b>	7
<b>1-1 Staphylocoques</b>	
<b>1-1.1. Historique</b>	
<b>1-1.2 Taxonomie</b>	
<b>1-1.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i></b>	9
<b>1-1.2.1.1 Caractères bactériologiques</b>	
<b>1-1.2.1.1.1 Morphologie</b>	
<b>1-1.2.1.1.2 Caractères cultureux</b>	
<b>1-1.2.1.1.3 Equipement enzymatique</b>	10
<b>1-1.2.1.1.4 Autres substances élaborées</b>	
<b>1-1.2.1.2 Antigènes</b>	12
<b>1-1.2.1.3 Pouvoir pathogène chez l'homme</b>	
<b>1-1.2.1.4 Epidémiologie</b>	14
<b>1-1.2.1.5 Immunité</b>	
<b>1-1.2.1.6 Diagnostic biologique</b>	15
<b>1-1.2.1.7 Résistances aux antibiotiques</b>	16
<b>1-1.2.2 Staphylocoques coagulase négatifs (SCN)</b>	20
<b>1-1.2.2.1 Classification et habitat</b>	
<b>1-1.2.2.2 Caractères bactériologiques</b>	

<b>1-1.2.2.3 Pouvoir pathogène</b>	21
<b>1-1.2.2.4 Sensibilité des SCN aux antibiotiques</b>	
<b>1-2 Streptocoques</b>	23
<b>1-2.1 Historique</b>	24
<b>1-2.2 Classification</b>	
<b>1-2.2.1 Streptocoques du groupe A</b>	27
<b>1-2.2.1.1 Caractères bactériologiques</b>	
<b>1-2.2.1.1.1 Morphologie</b>	
<b>1-2.2.1.1.2 Caractères cultureux</b>	28
<b>1-2.2.1.1.3 Paroi</b>	
<b>1-2.2.1.1.4 Antigènes diffusibles</b>	29
<b>1-2.2.1.2 Habitat-pouvoir pathogène chez l'homme</b>	30
<b>1-2.2.1.3 Epidémiologie</b>	32
<b>1-2.2.1.4 Diagnostic des infections à streptocoques A</b>	33
<b>1-2.2.1.5 Sensibilité aux antibiotiques</b>	34
<b>1-2.2.2 Streptocoques bêta-hémolytiques C, G ou L</b>	35
<b>1-2.2.3 Streptocoques du groupe B</b>	
<b>1-2.2.3.1 Caractères bactériologiques et antigéniques</b>	36
<b>1-2.2.3.2 Habitat et pouvoir pathogène humaine</b>	
<b>1-2.2.3.3 Diagnostic bactériologique</b>	37
<b>1-2.2.3.4 Sensibilité aux antibiotiques</b>	
<b>1-2.2.3.5 Prophylaxie</b>	38
<b>1-2.2.4 Streptocoques du groupe D</b>	
<b>1-2.2.4.1 Caractères cultureux</b>	39
<b>1-2.2.4.2 Caractères biochimiques</b>	

1-2.2.4.3 Caractères antigéniques	
1-2.2.4.4 Sensibilité aux antibiotiques	40
1-2.2.5 Entérocoques	
1-2.2.5.1 Caractères bactériologiques	
1-2.2.5.2 Habitat-pouvoir pathogène chez l'homme	41
1-2.2.5.3 Diagnostic bactériologique	42
1-2.2.5.4 Sensibilité aux antibiotiques	
1-2.2.6 Streptocoques oraux	44
2- Généralités sur quelques pathologies dues aux cocci Gram Positif	45
2-1 Flore cutanée normale	
2-2 Quelques infections cutané-muqueuses	46
2-2.1 Impétigo	
2-2.2 Furoncle	49
2-2.3 Erysipèle	52
3- Evaluations thérapeutiques	57
4- Quelques molécules déterminées dans le tri phytochimique	64
4-1 Alcaloïdes	
4-2 Tanins	65
4-3 Polyphénols	66
4-4 Flavonoïdes	
4-5 Quinones	67
4-6 Saponosides	68
4-7 Substances polyterméniques et stéroliques	
5- Généralités sur l'acide fusidique	71
Matériel & Méthodes	72

<b>1- Matériel</b>	73
<b>1-1 Matériel biologique</b>	
<b>1-1.1 Matériel végétal</b>	
<b>1-1.2 Bactéries testées</b>	76
<b>2- Méthodes</b>	77
<b>2-1 Isolement et identification des souches bactériennes</b>	
<b>2-1.1 Souches de staphylocoques</b>	
<b>2-1.2 Souches de streptocoques <math>\beta</math>-hémolytiques</b>	
<b>2-1.3 Souches d'entérocoques</b>	78
<b>2-2 Préparation des différents extraits végétaux</b>	
<b>2-2.1 Préparation de l'extrait total aqueux</b>	79
<b>2-2.2 Préparation de l'extrait éthanolique 70% et de l'extrait résiduel 70%</b>	81
<b>2-2.3 Préparation de l'extrait éthanolique 100%</b>	83
<b>2-2.4 Préparation de l'extrait butanolique</b>	85
<b>2-3 Evaluation de l'activité anti-bactérienne des         différents extraits de MISCA <i>in vitro</i></b>	87
<b>2-3.1 Technique de diffusion en milieu gélosé: Méthodes des disques</b>	
<b>2-3.1.1 Méthode standard International Collaborative Study</b>	88
<b>2-3.1.1.1 Milieu de culture</b>	
<b>2-3.1.1.2 Réalisation de l'inoculum</b>	89
<b>2-3.1.1.3 Ensemencement par inondation</b>	
<b>2-3.1.1.4 Application des disques</b>	90
<b>2-3.1.1.5 Pré-diffusion et incubation</b>	
<b>2-3.2 Méthodes par dilution (Diffusion en bouillon)</b>	92
<b>2-3.2.1 Test de survivance des souches de staphylocoques                 mécicillino-résistantes en présence de MISCA</b>	105

2-3.2.2 Test de survivance des souches de streptocoques $\beta$ hémolytiques en présence de MISCA	
2-3.2.3 Test de survivance des souches d'entérocoques en présence de MISCA	106
2-4 Dénombrement des germes	109
2-5 Tri phytochimique des différents extraits de MISCA testés	110
2-5.1 Mise en évidence des alcaloïdes	
2-5.2 Mise en évidence des tanins	111
2-5.3 Mise en évidence des polyphénols	112
2-5.4 Mise en évidence des flavonoïdes	
2-5.5 Mise en évidence des quinones	113
2-5.6 Mise en évidence des saponosides	
2-5.7 Mise en évidence des terpènes et des stérols	114
Résultats	115
1- Sensibilité des souches de staphylocoques méticillino-sensibles ou méticillino-résistantes aux différents extraits de MISCA et à l'acide fusidique	116
1-1 Action de l'extrait total aqueux (MISCA-Aq) sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de staphylocoques méticillino-sensibles ou méticillino-résistantes par la méthode des disques	117
1-2 Action des différents extraits de MISCA sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de staphylocoques méticillino-résistantes par les méthodes par dilution	121
1-2.1 Détermination de la charge bactérienne de l'inoculum réparti dans les tubes expérimentaux	
1-2.2 Aspect des cultures bactériennes après incubation en milieu liquide et repiquage sur milieu solide	122
1-2.2.1 Aspect des cultures bactériennes en milieu liquide	
1-2.2.2 Aspect des cultures bactériennes après repiquage sur milieu solide	123
1-3 Action de l'acide fusidique sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de staphylocoques méticillino-résistantes par les méthodes par dilution	145

1-3.1 Aspect des cultures bactériennes après incubation en milieu liquide et repiquage sur milieu solide	
1-4 Action comparée de l'extrait butanolique de MISCA et de l'acide fusidique sur la croissance <i>in vitro</i> des souches	147
2- Sensibilité des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques aux différents extraits de MISCA et à l'acide fusidique	148
2-1 Action des différents extraits de MISCA sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques par les méthodes par dilution	149
2-1.1 Détermination de la charge bactérienne de l'inoculum réparti dans les tubes expérimentaux	
2-1.2 Aspect des cultures bactériennes après incubation en milieu liquide et repiquage sur milieu solide	150
2-1.2.1 Aspect des cultures bactériennes en milieu liquide	
2-1.2.2 Aspect des cultures bactériennes après repiquage sur le milieu solide	151
2-2 Action de l'acide fusidique sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques par les méthodes par dilution	175
2-2.1 Aspect des cultures bactériennes après incubation en milieu liquide et repiquage sur milieu solide	
2-3 Action comparée de l'extrait butanolique de MISCA et de l'acide fusidique sur la croissance <i>in vitro</i> des souches	177
3- Sensibilité des souches d'entérocoques aux différents extraits de MISCA et à l'acide fusidique	178
3-1 Action des différents extraits de MISCA sur la croissance <i>in vitro</i> des souches d' <i>Enterococcus faecalis</i> par les méthodes par dilution	179
3-1.1 Détermination de la charge bactérienne de l'inoculum réparti dans les tubes expérimentaux	
3-1.2 Aspect des cultures bactériennes après incubation en milieu liquide et repiquage sur milieu solide	180
3-1.2.1 Aspect des cultures bactériennes en milieu liquide	
3-1.2.2 Aspect des cultures bactériennes après repiquage sur milieu solide	181
3-2 Action de l'acide fusidique sur la croissance <i>in vitro</i> des souches d' <i>Enterococcus faecalis</i> par les méthodes par dilution	205

<b>3-2.1 Aspect des cultures bactériennes après incubation en milieu liquide et repiquage sur milieu solide</b>	
<b>3-3 Action comparée de l'extrait butanolique de MISCA et de l'acide fusidique sur la croissance <i>in vitro</i> des souches</b>	207
<b>3-4 Tri phytochimique des différents extraits de MISCA testés</b>	208
<b>Discussion</b>	211
<b>1- Action des différents extraits de MISCA et de l'acide fusidique sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de staphylocoques</b>	212
<b>1-1 Action des différents extraits de MISCA</b>	
<b>1-2 Action de l'acide fusidique</b>	220
<b>1-3 Action comparée de l'extrait butanolique de MISCA et de l'acide fusidique</b>	221
<b>2- Action des différents extraits de MISCA sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de streptocoques <math>\beta</math> hémolytiques</b>	222
<b>2-1 Action des différents extraits de MISCA</b>	
<b>2-2 Action de l'acide fusidique</b>	228
<b>2-3 Action comparée de l'extrait butanolique de MISCA et de l'acide fusidique</b>	229
<b>3- Action des différents extraits de MISCA et de l'acide fusidique sur la croissance <i>in vitro</i> des souches d'entérocoques</b>	230
<b>3-1 Action des différents extraits de MISCA</b>	
<b>3-2 Action de l'acide fusidique</b>	235
<b>3-3 Action comparée de l'extrait butanolique de MISCA et de l'acide fusidique</b>	236
<b>Conclusion et perspectives</b>	238
<b>1- Conclusion</b>	239
<b>2- Perspectives</b>	244
<b>Références bibliographiques</b>	245
<b>Annexes</b>	

## DEDICACE

Nous dédions ce travail au Saint-Esprit car c'est sous son onction qu'il a pu être réalisé. Cette inspiration divine, nous a permis d'entreprendre et d'achever ce travail. Le Seigneur a été d'une assistance sans faille pour nous. Sa protection non plus ne nous a jamais fait défaut. C'est la raison pour laquelle nous pouvons lui dire: «Tu es la forteresse où je trouve refuge, Tu es mon Dieu, j'ai confiance en Toi.» Psaume 91.

## **HOMMAGE A**

Feu le Professeur GUEDE-GUINA Frédéric qui a permis de réaliser ce travail de thèse dans son Laboratoire, le Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique. Le Professeur a été pendant longtemps, Directeur et ensuite Directeur honoraire de ce Laboratoire. Il a été plus qu'un encadreur, c'était un père pour nous. Il avait su guider nos pas, pendant toute la période de notre formation. L'une de ses caractéristiques a toujours été de trouver les mots justes, avec un certain brin d'humour, pour nous remettre sur les rails du travail et cela chaque fois qu'il avait senti que nous commencions à nous décourager. Mais surtout, il avait su ne pas mettre de différences entre les étudiants. La considération, la confiance, la patience et le temps d'écoute qu'il avait toujours eu pour nous ont été des éléments catalyseurs pour nous pousser à l'effort, pour nous doper en quelque sorte. Reconnaissance éternelle à cet illustre Professeur disparu, qu'il en soit remercié et que son âme repose en paix.

# AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué conjointement au Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique et au Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Il s'inscrit dans le vaste programme de valorisation scientifique de la pharmacopée traditionnelle africaine. Il vise à mettre au point des médicaments à base de plantes médicinales efficaces, à prix certainement abordables et pouvant aider dans le traitement des maladies infectieuses. Une telle recherche scientifique a l'avantage de permettre de connaître les propriétés biochimiques, pharmacologiques et toxicologiques des médicaments issus des plantes médicinales. Mais, elle peut permettre également de trouver sûrement d'autres nouvelles séries de médicaments.

# REMERCIEMENTS

Nous remercions, Monsieur le Professeur TOURE Seikou Amadou, Professeur Titulaire de Chimie Organique à l'UFR Sciences des Structures, des Matières et des Technologies, Membre du Conseil Pédagogique et du Conseil Scientifique de l'UFR Sciences des Structures, des Matières et des Technologies, et Chef de Groupe de la Chimie Fine et Synthèse Organique pour avoir accepté de présider cette thèse. Monsieur le Professeur, la spontanéité avec laquelle vous avez accepté d'être Président de jury de cette thèse, nous a sincèrement épatés. Votre simplicité et votre courtoisie ne nous laissent pas indifférents. Vous avez été tellement simple avec nous que l'on pourrait penser que vous nous connaissiez depuis longtemps. Vos encouragements ne nous ont pas aussi faits défauts. Toutes ces valeurs et bien d'autres que nous n'avons pas pu énumérer ici, nous prions le bon Dieu de nous les inculquer afin de pouvoir vous ressembler. Toute notre reconnaissance et que Dieu vous accorde longue vie afin que d'autres jeunes chercheurs puissent apprendre auprès de vous.

Nous remercions, Madame le Professeur DOSSO Mireille, Professeur Titulaire de Bactériologie-Virologie l'UFR Sciences Médicales, Directrice de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et Responsable du Laboratoire de Bactériologie-Virologie. Sachez, Madame le Professeur que nous vous admirons beaucoup. Car vous êtes très dynamique et ce dynamisme a été contagieux. En effet, derrière votre apparence de femme sévère, se cache une mère attentive, douce, ouverte et déterminée. Toutes ces vertus sans que vous ne le sachiez, nous ont été inculquées et ont fait de nous ce que nous sommes aujourd'hui et nous serons certainement dans le futur.

Nous vous remercions aussi parce que vous nous avez acceptés dans votre Laboratoire et mis à notre disposition, votre personnel et vos matériels de laboratoire, afin de nous permettre de réaliser notre travail. Que le Tout-Puissant vous accorde longue vie, afin que, d'autres étudiants puissent profiter de votre savoir.

Nous remercions également, Monsieur le Professeur DJAMAN Allico Joseph, Professeur Titulaire de Biochimie-Parasitologie à l'UFR Biosciences, Chef de service du Département de Biochimie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, actuel Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique et notre Directeur de thèse, pour ses conseils avisés, ses encouragements, son aide et son attention à notre égard. Monsieur le Professeur, vous avez été pour nous une source de motivation et d'inspiration pour la confection de ce travail. Merci Monsieur le Professeur pour votre attention particulière, que le bon Dieu vous bénisse et vous le rende au centuple.

Nous formulons des remerciements à l'endroit Madame le Professeur KACOU N'Douba Adèle, Professeur Titulaire de Microbiologie-Virologie à l'UFR Sciences Médicales, Responsable de l'Unité de Bactériologie Clinique et de la Formation à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire pour avoir accepté de faire partie des membres de jury de cette thèse. Nous sommes sûrs que vos critiques scientifiques permettront de parfaire ce travail. Nous vous remercions pour votre esprit d'ouverture et votre attention maternelle qui nous ont beaucoup marqués pendant le peu de temps que nous vous avons côtoyée. Ces particularités, nous ont façonnés sans que vous ne le sachiez. Soyez en remerciée et que Dieu vous bénisse abondamment vous et votre famille.

Merci au Professeur KOUAME Patrice, Professeur Titulaire de Biochimie-Enzymologie, Doyen de l'UFR Sciences et Technologies Alimentaires et Directeur du Laboratoire de Biocatalyse pour ses critiques scientifiques et ses suggestions constructives qui ont permis de bonifier ce travail. Monsieur le Professeur, en plus d'avoir été un rapporteur de la thèse, vous nous avez faits aussi l'honneur d'être parmi les membres de jury de cette thèse. Nous pensons également que ce travail est le vôtre tellement vous devez le connaître par cœur. Que Dieu vous bénisse pour vos apports inestimables.

Nos remerciements sont aussi formulés pour Monsieur le Professeur OTOKORE Dama Albert, Maître de Conférences à l'UFR Biosciences pour sa particulière attention à notre égard. Nous avons pu profiter pendant notre cursus universitaire de ses enseignements et du temps d'écoute qu'il nous a toujours accordé. Monsieur le Professeur, vous ressentirez certainement, le fruit de votre rigueur et de votre application au travail car ce sont des caractères que nous avons toujours admirés en vous. Que Dieu vous accorde beaucoup de grâces.

Merci à Monsieur le Professeur ZIRIHI Guédé Noël, Maître de Conférences au Laboratoire de Botanique à l'UFR Biosciences, Maître de Conférences associé au Museum National d'Histoire Naturelle de Paris (France) et chercheur associé au Laboratoire Pharmaceutique Schaper et Brümer en Allemagne, pour nous avoir guidés dans les méthodes d'extraction. En effet, Monsieur le Professeur, votre disponibilité à l'égard de tous les chercheurs du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique est un fait qui nous impressionne beaucoup. Nous pensons de tout cœur, que vous jetez là les bases d'une future et sincère collaboration. Cela a également été un honneur pour nous de vous avoir eu comme rapporteur et comme membre de jury pour évaluer ce travail. Que Dieu vous bénisse et vous accorde longue vie pour que cette collaboration soit profitable à tous.

Merci à Monsieur le Professeur N'GUESSAN Jean David, Maître de Conférences de Biochimie-Pharmacologie à l'UFR Biosciences, Président de la Commission Pédagogique de l'UFR Biosciences et Directeur-Adjoint du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique pour ses encouragements et ses conseils avisés. Monsieur le Professeur, trouvez ici l'expression de toutes nos reconnaissances et que Dieu vous bénisse abondamment ainsi que votre famille.

Merci à nos aînés, les Docteurs BAHI Calixte, KRA Adou Koffi Mathieu, TREBISSOU Johnson Noël David, Adou YAPO, DJYH Bernard Nazaire, BIDIE Alain Philippe, YEO Dodéhé et COULIBALY Founzégué Amadou du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique et GUESSENND Nathalie du Laboratoire de Bactériologie-Virologie, pour leurs conseils et leur attention à notre égard. Vous avez tous été des sources de motivation et d'inspiration pour nous.

Merci particulier au Docteur KRA, pour sa disponibilité, son esprit d'ouverture et les encouragements qu'il a toujours su manifester à nous et aux autres étudiants. Docteur KRA, nous souhaitons que ces valeurs ne vous quittent jamais car, nous pensons que ce sont des vertus que Dieu a mises dans le fond de votre cœur. En réalité, ce sont des signes révélateurs d'un futur grand Enseignant-chercheur. Nous prions Dieu, pour qu'il vous comble encore d'autres vertus et qu'il vous accorde longue vie pour que d'autres étudiants puissent en profiter aussi.

Merci au Docteur GUESSENND, responsable de l'unité des Antibiotiques, des Substances naturelles et de la Surveillance des Micro-organismes aux antibiotiques (Unité ASSURMI) du Laboratoire de Bactériologie-Virologie pour nous avoir stimulés pendant le temps des tests à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Votre présence à notre côté a été une source de motivation supplémentaire pour la réalisation de ce travail. Ce travail est aussi le fruit de votre réflexion, de vos suggestions et conseils. Que Dieu vous bénisse.

Merci aussi au Docteur OUASSA du Centre de Diagnostic et de Recherche sur le SIDA (CeDReS) du CHU de Treichville pour nous avoir fourni les souches de streptocoques.

Merci à notre père TEA Okou Yves pour l'éducation qu'il nous a donnée. Cher père, ce travail est le couronnement de tous les sacrifices que tu as consentis pour notre instruction. Tes prières et tes encouragements nous ont toujours accompagnés tout le long de notre cursus de formation. Tu n'as jamais non plus lésiné sur les moyens pour l'éducation de tes enfants. Que le bon Dieu t'accorde une longue vie afin que tu puisses profiter de tous tes efforts.

A notre mère ADJALOU Yah, nous disons merci car l'enfant que tu as mis au monde est devenu un homme avec les différentes vertus que les autres ont bien voulu forger en lui; trouve ici toute notre reconnaissance. Il est vrai que nous étions loin l'un de l'autre mais comme dit l'adage: «loin des yeux, mais près du cœur». Nous sommes persuadés que vos prières ont été pour nous de fidèles compagnes pendant tout notre cursus scolaire et universitaire. Que le bon Dieu te bénisse et t'accorde longue vie pour que tu puisses également profiter des fruits de ce travail.

A notre éducatrice TEA Claire, comment exprimer à ton égard notre reconnaissance? En vérité, c'est Dieu seul qui pourra te récompenser pour tous tes bienfaits envers nous. Ce travail est avant tout le fruit de tes sacrifices et prières, de ta patience et de ton amour. Quoiqu'il en soit, tu as été d'un soutien sans faille pour nous. Tu as toujours été à nos côtés dans les moments d'espoirs et de doutes, nous pensons sincèrement que cela a milité beaucoup dans la conception et la finition de ce travail.

Tu as su nous apprendre à aimer et tu as toujours été la personne vers qui nous nous sommes tournés lorsque tout semblait nous abandonner. Ton influence sur notre personne est indéniable et tu as marqué notre vie d'une empreinte indélébile. Tu le sais bien, nos simples écrits ne suffiront pas pour te magnifier et de remercier. Par conséquent que Dieu seul te bénisse, t'accorde beaucoup de grâces et longue vie, afin que, tu puisses profiter des retombées de ce travail.

Merci à OKOU Aloys et famille car c'est en partie grâce à vous, à votre soutien financier et logistique que nous avons été initiés à la recherche. C'est aussi grâce à vos conseils, encouragements et prières que cette thèse a été menée à terme. Cher grand frère, par ton arrivée à l'université, tu as ouvert une voie que nous approfondissons en ce moment. Par conséquent, le mérite de ce travail te revient de plein droit. Que tous les efforts consentis à notre égard soient profitables à toi et à ta famille. Que Dieu vous bénisse dans toutes vos activités.

Merci à Madame ABIYOU Cunégonde et famille pour vos prières, votre affection, votre attention et vos conseils qui ont été d'un secours appréciable pour notre accomplissement. Vos aides financières, nous ont également permis de tenir le coup tout le long de notre cursus scolaire et universitaire. Chère grande sœur, nous te mettons au rang de notre mère tellement, tu as toujours mis l'intérêt de tes frères avant le tien. Le couronnement de tous tes sacrifices est enfin prêt. Savourons chère grande sœur ensemble, ce fruit de dure labeur. Que les fruits de ce travail te soient profitables, ainsi qu'à ta famille. Que le Tout-Puissant vous accorde d'abondantes grâces.

Au Docteur OKOU Téma David et famille, toutes nos estimations,  
Cher aîné, tu es un modèle pour nous. Ton cursus scolaire et universitaire a certainement fait éclore les talents qui somnolaient en nous. Tes sages conseils et tes encouragements depuis les Etats-Unis d'Amérique, ne nous ont jamais fait défaut. Ton soutien logistique, financier et tes cadeaux ne nous ont non plus jamais manqué. Tu partageais aussi, nos doutes et nos espoirs. Par ce travail, cher grand frère, ton petit frère est devenu pour toi, un collègue biochimiste et nous pensons que c'est tout à ton honneur. Honneur et gloire à toi dont le souci premier a toujours été de nous voir nous épanouir. Nous pensons que ce sont là les caractéristiques d'un grand enseignant-chercheur et que Dieu t'aide à le devenir. Ce travail est par conséquent, le fruit de tous les efforts consentis envers nous. Qu'il soit profitable autant à toi, qu'à ta famille et que le Tout-Puissant vous bénisse davantage.

A Madame MAUX Annette,

Chère sœur ça a été un plaisir pour toi, de savoir que, nous étions devenus étudiants et tu nous l'as toujours fait savoir. Il est vrai qu'étant loin de nous, tu n'as pas pu suivre notre évolution universitaire. Cependant, ton affection, ton encouragement et ton soutien, nous ont toujours accompagnés au cours de notre cursus universitaire et nous pensons que c'est le plus important. Que le bon Dieu vous comble, toi et ta famille au delà de toutes vos espérances. Que ce travail vous soit profitable.

A TEA Jean Ponce et famille,

Cher frère merci pour ton attention et ta confiance totale en nous, ce sont des éléments qui ont toujours été des sources de motivations spéciales pour notre évolution. En effet, tu n'as jamais cessé de nous combler de présents, chaque fois que, tu venais au pays.

Tes appels incessants pour t'enquérir de notre état de santé et de l'état d'avancement de nos travaux, ont été pour nous, un moyen de savoir que, nous comptons beaucoup pour toi. Et ces inquiétudes permanentes, nous ont quelquefois galvanisés. Cela a été une fierté pour toi de nous savoir étudiant. Que le bon Dieu te bénisse avec ta famille et que vous profitez aussi de ce travail.

A N'GORAN Jhonson et famille pour leur soutien constant,

Cher aîné bien que n'ayant pas grandi ensemble, tu n'as jamais manqué de nous exprimer ta fierté de nous avoirs comme frère. Toutes les occasions ont été bonnes pour toi de nous le faire savoir. Ton soutien financier, logistique et tes conseils ont été primordiaux pour la réalisation et la finalisation de ce travail. Cela a toujours été un honneur pour toi de nous présenter à tous tes amis, comme étant, un de tes petits frères faisant de longue étude. Tu as toujours cherché à avoir de nos nouvelles, chaque fois que tu n'en avais pas. Tu n'as jamais cessé de nous faire connaître, tes projets et d'en discuter avec nous. Merci pour cette marque de confiance et cette attention particulière à notre égard. Nous t'assurons que, tu ne seras jamais déçu de cette marque de confiance placée en nous. Que ce travail te soit profitable au même titre que les autres. Que le Tout-Puissant te bénisse et t'accorde beaucoup de grâces ainsi qu'à ta famille.

Au Docteur TEA Basilide et famille, trouvez ici l'expression de toute notre reconnaissance et de notre amour. Cher frère, tu as toujours été le plus proche de nous car il se trouve que nous avons fait une bonne partie de notre enfance ensemble. Certainement que, cet effet de proximité est pour beaucoup dans notre ressemblance, tant dans les traits physiologiques que dans le caractère. Cher frère, c'est en partie grâce à ton attention à notre égard que nous avons pu faire et achever le 3<sup>e</sup> cycle.

Ton aide financière, ton assistance médicale mais surtout ta présence à nos côtés ont été des éléments qui ont pesés pour beaucoup dans la finition de cette thèse. Tes conseils et tes prières nous ont toujours soutenus. Ton souci de savoir l'état d'avancement des travaux a été important pour nous. En somme, tu as été d'un apport appréciable dans notre accomplissement. Ton œuvre est enfin prête parce que ce travail est le tien. Pour tous ces faits, que le bon Dieu te bénisse et te comble de beaucoup de grâces. Que ce travail profite également à ta famille.

A Madame BARDOU Lydie,

Nous ne savons pas petite sœur, comment te remercier pour tous tes bienfaits tellement ils sont innombrables. En effet, tu as toujours été d'un soutien indéniable dans la réalisation de ce travail. Cet appui, petite sœur a été important dans diverses domaines: sur le plan financier, spirituel et logistique. Nous pensons sincèrement chère petite sœur que seul Dieu saura te remercier à notre place car nos balbutiements seuls ne suffiront pas à le faire. Que le bon Dieu te comble une fois encore de multitudes de bénédictions, de grâces et satisfasse aux désirs profonds de ton cœur.

A nos autres petits frères et sœurs, tous nos remerciements et notre reconnaissance pour vos faits individuels et collectifs. Sachez, chers frères et sœurs que c'est une véritable joie pour nous de vous avoir comme parents. Chacun a été important dans la réalisation de ce travail de thèse. Vos prières et votre attention à notre égard ont été des facteurs stimulants pour la finition de ce travail. Soyez-en remercié et que Dieu dans sa grande miséricorde vous bénisse tous et vous permette de profiter du fruit de ce travail parce que vous êtes méritants autant que nous.

A notre oncle, Monsieur le Professeur TEA Gokou Célestin, ancien président de l'Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody, pour son attention à notre égard. De tous nos oncles, tu as été le plus proche de nous. En fait, tes constantes interrogations sur l'évolution de notre travail de thèse nous ont été d'un apport appréciable. Ta simplicité, ton esprit d'ouverture et ton sens de l'humour ne sont pas à négliger dans notre accomplissement. Que l'Eternel Dieu te bénisse pour tous tes bienfaits et te comble de beaucoup de grâces. Que ce travail soit profitable à toi autant qu'à ta famille.

A notre cousin, Monsieur le Professeur OURAGA Obou Boniface, pour ses encouragements, ses conseils et sa disponibilité à notre égard. Ces qualités, cher Professeur ont été des éléments importants dans notre façonnement. Que l'Eternel te bénisse également ainsi que ta famille. Que ce travail vous soit aussi profitable.

A tous nos camarades et connaissances du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique et à Docteur KOUAKOU Léandre du Laboratoire de Physiologie Animale de l'Université d'Abobo-Adjamé qui ont suivis de près ou de loin toutes les péripéties de ce travail, trouvez ici l'expression de notre reconnaissance envers vous, car, vos soutiens, conseils et prières nous ont été profitables pour la réalisation de ce travail. Vous avez su faire entretenir entre nous, une saine ambiance emprunt de fraternité et de convivialité. Lesquelles ont été primordiales pour nous remettre d'aplomb afin de finir ce travail. Par conséquent, vous êtes aussi méritants que nous. Par ce fait, vous venez d'agrandir votre cercle d'amitié. Que Dieu vous bénisse tous et accorde aux uns, la grâce de finir aussi leurs travaux de thèse et aux autres, une bonne carrière universitaire.

A nos amis, connaissances et aînés du Laboratoire des Sciences des Aliments que sont: Docteur EZOUA, Docteur BIEGO, NIAMKE Arthur, YAO Agbo Théodore, ASSOI Sylvie, DIBY Sylvie, YAO Valentin, AMARIN Olivier, N'CHO Léopold pour leur amitié exprimée à notre égard et leur aide pour la réalisation de ce travail. Vous venez chers amis et aînés de jeter par vos actes, les bases d'une future collaboration sincère. Que le bon Dieu vous bénisse pour votre assistance.

A nos camarades et connaissances du Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, nous vous disons merci. Merci, pour les uns pour votre assistance, vos aides, encouragements, prières et inquiétudes à notre égard et pour les autres pour la bonne ambiance qu'ils ont su entretenir au laboratoire. Sachez-le, par votre attitude, vous venez d'agrandir votre cercle de camarade et ma disponibilité en retour envers vous sera constante soyez en sûr. Que ce travail vous soit profitable également et que le Tout-Puissant vous bénisse tous autant que vous êtes dans vos entreprises respectives.

Aux membres de la Communauté Mère du Divin Amour de Yopougon merci. Merci pour vos prières incessantes qui nous ont permis d'achever ce travail. Merci d'avoir donné un coup de fouet à notre foi. Merci singulièrement au Frère ASSANDE Honoré pour son attention et l'amitié qu'il a su manifester à notre égard. Que le bon Dieu vous comble de beaucoup plus de grâces afin que d'autres croyants puissent en profiter.

Merci aux frères de la fraternité Patience, pour vos prières et votre présence constante auprès de nous. La solidarité dont nous avons fait preuve dans cette fraternité a été pour beaucoup dans la finition de ce travail. Notre disponibilité à votre égard sera toujours sans faille. Que Dieu vous bénisse.

Merci à GOUDALE Christian et les amis de Globaltech, pour votre assistance technique et sympathie à notre égard. Que cette relation établie soit durable et que Dieu vous comble de beaucoup de grâces.

Merci à ASSI Jean du Centre National de Floristique de l'Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody, pour nous avoir fournir des informations sur la position systématique de la plante. Que Dieu te bénisse.

# LISTE DES ABREVIATIONS

BEA: bile esculine azide

BCC: bouillon cœur-cervelle

MISCA: *Mitracarpus scaber*

MISCA-Aq: extrait total aqueux de MISCA

MISCA-70Et: extrait éthanolique 70% de MISCA

MISCA-70R: extrait résiduel 70% de MISCA

MISCA-100Et: extrait éthanolique 100% de MISCA

MISCA-100R: extrait résiduel 100% de MISCA

MISCA-Ac<sup>+</sup>: surnageant de l'acétate d'éthyle 50%

MISCA-Ac<sup>-</sup>: dépôt de l'acétate d'éthyle 50%

MISCA-But<sup>+</sup>: surnageant du butanol 50%

MISCA-But<sup>-</sup>: dépôt du butanol 50%

CMI: concentration minimale inhibitrice

CMB: concentration minimale bactéricide

CI<sub>50</sub>: concentration inhibant 50% de la population bactérienne étudiée

SCN: staphylocoques coagulase négatifs

Nb.: nombre

Moy.: moyenne

Bact.: bactéries

# LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1: <i>Mitracarpus scaber</i> (MISCA)	75
Figure 2: Méthode de préparation de l'extrait total aqueux de MISCA	80
Figure 3: Méthode de préparation de l'extrait éthanolique 70% et de l'extrait résiduel 70% de MISCA	82
Figure 4: Méthode de préparation de l'extrait éthanolique 100% de MISCA	84
Figure 5: Méthode de préparation de l'extrait butanolique de MISCA	86
Figure 6: Méthode des disques	91
Figure 7: Méthodes par dilution	99
Figure 8: Méthodes de détermination de la CMI et de la CMB	104
Figure 9: Action de MISCA-Aq sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de staphylocoques méticillino-sensibles par la méthode des disques	117
Figure 10: Action de MISCA-Aq sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de staphylocoques méticillino-résistantes par la méthode des disques	119
Figure 11: Bouillon inoculé de la souche de staphylocoque méticillino-résistante	121
Figure 12: Action de MISCA-Aq sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de staphylocoques méticillino-résistantes	123
Figure 13: Courbe de sensibilité des souches de staphylocoques méticillino-résistantes à l'extrait total aqueux	126
Figure 14: Action de MISCA-70Et sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de staphylocoques méticillino-résistantes	127
Figure 15: Courbe de sensibilité des souches de staphylocoques méticillino-résistantes à l'extrait éthanolique 70%	129
Figure 16: Action de MISCA-100Et sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de staphylocoques méticillino-résistantes	130

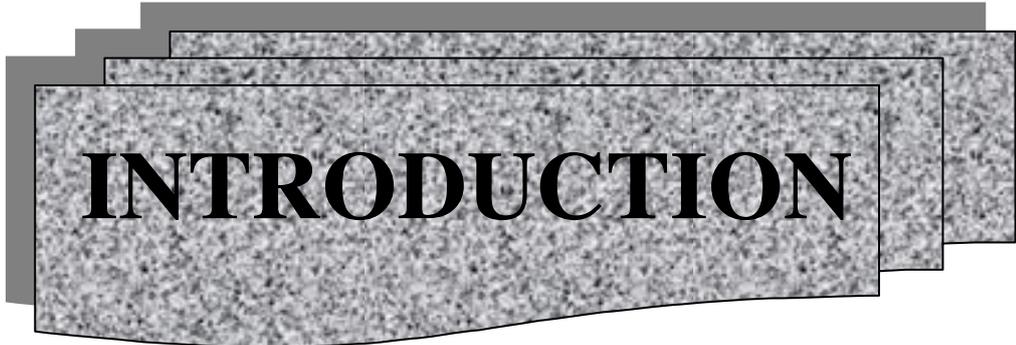
Figure 17: Courbe de sensibilité des souches de staphylocoques méticillino-résistantes à l'extrait éthanolique 100%	132
Figure 18: Action de MISCA-But <sup>+</sup> sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de staphylocoques méticillino-résistantes	133
Figure 19: Courbe de sensibilité des souches de staphylocoques méticillino-résistantes à l'extrait butanolique	135
Figure 20: Courbe de sensibilité des souches de staphylocoques méticillino-résistantes à l'extrait résiduel 70%	137
Figure 21: Courbe récapitulative de la sensibilité des souches de staphylocoques méticillino-résistantes aux extraits de MISCA	138
Figure 22: Action de l'acide fusidique sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de staphylocoques méticillino-résistantes	146
Figure 23: Bouillon inoculé de la souche streptocoque $\beta$ -hémolytique	149
Figure 24: Action de MISCA-Aq sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques	151
Figure 25: Courbe de sensibilité des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques à l'extrait total aqueux	155
Figure 26: Action de MISCA-70Et sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques	156
Figure 27: Courbe de sensibilité des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques à l'extrait éthanolique 70% sur les souches	158
Figure 28: Action de MISCA-100Et sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques	159
Figure 29: Courbe de sensibilité des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques à l'extrait éthanolique 100% sur les souches	161
Figure 30: Action de MISCA-But <sup>+</sup> sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques	162
Figure 31: Courbe de sensibilité des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques à l'extrait butanolique	164
Figure 32: Courbe de sensibilité des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques à l'extrait résiduel 70%	166

Figure 33: Courbe récapitulative de la sensibilité des souches de streptocoques aux extraits de MISCA	167
Figure 34: Action de l'acide fusidique sur la croissance <i>in vitro</i> des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques	176
Figure 35: Bouillon inoculé de la souche d' <i>Enterococcus faecalis</i>	179
Figure 36: Action de MISCA-Aq sur la croissance <i>in vitro</i> des souches d' <i>Enterococcus faecalis</i>	181
Figure 37: Courbe de sensibilité des souches d'entérocoques à l'extrait total aqueux	185
Figure 38: Action de MISCA-70Et sur la croissance <i>in vitro</i> des souches d' <i>Enterococcus faecalis</i>	186
Figure 39: Courbe de sensibilité des souches d'entérocoques à l'extrait éthanolique 70%	188
Figure 40: Action de MISCA-100Et sur la croissance <i>in vitro</i> des souches d' <i>Enterococcus faecalis</i>	189
Figure 41: Courbe de sensibilité des souches d'entérocoques à l'extrait éthanolique 100%	191
Figure 42: Action de MISCA-But <sup>+</sup> sur la croissance <i>in vitro</i> des souches d' <i>Enterococcus faecalis</i>	192
Figure 43: Courbe de sensibilité des souches d'entérocoques à l'extrait butanolique	194
Figure 44: Courbe de sensibilité des souches d'entérocoques à l'extrait résiduel 70%	196
Figure 45: Courbe récapitulative de la sensibilité des souches d'entérocoques aux extraits de MISCA	197
Figure 46: Action de l'acide fusidique sur la croissance <i>in vitro</i> des souches d' <i>Enterococcus faecalis</i>	206

# LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I: Evolution des colonies de staphylocoques méticillino-résistantes (SAMR) en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-Aq	124
Tableau II: Evolution des colonies de staphylocoques méticillino-résistantes (SAMR) en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-70Et	128
Tableau III: Evolution des colonies de staphylocoques méticillino-résistantes (SAMR) en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-100Et	131
Tableau IV: Evolution des colonies de staphylocoques méticillino-résistantes (SAMR) en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-But <sup>+</sup>	134
Tableau V: Evolution des colonies de staphylocoques méticillino-résistantes (SAMR) en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-70R	136
Tableau récapitulatif VI: Valeurs de paramètres anti-bactériens des 5 extraits de MISCA	139
Tableau VII: Evolution des colonies de streptocoques $\beta$ hémolytiques en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-Aq	153
Tableau VIII: Evolution des colonies de streptocoques $\beta$ hémolytiques en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-70Et	157
Tableau IX: Evolution des colonies de streptocoques $\beta$ hémolytiques en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-100Et	160
Tableau X: Evolution des colonies de streptocoques $\beta$ hémolytiques en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-But <sup>+</sup>	163
Tableau XI: Evolution des colonies de streptocoques $\beta$ hémolytiques en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-70R	165
Tableau récapitulatif XII: Valeurs de paramètres anti-bactériens des 5 extraits de MISCA	169
Tableau XIII: Evolution des colonies d' <i>Enterococcus faecalis</i> en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-Aq	183
Tableau XIV: Evolution des colonies d' <i>Enterococcus faecalis</i> en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-70Et	187

Tableau XV: Evolution des colonies d' <i>Enterococcus faecalis</i> en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-100Et	190
Tableau XVI: Evolution des colonies d' <i>Enterococcus faecalis</i> en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-But <sup>+</sup>	193
Tableau XVII: Evolution des colonies d' <i>Enterococcus faecalis</i> en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-70R	195
Tableau récapitulatif XVIII: Les valeurs de paramètres anti-bactériens des 5 extraits de MISCA	199
Tableau XIX : Tri phytochimique des différents extraits de MISCA testés	209



# INTRODUCTION

La découverte des antibiotiques, des vaccins et leur utilisation en thérapeutique et en prévention ont apporté un plus dans la lutte contre les maladies infectieuses. Malheureusement, ces dernières décennies, les traitements aux antibiotiques commencent à montrer leurs insuffisances et voire même à être dépassés. En effet, nous constatons une recrudescence des maladies infectieuses dans plusieurs spécialités cliniques. Parmi ces maladies en forte progression, l'on compte les infections cutanées causées par plusieurs germes dont les staphylocoques, les streptocoques et les entérocoques (BERGOGNE, 2000; DECOSTER, 2003; De GHELDRE *et al.*, 2000). Les raisons de la forte progression des maladies infectieuses sont nombreuses. Cependant, les plus citées sont:

- le non-respect des règles élémentaires de précaution hygiénique,
- l'usage abusif des antibiotiques en médecine et en agriculture,
- les erreurs de prescriptions antibio-thérapeutiques,
- la non observance de la prescription médicale,
- l'auto-médication,
- les résistances ou multi-résistances microbiennes (naturelles ou acquises) aux antibiotiques,
- les mutations pathogéniques,
- l'avènement du VIH (virus de l'immuno-déficience humaine) dans la pathologie virale humaine,
- l'augmentation des fréquences des maladies opportunistes,
- l'augmentation des fréquences des maladies nosocomiales,
- la fragilité du système immunitaire aux âges extrêmes de la vie (enfants et vieillards),
- le manque de politiques sanitaires cohérentes des états en terme:
  - ✓ d'insuffisance des structures sanitaires,

- ✓ d'insuffisance de personnels bien formés,
- ✓ d'insuffisance des outils diagnostics,
- ✓ de difficultés pour les malades d'accéder aux médicaments usuels.

Devant cette situation et face aux nombreux échecs thérapeutiques, la recherche de nouvelles séries de médicaments (antibiotiques) est devenue une nécessité (DROMER *et al.*, 1996; DUPONT *et al.*, 1996; GARRIGUES *et al.*, 1996; ZIRIHI *et al.*, 2003). Parmi les nombreuses voies explorées, la pharmacopée traditionnelle est l'une des sources les plus sollicitées. En effet, le patrimoine floristique africain regorge de plus de 5000 espèces de plantes médicinales (ADJANOHOON et AKE-ASSI, 1979). Plusieurs enquêtes ethnobotaniques ont montré qu'il existe dans la flore ouest africaine des plantes utilisées pour soigner les infections cutanées (BOUQUET et DEBRAY, 1974; ADJANOHOON *et al.*, 1977, 1979 et 1988; AKE-ASSI, 1984 et 1985; ZIRIHI, 1991; LOROUGNON, 1995; ZIRIHI *et al.*, 2003).

Pour apporter sa contribution à ces efforts de recherche, le Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'Université Félix HOUPHOUET-BOIGNY de Cocody, a initié depuis plus de quinze ans des axes de recherche en vue de mettre au point de nouvelles molécules efficaces et à prix certainement abordables, pouvant aider dans les traitements des maladies infectieuses. Parmi les nombreuses espèces végétales sélectionnées par notre équipe de recherche, *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae) figure non seulement au nombre de celles qui sont les plus sollicitées, mais aussi, elle passe pour être la plus utilisée dans le traitement de diverses infections cutanées. Cette plante a été codifiée MISCA au Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique. Ses extraits ont fait l'objet de nombreuses investigations relatives à leurs vertus anti-infectieuses.

Ils ont été notamment testés sur des souches pathogènes de bactéries (GUEDE-GUINA *et al.*, 1995; BONGA *et al.*, 1995, 1998) et de champignons (CROCKETT *et al.*, 1992; BONGA *et al.*, 1995, 1998; VANGAH-MANDA *et al.*, 1996; MOBIE *et al.*, 1996, 1997, 1998, 1998; KOFFI, 1997; GUEDE-GUINA *et al.*, 1995, 1996, 1998; TRA BI, 1999; KRA, 1997, 1998, 2001; M'BAYE, 2000; THES, 2001; ACKAH, 2004; KPOROU, 2004). Les travaux des divers auteurs réalisés en milieu solide ont révélé que les stéroïdes de la fraction active de MISCA-F2 avaient une action anti-microbienne dose-dépendante. Cependant, les travaux effectués par ces mêmes auteurs sur particulièrement, la souche de référence de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fournie par le Service de Microbiologie Clinique de la Faculté de Médecine d'Abidjan ont donné une concentration minimale bactéricide (CMB) de 6,25 mg/ml. Des études de bio-tolérance et de toxicité ont été aussi effectuées (COULIBALY, 1995; KONE, 1997; ABOUGHE, 1998; KONIN, 2002; DJYH, 1999, 2003; TREBISSOU, 1997, 2001, 2002; DOUMBIA, 2001). Des crèmes galéniques de MISCA (MISCA-FGG) ont été mises au point pour traiter avec succès les infections cutanées, telles que les teignes, les eczémas microbiens, les impétigos bulleux, les lichens, les psoriasis, les dartres, les kératodermies, les pityriasis, les furoncles et diverses autres inflammations de la peau (BONGA *et al.*, 1995; GUEDE-GUINA *et al.*, 1995; KOFFI, 1997).

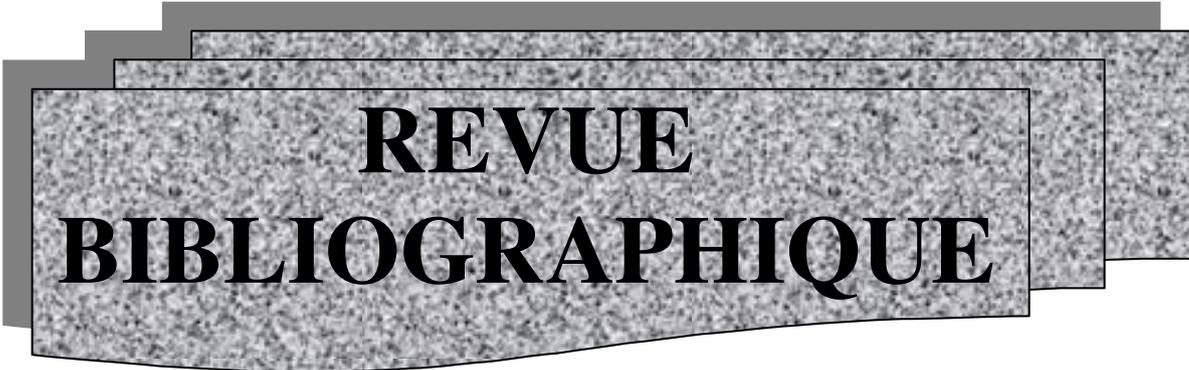
Ailleurs, certains chercheurs ont également évalué son activité anti-bactérienne (MAYNART *et al.*, 1982; EKPENDU *et al.*, 1994; OKUNADE *et al.*, 1999; ALI-EMMANUEL *et al.*, 2003), anti-microbienne (BISIGNANO *et al.*, 2000; ABERE *et al.*, 2007) et anti-parasitaire (NOK, 2002). De cette plante, de nombreux chercheurs, ont même isolé des groupes de molécules actives sur les microbes (BISIGNANO *et al.*, 2000; GBAGUIDI, 2005) et les parasites (NOK, 2002).

C'est pour contribuer à l'amélioration de l'efficacité de *Mitracarpus scaber* que la présente étude a été menée.

Notre travail a pour objectif général d'évaluer le spectre anti-bactérien des extraits de *Mitracarpus scaber* et d'un stéroïde standard, l'acide fusidique (antibiotique) sur des cocci Gram positif, les germes les plus mis en cause en pathologie cutanée humaine.

Spécifiquement, il s'agit de:

- 1- identifier et conserver les souches de staphylocoques (coagulase positif et coagulase négatif), de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques (groupe A, C et G) et d'entérocoques (*Enterococcus faecalis*);
- 2- évaluer l'activité anti-bactérienne de l'extrait total aqueux de MISCA;
- 3- optimiser l'activité anti-bactérienne de l'extrait total aqueux de MISCA par des partitions bio-guidées;
- 4- réaliser le tri phytochimique des différents extraits de MISCA testés, afin d'identifier les différentes molécules ou groupes de composés possédant les dites activité anti-bactérienne;
- 5- évaluer un stéroïde standard, l'acide fusidique (antibiotique) sur ces souches bactériennes.



**REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1- Généralités sur les cocci Gram positif**

### **1-1 Staphylocoques**

Les staphylocoques sont des germes ubiquitaires. Ils sont très fréquemment isolés en pathologie humaine, particulièrement au cours des suppurations. Ils sont trouvés dans l'air, les sols et les eaux. Les staphylocoques appartiennent à la flore commensale de la peau et des muqueuses de l'Homme et des animaux (DECOSTER, 2003).

#### **1-1.1 Historique**

Ils ont été observés par PASTEUR en 1879 dans un pus de furoncle. Les staphylocoques doivent leur nom à OGSTON qui les a mis en évidence en 1881 dans des abcès aigus et chroniques.

#### **1-1.2 Taxonomie**

Les staphylocoques appartiennent à la famille des Micrococcaceae qui comprend quatre genres: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Stomatococcus* et *Planococcus*.

- Le genre *Micrococcus* comprend les microcoques qui sont également des hôtes normaux de la peau et des muqueuses de l'Homme. Par conséquent, ils sont souvent présents dans les prélèvements sanguins et biopsiques. Ce sont presque toujours des contaminants qu'il importe de distinguer des staphylocoques (DECOSTER, 2003);
- Le genre *Staphylococcus* comprend une trentaine d'espèces dont certaines sont des hôtes de l'homme, d'autres des animaux, d'autres encore sont rencontrées à la fois chez l'Homme et l'animal. Chez l'Homme, les espèces les plus couramment isolées sont:
  - ✓ Le germe *Staphylococcus aureus*, le plus pathogène,

- ✓ Le germe *Staphylococcus epidermidis*, souvent considéré comme opportuniste,
- ✓ Le germe *Staphylococcus saprophyticus*, responsable d'infections urinaires chez la jeune femme,
- ✓ et à une fréquence moindre, les germes *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis* et *S. auricularis* (DECOSTER, 2003).

Il faut se garder d'assimiler *S. aureus* à un pathogène obligatoire et *S. epidermidis* à un commensal certain. L'un comme l'autre sont des hôtes normaux de la peau et des muqueuses de l'Homme pouvant, de ce fait, contaminer les prélèvements sanguins. Cependant, l'un et l'autre peuvent aussi être à l'origine d'infections graves. Le germe *S. aureus* a néanmoins un potentiel pathogène plus important. Le germe *S. aureus* exprime des caractères qui le différencient des autres staphylocoques. Il possède notamment une coagulase. En pratique bactériologique courante, ce caractère permet de faire la distinction entre *Staphylococcus aureus* et les Staphylocoques coagulase négatifs (SCN) (DECOSTER, 2003).

- Le genre *Stomatococcus* comprend *Stomatococcus mucilaginosus* qui fait partie de la flore buccale (DECOSTER, 2003);
- Le genre *Planococcus* comprend des bactéries du milieu marin (DECOSTER, 2003).

## **1-1.2.1 *Staphylococcus aureus***

### **1-1.2.1.1 Caractères bactériologiques**

#### **1-1.2.1.1.1 Morphologie**

Le germe *Staphylococcus aureus* est comme tous les staphylocoques, une coque à Gram positif d'environ 1 micromètre de diamètre, apparaissant en amas à l'examen microscopique. Il est immobile, non sporulé et ne présente pas de capsule visible au microscope optique (DECOSTER, 2003).

#### **1-1.2.1.1.2 Caractères cultureux**

Il se cultive facilement sur les milieux ordinaires (gélose ordinaire, columbia) en aérobiose comme en anaérobiose en formant, sur les milieux solides, des colonies lisses, luisantes et bombées, plus ou moins pigmentées en jaune or d'où l'appellation *Staphylococcus aureus* ou staphylocoque "doré". En milieu liquide, il produit dans le bouillon un trouble homogène. Il n'a pas d'exigences particulières. Si les conditions idéales de croissance sont une température de 37°C et un pH de 7,5; de grandes variations sont tolérées. Comme tous les Micrococaceae, il se multiplie dans des milieux contenant une forte concentration de NaCl (5 à 10 g pour cent). Il est capable de transformer de nombreux substrats, notamment les sucres ce qui n'a guère d'intérêt pratique sauf en ce qui concerne le mannitol (un polyalcool) que *S. aureus* peut fermenter contrairement à la plupart des SCN (DECOSTER, 2003).

### **1-1.2.1.1.3 Equipement enzymatique**

Outre ceux nécessaires aux fonctions métaboliques (transformation du mannitol, la possibilité de pousser sur les milieux hypersalés) décrites ci-dessus, diverses enzymes peuvent être mises en évidence chez *Staphylococcus aureus*. Ce sont la catalase (qui existe chez tous les Micrococaceae), la coagulase, la désoxyribonucléase, la phosphatase, la hyaluronidase, la fibrinolysine, la lipase et les protéolysines (DECOSTER, 2003).

Ces différentes enzymes caractérisent les *S. aureus*. La présence d'une coagulase identifie en pratique courante l'espèce *S. aureus*. Il existe une coagulase libre (libérée dans le milieu de culture) et une coagulase liée au corps bactérien. La coagulase libre est une protéine diffusible réagissant comme la prothrombine et coagulant en quelques heures, le plasma citraté de l'homme ou du lapin. La forme liée ou clumping factor réagit directement avec le fibrinogène, entraînant l'agglutination des staphylocoques lorsqu'elle est mélangée à un plasma. L'activité de toutes ces enzymes explique en partie, la physio-pathologie de l'infection staphylococcique. Leur recherche est par ailleurs utile pour la classification et le typage des souches (DECOSTER, 2003).

### **1-1.2.1.1.4 Autres substances élaborées**

Le pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus* tient également à la production d'un grand nombre de substances diffusibles:

➤ hémolysines

L'hémolysine  $\alpha$  ou staphylolysine  $\alpha$  est cytotoxique et cytolytique. Elle a un effet nécrotique sur la peau lié à son effet vaso-constricteur. C'est une hémolysine active surtout sur les hématies de lapin.

La staphylolysine  $\alpha$  entraîne la production d'anticorps appelés anti-staphylolysines A (ASTA) recherchés dans le séro-diagnostic. Il existe d'autres hémolysines,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  dont le pouvoir toxique est incertain (DECOSTER, 2003).

➤ leucocidine

Cette toxine agit sur les granulocytes, les macrophages et les basophiles et provoque leur immobilisation puis leur dégranulation et leur lyse (DECOSTER, 2003).

➤ entérotoxines

Certaines souches de *Staphylococcus aureus* élaborent des toxines protéiques responsables de toxi-infections alimentaires. Ce sont les entéro-toxines staphylococciques qui sont au nombre de cinq: A, B, C, D, E. C'est leur activité de superantigène qui explique les effets toxiques (DECOSTER, 2003).

➤ la toxine du syndrome de choc toxique

Certaines souches de *Staphylococcus aureus* élaborent une toxine pyrogène et létale: la toxine du syndrome de choc toxique ou TSST (Toxic-Shock Syndrom Toxin). Elle se comporte aussi comme un superantigène (DECOSTER, 2003).

➤ exfoliatines ou épidermolysines

Certaines souches de *Staphylococcus aureus* élaborent des toxines protéiques A ou B. Elles sont responsables de staphylococcies cutanées bulleuses dues à des lésions histologiques caractérisées par un décollement intra-épidermique donnant lieu au syndrome de la "peau ébouillantée" ou syndrome de Ritter (DECOSTER, 2003).

### **1-1.2.1.2 Antigènes**

Il existe des antigènes capsulaires de nature polysaccharidique et des antigènes pariétaux constitués par le peptidoglycane et les acides teichoïques. La plupart de ces antigènes permettent le sérotypage des souches. Une protéine de paroi, la protéine A a la propriété de fixer les immuno-globulines de classe G par leur fragment Fc. Cette propriété est mise à profit au laboratoire, dans des réactions de “co-agglutination”. Rappelons également la staphylolysine  $\alpha$  décrite plus haut (DECOSTER, 2003).

### **1-1.2.1.3 Pouvoir pathogène chez l'homme**

Le germe pyogène *Staphylococcus aureus* est responsable de la plupart des infections suppurées de la peau et des muqueuses. Il “surinfecte” souvent les plaies négligées. Les principales staphylococcies cutanées focales sont dues à la pénétration des germes au niveau des annexes de la peau (follicules pilo-sébacés, glandes sudoripares) ou dans les muqueuses à l'occasion d'une plaie même minime. Elles donnent lieu à des folliculites, furoncles, sycosis, anthrax, orgelets, hydrosadénites, panaris, onyxis, périonyxis, impétigo et abcès à localisations variées (sein, fesse, marge de l'anus, aisselle, aine...). Plus rares sont les conjonctivites, angines, phlegmons de l'amygdale, otites ou sinusites. Ces infections cutané-muqueuses sont parfois le point de départ de suppurations profondes ou d'infections générales (DECOSTER, 2003).

Les infections générales septicémiques ou septico-pyohémiques donnent lieu à de fréquentes localisations métastatiques génératrices d'infections profondes (DECOSTER, 2003).

Les infections profondes sont pleuro-pulmonaires (pneumopathies, abcès, pleurésies, pneumonies “bulleuses”), génito-urinaires (abcès rénal, phlegmon périnéphrétique, abcès de la prostate), ostéo-articulaires (ostéomyélite aiguë des adolescents, abcès osseux) cardiaques ou cérébro-méningées (DECOSTER, 2003).

Le germe *Staphylococcus aureus* est fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (GOURDET *et al.*, 2000; WOLFF, 2001; ELOUENNASS *et al.*, 2002; DECOSTER, 2003). L'incidence élevée est expliquée par l'emploi intensif d'antibiotiques qui sélectionnent, dans l'écosystème hospitalier, des souches résistantes, par la fragilité des malades et par les soins ou traitements de plus en plus hardis mais de plus en plus agressifs qu'ils subissent (BERGOGNE, 2000; GARRABE *et al.*, 2000; DELMEE, 2000; TABONE *et al.*, 2000; DECOSTER, 2003). Les voies d'entrée sont iatrogènes (aiguilles, sondes, canules, cathéters, perfuseurs, drains ...) (VAUDAUX, 2000; DECOSTER, 2003).

Le germe *Staphylococcus aureus* est aussi un pathogène à cause des toxines qu'il fabrique (DECOSTER, 2003).

Le syndrome de Ritter ou SSSS (Staphylococcal Scalded Skin Syndrom), improprement appelé syndrome de Lyell (qui est d'origine toxique) est plus fréquent chez l'enfant. Il est caractérisé par une érythrodermie bulleuse avec fièvre évoquant une brûlure du second degré. Il est occasionné par des staphylocoques producteurs d'exfoliatines. L'impétigo et le pemphigus sont des formes mineures localisées du syndrome (DECOSTER, 2003).

Le syndrome de choc toxique staphylococcique (SCTS) associe hypotension, choc et fièvre à une érythrodermie généralisée desquamante. Il est occasionné par des staphylocoques producteurs de TSST. Sa survenue serait favorisée par l'utilisation de tampons périodiques (DECOSTER, 2003).

Les manifestations intestinales provoquées par les staphylocoques entéro-toxinogènes se présentent sous deux formes:

- les toxi-infections alimentaires sont les plus fréquentes, il s'agit de troubles digestifs provoqués par l'ingestion d'aliments contenant l'entéro-toxine préformée d'incubation très courte (une heure à six heures après le repas) et évoluant sans fièvre;
- l'entérocolite aiguë pseudo-membraneuse, plus rare, survenant chez des sujets ayant reçu une antibio-thérapie qui a sélectionné une souche intestinale de *S. aureus* résistante au traitement et sécrétrice d'entéro-toxine (DECOSTER, 2003).

#### **1-1.2.1.4 Epidémiologie**

Le principal "réservoir de virus" est la peau et les muqueuses de l'Homme, qu'il soit malade ou bien portant puisqu'on trouve, parmi les sujets indemnes de toute infection, 30 à 50% de porteurs sains. On le trouve en particulier dans les narines. C'est une affinité du germe pour l'épithélium nasalaire et le pouvoir d'y adhérer durablement qui explique sa prévalence dans le nez. La transmission manuportée est le mode essentiel de transmission et le réservoir nasal recontaminant rapidement les mains assure la pérennité de la transmission. Le portage intestinal est assez fréquent et n'a pas beaucoup de signification pathologique (DECOSTER, 2003).

#### **1-1.2.1.5 Immunité**

La fréquence du portage sain chez l'Homme implique l'existence d'une immunité naturelle dont le support n'est pas encore bien établi. Puisque les staphylocoques sont des bactéries à multiplication extracellulaire (BME), la phagocytose est probablement le mécanisme le plus efficace.

Une diminution des capacités phagocytaires des granulocytes se traduit par des infections staphylococciques fréquentes et récidivantes (granulomatose septique). Des anticorps apparaissent au cours des infections staphylococciques mais leur rôle protecteur est incertain (DECOSTER, 2003).

### **1-1.2.1.6 Diagnostic biologique**

#### ➤ Isolement et identification

La morphologie (cocci Gram + en amas) est très évocatrice dès l'examen microscopique. Pour isoler *S. aureus* des prélèvements plurimicrobiens, on peut utiliser des milieux sélectifs comme le milieu de Chapman qui contient du mannitol et une forte concentration de NaCl (DECOSTER, 2003).

Le germe *Staphylococcus aureus* peut être facilement cultivé sur des milieux ordinaires. Des épreuves enzymatiques simples (oxydase -, catalase +) permettent de reconnaître le genre. D'autres tests définissent l'espèce (présence d'une coagulase libre ou liée) (DECOSTER, 2003).

#### ➤ Diagnostic sérologique

Le taux sérique normal des anti-staphylolysines  $\alpha$  étant de 0,5 à 2 Unités par millilitre, un taux supérieur à 2 U est donc significatif. Ce dosage est rarement demandé (DECOSTER, 2003).

#### ➤ Typage des souches

Il permet un diagnostic épidémiologique dans les collectivités, au cours d'une enquête entreprise à la suite d'une intoxication alimentaire, dans la surveillance et le contrôle des infections nosocomiales.

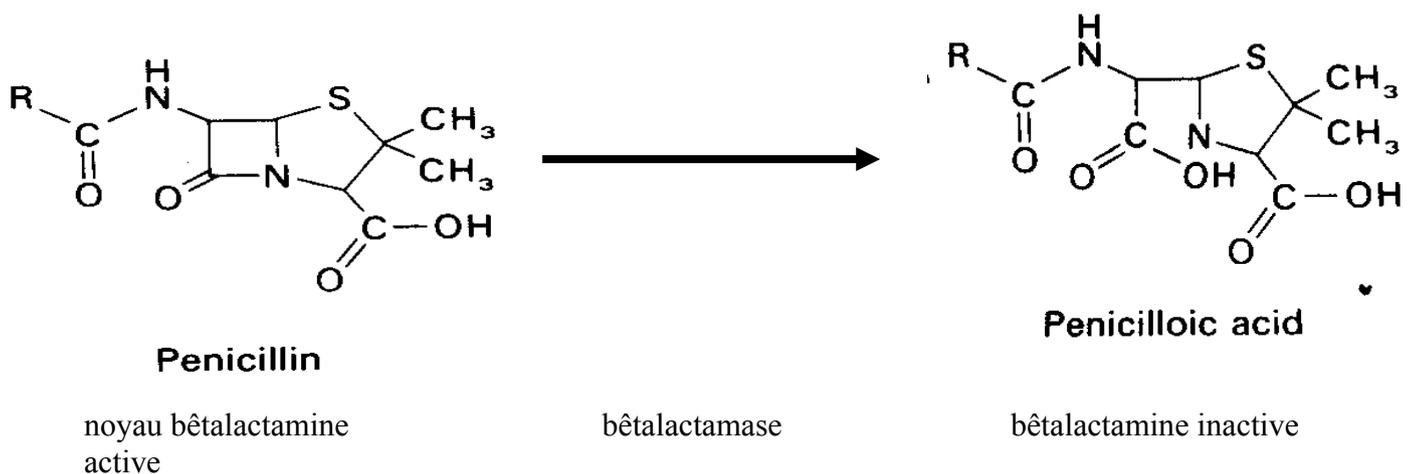
On peut typer les souches par séro-agglutination ou par lysotypie et mettre en évidence les toxines mais il s'agit de recherches particulières réservées aux laboratoires de référence (DECOSTER, 2003).

### 1-1.2.1.7 Résistances aux antibiotiques

#### ➤ Bêtalactamines

La résistance de *Staphylococcus aureus* aux bêtalactamines relève de plusieurs mécanismes:

- ✓ la production d'origine plasmidique de bêtalactamases



Les bêtalactamases sont des enzymes inactivant l'antibiotique par ouverture du cycle bêtalactame. La bêtalactamase du staphylocoque est une pénicillinase qui induit une résistance aux pénicillines G et A (Ampicilline, Amoxicilline), les carboxypénicillines (Ticarcilline) et les acyluréidopénicillines (Mezlocilline, Azlocilline et Pipéracilline), mais, n'a pas d'effet sur les pénicillines M (Méticilline, Oxacilline, Cloxacilline), les céphalosporines et les pénèmes (Imipenem). Cette résistance est due à la différence structurale qu'il y a entre ces molécules et celles des pénicillines G et A, des carboxypénicillines et des acyluréidopénicillines.

Par exemple, dans le cas des céphalosporines, le cycle thiazolidine est remplacé par un cycle dihydrothiazine qui est plus stable. Quant aux pénèmes, ils diffèrent des pénicillines G et A par la présence d'un radical alphanéthoxy les rendant plus stables vis-à-vis des bêtalactamases. Cette pénicillinase staphylococcique est inactivée par des produits dénommés "inhibiteurs de bêtalactamases" (acide clavulanique, tazobactam, sulbactam) qui associés aux bêtalactamines restaurent leur efficacité. En milieu hospitalier, 80% au moins des staphylocoques sont producteurs de bêtalactamase (DECOSTER, 2003).

✓ la modification de la cible d'origine chromosomique

La cible des bêtalactamines est un ensemble d'enzymes de la membrane cytoplasmique nécessaires à la formation du peptidoglycane de la paroi. Les bêtalactamines se fixent d'une manière irréversible à l'une ou l'autre de ces enzymes appelées pour cette raison "P.L.P." (Protéine Liant la Pénicilline, en anglais: "P.B.P." pour Protein Binding Penicillin). En présence d'une bêtalactamine, les bactéries ont de ce fait une paroi fragilisée et sont incapables de résister aux chocs osmotiques (DECOSTER, 2003).

Les souches résistantes élaborent une nouvelle "P.L.P. appelée 2a" pour laquelle les bêtalactamines n'ont pas d'affinité ou une affinité réduite. La résistance ainsi induite ne concerne parfois qu'une partie de la population d'une souche. Elle est pour cette raison dénommée "résistance hétérogène" (MOREILLON *et al.*, 2000; QUINCAMPOIX *et al.*, 2001; DECOSTER, 2003).

On la détecte en testant l'activité de l'oxacilline (une pénicilline M) dans des conditions de cultures particulières (milieu hypertonique ou incubation à 30°C) (DECOSTER, 2003).

Les souches possédant ce type de résistance sont dites "méti-R" et désignées par le sigle "SAMR" pour (*Staphylococcus aureus* méticillino-résistant - appellation qui n'est pas très indiquée puisque la méticilline n'est plus commercialisée).

Les souches méti-R sont résistantes à toutes les bêtalactamines et généralement résistantes aux autres familles d'antibiotiques (souches polyrésistantes). Toutes ces souches produisent la pénicillinase staphylococcique (DECOSTER, 2003).

Elles sont surtout isolées en milieu hospitalier (20% des souches hospitalières, moins de 1% des souches “de ville”) (DECOSTER, 2003).

➤ Autres mécanismes de résistance à la méticilline:

- ✓ par diminution de la synthèse et/ou de l'affinité d'une des P.L.P.,
- ✓ par hyperproduction de bêtalactamase,
- ✓ par production de méticillinase.

Ce sont des mécanismes beaucoup plus rares et occasionnant des résistances de moindre niveau (DECOSTER, 2003).

➤ Aminocyclitolides

Le germe *Staphylococcus aureus* est normalement sensible aux aminocyclitolides mais des résistances sont fréquemment détectées surtout parmi les souches méti-R. Elles sont dues à une inactivation de l'antibiotique par diverses enzymes bactériennes. Parmi les aminocyclitolides, la molécule la plus active est la gentamicine et toute souche résistante à cet antibiotique résiste aux autres aminocyclitolides (phénotype KGT). Certaines souches opposent une double résistance à l'amikacine et à la tobramycine (phénotype KT), et d'autres, une résistance limitée à l'amikacine et à la néomycine (phénotype KNm) (DECOSTER, 2003).

➤ Macrolides et apparentés: MLS (Macrolides, Lincosamines, Synergistines)

Les macrolides vrais (Erythromycine, Josamycine) et les lincosamines (Lincomycine, Clindamycine) sont efficaces mais on observe des résistances par modification de la cible ribosomale (DECOSTER, 2003).

Les synergistines (Pristinamycine) sont presque toujours actives et constituent d'excellents anti-staphylococciques. Tous ces produits sont utilisables comme une alternative aux bêtalactamines en cas d'allergie à ces dernières (DECOSTER, 2003).

➤ Autres antibiotiques:

- ✓ fosfomycine, acide fusidique, rifampicine et quinolones fluorées (péfloxacine, ofloxacine, ciprofloxacine) sont presque toujours actifs. Ils ne sont utilisés qu'en association pour éviter la sélection de mutants résistants;
- ✓ les glycopeptides (vancomycine, teicoplanine) sont très efficaces. Il n'existe pas de souche résistante à ces glycopeptides, mais doivent être réservés aux infections sévères (DECOSTER, 2003).

En somme, pour un *Staphylococcus aureus* "méti-S", les pénicillines M constituent le traitement de choix, associées à un aminoside dans les infections graves. Les céphalosporines de 1ère génération (C1G) et la pristinamycine peuvent être utilisés en deuxième intention. Sont également utiles les macrolides, les lincosamines, l'acide fusidique, la rifampicine et l'association amoxicilline-acide clavulanique. Les aminosides peuvent être prescrits en association. Pour un *Staphylococcus aureus* "méti-R", les glycopeptides et particulièrement la vancomycine s'impose en monothérapie ou, selon la localisation, en association avec d'autres molécules actives telles que fosfomycine, rifampicine, quinolones systémiques ou acide fusidique (DECOSTER, 2003).

En milieu hospitalier, la prévention des staphylococcies sévères et difficiles à traiter nécessite la détection des souches polyrésistantes, des mesures d'hygiène rigoureuses pour éviter leur diffusion avec éventuellement l'isolement des porteurs et une tentative d'éradication par l'usage raisonné d'antibiotiques appropriés (JOLY, 1998; EL SOLH, 2000; WOLFF, 2001; DECOSTER, 2003).

## **1-1.2.2 Staphylocoques coagulase négatifs**

Longtemps opposés aux “staphylocoques dorés” réputés dangereux, les “staphylocoques blancs” étaient considérés comme de simples commensaux de la peau et des muqueuses car ils sont omniprésents. D'indéniables infections nosocomiales causées par ces staphylocoques “non pathogènes” ont suscité des travaux visant à les identifier et à les classer. On les désigne sous le nom de “staphylocoques coagulase-négatifs” (SCN) car contrairement aux *Staphylococcus aureus*, la plupart d'entre eux sont dépourvus de cette enzyme (DECOSTER, 2003).

### **1-1.2.2.1 Classification et habitat**

Vingt neuf espèces de SCN sont répertoriées, certaines sont des hôtes de l'Homme, d'autres de l'animal et d'autres encore de l'Homme et de l'animal. Chez l'Homme, *Staphylococcus epidermidis* domine largement en particulier sur la peau. Mais sur certains sites, on trouve aussi d'autres espèces: *S. capitis* sur le cuir chevelu, *S. auricularis* dans le conduit auditif externe, *S. hominis* ou *haemolyticus* sur les zones sèches. Sur les muqueuses intestinales ou nasales on isole surtout *S. epidermidis* et sur la muqueuse vaginale, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*. Cette répartition varie légèrement selon l'âge, les habitudes, le mode de vie et une éventuelle antibio-thérapie (DECOSTER, 2003).

### **1-1.2.2.2 Caractères bactériologiques**

Les SCN sont évidemment reconnus, d'une manière plus pragmatique que scientifique, par l'absence de coagulase ce qui les différencie de *Staphylococcus aureus* (quelques espèces de SCN animales surtout possèdent toutefois l'enzyme). De plus, la majorité d'entre eux sont incapables de fermenter le mannitol.

Leur identification plus complète repose sur des caractères bactériologiques classiques (nitratase, phosphatase, ornithine décarboxylase, fermentations sucrées ...). Comme cela a déjà été signalé à propos de *S. aureus*, il importe de les distinguer des microcoques. Il existe des galeries miniaturisées spécialement conçues à cette fin. La démarche est cependant longue et assez coûteuse et n'a d'intérêt que dans des circonstances épidémiologiques particulières (DECOSTER, 2003).

### **1-1.2.2.3 Pouvoir pathogène**

Les SCN sont essentiellement responsables d'infections nosocomiales et iatrogènes. Leur virulence est en rapport avec leur capacité d'adhésion aux matériels étrangers car ils élaborent une substance polysaccharidique dénommée "slime" qui facilite cette adhérence. Cathéters, voies veineuses centrales, sondes, prothèses valvulaires cardiaques ou prothèses osseuses, valves sont les portes d'entrée ou le siège de ces infections qui occasionnent des septicémies, bactériémies, endocardites, médiastinites après chirurgie cardiaque, infections urinaires ou prostatiques après chirurgie ou endoscopie, infections sur valves de dérivation pour traiter l'hydrocéphalie (PATRICK, 1990; HALL, 1991; AUJARD *et al.*, 2000; DECOSTER, 2003). Signalons le cas particulier des infections urinaires dues à *Staphylococcus saprophyticus* frappant surtout les jeunes femmes (DECOSTER, 2003).

### **1-1.2.2.4 Sensibilité des SCN aux antibiotiques**

Les SCN forment un groupe hétérogène et leur comportement vis-à-vis des antibiotiques varie selon les espèces. A l'exception de *S. saprophyticus*, ils sont généralement plus résistants aux antibiotiques que *S. aureus*.

Certains opposent des résistances naturelles utiles pour les identifier: *saprophyticus* résistant à la novobiocine et à la fosfomycine, *epidermidis* (et *aureus*) résistant à la polymyxine, *haemolyticus* résistant à la bacitracine etc... (DECOSTER, 2003).

Les mécanismes de résistance aux bêtalactamines sont identiques à ceux décrits pour *aureus*: production de pénicillinase et modification des PLP. Une souche "méti-R" est résistante à toutes les bêtalactamines. Quatre vingt dix pour cent des souches "méti-R" sont résistantes aux aminosides; cette proportion tombe à 15% pour les souches "méti-S". Il existe des souches présentant une résistance isolée à l'amikacine parfois associée à une résistance à la tobramycine. Les résistances aux macrolides et apparentés sont fréquentes chez les souches "méti-R". Les autres anti-staphylococciques (acide fusidique, fosfomycine, rifampicine) sont efficaces (DECOSTER, 2003).

Les glycopeptides sont actifs, même sur les souches polyrésistantes "méti-R" (DECOSTER, 2003).

Le germe *Staphylococcus saprophyticus* est un staphylocoque dépourvu de coagulase (SCN) mais qui fermente le mannitol comme *S. aureus*. Contrairement à la plupart des staphylocoques isolés chez l'Homme, il est résistant à la novobiocine (la zone d'inhibition de la culture autour d'un disque chargé à 5 µg de novobiocine est inférieure à 16 mm). *S. saprophyticus* est responsable d'infections urinaires chez la jeune femme. Il est la cause de 3 à 4 % des cystites banales de la femme. On l'isole plus souvent en ville qu'à l'hôpital. Les tests de dépistage des infections urinaires (bandelettes) sont souvent en défaut car le test au nitrite est négatif.

Il faut pratiquer un examen cyto bactériologique complet des urines pour reconnaître une cystite à *S. saprophyticus*. Il est sensible à la plupart des antibiotiques à visée urinaire sauf à la fosfomycine (résistance naturelle) (DECOSTER, 2003).

Cependant, de manière générale, ces dernières années, des cas de résistances à la vancomycine sont constatées ici et là (Japon, Etats-Unis, France) chez les cocci Gram positif (JOLY, 1998; ENTENZA *et al.*, 1998; GAMBAROTTO *et al.*, 2000; MOREILLON, 2000; GIBERT *et al.*, 2001).

Pour remédier au plus vite à cet état de fait, afin d'éviter d'être dans une impasse thérapeutique, d'autres molécules ont été découvertes (COQUE *et al.*, 1996; LECLERCQ *et al.*, 2000; MULLER, 2000; BERGOGNE, 2000; BAIN *et al.*, 2001; KASSIS *et al.*, 2002; RAFFI, 2002; GARRIGUES, 2002; DOS SANTOS *et al.*, 2002; GAUZIT, 2003; MUTNICK *et al.*, 2003).

## **1-2 Streptocoques**

La famille des Streptococcaceae comprend sept genres. Parmi eux, *Streptococcus* et *Enterococcus* regroupent la plupart des espèces responsables d'infections humaines. Les caractéristiques communes à toutes ces espèces sont les suivantes: coques à Gram positif, non sporulées, immobiles, dépourvues de catalase et d'oxydase, ne réduisant pas les nitrates et résistants aux aminosides (DECOSTER, 2003).

## **1-2.1 Historique**

En 1879, PASTEUR décrit dans le pus d'un abcès chaud des micro-organismes en chapelet de grains. ROSENBAACH leur donne, en 1884, le nom de streptocoques. En 1924, DICK démontre que la scarlatine est due au streptocoque. En 1928, LANCEFIELD propose la classification antigénique qui porte son nom et qui remplace les classifications précédentes basées uniquement sur les propriétés hémolytiques. Avec la méthode de LANCEFIELD, on peut classer les streptocoques en séro-groupes de A à T. Certains streptocoques qui ne possèdent pas d'antigène permettant de les classer selon la méthode de LANCEFIELD sont dits "non groupables". En 1936, l'avènement des sulfamides entraîne une baisse de la mortalité par fièvre puerpérale, complication post partum souvent causée par les streptocoques (DECOSTER, 2003).

## **1-2.2 Classification**

Leur classification se fonde sur plusieurs critères:

- d'après leur pouvoir hémolytique:
  - ✓ hémolyse incomplète: streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques,
  - ✓ hémolyse complète: streptocoques  $\beta$ -hémolytiques,
  - ✓ pas d'hémolyse: streptocoques non hémolytiques (DECOSTER, 2003).
- d'après leur équipement antigénique (LANCEFIELD):
  - ✓ un antigène de la paroi, le polyside C permet de définir plusieurs groupes: A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P, R, S, T, U, V. Certains streptocoques, dépourvus de polyside C sont dits "non groupables" (DECOSTER, 2003).

On peut mettre en évidence le polyside C:

- ❖ par la technique de LANCEFIELD qui comprend une extraction du polyside C à partir d'une suspension de la souche par l'acide chlorhydrique à chaud ou par l'acide nitreux ou par la formamide ou encore par la pronase suivie d'une réaction de précipitation en tube en présence des anti-sérums spécifiques;
  - ❖ par précipitation en milieu gélosé par contre immuno-électrophorèse;
  - ❖ par immuno-fluorescence directe (pour le groupe A);
  - ❖ par co-agglutination de staphylocoques ou de particules de latex sensibilisés par des anticorps spécifiques (cette dernière technique est actuellement la plus utilisée) (DECOSTER, 2003).
- d'après leurs caractères biochimiques qui permettent d'individualiser des espèces dans le genre: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus bovis* etc...

Ces classifications ne sont pas superposables. Les critères de la taxonomie moléculaire ont permis de définir des groupes génomiques et d'individualiser de nouvelles espèces. En routine, on peut toutefois classer et identifier la plupart des streptocoques grâce aux caractères phénotypiques décrits ci-dessus (DECOSTER, 2003).

On classe actuellement les streptocoques en “ensembles” et “sous-ensembles” (ce qui n'est hélas guère en conformité avec les règles de la taxonomie bactérienne):

- ✓ les streptocoques pyogènes,
- ✓ les streptocoques du groupe D,
- ✓ les streptocoques oraux,
- ✓ les streptocoques non classés.

PYOGENES	GROUPE D	ORAUX
Sous-ensemble 1	<i>S. bovis</i>	sous-ensemble 1
<i>S. pyogenes</i>	<i>S. equinus</i>	<i>S. mitis, S. sanguis</i>
	<i>S. alactolyticus</i>	<i>S. oralis</i>
		<i>S. gordonii</i>
Sous-ensemble 2		sous-ensemble 2
<i>S. agalactiae</i>		
Sous-ensemble 3		sous-ensemble 3
<i>S. equismilis</i>		<i>S. pneumoniae</i>
<i>S. dysgalactiae</i>		
Sous-ensemble 4		sous-ensemble 4
		<i>S. milleri</i>
Sous-ensemble 5		sous-ensemble 5
		<i>S. mutans</i>
		sous-ensemble 6
		<i>S. salivarius</i>

➤ Dans l'ensemble des streptocoques pyogènes:

- ✓ Le germe *Streptococcus pyogenes* est l'espèce type du genre; c'est le streptocoque  $\beta$ -hémolytique du groupe A;
- ✓ Le germe *Streptococcus agalactiae* possédant l'antigène de groupe B est souvent désigné streptocoque;
- ✓ Dans le sous-ensemble 3, on trouve les streptocoques  $\beta$ -hémolytiques des groupes C, G ou L;
- ✓ Les souches des sous-ensembles 4 et 5, non hémolytiques sont d'origine animale (DECOSTER, 2003).

- Dans l'ensemble des streptocoques du groupe D, on trouve trois espèces commensales du tube digestif de l'Homme et des animaux, *S. bovis* est le plus fréquemment isolé (DECOSTER, 2003).
- Les streptocoques oraux correspondent aux streptocoques autrefois dénommés *viridans*. Ils sont pour la plupart  $\alpha$  ou non hémolytiques et non groupables. Parmi eux, *S. pneumoniae*, le pneumocoque mérite une étude particulière à cause de sa virulence (DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.1 Streptocoques du groupe A**

Ils sont encore appelés *Streptococcus pyogenes* et ont une grande importance en bactériologie médicale car ils sont responsables de la majorité des infections humaines à streptocoques (DECOSTER, 2003).

#### **1-2.2.1.1 Caractères bactériologiques**

##### **1-2.2.1.1.1 Morphologie**

Ce sont des cocci à Gram positif disposés en chaînettes, immobiles, non sporulés, apparaissant parfois capsulés.

### **1-2.2.1.1.2 Caractères cultureux**

Les streptocoques du groupe A se comportent en culture comme des aérobies-anaérobies facultatifs. Ils tolèrent l'oxygène mais l'eau oxygénée apparue lors du métabolisme respiratoire leur est nuisible. Car, contrairement aux staphylocoques, ils sont dépourvus de catalase. L'adjonction de sang dans le milieu est donc utile à cause de l'action catalasique de l'hémoglobine. Sur gélose au sang, les colonies sont petites et entourées d'une zone d'hémolyse franche et complète (c'est une  $\beta$ -hémolyse). En milieu liquide la culture prend dans le bouillon l'aspect de "mie de pain". La température optimale de croissance se situe entre 35°C et 37°C. Le pH qui doit être voisin de 7,2 impose d'utiliser des milieux tamponnés (DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.1.1.3 Paroi**

Les structures de la paroi comprennent de l'intérieure à l'extérieure:

1- la couche de peptidoglycane,

2- le polysaccharide C qui détermine le groupe A de LANCEFIELD, est situé entre la couche de peptidoglycane et la couche protéique externe,

3- la couche protéique externe est composée de:

- la protéine M est un antigène qui différencie les sérotypes, elle est le facteur principal de virulence et les anticorps qu'elle suscite sont immunisants et protecteurs;
- la protéine T également antigénique est utilisée avec la protéine M comme marqueur dans les études épidémiologiques;
- la protéine R n'est pas impliquée dans la virulence ou l'immunité (DECOSTER, 2003).

#### **1-2.2.1.1.4 Antigènes diffusibles**

Parmi les nombreuses substances antigéniques diffusibles, certaines ont une importance bactériologique et pathogénique.

- La streptolysine O (O pour oxygène-labile) lyse la membrane des érythrocytes et d'autres cellules (leucocytes et plaquettes) en se liant au cholestérol. Une faible concentration de cholestérol dans le milieu inhibe son action. La streptolysine O est antigénique et suscite la formation d'anticorps dénommés anti-streptolysines O (ASLO) dont l'élévation des titres sériques constitue un bon marqueur d'infection streptococcique (DECOSTER, 2003).
- La streptolysine S insensible à l'oxygène est produite par de nombreux streptocoques des groupes A, C, G mais aussi E, H et L. Elle n'est pas antigénique (DECOSTER, 2003).
- La hyaluronidase a un effet lytique sur la substance de base du tissu conjonctif et se comporte de ce fait, comme un facteur favorisant la diffusion de l'infection (DECOSTER, 2003).
- La streptokinase active la transformation du plasminogène en plasmine qui lyse la fibrine et s'oppose ainsi à la formation de barrières fibrineuses autour des lésions tissulaires où se développent des streptocoques. C'est également un facteur de diffusion comme l'hyaluronidase (DECOSTER, 2003).
- La streptodornase ou DNase dégrade les acides nucléiques. Elle n'a pas d'effet cytotoxique car elle ne pénètre pas dans les cellules eucaryotes.

Comme la Streptolysine O, streptokinase, streptodornase et hyaluronidase sont antigéniques et les anticorps correspondants dénommés anti-streptokinase (ou ASK), anti-streptodornase (ou ASD) et anti-hyaluronidase sont, comme les ASLO, des marqueurs d'infection à streptocoque A (DECOSTER, 2003).

- Les toxines érythro-gènes (TE) ou pyrogènes au nombre de quatre: A, B, C, D, provoquent une éruption érythémateuse et de la fièvre. Antigéniques, elles induisent un état d'hypersensibilité retardée ainsi que la production d'anticorps neutralisants. Elles sont la cause de l'éruption de la scarlatine par effet direct ou par effet secondaire en déclenchant une réaction d'hypersensibilité retardée. Elles sont en cause dans le choc toxique streptococcique. Comme la toxine staphylococcique, elle se comporte comme un superantigène pouvant entraîner l'activation non spécifique des lymphocytes T. L'injection sous-épidermique de toxine érythro-gène provoque une zone d'éruption chez les sujets réceptifs non immunisés, c'est l'épreuve de DICK (DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.1.2 Habitat-pouvoir pathogène chez l'homme**

Les streptocoques hémolytiques du groupe A sont la principale cause d'infections à streptocoques chez l'homme mais on peut en trouver dans la gorge des sujets bien portants (DECOSTER, 2003).

Les streptococcies aiguës sont bénignes ou sévères mais sont susceptibles d'occasionner des affections non suppuratives redoutables à pathogénie auto-immune regroupées sous l'appellation de syndromes post-streptococciques (DECOSTER, 2003).

- Infections de la sphère rhino-pharyngée;
- Les angines à streptocoques sont fréquentes chez l'enfant avec prédilection entre 5 et 10 ans. Ce sont des angines érythémateuses à surveiller et à traiter;
- La scarlatine est une maladie éruptive et immunisante provoquée par des souches productrices de toxine érythro-gène;

- Érysipèle caractérisé par un placard cutané rouge et oedématié à contour nettement délimité survenant chez les nourrissons ou les personnes âgées;
- Impétigo streptococcique fréquent chez l'enfant, surtout dans le tiers-monde;
- Infections et suppurations cutanées telles que cellulites ou surinfections cutanées sur plaies ou brûlures (DECOSTER, 2003);
- Gangrène sous-cutanée streptococcique ou fasciite nécrosante ou syndrome de MELENEY donnant lieu à une infection extensive avec nécrose atteignant le tissu cellulaire sous-cutané (bactéries “mangeuses de chair”) avec une mortalité de 50% (SENET *et al.*, 2001; DECOSTER, 2003).
- Les autres infections locales ou générales:
  - ✓ surinfections d'atteintes broncho-pulmonaires d'origine virale;
  - ✓ endométrites streptococciques survenant après un accouchement ou un avortement septiques. Avant l'ère des antibiotiques et de l'asepsie, elles se compliquaient souvent de la redoutable fièvre puerpérale, septicémie qui représentait la principale cause de mortalité de la jeune femme;
  - ✓ infections profondes rares mais graves: endocardites, pneumopathies, arthrites, méningites, péritonites avec souvent bactériémies;
  - ✓ choc toxique streptococcique associant fièvre, hypotension et éruption avec atteintes viscérales (rénales, respiratoires) souvent dû à un streptocoque de sérotype M1 et provoqué par la libération de toxines érythrogènes (DECOSTER, 2003).

➤ Les syndromes post-streptococciques:

- ✓ le rhumatisme articulaire aigu (RAA) avec atteinte articulaire, cutanée et surtout cardiaque: endocardite, myocardite, péricardite et risque de redoutables séquelles valvulaires. Elle survient quelques semaines après une infection aiguë streptococcique. Les crises de RAA peuvent récidiver après chaque réinfection à streptocoques A d'un autre type;
- ✓ la chorée de SYDENHAM (danse de Saint Guy) caractérisée par des mouvements désordonnés, parfois associée à des atteintes rhumatismale et cardiaque. Elle guérit en 2 à 4 mois mais peut laisser persister des séquelles cardiaques;
- ✓ la glomérulonéphrite aiguë post-streptococcique, de pronostic souvent favorable. Elle évolue parfois d'une façon subaiguë et peut être la cause d'insuffisance rénale chronique.
- ✓ l'érythème noueux et le purpura rhumatoïde peuvent relever d'une étiologie streptococcique (DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.1.3 Epidémiologie**

L'étude antigénique des protéines de surface M et T permet de distinguer plus de 80 sérotypes. On a récemment défini 10 biotypes et établi certaines corrélatons entre biotypes et pouvoir pathogène. Sérotypes et biotypes sont des marqueurs épidémiologiques (DECOSTER, 2003).

La transmission est directe d'Homme à Homme car la bactérie très fragile survit peu dans le milieu extérieur. Une immunité protectrice se développe pour chaque type de protéine M. Il y a 80 types dans le groupe A. Ce qui explique le caractère récidivant des crises de rhumatisme articulaire aigu qui peuvent être dues à n'importe quel streptocoque A. Au contraire, la glomérulonéphrite qui n'est due qu'au seul sérotype M12 ne récidive pas (DECOSTER, 2003).

#### **1-2.2.1.4 Diagnostic des infections à streptocoques A**

Le diagnostic biologique des infections à streptocoques A repose sur la mise en évidence de la bactérie dans les lésions ou sur la détection d'anticorps anti-streptococciques dans le sérum (DECOSTER, 2003).

##### ➤ L'examen bactériologique

Les prélèvements de gorge, de sérosité, de pus ou de sécrétions doivent être rapidementensemencés car le germe est fragile dans le milieu extérieur. A l'examen microscopique du prélèvement, on voit de nombreux cocci en chaînettes à Gram positif. La culture nécessite un milieu au sang frais. Les colonies, petites apparaissent en 24 heures et sont entourées d'une zone d'hémolyse franche et complète ( $\beta$ -hémolyse) très évocatrice. L'absence de catalase et d'oxydase confirme le genre *Streptococcus* et l'étude antigénique caractérise le groupe A (technique de LANCEFIELD, co-agglutination, agglutination de particules de latex). Les streptocoques du groupe A se distinguent parmi les streptocoques  $\beta$ -hémolytiques par leur sensibilité à la bacitracine. On peut recourir à des méthodes de diagnostic rapide pratiquées sur un prélèvement obtenu par écouvillonnage pharyngé mettant en oeuvre des techniques d'immuno-fluorescence directe ou ELISA (DECOSTER, 2003).

## ➤ Sérologie

Les anticorps anti-streptococciques utiles au diagnostic sont les anticorps anti-enzymes: anti-streptolysine O (ASLO), anti-streptodornase (ASD), anti-streptokinase (ASK) ou anti-hyaluronidase. Tout le monde ou presque est porteur d'anticorps ASLO à des titres faibles aussi ne considère-t-on comme significatifs que les titres supérieurs à 200 Unités. Le taux des ASLO s'élève dix jours après la survenue de l'infection mais peut rester normal dans 20 à 30% d'infections streptococciques authentiques et n'est guère modifié au cours des atteintes cutanées. En outre, la réaction risque d'être faussement négative si le sérum est ictérique ou s'il est riche en lipides ou cholestérol. Les infections à streptocoques C et G s'accompagnent également d'une élévation des ASLO. Le titrage des ASLO n'est donc ni sensible ni spécifique et seule, la constatation de titres élevés ou d'une ascension des taux en quelques jours a une signification clinique (DECOSTER, 2003).

Les anti-streptodornases sont plus spécifiques et plus sensibles (DECOSTER, 2003).

Il existe des tests globaux détectant en une seule manipulation, tous les anticorps anti-streptococciques (DECOSTER, 2003).

La sérologie anti-streptococcique est utile pour confirmer l'étiologie streptococcique de manifestations cliniques évoquant un syndrome post-streptococcique (DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.1.5 Sensibilité aux antibiotiques**

Les streptocoques A sont sensibles à la pénicilline qui est l'antibiotique de choix pour le traitement et la prophylaxie des infections à streptocoques A. En cas d'allergie à la pénicilline, on a recours aux macrolides (DECOSTER, 2003).

Comme tous les streptocoques, les streptocoques A résistent aux aminosides. Vingt pour cent environ des souches isolées sont résistantes aux cyclines. Les autres antibiotiques sont actifs mais leur emploi n'est guère utile (DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.2 Streptocoques bêta-hémolytiques C, G ou L**

Les streptocoques des groupes C, G et L constituent le sous-ensemble 3 de l'ensemble des pyogènes. Ils sont d'origine humaine ou animale (DECOSTER, 2003).

Chez l'homme, ils se comportent comme commensaux mais sont parfois responsables d'infections aiguës de la peau, de la gorge et des voies respiratoires, d'endocardites ou d'infections néonatales. Ces infections sont rares mais assez sévères car elles s'accompagnent souvent de bactériémies et de suppurations métastatiques profondes. La seule complication post-streptococcique à redouter est la glomérulonéphrite (BOUVET, 1992; VANDENESCH, 1993; DECOSTER, 2003).

Ces streptocoques forment sur gélose au sang, de petites colonies entourées d'une zone de  $\beta$ -hémolyse et leur culture, contrairement à celle des streptocoques A n'est pas inhibée par la bacitracine. Ils sont sensibles à la plupart des antibiotiques, aux pénicillines en particulier (DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.3 Streptocoques du groupe B**

Les streptocoques du groupe B ou *Streptococcus agalactiae* sont responsables de mammite chez les bovidés. Chez l'Homme, ce sont des commensaux des voies génitales et de l'intestin (à l'origine de la contamination vaginale) éventuellement responsables d'infections néonatales sévères (septicémies, méningites) (DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.3.1 Caractères bactériologiques et antigéniques**

Ce sont des streptocoques  $\beta$ -hémolytiques mais la zone d'hémolyse est souvent étroite. Ils élaborent un certain nombre de produits parmi lesquels le facteur CAMP (initiales du nom des auteurs qui ont décrit le test en 1944 : Christie, Atkins et Munch-Peterson) qui est une protéine diffusible qui, agissant en synergie avec l'hémolysine  $\beta$  du staphylocoque provoque l'hémolyse des hématies de mouton (DECOSTER, 2003).

Les autres facteurs notables sont des enzymes: desoxyribonucléase qui est antigénique, sialidase qui est un facteur de virulence, hyaluronidase, protéase et hippuricase (DECOSTER, 2003).

Un antigène capsulaire définit 7 sérotypes (Ia, Ib, Ic, II, III, IV et V) (DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.3.2 Habitat et pouvoir pathogène humain**

Ce sont des hôtes normaux du tube digestif, des voies respiratoires supérieures et des voies génitales féminines. Ils sont responsables d'infections graves du nouveau-né qui donnent lieu à des tableaux cliniques variables. La forme précoce survient dans les cinq premiers jours de vie et souvent dès la naissance et se manifeste par un syndrome infectieux généralisé toujours sévère et parfois mortel. L'autre forme, tardive atteint les nouveau-nés d'une semaine à trois mois de vie qui font alors une méningite avec ou sans septicémie (DECOSTER, 2003).

Chez l'accouché, dans la période du post partum, plus fréquemment si l'enfant est atteint, les streptocoques B sont responsables de bactériémies avec endométrite ou suppuration de la plaie de césarienne (DECOSTER, 2003).

On observe, chez les sujets immuno-déprimés ou atteints d'affections fragilisantes des infections opportunistes (pneumopathies, arthrites, méningites, cellulites, endocardites) dans lesquelles le streptocoque B est en cause (DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.3.3 Diagnostic bactériologique**

On isole la bactérie sur gélose au sang et on l'identifie en mettant en évidence l'antigène B caractéristique du groupe. La mise en évidence du facteur CAMP (le "CAMP test") constitue un bon test d'orientation mais n'est pas absolument spécifique (DECOSTER, 2003).

Quand il s'agit d'une infection néonatale, les prélèvements proviennent du nouveau-né (sang, LCR, liquide gastrique, urines, méconium, lésions cutanées) ou de sa mère (lochies, sang, urines, sécrétions vaginales), du placenta ou du liquide amniotique (DECOSTER, 2003).

On peut aussi détecter directement l'antigène de groupe dans les humeurs (sérum, urines, liquide céphalo-rachidien) à l'aide d'anti-sérum spécifique ou de particules de latex sensibilisées (DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.3.4 Sensibilité aux antibiotiques**

Les streptocoques B sont moins sensibles aux pénicillines que les streptocoques A. Des souches résistantes aux cyclines sont fréquemment isolées. Les autres antibiotiques (chloramphénicol, macrolides, cotrimoxazole) sont généralement actifs (DECOSTER, 2003).

Le traitement recommandé des infections néonatales est une association pénicilline-aminoside (gentamicine). En cas d'atteinte méningée, on remplace la pénicilline par l'ampicilline.

Il faut bien entendu s'assurer que la souche n'oppose pas une possible mais rare résistance “de haut niveau” aux aminosides en testant des disques fortement chargés en antibiotiques (DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.3.5 Prophylaxie**

On préconise une antibio-prophylaxie par pénicilline ou ampicilline au cours de l'accouchement en cas de rupture prématurée des membranes ou quand on a la notion d'un portage maternel (DECOSTER, 2003).

Un vaccin polyvalent utilisant les polysides capsulaires est à l'étude (DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.4 Streptocoques du groupe D**

Ce groupe est caractérisé par la présence de l'antigène de groupe D qui n'est pas un polyside mais qui est constitué par l'acide teichoïque de la paroi. Cet antigène D est également présent chez les entérocoques mais des études génétiques ont conduit à séparer le genre *Enterococcus* des streptocoques. Dans le groupe D des streptocoques, il reste *S. bovis*, *S. equinus* et *S. alactolyticus* qui sont des commensaux du tube digestif de l'Homme et des animaux. Le germe *S. bovis* est l'espèce la plus fréquemment isolée chez l'Homme, elle est responsable d'infections localisées, de septicémies et d'endocardites (DECOSTER, 2003).

#### **1-2.2.4.1 Caractères cultureux**

Les streptocoques du groupe D cultivent sur des milieux ordinaires et même en présence de substances inhibitrices comme la bile. Leur croissance est encore possible à 45°C mais contrairement aux entérocoques, ils ne se développent pas en milieu hypersalé (DECOSTER, 2003).

En milieu liquide, ils produisent un trouble homogène du bouillon (DECOSTER, 2003).

Sur gélose du sang, ils cultivent facilement en donnant de petites colonies, le plus souvent non hémolytiques mais parfois entourées d'une zone d'hémolyse  $\alpha$  ou  $\beta$  (DECOSTER, 2003).

#### **1-2.2.4.2 Caractères biochimiques**

Les streptocoques du groupe D sont comme tous les streptocoques dépourvus de catalase. Ils hydrolysent l'esculine (un glycoside extrait du marron d'Inde). Un milieu sélectif contenant bile et esculine permet un dépistage rapide. D'autres caractères biochimiques sont utiles pour distinguer les différentes espèces (résistance au tellurite, fermentation du mannitol, du raffinose, du sorbitol ...) (DECOSTER, 2003).

#### **1-2.2.4.3 Caractères antigéniques**

L'antigène D mis en évidence par la technique de LANCEFIELD par précipitation ou par co-agglutination, caractérise le groupe (DECOSTER, 2003).

#### **1-2.2.4.4 Sensibilité aux antibiotiques**

Les streptocoques du groupe D sont plus accessibles que les entérocoques aux antibiotiques mais des résistances acquises pouvant être observées, un antibiogramme est nécessaire pour les détecter. Les infections bénignes répondent bien aux bêtalactamines mais les infections sévères nécessitent une association bêtalactamine-aminoside (DECOSTER, 2003).

#### **1-2.2.5 Entérocoques**

Le genre *Enterococcus* comprend plus de quinze espèces. Les plus fréquemment isolées en pathologie humaine sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* (DECOSTER, 2003).

##### **1-2.2.5.1 Caractères bactériologiques**

Les entérocoques comme les streptocoques D possèdent l'antigène D et hydrolysent l'esculine. La principale différence phénotypique entre les deux genres est que, contrairement aux streptocoques, les entérocoques se développent dans un milieu hypersalé (6,5 % de NaCl) (DECOSTER, 2003).

Les caractères qui différencient les entérocoques et les streptocoques D sont résumés ci-dessous (DECOSTER, 2003).

	<i>Enterococcus</i>		<i>Streptococcus</i> (D)		
	<i>faecalis</i>	<i>faecium</i>	<i>durans</i>	<i>bovis</i>	<i>equinus</i>
antigène D	+	+	+	+	+
esculine	+	+	+	+	+
NaCl 6,5 %	+	+	+	-	-
Résistance au Tellurite					
	+	-	-	-	-
mannitol	+	+	-	+	-
raffinose	-	-	-	+	-
sorbitol	+	-	-	-	-
culture à 45°C+	+	+	+	+	+

### **1-2.2.5.2 Habitat-pouvoir pathogène chez l'homme**

Les entérocoques sont des commensaux habituels des flores bucco-pharyngées et intestinales de l'Homme et des animaux.

Ils sont isolés au cours:

- d'infections urinaires,
- d'infections primitives ou de surinfections chez les hospitalisés ou chez les malades atteints de lithiase,
- d'infections cutanées sur plaies, brûlures, ulcères, escarres,
- d'infections génitales et périnéales,
- d'infections biliaires, péritonéales, appendiculaires,

- de suppurations des plaies chirurgicales,
- d'infections dentaires,
- d'otites-sinusites,
- d'endocardites et bactériémies (GOULD *et al.*, 1975; DECOSTER, 2003).

Les entérocoques sont, seuls ou en association, au troisième rang des agents responsables d'infections nosocomiales (JOLY, 1998; SOLIGNAC, 1998; De GHELDRE *et al.*, 2000; DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.5.3 Diagnostic bactériologique**

Il repose uniquement sur la mise en évidence de la bactérie. Les prélèvements sont variés: pus, urines, selles ou sang par hémoculture. On ensemence sur des milieux ordinaires et sélectifs (Bile-Esculine) (DECOSTER, 2003).

L'identification repose sur les caractères cultureux, biochimiques et antigéniques (antigène D) indiqués dans le tableau ci-dessus (DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.5.4 Sensibilité aux antibiotiques**

Les pénicillines M et les céphalosporines de toutes générations sont inactives (DECOSTER, 2003).

La pénicilline G est peu active tout comme les pénicillines A et acyluréidopénicilline (DECOSTER, 2003).

Les glycopeptides sont généralement actifs mais certaines espèces (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*) opposent une résistance naturelle à la vancomycine. Depuis peu, on détecte des souches ayant acquis une résistance soit à la vancomycine et à la teicoplanine (phénotype VanA) soit à la seule vancomycine (phénotype VanB).

Une association glycopeptide-aminoside est efficace si la souche n'oppose pas de résistance aux glycopeptides (JOLY, 1998; SOLIGNAC, 1998; DECOSTER, 2003).

Les aminosides utilisés en monothérapie sont inefficaces (comme sur tous les streptocoques). Cette résistance naturelle est de "bas niveau" mais certaines souches opposent une résistance acquise à de fortes concentrations de ces antibiotiques: c'est une résistance de "haut niveau". On la détecte en testant des disques de streptomycine, de kanamycine et de gentamicine fortement chargés. Les associations pénicilline-aminosides sont efficaces si la résistance aux aminosides est de "bas niveau" (DECOSTER, 2003).

Les tétracyclines, macrolides et chloramphénicol sont peu actifs et les lincosamines totalement inactives (DECOSTER, 2003).

Les quinolones de première génération sont sans effet, les fluoro-quinolones ont un effet modéré (DECOSTER, 2003).

Le cotrimoxazole est inefficace *in vivo* (DECOSTER, 2003).

Au total, le choix des antibiotiques pour traiter les infections graves à entérocoques est limité aux associations bêtalactamines-aminosides ou glycopeptides-aminosides mais l'émergence de souches résistantes à haut niveau aux aminosides ou résistantes aux glycopeptides complique la situation (GUTMANN, 1994; DECOSTER, 2003).

Les infections moins graves telles que les infections urinaires répondent bien à un traitement par la pénicilline, l'ampicilline ou l'amoxicilline (DECOSTER, 2003).

La présence d'entérocoques dans l'intestin est habituelle et ne mérite pas de traitement (DECOSTER, 2003).

Néanmoins, c'est par le contrôle plus efficace de l'utilisation des antibiotiques que l'on peut espérer maîtriser la résistance bactérienne aux antibiotiques (DECOSTER, 2003).

### **1-2.2.6 Streptocoques oraux**

Alpha, non ou rarement bêta hémolytiques, souvent non groupables, ils font partie de la flore bucco-pharyngée normale et certains sont responsables de la formation de la plaque dentaire mais aussi d'endocardites malignes, de pneumopathies ou de suppurations diverses (DECOSTER, 2003).

On les signale aussi comme agents étiologiques d'infections nosocomiales (DECOSTER, 2003).

Les espèces d'importance médicale sont: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis* (DECOSTER, 2003).

Les streptocoques oraux sont généralement sensibles aux pénicillines mais pour eux aussi, un antibiogramme comprenant la détection d'un haut niveau de résistance aux aminosides est nécessaire. Les règles de traitement sont les mêmes que celles concernant les entérocoques (DECOSTER, 2003).

Ce phénomène de résistance étant en constance progression et en perpétuelle adaptation, certains chercheurs ou équipes de recherche évaluent en ce moment de nouvelles familles de molécules, en particulier vis à vis des bactéries résistantes aux antibiotiques conventionnels.

Entre autres:

- de nombreux fluoro-quinolones (MULLER, 1998; 2000) et leur dérivé tel que trovafloxacin (COQUE *et al.*, 1996);
- le linézolide (BAIN *et al.*, 2001; KASSIS *et al.*, 2002; RAFFI, 2002).

## **2- Généralités sur quelques pathologies dues aux cocci Gram positif**

### **2-1 Flore cutanée normale**

La peau normale est colonisée par une flore bactérienne qui occupe les couches superficielles de l'épiderme et les annexes pilaires. Ce portage bactérien est plus marqué dans certaines régions cutanées (plis, périnée, mains) ou muqueuses (fosses nasales) (RICHARD *et al.*, 2005).

Dans cette flore bactérienne, il y a une flore résidente ou permanente et une flore transitoire ou contaminante.

La flore résidente comporte :

- ✓ les cocci Gram positif tels que *Staphylococcus epidermidis*, mais aussi *Staphylococcus aureus*, les streptocoques et les microcoques ;
- ✓ les bacilles Gram positif tels que les corynébactéries aérobies ou anaérobies (*Propionibacterium acnes*) et lipophiles ;
- ✓ les bactéries Gram négatif telles que les cocci (*Neisseria*) et bacilles (*Acinetobacter*, *Proteus...*) (RICHARD *et al.*, 2005).

La flore transitoire résulte quant à elle, d'une contamination externe ou de contiguïté à partir d'un portage muqueux. Le staphylocoque doré (ou *S. aureus*) est le contaminant le plus fréquent (RICHARD *et al.*, 2005).

La flore bactérienne normale varie en fonction :

- ✓ de la qualité de l'épiderme (toute maladie affectant l'épiderme et en particulier toute effraction est habituellement contaminée);
- ✓ de l'interaction des germes;
- ✓ de facteurs environnementaux (chaleur et humidité favorisant la contamination);
- ✓ de l'hôte (déficit immunitaire, diabète...);

✓ de l'utilisation des savons et antiseptiques (RICHARD *et al.*, 2005).

Une faible proportion de la population normale est porteuse de façon prolongée de staphylocoque doré sur des "gîtes" cutanés ou muqueux (région périnéale et fosses nasales). Ce portage chronique est un facteur de risque d'infections cutanées récidivantes symptomatiques. Il est particulièrement fréquent chez les diabétiques, les hémodialysés, les patients atteints de dermatite atopique. Chez les patients qui sont hospitalisés de façon répétée, le portage nasal peut être celui d'un *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) (RICHARD *et al.*, 2005).

## **2-2 Quelques infections cutanéomuqueuses**

### **2-2.1 Impétigo**

C'est une infection cutanée superficielle (sous la couche cornée de l'épiderme) à streptocoque  $\beta$ -hémolytique du groupe A et/ou à staphylocoque doré. Il est auto-inoculable et non immunisant, atteint surtout l'enfant. Il est contagieux avec de petites épidémies familiales ou de collectivités qui justifient l'éviction scolaire. Chez l'adulte, il témoigne presque toujours de lésions cutanées préexistantes, en particulier d'une ectoparasitose (impétigo secondaire) (RICHARD *et al.*, 2005; DECOSTER, 2003; TOURE, 2005).

Son diagnostic repose sur la clinique. Le prélèvement bactériologique met en évidence un streptocoque le plus souvent du groupe A et/ou un staphylocoque doré. Ce prélèvement n'est indispensable que si l'on redoute la présence de SARM (hospitalisation récente du patient ou d'un proche) ou si l'on craint une épidémie (collectivités) (RICHARD *et al.*, 2005; DECOSTER, 2003)

La forme habituelle de l'impétigo de l'enfant est une bulle superficielle, sous-cornée, flasque. Elle est généralement très fragile, rarement visible et évolue rapidement vers une érosion recouverte de croûtes jaunâtres (« mélicériques », c'est-à-dire couleur de miel) à extension centrifuge. Au début souvent péri-orificiel, les lésions se diffusent sur le visage et les membres supérieurs en raison du portage manuel. En l'absence de complication, il n'existe pas de signes généraux (en particulier pas de fièvre) (RICHARD *et al.*, 2005; DECOSTER, 2003; TOURE, 2005).

L'impétigo bulleux est quant à lui, une forme caractéristique du nouveau-né. Il est plus dû aux staphylocoques. Les bulles sont parfois de grandes tailles, pouvant être entourées d'un érythème diffus (RICHARD *et al.*, 2005).

Au stade d'extrême gravité, c'est le syndrome d'épidermolyse staphylococcique (ou SSSS pour *staphylococcal scalded skin syndrome*, syndrome staphylococcique des ébouillantés). Il se caractérise par:

- ✓ un érythème diffus et décollement épidermique superficiel qui débutent autour d'un foyer infectieux parfois minime (nasal, ombilical ou périnéal) et s'étendent rapidement dans un tableau fébrile qui peut se compliquer de déshydratation ;
- ✓ un signe de Nikolsky positif ;
- ✓ un examen histologique extemporané d'un fragment d'épiderme décollé montrant qu'il est constitué par la seule couche cornée ; cela est caractéristique du clivage induit par une toxine exfoliante staphylococcique (exfoliatine) et permet d'écarter le diagnostic de nécrolyse épidermique toxique (syndrome de Lyell) où l'épiderme est nécrosé sur toute sa hauteur ;

- ✓ une forme clinique : la scarlatine staphylococcique prédomine dans les plis et ne s'accompagne pas de bulles. Elle évolue vers la desquamation en 10 à 20 jours (RICHARD *et al.*, 2005; DECOSTER, 2003).

L'ecthyma est une forme creusante d'impétigo, habituellement localisée aux membres inférieurs. Il est plus volontiers observé sur terrain immuno-déprimé et est dû à *Streptococcus pyogenes* (RICHARD *et al.*, 2005).

L'impétiginisation est une apparition sur une dermatose prurigineuse de pustules ou de croûtes mélicériques. Elle doit donc être différenciée de la simple colonisation bactérienne (RICHARD *et al.*, 2005).

L'évolution est rapidement favorable. Très rarement, un impétigo peut être la porte d'entrée d'une infection générale sévère à streptocoque ou à staphylocoque. Le risque potentiel de glomérulonéphrite post-streptococcique conduit à contrôler la protéinurie 3 semaines après l'épisode infectieux. Ce risque est en fait exceptionnel (RICHARD *et al.*, 2005).

Pour le traitement de l'impétigo, il y a 2 possibilités:

- ✓ un traitement local,
- ✓ un traitement général à l'antibiotique.

Le traitement local peut suffire pour des formes peu étendues. Dans ce cas il faut faire:

- ✓ un lavage biquotidien à l'eau et au savon ;
- ✓ utiliser des antiseptiques tels que le chlorhexidine ou des antibiotiques topiques tels que l'acide fusidique en application uni- ou biquotidienne. Il est aussi préférable d'utiliser des pommades grasses pour ramollir et faire tomber les croûtes

(RICHARD *et al.*, 2005).

Le traitement général à l'antibiotique est souvent prescrit. Il est nécessaire si les lésions sont étendues ou si l'on n'est pas certain de la qualité des soins locaux. Dans ce cas, il est conseillé d'utiliser:

- ✓ les pénicillines M tels que l'oxacilline, le cloxacilline (30 à 50 mg/kg/j);
- ✓ le synergistine tel que le pristinamycine (30 à 50 mg/kg/j);
- ✓ l'acide fusidique (1 à 1,5 g/j chez l'adulte; 30 à 50 mg/kg/j chez l'enfant).

La durée du traitement est de 10 jours (*RICHARD et al., 2005*).

A ces traitements, il faut adjoindre les mesures complémentaires suivantes:

- ✓ l'éviction scolaire de quelques jours;
- ✓ le traitement de la fratrie;
- ✓ le prélèvement et le traitement des gîtes pour l'enfant et toute la famille en cas de récurrence;
- ✓ le port de sous-vêtements propres ; ongles coupés courts (*RICHARD et al., 2005*).

## **2-2.2 Furoncle**

C'est une infection profonde du follicule pilo-sébacé due au staphylocoque doré qui évolue en 5 à 10 jours vers la nécrose et l'élimination du follicule pileux (bourbillon). Il est favorisé par le portage manuel à partir des gîtes staphylococciques. La prévalence est augmentée en cas de diabète, d'immuno-suppression, d'atopie, de carence martiale (*RICHARD et al., 2005; DECOSTER, 2003*).

Son diagnostic est avant tout clinique. La mise en évidence de staphylocoque doré est moins importante au niveau du furoncle (pour écarter d'autres germes) que dans les gîtes pour convaincre le patient de l'importance de traiter ces gîtes en cas de furonculose (*RICHARD et al., 2005*).

L'inflammation, centrée sur un follicule pilo-sébacé, crée initialement une induration douloureuse qui évolue en quelques jours vers la nécrose. Le bourbillon s'élimine, laissant un cratère rouge. Unique ou multiple, le furoncle prédomine au dos, épaules, cuisses ou fesses. Il est impératif d'éviter l'irritation ou la manipulation en raison du risque d'extension (*RICHARD et al.*, 2005; *DECOSTER*, 2003).

L'anthrax est un agglomérat de furoncles, réalisant un placard inflammatoire hyperalgique parsemé de pustules. Il peut s'accompagner de fusées purulentes sous-jacentes, de fièvre et d'adénopathies régionales. Son siège électif est le cou ou le haut du dos (*RICHARD et al.*, 2005; *DECOSTER*, 2003).

La furunculose est la répétition d'épisodes de furoncles, avec passage à la chronicité sur des périodes de plusieurs mois. Elle doit faire rechercher un facteur favorisant (obésité, frottement, hypersudation, défaut d'hygiène) et un (des) foyer(s) staphylococcique(s) (narinaire surtout mais aussi rétro-auriculaire, interfessier et cicatrices d'anciens furoncles) (*RICHARD et al.*, 2005; *DECOSTER*, 2003).

L'on doit différencier les furoncles de:

- ✓ Folliculites superficielles: papulo-pustules centrées par un poil (prenant le nom de sycosis pour l'atteinte de la barbe). Il s'agit le plus souvent d'infection à staphylocoque doré, mais d'autres organismes peuvent être en cause (levures, bactéries à Gram-) (*RICHARD et al.*, 2005; *DECOSTER*, 2003).
- ✓ Maladie de Verneuil: syndrome suppuratif chronique, inflammatoire essentiellement ano-périnéal, d'origine folliculaire (*RICHARD et al.*, 2005).
- ✓ Myiase: impasse cutanée parasitaire après un séjour tropical (larves de mouches tropicales) (*RICHARD et al.*, 2005).

- ✓ Acné: la confusion est fréquente, bien que l'acné se distingue des furoncles par son polymorphisme lésionnel (comédons, kystes, papulopustules)

(*RICHARD et al.*, 2005).

Le passage du furoncle à la chronicité (ou furonculose chronique) est la complication la plus fréquente. Les septicémies et autres complications viscérales à staphylocoque doré restent très rares. La staphylococcie maligne du visage avec thrombophlébite du sinus caverneux est exceptionnelle. Elle est redoutée en présence d'un furoncle centro-facial manipulé, devenant hyperalgique, accompagné d'un syndrome infectieux sévère avec oedème centro-facial important (*RICHARD et al.*, 2005).

Pour traiter le furoncle isolé, il faut:

- ✓ Pas d'incision; pas d'antibiothérapie systémique.
- ✓ Faire la protection par un pansement; des antiseptiques.
- ✓ Faire le lavage des mains après le pansement, faire une hygiène soignée.
- ✓ Faire la localisation à risque (centro-faciale), anthrax ou furoncles multiples, fièvre ou terrain particulier (diabète, immunodépression): faire une antibiothérapie générale pendant 10 jours (pénicilline M, synergistine, acide fusidique)

(*RICHARD et al.*, 2005).

Dans le cas d'une furonculose, il faut:

- ✓ Des vêtements amples.
- ✓ Une hygiène rigoureuse: une douche quotidienne à la chlorhexidine, le lavage à 90°C du linge.
- ✓ La désinfection du gîte staphylococcique nasaire (à la fucidine), si SAMR (à la mupirocine).
- ✓ Faire une antibiothérapie (10 jours) en cas de lésions centro-faciales ou récidivantes.

- ✓ Faire un traitement local prolongé des gîtes par des antiseptiques ou des antibiotiques.
- ✓ Faire l'évaluation microbiologique familiale (gîtes) et l'antibiogramme dans les formes réfractaires.
- ✓ Un arrêt de travail en cas de profession comportant un contact avec des aliments

(*RICHARD et al.*, 2005).

### **2-2.3 Erysipèle**

C'est une infection cutanée aiguë :

- ✓ streptococcique à streptocoque  $\beta$ -hémolytique surtout du groupe A et plus rarement du groupe G ou C;
- ✓ atteignant le derme et l'hypoderme (dermo-hypodermite bactérienne non nécrosante)

(*RICHARD et al.*, 2005; *DECOSTER*, 2003; *TOURE*, 2005).

La maladie est rare chez l'enfant, mais est observée le plus souvent chez l'adulte après 40 ans (*RICHARD et al.*, 2005).

Malgré les progrès de l'hygiène et le développement de l'antibiothérapie, l'incidence de l'érysipèle semble en augmentation constante en France. L'atteinte des membres inférieurs, sans doute liée au rôle favorisant de l'insuffisance veineuse et/ou lymphatique, a supplanté celle du visage. L'origine streptococcique de l'érysipèle est en pratique difficile à confirmer (*RICHARD et al.*, 2005).

Son diagnostic positif est fondé sur la clinique (*RICHARD et al.*, 2005; *DECOSTER*, 2003).

Dans la forme habituelle de l'adulte, l'érysipèle siège au membre inférieur où il donne un tableau de "grosse jambe rouge aiguë fébrile" unilatérale (*RICHARD et al.*, 2005; *DECOSTER*, 2003).

Le début est brutal, avec une fièvre élevée (39 à 40°C) et des frissons qui précèdent de quelques heures l'apparition du placard cutané inflammatoire: plaque érythémateuse, oedémateuse, douloureuse à la palpation et bien circonscrite. Un bourrelet périphérique bien marqué est rare sur la jambe contrairement à la localisation faciale. Dans certains cas, le placard inflammatoire peut aboutir à des décollements bulleux superficiels, conséquence mécanique de l'oedème dermique. La présence d'adénopathies inflammatoires régionales est fréquente, l'association à une traînée de lymphangite inconstante. Une porte d'entrée est décelable cliniquement dans 50 à 70% des cas: intertrigo interdigito-plantaire, plaie traumatique, ulcère de jambe (RICHARD *et al.*, 2005; DECOSTER, 2003).

Des examens complémentaires suivants sont nécessaires:

- ✓ L'hyperleucocytose généralement importante ( $> 12\ 000/\text{mm}^3$ ) avec polynucléose neutrophile ( $> 7\ 000/\text{mm}^3$ ) (RICHARD *et al.*, 2005).
- ✓ Le syndrome inflammatoire biologique marqué avec protéine C réactive (CRP) précocement élevée; l'association CRP  $> 150\ \text{mg/L}$  + polynucléose neutrophile a une valeur discriminante pour une origine infectieuse (RICHARD *et al.*, 2005).

Les autres examens complémentaires (sérologie, prélèvements bactériologiques) pourraient confirmer, de manière rétrospective et inconstante, l'étiologie streptococcique. Les hémocultures sont peu sensibles, l'attente de leurs résultats ne doit pas retarder la mise en route du traitement antibiotique. Dans les formes typiques, aucun examen bactériologique n'est nécessaire (RICHARD *et al.*, 2005).

Les symptômes de l'érysipèle sont les suivants:

- ✓ Un placard purpurique, ecchymotique ou pétéchial.
- ✓ L'apparition secondaire de pustules ou de petites zones de nécrose superficielle est rare (RICHARD *et al.*, 2005; DECOSTER, 2003).

Sur le visage (5 à 10% des cas), le placard inflammatoire est généralement unilatéral et très oedémateux, avec un bourrelet périphérique marqué. Il concerne plus rarement le membre supérieur, l'abdomen, le thorax (mammectomie) ou la région fessière (*RICHARD et al.*, 2005).

Dans sa forme évolutive, les formes subaiguës sont accompagnées de fièvres et d'hyperleucocytoses modérées, voire même absentes, notamment aux membres inférieurs (*RICHARD et al.*, 2005).

Le diagnostic repose sur les caractères cliniques du placard inflammatoire cutané et sa régression sous antibiothérapie (*RICHARD et al.*, 2005; *DECOSTER*, 2003).

L'on doit différencier chez le jeune enfant l'érysipèle du dermo-hypodermite infectieuse à *Haemophilus influenzae*, fréquemment localisée au visage. Le placard inflammatoire revêt une teinte bleu-violacé. La recherche d'une atteinte ophtalmologique, ORL ou méningée est impérative. Les hémocultures sont positives dans 80% des cas (*RICHARD et al.*, 2005).

Chez l'adulte, l'on doit distinguer au visage l'érysipèle de l'eczéma aigu. Il se caractérise par un oedème, prurit avec absence de fièvre. Le placard est oedémateux autour d'une folliculite staphylococcique traumatisée (*RICHARD et al.*, 2005).

Toujours chez l'adulte, au membre inférieur, il est classique de discuter une phlébite, dont le tableau est en fait différent. L'oedème est douloureux, mal limité, peu ou non érythémateux avec perte du ballotement du mollet, la fièvre est modérée. En cas de doute, un échodoppler veineux doit être réalisé. L'association d'une authentique thrombose veineuse profonde à un érysipèle est exceptionnelle. Les exacerbations aiguës d'une lipodermatosclérose veineuse peuvent prêter à confusion. Les dermohypodermite bactériennes aiguës non streptococciques surviennent habituellement sur un terrain d'immuno-dépression ou après inoculation (maladie du rouget du porc, pasteurellose) (*RICHARD et al.*, 2005).

Le problème majeur est le diagnostic initial d'une forme nécrosante (dermohypodermite ou fasciite nécrosantes). Les signes suivants sont en faveur de ce diagnostic:

- ✓ syndrome septique majeur: fièvre > 39°C persistant sous antibiotiques ou hypothermie, confusion, hypotension artérielle, oligo-anurie;
- ✓ signes locaux: douleur très intense, induration diffuse, taches cyaniques et/ou nécrotiques, crépitation (*RICHARD et al., 2005*).

Ils justifient une exploration chirurgicale qui confirme le diagnostic, précise de l'extension de la nécrose et permet son excision (*RICHARD et al., 2005*).

Lorsque le patient est sous antibiothérapie, la guérison d'un érysipèle est obtenue en une dizaine de jours après une phase de desquamation superficielle (apyrexie en 72 h dans 80% des cas). Cependant, lorsqu'il n'est pas traité, l'érysipèle peut régresser spontanément en 2 à 3 semaines, mais le risque de complications systémiques (septicémie) ou locorégionales est accru (*RICHARD et al., 2005*).

Les complications locales dans 5 à 10% des cas sont:

- ✓ les abcès localisés, le plus souvent superficiels;
- ✓ rares abcès sous-cutanés profonds nécessitant un drainage chirurgical

(*RICHARD et al., 2005*).

Les complications systémiques sont exceptionnelles. La récurrence est la complication la plus fréquente. Elle survient sur un terrain d'insuffisance veineuse ou lymphatique chronique et est souvent associée à l'existence d'une porte d'entrée persistante (ulcère de jambe, intertrigo interdigitoplantaire) (*RICHARD et al., 2005*).

Pour le traitement, une hospitalisation est indispensable en cas de signes généraux marqués, de complications locales, d'une co-morbidité, du contexte social, d'une absence d'amélioration à 72 h ou d'affections associées (*RICHARD et al., 2005*).

Dans ce cas, l'antibiothérapie doit être anti-streptococcique c'est-à-dire utiliser:

- ✓ les  $\beta$ -lactamines tels que:
  - la pénicilline G injectable (traitement de référence) : 10 à 20 millions d'unités (MU)/j en 4 à 6 perfusions;
  - pénicilline V orale (4 à 6 MU/j);
  - pénicilline A : amoxicilline (3 à 4,5 g/j en 3 prises);
- ✓ les synergistines tels que la pristinamycine (3 g/j);
- ✓ la clindamycine : 600 à 1 200 mg/j en 3 à 4 prises (effets indésirables digestifs);
- ✓ les glycopeptides (*RICHARD et al.*, 2005).

A ces traitements, l'on peut adjoindre:

- ✓ un repos strict au lit jusqu'à la régression des signes inflammatoires locaux (érythème, oedème, douleur) (*RICHARD et al.*, 2005).
- ✓ un traitement anticoagulant par héparine calcique ou héparine de faible poids moléculaire à doses préventives en cas de risque de maladie thromboembolique associé (*RICHARD et al.*, 2005).

Les anti-inflammatoires sont déconseillés. Les antalgiques sont indispensables en cas de douleurs (*RICHARD et al.*, 2005).

S'il y a une hospitalisation, il faut utiliser la pénicilline G IV jusqu'à l'apyrexie puis relais *per os* par la pénicilline V (amoxicilline). La durée totale est de 10 à 20 jours.

Si le patient est maintenu au domicile, il faut utiliser l'amoxicilline *per os* avec une surveillance quotidienne (*RICHARD et al.*, 2005).

En cas d'allergie aux  $\beta$ -lactamines, il faut utiliser la pristinamycine (ou la clindamycine) (*RICHARD et al.*, 2005).

Lorsque l'infection est récidivante, il faut:

- ✓ Faire le traitement d'une porte d'entrée persistante (intertrigo à dermatophytes, ulcère de jambe) (RICHARD *et al.*, 2005).
- ✓ Améliorer des troubles circulatoires (bandes à varices, drainage lymphatique manuel) (RICHARD *et al.*, 2005).
- ✓ Faire une hygiène cutanée soignée (RICHARD *et al.*, 2005).

En cas de récurrences multiples, une pénicillinothérapie au long cours (*Extencilline*) 2,4 MU en intramusculaire (IM) toutes les 2 à 3 semaines de façon prolongée (parfois définitive) (RICHARD *et al.*, 2005).

### **3- Evaluations thérapeutiques**

Le traitement des maladies infectieuses par les plantes est une pratique courante en milieu traditionnel. En effet, de nombreuses plantes et recettes sont connues et utilisées par nos populations (en particulier les tradi-thérapeutes) pour guérir un grand nombre de maladies infectieuses (cutanée et systémique). De nombreux auteurs ont travaillé au recensement des plantes médicinales, et de nombreux travaux sur ce sujet ont été publiés (ADJANOHOUN, 1979; ADJANOHOUN *et al.*, 1977, 1979, 1983, 1985, 1986, 1988 et 1993; AKE-ASSI *et al.*, 1985; ASSEMIAN, 1988; ASPERGILLA *et al.*, 1990; GUEDE-GUINA *et al.*, 1991, 1992, 1996, 1996, 1997, 1998, 1998; KRA, 2001).

De tout temps, on a toujours cherché à soulager les maux de l'Homme et des animaux par des médicaments. Et, l'usage des plantes dans les soins médicaux est une pratique courante dans beaucoup de cultures des peuples, faisant parfois l'objet de pratiques millénaires (KRA, 2001).

En Europe, la connaissance des vertus curatives de certaines plantes ou de certains minéraux était déjà inscrite dès l'antiquité dans les traités de botanique (HEINZ *et al.*, 1998; KRA, 2001). En Afrique, le savoir thérapeutique a toujours été un ensemble de connaissances ancestrales transmises exclusivement par la tradition. De plus, l'héritage colonial en apportant aux Africains la médecine moderne a aussi contribué du même coup, à faire naître une position ethno-sociologique telle que les populations ont souvent recours à une médecine mixte. En fait, dans les contextes socio-économiques difficiles de notre sous-région, les populations ont recours aux médicaments traditionnels pour se soigner et cela pour des raisons culturelles et objectives diverses (KRA, 2001). En Côte d'Ivoire, une bonne partie de la population n'échappe pas à ce principe; elle se soigne avec les "drogues" du guérisseur (GUEDE-GUINA, 1975; POUSSET *et al.*, 1994; KRA, 2001).

Cet important usage empirique comporte des risques réels et sérieux pour les populations car il s'agit le plus souvent de recettes médicamenteuses à base de produits naturels (plantes ou animaux) pouvant renfermer des substances exerçant une action curative efficace; mais aussi, ces produits peuvent contenir des composés à effets nocifs très prononcés, voire toxiques (KRA, 2001).

En outre, la plupart des travaux consacrés aux plantes médicinales africaines ont privilégié l'inventaire des plantes et des recettes, mais très peu d'informations sur les propriétés biochimiques, pharmacologiques et toxicologiques sont connues. Pour toutes ces raisons, la valorisation scientifique de la pharmacopée traditionnelle est de plus en plus indispensable. L'intérêt d'une telle valorisation se situe à plusieurs niveaux:

- la découverte de nouveaux principes actifs bien identifiés aux propriétés pharmacodynamiques et pharmaco-cinétiques bien cernées,
- la possibilité de donner une dose précise et renouvelable du nouveau produit,

➤ la possibilité de synthétiser chimiquement ces molécules et leurs dérivées pharmacologiquement actives afin de s'affranchir de l'épuisement des ressources naturelles (KRA, 2001).

En somme, il s'agit de faire sortir les recettes du domaine empirique, de la sphère magique et surnaturelle pour une mise en pratique scientifique. Cela concourra à n'en point douter à la mise en valeur de notre patrimoine naturel et à la découverte de nouvelles séries de molécules pour le bien être des populations (KRA, 2001).

Selon Thierry SEVENET, “c'est en faisant l'inventaire intelligent des substances synthétisées par les plantes qu'on aura le plus de chances de découvrir de nouvelles séries de médicaments.

La flore qui existe depuis plus de cent vingt millions d'années peut encore nous révéler quantités de principes actifs utilisables. Elle l'a souvent prouvé” (ANONYME, 1994; KRA, 2001). Et il faut noter que de nombreux médicaments des temps modernes sont préparés à base de molécules extraites à l'origine de substances naturelles. Nous citerons entre autres:

➤ la morphine est utilisée médicalement comme antalgique. C'est en 1803 que SERTÜNER réussit son extraction à partir de l'opium *Papaver somniferum* (Papaveraceae). Très rapidement, elle entre dans l'usage hospitalier. Malheureusement, vers 1850, la crainte d'induire des toxicomanies va l'emporter sur l'intérêt médical. De nos jours, elle est prescrite en cancérologie et dans bien d'autres domaines pour lutter contre les douleurs rebelles aux traitements (KRA, 2001);

- la quinine utilisée dans les accès palustres a été extraite en 1820 comme alcaloïde des écorces de *Cinchona sp* (Rubiaceae) par Pierre PELLETIER et Joseph CAVENTOU. Les origines de l'utilisation des décoctions de cette plante comme anti-paludique remontent au XVII<sup>e</sup> siècle, sous le règne de la comtesse CINCHONA, vice reine du Pérou (BOWMAN *et al.*, 1980; ANONYME, 1994; KRA, 2001);
- l'atropine fut isolée à partir d'*Atropa belladonna* Linn. (Solanaceae), au début du XIX<sup>e</sup> siècle (1831). Elle donna naissance à une grande famille de médicaments de synthèse, aux propriétés variées (dilatateurs pupillaires, broncho-dilatateurs, anti-spasmodiques, intestinaux ou accélérateurs du rythme cardiaque). La belladone est une grande herbe d'Europe et d'Asie, c'est une plante vénéneuse. En fait, toutes les parties de cette plante sont dangereuses et l'ingestion de quelques unes de ses baies suffit à donner la mort (BOWMAN, 1980; ANONYME, 1994; KRA, 2001);
- LASCHTSCHENKO (1909) a montré que le lysozyme est une enzyme du blanc d'œuf qui possède des propriétés antibiotiques (BABIN, 1972);
- la pénicilline, un antibiotique très utilisé fut extraite en 1932 par ALEXANDER FLEMING d'un champignon microscopique le *Penicillium notatum* (Aspergillaceae) (BOWMAN *et al.*, 1980; KRA, 2001);
- la tubocurarine (alcaloïde curare) utilisée par les anesthésistes dès 1942 comme relaxant musculaire a été extraite de *Chondodendron tomentosum* (Menispermaceae) par KING en 1935. Les alcaloïdes curares sont extraits des strychnées du genre *Strychnos* et des *Chondodendron*, des familles de plantes figurant parmi les plus toxiques du règne végétal. Le curare est un poison concocté à l'origine par les indiens d'Amérique du sud. Ils s'en servaient pour chasser et faire la guerre (TERRIEUX, 1952; BOWMAN, 1980; ANONYME, 1994; KRA, 2001);

- la streptomycine a été découverte par WAKSMAN et WOODRUFF dès 1942 à partir de *Actinomyces griseus* (BABIN, 1972);
- la céphalosporine C isolée de *Cephalosporium* en 1954 à Oxford a une structure  $\beta$ -lactamine hexa-atomique (dihydrothiazine). Elle est résistante aux pénicillinases bactériennes et aux amidases (BABIN, 1972);
- comme *Papaver somniferum*, *Taxus baccata* Linn. (Taxaceae) encore appelé "IF" a longtemps eu mauvaise réputation. A partir de son écorce et ses graines, on fabriquait un redoutable poison. Ce n'est que dans les années 1960 grâce au screening lancé par l'Institut Nationale Cancérologie (NCI) américain que l'on découvre que son écorce contient un produit très toxique pour les cellules cancéreuses. Le taxol (un poison fusorial) fut extrait et sa structure publiée en 1971. Aujourd'hui, le taxol et ses dérivés sont utilisés comme anti-tumoraux dans le traitement des cancers de seins (ANONYME, 1994; KRA, 2001);
- la céphalosporine N appelée aussi Synnematine B est extraite de *Cephalosporium acremonium*. Elle est peu sensible aux pénicillinases des bactéries, active sur les germes pénicillino-résistants et contre *Salmonella typhi*. Cette céphalosporine est classée comme pénicilline azotée (BABIN, 1972);
- la ciclosporine fut isolée d'un champignon au début des années 1980 par BOREL. Elle est utilisée comme immuno-suppresseur afin de prévenir les rejets de greffons lors des transplantations d'organes (ANONYME, 1994; KRA, 2001);

➤ les glycosides cardiaques comptent parmi les plus anciennes “drogues” utilisées par l'homme comme médicaments, comme poisons, mais aussi à des fins guerrières. De nos jours, ils sont utilisés médicalement pour accroître la contractilité du cœur, dans les traitements des insuffisances cardiaques. Parmi eux, la Ouabaïne encore appelé Strophantine G est extraite des graines de *S. gratus* Franch. (Apocynaceae) ou de *A. ouabaio* Poiss. (Apocynaceae) (BOWMAN, 1980; KRA, 2001). La mansonine, un autre exemple de ce type de composé est extraite du bois Bété: *Mansonia altissima* (Sterculiaceae) de notre patrimoine naturel (GUEDE-GUINA, 1975, 1989, 1992);

Des travaux réalisés dans d'autres laboratoires à partir des plantes ici et ailleurs ont permis de découvrir d'autres nouvelles molécules végétales actives telles que:

- la fagaronine est un anti-tumoral extrait de *Fagara xanthoxyloides* Lim. (Rutaceae) par COMOË en 1987;
- le G<sub>243</sub> est un cholinergique isolé de *Mareya micrantha* (Euphorbiaceae) par GUEDE-GUINA *et al.* en 1991;
- l'huile de *Clausena anisata* peut être utilisée pour lutter contre les champignons et les bactéries pathogènes de l'homme (MAZURA, 1994);
- MYTA est un anti-paludique extrait de *Mitragyna ciliata* (Mitragynaceae) par DJE *et al.*, en 1997. Selon l'auteur, MYTA inhiberait la croissance *in vitro* du *Plasmodium falciparum* souche FCM 29 chloroquino-résistant;
- les essences de *Ocimum gratissimum* et *O. basilicum* ont des effets sur les bactéries isolées du pus des malades hospitalisés et des champignons de ces mêmes patients (N'DOUNGA *et al.*, 1997);

- MISCA est un anti-cryptococcique qui a été isolé de *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae) par CROCKETT *et al.* en 1991. Les constituants actifs ont été par la suite identifiés par KABORE *et al.* en 1998;
- OLSU est un anti-plasmodial extrait d'*Olax subscorpioides* (Olacaceae) par DJAMAN *et al.* en 1998;
- BGG est un anti-diarrhéique extrait de *Morinda morindoides* (Rubiaceae) par BAHU en 1998;
- les huiles essentielles de *Ocimum gratissimum* et *O. canum* inhibent la croissance de *Aureobasidium pullulans* et *Microsporium gypseum* (AMVAM *et al.*, 1998);
- l'huile essentielle de *O. gratissimum* inhibe la croissance des staphylocoques et *E. coli* (KOUA, 1998);
- l'huile essentielle des aiguilles de *Picea excelsia* a une action bactéricide sur les bactéries Gram positif (CANILLAC *et al.*, 2001);
- ZTCO est un anti-hémorroïdaire isolé de *Landorpha hirsuta* par GUEDE en 2003;
- PYMI est un anti-fongique extrait de *Microglossa pyrifolia* (Asteraceae) par ZIRIHI *et al.* en 2003.

Quoiqu'il en soit, c'est la dose qui sépare le poison du médicament. De plus, selon Théophrate VON HOHEINHEIM (1493-1541), "si vous voulez expliquer de façon précise l'action de chaque poison, il faut alors se demander qu'est ce qui n'est pas poison. Toute substance est un "poison" et aucune n'est inoffensive. C'est simplement la dose qui fait qu'une substance n'est pas toxique" (HEINZ *et al.*, 1998; KRA, 2001).

## **4- Quelques molécules déterminées dans le tri phytochimique**

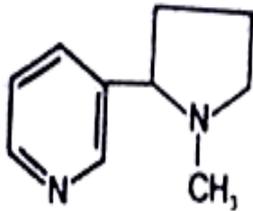
Le tri phytochimique est un ensemble de réactions de caractérisation qui permet l'étude de la composition chimique des plantes. Les méthodes utilisées sont limitées à la détection de quelques groupes de molécules chimiques ayant des réactions générales, suffisamment sensibles pour ne mettre en évidence qu'une faible quantité de drogue, elles n'ont qu'une valeur indicative (MANDA, 1988; KOUAME, 2006).

Les grands groupes chimiques rencontrés le plus souvent chez les végétaux et susceptibles de posséder des activités biologiques sont les alcaloïdes, les saponosides, les flavonoïdes, les polyphénols, les polyterpènes, les stérols etc...(KOUAME, 2006)

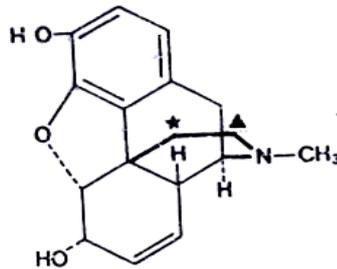
### **4-1 Alcaloïdes**

Le terme alcaloïde vient de l'Arabe *alcaly* qui signifie basique. Les alcaloïdes sont des molécules issues des substances naturelles qui renferment au moins un atome d'azote (à l'exclusion des acides nucléiques et des protéines) et qui ont un caractère basique. Ils sont doués de propriétés physiologiques prononcées à faible dose (GORIS *et al.*, 1949; KOUAME, 2006). On les trouve exclusivement dans les organes végétaux, sous forme de sels solubles ou sous forme de complexes tanniques insolubles (KOUAME, 2006). Leur saveur est généralement amère. Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes grâce à leurs activités pharmacologiques toxiques qui s'exercent dans divers domaines (KOUAME, 2006).

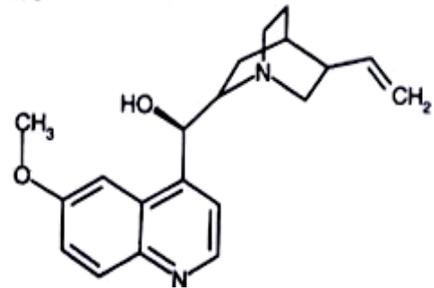
## Exemples d'alcaloïdes



Nicotine



Morphine

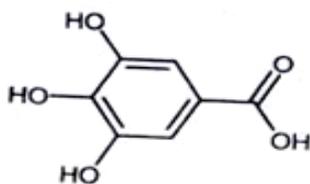


Quinine

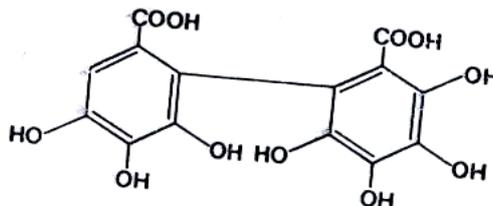
## 4-2 Tanins

Les tanins sont très nombreux et de compositions très différentes. Ils présentent tous dans leur molécule, un certain nombre de fonctions phénols. Ils présentent également un ensemble de propriétés communes; ce sont pour la plus part des composés incristallisables, de nature colloïdale et très soluble dans l'eau, l'alcool, l'acétone (GORIS *et al.*, 1949; KOUAME, 2006). Ce sont des pigments que l'on rencontre principalement chez les végétaux. On distingue les tanins galliques qui sont hydrolysables et les tanins cathéchiques sous forme condensée. La plupart des activités biologiques des tanins sont attribuées au pouvoir qu'ils ont de se lier à certaines macromolécules, en particulier aux protéines (enzymes digestives et autres protéines fongiques ou virales) pour former un complexe (BRUNETON, 1993; KOUAME, 2006).

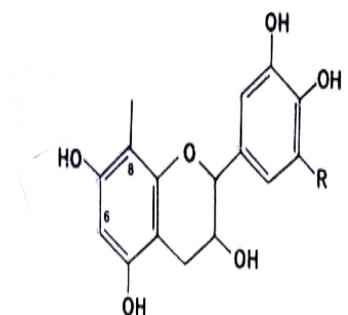
### Exemples de tanins



Acide gallique



Acide digallique



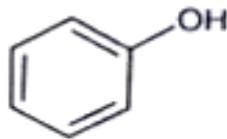
Tanins vrais (R= H, OH)

### 4-3 Polyphénols

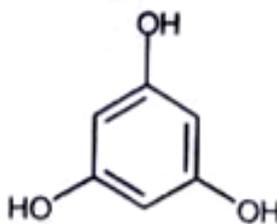
Les polyphénols sont des composés qui possèdent plusieurs groupes phénols ou hydroxyles. Ils sont en principe solubles dans les solvants organiques polaires. Ils sont par ailleurs solubles dans les solutions d'hydroxyde de sodium ou de carbonate de sodium. Les formes hétérosidiques de ces composés sont par contre solubles dans l'eau (GNALEI, 2004; KOUAME, 2006).

Des travaux plus anciens ont montré que les phénols seraient associés aux nombreux processus physiologiques telles que la croissance cellulaires (ALIBERT *et al.*, 1977; KOUAME, 2006)

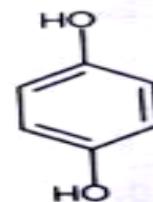
Exemples de polyphénols



Phénol



phoroglucinol



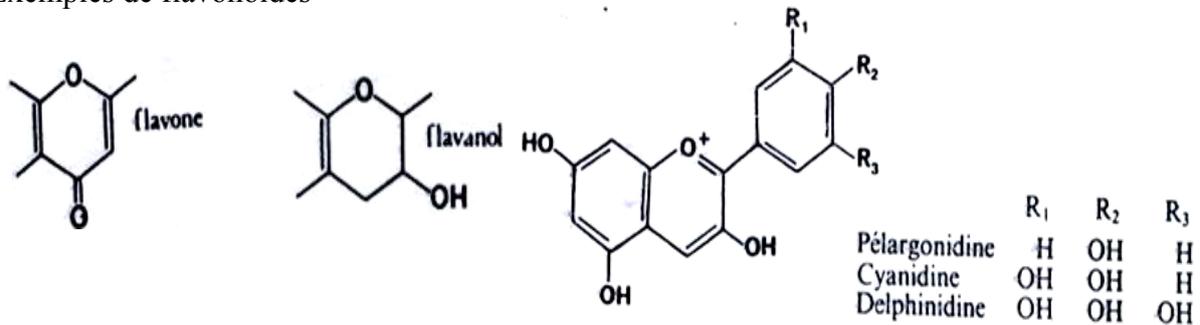
hydroquinone

### 4-4 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux. Ils sont responsables de la couleur des fleurs, des fruits et légumes parfois même des feuilles. Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont solubles dans l'alcool et peu solubles dans l'eau. Parmi les flavonoïdes présentant plus d'intérêt, nous citons les anthocyanes, les anthocyanidols ou flavanidiols, les flavonols, la roténone et les rotenoïdes (KOUAME, 2006).

Les flavonoïdes possèdent de fortes propriétés anti-oxydantes, améliorent les fonctions de la vitamine C et protègent de l'oxydation (ANONYME, 2005; KOUAME, 2006).

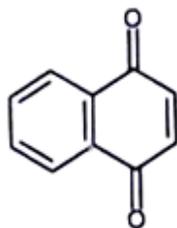
Exemples de flavonoïdes



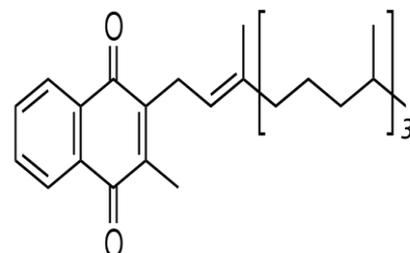
## 4-5 Quinones

Les quinones sont des composés oxygénés qui proviennent de l'oxydation des dérivés aromatiques. Ce sont des substances qui contiennent le noyau quinones ou hydroquinones. Les quinones des végétaux appartiennent aux benzoquinones, aux naphtoquinones et aux anthraquinones (GUIGNARD *et al.*, 1985; KOUAME, 2006). Les quinones présentent plusieurs effets. La plastoquinone et ubiquinone de formules voisines interviennent dans le transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire. Il faut souligner que toutes les molécules du groupe des quinones ont des effets toxiques non négligeables (KOUAME, 2006).

Exemples de quinones



Naphtoquinome

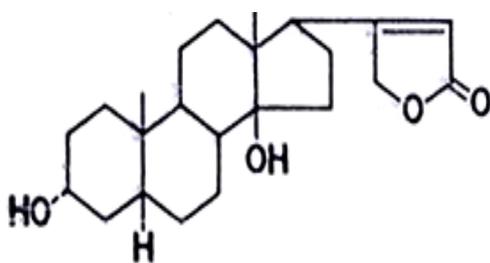


Phylloquinone

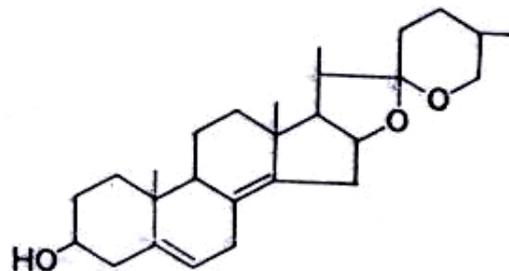
## 4-6 Saponosides

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides à génine stéroïdique ou triterpénique. Ce sont des substances amorphes très répandues chez les végétaux. Ils sont solubles dans l'eau, l'alcool dilué bouillant, mais précipitent par refroidissement. Ils sont par contre insolubles dans l'éther. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives (BRUNETON, 1993; KOUAME, 2006). Ils moussent abondamment par agitation dans l'eau. Ils se colorent en jaune par l'ammoniaque et précipitent par les alcalino-terreux. Les saponosides sont des composés particulièrement intéressants du point de vue physiologiques car beaucoup de plantes fraîches leur doivent leur grande activité tensioactive. Ils s'altèrent beaucoup par dessiccation (GORIS *et al.*, 1949; KOUAME, 2006).

Exemples de saponosides



Digitoxigénine (génine de plusieurs hétérosides cardiotoniques) digitales



Diosgénine (sapogénine) dioscoréas

## 4-7 Substances polyterméniques et stéroliques

L'origine des terpènes et des stérols est commune. Ils dérivent d'un même motif de base qui est l'isoprène. Ce sont des polymères d'unités isopréniques qui selon la voie de synthèse abouti soient aux terpènes, soient aux stérols et aux stéroïdes. Le nom terpène a été donné à cette famille parce que la première molécule isolée provenait des essences de térébenthine (KOUAME, 2006).

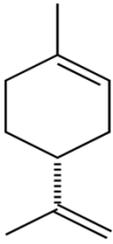
Les terpènes appartiennent au grand groupe des huiles essentielles; les terpènes tels que le thymol ont un effet antiseptique (POUSSET, 1992) et anti-inflammatoire (KOUAME, 2006).

Le terme de stérol (du grec solide) désigne un ensemble de substances portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles sur le squelette carboné formé par le cyclopentano-perhydrophénanthrène (GANTER *et al.*, 1969; KOUAME, 2006). Les stérols entrent dans la composition d'un certain nombre de lipides animaux ou végétaux et de ce fait, leur étude est souvent rapprochée de celle des lipides. Les stérols sont solubles dans l'éther, l'acétone, le chloroforme, le benzène mais moins solubles dans l'eau. Suivant leur origine, on distingue les zoostérols d'origine animale et les phytostérols d'origine végétale (KOUAME, 2006).

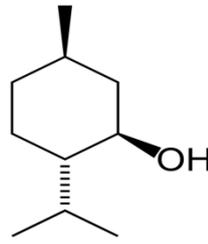
Les stéroïdes sont des substances qui s'apparentent aux stérols par la présence du même squelette fondamental et qui englobent des substances en apparence fort éloignées les unes des autres (GANTER *et al.*, 1969; KOUAME, 2006).

Les stérols possèdent plusieurs fonctions. Ceux des végétaux présentent un intérêt pharmacologique; car ils entrent dans la fabrication de nombreux médicaments tels que les contraceptifs, les anti-inflammatoires (BRUNETON, 1993; KOUAME, 2006).

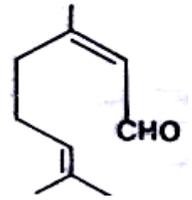
Exemples de terpènes



Limonène (orange, citron)

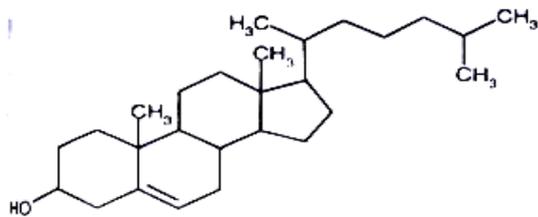


Menthol (menthe)

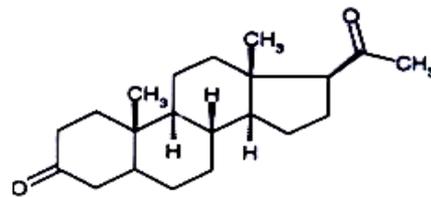


Citral (citron)

Exemples de stérols

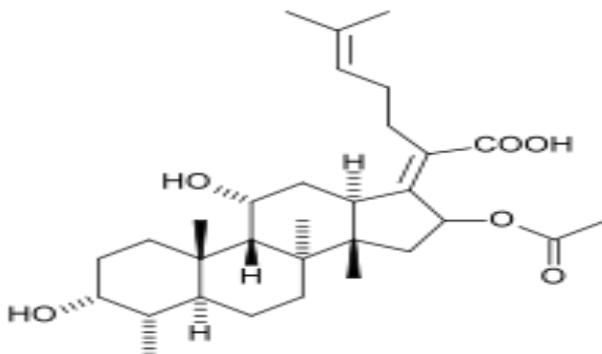


Cholestérol



Progestérol

Exemple de stéroïde

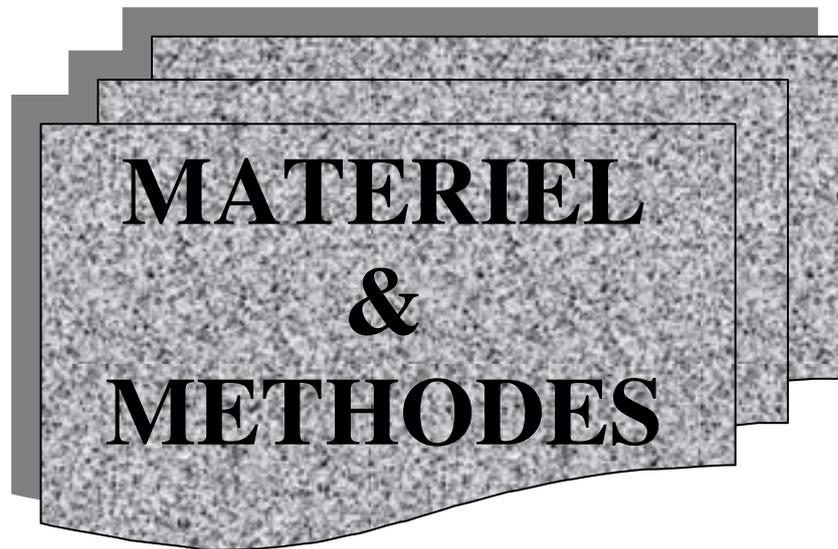


Acide fusidique

## **5- Généralités sur l'acide fusidique**

L'acide fusidique est un antibiotique possédant une structure stéroïdique, bactériostatique, avant tout anti-staphylococcique, et qui inhibe la synthèse protéique de la bactérie pour laquelle il est actif. Pour le traitement efficace des staphylocoques, il est utilisé en association avec un autre antibiotique actif (ANONYME, 2005). Il empêche la synthèse protéique de la souche bactérienne en bloquant le ribosome par une liaison au "facteur G", responsable de la translocation de la chaîne des peptides durant la synthèse des protéines (ANONYME, 2005). Il possède une bonne pénétration tissulaire mais ne diffuse pas dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Son activité métabolique est essentiellement hépatique et il est éliminé à plus de 95% dans la bile (ANONYME, 2005).

Il est actif sur les bactéries Gram positif aérobies telles que les germes *Staphylococcus aureus*, staphylocoques non coagulase (5 à 20% de résistances acquises) (BABIN, 1972; LECLERC *et al.*, 1983; COLLIGNON *et al.*, 1999; ANONYME, 2005). Il est aussi actif sur les bactéries Gram positif, certains bacilles Gram négatif et cocci Gram négatif (LECLERC *et al.*, 1983; COLLIGNON *et al.*, 1999 ; ANONYME, 2005). Il possède une activité modérée sur le genre *Streptococcus* (COLLIGNON *et al.*, 1999; ANONYME, 2005). Il est inactif sur les bactéries gram négatif aérobies telles que les genres *Acinetobacter sp*, *Pseudomonas sp* et les enterobactéries (ANONYME, 2005).



**MATERIEL  
&  
METHODES**

## **1- MATERIEL**

### **1-1 Matériel biologique**

#### **1-1.1 Matériel végétal**

Le matériel végétal est une poudre préparée à partir de toutes les parties de *Mitracarpus scaber* (feuilles, tiges, fleurs et racines). *Mitracarpus scaber* est une herbe annuelle de 30 à 60 cm de hauteur de la famille des Rubiaceae (MAYNART *et al.*, 1982; AUBRY, 1984; DEMBELE, 1988; LeBOURGEOIS *et al.*, 1995; KRA, 1997; KOUAME, 2006). Il s'agit d'une plante érigée, ramifiée ou non avec des tiges cylindriques de couleur verte et pubescentes. Elle possède des feuilles lancéolées de 1,5 à 3 cm de largeur sur 3 à 6 cm de longueur. Ces feuilles sont opposées-décussées à la face supérieure parfois scabre et glabre à la face inférieure (MAYNART *et al.*, 1982; AUBRY, 1984; LeBOURGEOIS *et al.*, 1995; KOUAME, 2006). Les inflorescences sont assemblées en grappes denses de 8 à 18 mm de diamètre et constituées de petites fleurs blanches (MAYNART *et al.*, 1982; LeBOURGEOIS *et al.*, 1995; KOUAME, 2006). Cette espèce est répandue dans toutes les régions tropicales du globe. Elle se développe de la zone sahélo-soudanienne à la zone soudanienne. *Mitracarpus scaber* une espèce fréquente sur les sols dégradés, les terrains vagues et les champs en friche. Au nord du Cameroun, elle est un adventice régional présent dans 50% des parcelles cultivées. Elle est plus abondante en région sahélo-soudanienne. Elle est rencontrée principalement dans les parcelles cultivées de façon continue depuis plus de 10 ans. *Mitracarpus scaber* est présente tout au long du cycle cultural, mais elle devient plus fréquente et plus abondante enfin de cycle cultural. A cette période, en effet, elle devient un adventice potentiel général présent dans plus de 60% des parcelles et souvent abondant.

La germination commence depuis le mois de mai jusqu'en octobre. Cette germination devient abondante en août ou en septembre (LeBOURGEOIS *et al.*, 1995; KOUAME, 2006).

Dans la pharmacopée traditionnelle, cette plante est beaucoup utilisée pour les soins de diverses affections cutanées telles que les démangeaisons, les dartres, les dermatophyties, les candidoses cutanées et vaginales (MAYNART *et al.*, 1982; AUBRY, 1984; GUEDE-GUINA *et al.*, 1992; VANGAH-MANDA *et al.*, 1993; BONGA *et al.*, 1995; MOBIE, 1996; VANGAH-MANDA *et al.*, 1996; GUEDE-GUINA *et al.*, 1997; BONGA *et al.*, 1998; MOBIE *et al.*, 1998; KPOROU., 2004; KOUAME, 2006). *Mitracarpus scaber* est employée également dans le traitement de la syphilis (MAYNART *et al.*, 1982; AUBRY, 1984; KOUAME, 2006), de la blennorragie ou gonococcie, de la lèpre, des morsures de serpent, des céphalées et bien d'autres affections (MAYNART *et al.*, 1982; KOUAME, 2006) et des mycoses (AUBRY, 1984; KOUAME, 2006) (figure 1).

## **Position systématique de la plante**

Règne: végétal

Embranchement: Spermaphytes ou Phanérogames

Sous/ Embranchement: Angiospermes

Classe: Dicotylédone

Sous/ Classe: Gamopétale

Série: des Inférovaridés

Ordre: des Gentianales

Famille: Rubiaceae

Genre: *Mitracarpus*

Espèce: *scaber*



(Photo: source DEA de KOUAME)

**Figure 1: *Mitracarpus scaber* (MISCA)**

## **1-1.2 Bactéries testées**

Les tests anti-bactériens ont été réalisés sur 87 souches de staphylocoques, 87 souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques et 87 souches d'entérocoques notamment *Enterococcus faecalis*.

Les souches de staphylocoques ont été prélevées à la fois chez l'Homme et chez les caprins (moutons et chèvres).

Les souches de staphylocoques d'origine humaine et celles d'entérocoques ont été isolées sur des patients reçus pour des analyses biologiques à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI).

Quant aux souches de staphylocoques provenant des caprins, elles ont été prélevées des fosses nasales de ces animaux à l'abattoir de Port-Bouët, Abidjan, Côte d'Ivoire.

Toutes les souches de staphylocoques se répartissent comme suit: 31 souches de *Staphylococcus aureus*, 31 souches de *Staphylococcus epidermidis* et 25 souches de *Staphylococcus saprophyticus*.

Le disque d'oxacilline a été utilisé de préférence à celui de la méticilline à cause de sa stabilité en culture *in vitro* par rapport à ce dernier. Et il a permis de séparer les souches sensibles de staphylocoques de celles qui sont résistantes.

Alors que les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques ont été quant à elles, fournies par le Centre de Diagnostic et de Recherche sur le SIDA (CeDReS) du CHU de Treichville, Abidjan, Côte d'Ivoire. Selon ce centre, ces souches ont été prélevées sur des personnes reçus pour leurs analyses biologiques à ce lieu. Ces souches appartiennent aux groupes A, C et G. Elles se répartissent comme suit: 31 souches de streptocoques du groupe A, 31 souches de streptocoques du groupe C et 25 souches de streptocoques du groupe G.

## **2- METHODES**

### **2-1 Isolement et identification des souches bactériennes**

#### **2-1.1 Souches de staphylocoques**

L'isolement nasal des souches de staphylocoques chez les caprins a été réalisé à l'aide d'écouvillons et du bouillon cœur-cervelle. Chaque prélèvement obtenu a été par la suite ensemencé sur le milieu de Chapman, un milieu spécifique, puis mis à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures. Quelle que soit l'origine des souches de staphylocoques (humaine ou animale), le milieu pour la mise en évidence d'une DNase, les disques de novobiocine 5 µg et d'oxacilline 1 µg ont été utilisés, afin de mieux distinguer les espèces de staphylocoques entre elles.

Après leur caractérisation, les souches de staphylocoques ont été ensemencées par inondation sur le milieu de Mueller-Hinton, puis incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C. Après ce temps d'incubation, elles ont été raclées à l'aide d'une anse de platine, ensuite séparément conservées dans des cryotubes contenant le lait écrémé stérile à -80°C.

#### **2-1.2 Souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques**

Toutes les souches de streptocoques utilisées ont certes été fournies par le Centre de Diagnostic et de Recherche sur le SIDA (CeDRoS) du CHU de Treichville, Abidjan, Côte d'Ivoire. Cependant, selon le fournisseur, elles ont été isolées de la gorge de malades à l'aide d'écouvillons ensuite, immédiatement ensemencées sur le milieu base pour gélose au sang additionné de 10% de sang frais de mouton défibriné stérile, ensuite mises à l'étuve sous enceinte humide pendant 18 à 24 heures à 37°C. La méthode de groupage sérologique de LANCEFIELD a été utilisée pour déterminer les groupes des souches de streptocoques.

Après la détermination du groupe des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques, elles ont distinctement étéensemencées par inondation sur le milieu de Mueller-Hinton additionné de 10% de sang frais de mouton défibriné stérile, puis incubées à 37°C sous enceinte humide pendant 18 à 24 heures. Après ce temps d'incubation, ces souches bactériennes ont été raclées à l'aide d'une anse de platine, ensuite distinctement conservées dans des cryotubes contenant le lait écrémé stérile à -80°C.

### **2-1.3 Les souches d'entérocoques**

Les souches d'*Enterococcus faecalis* ont été isolées des pus, urines, selles ou sang des patients reçus pour leurs analyses biologiques à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) par hémoculture. Les prélèvements obtenus ont été ensuiteensemencés sur le milieu spécifique bile esculine azide, puis incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures.

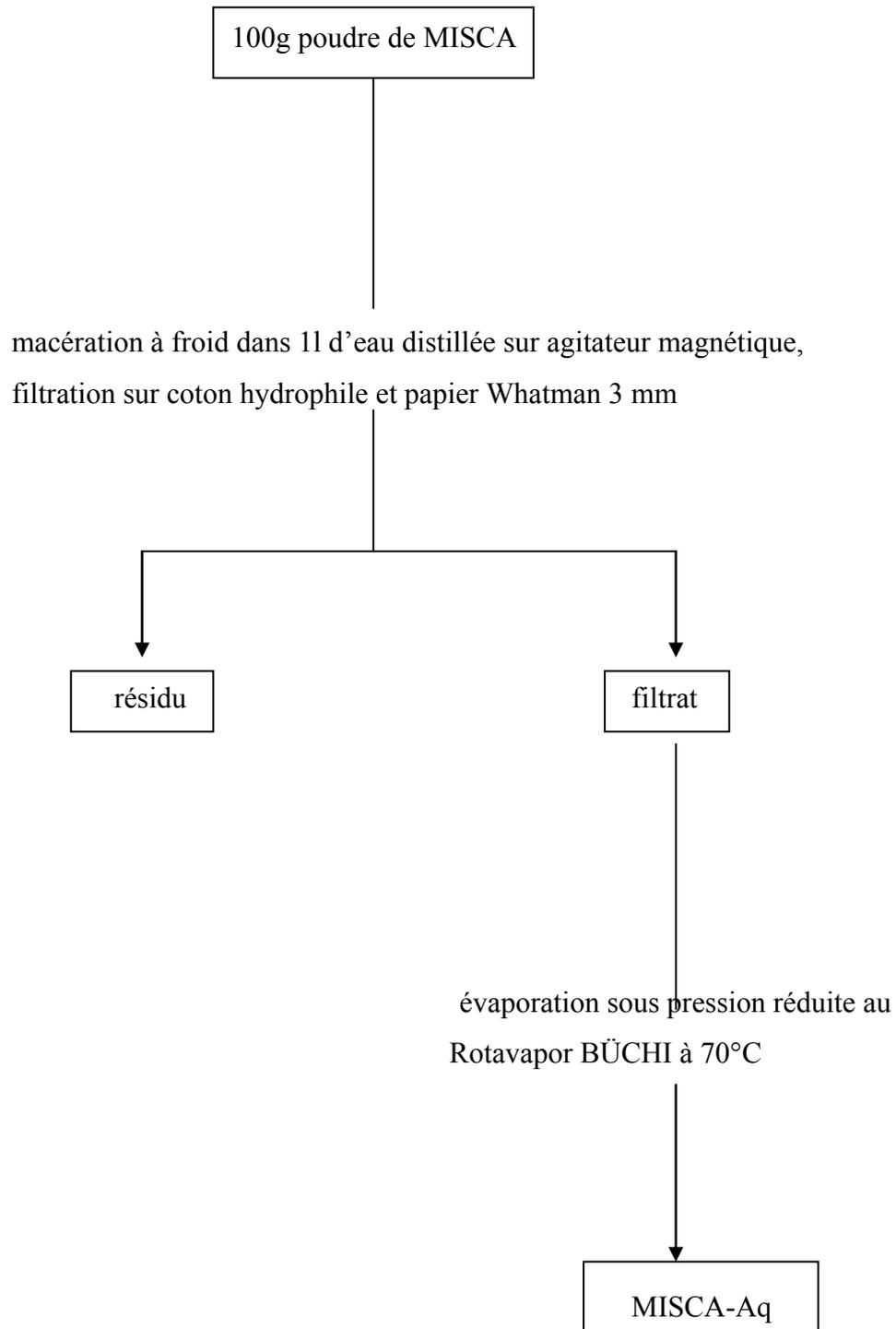
Après leur identification, les souches d'*Enterococcus faecalis* ont séparément étéensemencées par inondation sur le milieu de Mueller-Hinton, par la suite, incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Après ce temps d'incubation, elles ont été raclées à l'aide d'une anse de platine, ensuite individuellement conservées dans des cryotubes contenant le lait écrémé stérile.

### **2-2 Préparation des différents extraits végétaux**

*Mitracarpus scaber* (Rubiaceae) codifiée MISCA a été récoltée, lavée à l'eau de robinet, découpée puis séchée à l'abri du soleil, à la température du laboratoire pendant deux semaines. Après le séchage, elle a été broyée à l'aide d'une broyeuse électrique pour l'obtention d'une poudre végétale. Pour préparer les différents extraits de MISCA, le cheminement a été le suivant:

## **2-2.1 Préparation de l'extrait total aqueux**

L'extrait total aqueux de MISCA a été préparé par simple macération, de 100 grammes de la poudre végétale de MISCA dans un litre d'eau distillée sous agitation magnétique, sur un agitateur de type IKA-Labortechnik ou IKAMAG RCT pendant 24 heures. L'homogénat aqueux obtenu a été filtré sur coton hydrophile et papier Whatman 3 mm. Le filtrat a été évaporé à sec sous pression réduite à 70°C, par un évaporateur rotatif de type BÜCHI pour donner une poudre marron foncée (GUEDE-GUINA *et al.* 1992). La poudre obtenue a constitué l'extrait total aqueux de MISCA et a été notée: MISCA-Aq tout au long de l'étude expérimentale. La méthode de préparation de cet extrait est résumée sur la figure 2 comme suit:

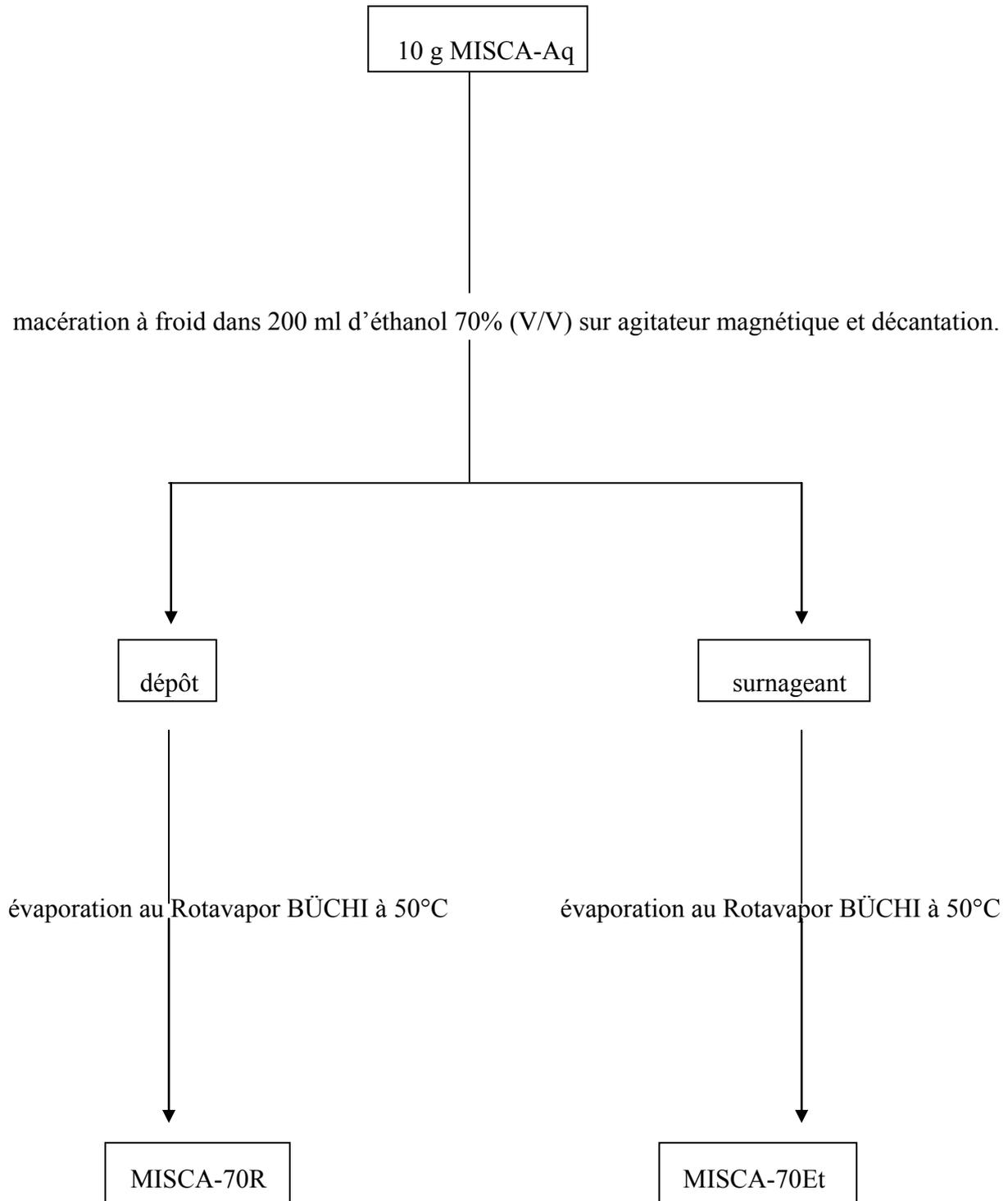


**Figure 2: Méthode de préparation de l'extrait total aqueux de MISCA**  
(GUEDE-GUINA *et al.*, 1992)

## **2-2.2 Préparation de l'extrait éthanolique 70% et de l'extrait résiduel 70%**

L'extrait éthanolique 70% a été préparé selon la méthode de ZIRIHI *et al.* (2003) à partir de MISCA-Aq.

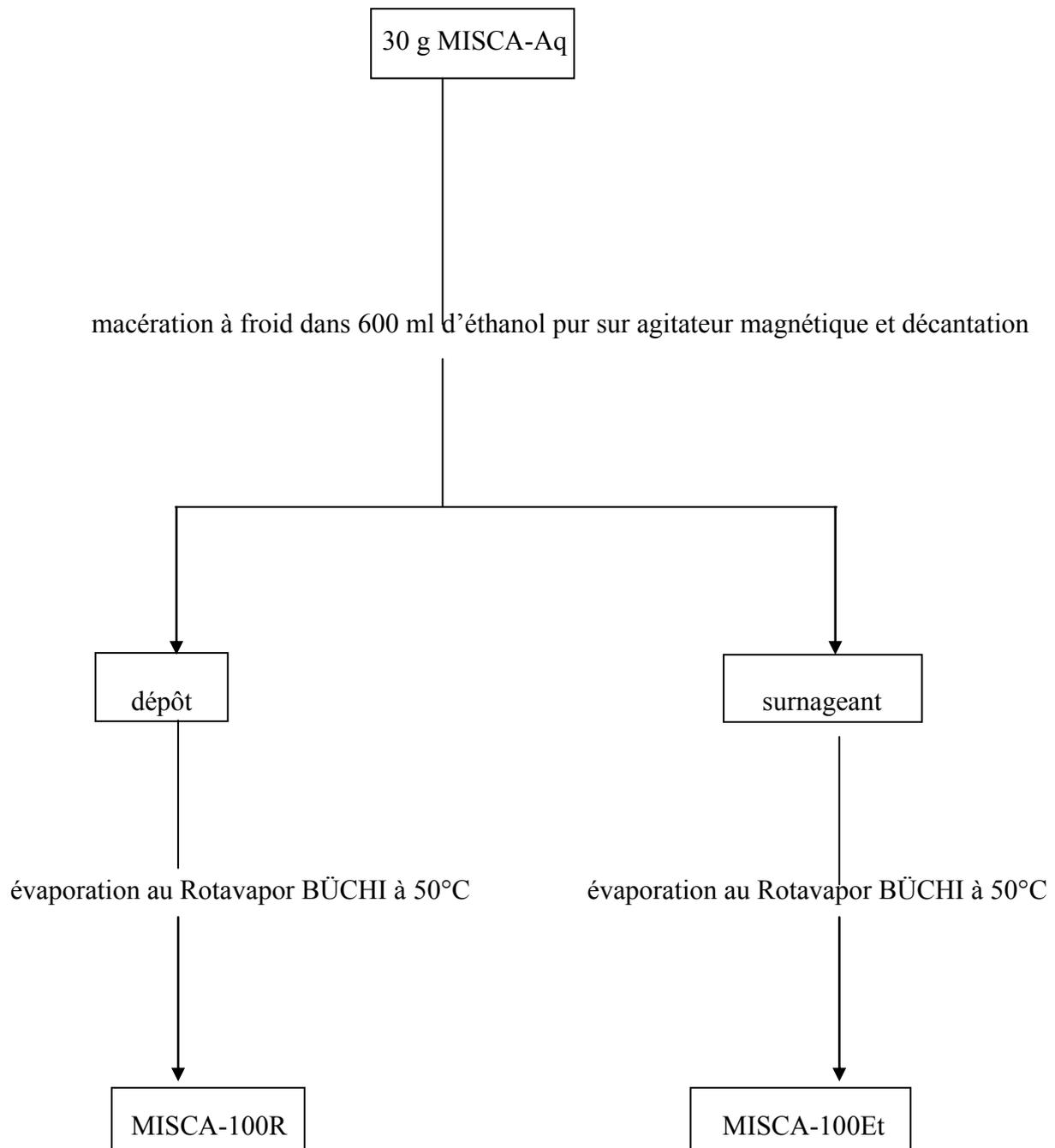
Selon cette méthode de préparation, 10 grammes de MISCA-Aq a été dissoute dans 200 millilitres d'éthanol 70% (V/V) par agitation à froid, sur agitateur magnétique. La solution homogène obtenue a été ensuite laissée à décantation complète. Par la suite, le surnageant a été séparé du dépôt et, les deux phases ont séparément été concentrées sous pression réduite à 50°C au Rotavapor BÜCHI, pour donner distinctement deux pâtes marrons. La pâte marron obtenue du surnageant a constitué MISCA-70Et (l'extrait éthanolique 70% de MISCA). Alors que celle obtenue du dépôt a constitué MISCA-70R (l'extrait résiduel 70% de MISCA). La figure 3 est la représentation schématique de cette méthode de préparation.



**Figure 3: Méthode de préparation de l'extrait éthanolique 70% et de l'extrait résiduel 70% de MISCA (ZIRIHI *et al.*, 2003)**

### **2-2.3 Préparation de l'extrait éthanolique 100%**

Une quantité de 30 g de l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq) a été dissous dans 600 millilitres d'éthanol pur par agitation à froid sur agitateur magnétique jusqu'à homogénéité complète (ZIRIHI *et al.*, 2005). Ensuite, les deux phases obtenues après décantation ont distinctement été concentrées sous pression réduite à 50°C au Rotavapor BÜCHI pour donner séparément deux pâtes marron. La pâte marron obtenue du surnageant a constitué MISCA-100Et (extrait éthanolique 100% de MISCA). Tandis que celle obtenue du dépôt a constitué MISCA-100R (extrait résiduel 100% de MISCA). Cette méthode de préparation est parfaitement résumée par la figure 4.

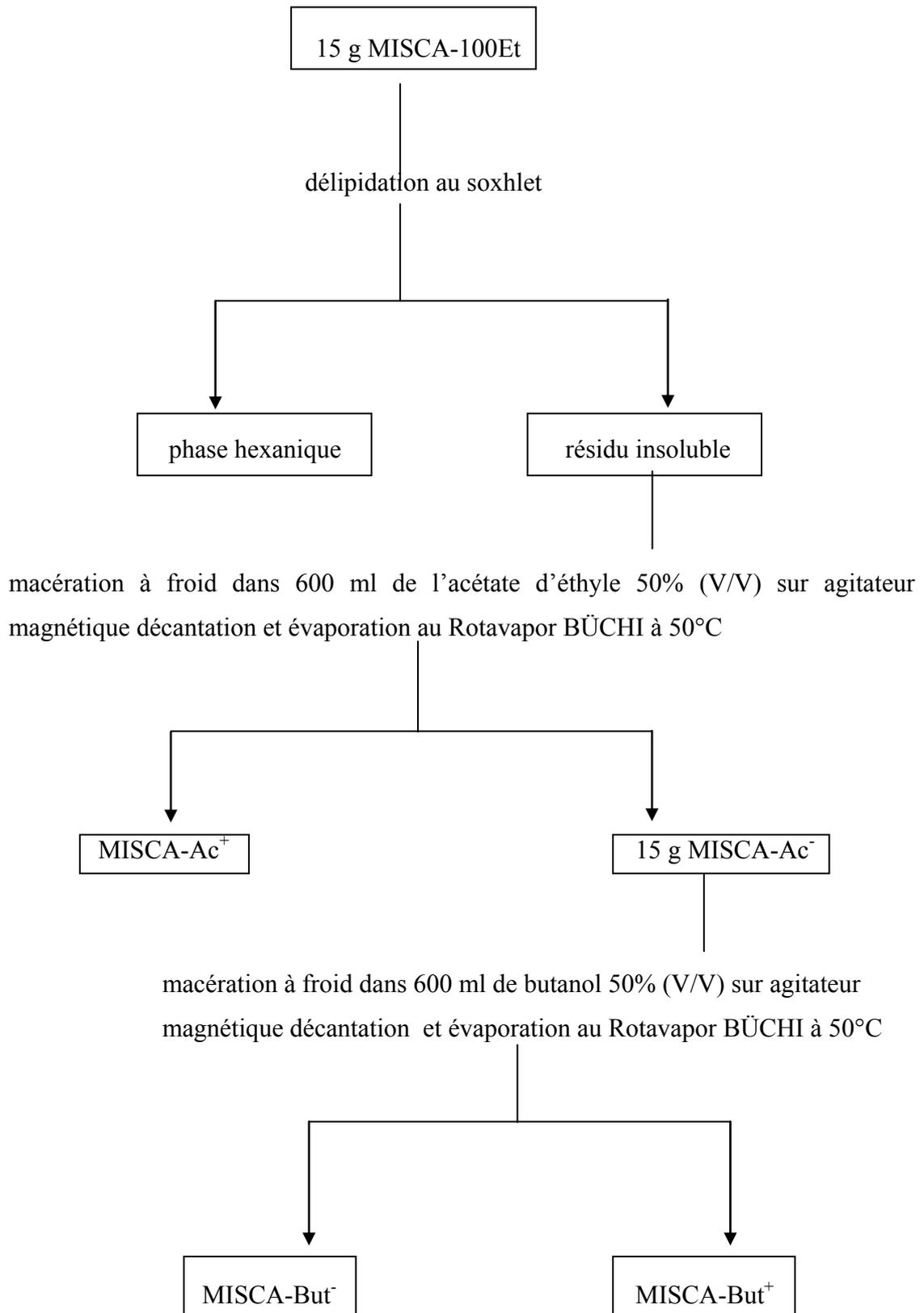


**Figure 4: Méthode de préparation de l'extrait éthanolique 100% de MISCA**  
(ZIRIHI *et al.*, 2005)

## **2-2.4 Préparation de l'extrait butanolique**

Selon la méthode de ZIRIHI *et al.* (2005), les autres extraits (MISCA-Ac<sup>+</sup>, MISCA-Ac<sup>-</sup>, MISCA-But<sup>-</sup>, MISCA-But<sup>+</sup>) ont été préparés à partir de l'extrait éthanolique 100% de MISCA (MISCA-100Et) comme suit:

- 15 g de MISCA-100Et a été d'abord dégraissé à l'hexane dans un soxhlet c'est-à-dire, lavé à plusieurs reprises par l'hexane dans le soxhlet, puis la portion non liposoluble a été récupérée et soumise à partition dans 600 ml de l'acétate d'éthyle 50% (V/V) par agitation à froid sur agitateur magnétique et laissée décanter. Après décantation, les deux phases ont été séparément concentrées sous pression réduite à 50°C au Rotavapor BÜCHI, pour donner distinctement deux pâtes marron. La pâte obtenue du surnageant a constitué MISCA-Ac<sup>+</sup>. Alors que celle obtenue du dépôt a constitué MISCA-Ac<sup>-</sup>.
- 15 g de MISCA-Ac<sup>-</sup> a été repris dans 600 ml de butanol 50% (V/V) sous agitation magnétique à froid, puis laissé décanter, ensuite évaporé au Rotavapor. La concentration au Rotavapor BÜCHI de ces deux fractions a donné les extraits MISCA-But<sup>+</sup> (issu du surnageant) et MISCA-But<sup>-</sup> (issu du dépôt). La figure 5 est un résumé de cette méthode de préparation.



**Figure 5: Méthode de préparation de l'extrait butanolique de MISCA**  
(ZIRIHI *et al.*, 2005)

Les extraits MISCA-Aq, MISCA-70Et, MISCA-70R, MISCA-100Et et MISCA-But<sup>+</sup> ont été testés sur la croissance *in vitro* des différentes souches bactériennes utilisées. Le test de ces cinq extraits a permis de déterminer les paramètres anti-bactériens suivants: CMI, CMB et CI<sub>50</sub>; alors que le test de MISCA-Ac<sup>+</sup> (surnageant de l'acétate d'éthyle 50%) et MISCA-But<sup>-</sup> (dépôt du butanol 50%) sur les mêmes souches bactériennes a seulement permis de déterminer la CMI à cause du constat des activités moindres de ces extraits.

## **2-3 Evaluation de l'activité anti-bactérienne *in vitro* des différents extraits de MISCA**

### **2-3.1 Technique de diffusion en milieu gélosé (Méthode des disques)**

Pendant la manipulation, les substances (oxacilline 1µg, pénicilline et extrait total aqueux de MISCA) ont été testées sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques sensibles ou résistantes. L'oxacilline et la pénicilline ont servi d'antibiotiques de référence. Pour établir de manière précise la résistance ou la sensibilité des souches de staphylocoques, le disque d'oxacilline a été utilisé. Ce choix a été motivé par le fait qu'en culture *in vitro*, le disque d'oxacilline est beaucoup plus stable que celui de la méticilline. Ainsi, en culture *in vitro*, la sensibilité d'une souche de staphylocoque à l'oxacilline détermine sa sensibilité à la méticilline et la souche est nommée staphylocoque méticillino-sensible (ou staphylocoque Méti-S). Par contre, sa résistance à l'oxacilline détermine sa résistance à la méticilline et la souche est appelée staphylocoque méticillino-résistante (ou staphylocoque Méti-R). Cette sensibilité ou résistance de la souche de staphylocoque se détermine en mesurant le diamètre d'inhibiton autour du disque d'oxacilline. Si le diamètre mesuré est supérieur à 12 mm (valeur de référence), la souche de staphylocoque utilisée est méticillino-sensible.

Par contre, s'il est inférieur à 12 mm, la souche de staphylocoque utilisée est dite méticillino-résistante. Pendant l'étude expérimentale, des souches pures de staphylocoques ont été utilisées selon le cheminement suivant.

### **2-3.1.1 Méthode standard International Collaborative Study**

La méthode des disques convient parfaitement à l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de la plupart des germes couramment rencontrés en bactériologie médicale. Cependant, pendant l'étude expérimentale, cette technique a été uniquement utilisée sur les souches de staphylocoques. Elle a été préférentiellement utilisée sur ces souches car elle peut permettre de séparer les souches sensibles de staphylocoques, des souches résistantes (CHABBERT, 1972; ACAR, 1980).

En clair, il s'est agit de chercher à savoir si les souches de staphylocoques utilisées étaient soient méticillino-sensibles ou soient méticillino-résistantes. Cette discrimination a permis de ne retenir que les souches méticillino-résistantes de staphylocoques pour la suite des tests expérimentaux en milieu liquide, à cause de l'incidence clinique qu'ont ces dites souches sur la peau humaine.

#### **2-3.1.1.1 Milieu de culture**

Au cours des travaux, la gélose de Mueller-Hinton a été utilisée. Elle a été préparée, puis, nous avons uniformément réparti 22 ml de la gélose Mueller-Hinton dans des boîtes de Pétri de 90 mm, afin de respecter l'épaisseur de 4 mm de gélose dans les boîtes de Pétri. Quelle que soit la dimension ou la forme de la boîte utilisée, cette épaisseur doit être respectée. La solidification de la gélose a été effectuée sur une table de niveau et les boîtes obtenues ont été séchées à 37°C à l'étuve durant 30 minutes avant leur utilisation (MARMONIER, 1990).

### **2-3.1.1.2 Réalisation de l'inoculum**

Pendant la réalisation de l'inoculum, les souches pures de staphylocoques (sensibles ou résistantes) ont été utilisées pour des raisons évidentes d'interprétation des résultats. A l'aide d'une pipette Pasteur surmontée de poire, une quantité suffisante de souche de staphylocoque a été raclée, puis délayée dans 10 ml d'eau distillée stérile pour constituer une suspension bactérienne. La suspension réalisée a été secondairement diluée au 1/50<sup>e</sup> dans 10 autre ml d'eau distillée stérile, afin d'obtenir une turbidité de 0,5 Mc Farland (Microdilution). Cette méthode permet d'avoir une concentration finale de l'inoculum de staphylocoque, 4 à 5 fois plus importante que celle de par exemple d'une entérobactérie ou d'un *Pseudomonas*. La réalisation de l'inoculum a été faite de sorte à avoir, après 18 heures d'incubation en milieu solide, une culture en nappe de colonies, ni tout à fait confluentes, ni tout à fait isolées, "tangentes" si possibles (MARMONIER, 1990).

### **2-3.1.1.3 Ensemencement par inondation**

Quelques millilitres de l'inoculum (de 2 à 6 ml environ selon les dimensions des boîtes de Pétri) ont été déversés de façon à recouvrir presque entièrement la surface gélosée. Des mouvements de rotation dans les deux axes ont été imprimés par la main pour accélérer le recouvrement. L'aspiration du liquide en excès a été effectuée en deux temps; une première fois après l'immersion, puis une seconde fois quelques minutes plus tard après inclinaison de la boîte, afin d'éliminer tout résidu d'inoculum. L'aspiration a été accomplie à l'aide d'une pipette Pasteur surmontée d'une poire. Les boîtes ainsiensemencées ont été mises à sécher pendant 15 minutes à 37°C (MARMONIER, 1990).

#### **2-3.1.1.4 Application des disques**

Les gammes de concentration de l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq) utilisées varient de 200 mg/ml à 3,13 mg/ml. Elles ont préalablement été préparées par la technique de la double dilution en milieu liquide avec une progression géométrique de raison 1/2, puis chaque disque non imprégné a été mis au contact de chacune des concentrations de l'extrait total de MISCA préparée, ensuite déposé à l'aide d'une pince flambée à la surface de la boîte gélosée de Mueller-Hinton initialement séchée. Ces disques ont également été posés avec les disques de l'oxacilline et de la pénicilline. Ils ont été posés tout en mettant au milieu l'oxacilline et tout autour, les différents disques imprégnés des diverses gammes de concentrations de l'extrait total aqueux de MISCA et le disque de pénicilline. Ils ont été posés à une distance minimale de 15 mm du bord de la boîte de Pétri et, 30 mm les uns des autres, pour éviter que les zones d'inhibition ne se chevauchent. Il est à noter que les disques ont été parfaitement appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose (MARMONIER, 1990).

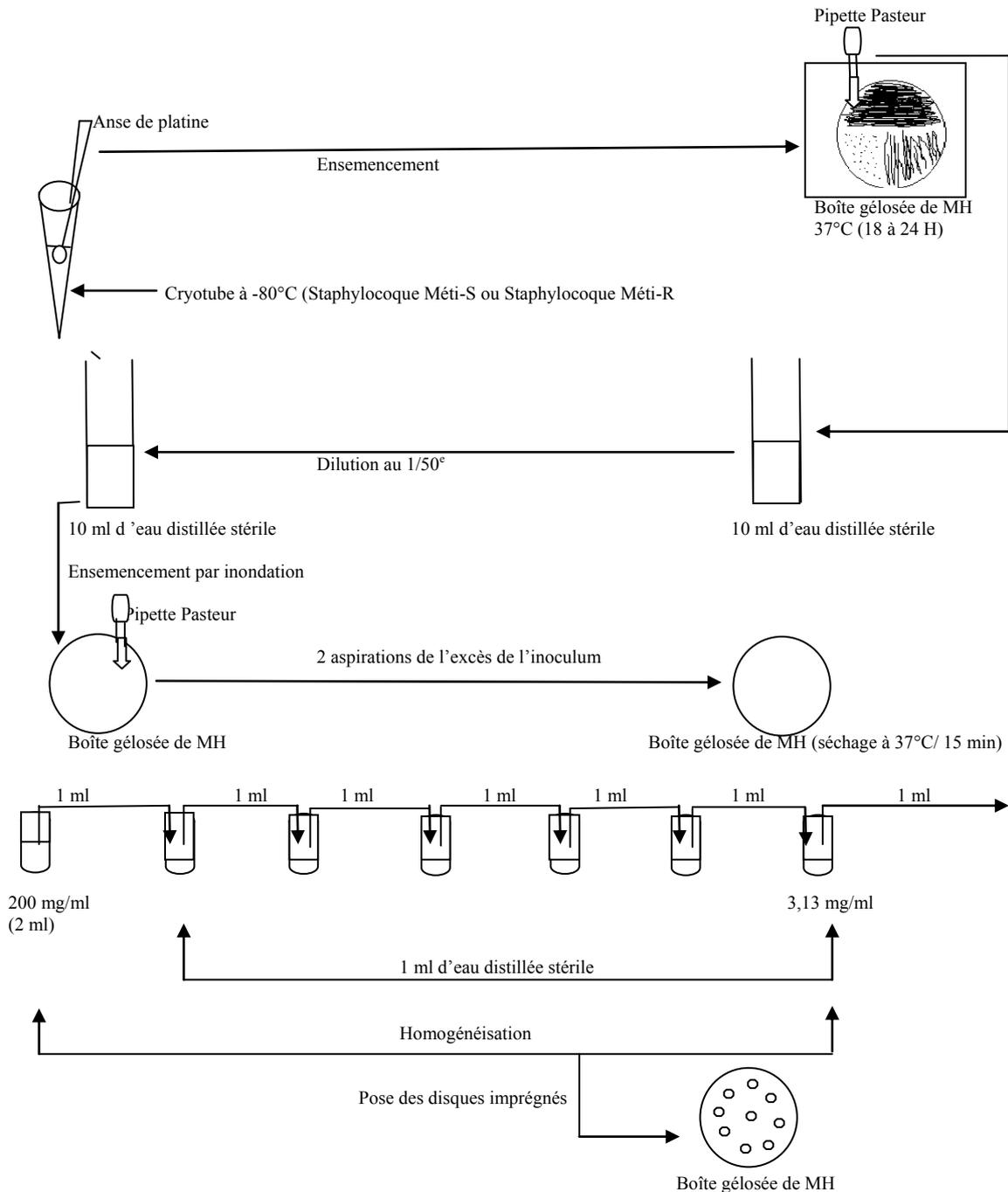
#### **2-3.1.1.5 Pré-diffusion et incubation**

Les boîtes de Pétri ci-dessus décrites ont été laissées durant 30 minutes à la température ambiante, pour permettre une pré-diffusion des substances contenus dans les divers disques. Après cette pré-diffusion, les boîtes de Pétri ont été incubées à l'étuve à 30°C pendant 18 à 24 heures couvercle en bas (position renversée) (MARMONIER, 1990).

L'observation de l'action des différentes substances sur la croissance *in vitro* de la souche de staphylocoque (sensible ou résistante) a été réalisée après 24 heures d'incubation selon NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) 1998.

Cette action se traduit par la présence ou l'absence des zones d'inhibition autour des disques imprégnés. La substance testée est d'autant plus active que la zone d'inhibition est grande et depourvue de colonies bactériennes (MARMONIER, 1990).

Cette méthode des disques est résumée sur cette figure 6 comme suit:



**Figure 6: Méthode des disques**

## **2-3.2 Méthodes par dilution**

De manière générale, la détermination des paramètres anti-bactériens a été effectuée selon la méthode adaptée de NASSIF *et al.*, (1990). Pour la détermination de ces paramètres, cette procédure a été suivie:

### **1<sup>er</sup> jour**

Les inocula bactériens ont été préparés à partir de 3 à 5 colonies isolées de 18 à 24 heures.

Pour isoler ces colonies, ce cheminement a été suivi:

- le milieu de Chapman initialement conservé dans la chambre froide a été fondu, puis coulé dans des boîtes de Pétri. Après le refroidissement des boîtes gélosées et leur séchage à l'étuve pendant 30 minutes, les souches de staphylocoques méticillino-résistantes préalablement conservées dans le lait écrémé stérile au congélateur à -80°C ont été repiquées sur ces boîtes gélosées.

Pour l'ensemencement de la souche de staphylocoque, une oëse de la culture bactérienne a été prélevée du cryotube de conservation à l'aide d'une anse de platine par simple raclage, puis ensemencée par quadrant sur la boîte gélosée de Chapman, ensuite incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- la gélose stérile (base pour gélose au sang) conservée dans la chambre froide a été fondue, ensuite refroidie aux environs de 45 à 50°C. A cette gélose a été additionnée 10% de sang frais de mouton défibriné stérile. Le mélange gélose-sang a été homogénéisé, puis réparti dans des boîtes de Pétri. Les boîtes obtenues ont été laissées à refroidir à la température ambiante, ensuite séchées à l'étuve pendant 30 minutes.

A l'aide d'une anse de platine, une oëse de la souche de streptocoque  $\beta$ -hémolytique préalablement conservée dans le lait écrémé stérile à  $-80^{\circ}\text{C}$  a été prélevé par simple raclage, puis repiquée par quadrant sur une boîte gélosée au sang, ensuite incubée sous enceinte humide (atmosphère contenant 5 à 10% de gaz carbonique) à  $37^{\circ}\text{C}$  durant 18 à 24 heures. La culture des souches de streptocoques dans de telles conditions favorise fortement leur optimisation.

➤ la gélose bile esculine azide (BEA) stérile précédemment conservée dans la chambre froide a été fondue, coulée dans des boîtes de Pétri, laissée refroidir à la température ambiante, puis séchée à l'étuve durant 30 minutes.

Ensuite, une oëse d'une souche d'*Enterococcus faecalis* antérieurement conservée dans le lait écrémé stérile à  $-80^{\circ}\text{C}$  a été prélevée par simple raclage à l'aide d'une anse de platine, puisensemencée sur une boîte gélosée de bile esculine azide, pour être par la suite incubée à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 18 à 24 heures.

En somme, il faut cependant retenir que, quelle que soit la souche bactérienne utilisée, 3 espèces différents de la souche bactérienne à tester ont distinctement été ensemencées sur un milieu spécifique précis, préalablement coulé dans différentes boîtes de Pétri.

## **2<sup>e</sup> jour**

### **1<sup>ère</sup> étape**

Après l'incubation, sur chaque culture bactérienne obtenue, trois à cinq colonies isolées ont été prélevées par une anse de platine, délayées dans 10 ml de bouillon de Mueller-Hinton stérile, ensuite homogénéisées à l'aide d'un agitateur vortex type "Heidolph Reax top". L'homogénat obtenu a été par la suite réincubé à  $37^{\circ}\text{C}$  durant 3 à 5 heures (NASSIF *et al.*, 1990).

Entre temps, les gammes de concentrations des extraits de MISCA à tester ont été préparées selon la méthode de la double dilution en milieu liquide avec une progression géométrique des concentrations des extraits de MISCA de raison 1/2. Pour chaque concentration de l'extrait, 0,2 ml a été prélevé, ensuite transféré dans un tube donné d'une série de tubes expérimentaux. Dans cette série qui a été appelée **série test**, un tube a servi de tube témoin de contrôle de croissance (sans extrait de MISCA). Le tube témoin a comporté 0,2 ml d'eau distillée stérile.

Après 3 à 5 heures d'incubation, le bouillon inoculé a été repris, puis il y a été prélevé 0,6 ml pour les souches de staphylocoques méticillino-résistantes et celles d'entérocoques ou 1,2 ml pour les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques. Le volume prélevé a été transféré sur 20 ml de bouillon de Mueller-Hinton stérile, puis homogénéisé à l'aide d'un agitateur vortex type "Heidolph Reax top", afin de permettre d'avoir une opalescence comprise entre  $5.10^5$  et  $5.10^7$  bactéries/ml (conditions standard). Après cela, le volume de 1,8 ml de ce dernier bouillon ont été prélevés pour compléter le volume (0,2 ml) des tubes de la **série test** à 2 ml (NASSIF *et al.*, 1990).

Parallèlement à la **série test**, une **série de référence** a été réalisée. Dans la **série de référence**, un tube expérimental a contenu 0,2 ml de l'extrait de MISCA à tester de concentration connue. Alors que, le tube témoin a comporté 0,2 ml d'eau distillée stérile. Aux tubes de la **série de référence**, a été ajouté 1,8 ml de bouillon Mueller-Hinton stérile. L'ensemble: différentes gammes de concentrations de l'extrait de MISCA utilisé-bouillons inoculés et eau distillée stérile-bouillon inoculé de la **série test**, et celui de la **série de référence** ont été homogénéisés par un agitateur vortex type "Heidolph Reax top", puis incubés:

➤ à 30°C pour les souches de staphylocoques méticillino-résistantes,

➤ ou à 37°C pour les souches d'entérocoques et celles de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques pendant 18 à 24 heures (NASSIF *et al.*, 1990).

## **2<sup>e</sup> étape**

### **Numération de l'inoculum**

Après l'homogénéisation et la répartition du bouillon inoculé dans les tubes expérimentaux, le fond restant du bouillon inoculé a été dilué de 10 en 10 jusqu'à  $10^{-5}$  selon une progression géométrique de raison  $10^{-1}$ . Les dilutions obtenues ont été par la suiteensemencées sur des boîtes gélosées, sur des stries de 5 cm, à l'aide d'une anse calibrée. L'ensemencement des souches bactériennes a été effectué:

- sur des boîtes gélosées de Mueller-Hinton simple pour les souches de staphylocoques méticillino-résistantes et celles d'entérocoques,
- sur des boîtes gélosées de Mueller-Hinton additionnées de 10% de sang de mouton défibriné stérile pour les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques.

Et les cultures ont été incubées à:

- 37°C pour les souches de staphylocoques méticillino-résistantes et celles d'entérocoques,
- 37°C sous enceinte humide pour les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques durant 18 à 24 heures (NASSIF *et al.*, 1990).

Toutefois, avant la culture des souches de staphylocoques méticillino-résistantes et celles d'entérocoques, la gélose de Mueller-Hinton stérile initialement conservée dans la chambre froide a été fondue, ensuite répartie dans des boîtes de Pétri. Elles ont été utilisées après leur refroidissement à la température ambiante et leur séchage à 37°C pendant 30 minutes.

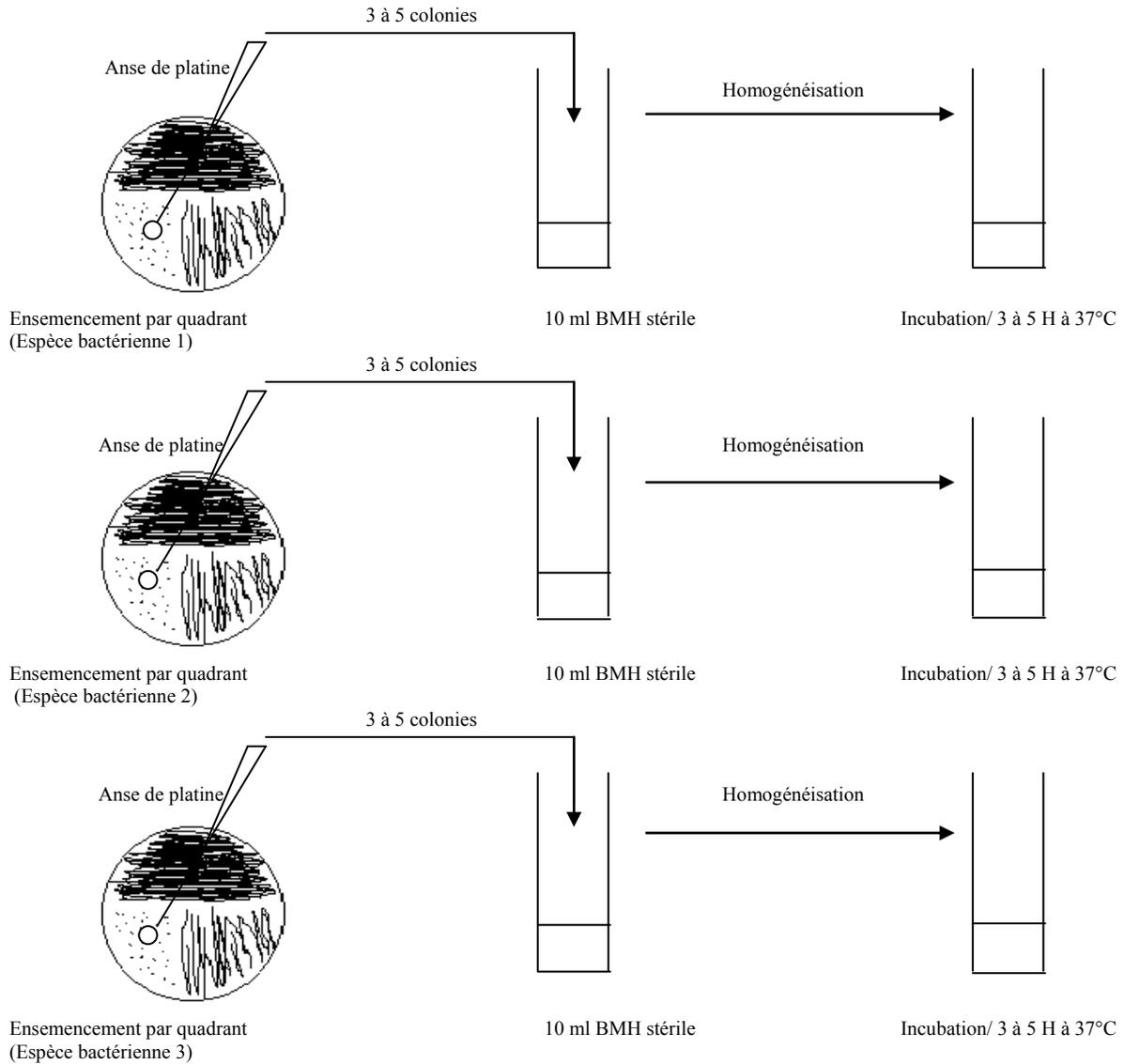
En ce qui concerne les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques, la gélose de Mueller-Hinton, après avoir a été fondue, a été refroidie aux environs de 45 à 50°C.

Après le refroidissement à ces températures, 10% de sang frais de mouton défibriné stérile y a été ajouté. Le mélange gélose-sang a été homogénéisé, puis coulé dans des boîtes de Pétri. Après cela, les boîtes de Pétri ont été laissées à la température ambiante pour refroidir, puis séchées à 37°C pendant 30 minutes avant leur emploi.

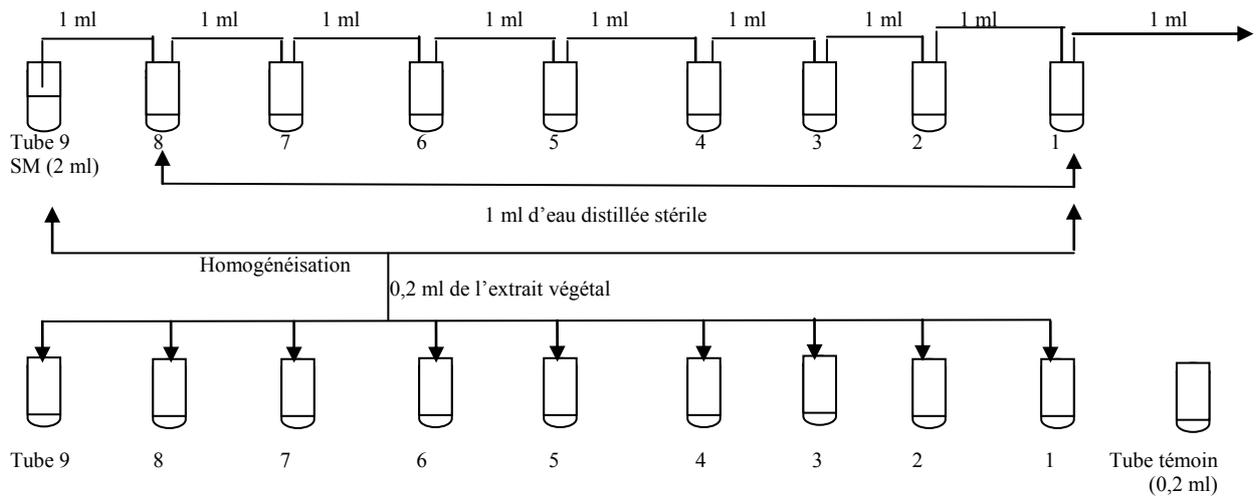
En clair, il faut dire que l'étape de dilution du bouillon inoculé réparti dans les tubes expérimentaux et de leur ensemencement a permis d'avoir une idée du nombre de bactéries présentes dans l'inoculum pur réparti dans la **série test**, c'est à dire savoir si les conditions standard (opalescence comprise entre  $5.10^5$  et  $5.10^7$  bactéries survivantes/ml) a été respectée (NASSIF *et al.*, 1990).

Ces méthodes par dilution sont résumées comme suit sur la figure 7:

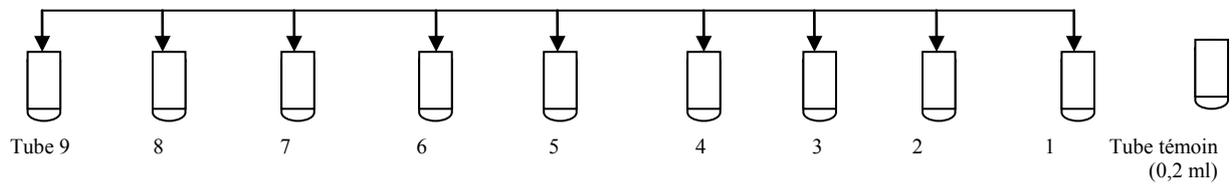
## Préparation des bouillons inoculés



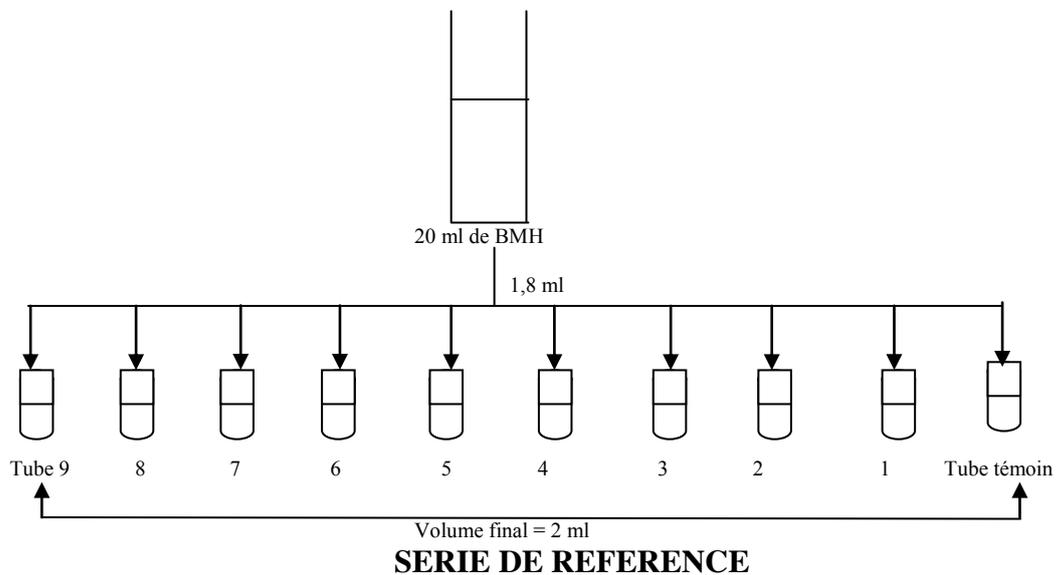
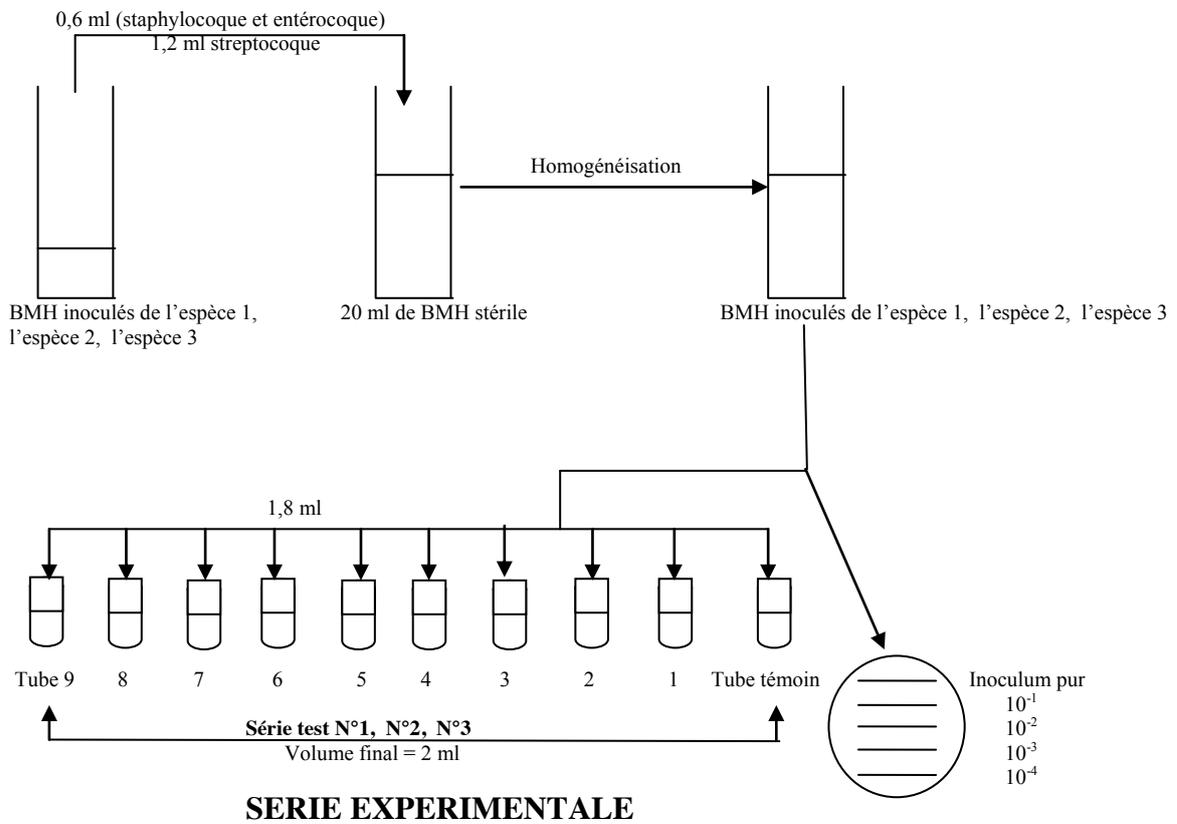
**Préparation des gammes de concentrations**



**SERIE EXPERIMENTALE série test N°1, N°2, N°3**



**SERIE DE REFERENCE**



**Figure 7: Méthodes par dilution**

### **3<sup>e</sup> jour**

Après 18 à 24 heures d'incubation, toutes les cultures réalisées à partir des bouillons inoculés purs avec leurs dilutions successivesensemencés sur des boîtes gélosées sur les stries ont été conservées entre 4°C et -10°C.

Par ailleurs, la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide a été réalisée par lecture directe, à l'œil nu, à la lumière du jour. Cette concentration a été définie de manière précise en comparant concentration par concentration, tube par tube, la turbidité dans chaque tube de la **série test** avec celle correspondant de la **série de référence**, à la recherche d'une absence de turbidité. Elle a été donnée par la concentration du premier tube où la culture n'est pas trouble (MARMONIER, 1990).

A ce stade du travail, pour avoir une idée de l'évolution des bactéries en présence ou en absence des différentes gammes de concentrations des extraits de MISCA utilisés, deux expériences distinctes ont été effectuées.

### **1<sup>ère</sup> expérience**

Elle consiste à ensemencer individuellement sur des boîtes gélosées de Mueller-Hinton, les différentes cultures (culture dans chaque tube expérimental). Ces cultures ont été réalisées à partir d'une espèce bactérienne de la souche à tester. Ces ensemencements ont été effectués sur des boîtes gélosées sur des stries de 5 cm à l'aide d'une anse calibrée.

- Pour les souches de staphylocoques méticillino-résistantes et celles d'entérocoques, les boîtes de Pétri contenaient la gélose Mueller-Hinton simple.
- Pour les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques, à la gélose de Mueller-Hinton a été additionnée de 10% de sang frais de mouton défibriné stérile, puis coulée dans des boîtes de Pétri.

Sur chaque boîte gélosée ensemencée, il y a l'inoculum du tube témoin de contrôle de croissance, les inocula où la turbidité n'a pas été visible et quelques inocula précédents (charges bactériennes plus élevées) celui du tube qui a permis de déterminer la CMI.

Les différents ensemencements ont été incubés à:

- 37°C pour les souches de staphylocoques méticillino-résistantes et celles d'entérocoques,
- 37°C sous enceinte humide pour les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques pendant 18 à 24 heures.

## **2<sup>e</sup> expérience**

Dans la mesure où le bouillon nutritif utilisé (bouillon de Mueller-Hinton) est un milieu favorable à la croissance des germes, il est sûr et certain que l'opalescence qui était comprise entre  $5.10^5$  et  $5.10^7$  bactéries /ml (bouillon inoculé réparti dans les tubes expérimentaux) va évoluer après 18 à 24 heures d'incubation et ce en présence ou en absence des diverses gammes de concentrations des extraits de MISCA utilisés. Par conséquent, pour mieux apprécier la sensibilité de ces souches bactériennes en présence ou en absence des diverses gammes de concentrations des extraits de MISCA utilisés, l'ensemble des cultures d'une **série test** obtenues à partir d'une espèce bactérienne de la souche à tester ont été isolées. Elles ont été ensuite diluées de 10 en 10 selon une progression géométrique de raison  $10^{-1}$ . L'ensemble inoculum pur et ses dilutions successives ont été agitées sur le vortex, puis individuellement ensemencées sur des boîtes gélosées, sur des stries de 5 cm à l'aide d'une anse calibrée sur des:

- boîtes gélosées de Mueller-Hinton simple pour les souches de staphylocoques méticillino-résistantes et celles d'entérocoques,

➤ boîtes gélosées de Mueller-Hinton au sang pour les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques.

Tous ces ensemencements ont été ensuite incubés à:

- 37°C pour les souches de staphylocoques et celles d'entérocoques
- 37°C sous enceinte humide pour les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques durant 18 à 24 heures.

Par ailleurs, le choix de cette série de culture a été effectué sur la base de l'inoculum pur ayant respecté le mieux les conditions standard décrites plus haut (opalescence comprise entre  $5.10^5$  et  $5.10^7$  bactéries /ml). C'est à dire l'inoculum ayant laissé à la dilution  $10^{-4}$  moins de colonies (moins de 10 colonies) (NASSIF *et al.*, 1990).

## **4<sup>e</sup> jour**

### **Numération en milieu solide par ensemencement en surface**

#### **Technique à l'anse calibrée**

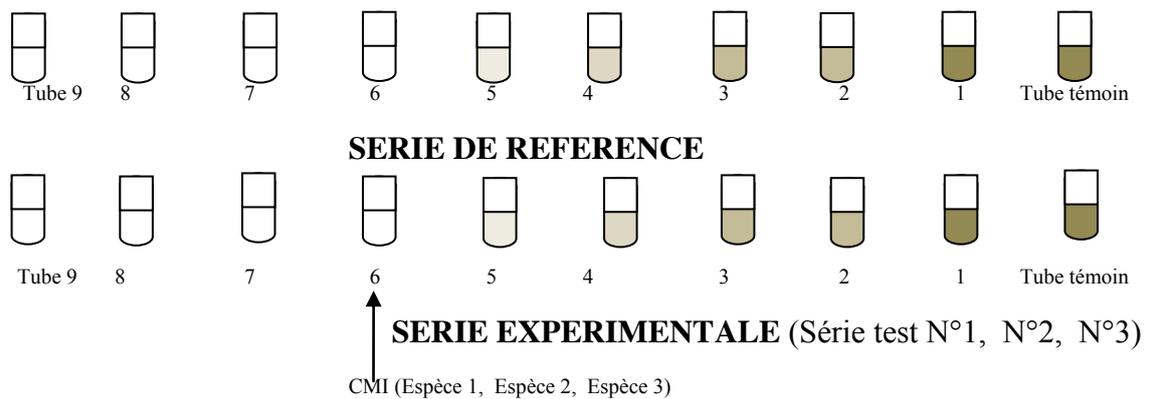
Après 18 à 24 heures d'incubation; le dénombrement des bactéries survivantes par tube (en présence ou en absence des extraits de MISCA) a été effectué en établissant une relation entre le diamètre de l'anse calibrée utilisée (2,1 mm), le volume prélevé (3  $\mu$ l), le nombre de bactéries dénombrées sur la dernière strie et les dilutions successives réalisées pour obtenir ces colonies isolées. Tous les volumes ont été exprimés en millilitre et la formule de calcul a été résumée comme suit:

$$\text{Nombre de Bactéries} = \text{Nombre de colonies} \times 1 \text{ ml/ volume prélevé}$$

La détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) a été possible en comparant le nombre de bactéries survivantes dans chaque tube de la **série test** avec le tube témoin de contrôle de croissance. En vérité, elle a été identifiée en cherchant à connaître la concentration laissant tout au plus 0,01% de survivants par rapport au tube témoin de contrôle de croissance (sans extrait de MISCA) (SIROT, 1990).

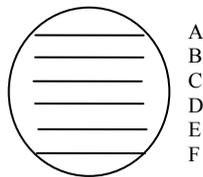
La représentation schématique de cette méthode est donnée par la figure 8.

### Détermination de la CMI



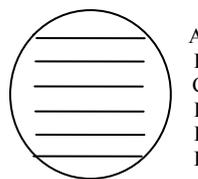
## Détermination de la CMB

### 1<sup>ère</sup> expérience



SERIE TEST N°1

A: Inoculum pur



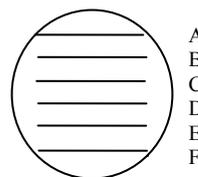
SERIE TEST N°2

B: Inoculum du tube 5

C: Inoculum du tube 6

D: Inoculum du tube 7

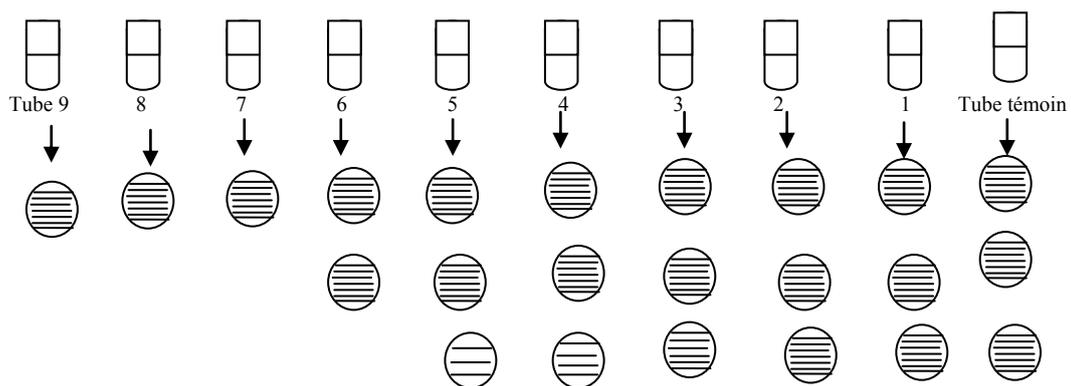
E: Inoculum du tube 8



SERIE TEST N°3

F: Inoculum du tube 9

### 2<sup>e</sup> expérience



SERIE TEST N°1

Figure 8: Méthode de détermination de la CMI et de la CMB

### **2-3.2.1 Test de survivance des souches de staphylocoques méticillino-résistantes en présence de MISCA**

Les gammes de concentrations de chaque extrait utilisé ont été préparées en milieu liquide selon la méthode de la double dilution. Ces concentrations varient de:

- 100 mg/ml à 0,39 mg/ml pour l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq),
- 25 mg/ml à 0,39 mg/ml pour l'extrait éthanolique 70% de MISCA (MISCA-70Et),
- 200 mg/ml à 12,5 mg/ml pour l'extrait résiduel 70% de MISCA (MISCA-70R),
- 25 mg/ml à 0,39 mg/ml pour l'extrait éthanolique 100% de MISCA (MISCA-100Et),
- 25 mg/ml à 0,39 mg/ml pour le surnageant de l'acétate d'éthyle 50% (MISCA-Ac<sup>+</sup>),
- 25 mg/ml à 0,39 mg/ml pour le dépôt du butanol 50% (MISCA-But<sup>-</sup>),
- 12,5 mg/ml à 0,05 mg/ml pour l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>),

### **2-3.2.2 Test de survivance des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques en présence de MISCA**

Pour la détermination des paramètres anti-bactériens des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques en milieu liquide par la technique de la double dilution, les gammes de concentrations de chaque extrait de MISCA testé ont été préparées et varient de:

- 200 mg/ml à 3,13 mg/ml pour l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq),
- 50 mg/ml à 0,1 mg/ml pour l'extrait éthanolique 70% et 100% de MISCA (MISCA-70Et),
- 200 mg/ml à 3,13 mg/ml pour l'extrait résiduel 70% de MISCA (MISCA-70R),
- 50 mg/ml à 0,1 mg/ml pour le surnageant de l'acétate d'éthyle 50% (MISCA-Ac<sup>+</sup>),
- 50 mg/ml à 0,1 mg/ml pour le dépôt du butanol 50% (MISCA-But<sup>-</sup>),
- 12,5 mg/ml à 0,05 mg/ml l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>),

### **2-3.2.3 Test de survivance des souches d'entérocoques en présence de MISCA**

Les paramètres anti-bactériens ont été déterminés en préparant en milieu liquide par la méthode de la double dilution des gammes de concentrations de chaque extrait utilisé allant de:

- 100 mg/ml à 3,13 mg/ml pour l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq),
- 100 mg/ml à 1,56 mg/ml pour l'extrait éthanolique 70% de MISCA (MISCA-70Et),
- 200 mg/ml à 6,25 mg/ml pour l'extrait résiduel 70% de MISCA (MISCA-70R),
- 100 mg/ml à 1,56 mg/ml pour l'extrait éthanolique 100% de MISCA (MISCA-100Et),
- 100 mg/ml à 3,13 mg/ml pour le surnageant de l'acétate d'éthyle 50% (MISCA-Ac<sup>+</sup>),
- 100 mg/ml à 3,13 mg/ml pour le dépôt du butanol 50% (MISCA-But<sup>-</sup>),
- 50 mg/ml à 0,1 mg/ml pour l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>),

En fait, quel que soit l'extrait et la souche bactérienne considérés, un test expérimental a été réalisé avec 3 différentes espèces de la souche bactérienne à tester. Une espèce bactérienne donnée a servi à la préparation d'un bouillon inoculé précis. Le bouillon inoculé obtenu a été réparti dans une série de tubes de la **série test** au contact ou non des différentes gammes de concentrations des divers extraits de MISCA testés. Ainsi, chaque test expérimental a été constitué de **3 séries tests** distinctes de cultures réalisées par 3 espèces différentes de la souche bactérienne à tester. Chaque bouillon inoculé obtenu à partir d'une espèce bactérienne donnée a été ensuite dilué de 10 en 10 jusqu'à 10<sup>-5</sup> selon une progression géométrique de raison 10<sup>-1</sup>.

L'inoculum pur et ses différentes dilutions ont été par la suiteensemencés sur la même boîte gélosée. Ainsi, pour les 3 espèces bactériennes, 3 différentes boîtes gélosées ont été utilisées.

Après l'incubation, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée et la valeur obtenue s'est avérée la même pour les 3 espèces bactériennes utilisées par test expérimental. Les cultures obtenues sur les 3 différentes boîtes gélosées ont été quantifiées, retirées de l'étuve, ensuite conservées entre 4 et -10°C. Le test expérimental a été répété 4 fois de suite. Au cours d'un test expérimental donné, 3 espèces différentes de la souche bactérienne à tester ont toujours été utilisées.

Cependant, au cours de 3 tests expérimentaux consécutifs, 3 dénombrements successifs ont été effectués, afin de permettre de connaître la moyenne de colonies dénombrées. C'est la moyenne des bactéries dénombrées après les 3 dénombrements successifs, qui a permis de déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB). Cette détermination a été possible en comparant la moyenne des bactéries survivantes des tubes expérimentaux avec celles du tube témoin de contrôle de croissance.

La représentation graphique des moyennes des charges bactériennes des diverses espèces bactériennes a permis de déterminer, la  $CI_{50}$  de chaque extrait de MISCA testé sur la croissance *in vitro* des dites espèces bactériennes utilisées. L'écart très grand des valeurs des concentrations de chaque extrait testé a poussé à utiliser les valeurs logarithmiques des différentes concentrations testées. Cependant, il faut dire que la  $CI_{50}$  de chaque extrait testé a été initialement déterminée graphiquement sur papier millimétré.

Le 4<sup>e</sup> et dernier test expérimental a été considéré comme test de confirmation de la valeur de la CMI identifiée.

En somme, au cours des tests expérimentaux, 12 (3x4) différentes espèces de la souche bactérienne à tester ont été utilisées en raison de 3 espèces bactériennes par test expérimental et par extrait. Puisque, 5 extraits (MISCA-Aq, MISCA-70Et, MISCA-70R, MISCA-100Et et MISCA-But<sup>+</sup>) ont été testés sur la croissance *in vitro* de la souche bactérienne à étudier, et ont permis de déterminer les paramètres anti-bactériens (CMI, CMB et CI<sub>50</sub>), cela veut dire que 60 (12x5) espèces bactériennes ont été utilisées en raison de 12 par extrait testé et par souche bactérienne considérée.

Le test du surnageant de l'acétate d'éthyle 50% et du dépôt du butanol 50% (respectivement MISCA-Ac<sup>+</sup> et MISCA-But<sup>-</sup>) a obéi au même principe et a permis de uniquement déterminer la CMI à cause du constat de la faible action de ces extraits sur les différentes souches bactériennes testées.

Par conséquent, le test des 7 extraits (MISCA-Aq, MISCA-70Et, MISCA-70R, MISCA-100Et, MISCA-Ac<sup>+</sup>, MISCA-But<sup>-</sup> et MISCA-But<sup>+</sup>) sur la croissance *in vitro* des différentes souches bactériennes a nécessité en tout et pour tout 84 (12x7) espèces par souche bactérienne.

Cependant, pour l'acide fusidique, des gammes de concentrations allant de 500 µg/ml à 3,91 µg/ml ont été utilisées et testées simultanément sur 3 les espèces différentes de la souche bactérienne (staphylocoque, streptocoque ou entérocoque) à étudier.

## **2-4 Dénombrement des germes**

Après 24 heures d'incubation, les colonies ont été dénombrées par comptage direct. Et la croissance des germes du tube de chaque série expérimentale a été évaluée en pourcentage de survivance, calculée par rapport à 100% de survivance dans le tube témoin de croissance.

La méthode de calcul du pourcentage de survivance des germes dans les tubes expérimentaux peut se résumer par la formule suivante:

$$S = \frac{n}{N} \cdot 100$$

S: survivance des germes (exprimée en pourcentage)

N: nombre de colonies dans le tube témoin de croissance

n: nombre de colonies dans les tubes expérimentaux

L'analyse des résultats a permis, non seulement de tracer les courbes de sensibilité des germes aux différents extraits utilisés mais aussi de déterminer les paramètres suivants:

➤ CMI: concentration minimale inhibitrice

✓ Selon MARMONIER (1990); c'est la plus petite concentration d'antibiotique (substance) inhibant toute croissance visible de germe. Ainsi, la CMI apparaît comme un point limite macroscopique aisément lisible mais peu précis.

✓ Selon SIROT (1990); c'est la plus faible concentration d'antibiotique (substance) inhibant toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures. C'est le point limite universellement utilisé pour caractériser l'activité d'un antibiotique (substance).

- CMB: la concentration minimale bactéricide est la concentration d'antibiotique (substance) permettant d'obtenir, après 18 heures de contact, un taux de survivance inférieur ou égal à 0,01% de l'inoculum initial (soit 1 bactérie pour 10000). La détermination de ce pourcentage de survivants dépend pour une large part, des conditions de préparation de l'inoculum, de la méthode utilisée et de la quantité de milieu prélevée pour les subcultures nécessaires au dénombrement des survivants (SIROT, 1990),
- $CI_{50}$  : la concentration d'antibiotique inhibant 50% de la population bactérienne étudiée (SIROT, 1990).

Pendant les différentes phases expérimentales, l'évaluation de l'activité anti-bactérienne *in vitro* des substances (extraits de MISCA et acide fusidique) sur ces germes a été effectuée dans des conditions d'asepsie c'est à dire soit sous une hotte type "Telstar AV-100" possédant un bec électrique (fireboy plus IBS) ou près d'une flamme de bec Bunsen.

## **2-5 Tri phytochimique des différents extraits de MISCA testés**

### **2-5.1 Mise en évidence des alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont caractérisés par le fait qu'ils ont la propriété de se lier aux métaux lourds (bismuth, iode, mercure, tungstène...) et précipiter sous forme de sels lourds. Les métaux lourds utilisés dans les réactifs servant à leur caractérisation sont:

- ✓ Réactif de Dragendorff (iode, bismuth),
- ✓ Réactif de Bouchardat (iode),
- ✓ Réactif de Valser-Mayer.

Dans cette étude la mise en évidence s'est faite par les réactifs de Dragendorff et de Bouchardât. Une quantité de 0,5 g de l'extrait de MISCA a été dissoute dans 10 ml d'alcool 60°. Le volume de 4 ml de la solution obtenue a été reparti dans 2 tubes à essai. Dans l'un des tubes, quelques gouttes de réactif de Dragendorff ont été ajoutées et l'observation de précipités orangés indique la présence d'alcaloïdes. Dans l'autre, 2 à 3 gouttes de réactif de Bouchardat ont été additionnées et l'apparition de coloration brun-rougeâtre indique une réaction positive. Un essai témoin a été réalisé avec de la quinine.

## **2-5.2 Mise en évidence des tanins**

La réaction de Stiasny au formol chlorhydrique permet de distinguer les tanins cathéchiqes (par précipitation), des tanins galliques par saturation à l'acétate de sodium. A 10 mg de l'extrait de MISCA a été ajouté 10 ml de réactif de Stiasny. Le mélange a été porté au Bain Marie à 80 °C pendant 30 minutes. Après refroidissement sous un courant d'eau, l'observation de précipités en gros flocons brun-clairs caractérise les tanins cathéchiqes. Après filtration qui enlève les flocons, le filtrat a été saturé avec de l'acétate de sodium. L'addition de quelques gouttes de chlorure ferrique 2% a fait apparaître une coloration bleu-noire indiquant la présence de tanins galliques. Un essai témoin a été réalisé avec l'acide gallique.

### **2-5.3 Mise en évidence des polyphénols**

Les polyphénols sont caractérisés par la réaction au chlorure ferrique. L'appréciation de la coloration met en évidence la formation de complexe avec l'ion ferrique. A 2 ml de solution, ont été ajoutées quelques gouttes de solution alcoolique de chlorure ferrique 2%. L'apparition de coloration bleu-noire ou verte plus ou moins foncée indique la présence de dérivés polyphénoliques. Un essai témoin a été réalisé avec une solution de phénol.

### **2-5.4 Mise en évidence des flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont caractérisés par la réaction à la cyanidine dont le principe est basé sur le fait que, les hétérosides flavoniques en solution alcoolique et en présence d'hydrogène naissant donnent des dérivés diversement colorés en fonction de la structure chimique des flavonoïdes. Ainsi, les flavones donnent une coloration orange, les flavonols donnent une coloration rouge, les flavonones donnent une coloration rouge-orangé.

Pour mettre en évidence, ces flavonoïdes, 10 mg de l'extrait de MISCA a été solubilisée dans 5 ml d'alcool chlorhydrique 2 fois dilué. Le tout a été renversé dans un tube à essai; puis 2 à 3 copeaux de magnésium y ont été ajoutés. L'addition de quelques gouttes d'iso amyl alcool fait apparaître une coloration rouge-orangé en présence de flavonoïdes.

### **2-5.5 Mise en évidence des quinones**

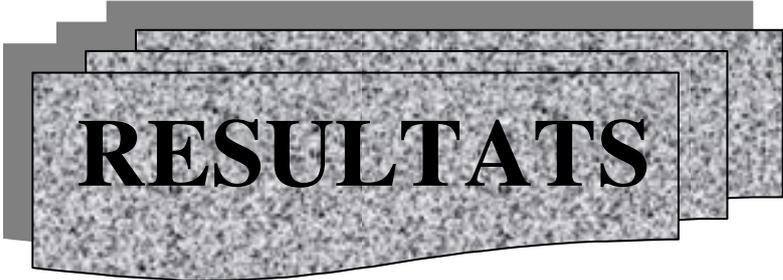
La caractérisation des quinones s'est faite à l'aide de la réaction de Borntraeger. Elle est fondée sur le fait qu'ils donnent sous l'action de lessive alcaline ajoutée en faible quantité (ammoniaque, soude, eau de chaux), une coloration rouge cerise. Pour les quinones liées, à 2,5 ml de solution, le volume de 1,5 ml de réactif de Borntraeger a été additionné. Une coloration rouge ou rouge violacée indique la présence de quinones liées. Pour les quinones combinées, 2,5 ml de solution a été mis dans un tube à essai, puis 0,5 ml de réactif de Borntraeger a été ajouté. Après agitation énergique pendant 2 minutes, la solution obtenue a été laissée au repos quelques minutes à la température ambiante. L'apparition d'une coloration violée indique un test positif. Un test témoin a été réalisé avec une molécule de vitamine E.

### **2-5.6 Mise en évidence des saponosides**

La caractérisation des saponosides est basée sur leur propriété physique. Ils ont en effet, un indice de mousse très élevé, ce qui explique le fait que les solutions aqueuses qui les contiennent moussent après agitation. Le volume de 3 ml de solution aqueuse est mis dans un tube à essai. Celui-ci a été ensuite bouché avec le pouce et agité fortement pendant 1 minute. Puis un temps de repos de 15 minutes a été observé. La persistance d'une mousse supérieure à 1 cm de hauteur indique la présence des saponines.

## **2-5.7 Mise en évidence des terpènes et des stérols**

La réaction de Liebermann permet de caractériser les terpènes et les stérols. Ils sont mis en évidence par une coloration mauve (violet pâle) virant au vert du fait de la transformation de ces composés chromogènes en composés colorés par l'acide sulfurique. Une quantité de 0,2 g de l'extrait de MISCA a été mise à macérer dans 5 ml d'éther éthylique pendant 30 minutes. Le macérat obtenu a été filtré et évaporé. Le résidu a été dissout dans 0,5 ml d'anhydride acétique. L'addition de 2 gouttes d'acide sulfurique pur montre en présence de composés polystéroliques et terpéniques, une coloration mauve virant au vert. Un essai témoin a été réalisé avec de la progestérone.



# RESULTATS

# **1- Sensibilité des souches de staphylocoques méticillino- sensibles ou méticillino- résistantes aux différents extraits de MISCA et à l'acide fusidique**

### **1-1 Action de l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq) sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-sensibles ou méticillino-réistantes par la méthode des disques**



- ✓ au centre l'oxacilline (Ox),
- ✓ tout autour les concentrations d'extrait total aqueux allant de 3,13 mg/ml à 200 mg/ml dans le sens des aiguilles d'une montre,
- ✓ entre la concentration 3,13 et 200 mg/ml, la pénicilline G (P).

**Figure 9: Action de MISCA-Aq sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-sensibles par la méthode des disques**

La figure 9 présente les résultats comparés de l'action de l'extrait total aqueux de MISCA avec les effets des antibiotiques de référence (oxacilline: Ox et pénicilline G: P) sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-sensibles. Sur cette figure, le disque d'oxacilline (Ox) se trouve au centre et autour de ce dernier, sont disposés dans le sens des aiguilles d'une montre, les autres substances dont la pénicilline G (P) et différentes concentrations de l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq) allant de 3,13 mg/ml à 200 mg/ml. Autour de la plupart des disques, il y a la présence de zones d'inhibition. L'étendue d'une zone d'inhibition varie selon la substance utilisée et sa concentration. En fait, elles représentent, les zones des activités inhibitrices des substances contenues dans les divers disques.

Il faut également remarquer que la zone d'inhibition décrite autour du disque d'oxacilline est plus étendue que celles des autres substances.

Pour MISCA-Aq, il est à remarquer que les diamètres des zones d'inhibition augmentent au fur et mesure que les concentrations de cet extrait deviennent importantes.

De même, il est aussi à constater que les zones d'inhibition décrites autour des disques de référence utilisés (oxicilline et pénicilline) sont depourvues de colonies, contrairement à celles décrites autour des différentes gammes de concentration de MISCA-Aq.



- ✓ au centre l'oxacilline (Ox),
- ✓ tout autour les concentrations d'extrait total aqueux allant de 3,13 mg/ml à 200 mg/ml dans le sens des aiguilles d'une montre,
- ✓ entre la concentration 3,13 et 200 mg/ml, la pénicilline G (P).

**Figure 10: Action de MISCA-Aq sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes par la méthode des disques**

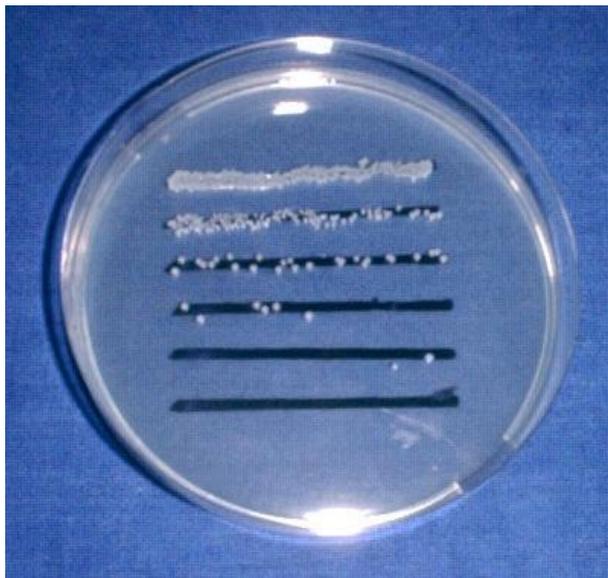
La figure 10 résume l'action de l'oxacilline, de la pénicilline et des différentes gammes de concentration de MISCA-Aq sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes. Sur la figure, les mêmes phénomènes de la figure 9 sont observés, à savoir, la présence des zones d'inhibition autour des disques d'Ox (oxacilline), de P (pénicilline G) et quelques disques imprégnés de MISCA-Aq (12,5 mg/ml à 200 mg/ml). De plus, les zones d'inhibition constatées autour du disque Ox, P et de la concentration 50 mg/ml de MISCA-Aq sont dépourvues de colonies; ce qui n'est pas le cas des autres concentrations de MISCA-Aq. Cependant, il faut remarquer que pour toutes les substances testées, les zones d'inhibition sont moins étendues (diamètres d'inhibition sont plus petits) que celles de l'action de MISCA-Aq sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-sensibles c'est-à-dire celles obtenues sur la figure 9.

Les résultats obtenus sur les 2 figures attestent que l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq) testé a une activité anti-bactérienne sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques (mécicilino-résistantes et mécticillino-sensibles).

Dans la mesure où le disque d'oxacilline était plus stable en culture *in vitro* que le disque de mécticilline, et que le diamètre d'inhibition obtenue autour du disque d'oxacilline est plus grand (= 18 mm > 12 mm de la valeur de référence) pour la souche staphylocoque de la figure 9 que celui de la figure 10 (= 11 mm < 12 mm de la valeur de référence), il est possible de dire que la souche de staphylocoque de la figure 9 est beaucoup plus sensible à l'oxacilline que celle de la figure 10. Par conséquent, la souche de staphylocoque de la figure 9 peut être nommée souche de staphylocoque mécticillino-sensible, alors que celle de figure 10, staphylocoque mécticillino-résistante. C'est sur la base de ce résultat qu'a été opéré le choix de poursuivre, les tests d'évaluation de l'activité anti-bactérienne des différents extraits de MISCA utilisés par les méthodes par dilution (milieu liquide et sur milieu solide) sur uniquement la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques mécticillino-résistantes. Ce choix se justifie par l'incidence clinique qu'ont ces dites souches en pathologie humaine cutanée.

## **1-2 Action des différents extraits de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches par les méthodes par dilution**

### **1-2.1 Détermination de la charge bactérienne de l'inoculum réparti dans les tubes expérimentaux**



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur ( $10^0$ ) 100% de survivants,
- ✓ inoculum ( $10^{-1}$ ) 10% de survivants,
- ✓ inoculum ( $10^{-2}$ ) 1% de survivants,
- ✓ inoculum ( $10^{-3}$ ) 0,1% de survivants,
- ✓ inoculum ( $10^{-4}$ ) 0,01% de survivants
- ✓ inoculum ( $10^{-5}$ ) 0,001% de survivants

**Figure 11: Bouillon inoculé de la souche de staphylocoque méticillino-résistante**

La figure 11 représente la culture sur des stries du bouillon inoculé de la souche de staphylocoque méticillino-résistante réparti dans les tubes expérimentaux (milieu liquide) au contact ou non des diverses gammes de concentrations des différents extraits de MISCA et de l'acide fusidique testés. Cette figure révèle qu'il y a deux colonies survivantes sur la strie à la dilution  $10^{-4}$ , ce qui correspond au plus à 0,01% de survivants après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C.

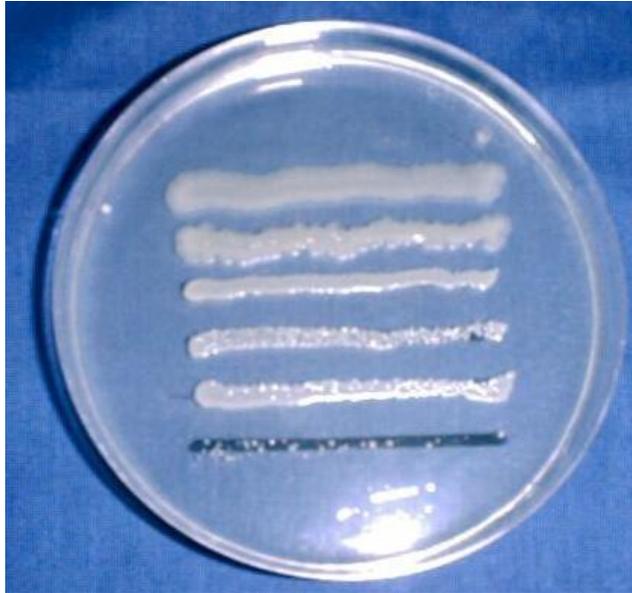
## **1-2.2 Aspect des cultures bactériennes après incubation en milieu liquide et repiquage sur milieu solide**

### **1-2.2.1 Aspect des cultures bactériennes en milieu liquide**

Après avoir incubé, à 30°C pendant 18 à 24 heures les ensembles: bouillons inoculés- différentes gammes de concentrations des extraits de MISCA, l'absence de turbidité a été remarquée pour chaque extrait utilisé à partir de la concentration de:

- 6,25 mg/ml pour MISCA-Aq,
- 3,13 mg/ml pour MISCA-70Et,
- 100 mg/ml pour MISCA-70R,
- 3,13 mg/ml pour MISCA-100Et,
- 1,56 mg/ml pour MISCA-Ac<sup>+</sup>,
- 1,56 mg/ml pour MISCA-But<sup>-</sup>,
- 0,78 mg/ml pour MISCA-But<sup>+</sup>.

### 1-2.2.2 Aspect des cultures bactériennes après repiquage sur milieu solide



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur sans MISCA-Aq
- ✓ inoculum avec 6,25 mg/ml
- ✓ inoculum avec 12,5 mg/ml
- ✓ inoculum avec 25 mg/ml
- ✓ inoculum avec 50 mg/ml
- ✓ inoculum avec 100 mg/ml

**Figure 12: Action de MISCA-Aq sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes**

La figure 12 résume les résultats de l'action de l'extrait total aqueux de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes. Sur la figure, il est observé du haut vers le bas sur les stries:

- un inoculum pur sans extrait végétal qui sert de témoin de contrôle de croissance.
- l'aspect donné par cet inoculum pur au contact de concentrations de plus en plus élevées des extraits de MISCA.

Les cultures obtenues sur les différentes stries au contact des concentrations de plus en plus élevées de MISCA, ont des croissances bactériennes qui se présentent généralement, sous des formes de nappes de colonies plus ou moins denses selon la concentration de l'extrait utilisée.

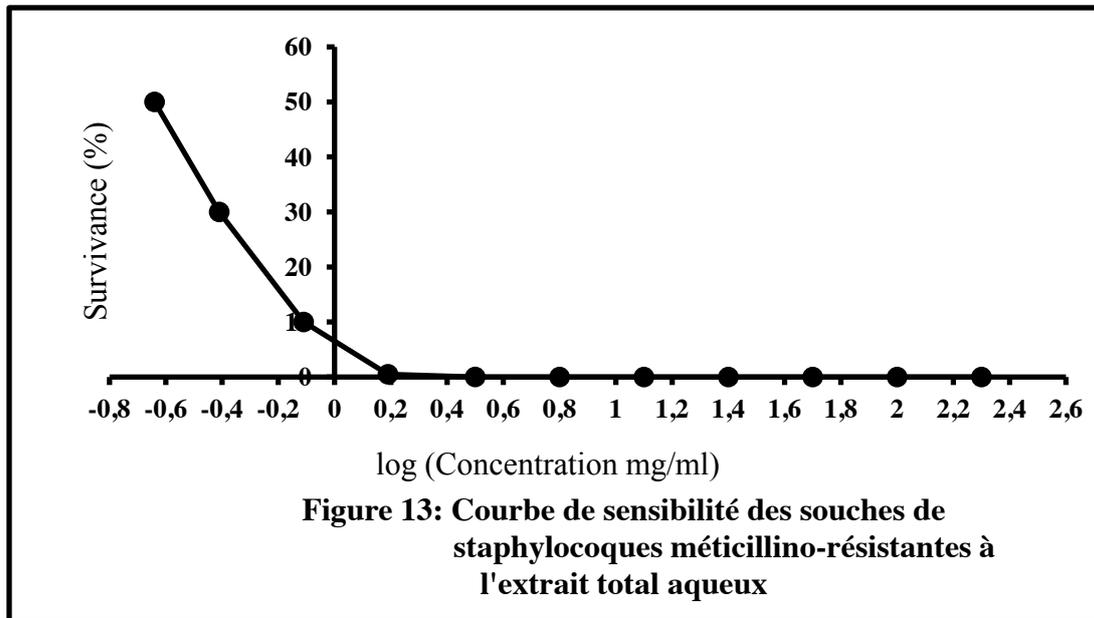
A la concentration de 100 mg/ml de cet extrait, la croissance bactérienne présente un aspect de colonies isolées sur la strie.

**Tableau I: Evolution des colonies de staphylocoques méticillino-résistantes (SAMR) en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-Aq**

	Concentration de l'extrait (mg/ml) dans le milieu liquide									
	Témoin de croissance (0)	0,39	0,78	1,56	<b>3,13</b>	6,25	12,5	25	50	100
log (concentration)		-0,41	-0,11	0,19	0,5	0,8	1,1	1,4	1,7	2
1 <sup>er</sup> dénombrement	1,5 10 <sup>18</sup>	8,33 10 <sup>16</sup>	7,33 10 <sup>15</sup>	5,67 10 <sup>15</sup>	3,1 10 <sup>15</sup>	4 10 <sup>12</sup>	10 <sup>12</sup>	4 10 <sup>11</sup>	10 <sup>11</sup>	1,2 10 <sup>8</sup>
2 <sup>e</sup> dénombrement	2,83 10 <sup>20</sup>	1,1 10 <sup>19</sup>	8,33 10 <sup>17</sup>	1,33 10 <sup>16</sup>	3,33 10 <sup>14</sup>	1,83 10 <sup>14</sup>	3,33 10 <sup>13</sup>	2,67 10 <sup>13</sup>	6,67 10 <sup>10</sup>	3,33 10 <sup>10</sup>
3 <sup>e</sup> dénombrement	10 <sup>20</sup>	6,67 10 <sup>19</sup>	3 10 <sup>19</sup>	1,37 10 <sup>18</sup>	2,67 10 <sup>16</sup>	6,67 10 <sup>14</sup>	2,33 10 <sup>14</sup>	3,33 10 <sup>11</sup>	3,33 10 <sup>7</sup>	3,33 10 <sup>5</sup>
Nb. Moy. de Bact. Dénombrées	10 <sup>20</sup>	3 10 <sup>19</sup>	10 <sup>19</sup>	5 10 <sup>17</sup>	10 <sup>16</sup>	3 10 <sup>14</sup>	9 10 <sup>13</sup>	9 10 <sup>12</sup>	6 10 <sup>10</sup>	2 10 <sup>8</sup>
Pourcentage de survivance (%)	100	30	10	0,5	<b>0,01</b>	0	0	0	0	0
Pourcentage d'inhibition (%)	0	70	90	99,5	<b>99,99</b>	100	100	100	100	100

Dans les tableaux I à V sont rapportés les résultats des dénombrements des souches de staphylocoques méticillino-résistantes. Les résultats obtenus montrent la variation des colonies (charges bactériennes) en milieu liquide au contact ou non de différentes gammes de concentrations des extraits de MISCA. Les tableaux comportent 3 dénombrements successifs avec leur moyenne. Les résultats des différents tableaux révèlent que, les charges bactériennes varient en fonction des extraits et des concentrations utilisés. Pour tous les extraits, il est à noter que comparativement au tube du témoin de contrôle de croissance, les charges bactériennes dans les autres tubes diminuent progressivement avec l'augmentation de la concentration des extraits de MISCA. Toutefois, cette diminution devient importante avec les extraits de plus en plus purs (extraits les plus améliorés) de MISCA.

Ainsi pour MISCA-Aq, la moyenne de la charge bactérienne du tube témoin est de  $10^{20}$  de staphylocoques méticillino-résistants et les autres tubes ont des charges de bactéries survivantes allant de  $3.10^{19}$  (pour le tube de concentration 0,39 mg/ml) à  $2.10^8$  (pour le tube de concentration 100 mg/ml). Lorsque la diminution des charges bactériennes est rapportée en pourcentage de survivance, la charge ( $10^{20}$ ) du tube témoin représente 100% de survivance et la charge  $2.10^8$  du tube de concentration 100 mg/ml représente 0% de survivance. Cette diminution transite par la survivance 0,01% qui correspond au tube de concentration 3,13 mg/ml. A partir du tube de concentration 6,25 mg/ml de l'extrait, l'inhibition 100% est atteinte (Tableau I).



La figure 13 représente la courbe des actions des différentes concentrations de l'extrait total aqueux de MISCA sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes. C'est une courbe logarithmique qui tient compte des concentrations de la  $CI_{50}$  jusqu'aux concentrations élevées de l'extrait. La courbe décrite sur la figure est donc décroissante et commence de la survivance 50% jusqu'à la survivance 0% sur l'axe des abscisses. Elle se confond à l'axe des abscisses dans la zone positive de la représentation graphique. La partie de la courbe présente dans la zone négative est obtenue à partir des plus faibles valeurs de concentrations de l'extrait.



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur sans MISCAs-70Et
- ✓ inoculum avec 1,56 mg/ml
- ✓ inoculum avec 3,13 mg/ml
- ✓ inoculum avec 6,25 mg/ml
- ✓ inoculum avec 12,5 mg/ml
- ✓ inoculum avec 25 mg/ml

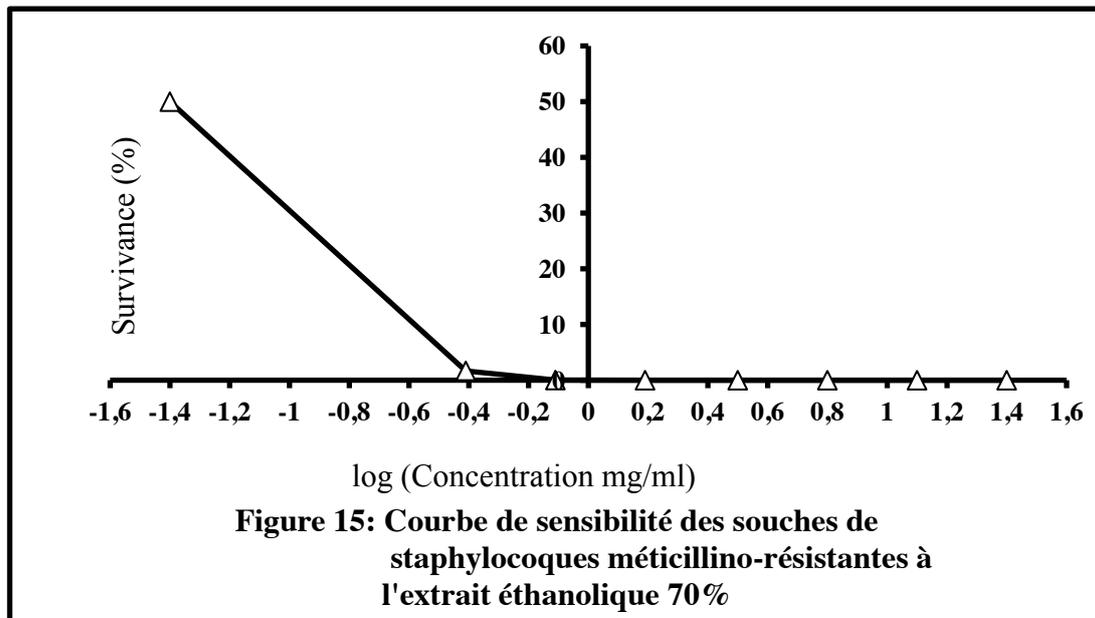
**Figure 14: Action de MISCAs-70Et sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes**

Sur la figure 14 qui est le résultat de l'action de l'extrait éthanolique 70% de MISCAs sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes, les mêmes phénomènes de croissances bactériennes en nappes de colonies sur les différentes stries sont observés. Cependant, il est à constater qu'à la concentration de 25 mg/ml de cet extrait, il y a environ 2 fois moins de colonies sur la strie qu'à la concentration de 12,5 mg/ml.

**Tableau II: Evolution des colonies de staphylocoques méticillino-résistantes (SAMR) en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-70Et**

	Concentration de l'extrait (mg/ml) dans le milieu liquide							
	Témoin de croissance (0)	0,39	0,78	<b>1,56</b>	3,13	6,25	12,5	25
log (concentration)		-0,41	-0,11	0,19	0,5	0,8	1,1	1,4
1 <sup>er</sup> dénombrement	1,33 10 <sup>19</sup>	10 <sup>18</sup>	1,67 10 <sup>16</sup>	1,67 10 <sup>15</sup>	6,67 10 <sup>13</sup>	3,33 10 <sup>8</sup>	4,33 10 <sup>4</sup>	0
2 <sup>e</sup> dénombrement	9 10 <sup>19</sup>	1,5 10 <sup>18</sup>	1,77 10 <sup>17</sup>	1,43 10 <sup>16</sup>	1,43 10 <sup>14</sup>	8,33 10 <sup>11</sup>	3,33 10 <sup>4</sup>	0
3 <sup>e</sup> dénombrement	6,67 10 <sup>20</sup>	1,23 10 <sup>19</sup>	8 10 <sup>16</sup>	6,67 10 <sup>15</sup>	5 10 <sup>11</sup>	5 10 <sup>7</sup>	1,67 10 <sup>5</sup>	6,67 10 <sup>4</sup>
Nb. Moy. de Bact. dénombrées	3 10 <sup>20</sup>	5 10 <sup>18</sup>	9 10 <sup>16</sup>	8 10 <sup>15</sup>	7 10 <sup>13</sup>	3 10 <sup>11</sup>	8 10 <sup>4</sup>	2 10 <sup>4</sup>
Pourcentage de survivance (%)	100	1,67	0,03	<b>3</b> <b>10<sup>-3</sup></b>	0	0	0	0
Pourcentage d'inhibition (%)	0	98,33	99,97	<b>99,997</b>	100	100	100	100

Pour MISCA-70Et, les mêmes phénomènes de diminution de la charge bactérienne en fonction de l'augmentation des concentrations de l'extrait sont constatés. Ici, la moyenne de la charge bactérienne du tube témoin est de  $3 \cdot 10^{20}$  de staphylocoques méticillino-résistants survivants et représente 100% de survivance. Cette charge bactérienne diminue graduellement, elle passe de  $5 \cdot 10^{18}$  soit 1,67% de survivance pour le tube de concentration 0,39 mg/ml à  $2 \cdot 10^4$  bactéries survivantes soit 0% de survivance pour le tube de concentration 25 mg/ml. Cette baisse de survivance atteint 0,01% dans le tube de concentration 1,56 mg/ml. La survivance 0% pour cet extrait est atteinte à partir du tube de concentration 3,13 mg/ml (Tableau II).



La figure 15 décrit les actions qu'ont eues les diverses concentrations de l'extrait éthanolique 70% de MISCA sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes. Sur la figure, les mêmes observations que celles de la figure 13 sont faites c'est-à-dire, une décroissance de la courbe d'action de l'extrait testé de la survivance 50% jusqu'à s'annuler sur l'axe des abscisses à la survivance 0%. Elle commence à se confondre à l'axe des abscisses déjà dans la zone négative de la représentation graphique. Dans cette zone négative, se trouve les plus faibles valeurs de concentrations de l'extrait.



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur sans MISCA-100Et
- ✓ inoculum avec 1,56 mg/ml
- ✓ inoculum avec 3,13 mg/ml
- ✓ inoculum avec 6,25 mg/ml
- ✓ inoculum avec 12,5 mg/ml
- ✓ inoculum avec 25 mg/ml

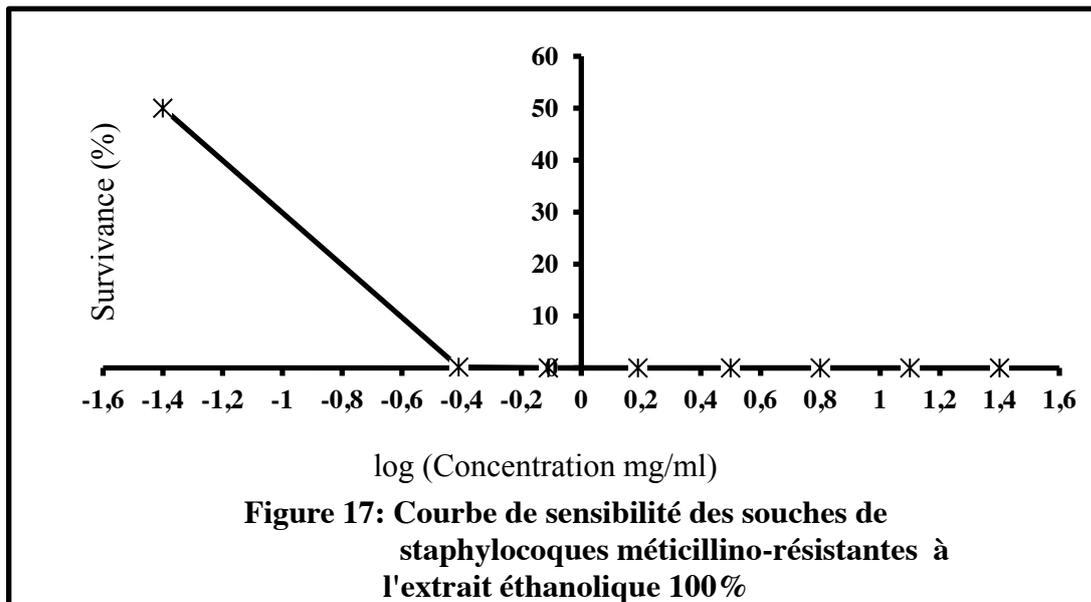
**Figure 16: Action de MISCA-100Et sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes**

L'action de l'extrait éthanolique 100% de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes est donnée par la figure 16. Elle révèle que les colonies isolées apparaissent sur la strie, déjà, à partir de la concentration de 3,13 mg/ml de l'extrait. Puis, elles deviennent moins importantes sur les autres stries avec l'augmentation de la concentration de cet extrait. Ainsi, à la concentration de 25 mg/ml de l'extrait, il est à remarquer qu'il y a environ 3 fois moins de colonies sur la strie qu'à la concentration de 12,5 mg/ml.

**Tableau III: Evolution des colonies de staphylocoques méticillino-résistantes (SAMR) en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-100Et**

	Concentration de l'extrait (mg/ml) dans le milieu liquide							
	Témoin de croissance (0)	0,39	<b>0,78</b>	1,56	3,13	6,25	12,5	25
log (concentration)		-0,41	-0,11	0,19	0,5	0,8	1,1	1,4
1 <sup>er</sup> dénombrement	7 10 <sup>20</sup>	9 10 <sup>17</sup>	5,33 10 <sup>15</sup>	2 10 <sup>13</sup>	4 10 <sup>10</sup>	10 <sup>7</sup>	3,33 10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
2 <sup>e</sup> dénombrement	3 10 <sup>20</sup>	2 10 <sup>17</sup>	10 <sup>15</sup>	4,33 10 <sup>13</sup>	6 10 <sup>11</sup>	6,67 10 <sup>9</sup>	6 10 <sup>4</sup>	3 10 <sup>3</sup>
3 <sup>e</sup> dénombrement	10 <sup>20</sup>	4 10 <sup>17</sup>	2,67 10 <sup>15</sup>	3 10 <sup>13</sup>	10 <sup>10</sup>	3 10 <sup>8</sup>	4 10 <sup>4</sup>	2 10 <sup>3</sup>
Nb. Moy. de Bact. Dénombrées	3 10 <sup>20</sup>	5 10 <sup>17</sup>	9 10 <sup>15</sup>	3 10 <sup>13</sup>	2 10 <sup>11</sup>	2 10 <sup>9</sup>	4 10 <sup>4</sup>	2 10 <sup>3</sup>
Pourcentage de survivance (%)	100	0,167	<b>3 10<sup>-3</sup></b>	0	0	0	0	0
Pourcentage d'inhibition (%)	0	99,833	<b>99,997</b>	100	100	100	100	100

Pour MISCA-100Et, le tube témoin de contrôle de croissance (100% de survivance) correspond à  $3 \cdot 10^{20}$  de staphylocoques méticillino-résistants survivants (0% d'inhibition). Le taux d'inhibition de 99,99% est donné par le tube de concentration 0,78 mg/ml avec  $9 \cdot 10^{15}$  bactéries survivantes. A partir du tube de concentration 1,56 mg/ml, il y a un taux d'inhibition de 100% (Tableau III).



La figure 17 qui donne un aperçu de la courbe des actions qu'ont eues les différentes concentrations de l'extrait éthanolique 100% de MISCA sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes, permet de constater que la courbe est décroissante de la survivance 50% jusqu'à la survivance 0% avec la présence d'une partie de la courbe dans la zone négative de la représentation graphique. La courbe commence également à se confondre à l'axe des abscisses déjà dans la zone négative de la représentation graphique.



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur sans MISCA-But<sup>+</sup>
- ✓ inoculum avec 0,78 mg/ml
- ✓ inoculum avec 1,56 mg/ml
- ✓ inoculum avec 3,13 mg/ml
- ✓ inoculum avec 6,25 mg/ml
- ✓ inoculum avec 12,5 mg/ml

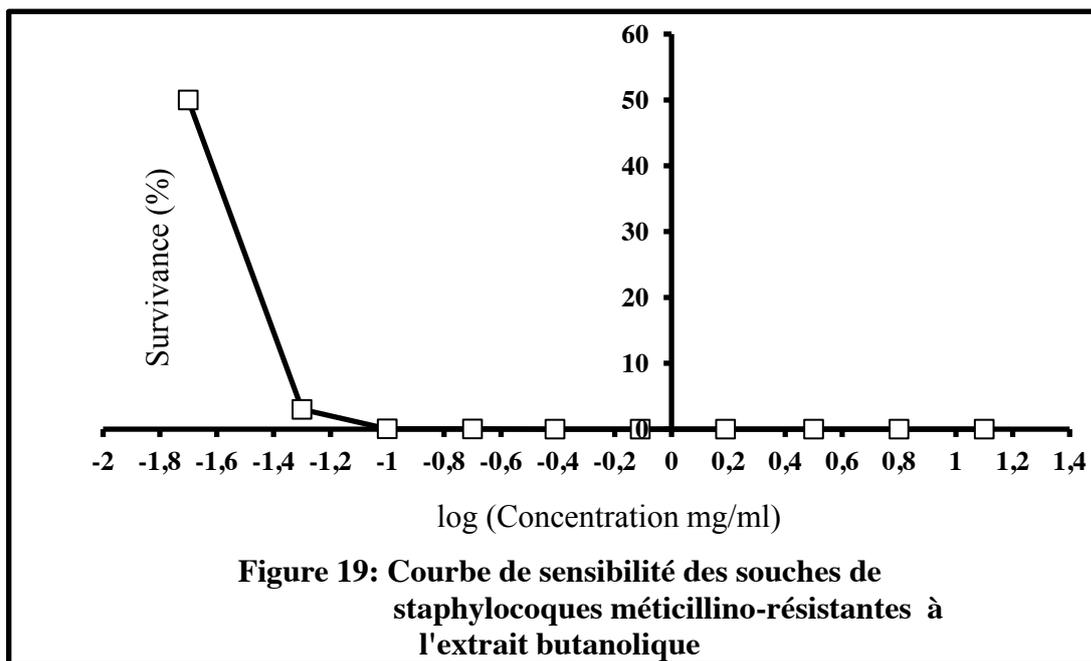
**Figure 18: Action de MISCA-But<sup>+</sup> sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes**

Sur la figure 18, se trouve le résultat de l'action de l'extrait butanolique de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes. Elle montre que déjà à la concentration de 1,56 mg/ml de cet extrait, il y a des colonies isolées sur la strie. Les colonies diminuent progressivement avec l'augmentation de la concentration de l'extrait jusqu'à leur disparition totale à la concentration de 12,5 mg/ml.

**Tableau IV: Evolution des colonies de staphylocoques méticillino-résistants (SAMR) en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-But<sup>+</sup>**

	Concentration de l'extrait (mg/ml) dans le milieu liquide									
	Témoin de croissance (0)	0,05	0,1	<b>0,2</b>	0,39	0,78	1,56	3,13	6,25	12,5
log (concentration)		-1,3	-1	-0,7	-0,41	-0,11	0,19	0,5	0,8	1,1
1 <sup>er</sup> dénombrement	9 10 <sup>19</sup>	5,33 10 <sup>17</sup>	4,33 10 <sup>16</sup>	5,33 10 <sup>15</sup>	1,9 10 <sup>8</sup>	4 10 <sup>6</sup>	4 10 <sup>3</sup>	9 10 <sup>2</sup>	9 10 <sup>2</sup>	0
2 <sup>e</sup> dénombrement	3,33 10 <sup>20</sup>	3,33 10 <sup>18</sup>	1,67 10 <sup>17</sup>	3,33 10 <sup>15</sup>	3,33 10 <sup>13</sup>	3,33 10 <sup>4</sup>	3,33 10 <sup>2</sup>	0	0	0
3 <sup>e</sup> dénombrement	2,67 10 <sup>20</sup>	1,33 10 <sup>19</sup>	10 <sup>17</sup>	10 <sup>16</sup>	2 10 <sup>15</sup>	4 10 <sup>8</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	0	0
Nb. Moy. de Bact. Dénombrées	2 10 <sup>20</sup>	6 10 <sup>18</sup>	10 <sup>17</sup>	6 10 <sup>15</sup>	7 10 <sup>14</sup>	10 <sup>8</sup>	8 10 <sup>3</sup>	3 10 <sup>2</sup>	3 10 <sup>2</sup>	0
Pourcentage de survivance (%)	100	3	0,05	<b>3</b> <b>10<sup>-3</sup></b>	0	0	0	0	0	0
Pourcentage d'inhibition (%)	0	97	99,95	<b>99,997</b>	100	100	100	100	100	100

Pour MISCA-But<sup>+</sup>, 100% de survivance du tube témoin correspond à  $2.10^{20}$  de staphylocoques méticillino-résistants survivants. Le tube de concentration 0,05 mg/ml donne une inhibition de 97% et laisse une survivance de 3% avec  $6.10^{18}$  bactéries survivantes. L'inhibition de 99,99% est atteinte avec le tube de concentration 0,2 mg/ml. A cette concentration, MISCA-But<sup>+</sup> laisse  $6.10^{15}$  bactéries survivantes. L'inhibition de 100% est atteinte à partir du tube de concentration 0,39 mg/ml de cet extrait (Tableau IV).

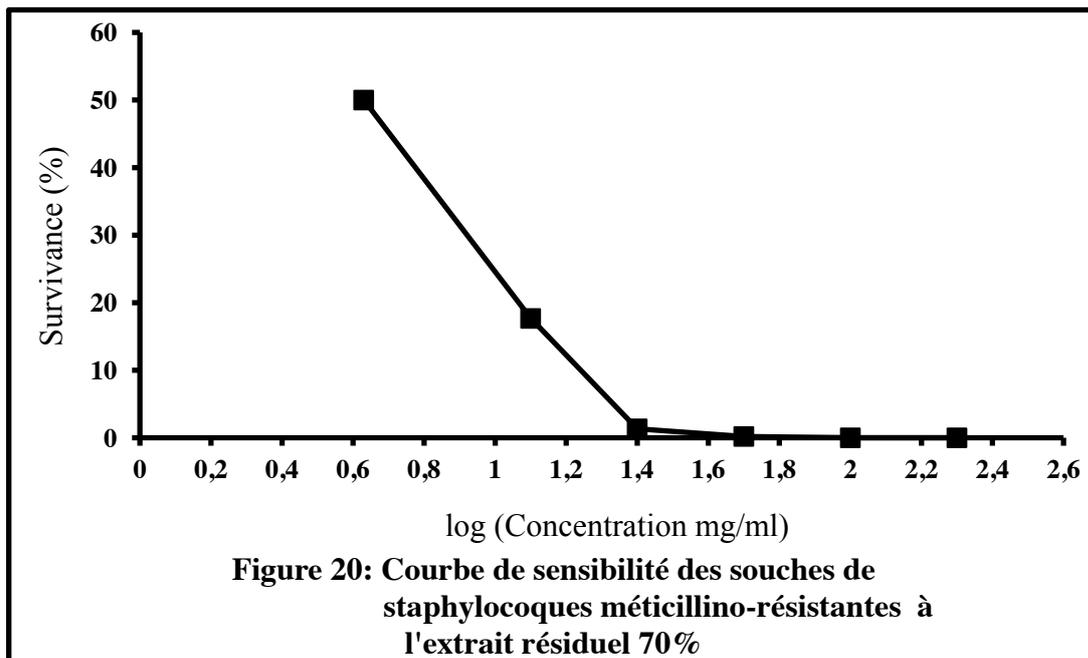


L'action des diverses concentrations de l'extrait butanolique de MISCA sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes est présentée par la figure 19, sur laquelle, les mêmes observations que celles des figures 15 et 17 sont faites.

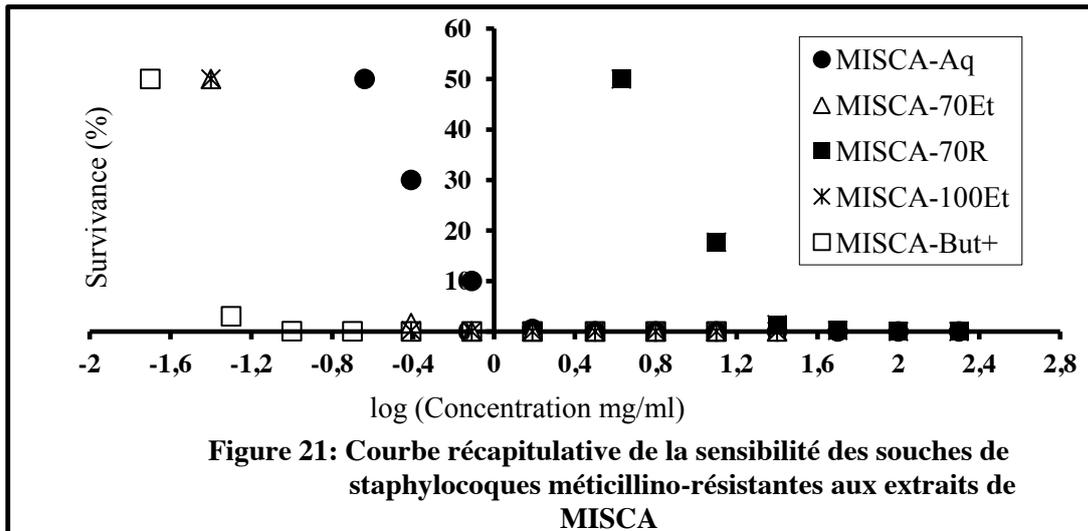
**Tableau V: Evolution des colonies de staphylocoques méticillino-résistantes (SAMR) en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-70R**

	Concentration de l'extrait (mg/ml) dans le milieu liquide					
	Témoin de croissance (0)	12,5	25	50	<b>100</b>	200
log (concentration)		1,1	1,4	1,7	2	2,3
1 <sup>er</sup> dénombrement	$10^{20}$	$4,83 \cdot 10^{19}$	$1,67 \cdot 10^{18}$	$4 \cdot 10^{17}$	$4,33 \cdot 10^5$	$1,73 \cdot 10^{14}$
2 <sup>e</sup> dénombrement	$9 \cdot 10^{21}$	$1,33 \cdot 10^{21}$	$10^{20}$	$1,6 \cdot 10^{19}$	$3,33 \cdot 10^{16}$	$8 \cdot 10^6$
3 <sup>e</sup> dénombrement	$9 \cdot 10^{20}$	$10^{20}$	$10^{19}$	$10^{18}$	$3 \cdot 10^{15}$	$6 \cdot 10^{10}$
Nb. Moy. de Bact. Dénombrées	$3 \cdot 10^{21}$	$5 \cdot 10^{20}$	$4 \cdot 10^{19}$	$6 \cdot 10^{18}$	$10^{16}$	$6 \cdot 10^{13}$
Pourcentage de survivance (%)	100	17,67	1,33	0,2	<b><math>10^{-3}</math></b>	0
Pourcentage d'inhibition (%)	0	82,33	98,67	99,8	<b>99,999</b>	100

Enfin pour MISCA-70R, il est à noter que la moyenne de la charge bactérienne du tube témoin est de  $3 \cdot 10^{21}$  de staphylocoques méticillino-résistants survivants. Le tube de concentration 12,5 mg/ml laisse  $5 \cdot 10^{20}$  bactéries survivantes soit une survivance de 17,67%, ce qui correspond à 82,33% d'inhibition. L'inhibition 99,99% est obtenue par le tube de concentration 100 mg/ml et l'inhibition 100% dans le tube de concentration 200mg/ml (Tableau V).



La courbe d'action des différentes concentrations de l'extrait résiduel 70% de MISCA sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes est donnée par la figure 20. Sur la figure, une décroissance de la courbe d'action de cet extrait de la survivance 50% jusqu'à la survivance 0% est observée. Cependant, contrairement aux courbes des figures 13, 15, 17 et 19, celle de la figure 20 se trouve dans la zone positive de la représentation graphique.



La figure 21 est un récapitulatif de l'ensemble des courbes des actions qu'ont eues les diverses concentrations des 5 extraits de MISCA sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes. Ce sont des courbes logarithmiques qui tiennent compte des concentrations à partir de la  $CI_{50}$  jusqu'aux concentrations élevées des extraits. Sur la figure, 2 genres de courbes sont observés:

- ✓ des courbes situées dans la zone négative,
- ✓ et une courbe située dans la zone positive de la représentation graphique.

Toutes les courbes situées dans la zone négative sont celles qui possèdent les plus faibles valeurs de paramètres anti-bactériens. La courbe située dans la zone positive possède, quant à elle, les valeurs de paramètres anti-bactériens les plus élevées. Cependant, les valeurs de MISCA-But<sup>+</sup> (extrait butanolique de MISCA) sont plus faibles que celles de MISCA-100Et (extrait éthanolique 100% de MISCA). Alors que celles de MISCA-100Et (extrait éthanolique 100% de MISCA) et de MISCA-70Et (extrait éthanolique 70% de MISCA) sont sensiblement égales. De toutes les courbes situées dans la zone négative de la représentation graphique, seule celle décrite par MISCA-Aq (extrait total aqueux de MISCA) possède les valeurs de paramètres anti-bactériens les plus élevées. L'extrait résiduel 70% de MISCA a donné la seule courbe située dans la zone positive de la représentation graphique.

**Tableau récapitulatif VI: Valeurs de paramètres anti-bactériens des 5 extraits de MISCA**

	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CI <sub>50</sub> (mg/ml)
MISCA-70R	100	100	4,31
MISCA-Aq	6,25	3,13	0,23
MISCA-70Et	3,13	1,56	0,04
MISCA-100Et	3,13	0,78	0,04
MISCA-But <sup>+</sup>	0,78	0,2	0,02

Le tableau VI est un récapitulatif des valeurs de paramètres (CMI, CMB et CI<sub>50</sub>) anti-bactériens obtenus pendant les tests expérimentaux.

Si les valeurs de paramètres anti-bactériens consignées dans le tableau VI sont prises pour base, et que des rapports sont établis entre les valeurs de paramètres anti-bactériens d'un extrait donné avec celles d'un autre extrait, les observations suivantes peuvent être faites:

### **Comparaison des valeurs paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-70Et**

- ✓  $CMI_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-70Et} = 6,25/3,13 = 2,$
- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-70Et} = 3,13/1,56 = 2,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-Aq}/CI_{50\ MISCA-70Et} = 0,23/0,04 = 6.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-70R**

- ✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-Aq} = 100/6,25 = 16,$
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-Aq} = 100/3,13 = 32,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-70R}/CI_{50\ MISCA-Aq} = 4,31/0,23 = 19.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-100Et**

- ✓  $CMI_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-100Et} = 6,25/3,13 = 2,$
- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-100Et} = 3,13/0,78 = 4,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-Aq}/CI_{50\ MISCA-100Et} = 0,23/0,04 = 6.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-Ac<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-Ac^+} = 6,25/1,56 = 4.$

### **Comparaison des valeurs paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-But<sup>-</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-But^-} = 6,25/1,56 = 4.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-But<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-But^+} = 6,25/0,78 = 8,$
- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-But^+} = 3,13/0,2 = 16,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-Aq}/CI_{50\ MISCA-But^+} = 0,23/0,02 = 12.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70Et et MISCA-70R**

- ✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-70Et} = 100/3,13 = 32,$
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-70Et} = 100/1,56 = 64,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-70R}/CI_{50\ MISCA-70Et} = 4,31/0,04 = 108.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70Et et MISCA-100Et**

- ✓  $CMI_{MISCA-70Et}/CMI_{MISCA-100Et} = 3,13/3,13 = 1,$
- ✓  $CMB_{MISCA-70Et}/CMB_{MISCA-100Et} = 1,56/0,78 = 2,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-70Et}/CI_{50\ MISCA-100Et} = 0,04/0,04 = 1.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70Et et MISCA-Ac<sup>+</sup>**

✓  $CMI_{MISCA-70Et}/CMI_{MISCA-Ac^+} = 3,13/1,56 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70Et et MISCA-But<sup>-</sup>**

✓  $CMI_{MISCA-70Et}/CMI_{MISCA-But^-} = 3,13/1,56 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70Et et MISCA-But<sup>+</sup>**

✓  $CMI_{MISCA-70Et}/CMI_{MISCA-But^+} = 3,13/0,78 = 4,$

✓  $CMB_{MISCA-70Et}/CMB_{MISCA-But^+} = 1,56/0,2 = 8,$

✓  $CI_{50\ MISCA-70Et}/CI_{50\ MISCA-But^+} = 0,04/0,02 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70R et MISCA-100Et**

✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-100Et} = 100/3,13 = 32,$

✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-100Et} = 100/0,78 = 128,$

✓  $CI_{50\ MISCA-70R}/CI_{50\ MISCA-100Et} = 4,31/0,04 = 108.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70R et MISCA-Ac<sup>+</sup>**

✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-Ac^+} = 100/1,56 = 64.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70R et MISCA-But<sup>-</sup>**

✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-But^-} = 100/1,56 = 64.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70R et MISCA-But<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-But^+} = 100/0,78 = 128,$
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-But^+} = 100/0,2 = 500,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-70R}/CI_{50\ MISCA-But^+} = 4,31/0,02 = 216.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-100Et et MISCA-Ac<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-100Et}/CMI_{MISCA-Ac^+} = 3,13/1,56 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-100Et et MISCA-But<sup>-</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-100Et}/CMI_{MISCA-But^-} = 3,13/1,56 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-100Et et MISCA-But<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-100Et}/CMI_{MISCA-But^+} = 3,13/0,78 = 4,$
- ✓  $CMB_{MISCA-100Et}/CMB_{MISCA-But^+} = 0,78/0,2 = 4,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-100Et}/CI_{50\ MISCA-But^+} = 0,04/0,02 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Ac<sup>+</sup> et MISCA-But<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-Ac^+}/CMI_{MISCA-But^+} = 1,56/0,78 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-But<sup>-</sup> et MISCA-But<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-But^-}/CMI_{MISCA-But^+} = 1,56/0,78 = 2.$

Les valeurs de paramètres anti-bactériens obtenues lors des tests expérimentaux et consignées dans le tableau VI attestent l'amélioration de l'activité bactéricide des différents extraits de MISCA sur les diverses souches de staphylocoques utilisées lors du passage de MISCA-Aq à MISCA-But<sup>+</sup>.

En effet, la comparaison entre elles, des CMB (concentrations minimales bactéricides) du tableau VI montrent que:

$$CMB_{MISCA-But^+} < CMB_{MISCA-100Et} < CMB_{MISCA-70Et} < CMB_{MISCA-Aq} < CMB_{MISCA-70R}$$

Il ressort de cette analyse que l'extrait le plus bactéricide est MISCA-But<sup>+</sup>, car sa valeur de CMB (0,2 mg/ml) est la plus faible. Alors que l'extrait le moins bactéricide de tous est MISCA-70R à cause de la valeur élevée de sa CMB (100 mg/ml). Entre MISCA-But<sup>+</sup> et MISCA-70R, il y a dans l'ordre décroissant de bactéricidie, MISCA-100Et (0,78 mg/ml), MISCA-70Et (1,56 mg/ml) et MISCA-Aq (3,13 mg/ml).

De plus, lorsque les valeurs des concentrations minimales bactéricides (CMB) des extraits de MISCA testés sont comparées entre elles, il est remarqué que:

- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-But^+} = 100/0,2 = 500$ ; MISCA-But<sup>+</sup> est 500 fois plus bactéricide que MISCA-70R.
- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-But^+} = 3,13/0,2 = 16$ ; MISCA-But<sup>+</sup> est 16 fois plus bactéricide que MISCA-Aq.
- ✓  $CMB_{MISCA-70Et}/CMB_{MISCA-But^+} = 1,56/0,2 = 8$ ; MISCA-But<sup>+</sup> est 8 fois plus bactéricide que MISCA-70Et.
- ✓  $CMB_{MISCA-100Et}/CMB_{MISCA-But^+} = 0,78/0,2 = 4$ ; MISCA-But<sup>+</sup> est 4 fois plus bactéricide que MISCA-100Et.
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-100Et} = 100/0,78 = 128$ ; MISCA-100Et est 128 fois plus bactéricide que MISCA-70R.

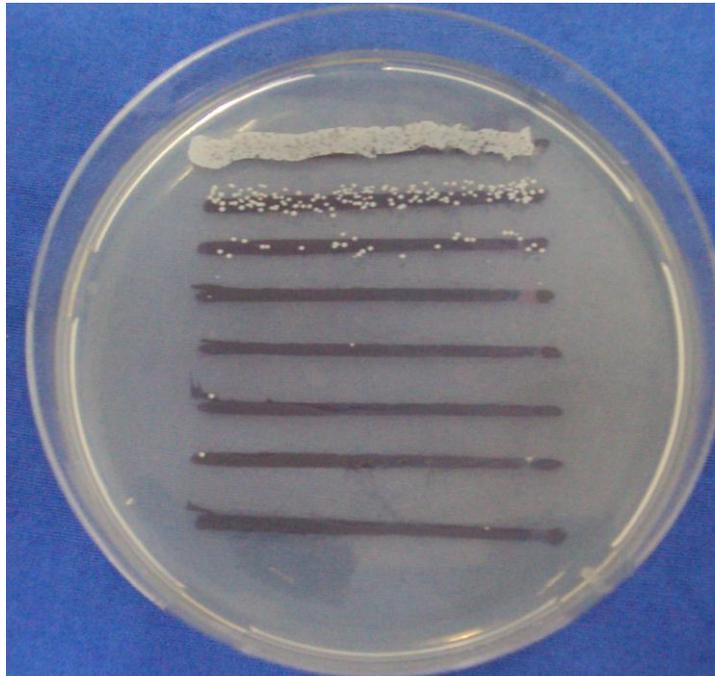
- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-100Et} = 3,13/0,78 = 4$ ; MISCA-100Et est 4 fois plus bactéricide que MISCA-Aq.
- ✓  $CMB_{MISCA-70Et}/CMB_{MISCA-100Et} = 1,56/0,78 = 2$ ; MISCA-100Et est 2 fois plus bactéricide que MISCA-70Et.
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-70Et} = 100/1,56 = 64$ ; MISCA-70Et est 64 fois plus bactéricide que MISCA-70R.
- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-70Et} = 3,13/1,56 = 2$ ; MISCA-70Et est 2 fois plus bactéricide que MISCA-Aq.
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-Aq} = 100/3,13 = 32$ ; MISCA-Aq est 32 fois plus bactéricide que MISCA-70R.

Ces rapports indiquent ainsi qu'en passant de MISCA-Aq à MISCA-But<sup>+</sup>, MISCA-70Et améliore de 2 fois l'activité de l'extrait de base (MISCA-Aq), MISCA-100Et de 4 fois et MISCA-But<sup>+</sup> de 16 fois. Les résultats obtenus révèlent donc que la méthode d'extraction qui met en œuvre la partition de l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq) dans plusieurs combinaisons successives de solvants, permet une meilleure concentration des principes actifs de MISCA dans MISCA-But<sup>+</sup>.

## **1-3 Action de l'acide fusidique sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes par les méthodes par dilution**

### **1-3.1 Aspect des cultures bactériennes après incubation en milieu liquide et repiquage sur milieu solide**

Après incubation des ensembles: bouillons inoculés-diverses gammes de concentrations (500 µg/ml à 3,91 µg/ml) de l'acide fusidique à 37°C durant 18 à 24 heures, l'absence de turbidité a été visible à partir de la concentration de 7,81 µg/ml. Ensuite, les cultures bactériennes du témoin de croissance au tube de concentration 125 µg/ml ont étéensemencées sur les stries en milieu solide et incubation à nouveau à 37°C pour donner la figure 19.



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur sans Acide
- ✓ inoculum avec 1,95 µg/ml
- ✓ inoculum avec 3,91 µg/ml
- ✓ inoculum avec 7,81 µg/ml
- ✓ inoculum avec 15,63 µg/ml
- ✓ inoculum avec 31,25 µg/ml
- ✓ inoculum avec 62,5 µg/ml
- ✓ inoculum avec 125 µg/ml

**Figure 22: Action de l'acide fusidique sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes**

Elle montre les actions qu'ont eues les différentes concentrations de l'acide fusidique sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes. Elle révèle qu'à partir de la concentration 1,95 µg/ml, il y a déjà apparition de colonies isolées. Celles-ci décroissent davantage à la concentration suivante (3,91 µg/ml), puis progressivement pour s'annuler à la concentration de 125 µg/ml

#### **1-4 Action comparée de l'extrait butanolique de MISCA et de l'acide fusidique sur la croissance *in vitro* des souches**

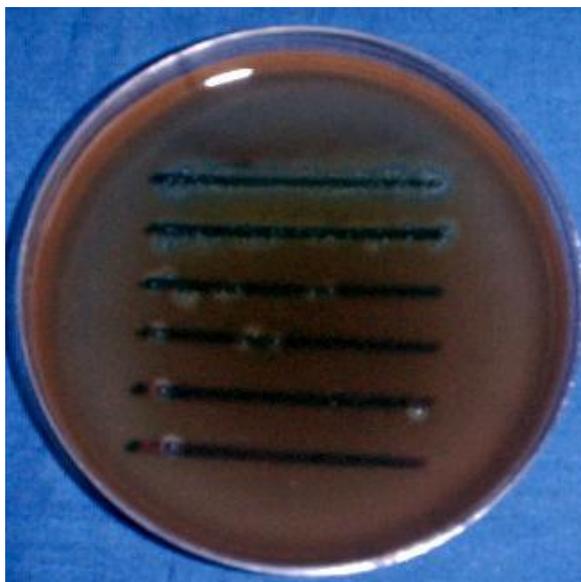
Cette action comparée révèle qu'en milieu liquide, l'absence de turbidité est observée à la concentration de 0,78 mg/ml pour l'extrait butanolique de MISCA (extrait le plus amélioré de MISCA ) et de 7,81 µg/ml pour l'acide fusidique (molécule pure). Tandis qu'en milieu solide, celle-ci montre que les colonies isolées sont visibles à 1,56 mg/ml de l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) et à 1,95 µg/ml de l'acide fusidique. Toujours en milieu solide, la disparition totale de colonies est observée à 12,5 mg/ml de l'extrait butanolique de MISCA et à 125 µg/ml de l'acide fusidique.

En dehors de ces différences majeures, il est aussi observé les mêmes phénomènes d'apparition de colonies isolées, déjà aux faibles concentrations de l'extrait butanolique de MISCA et de l'acide fusidique utilisés. Celle-ci est également suivie de disparition totale de colonies quelle que soit la substance testée.

## **2- Sensibilité des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques aux différents extraits de MISCA et à l'acide fusidique**

## **2-1 Action des différents extraits de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques par les méthodes par dilution**

### **2-1.1 Détermination de la charge bactérienne de l'inoculum réparti dans les tubes expérimentaux**



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur( $10^0$ ) 100% de survivants,
- ✓ inoculum ( $10^{-1}$ ) 10% de survivants,
- ✓ inoculum ( $10^{-2}$ ) 1% de survivants,
- ✓ inoculum ( $10^{-3}$ ) 0,1% de survivants,
- ✓ inoculum ( $10^{-4}$ ) 0,01% de survivants,
- ✓ inoculum ( $10^{-5}$ ) 0,001% de survivants.

#### **Figure 23: Bouillon inoculé de la souche de streptocoque $\beta$ hémolytique**

La figure 23 décrit le repiquage du bouillon inoculé de la souche de streptocoque  $\beta$ -hémolytique, bouillon réparti dans les tubes de la **série test**, au contact ou non des diverses gammes de concentrations des différents extraits de MISCA et de l'acide fusidique. La figure indique qu'il y a deux colonies à la dilution  $10^{-4}$  du bouillon inoculé, après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C sous enceinte humide. A cette dilution, le pourcentage se situe dans la limite au plus égale à 0,01% de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques survivants.

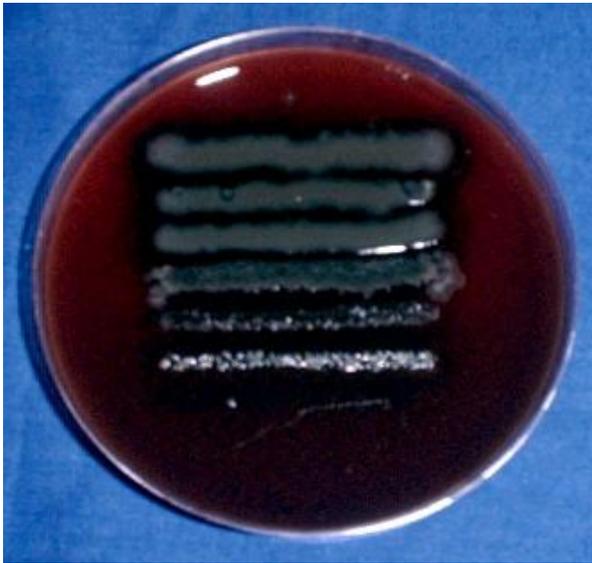
## **2-1.2 Aspect des cultures bactériennes après incubation en milieu liquide et repiquage sur milieu solide**

### **2-1.2.1 Aspect des cultures bactériennes en milieu liquide**

Après un jour d'incubation à 37°C des ensembles: bouillons inoculés-différentes gammes de concentrations des extraits de MISCA, l'absence de turbidité en milieu liquide a été observée pour chaque extrait testé à partir de la concentration de:

- 25 mg /ml pour MISCA-Aq,
- 12,5 mg /ml pour MISCA-70Et,
- 50 mg/ml pour MISCA-70R,
- 12,5 mg/ml pour MISCA-100Et,
- 6,25 mg/ml pour MISCA-Ac<sup>+</sup>,
- 6,25 mg/ml pour MISCA-But<sup>-</sup>,
- 3,13 mg/ml pour MISCA-But<sup>+</sup>.

### 2-1.2.2 Aspect des cultures bactériennes après repiquage sur milieu solide



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur sans MISCA-Aq
- ✓ inoculum avec 12,5 mg/ml
- ✓ inoculum avec 25 mg/ml
- ✓ inoculum avec 50 mg/ml
- ✓ inoculum avec 100 mg/ml
- ✓ inoculum avec 200 mg/ml

**Figure 24: Action de MISCA-Aq sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques**

Les résultats des figures 24, 26, 28 et 30 sont ceux obtenus après incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures des ensembles: bouillons inoculés-différentes gammes de concentrations des divers extraits de MISCA testés, puis ensemencement sur milieu solide et incubation à nouveau 37°C, mais cette fois-ci, sous enceinte humide.

Les résultats des différentes cultures sur les diverses stries montrent que de manière générale, il y a du haut vers le bas sur les stries:

- un inoculum pur sans extrait végétal, il sert de témoin de contrôle de croissance.
- les actions des diverses concentrations de plus en plus élevées des différents extraits de MISCA sur cet inoculum témoin.

Les cultures sur les différentes stries au contact de concentrations de plus en plus élevées de MISCA ont des croissances bactériennes qui se présentent dans la plupart des cas, sous des formes de nappes de colonies dont les épaisseurs diminuent au fur et à mesure que les concentrations des extraits augmentent.

La figure 24 qui est le résultat de l'action de l'extrait total aqueux de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques révèle qu'il y a des colonies isolées à la concentration de 200 mg/ml de cet extrait.

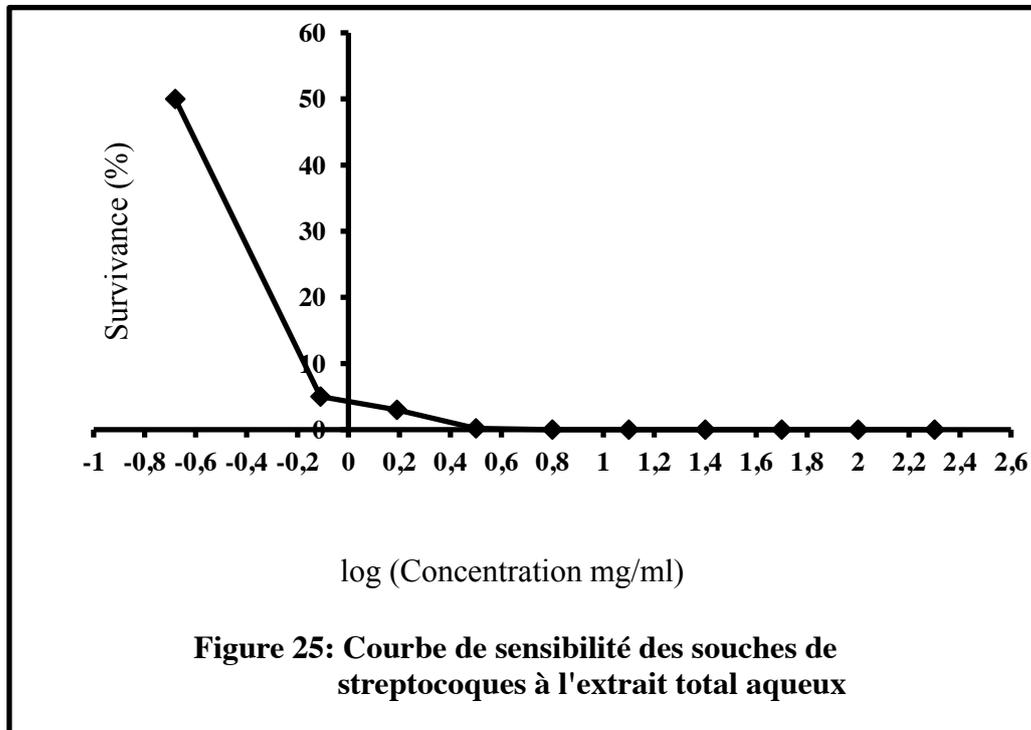
**Tableau VII: Evolution des colonies de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-Aq**

	Concentration de l'extrait (mg/ml) dans le milieu liquide									
	Témoin de croissance (0)	0,78	1,56	3,13	<b>6,25</b>	12,5	25	50	100	200
log (concentration)		-0,11	0,19	0,5	0,8	1,1	1,4	1,7	2	2,3
1 <sup>er</sup> dénombrement	1,9 10 <sup>18</sup>	1,07 10 <sup>18</sup>	1,17 10 <sup>17</sup>	10 <sup>16</sup>	1,83 10 <sup>15</sup>	1,3 10 <sup>15</sup>	10 <sup>14</sup>	5,17 10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	1,67 10 <sup>7</sup>
2 <sup>e</sup> dénombrement	8 10 <sup>20</sup>	7,33 10 <sup>19</sup>	6,67 10 <sup>19</sup>	3,33 10 <sup>18</sup>	1,33 10 <sup>17</sup>	6,67 10 <sup>16</sup>	10 <sup>16</sup>	5,67 10 <sup>13</sup>	1,33 10 <sup>12</sup>	5,33 10 <sup>9</sup>
3 <sup>e</sup> dénombrement	2,67 10 <sup>21</sup>	6,67 10 <sup>19</sup>	9,67 10 <sup>18</sup>	7,33 10 <sup>17</sup>	1,2 10 <sup>14</sup>	2,23 10 <sup>14</sup>	2 10 <sup>16</sup>	3,87 10 <sup>14</sup>	6,33 10 <sup>10</sup>	6,67 10 <sup>8</sup>
Nb. Moy. de Bact. Dénombrées	10 <sup>21</sup>	5 10 <sup>19</sup>	3 10 <sup>19</sup>	2 10 <sup>18</sup>	9 10 <sup>16</sup>	3 10 <sup>16</sup>	10 <sup>16</sup>	2 10 <sup>14</sup>	5 10 <sup>11</sup>	2 10 <sup>9</sup>
Pourcentage de survivance (%)	100	5	3	0,2	<b>9</b> <b>10<sup>-3</sup></b>	0	0	0	0	0
Pourcentage d'inhibition (%)	0	95	97	99,8	<b>99,991</b>	100	100	100	100	100

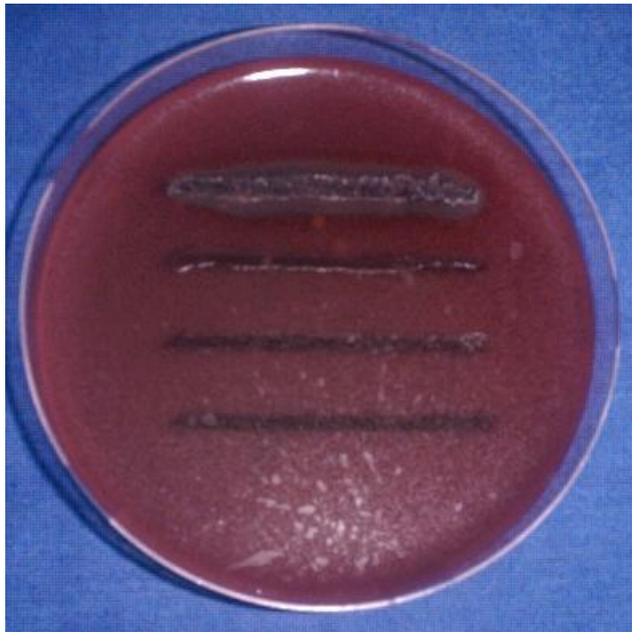
Les données du dénombrement des ensembles: bouillons inoculés-différentes gammes de concentrations des extraits de MISCA d'une souche donnée de streptocoque  $\beta$ -hémolytique de la **série test** sont consignées dans les tableaux VII à XI. Les tableaux montrent l'évolution des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques en milieu liquide en présence ou non de différentes gammes de concentrations de MISCA. Ils comportent 3 dénombrements consécutifs avec leur moyenne. Les bactéries dénombrées varient en fonction des extraits et des concentrations utilisés. Comparativement à la charge bactérienne du tube témoin de contrôle de croissance, il est à remarquer que cette charge décroît progressivement à mesure que la concentration de l'extrait augmente et ce quel que soit l'extrait de MISCA utilisé.

Cette baisse de la charge bactérienne s'accroît considérablement sous l'action des extraits de plus en plus améliorés de MISCA.

Ainsi pour MISCA-Aq, il est à constater que la moyenne du nombre de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques dénombrés du tube témoin est de  $10^{21}$  bactéries, alors que ceux des autres tubes passent de  $5.10^{19}$  bactéries pour le tube ayant la concentration de 0,78 mg/ml à  $2.10^9$  bactéries pour celui ayant la concentration de 200 mg/ml. Lorsque le nombre de la charge bactérienne moyenne est ramené en pourcentage d'inhibition, il est constaté que celui-ci ( $10^{21}$ ) du tube témoin constitue 0% d'inhibition et la charge ( $2.10^9$ ) du tube de concentration 200 mg/ml représente 100% d'inhibition. Cette augmentation du pourcentage d'inhibition passe par l'inhibition 99,99% qui correspond au tube de concentration 6,25 mg/ml. L'inhibition 100% est déjà atteinte à partir du tube de concentration 12,5 mg/ml (Tableau VII).



Sur la figure 25, il y a une courbe logarithmique qui montre les actions anti-bactériennes qu'ont eues les différentes concentrations de l'extrait total aqueux de MISCA testées sur les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques, cette courbe est décroissante. Cette décroissance commence de la survivance 50% jusqu'à la survivance 0%. La courbe se confond à l'axe des abscisses dans la zone positive de la représentation graphique. Dans la zone négative de cette représentation, se trouve les actions qu'ont eues les plus faibles valeurs de concentrations de l'extrait total aqueux de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques.



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur sans MISCA-70Et
- ✓ inoculum avec 12,5 mg/ml
- ✓ inoculum avec 25 mg/ml
- ✓ inoculum avec 50 mg/ml

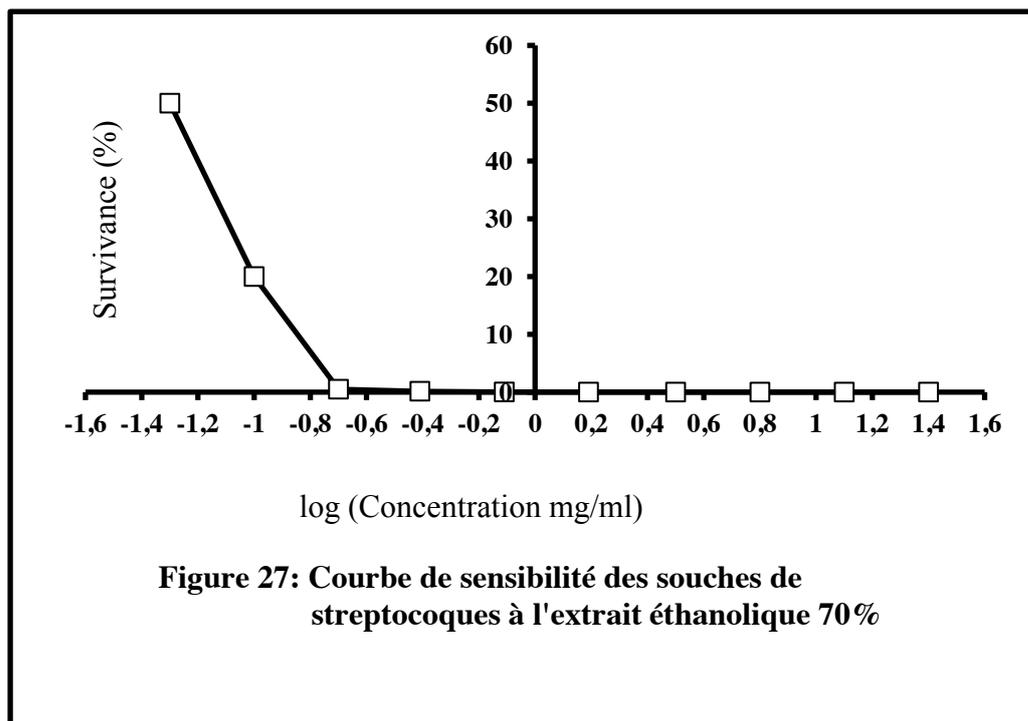
**Figure 26: Action de MISCA-70Et sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques**

L'action de l'extrait éthanolique 70% de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques est donnée par la figure 26. Elle révèle la présence de nappes de colonies amincies sur la strie à la concentration de 12,5 mg/ml de cet extrait, suivie d'une disparition totale de colonies à partir de la concentration de 25 mg/ml.

**Tableau VIII: Evolution des colonies de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-70Et**

	Concentration de l'extrait (mg/ml) dans le milieu liquide										
	Témoin de croissance (0)	0,1	0,2	0,39	0,78	<b>1,56</b>	3,13	6,25	12,5	25	50
log (concentration)		-1	-0,7	-0,41	-0,11	0,19	0,5	0,8	1,1	1,4	1,7
1 <sup>er</sup> dénombrement	$6,67 \cdot 10^{18}$	$6,67 \cdot 10^{15}$	$6,67 \cdot 10^{15}$	$3,33 \cdot 10^{15}$	$6,67 \cdot 10^{14}$	$3,33 \cdot 10^{13}$	$2 \cdot 10^{12}$	$4,67 \cdot 10^{11}$	$3,33 \cdot 10^6$	$3,33 \cdot 10^2$	$3,33 \cdot 10^2$
2 <sup>e</sup> dénombrement	$5,27 \cdot 10^{21}$	$9,83 \cdot 10^{20}$	$1,87 \cdot 10^{19}$	$4,33 \cdot 10^{18}$	$6 \cdot 10^{17}$	$2,7 \cdot 10^{16}$	$3,9 \cdot 10^{15}$	$5,67 \cdot 10^{13}$	$1,03 \cdot 10^{11}$	$2,33 \cdot 10^9$	$6,67 \cdot 10^7$
3 <sup>e</sup> dénombrement	$1,77 \cdot 10^{21}$	$3 \cdot 10^{20}$	$2,3 \cdot 10^{19}$	$4,67 \cdot 10^{18}$	$8,33 \cdot 10^{17}$	$2,6 \cdot 10^{17}$	$9,33 \cdot 10^{15}$	$1,2 \cdot 10^{15}$	$4 \cdot 10^{11}$	$5,67 \cdot 10^9$	$8,67 \cdot 10^4$
Nb. Moy. de Bact. Dénombrées	$2 \cdot 10^{21}$	$4 \cdot 10^{20}$	$10^{19}$	$3 \cdot 10^{18}$	$5 \cdot 10^{17}$	$10^{17}$	$5 \cdot 10^{15}$	$4 \cdot 10^{14}$	$2 \cdot 10^{11}$	$3 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^7$
Pourcentage de survivance (%)	100	20	0,5	0,15	0,025	<b><math>5 \cdot 10^{-3}</math></b>	0	0	0	0	0
Pourcentage d'inhibition (%)	0	80	99,5	99,85	99,975	<b>99,995</b>	100	100	100	100	100

Pour MISCA-70Et, les mêmes évolutions sont remarquées pour toutes les concentrations. En effet, la moyenne du nombre de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques dénombrés du tube témoin est de  $2 \cdot 10^{21}$  bactéries et représente 100% de survivance. Cette moyenne passe de  $4 \cdot 10^{20}$  bactéries soit 20% de survivance pour le tube de concentration 0,1 mg/ml à  $2 \cdot 10^7$  bactéries soit 0% de survivance pour le tube de concentration 50 mg/ml. Cette régression de la survivance transite par 0,01% dans le tube de concentration 1,56 mg/ml. La survivance 0% est atteinte à partir du tube de concentration 3,13 mg/ml (Tableau VIII).



La courbe d'action des diverses concentrations de l'extrait éthanologique 70% de MISCA sur les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques est donnée par la figure 27. Sur la figure, les mêmes constats que ceux de la figure 25 sont faits avec cette fois-ci, une courbe d'action qui commence à se confondre avec l'axe des abscisses dans la zone négative de la représentation graphique.



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur sans MISCA-100Et
- ✓ inoculum avec 12,5 mg/ml
- ✓ inoculum avec 25 mg/ml
- ✓ inoculum avec 50 mg/ml

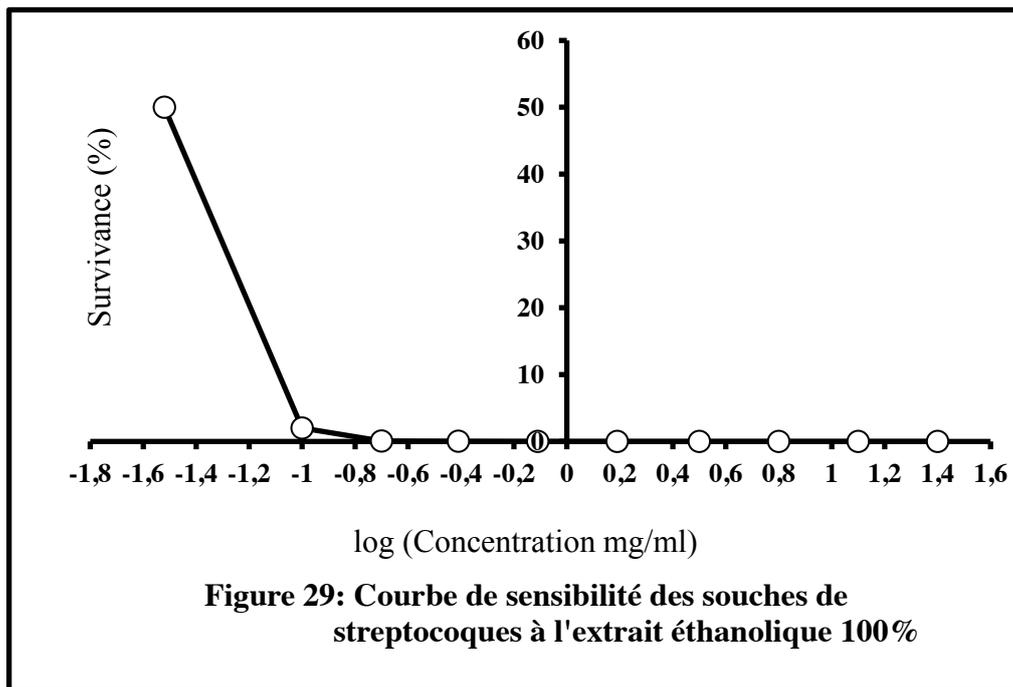
**Figure 28: Action de MISCA-100Et sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques**

Sur cette figure qui résume l'action de l'extrait éthanolique 100% de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques, il est à remarquer qu'il y a apparition de quelques colonies isolées sur la strie à la concentration de 12,5 mg/ml de cet extrait, suivie de la disparition totale de colonies à partir de la concentration de 25 mg/ml.

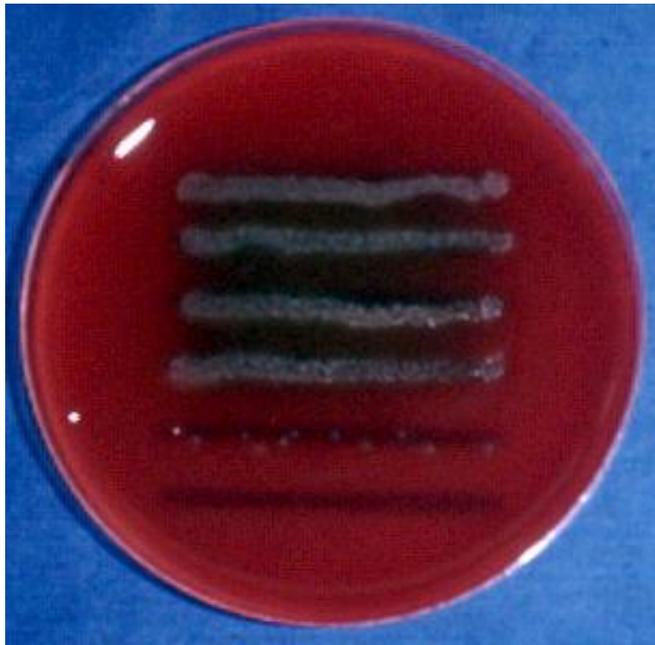
**Tableau IX: Evolution des colonies de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-100Et**

	Concentration de l'extrait (mg/ml) dans le milieu liquide										
	Témoin de croissance (0)	0,1	0,2	0,39	<b>0,78</b>	1,56	3,13	6,25	12,5	25	50
log (concentration)		-1	-0,7	-0,41	-0,11	0,9	0,5	0,8	1,1	1,4	1,7
1 <sup>er</sup> dénombrement	$8 \cdot 10^{20}$	$4,67 \cdot 10^{19}$	$10^{18}$	$7,67 \cdot 10^{15}$	$4 \cdot 10^{16}$	$10^{14}$	$2 \cdot 10^{12}$	$7,33 \cdot 10^{10}$	$3 \cdot 10^9$	$10^8$	$8,33 \cdot 10^6$
2 <sup>e</sup> dénombrement	$2,33 \cdot 10^{20}$	$7 \cdot 10^{18}$	$1,33 \cdot 10^{17}$	$9 \cdot 10^{15}$	$3 \cdot 10^{14}$	$9,67 \cdot 10^{12}$	$4,67 \cdot 10^{11}$	$10^{10}$	$3,33 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^7$	$10^7$
3 <sup>e</sup> dénombrement	$10^{20}$	$10^{19}$	$6,67 \cdot 10^{17}$	$9 \cdot 10^{16}$	$10^{16}$	$1,33 \cdot 10^{14}$	$10^{12}$	$1,33 \cdot 10^{10}$	$10^9$	$10^7$	$10^5$
Nb. Moy. de Bact. Dénombrées	$10^{21}$	$2 \cdot 10^{19}$	$6 \cdot 10^{17}$	$3 \cdot 10^{17}$	$2 \cdot 10^{16}$	$8 \cdot 10^{13}$	$10^{12}$	$3 \cdot 10^{10}$	$10^9$	$6 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^6$
Pourcentage de survivance (%)	100	2	$6 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-2}$	<b>2</b> <b><math>10^{-3}</math></b>	0	0	0	0	0	0
Pourcentage d'inhibition (%)	0	98	99,94	99,97	<b>99,998</b>	100	100	100	100	100	100

Pour MISCA-100Et, le témoin de contrôle de croissance (0% d'inhibition) correspond à  $10^{21}$  streptocoques  $\beta$ -hémolytiques survivants (100% de survivance). Le taux d'inhibition de 99,99% est donné par le tube de concentration 0,78 mg/ml avec  $2 \cdot 10^{16}$  bactéries survivantes. Ces bactéries dénombrées varient de  $2 \cdot 10^{19}$  dans le tube de concentration 0,1 mg/ml à  $6 \cdot 10^6$  dans le tube de concentration 50 mg/ml. Du tube de concentration 1,56 mg/ml à celui de concentration 50 mg/ml, il y a un taux de survivance de 0% (Tableau IX).



Sur la figure 29 qui est le résultat des actions qu'ont eues les différentes concentrations de l'extrait éthanolique 100% de MISCA sur les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques, les mêmes observations que celles de la figure 27 sont faites.



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur sans MISCA-But<sup>+</sup>
- ✓ inoculum avec 0,78 mg/ml
- ✓ inoculum avec 1,56 mg/ml
- ✓ inoculum avec 3,13 mg/ml
- ✓ inoculum avec 6,25 mg/ml
- ✓ inoculum avec 12,5 mg/ml

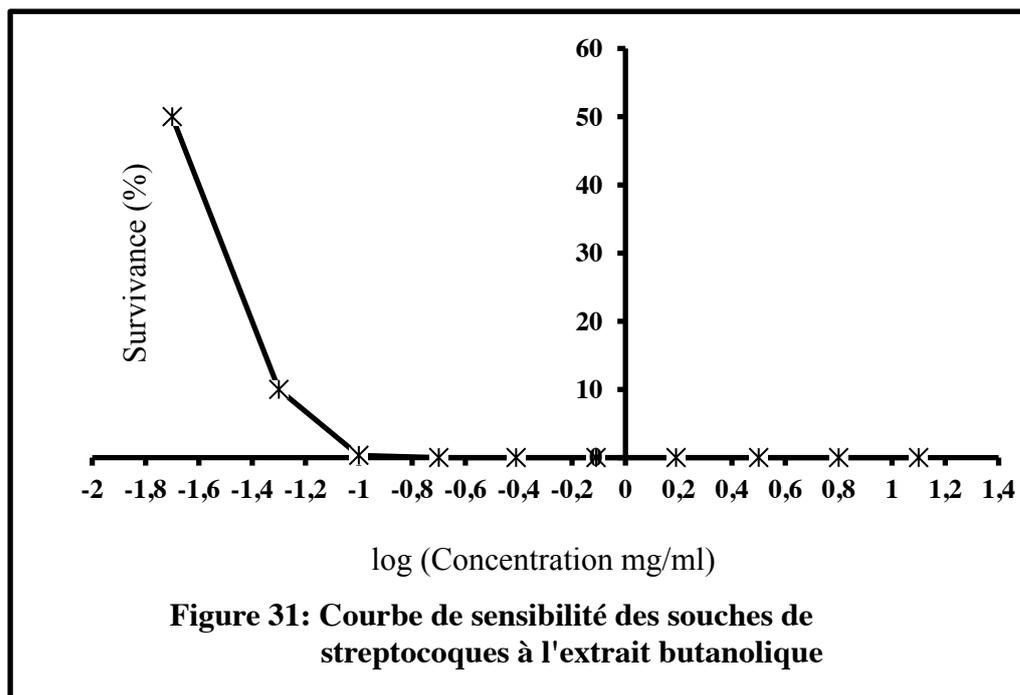
**Figure 30: Action de MISCA-But<sup>+</sup> sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques**

La figure 30 présente l'action qu'a eue l'extrait butanolique de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques. Elle montre qu'à la concentration de 6,25 mg/ml de cet extrait, il y a des colonies isolées sur la strie. Alors qu'à la concentration de 12,5 mg/ml, la disparition totale de colonies est observée sur la strie.

**Tableau X: Evolution des colonies de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-But<sup>+</sup>**

	Concentration de l'extrait (mg/ml) dans le milieu liquide									
	Témoin de croissance (0)	0,05	0,1	0,2	<b>0,39</b>	0,78	1,56	3,13	6,25	12,5
log (concentration)		-1,3	-1	-0,7	-0,41	-0,11	0,19	0,5	0,8	1,1
1 <sup>er</sup> dénombrement	$10^{20}$	$2,67 \cdot 10^{19}$	$4,33 \cdot 10^{17}$	$3 \cdot 10^{16}$	$4 \cdot 10^{15}$	$7,67 \cdot 10^{14}$	$2 \cdot 10^{10}$	$10^9$	$9 \cdot 10^4$	0
2 <sup>e</sup> dénombrement	$6,67 \cdot 10^{20}$	$4,67 \cdot 10^{19}$	$2,33 \cdot 10^{18}$	$1,17 \cdot 10^{17}$	$4 \cdot 10^{15}$	$5 \cdot 10^{14}$	$2,73 \cdot 10^{11}$	$1,37 \cdot 10^{10}$	$6 \cdot 10^8$	0
3 <sup>e</sup> dénombrement	$10^{19}$	$3,33 \cdot 10^{17}$	$6,67 \cdot 10^{16}$	$6,67 \cdot 10^{14}$	$6,67 \cdot 10^{14}$	$3,33 \cdot 10^{14}$	$10^{10}$	$2,67 \cdot 10^9$	$3,33 \cdot 10^4$	0
Nb. Moy. de Bact. Dénombrées	$3 \cdot 10^{20}$	$3 \cdot 10^{19}$	$10^{18}$	$5 \cdot 10^{16}$	$3 \cdot 10^{15}$	$5 \cdot 10^{14}$	$10^{11}$	$6 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^8$	0
Pourcentage de survivance (%)	100	10	0,33	0,017	<b><math>10^{-3}</math></b>	0	0	0	0	0
Pourcentage d'inhibition (%)	0	90	99,67	99,983	<b>99,999</b>	100	100	100	100	100

Pour MISCA-But<sup>+</sup>, 100% de survivance de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques (tube témoin) correspond à  $3 \cdot 10^{20}$  bactéries. Le tube de concentration 0,05 mg/ml donne une inhibition de 90% et laisse une survivance de 10% avec  $3 \cdot 10^{19}$  bactéries survivantes. L'inhibition de 99,99% est atteinte avec le tube de concentration 0,39 mg/ml. Cette inhibition (99,99%) laisse  $3 \cdot 10^{15}$  bactéries survivantes. L'évolution de la charge bactérienne est de  $3 \cdot 10^{19}$  bactéries dans le tube de concentration 0,05 mg/ml à 0 bactérie dans le tube de concentration 12,5 mg/ml. La survivance de 0% est atteinte à partir du tube de concentration 0,78 mg/ml (Tableau X).

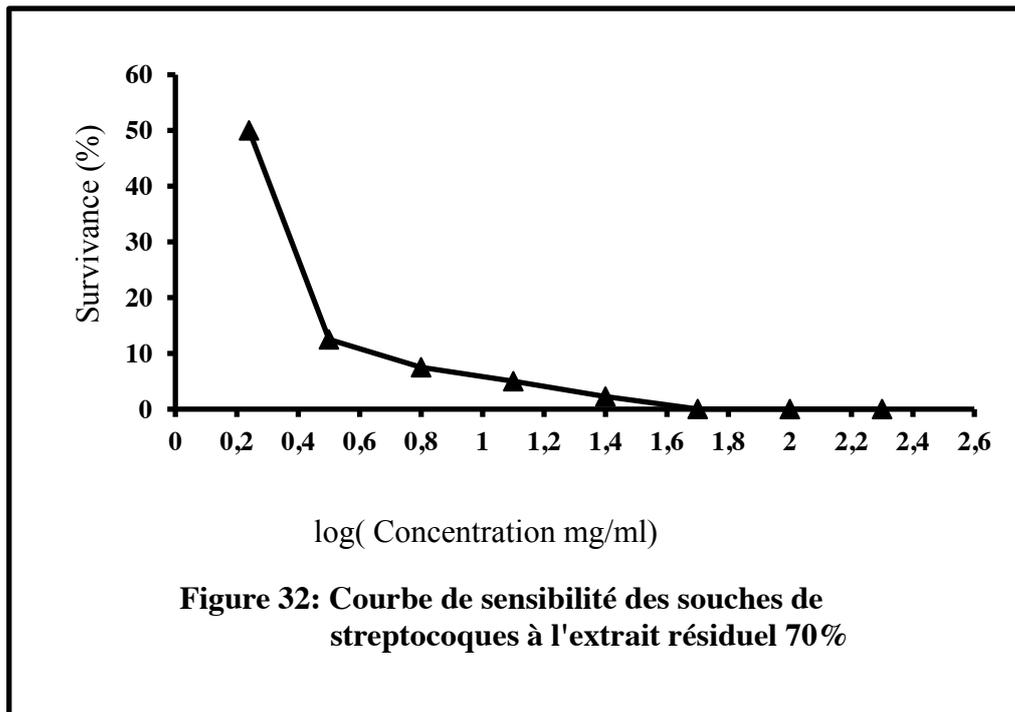


La figure 31 qui représente la courbe d'action des diverses concentrations de l'extrait butanolique sur les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques, les mêmes constats que ceux de la figure 27 et 29 sont faits.

**Tableau XI: Evolution des colonies de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-70R**

	Concentration de l'extrait (mg/ml) dans le milieu liquide							
	Témoin de croissance (0)	3,13	6,25	12,5	25	50	<b>100</b>	200
log (concentration)		0,5	0,8	1,1	1,4	1,7	2	2,3
1 <sup>er</sup> dénombrement	8,67 $10^{21}$	$10^{21}$	7 $10^{20}$	6,33 $10^{20}$	2,67 $10^{18}$	1,77 $10^{18}$	3,13 $10^{16}$	8,33 $10^{14}$
2 <sup>e</sup> dénombrement	2,37 $10^{21}$	4 $10^{20}$	1,27 $10^{19}$	2,5 $10^{18}$	1,7 $10^{17}$	$10^{17}$	1,08 $10^{16}$	2,5 $10^{14}$
3 <sup>e</sup> dénombrement	$10^{21}$	$10^{20}$	4 $10^{19}$	$10^{29}$	4 $10^{18}$	4 $10^{17}$	2 $10^{16}$	3 $10^{14}$
Nb. Moy. de Bact. dénombrées	4 $10^{21}$	5 $10^{20}$	3 $10^{20}$	2 $10^{20}$	9 $10^{19}$	8 $10^{17}$	2 $10^{16}$	5 $10^{14}$
Pourcentage de survivance (%)	100	12,5	7,5	5	2,25	0,02	<b><math>10^{-3}</math></b>	0
Pourcentage d'inhibition (%)	0	87,5	92,5	95	97,75	99,98	<b>99,999</b>	100

Pour MISCA-70R, il est à remarquer que la moyenne du nombre de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques survivants dans le tube témoin est de  $4 \cdot 10^{21}$  bactéries (100%), alors que le tube de concentration 3,13 mg/ml laisse  $5 \cdot 10^{20}$  bactéries survivantes soit une survivance de 12,5%, ce qui correspond à 87,5% d'inhibition. Cette diminution de la charge bactérienne atteint  $5 \cdot 10^{14}$  bactéries dans le tube de concentration 200 mg/ml, ce qui correspond 0% de survivance. La survivance 0,01% est obtenue dans le tube de concentration 100 mg/ml et la survivance (0%) est atteinte dans le tube de concentration 200mg/ml (Tableau XI).



La courbe décrite sur la figure 32, permet de voir qu'elle est décroissante de la survivance 50% jusqu'à s'annuler sur l'axe des abscisses à la survivance 0%. Par ailleurs, la figure montre une courbe d'action qui se trouve dans la zone positive de la représentation graphique.

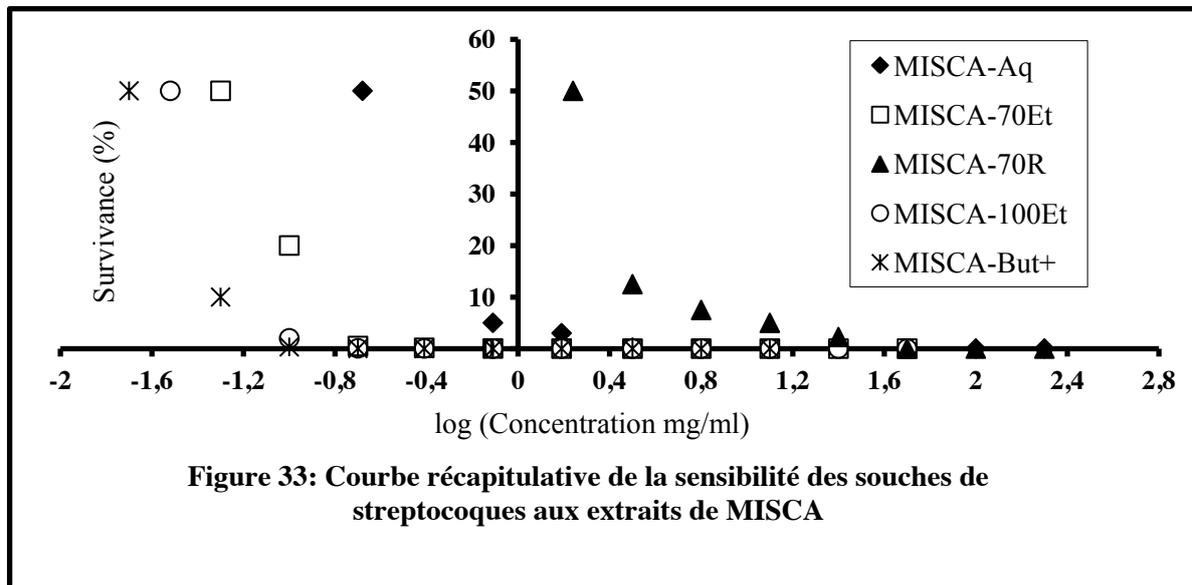


Figure 33: Courbe récapitulative de la sensibilité des souches de streptocoques aux extraits de MISCA

Les résultats des figures 25, 27, 29, 31, 32 et 33 montrent les courbes des actions des diverses concentrations des 5 extraits de MISCA sur les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques. Ce sont des courbes logarithmiques qui tiennent compte des concentrations à partir de la  $CI_{50}$  jusqu'aux concentrations élevées d'extraits.

Sur la figure 33 qui récapitule l'ensemble des autres figures, la présence de 2 types de courbes est remarquée. Un genre de courbes situées dans la zone négative et un autre genre situé dans la zone positive de la représentation graphique. Les courbes logarithmiques situées dans la zone négative de la représentation graphique sont celles qui possèdent de faibles valeurs de paramètres anti-bactériens. La courbe située dans la zone positive de la représentation graphique possède pour sa part, des valeurs de paramètres anti-bactériens élevées. Selon ces courbes décrites, l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) possède des valeurs plus faibles que celui de MISCA-100Et (extrait éthanolique 100% de MISCA).

Alors que MISCA-100Et possède des valeurs plus faibles que l'extrait éthanolique 70% de MISCA (MISCA-70Et). Parmi toutes les courbes de la zone négative, l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq) est le seul à avoir des valeurs élevées.

La courbe décrite par l'extrait résiduel 70% (MISCA-70R) est la seule à être dans la zone positive de la figure 33 et ses valeurs sont plus élevées que celles des autres extraits testés.

**Tableau récapitulatif XII: Valeurs de paramètres anti-bactériens des 5 extraits de MISCA**

	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CI <sub>50</sub> (mg/ml)
MISCA-70R	50	100	1,72
MISCA-Aq	25	6,25	0,21
MISCA-70Et	12,5	1,56	0,05
MISCA-100Et	12,5	0,78	0,03
MISCA-But <sup>+</sup>	3,13	0,39	0,02

Le tableau XII est le récapitulatif des valeurs de paramètres anti-bactériens obtenus pendant les tests expérimentaux.

Dans le même tableau, lorsque les valeurs de paramètres anti-bactériens d'un extrait donné sont comparées avec celles d'un autre extrait, les résultats suivants sont obtenus:

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-70Et**

- ✓  $CMI_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-70Et} = 25/12,5 = 2,$
- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-70Et} = 6,25/1,56 = 4,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-Aq}/CI_{50\ MISCA-70Et} = 0,21/0,05 = 4.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-70R**

- ✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-Aq} = 50/25 = 2,$
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-Aq} = 100/6,25 = 16,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-70R}/CI_{50\ MISCA-Aq} = 1,72/0,21 = 8.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-100Et**

- ✓  $CMI_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-100Et} = 25/12,5 = 2,$
- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-100Et} = 6,25/0,78 = 8,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-Aq}/CI_{50\ MISCA-100Et} = 0,21/0,03 = 7.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-Ac<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-Ac^+} = 25/6,25 = 4.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-But<sup>-</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-But^-} = 25/6,25 = 4.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-But<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-But^+} = 25/3,13 = 8,$
- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-But^+} = 6,25/0,39 = 16,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-Aq}/CI_{50\ MISCA-But^+} = 0,21/0,02 = 11.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70Et et MISCA-70R**

- ✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-70Et} = 50/12,5 = 4,$
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-70Et} = 100/1,56 = 64,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-70R}/CI_{50\ MISCA-70Et} = 1,72/0,05 = 34.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70Et et MISCA-100Et**

- ✓  $CMI_{MISCA-70Et}/CMI_{MISCA-100Et} = 12,5/12,5 = 1,$
- ✓  $CMB_{MISCA-70Et}/CMB_{MISCA-100Et} = 1,56/0,78 = 2,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-70Et}/CI_{50\ MISCA-100Et} = 0,05/0,03 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70Et et MISCA-Ac<sup>+</sup>**

✓  $CMI_{MISCA-70Et}/CMI_{MISCA-Ac^+} = 12,5/6,25 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70Et et MISCA-But<sup>-</sup>**

✓  $CMI_{MISCA-70Et}/CMI_{MISCA-But^-} = 12,5/6,25 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70Et et MISCA-But<sup>+</sup>**

✓  $CMI_{MISCA-70Et}/CMI_{MISCA-But^+} = 12,5/3,13 = 4,$

✓  $CMB_{MISCA-70Et}/CMB_{MISCA-But^+} = 1,56/0,39 = 4,$

✓  $CI_{50\ MISCA-70Et}/CI_{50\ MISCA-But^+} = 0,05/0,02 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70R et MISCA-100Et**

✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-100Et} = 50/12,5 = 4,$

✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-100Et} = 100/0,78 = 128,$

✓  $CI_{50\ MISCA-70R}/CI_{50\ MISCA-100Et} = 1,72/0,03 = 57.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70R et MISCA-Ac<sup>+</sup>**

✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-Ac^+} = 50/6,25 = 8.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70R et MISCA-But<sup>-</sup>**

✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-But^-} = 50/6,25 = 8.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70R et MISCA-But<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-But^+} = 50/3,13 = 16,$
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-But^+} = 100/0,39 = 256,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-70R}/CI_{50\ MISCA-But^+} = 1,72/0,02 = 86.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-100Et et MISCA-Ac<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-100Et}/CMI_{MISCA-Ac^+} = 12,5/6,25 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-100Et et MISCA-But<sup>-</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-100Et}/CMI_{MISCA-But^-} = 12,5/6,25 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-100Et et MISCA-But<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-100Et}/CMI_{MISCA-But^+} = 12,5/3,13 = 4,$
- ✓  $CMB_{MISCA-100Et}/CMB_{MISCA-But^+} = 0,78/0,39 = 2,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-100Et}/CI_{50\ MISCA-But^+} = 0,03/0,02 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Ac<sup>+</sup> et MISCA-But<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-But^-}/CMI_{MISCA-But^+} = 6,25/3,13 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-But<sup>-</sup> et MISCA-But<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-But^-}/CMI_{MISCA-But^+} = 6,25/3,13 = 2.$

Dans le tableau XII est rapporté les valeurs de paramètres anti-bactériens des divers extraits de MISCA testés sur les souches de  $\beta$ -hémolytiques.

La comparaison des valeurs des CMB du tableau XII entre elles révèle que:

$$\text{CMB}_{\text{MISCA-But}^+} < \text{CMB}_{\text{MISCA-100Et}} < \text{CMB}_{\text{MISCA-70Et}} < \text{CMB}_{\text{MISCA-Aq}} < \text{CMB}_{\text{MISCA-70R}}$$

A partir de cette analyse, il est possible de dire que MISCA-But<sup>+</sup> est le plus bactéricide des extraits de MISCA testés à cause de la faible valeur de sa CMB (0,39 mg/ml). Alors que, MISCA-70R est l'extrait le moins bactéricide de tous à cause de la valeur élevée de sa CMB (100 mg/ml). Quant à MISCA-100Et, MISCA-70Et et MISCA-Aq, ils ont des potentiels bactéricides moyens sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques. Néanmoins, MISCA-100Et (0,78 mg/ml) est plus bactéricide que MISCA-70Et (1,56 mg/ml) qui lui est plus bactéricide que MISCA-Aq (6,25 mg/ml).

La comparaison des concentrations minimales bactéricides (CMB) des différents extraits entre elles montrent que:

- ✓  $\text{CMB}_{\text{MISCA-70R}} / \text{CMB}_{\text{MISCA-But}^+} = 100 / 0,39 = 256$ ; MISCA-But<sup>+</sup> est 256 fois plus bactéricide que MISCA-70R.
- ✓  $\text{CMB}_{\text{MISCA-Aq}} / \text{CMB}_{\text{MISCA-But}^+} = 6,25 / 0,39 = 16$ ; MISCA-But<sup>+</sup> est 16 fois plus bactéricide que MISCA-Aq.
- ✓  $\text{CMB}_{\text{MISCA-70Et}} / \text{CMB}_{\text{MISCA-But}^+} = 1,56 / 0,39 = 4$ ; MISCA-But<sup>+</sup> est 4 fois plus bactéricide que MISCA-70Et.
- ✓  $\text{CMB}_{\text{MISCA-100Et}} / \text{CMB}_{\text{MISCA-But}^+} = 0,78 / 0,39 = 2$ ; MISCA-But<sup>+</sup> est 2 fois plus bactéricide que MISCA-100Et.
- ✓  $\text{CMB}_{\text{MISCA-70R}} / \text{CMB}_{\text{MISCA-100Et}} = 100 / 0,78 = 128$ ; MISCA-100Et est 128 fois plus bactéricide que MISCA-70R.

- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-100Et} = 6,25/0,78 = 8$ ; MISCA-100Et est 8 fois plus bactéricide que MISCA-Aq.
- ✓  $CMB_{MISCA-70Et}/CMB_{MISCA-100Et} = 1,56/0,78 = 2$ ; MISCA-100Et est 2 fois plus bactéricide que MISCA-70Et.
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-70Et} = 100/1,56 = 64$ ; MISCA-70Et est 64 fois plus bactéricide que MISCA-70R.
- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-70Et} = 6,25/1,56 = 4$ ; MISCA-70Et est 4 fois plus bactéricide que MISCA-Aq.
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-Aq} = 100/6,25 = 16$ ; MISCA-Aq est 16 fois plus bactéricide que MISCA-70R.

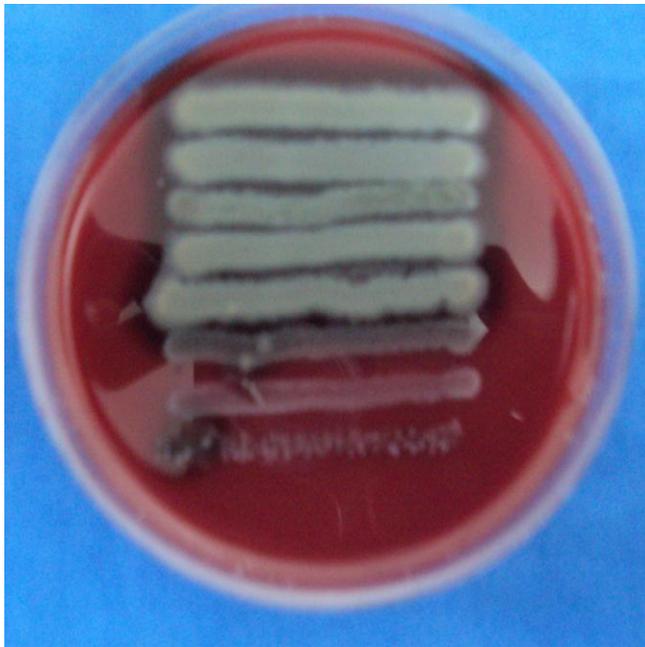
Les rapports obtenus montrent que de MISCA-Aq à MISCA-But<sup>+</sup>, MISCA-70Et améliore de 4 fois l'action de MISCA-Aq sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques, MISCA-100Et de 8 fois et MISCA-But<sup>+</sup> de 16 fois. Tous ces extraits ont été obtenus à partir de MISCA-Aq qui a servi de base à leur préparation.

## **2-2 Action de l'acide fusidique sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques $\beta$ -hémolytiques par les méthodes par dilution**

### **2-2.1 Aspect des cultures bactériennes après incubation en milieu liquide et repiquage sur milieu solide**

Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C des ensembles: bouillons inoculés-différentes gammes de concentrations (500  $\mu\text{g/ml}$  à 1,96  $\mu\text{g/ml}$ ) de l'acide fusidique, l'absence de turbidité des différents milieux de culture a été constatée à la concentration de 500  $\mu\text{g/ml}$ .

L'ensemencement des divers milieux de cultures inoculées sur des boîtes gélosées sur des stries, puis leur incubation cette fois-ci à 37°C sous enceinte humide a permis d'avoir la figure suivante.



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur sans Acide
- ✓ inoculum avec 7,81  $\mu\text{g/ml}$
- ✓ inoculum avec 15,63  $\mu\text{g/ml}$
- ✓ inoculum avec 31,25  $\mu\text{g/ml}$
- ✓ inoculum avec 62,5  $\mu\text{g/ml}$
- ✓ inoculum avec 125  $\mu\text{g/ml}$
- ✓ inoculum avec 250  $\mu\text{g/ml}$
- ✓ inoculum avec 500  $\mu\text{g/ml}$

**Figure 34: Action de l'acide fusidique sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques**

Sur cette figure se trouve les actions qu'ont eues les différentes concentrations de l'acide fusidique sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques. Elle révèle qu'à partir de la concentration de 125  $\mu\text{g/ml}$  jusqu'à la concentration de 250  $\mu\text{g/ml}$ , il y a amincissement des nappes de colonies suivie d'une apparition de colonies isolées à la plus forte concentration utilisée (500  $\mu\text{g/ml}$ ).

### **2-3 Action comparée de l'extrait butanolique de MISCA et de l'acide fusidique sur la croissance *in vitro* des souches**

Elle montre que:

- ✓ En milieu liquide, l'absence de turbidité est constatée à 3,13 mg/ml de l'extrait butanolique de MISCA et à 500 µg/ml de l'acide fusidique.
- ✓ En solide, les colonies isolées sont observées à 6,25 mg/ml de l'extrait butanolique de MISCA et à 500 µg/ml de l'acide fusidique.

En dehors de ces faits majeurs, il est observé les mêmes phénomènes de diminution de nappes de colonies au fur et à mesure que les concentrations des substances utilisées augmentent, avec une disparition totale de colonies à 12,5 mg/ml de l'extrait butanolique de MISCA.

# **3- Sensibilité des souches d'entérocoques aux différents extraits de MISCA et à l'acide fusidique**

### **3-1 Action des différents extraits de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis* par les méthodes par dilution**

#### **3-1.1 Détermination de la charge bactérienne de l'inoculum réparti dans les tubes expérimentaux**



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur ( $10^0$ ) 100% de survivants,
- ✓ inoculum ( $10^{-1}$ ) 10% de survivants,
- ✓ inoculum ( $10^{-2}$ ) 1% de survivants,
- ✓ inoculum ( $10^{-3}$ ) 0,1% de survivants,
- ✓ inoculum ( $10^{-4}$ ) 0,01% de survivants,
- ✓ inoculum ( $10^{-5}$ ) 0,001% de survivants.

**Figure 35: Bouillon inoculé de la souche d'*Enterococcus faecalis***

Les ensemencements de la figure 35 sont ceux du bouillon inoculé de la souche d'*Enterococcus faecalis* qui a été distribué dans les tubes expérimentaux au contact ou non de différentes gammes de concentrations des divers extraits de MISCA et de l'acide fusidique. Ils révèlent qu'à la dilution  $10^{-4}$ , il y a deux colonies après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C. Cette dilution laisse au plus 0,01% de survivants.

### **3-1.2 Aspect des cultures bactériennes après incubation en milieu liquide et repiquage sur milieu solide**

#### **3-1.2.1 Aspect des cultures bactériennes en milieu liquide**

Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C des ensembles: bouillons inoculés-différentes gammes de concentrations des extraits de MISCA, l'absence de turbidité en milieu liquide a été constatée pour chaque extrait testé à partir de la concentration de:

- 50 mg /ml pour MISCA-Aq,
- 25 mg /ml pour MISCA-70Et,
- 50 mg/ml pour MISCA-70R,
- 25 mg/ml pour MISCA-100Et,
- 25 mg/ml pour MISCA-Ac<sup>+</sup>,
- 25 mg/ml pour MISCA-But<sup>-</sup>,
- 12,5 mg/ml pour MISCA-But<sup>+</sup>.

### 3-1.2.2 Aspect des cultures bactériennes après repiquage sur le milieu solide



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur sans MISCA-Aq
- ✓ inoculum avec 50 mg/ml
- ✓ inoculum avec 100 mg/ml

**Figure 36: Action de MISCA-Aq sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis***

Les résultats sur les stries des actions des différents extraits de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis* présentent de manière générale du haut vers le bas:

- l'inoculum témoin, sans extrait végétal. Il sert de témoin de contrôle de croissance.
- l'évolution de l'inoculum témoin au contact de gammes de concentrations de plus en plus élevées des extraits de MISCA testés.

Sur les différentes stries pour lesquelles l'inoculum a été mis au contact avec des diverses gammes de concentrations de plus en plus élevées de MISCA, les croissances bactériennes obtenues se présentent le plus souvent, sous des formes de nappes de colonies dont les épaisseurs diminuent progressivement à mesure que les concentrations des extraits augmentent. Ces nappes sont quelques fois suivies de colonies isolées.

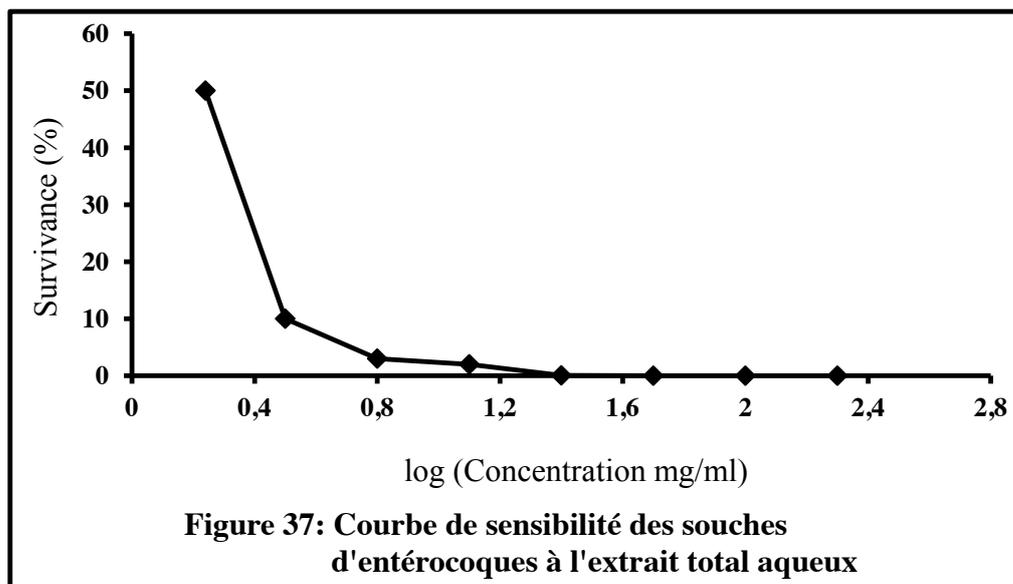
Ainsi, pour l'action de l'extrait total aqueux de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis* (figure 36), il est à constater qu'à la concentration de 50 mg/ml, il y a un amincissement de l'épaisseur de la nappe de colonies. Cet amincissement est suivi par l'apparition de quelques colonies isolées à la concentration de 100 mg/ml.

**Tableau XIII: Evolution des colonies d'*Enterococcus faecalis* en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-Aq**

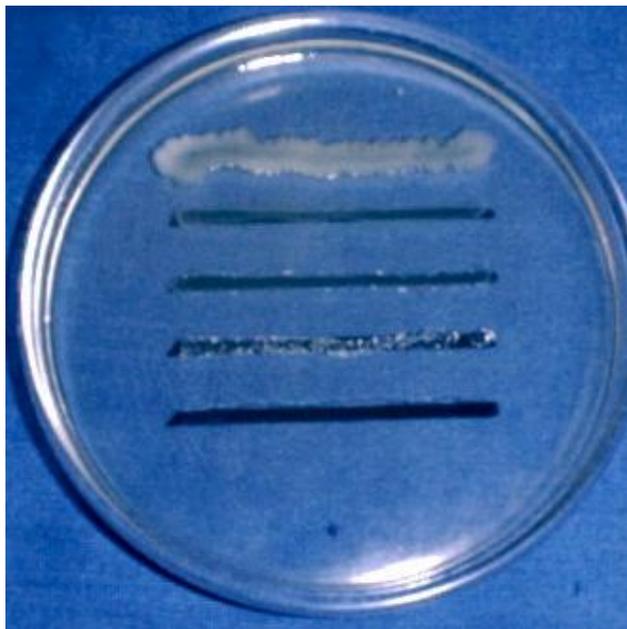
	Concentration de l'extrait (mg/ml) dans le milieu liquide						
	Témoin de croissance (0)	3,13	6,25	12,5	25	<b>50</b>	100
log (concentration)		0,5	0,8	1,1	1,4	1,7	2
1 <sup>er</sup> dénombrement	2,33 10 <sup>20</sup>	2,67 10 <sup>19</sup>	5 10 <sup>18</sup>	4,33 10 <sup>18</sup>	7,67 10 <sup>16</sup>	6,67 10 <sup>14</sup>	2,33 10 <sup>11</sup>
2 <sup>e</sup> dénombrement	1,67 10 <sup>19</sup>	7,67 10 <sup>18</sup>	2,27 10 <sup>18</sup>	1,07 10 <sup>17</sup>	9 10 <sup>16</sup>	6,5 10 <sup>14</sup>	3,33 10 <sup>13</sup>
3 <sup>e</sup> dénombrement	6,67 10 <sup>19</sup>	5 10 <sup>18</sup>	1,33 10 <sup>15</sup>	3,33 10 <sup>14</sup>	3,33 10 <sup>13</sup>	2,83 10 <sup>13</sup>	4 10 <sup>12</sup>
Nb. Moy. de Bact. Dénombrées	10 <sup>20</sup>	10 <sup>19</sup>	3 10 <sup>18</sup>	2 10 <sup>18</sup>	6 10 <sup>16</sup>	5 10 <sup>14</sup>	10 <sup>13</sup>
Pourcentage de survivance (%)	100	10	3	2	0,06	<b>10<sup>-3</sup></b>	0
Pourcentage d'inhibition (%)	0	90	97	98	99,94	<b>99,999</b>	100

Les tableaux XIII à XVI contiennent les résultats de la détermination du nombre de bactéries survivantes par tube, pour une souche donnée d'*Enterococcus faecalis* de la série expérimentale, avec leur moyenne. Les résultats obtenus montrent que la moyenne du nombre d'*Enterococcus faecalis* survivants par tube expérimental diminue en fonction de l'augmentation de la concentration des extraits. Cette diminution devient de plus en plus importante lors du passage de MISCA-Aq à MISCA-But<sup>+</sup>, donc lorsque l'extrait de MISCA est de plus en plus amélioré.

Ainsi pour MISCA-Aq, la moyenne d'*Enterococcus faecalis* survivants du tube témoin de croissance est de  $10^{20}$ . Tandis que celles des autres tubes varient de  $10^{19}$  bactéries survivantes pour le tube de concentration 3,13 mg/ml à  $10^{13}$  bactéries survivantes pour celui de concentration 100 mg/ml. Lorsque toutes ces données sont rapportées en pourcentage de survivance, il est constaté que le tube témoin constitue 100% de survivance (0% d'inhibition). Alors que le tube de concentration 3,13 mg/ml et le tube de concentration 100 mg/ml représentent respectivement 90% et 100% d'inhibition. Cette décroissance de la moyenne du nombre de bactéries survivantes du tube témoin au tube de concentration 100 mg/ml passe par la survivance de 0,01%. L'inhibition (99,99%) est atteinte dans le tube de concentration 50 mg/ml (Tableau XIII).



La courbe d'action des diverses concentrations de l'extrait total aqueux de MISCA sur les souches d'entérocoques de la figure 37, est une courbe logarithmique qui commence de la survivance 50% jusqu'à s'annuler sur l'axe des abscisses à la survivance 0%. La courbe décroissante décrite se trouve dans la zone positive de la représentation graphique



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur sans MISCA-70Et
- ✓ inoculum avec 12,5 mg/ml
- ✓ inoculum avec 25 mg/ml
- ✓ inoculum avec 50 mg/ml
- ✓ inoculum avec 100 mg/ml

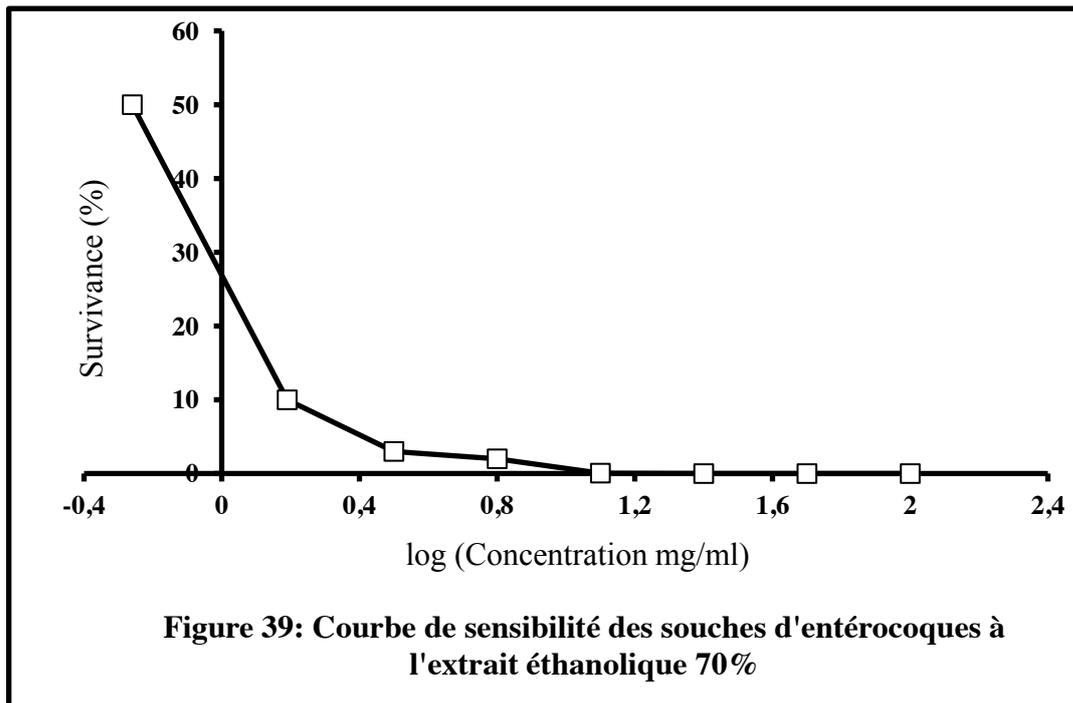
**Figure 38: Action de MISCA-70Et sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis***

Pour l'action de l'extrait éthanolique 70% de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis* représentée par la figure 38, il est remarqué un important amincissement de l'épaisseur de la nappe de colonies sur la strie à la concentration de 12,5 mg/ml, suivi d'une diminution progressive et d'une apparition de colonies isolées de la concentration 25 mg/ml à la concentration de 100 mg/ml.

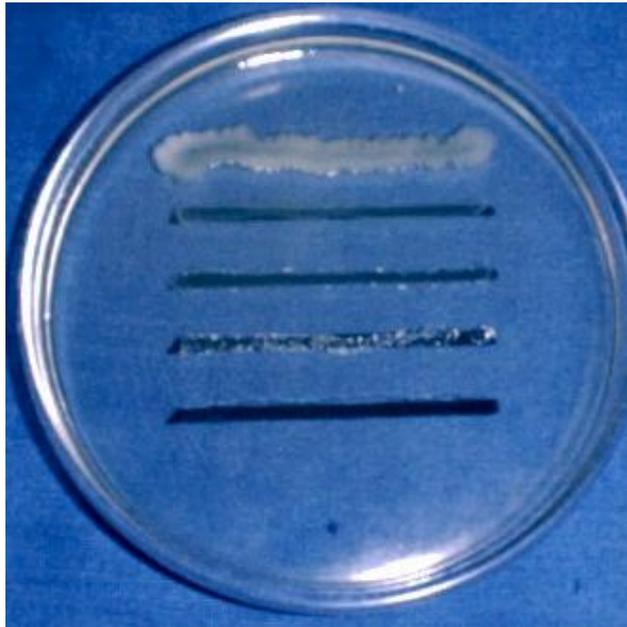
**Tableau XIV: Evolution des colonies d'*Enterococcus faecalis* en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-70Et**

	Concentration de l'extrait (mg/ml) dans le milieu liquide							
	Témoin de croissance (0)	1,56	3,13	6,25	<b>12,5</b>	25	50	100
log (concentration)		0,19	0,5	0,8	1,1	1,4	1,7	2
1 <sup>er</sup> dénombrement	1,33 10 <sup>19</sup>	9,33 10 <sup>17</sup>	3,33 10 <sup>17</sup>	10 <sup>17</sup>	6,67 10 <sup>11</sup>	3,33 10 <sup>11</sup>	0	0
2 <sup>e</sup> dénombrement	4,33 10 <sup>20</sup>	6,67 10 <sup>18</sup>	10 <sup>18</sup>	2,67 10 <sup>15</sup>	3,33 10 <sup>11</sup>	10 <sup>7</sup>	0	0
3 <sup>e</sup> dénombrement	6,67 10 <sup>19</sup>	4 10 <sup>19</sup>	6,67 10 <sup>17</sup>	9,33 10 <sup>15</sup>	4,67 10 <sup>14</sup>	3,6 10 <sup>12</sup>	2,73 10 <sup>9</sup>	2,67 10 <sup>7</sup>
Nb. Moy. de Bact. Dénombrées	2 10 <sup>20</sup>	2 10 <sup>19</sup>	7 10 <sup>17</sup>	4 10 <sup>16</sup>	2 10 <sup>14</sup>	10 <sup>12</sup>	9 10 <sup>8</sup>	9 10 <sup>6</sup>
Pourcentage de survivance (%)	100	10	0,35	0,02	<b>10<sup>-3</sup></b>	0	0	0
Pourcentage d'inhibition (%)	0	90	99,65	99,98	<b>99,999</b>	100	100	100

Pour MISCA-70Et, la moyenne d'*Enterococcus faecalis* survivants du tube témoin est de  $2.10^{20}$  et représente 100% de survivance. Du tube de concentration 1,56 mg/ml (10% de survivance) au tube de concentration 100 mg/ml (0% de survivance), cette moyenne passe de  $2.10^{19}$  bactéries survivantes à  $9.10^6$  bactéries survivantes. Cette réduction transite par l'inhibition 99,99% qui correspond au tube de concentration 12,5 mg/ml. A cette concentration, il y a une charge bactérienne de  $2.10^{14}$ . L'inhibition 100% est déjà atteinte dans le tube de concentration 25 mg/ml (Tableau XIV).



La courbe d'action décroissante de la figure 39 débute à la survivance 50% jusqu'à s'annuler sur l'axe des abscisses à la survivance 0%. L'essentielle de la courbe se trouve dans la zone positive de la représentation graphique.



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur sans MISCA-70Et
- ✓ inoculum avec 12,5 mg/ml
- ✓ inoculum avec 25 mg/ml
- ✓ inoculum avec 50 mg/ml
- ✓ inoculum avec 100 mg/ml

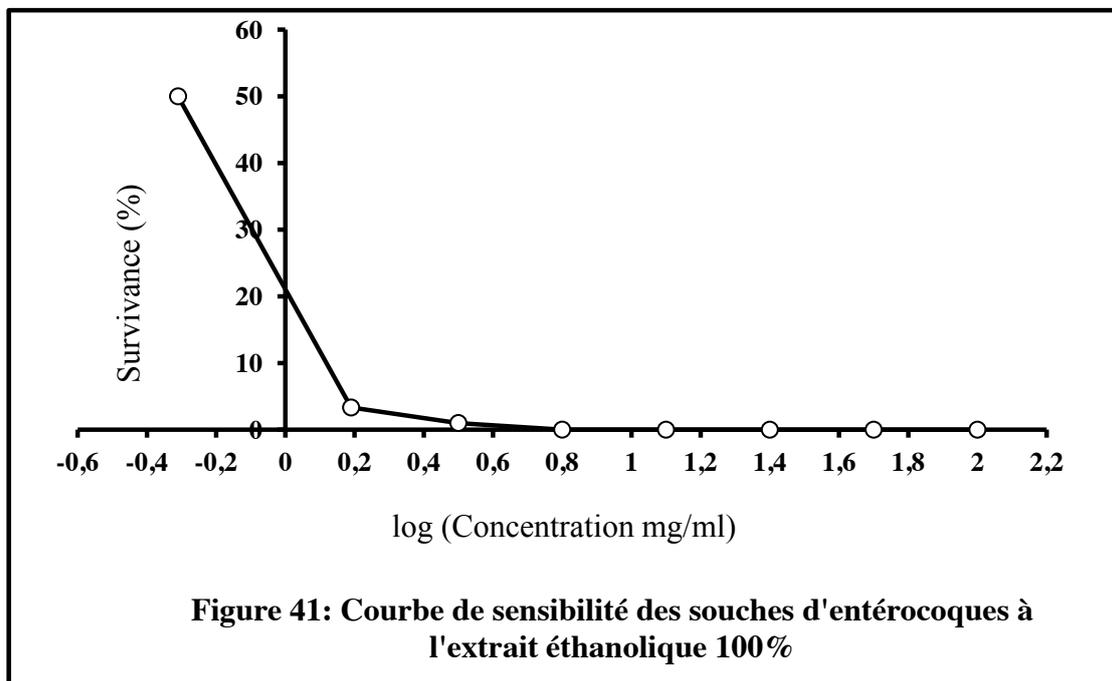
**Figure 40:** Action de MISCA-100Et sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis*

Pour l'action de l'extrait éthanolique 100% de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis*, les mêmes observations que celles de l'action de l'extrait éthanolique 70% de MISCA sur ces souches d'*Enterococcus faecalis* sont faites (figure 38).

**Tableau XV: Evolution des colonies d'*Enterococcus faecalis* en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-100Et**

	Concentration de l'extrait (mg/ml) dans le milieu liquide							
	Témoin de croissance (0)	1,56	3,13	<b>6,25</b>	12,5	25	50	100
log (concentration)		0,19	0,5	0,8	1,1	1,4	1,7	2
1 <sup>er</sup> dénombrement	$3,67 \cdot 10^{20}$	$3,33 \cdot 10^{19}$	$2 \cdot 10^{18}$	$10^{17}$	$8,67 \cdot 10^{12}$	$8,67 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^5$
2 <sup>e</sup> dénombrement	$2 \cdot 10^{19}$	$4,67 \cdot 10^{18}$	$9 \cdot 10^{16}$	$10^{14}$	$6,67 \cdot 10^{11}$	$2 \cdot 10^9$	$8,67 \cdot 10^6$	$10^6$
3 <sup>e</sup> dénombrement	$4 \cdot 10^{20}$	$10^{19}$	$8 \cdot 10^{17}$	$6,67 \cdot 10^{16}$	$10^{12}$	$10^9$	$10^7$	$10^5$
Nb. Moy. de Bact. Dénombrées	$6 \cdot 10^{20}$	$2 \cdot 10^{19}$	$10^{18}$	$6 \cdot 10^{16}$	$2 \cdot 10^{12}$	$4 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^5$
Pourcentage de survivance (%)	100	3,33	1	<b>0,01</b>	0	0	0	0
Pourcentage d'inhibition (%)	0	96,67	99	<b>99,99</b>	100	100	100	100

Pour MISCA-100Et, le témoin de croissance (100% de survivance) a une charge bactérienne de  $6 \cdot 10^{20}$  (0% d'inhibition). Le taux de survivance 0,01% est donné par le tube de concentration 6,25 mg/ml avec une charge de  $6 \cdot 10^{16}$  *Enterococcus faecalis* survivants. Du tube de concentration 1,56 mg/ml (3,33% de survivance) au tube de concentration 100 mg/ml (0% de survivance), le nombre de bactéries survivantes est réduit de  $2 \cdot 10^{19}$  à  $5 \cdot 10^5$ . A partir du tube de concentration 12,5 mg/ml, l'inhibition 100% est atteinte (Tableau XV).



Sur la figure 41, les mêmes observations que celles de la figure 39 sont constatées.



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur sans MISCABut<sup>+</sup>
- ✓ inoculum avec 1,56 mg/ml
- ✓ inoculum avec 3,13 mg/ml
- ✓ inoculum avec 6,25 mg/ml
- ✓ inoculum avec 12,5 mg/ml
- ✓ inoculum avec 25 mg/ml

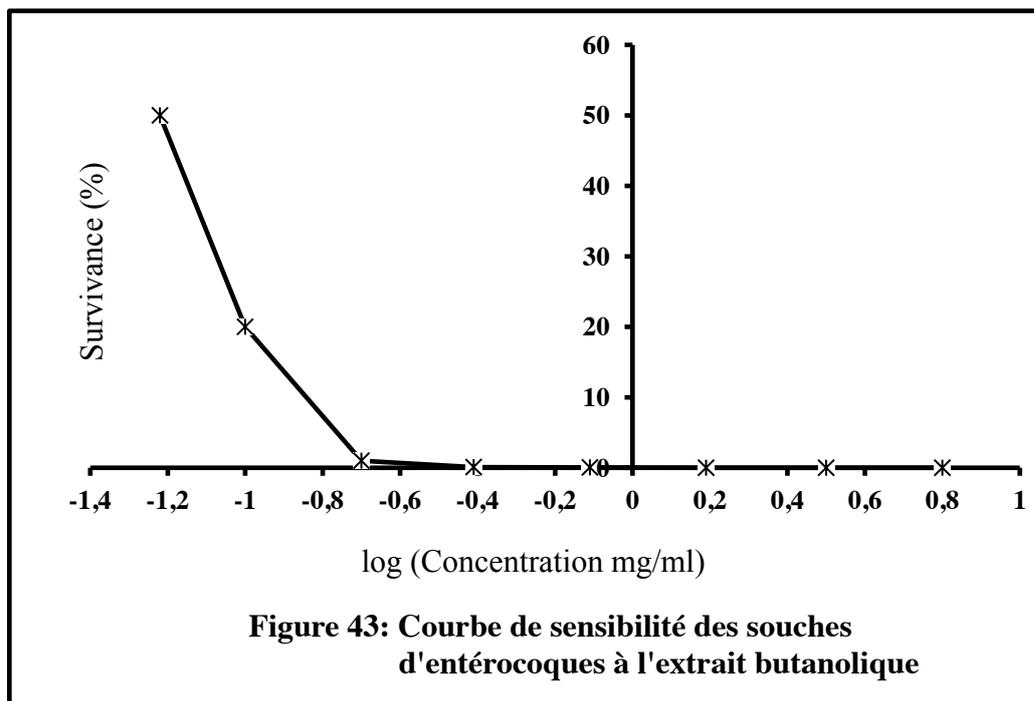
**Figure 42: Action de MISCABut<sup>+</sup> sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis***

La figure 42 représente quant à elle, l'action qu'a eue l'extrait butanolique de MISCABut sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis*. Elle révèle qu'à partir de la concentration de 1,56 mg/ml et jusqu'à la concentration de 12,5 mg/ml de cet extrait, il y a un amincissement de l'épaisseur de la nappe de colonies sur les différentes stries, suivi par une apparition de colonies isolées à la concentration de 25 mg/ml.

**Tableau XVI: Evolution des colonies d'*Enterococcus faecalis* en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-But<sup>+</sup>**

	Concentration de l'extrait (mg/ml) dans le milieu liquide									
	Témoin de croissance (0)	0,1	0,2	0,39	0,78	<b>1,56</b>	3,13	6,25	12,5	25
log (concentration)		-1	-0,7	-0,41	-0,11	0,19	0,5	0,8	1,1	1,4
1 <sup>er</sup> dénombrement	2,2 10 <sup>21</sup>	1,7 10 <sup>20</sup>	3,13 10 <sup>18</sup>	3,63 10 <sup>17</sup>	5,03 10 <sup>16</sup>	2,27 10 <sup>15</sup>	3,33 10 <sup>14</sup>	2,67 10 <sup>11</sup>	1,73 10 <sup>10</sup>	7,33 10 <sup>8</sup>
2 <sup>e</sup> dénombrement	1,73 10 <sup>21</sup>	2,07 10 <sup>20</sup>	1,33 10 <sup>18</sup>	2,87 10 <sup>17</sup>	1,27 10 <sup>16</sup>	6 10 <sup>15</sup>	5,67 10 <sup>11</sup>	6,67 10 <sup>10</sup>	2 10 <sup>10</sup>	1,43 10 <sup>10</sup>
3 <sup>e</sup> dénombrement	2,47 10 <sup>21</sup>	6,5 10 <sup>20</sup>	5,1 10 <sup>19</sup>	5,83 10 <sup>18</sup>	3,43 10 <sup>18</sup>	2,5 10 <sup>16</sup>	2,4 10 <sup>15</sup>	4,33 10 <sup>11</sup>	1,23 10 <sup>11</sup>	2,67 10 <sup>9</sup>
Nb. Moy. de Bact. Dénombrées	2 10 <sup>21</sup>	4 10 <sup>20</sup>	2 10 <sup>19</sup>	2 10 <sup>18</sup>	10 <sup>18</sup>	10 <sup>16</sup>	9 10 <sup>14</sup>	3 10 <sup>11</sup>	5 10 <sup>10</sup>	6 10 <sup>9</sup>
Pourcentage de survivance (%)	100	20	1	0,1	0,05	<b>10<sup>-3</sup></b>	0	0	0	0
Pourcentage d'inhibition (%)	0	80	99	99,9	99,95	<b>99,999</b>	100	100	100	100

Pour MISCA-But<sup>+</sup>, 100% de survivance du tube témoin correspond à  $2.10^{21}$  *Enterococcus faecalis* survivants. Le tube de concentration 0,1 mg/ml laisse une survivance de 20% et donne une inhibition de 80% avec  $4.10^{20}$  bactéries survivantes. La survivance 0,01% est atteinte dans le tube de concentration 1,56 mg/ml, ce qui correspond à  $10^{16}$  bactéries survivantes. La charge des bactéries évolue de  $4.10^{20}$  bactéries survivantes dans le tube de concentration 0,1 mg/ml à  $6.10^9$  bactéries survivantes (0% de survivance) dans celui de concentration 25 mg/ml. La survivance de 0% est atteinte à partir du tube de concentration 3,13 mg/ml (Tableau XVI).

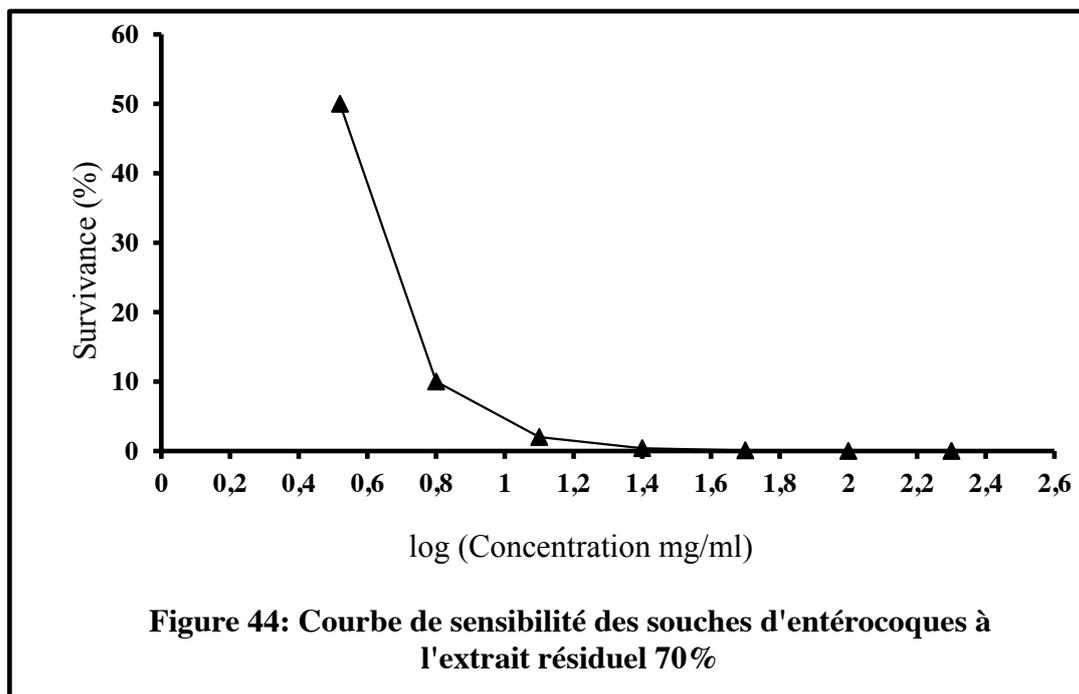


La figure 43 est la courbe des actions décroissantes qu'ont eues les différentes concentrations de l'extrait butanolique de MISCA sur les souches d'entérocoques, de la survivance 50% à la survivance 0%. Cette courbe à la survivance 0% commence déjà à se confondre à l'axe des abscisses dans la zone négative de la représentation graphique.

**Tableau XVII: Evolution des colonies d'*Enterococcus faecalis* en milieu liquide sous l'action des différentes concentrations de MISCA-70R**

	Concentration de l'extrait (mg/ml) dans le milieu liquide						
	Témoin de croissance (0)	6,25	12,5	25	50	<b>100</b>	200
log (concentration)		0,8	1,1	1,4	1,7	2	2,3
1 <sup>er</sup> dénombrement	1,63 10 <sup>21</sup>	2,03 10 <sup>20</sup>	1,13 10 <sup>19</sup>	1,23 10 <sup>18</sup>	2,83 10 <sup>16</sup>	4,77 10 <sup>14</sup>	1,5 10 <sup>12</sup>
2 <sup>e</sup> dénombrement	1,67 10 <sup>21</sup>	6,67 10 <sup>19</sup>	3,33 10 <sup>19</sup>	7 10 <sup>18</sup>	2,07 10 <sup>18</sup>	9,83 10 <sup>15</sup>	1,5 10 <sup>15</sup>
3 <sup>e</sup> dénombrement	10 <sup>21</sup>	2 10 <sup>19</sup>	2 10 <sup>19</sup>	3 10 <sup>18</sup>	2 10 <sup>17</sup>	9 10 <sup>14</sup>	10 <sup>13</sup>
Nb. Moy. de Bact. Dénombrees	10 <sup>21</sup>	10 <sup>20</sup>	2 10 <sup>19</sup>	4 10 <sup>18</sup>	7 10 <sup>17</sup>	4 10 <sup>15</sup>	5 10 <sup>14</sup>
Pourcentage de survivance (%)	100	10	2	0,4	0,08	<b>10<sup>-3</sup></b>	0
Pourcentage d'inhibition (%)	0	90	98	99,6	99,92	<b>99,999</b>	100

Pour MISCA-70R, le nombre d'*Enterococcus faecalis* survivants du tube témoin est de 10<sup>21</sup>, alors que celui de concentration 6,25 mg/ml laisse 10<sup>20</sup> bactéries survivantes soit une survivance de 10%, ce qui correspond à 90% d'inhibition. Cette diminution de la charge bactérienne atteint 5.10<sup>14</sup> bactéries survivantes dans le tube de concentration 200 mg/ml, ce qui correspond 0% de survivance. La survivance 0,01% est obtenue pour le tube de concentration 100 mg/ml (Tableau XVII).



Sur la figure 44, le même constat que celui de l'action des diverses concentrations de l'extrait total aqueux de MISCA sur les souches d'entérocoques est observé c'est-à-dire celui de la figure 37.

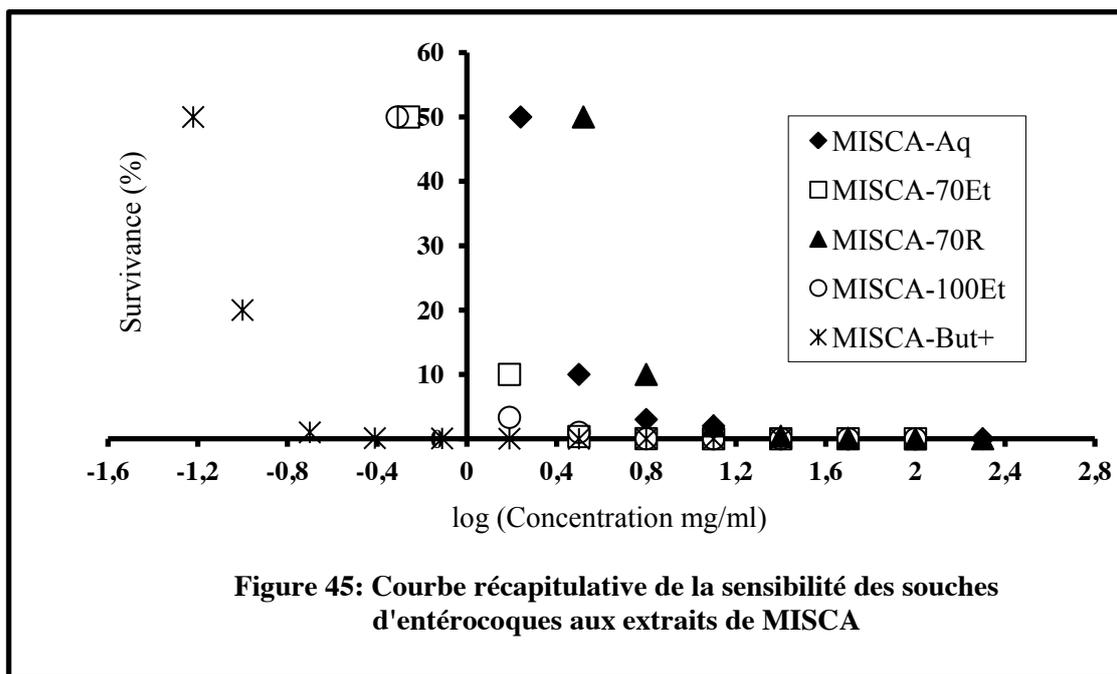


Figure 45: Courbe récapitulative de la sensibilité des souches d'entérocoques aux extraits de MISCA

Les résultats des figures 37, 39, 41, 43, 44 et 45 montrent les courbes des actions des différentes concentrations des 5 extraits de MISCA sur les souches d'*Enterococcus faecalis*. Ce sont des courbes logarithmiques qui tiennent compte des concentrations à partir de la CI<sub>50</sub> jusqu'aux concentrations élevées d'extraits.

Sur la figure 45 qui récapitule l'ensemble des figures, 2 types de courbes sont observées. Il est à remarquer qu'il y a 3 courbes décrites par l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>), l'extrait éthanolique 100% de MISCA (MISCA-100Et) et l'extrait éthanolique 70% de MISCA (MISCA-70Et), qui sont situées dans la zone négative de la représentation graphique. Et 2 courbes décrites respectivement par l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq) et l'extrait résiduel 70% de MISCA (MISCA-70R) qui sont, quant à elles, situées dans la zone positive de la représentation graphique.

Dans la zone négative, la courbe décrite par MISCA-But<sup>+</sup> possède des valeurs plus faibles que celles de MISCA-100Et. Alors que MISCA-100Et possède des valeurs relativement plus faibles que celles de MISCA-70Et.

Dans la zone positive, la courbe décrite par MISCA-70R possède des valeurs plus élevées que celles de MISCA-Aq.

**Tableau récapitulatif XVIII: Valeurs de paramètres anti-bactériens des 5 extraits de MISCA**

	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CI <sub>50</sub> (mg/ml)
MISCA 70R	50	100	3,28
MISCA-Aq	50	50	1,72
MISCA-70Et	25	12,5	0,55
MISCA-100Et	25	6,25	0,49
MISCA-But <sup>+</sup>	12,5	1,56	0,06

Dans le tableau XVIII est récapitulé les valeurs de paramètres anti-bactériens des 5 extraits testés.

Lorsque les valeurs de paramètres anti-bactériens du même tableau d'un extrait précis sont comparées avec celles un autre extrait, les résultats suivants sont obtenus:

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-70Et**

- ✓  $CMI_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-70Et} = 50/25 = 2,$
- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-70Et} = 50/12,5 = 4,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-Aq}/CI_{50\ MISCA-70Et} = 1,72/0,55 = 3.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-70R**

- ✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-Aq} = 50/50 = 1,$
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-Aq} = 100/50 = 2,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-70R}/CI_{50\ MISCA-Aq} = 3,28/1,72 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-100Et**

- ✓  $CMI_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-100Et} = 50/25 = 2,$
- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-100Et} = 50/6,25 = 8,$
- ✓  $CI_{50 MISCA-Aq}/CI_{50 MISCA-100Et} = 1,72/0,49 = 4.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-Ac<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-Ac^+} = 50/25 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-But<sup>-</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-But^-} = 50/25 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Aq et MISCA-But<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-But^+} = 50/12,5 = 4,$
- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-But^+} = 50/1,56 = 32,$
- ✓  $CI_{50 MISCA-Aq}/CI_{50 MISCA-But^+} = 1,72/0,06 = 29.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70Et et MISCA-70R**

- ✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-70Et} = 50/25 = 2,$
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-70Et} = 100/12,5 = 8,$
- ✓  $CI_{50 MISCA-70R}/CI_{50 MISCA-70Et} = 3,28/0,55 = 6.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70Et et MISCA-100Et**

- ✓  $CMI_{MISCA-70Et}/CMI_{MISCA-100Et} = 25/25 = 1,$
- ✓  $CMB_{MISCA-70Et}/CMB_{MISCA-100Et} = 12,5/6,25 = 2,$
- ✓  $CI_{50 MISCA-70Et}/CI_{50 MISCA-100Et} = 0,55/0,49 = 1.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70Et et MISCA-Ac<sup>+</sup>**

✓  $CMI_{MISCA-70Et}/CMI_{MISCA-Ac^+} = 25/25 = 1.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70Et et MISCA-But<sup>-</sup>**

✓  $CMI_{MISCA-70Et}/CMI_{MISCA-But^-} = 25/25 = 1.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70Et et MISCA-But<sup>+</sup>**

✓  $CMI_{MISCA-70Et}/CMI_{MISCA-But^+} = 25/12,5 = 2,$

✓  $CMB_{MISCA-70Et}/CMB_{MISCA-But^+} = 12,5/1,56 = 8,$

✓  $CI_{50\ MISCA-70Et}/CI_{50\ MISCA-But^+} = 0,55/0,06 = 9.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70R et MISCA-100Et**

✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-100Et} = 50/25 = 2,$

✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-100Et} = 100/6,25 = 16,$

✓  $CI_{50\ MISCA-70R}/CI_{50\ MISCA-100Et} = 3,28/0,49 = 7.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70R et MISCA-Ac<sup>+</sup>**

✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-Ac^+} = 50/25 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70R et MISCA-But<sup>-</sup>**

✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-But^-} = 50/25 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-70R et MISCA-But<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-70R}/CMI_{MISCA-But^+} = 50/12,5 = 4,$
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-But^+} = 100/1,56 = 64,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-70R}/CI_{50\ MISCA-But^+} = 3,28/0,06 = 55.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-100Et et MISCA-Ac<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-100Et}/CMI_{MISCA-Ac^+} = 25/25 = 1.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-100Et et MISCA-But<sup>-</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-100Et}/CMI_{MISCA-But^-} = 25/25 = 1.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-100Et et MISCA-But<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-100Et}/CMI_{MISCA-But^+} = 25/12,5 = 2,$
- ✓  $CMB_{MISCA-100Et}/CMB_{MISCA-But^+} = 6,25/1,56 = 4,$
- ✓  $CI_{50\ MISCA-100Et}/CI_{50\ MISCA-But^+} = 0,49/0,06 = 8.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-Ac<sup>+</sup> et MISCA-But<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-Ac^+}/CMI_{MISCA-But^+} = 25/12,5 = 2.$

### **Comparaison des valeurs des paramètres anti-bactériens de MISCA-But<sup>-</sup> et MISCA-But<sup>+</sup>**

- ✓  $CMI_{MISCA-But^-}/CMI_{MISCA-But^+} = 25/12,5 = 2.$

Les valeurs de paramètres anti-bactériens du tableau XVIII sont celles obtenues pendant les tests expérimentaux.

Lors de la comparaison entre elles des valeurs des CMB des différents extraits de MISCA testés sur les souches d'*Enterococcus faecalis* du tableau XVIII, il est remarqué que:

$$\text{CMB}_{\text{MISCA-But}^+} < \text{CMB}_{\text{MISCA-100Et}} < \text{CMB}_{\text{MISCA-70Et}} < \text{CMB}_{\text{MISCA-Aq}} < \text{CMB}_{\text{MISCA-70R}}$$

Les résultats de cette analyse atteste que l'extrait le plus bactéricide est MISCA-But<sup>+</sup> parce que sa CMB (1,56 mg/ml) est la plus faible. Tandis que MISCA-70R est le moins bactéricide de tous à cause de la valeur élevée de sa CMB (100 mg/ml). Cependant entre MISCA-But<sup>+</sup> et MISCA-70R, il a été obtenu les extraits (MISCA-100Et, MISCA-70Et et MISCA-Aq) qui sont bactéricides dans l'ordre décroissant suivant: MISCA-100Et (6,25 mg/ml), MISCA-70Et (12,5 mg/ml) et MISCA-Aq (50 mg/ml).

Les rapports établis sur la base des concentrations minimales bactéricides (CMB) des divers extraits de MISCA testés montrent que:

- ✓  $\text{CMB}_{\text{MISCA-70R}} / \text{CMB}_{\text{MISCA-But}^+} = 100 / 1,56 = 64$ ; MISCA-But<sup>+</sup> est 64 fois plus bactéricide que MISCA-70R.
- ✓  $\text{CMB}_{\text{MISCA-Aq}} / \text{CMB}_{\text{MISCA-But}^+} = 50 / 1,56 = 32$ ; MISCA-But<sup>+</sup> est 32 fois plus bactéricide que MISCA-Aq.
- ✓  $\text{CMB}_{\text{MISCA-70Et}} / \text{CMB}_{\text{MISCA-But}^+} = 12,5 / 1,56 = 8$ ; MISCA-But<sup>+</sup> est 8 fois plus bactéricide que MISCA-70Et.
- ✓  $\text{CMB}_{\text{MISCA-100Et}} / \text{CMB}_{\text{MISCA-But}^+} = 6,25 / 1,56 = 4$ ; MISCA-But<sup>+</sup> est 4 fois plus bactéricide que MISCA-100Et.
- ✓  $\text{CMB}_{\text{MISCA-70R}} / \text{CMB}_{\text{MISCA-100Et}} = 100 / 6,25 = 16$ ; MISCA-100Et est 16 fois plus bactéricide que MISCA-70R.

- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-100Et} = 50/6,25 = 8$ ; MISCA-100Et est 8 fois plus bactéricide que MISCA-Aq.
- ✓  $CMB_{MISCA-70Et}/CMB_{MISCA-100Et} = 12,5/6,25 = 2$ ; MISCA-100Et est 2 fois plus bactéricide que MISCA-70Et.
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-70Et} = 100/12,5 = 8$ ; MISCA-70Et est 8 fois plus bactéricide que MISCA-70R.
- ✓  $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-70Et} = 50/12,5 = 4$ ; MISCA-70Et est 4 fois plus bactéricide que MISCA-Aq.
- ✓  $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-Aq} = 100/50 = 2$ ; MISCA-Aq est 2 fois plus bactéricide que MISCA-70R.

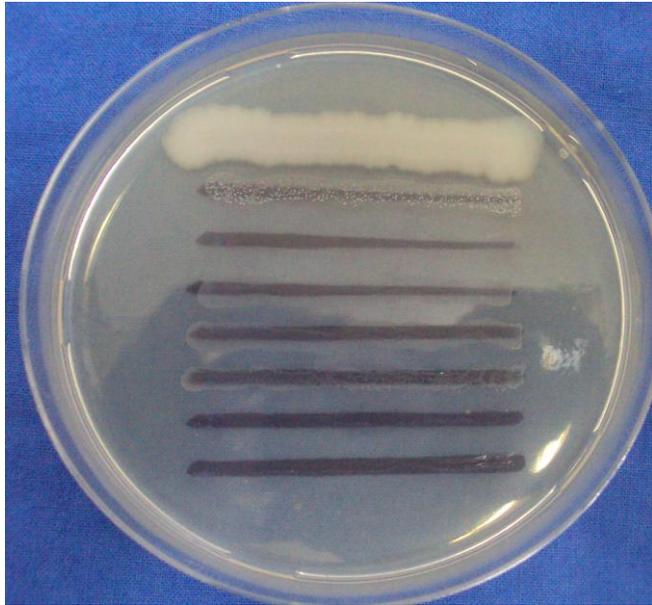
Ces rapports obtenus révèlent que lors du passage de MISCA-Aq à MISCA-But<sup>+</sup>, MISCA-70Et améliore de 4 fois le potentiel bactéricide de MISCA-Aq sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis*, MISCA-100Et de 8 fois et MISCA-But<sup>+</sup> de 32 fois. Tous ces extraits ont été préparés à partir de MISCA-Aq. Ainsi, il est possible de dire que, la méthode par partition de MISCA-Aq dans successivement l'éthanol, l'hexane, l'acétate d'éthyle et le butanol, a permis une meilleure concentration des terpènes et stérols, et des polyphénols de MISCA-But<sup>+</sup>.

### **3-2 Action de l'acide fusidique sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis* par les méthodes par dilution**

#### **3-2.1 Aspect des cultures bactériennes après incubation en milieu liquide et repiquage sur milieu solide**

Après l'incubation à 37°C des ensembles: bouillons inoculés-différentes gammes de concentrations (500 µg/ml à 1,96 µg/ml) de l'acide fusidique durant 18 à 24 heures, l'absence de turbidité en milieu liquide a été remarquée à partir de la concentration de 250 µg/ml.

L'ensemencement des différentes cultures bactériennes du tube témoin de croissance au tube de concentration 500 µg/ml de l'acide fusidique (la plus forte concentration utilisée) sur des boîtes gélosées sur des stries, puis leur incubation à nouveau à 37°C a donné la figure suivante.



Du haut vers le bas:

- ✓ inoculum pur sans Acide
- ✓ inoculum avec 7,81 µg/ml
- ✓ inoculum avec 15,63 µg/ml
- ✓ inoculum avec 31,25 µg/ml
- ✓ inoculum avec 62,5 µg/ml
- ✓ inoculum avec 125 µg/ml
- ✓ inoculum avec 250 µg/ml
- ✓ inoculum avec 500 µg/ml

**Figure 46: Action de l'acide fusidique sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis***

La figure 46 est le résultat des actions qu'ont eues les diverses concentrations de l'acide fusidique sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis*. Elle montre qu'à la concentration de 7,81 µg/ml, il y a des colonies isolées. Celles-ci sont suivies de nappes de colonies plus ou moins denses, puis d'une disparition totale de colonies à partir de la concentration de 250 µg/ml.

### **3-3 Action comparée de l'extrait butanolique de MISCA et de l'acide fusidique sur la croissance *in vitro* des souches**

Cette comparaison indique que:

- ✓ En milieu liquide, le milieu n'est pas trouble à 12,5 mg/ml de l'extrait butanolique de MISCA et à 250 µg/ml de l'acide fusidique.
- ✓ En solide, les colonies isolées sont observées à 25 mg/ml de l'extrait butanolique de MISCA. Tandis que les dernières nappes de colonies sont constatées respectivement à 12,5 mg/ml et à 125 µg/ml de l'extrait butanolique de MISCA et de l'acide fusidique.

## **4- Tri phytochimique des différents extraits de MISCA testés**

**Tableau XIX : Tri phytochimique des différents extraits de MISCA testés**

	Extraits de MISCA						
	MISCA-Aq	MISCA-70Et	MISCA-70R	MISCA-100Et	MISCA-100R	MISCA-But <sup>+</sup>	MISCA-But <sup>-</sup>
Saponosides	+	++	Traces	++	+	-	++
Flavonoïdes	-	-	-	-	-	-	-
Terpènes et stérols	+	++	Traces	++	Traces	++	+
Quinones	-	-	-	-	-	-	-
Alcaloïdes	Traces	-	-	-	-	-	-
Polyphénols	+	+	Traces	+	+	+	+
Tanins catéchiques	-	-	-	-	-	-	-
Tanins galliques	-	-	-	-	-	-	-

- ✓ Signe (++) indique l'abondance du groupe chimique recherché dans l'extrait utilisé,
- ✓ Signe (+) indique la présence,
- ✓ Signe (-) indique l'absence.

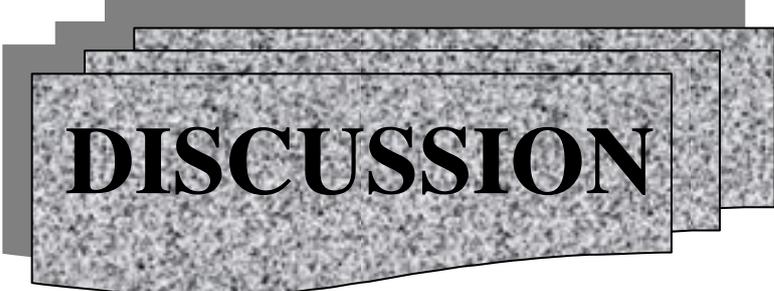
MISCA-Aq contient les saponosides, les terpènes et stérols et les polyphénols, tandis que les alcaloïdes sont sous forme de traces. Cependant, cet extrait est caractérisé par l'absence de flavonoïdes, de quinones, de tanins (catéchiques et galliques) (tableau XIX).

La comparaison des différents composés trouvés dans MISCA-70Et avec ceux de son résidu (MISCA-70R) montre que, MISCA-70Et se caractérise par l'abondance de saponosides, de terpènes et stérols et par la présence de polyphénols. Alors que MISCA-70R renferme les traces de ces composés. Cependant, dans les 2 extraits, l'absence de flavonoïdes, de quinones et de tanins (cathéchiques et galliques) est observée (Tableau XIX).

Quant à MISCA-100Et avec son résidu MISCA-100R, il est constaté qu'il y a dans le premier cité, une abondance de saponosides, de terpènes et stérols avec une juste présence de polyphénols; alors que MISCA-100R se caractérise par la présence de saponosides et de polyphénols, les terpènes et stérols sous forme de traces. Néanmoins, dans les 2 extraits l'absence de flavonoïdes, de quinones, de alcaloïdes et de tanins (cathéchiques et galliques) est constatée (Tableau XIX).

Enfin, le tri phytochimique de MISCA-But<sup>+</sup> et de MISCA-But<sup>-</sup> révèle que dans MISCA-But<sup>+</sup>, il y a d'abondants terpènes et stérols et présence de polyphénols. Alors que MISCA-But<sup>-</sup> se caractérise par d'abondants saponosides et par la présence de terpènes et stérols et de polyphénols. Dans ces 2 extraits, il y a absence de flavonoïdes, de quinones, de alcaloïdes et de tanins (cathéchiques et galliques) (Tableau XIX).

En définitive, les terpènes et stérols sont en abondance dans MISCA-70Et, MISCA-100Et et MISCA-But<sup>+</sup>; alors qu'ils sont présents dans MISCA-Aq et MISCA-But<sup>-</sup> et sous forme de traces dans MISCA-70R et MISCA-100R. Quant aux polyphénols, ils sont présents à la fois dans MISCA-Aq, MISCA-70Et, MISCA-100Et, MISCA-100R, MISCA-But<sup>+</sup> et MISCA-But<sup>-</sup>. Tandis qu'ils sont sous forme de traces dans MISCA-70R (Tableau XIX).



# DISCUSSION

## **1- ACTION DES DIFFERENTS EXTRAITS DE MISCA ET DE L'ACIDE FUSIDIQUE SUR LA CROISSANCE *IN VITRO* DES SOUCHES DE STAPHYLOCOQUES**

### **1-1 Action des différents extraits de MISCA**

Les résultats résumés par la figure 11 confirment aussi que, les bouillons inoculés de staphylocoque méticillino-résistante répartis dans les tubes expérimentaux au contact de gammes de concentrations variées des divers extraits de MISCA utilisés, dans les différentes **séries tests** ont respecté la condition standard de culture (opalescence comprise entre  $5.10^5$  et  $5.10^7$  bactéries survivantes/ml). En effet, il est remarqué que sur la figure, à la dilution  $10^{-4}$  du bouillon inoculé, 2 colonies de staphylocoques méticillino-résistantes survivantes sont laissées sur la strie. Alors que l'anse calibrée utilisée a un diamètre de 2,1 mm et prélève environ 3  $\mu$ l de bouillon inoculé. Si, une relation est établie entre le nombre de bactéries dénombrées à la dilution  $10^{-4}$  (2 colonies), le diamètre de l'anse calibrée utilisée (2,1 mm), le volume prélevé (3  $\mu$ l) et la dilution réalisée pour obtenir les 2 colonies isolées ( $10^4$ ), après calcul, un nombre de colonies survivantes de  $7.10^6$  dans le bouillon inoculé est obtenu. Il est bel et bien compris entre  $5.10^5$  et  $5.10^7$  bactéries survivantes de la condition standard de culture (NASSIF *et al.*, 1990).

Dans la mesure où l'absence de turbidité a été observée pour chaque extrait utilisé à partir des concentrations suivantes:

- ✓ 100 mg/ml pour l'extrait résiduel 70% (MISCA-70R),
- ✓ 6,25 mg/ml pour l'extrait total aqueux (MISCA-Aq),
- ✓ 3,13 mg/ml pour l'extrait éthanolique 70% (MISCA-70Et),
- ✓ 3,13 mg/ml pour l'extrait éthanolique 100% (MISCA-100Et),
- ✓ 1,56 mg/ml pour l'extrait issu du surnageant de l'acétate d'éthyle 50% (MISCA-Ac<sup>+</sup>),
- ✓ 1,56 mg/ml pour l'extrait issu du dépôt du butanol 50% (MISCA-But<sup>-</sup>),

✓ 0,78 mg/ml pour l'extrait butanolique (MISCA-But<sup>+</sup>),

ces concentrations constituent par conséquent et respectivement, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différents extraits de MISCA testés (SIROT, 1990).

De même, dans les différents tableaux (I à V) obtenus au cours des tests expérimentaux, il est constaté qu'aux concentrations suivantes de chaque extrait testé:

✓ pour l'extrait résiduel 70% (MISCA-70R), 100 mg/ml,

✓ pour l'extrait total aqueux (MISCA-Aq), 3,13 mg/ml,

✓ pour l'extrait éthanolique 70% (MISCA-70Et), 1,56 mg/ml,

✓ pour l'extrait éthanolique 100% (MISCA-100Et), 0,78 mg/ml,

✓ pour l'extrait butanolique (MISCA-But<sup>+</sup>), 0,2 mg/ml,

le pourcentage d'au plus 0,01% de bactéries survivantes est laissé après 18 à 24 heures de contact entre les différents extraits de MISCA utilisés et les bouillons inoculés. Ce qui veut dire que ces concentrations déterminées représentent, les concentrations minimales bactéricides (CMB) des différents extraits de MISCA testés sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes (SIROT, 1990).

Cependant, pour l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq) qui est l'extrait de base, les valeurs de paramètres anti-bactériens (concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB)) obtenues avec les souches de staphylocoques méticillino-résistantes sont respectivement 6,25 mg/ml et 3,13 mg/ml.

Le rapport:  $CMB_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-Aq} = 3,13/6,25 = 0,5 < 4$

Selon MARMONIER (1990), si ce rapport est inférieur ou égal à 4, la substance étudiée est bactéricide.

Ceci implique que l'effet de l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq) sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes correspond à cette définition et est donc bactéricide.

La bactéricidie déterminée s'améliore à 2 niveaux:

- ✓ si pour un extrait de MISCA considéré, comparativement à l'inoculum témoin, il y a une diminution progressive des épaisseurs des nappes de colonies sur les stries; mais aussi, une réduction du nombre de colonies sur les stries en passant des faibles concentrations, aux concentrations élevées des extraits de MISCA testés; et qu'à certaines concentrations élevées, il y a même une absence totale de colonies sur certaines stries, cela veut dire que cette bactéricidie décrite plus haut est dose-dépendante puisque liée à l'augmentation des concentrations des extraits de MISCA utilisés.
- ✓ si également lors du passage de MISCA-Aq à MISCA-But<sup>+</sup>, il y a une inhibition visible à 1,56 mg/ml pour MISCA-But<sup>+</sup>, 3,13 mg/ml pour MISCA-100Et, 12,5 mg/ml pour MISCA-70Et et 100 mg/ml pour MISCA-Aq, cela signifie aussi que l'activité bactéricide dose-dépendante observée est fonction de l'état de pureté ou d'amélioration de l'extrait de MISCA testé.

Ces dernières observations sont confirmées par les résultats de la représentation graphique. En effet, si sur la courbe récapitulative de la figure 21, il est remarqué que les valeurs de paramètres anti-bactériens données par MISCA-But<sup>+</sup> sont plus faibles que celles de MISCA-100Et; que celles de MISCA-100Et sont sensiblement égales à celles de MISCA-70Et et que celles de MISCA-Aq sont les plus élevées des valeurs données par les courbes de la zone négative; cela veut dire que l'action qu'ont eues les différentes concentrations des divers extraits de MISCA testés sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes est classée dans un ordre. Cet ordre est décroissant et il est le suivant: MISCA-But<sup>+</sup>, MISCA-100Et, MISCA-70Et et MISCA-Aq.

Ainsi MISCA-But<sup>+</sup> est plus actif sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes que celui de MISCA-100Et. Alors que MISCA-100Et et MISCA-70Et ont des activités anti-bactériennes relativement semblables sur elles. Enfin, MISCA-Aq est moins actif sur ces mêmes souches bactériennes que les autres extraits de MISCA qui possèdent des courbes situées dans la zone négative.

Dans la mesure où MISCA-70R possède des valeurs de paramètres anti-bactériens élevées que tous les autres extraits de MISCA testés, cela signifie que cet extrait est le moins actif de l'ensemble des extraits de MISCA testés sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes utilisées.

Et le tri phytochimique de MISCA-But<sup>+</sup> révèle que ses principes actifs sont essentiellement des terpènes et stérols et des polyphénols. Dans cet extrait, il y a beaucoup plus de terpènes et stérols que de polyphénols.

Le tri phytochimique également des autres extraits de MISCA testés sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes montre que:

- ✓ MISCA-Aq contient les saponosides, les terpènes et stérols et les polyphénols, tandis que les alcaloïdes sont sous forme de traces;
- ✓ MISCA-70Et se caractérise par l'abondance de saponosides, de terpènes et stérols et par la présence de polyphénols;
- ✓ MISCA-70R renferme les traces de ces composés (saponosides, terpènes et stérols et polyphénols);
- ✓ MISCA-100 se caractérise par l'abondance de saponosides, de terpènes et stérols avec une juste présence de polyphénols.

Les travaux réalisés par BISIGNANO *et al.* (2000) sur *Mitracarpus scaber* (MISCA) et les souches de référence (25923 et 33591) de *S. aureus* (souches méticillino-sensibles) ont révélé que sur ces souches, sont actifs les composés tels que l'acide gallique et l'acide 2,4,5-triméthoxybenzoïque. Lesquels composés appartiennent au groupe des tanins.

De la même plante, OKUNADE *et al.* (1999), ensuite GBAGUIDI *et al.* (2005) ont isolé l'azaanthraquinone. Cette molécule appartient au groupe des alcaloïdes possédant des structures quinoniques, et a une activité anti-bactérienne sur le *Dermatophilus congolensis* bovin.

Tous ces composés (terpènes et stérols, alcaloïdes, tanins, alcaloïdes possédant des structures quinoniques et polyphénols) font d'ailleurs partis des nombreuses molécules à action anti-bactérienne isolées à partir des plantes médicinales (COWAN, 1999).

Ainsi, la méthode d'extraction utilisée dans le cadre de ce travail a permis d'aboutir à MISCA-But<sup>+</sup> qui améliore de façon significative (16 fois) l'activité de l'extrait de base (MISCA-Aq). Entre MISCA-Aq et MISCA-But<sup>+</sup>, il y a MISCA-70Et et MISCA-100Et qui ont des actions bactéricides moyennes sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes testées. Car ils sont respectivement 2 fois et 4 fois plus bactéricides que MISCA-Aq.

Alors que MISCA-70R est 32 fois moins bactéricide que MISCA-Aq. La performance moindre de MISCA-70R serait normale et s'expliquerait par le fait qu'il concentrait beaucoup plus de macromolécules (sucres, protéines et glycoprotéines). Ces macrolécules sont en fait des substrats qui favorisent la croissance des souches de staphylocoques méticillino-résistantes (voir la moyenne des bactéries dénombrées dans le tableau V). Elles ne possèdent donc pas d'activité anti-bactérienne sur leur croissance *in vitro*. L'activité apparente de MISCA-70R, MISCA-Ac<sup>+</sup> et MISCA-But<sup>-</sup> s'expliquerait par le fait que, ces extraits contiendraient des traces de principes actifs laissées lors de la décantation des phases, pendant la méthode de partiton. En effet, le tri phytochimique de MISCA-70R a montré que cet extrait contient des traces de terpènes et stérols, et de polyphénols. Ces mêmes molécules sont beaucoup plus concentrées dans MISCA-But<sup>-</sup> que dans MISCA-70R.

De façon générale, lors de la comparaison entre elles, des valeurs de paramètres anti-bactériens (CMI, CMB et CI<sub>50</sub>) obtenues à partir des différents extraits de MISCA testés, il a été constaté que les extraits de MISCA préparés à partir d'alcool sont plus actifs que ceux qui sont hydrosolubles. Le traitement à l'alcool (éthanol d'abord puis butanol ensuite) de MISCA-Aq améliore de manière significative son potentiel bactéricide.

La présence des macromolécules dans l'extrait total aqueux pourrait expliquer en partie la présence des colonies dans la zone d'inhibition lors de l'imprégnation des disques par les différentes gammes de concentrations de MISCA-Aq. En effet, la présence de ces macromolécules peut empêcher une pleine expression de l'activité des principes actifs (terpènes et stérols, alcaloïdes et polyphénols) de l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq). Car comme constaté avec le test de MISCA-70R sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes, ces macromolécules n'ont pratiquement pas d'action bactéricide. Contrairement à l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq) qui n'est pas encore pur, l'oxacilline et la pénicilline G sont des molécules purifiées qui expriment pleinement leurs activités anti-bactériennes, ce qui peut expliquer l'absence de colonies dans les zones d'inhibition décrites autour du disque d'oxacilline et de pénicilline G.

Cette étude montre que la méthode d'extraction par partition de l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq) dans successivement l'éthanol, l'hexane, l'acétate d'éthyle et le butanol est une bonne voie qui permet de concentrer, les substances actives et d'améliorer l'activité de l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq) traditionnellement utilisé contre les infections cutanées. En effet, ce travail a permis d'aboutir à MISCA-But<sup>+</sup> qui est 16 fois plus bactéricide que MISCA-Aq.

En fait, quel que soit l'extrait utilisé, l'activité bactéricide observée est dose-dépendante puisqu'elle est liée à la concentration utilisée. Mais aussi, cette activité bactéricide est fonction de l'état de pureté ou d'amélioration de l'extrait testé. C'est la raison pour laquelle, de tous les extraits de MISCA testés, seul l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) a le meilleur potentiel bactéricide sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes.

Il est 500 fois plus bactéricide que l'extrait résiduel 70% de MISCA (MISCA-70R), 16 fois plus bactéricide que l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq), 8 fois plus bactéricide que l'extrait éthanolique 70% de MISCA (MISCA-70Et) et 4 fois plus bactéricide que l'extrait éthanolique 100% de MISCA (MISCA-100Et). Dans cet extrait (MISCA-But<sup>+</sup>), il y a d'abondants terpènes et stéroïdes et la présence de polyphénols.

Sur la même plante, les travaux de OKUNADE *et al.* (1999), BISIGNANO *et al.* (2000) et GBAGUIDI *et al.* (2005), ont aussi révélé qu'elle contenait des composés actifs tels que les alcaloïdes ayant des structures quinoniques et les tanins, et que ces molécules ont respectivement une action sur les *Dermatophilus congolensis* bovins (cocci Gram positif) et les *S. aureus* multi-sensibles.

La somme de ces résultats révèle que MISCA contient de nombreuses molécules actives qui sont liées à la méthode et au solvant d'extraction utilisés. En effet, les travaux de COWAN (1999) ont montré que, de manière générale, l'utilisation d'un solvant donné pour extraire des molécules actives d'une plante médicinale met plus en évidence, tels groupes de composés actifs par rapport à tels autres. Ainsi, selon le même auteur, l'utilisation des solvants d'extraction suivants:

- ✓ l'eau; permet d'isoler les substances actives telles que les anthocyanines, les tanins, les saponines etc....,
- ✓ l'éthanol; permet d'extraire les composés actifs tels que les tanins, les polyphénols, les polyacétylènes etc...,
- ✓ le méthanol; les terpénoïdes, les flavones, les phénones etc....,
- ✓ le chloroforme; les terpénoïdes et les flavonoïdes,
- ✓ le dichlorométhanol; les terpénoïdes,
- ✓ l'éther; les alcaloïdes, les coumarines, les terpénoïdes etc....,

✓ l'acétone; les flavonols.

Il y va de même si pour extraire les substances actives, il est utilisé une combinaison de solvants. Encore que dans ces cas, il est possible d'isoler les molécules actives ci-dessus citées, mais il peut arriver d'isoler d'autres types de composés qui sont à la fois solubles dans les différents solvants combinés utilisés. Par conséquent, selon le solvant d'extraction et la méthode utilisés, une substance active peut s'exprimer sur une bactérie mieux qu'une autre.

## **1-2 Action de l'acide fusidique**

Avec l'acide fusidique, l'absence de turbidité a été remarquée à partir de la concentration de 3,91 µg/ml, celle-ci constitue par conséquent la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Dans la mesure où les ensemencements des différentes cultures bactériennes montrent les mêmes phénomènes de décroissance des colonies au fur et à mesure que les concentrations de cette molécule standard augmentent et que la disparition totale de colonies est visible à la concentration de 125 µg/ml du stéroïde standard; il est possible de dire que ce composé chimique a une activité anti-bactérienne dose-dépendante sur ces souches bactériennes.

Cette activité anti-bactérienne (ou anti-staphylococcique) de l'acide fusidique a été mise en évidence par les travaux de BABIN (1972), de LECLERC *et al.* (1983) et de COLLIGNON *et al.* (1999). Ces derniers ont même montré que cette substance était aussi active sur les autres bactéries Gram positif, certains bacilles Gram négatif et cocci Gram négatif.

### **1-3 Action comparée de l'extrait butanolique de MISCA et de l'acide fusidique**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) est de 0,78 mg/ml; tandis celle de l'acide fusidique (molécule standard) est de 7,81 µg/ml sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes, il est possible de dire que l'acide fusidique est environ 100 fois plus inhibitrice que l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>). Egalement, si pour qu'il y ait disparition totalement de colonies de staphylocoques méticillino-résistantes sur la strie, il a été utilisé une concentration de 12,5 mg/ml pour l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>); et de 125 µg/ml pour l'acide fusidique; il est aussi possible de dire que l'acide fusidique est environ 100 fois plus actif sur ces souches bactériennes que l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>). Ainsi, l'acide fusidique (stéroïde standard) a un meilleur pouvoir anti-bactérienne que celui de l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>). Et cela peut s'expliquer par le fait que celui-ci est un composé pur contrairement à l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) qui est encore un agrégat de molécules actives (terpènes et stérols et polyphénols). La pureté de la molécule d'acide fusidique permet par conséquent la pleine expression de son principe actif.

## **2- ACTION DES DIFFERENTS EXTRAITS DE MISCA ET DE L'ACIDE FUSIDIQUE SUR LA CROISSANCE *IN VITRO* DES SOUCHES DE STREPTOCOQUES $\beta$ -HEMOLYTIQUES**

### **2-1 Action des différents extraits de MISCA**

Les résultats de la figure 23 révèlent qu'il y a 2 colonies de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques survivantes sur la strie à la dilution  $10^{-4}$ . L'anse calibrée utilisée a un diamètre de 2,1 mm et prélève environ 3  $\mu$ l de bouillon inoculé. Lorsqu'une relation est établie entre le diamètre de l'anse calibrée utilisée (2,1 mm), le volume prélevé (3  $\mu$ l), le nombre de colonies dénombrées à la dilution  $10^{-4}$  (2 colonies) et la dilution effectuée pour obtenir 2 colonies isolées ( $10^4$ ), il est obtenu après calcul,  $7.10^6$  streptocoques  $\beta$ -hémolytiques survivants/ml, dans le bouillon inoculé distribué dans les tubes de la **série test**. Cette valeur de bactéries survivantes obtenue dans le bouillon inoculé, obéit à la condition standard de culture puisqu'elle est comprise entre  $5.10^5$  et  $5.10^7$  bactéries survivantes/ml (NASSIF *et al.*, 1990).

Etant donné que pour extrait testé, à partir des concentrations suivantes:

- ✓ 25 mg /ml de MISCA-Aq,
- ✓ 12,5 mg /ml de MISCA-70Et,
- ✓ 50 mg/ml de MISCA-70R,
- ✓ 12,5 mg/ml de MISCA-100Et,
- ✓ 6,25 mg/ml de MISCA-Ac<sup>+</sup>,
- ✓ 6,25 mg/ml de MISCA-But<sup>-</sup>,
- ✓ 3,13 mg/ml de MISCA-But<sup>+</sup>,

l'absence de turbidité a été observée, cela signifie que, ces concentrations déterminées constituent les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits respectifs de MISCA testés sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques (SIROT, 1990).

Aussi, les concentrations suivantes ont été identifiées dans les tableaux expérimentaux (VII à XI):

- ✓ 100 mg/ml l'extrait résiduel 70% (MISCA-70R),
- ✓ 6,25 mg/ml pour l'extrait total aqueux (MISCA-Aq),
- ✓ 1,56 mg/ml pour l'extrait éthanolique 70% (MISCA-70Et),
- ✓ 0,78 mg/ml pour l'extrait éthanolique 100% (MISCA-100Et),
- ✓ 0,39 mg/ml pour l'extrait butanolique (MISCA-But<sup>+</sup>),

comme celles laissant après 18 à 24 heures de contact, un taux de survivance inférieur ou égal à 0,01% de l'inoculum initial (soit 1 bactérie pour 10000ensemencées). Par conséquent, ces concentrations représentent les concentrations minimales bactéricides (CMB) respectives des différents extraits de MISCA testés sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques (SIROT, 1990).

Néanmoins, pour l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq) qui est l'extrait de base, les valeurs de paramètres anti-bactériens (concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB)) obtenues avec les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques sont respectivement 25 mg/ml et 6,25 mg/ml.

$$\text{Le rapport: } \text{CMB}_{\text{MISCA-Aq}}/\text{CMI}_{\text{MISCA-Aq}} = 6,25/25 = \mathbf{0,25 < 4},$$

Par conséquent, il est possible de dire que MISCA-Aq qui est l'extrait de base a une action bactéricide sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques (MARMONIER, 1990).

Cette bactéricidie observée s'améliore à 2 niveaux:

- ✓ si pour un extrait de MISCA considéré, comparativement à l'inoculum témoin, il y a non seulement une diminution progressive des épaisseurs des nappes de colonies sur les stries; mais aussi, une diminution du nombre de colonies sur les différentes stries en passant des faibles concentrations, aux concentrations élevées des extraits de MISCA testés; qu'à certaines concentrations et sur certaines stries, il y a une absence totale de colonies, cela veut dire que cette bactéricidie observée est dose-dépendante car liée à l'augmentation des concentrations des extraits de MISCA testés.
- ✓ si également, lors du passage de MISCA-Aq à MISCA-But<sup>+</sup>, ce potentiel bactéricide est nettement visible à 6,25 mg/ml de MISCA-But<sup>+</sup>, 12,5 mg/ml de MISCA-100Et, 12,5 mg/ml de MISCA-70Et et 200 mg/ml de MISCA-Aq, cela signifie aussi que cette bactéricidie dose-dépendante constatée est fonction de l'état de pureté ou d'amélioration de l'extrait de MISCA testé.

Les résultats de figure 33 qui est un récapitulatif des courbes des actions des diverses concentrations des 5 extraits de MISCA testés sur les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques confirment l'évolution de cette amélioration. En effet, puisque sur la figure 33, les valeurs de paramètres anti-bactériens obtenues deviennent de plus en plus petites lors du passage de MISCA-Aq à MISCA-But<sup>+</sup>, cela veut dire que MISCA-But<sup>+</sup> est plus actif sur les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques utilisées que MISCA-100Et. Alors que MISCA-100Et est plus actif sur les mêmes souches bactériennes que MISCA-70Et. Sur ces souches utilisées, de tous les extraits de MISCA testés et dont les courbes d'action sont situées dans la zone négative de la figure 33, seul MISCA-Aq est le moins actif.

Contrairement aux autres extraits de MISCA testés, MISCA-70R possède des valeurs de paramètres anti-bactériens élevées. Ce qui prouve que cet extrait est le moins actif de l'ensemble des extraits de MISCA testés sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques. Par conséquent, il est possible de dire que, la méthode d'extraction par partition de MISCA-Aq dans une succession de solvants tels que: éthanol, hexane, acétate d'éthyle et butanol permet une meilleure concentration des principes actifs de MISCA tels que les terpènes et stérols, et les polyphénols.

Le tri phytochimique des autres extraits de MISCA testés sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques révèle que:

- ✓ MISCA-Aq se caractérise par la présence de saponosides, de terpènes et stérols et de polyphénols, les alcaloïdes sont sous forme de traces;
- ✓ MISCA-70Et contient d'abondants saponosides, terpènes et stérols et est caractérisé par la présence de polyphénols;
- ✓ MISCA-70R contient des traces de saponosides, de terpènes et stérols et de polyphénols;
- ✓ MISCA-100 se caractérise par l'abondance de saponosides, de terpènes et stérols et par la présence de polyphénols.

Selon COWAN, (1999), ces composés (terpènes et stérols, alcaloïdes, saponosides et polyphénols) font partis des molécules actives isolées à partir des plantes médicinales sur les bactéries.

Cette méthode d'extraction a permis d'obtenir MISCA-But<sup>+</sup> qui est 16 fois plus bactéricide que MISCA-Aq. La méthode de purification choisie a permis d'obtenir MISCA-100Et et MISCA-70Et qui ont des potentiels bactéricides moyens puisqu'étant respectivement 8 fois et 4 fois plus bactéricides que MISCA-Aq.

Cependant, il est à remarquer que MISCA-70R est 16 fois moins bactéricide que MISCA-Aq. La faible activité de MISCA-70R pourrait être expliquée par le fait qu'il concentrait beaucoup plus de macromolécules (sucres, protéines et glycoprotéines) qui n'ont aucune activité anti-bactérienne sur la croissance des streptocoques  $\beta$ -hémolytiques. Ces macromolécules sont au contraire des substrats qui favorisent la croissance des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques (voir la moyenne des bactéries dénombrées dans le tableau XI).

Toutefois, l'activité apparente de MISCA-70R, MISCA-Ac<sup>+</sup> et MISCA-But<sup>-</sup> s'expliquerait par le fait que, ces extraits contiendraient des traces de principes actifs laissés lors de la décantation des phases, pendant la préparation des extraits de MISCA. En effet, le tri phytochimique de MISCA-70R a révélé que cet extrait contient des traces de terpènes et stéroïdes, et de polyphénols. Ces mêmes molécules sont beaucoup plus dans MISCA-But<sup>-</sup> que dans MISCA-70R.

De manière générale, lors de la comparaison entre elles des valeurs de paramètres anti-bactériens (CMI, CMB et CI<sub>50</sub>) obtenues à partir des différents extraits de MISCA testés, il est remarqué que, les extraits préparés à partir d'alcool sont plus bactéricides que ceux préparés à partir de l'eau. Le traitement à l'alcool (éthanol d'abord puis butanol ensuite) de MISCA-Aq améliore de manière significative le pouvoir bactéricide de MISCA.

Cette étude montre que la méthode d'extraction par partition dans plusieurs solvants successifs est une bonne voie qui permet de concentrer les principes actifs et d'améliorer l'activité de l'extrait total aqueux de MISCA traditionnellement utilisé contre les infections cutanées. En effet, cette méthode a permis d'aboutir à MISCA-But<sup>+</sup> qui est 16 fois plus bactéricide que MISCA-Aq.

En clair, cette étude a permis de montrer que les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques utilisées sont sensibles à tous les extraits. Tous ces extraits sont plus ou moins actifs mais le plus bactéricide est MISCA-But<sup>+</sup> (CMB = 0,39 mg/ml) et le moins bactéricide est MISCA-70R (CMB = 100 mg/ml). MISCA-100Et (CMB = 0,78 mg/ml), MISCA-70Et (CMB = 1,56 mg/ml) et MISCA-Aq (CMB = 6,25 mg/ml) ont des actions bactéricides intermédiaires entre MISCA-But<sup>+</sup> et MISCA-70R. Tous les extraits agissent cependant selon un effet dose-réponse. La bactéricidie constatée est non seulement dose-dépendante, mais elle est liée à la pureté (amélioration) de l'extrait de MISCA testé.

L'activité élevée de MISCA-But<sup>+</sup> est due à la présence d'abondants terpènes et stérols et à la présence de polyphénols.

OKUNADE *et al.* (1999), BISIGNANO *et al.* (2000) et GBAGUIDI *et al.* (2005) ont montré par leurs travaux que MISCA contenait aussi des alcaloïdes possédant des structures quinoniques et des tanins.

L'ensemble des différents résultats indique que MISCA est constituée d'une flopée de molécules actives qui s'expriment selon la méthode d'extraction et le solvant utilisés. En effet, COWAN (1999) a révélé par ses travaux que, de façon générale, l'utilisation d'un solvant donné pour extraire des substances actives d'une plante médicinale mettait plus en évidence, tels groupes de molécules actives par rapport à tels autres. Ainsi, l'utilisation des solvants d'extraction suivants:

- ✓ l'eau; permet d'isoler les terpénoïdes, les polypeptides, les lectines etc....,
- ✓ l'éthanol; les flavonols, les stérols, les alcaloïdes etc....,
- ✓ le méthanol; les anthocyanines, les saponines, les xanthoxyllines etc....,
- ✓ le chloroforme; les terpénoïdes et les flavonoïdes,
- ✓ le dichlorométhanol; les terpénoïdes,

- ✓ l'éther; les alcaloïdes, les coumarines, les terpénoïdes etc...,
- ✓ l'acétone; les flavonols.

De même, l'utilisation d'une combinaison de solvants peut non seulement permettre d'isoler les composés actifs ci-dessus cités, mais aussi, d'autres types de substances actives solubles à la fois dans les différents solvants combinés utilisés. Ainsi, selon le solvant d'extraction et la méthode utilisés, un composé actif peut mieux s'exprimer sur une bactérie qu'un autre.

## **2-2 Action de l'acide fusidique**

Si l'action de l'acide fusidique sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques a révélé que les cultures bactériennes n'étaient pas troubles à la concentration de 500  $\mu\text{g/ml}$ , cela signifie que celle-ci constitue la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'acide fusidique.

Dans la mesure où les nappes de colonies apparaissent de la concentration 125  $\mu\text{g/ml}$  à la concentration 250  $\mu\text{g/ml}$ , puis sont suivies d'apparition de colonies isolées à la concentration de 500  $\mu\text{g/ml}$ , il est possible de dire que l'acide fusidique a une activité anti-bactérienne dose-dépendante sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques.

Les travaux de LECLERC *et al.* (1983) et de COLLIGNON *et al.* (1999) ont confirmé l'activité anti-bactérienne de cette molécule standard sur les bactéries Gram positif (streptocoques  $\beta$ -hémolytiques).

### **2-3 Action comparée de l'extrait butanolique de MISCA et de l'acide fusidique**

La concentration minimale inhibitrice de l'acide fusidique est de 500 µg/ml, alors que celle de l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) est de 3,13 mg/ml sur les souches de streptocoques β-hémolytique; il est possible de dire que la molécule pure d'acide fusidique est environ 6 fois plus inhibitrice que celle de l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>). De plus, sur les mêmes souches bactériennes, il a été constaté qu'avec l'acide fusidique, les colonies isolées apparaissent à la concentration de 500 µg/ml; alors qu'avec l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>), c'est à la concentration de 6,25 mg/ml que celle-ci est visible. Il est également possible de dire que l'acide fusidique est environ 12 fois plus actif que l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>). Ainsi, l'acide fusidique (stéroïde standard) a un meilleur potentiel anti-bactérien que celui de l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>). Et cela peut se comprendre par le fait que celui-ci est un composé pur contrairement à l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) qui est encore un agrégat de composés actifs (terpènes et stérols et polyphénols). La pureté de la molécule d'acide fusidique permet par conséquent la pleine expression de son principe actif.

### **3- ACTION DES DIFFERENTS EXTRAITS DE MISCA ET DE L'ACIDE FUSIDIQUE SUR LA CROISSANCE *IN VITRO* DES SOUCHES D'ENTEROCOQUES**

#### **3-1 Action des différents extraits de MISCA**

Sur la figure 35, il est à constater qu'il y a 2 colonies d'*Enterococcus faecalis* survivantes sur la strie correspondant la dilution  $10^{-4}$ . Dans la mesure où, l'anse calibrée utilisée à un diamètre de 2,1 mm, prélève 3  $\mu$ l et qu'à la dilution  $10^{-4}$ , 2 colonies survivent, il est obtenu après calcul,  $7.10^6$  *Enterococcus faecalis* survivants/ml du bouillon inoculé réparti dans les tubes expérimentaux. Le nombre obtenu a respecté la condition standard de culture (opalescence comprise entre  $5.10^5$  et  $5.10^7$  bactéries survivantes/ml) (NASSIF *et al.*, 1990).

Les concentrations ci-dessous sont celles, à partir desquelles, les cultures bactériennes obtenues n'étaient plus troubles après 18 à 24 heures d'incubation. Elles constituent donc les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différents extraits testés (SIROT, 1990).

- ✓ Pour MISCA-Aq, la CMI est de 50 mg /ml.
- ✓ Pour MISCA-70Et, la CMI est de 25 mg /ml.
- ✓ Pour MISCA-70R, la CMI est de 50 mg/ml.
- ✓ Pour MISCA-100Et, la CMI est de 25 mg/ml.
- ✓ Pour MISCA-Ac<sup>+</sup>, la CMI est de 25 mg/ml.
- ✓ Pour MISCA-But<sup>-</sup>, la CMI est de 25 mg/ml.
- ✓ Pour MISCA-But<sup>+</sup>, la CMI est de 12,5 mg/ml.

En plus, les résultats des tableaux XIII à XVII montrent qu'aux concentrations ci-dessous, environ 99,99% de bactéries ont été inhibées par chaque extrait de MISCA testé après 18 à 24 heures d'incubation. Ces concentrations déterminées constituent par conséquent, les concentrations minimales bactéricides (CMB) des différents extraits testés (SIROT, 1990).

- ✓ Pour l'extrait total aqueux, la CMB est de 50 mg/ml.
- ✓ Pour l'extrait éthanolique 70%, la CMB est de 12,5 mg/ml.
- ✓ Pour l'extrait résiduel 70%, la CMB est de 100 mg/ml.
- ✓ Pour l'extrait éthanolique 100%, la CMB est de 6,25 mg/ml.
- ✓ Pour l'extrait butanolique, la CMB est de 1,56 mg/ml.

Par ailleurs, pour l'extrait total aqueux qui est l'extrait de base, les valeurs de paramètres anti-bactériens (concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB)) obtenues avec les souches d'*Enterococcus faecalis* sont identiques (50 mg/ml).

Le rapport:  $CMB_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-Aq} = 50/50 = 1 < 4$ .

Par conséquent, cela veut dire que, l'action de l'extrait total aqueux de MISCA sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis* est une activité bactéricide (MARMONIER, 1990).

L'action bactéricide constatée devient meilleure à 2 niveaux:

- ✓ si pour un extrait de MISCA considéré, comparativement à l'inoculum témoin, il y a non seulement une diminution progressive des épaisseurs des nappes de colonies sur les stries; mais aussi, une diminution du nombre de colonies lors de l'augmentation des concentrations, et qu'à certaines concentrations élevées et sur certaines stries, il y a une absence totale de colonies; cela signifie que la bactéricidie décrite plus haut est dose-dépendante parce que liée à l'augmentation des concentrations des extraits de MISCA testés.

✓ si lors du passage de MISCA-Aq à MISCA-But<sup>+</sup>, l'inhibition nette des souches d'*Enterococcus faecalis* est observée à 1,56 mg/ml de MISCA-But<sup>+</sup>, 12,5 mg/ml de MISCA-100Et et de MISCA-70Et et 50 mg/ml de MISCA-Aq, cela veut dire que, la bactéricidie dose-dépendante constatée est liée à l'état de pureté ou d'amélioration de l'extrait de MISCA testé.

Sur la figure 45 est récapitulée les actions qu'ont eues les différentes concentrations des 5 extraits de MISCA testés sur les souches d'*Enterococcus faecalis*. Dans la mesure où, sur cette figure, les valeurs de paramètres anti-bactériens obtenues passent des valeurs positives aux valeurs négatives, de MISCA-70R à MISCA-But<sup>+</sup>, il est possible de dire que MISCA-Aq est plus actif sur les souches d'*Enterococcus faecalis* que MISCA-70R. MISCA-70Et est plus actif sur ces souches que MISCA-Aq et que MISCA-100Et a plus d'action sur elles que MISCA-70Et. Parmi tous ces extraits testés, seul MISCA-But<sup>+</sup> a la meilleure activité anti-bactérienne sur ces souches car c'est cet extrait qui possède les plus faibles valeurs de paramètres anti-bactériens. Ces résultats confirment une fois encore que l'activité bactéricide s'améliore lors du passage de MISCA-Aq à MISCA-But<sup>+</sup>.

Le tri phytochimique des autres extraits de MISCA testés sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis* montre que:

- ✓ MISCA-Aq est caractérisé par la présence de saponosides, de terpènes et stérols et de polyphénols, les alcaloïdes sont sous forme de traces;
- ✓ MISCA-70Et est caractérisé par l'abondance de saponosides, de terpènes et stérols et par la présence de polyphénols;
- ✓ MISCA-70R contient des saponosides, des terpènes et stérols et des polyphénols sous forme de traces;

✓ MISCA-100 contient d'abondants saponosides, terpènes et stérols et se caractérise par la présence de polyphénols.

Lesquels composés (terpènes et stérols, alcaloïdes, saponosides et polyphénols) font partis de ceux isolés à partir des plantes médicinales et possédant des activités anti-bactériennes (COWAN, 1999). La méthode d'extraction a permis d'aboutir à MISCA-But<sup>+</sup> qui est 32 fois plus bactéricide que MISCA-Aq. La méthode de purification choisie a aussi permis d'obtenir MISCA-100Et et MISCA-70Et qui ont des potentiels bactéricides moyens puisqu'étant respectivement 8 fois et 4 fois plus bactéricides que MISCA-Aq.

Contrairement à ces extraits de MISCA qui sont tous plus bactéricides que MISCA-Aq, il est constaté que MISCA-Aq est 2 fois plus bactéricide que MISCA-70R.

L'activité moindre de MISCA-70R s'expliquerait par le fait qu'il concentrait beaucoup plus de macromolécules (sucres, protéines et glycoprotéines) qui n'ont pas d'effet bactéricide sur la croissance *in vitro* des *Enterococcus faecalis* (voir la moyenne de bactéries dénombrées dans le tableau XVII). Néanmoins, l'activité apparente de MISCA-70R, MISCA-Ac<sup>+</sup> et MISCA-But<sup>-</sup> s'expliquerait par le fait que ces extraits contiendraient des traces de principes actifs laissés lors de la décantation des phases, pendant la préparation des extraits de MISCA. En effet, le tri phytochimique de MISCA-70R indique la présence de traces de terpènes et de stérols, et de polyphénols. Alors que, celui de MISCA-But<sup>-</sup> révèle la présence de beaucoup plus de terpènes et stérols, et de polyphénols dans cet extrait que dans MISCA-70R.

De manière générale, la comparaison des valeurs de paramètres anti-bactériens (CMI, CMB et CI<sub>50</sub>) obtenues entre elles a permis de constater que les extraits préparés à partir d'alcool sont plus bactéricides que ceux préparés à partir de l'eau. Le traitement à l'alcool de MISCA-Aq améliore de manière significative le potentiel bactéricide de MISCA.

Cette étude a permis de démontrer que les souches d'*Enterococcus faecalis* sont sensibles aux différents extraits de MISCA préparés. Tous ces extraits ont un effet dose-dépendant sur leur croissance *in vitro*.

Toutefois, l'extrait butanolique de MISCA est celui qui possède le potentiel bactéricide le plus élevé tel que mise en évidence par sa valeur de CMB égale à 1,56 mg/ml. Cette CMB est 32 fois plus petite que celle de l'extrait total aqueux de MISCA. Ceci démontre que, l'extraction par partition dans des divers solvants permet de mieux concentrer les substances responsables de l'activité bactéricide de MISCA et d'améliorer l'activité de l'extrait total aqueux de MISCA traditionnellement utilisé contre les infections cutanées. Ce potentiel bactéricide dose-dépendant est donc fonction de l'état de pureté de l'extrait de MISCA testé. Cette action bactéricide élevée de l'extrait butanolique est liée à la présence dans cet extrait d'abondants terpènes et stéroïdes et à la présence de polyphénols.

Les nombreuses études réalisées par OKUNADE *et al.* (1999), BISIGNANO *et al.* (2000) et GBAGUIDI *et al.* (2005) ont révélé que MISCA contenait également des alcaloïdes ayant des structures quinoniques et des tanins.

L'ensemble de ces résultats montre que MISCA est constituée d'abondantes substances actives qui s'expriment selon la méthode et le solvant d'extraction utilisés. En effet, les travaux de COWAN (1999) ont révélé que généralement, l'utilisation d'un solvant précis pour l'extraction des composés actifs d'une plante médicinale mettait plus en évidence, tels groupes de substances actives que tels autres. Ainsi, l'utilisation des solvants d'extraction suivants:

- ✓ l'eau; permet d'isoler les tanins, les anthocyanines, les polypeptides etc....,
- ✓ l'éthanol; les flavonols, les tanins, les polyacétylènes etc....,
- ✓ le méthanol; les saponines, les terpénoïdes, les phénones etc....,

- ✓ le chloroforme; les terpénoïdes et les flavonoïdes,
- ✓ le dichlorométhanol; les terpénoïdes,
- ✓ l'éther; les alcaloïdes, les coumarines, les terpénoïdes etc...,
- ✓ l'acétone; les flavonols.

L'utilisation d'une combinaison de solvants peut permettre également, d'isoler non seulement les substances actives ci-dessus cités, mais aussi, d'autres types de molécules actives solubles à la fois dans les différents solvants combinés utilisés. De cette façon, le solvant d'extraction et la méthode utilisés peuvent permettre à une substance d'être mieux mise en évidence sur une bactérie qu'une autre.

### **3-2 Action de l'acide fusidique**

Sur les souches d'*Enterococcus faecalis*, il a été constaté que les cultures bactériennes n'étaient pas troubles à partir de la 250 µg/ml. Celle-ci constitue par conséquent, la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'acide fusidique.

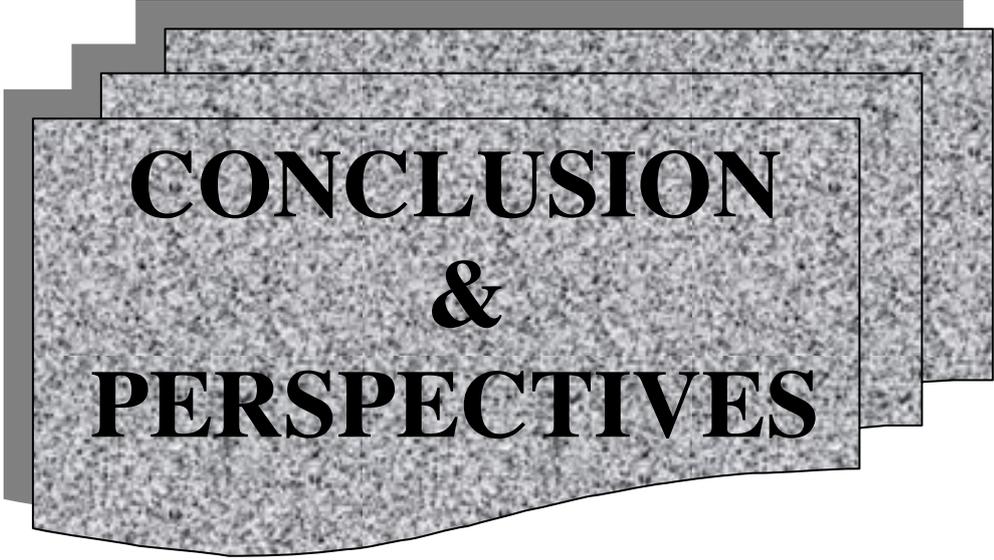
Dans la mesure où il y a apparition de colonies isolées à la concentration de 7,81 µg/ml, des nappes de colonies à partir de la concentration de 15,63 µg/ml jusqu'à la concentration de 125 µg/ml et disparition totale de colonies de la concentration de 250 µg/ml jusqu'à la concentration de 500 µg/ml; il est possible de dire que l'acide fusidique a une activité anti-bactérienne dose-dépendante sur la croissance *in vitro* des souches d'*Enterococcus faecalis*.

Les travaux de LECLERC *et al.* (1983) et de COLLIGNON *et al.* (1999) ont confirmé l'activité anti-bactérienne de cette molécule standard sur les bactéries Gram positif (*Enterococcus faecalis*).

### **3-3 Action comparée de l'extrait butanolique de MISCA et de l'acide fusidique**

La concentration minimale inhibitrice de l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) est de 12,5 mg/ml, alors que celle de l'acide fusidique est de 250 µg/ml sur les souches d'*Enterococcus faecalis*; il est possible de dire la molécule pure d'acide fusidique est environ 50 fois plus inhibitrice que celle de l'extrait butanolique. De même, sur les mêmes souches bactériennes, il est remarqué qu'avec l'acide fusidique, la dernière nappe de colonies est obtenue à la concentration de 125 µg/ml; alors qu'avec l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>), c'est à la concentration de 12,5 mg/ml que celle-ci est visible. Il est aussi possible de dire que l'acide fusidique est environ 100 fois plus actif que l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>). Ainsi, l'acide fusidique (stéroïde standard) a un meilleur potentiel anti-bactérien que celui de l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>). Et cela peut s'expliquer par le fait que celui-ci est un composé pur contrairement à l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) qui est encore un agrégat de substances actives (terpènes et stéroïls et polyphénols). La pureté de la molécule d'acide fusidique permet par conséquent la pleine expression de son principe actif.

De manière générale, l'action comparée de l'acide fusidique simultanément sur les différentes souches bactériennes (staphylocoques méticillio-résistantes, streptocoques  $\beta$ -hémolytiques et *Enterococcus faecalis*) a montré que l'acide fusidique est plus actif sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes que celles d'*Enterococcus faecalis*, plus actif sur les souches d'*Enterococcus faecalis* que celles de streptocoques  $\beta$  hémolytiques. Et cela est remarqué par le fait que pour les mêmes gammes de concentrations de l'acide fusidique testées, la molécule standard a déjà une action inhibitrice sur les souches de staphylocoques méticillio-résistantes à partir de la concentration de 3,91  $\mu\text{g/ml}$ , alors que pour les souches d'*Enterococcus faecalis*, c'est à partir de la concentration de 250  $\mu\text{g/ml}$  et de 500  $\mu\text{g/ml}$  pour souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques. Ces observations ont été confirmées par les travaux de BABIN (1972), de LECLERC *et al.* (1983) et de COLLIGNON *et al.* (1999). Ces différents auteurs ont montré que l'acide fusidique était un puissant anti-staphylococcique et qu'il avait une activité anti-bactérienne relativement moindre sur les autres bactéries Gram positif.



**CONCLUSION  
&  
PERSPECTIVES**

## 1- CONCLUSION

Quel que soit l'extrait de MISCA utilisé, l'activité bactéricide déterminée est dose-dépendante puisqu'elle est liée à la concentration utilisée. Cependant, cette bactéricidie est fonction de la pureté de l'extrait testé c'est-à-dire que cet extrait est d'autant plus efficace que ses principes actifs sont débarrassés de molécules encombrantes. Elle est également liée à la méthode et le solvant d'extraction utilisés. En effet, il a été montré que selon la méthode et le solvant d'extraction utilisés, certaines molécules actives identifiées dans MISCA, s'expriment mieux sur la bactérie testée que d'autres. Cependant, dans ce travail, les résultats obtenus ont montré que, tous les extraits testés sont actifs mais que parmi ceux-ci, seul l'extrait butanolique de MISCA possède l'activité bactéricide la plus élevée. Le tri-phytochimique a montré que cette bactéricidie est aussi liée à la présence dans cet extrait de polyphénols, et d'abondants terpènes et stérols. Ces composés font partis des nombreuses molécules à action anti-bactérienne synthétisées par les plantes médicinales.

Le test d'un stéroïde standard, l'acide fusidique sur les diverses souches bactériennes a confirmé les pouvoirs anti-bactériens que peuvent avoir de manière générale les terpènes et stérols sur ces souches bactériennes. En effet, il a été démontré que cette molécule pure comparativement à l'extrait butanolique de MISCA est:

- ✓ environ 100 fois plus actif sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes;
- ✓ environ 12 fois plus actif sur les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques;
- ✓ environ 100 fois plus actif sur les souches d'*Enterococcus faecalis*.

L'acide fusidique est plus actif sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes que celles d'*Enterococcus faecalis*; plus actif sur les souches d'*Enterococcus faecalis* que celles de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques.:

Cependant, le potentiel bactéricide élevé de l'extrait butanolique de MISCA par rapport aux autres extraits est vérifié quelque soit la souche bactérienne considérée. En effet, cet extrait est:

- ✓ pour les souches de staphylocoques méticillino-résistantes; 500 fois plus bactéricide que l'extrait résiduel 70%, 16 plus bactéricide que l'extrait total aqueux, 8 fois plus bactéricide que l'extrait éthanolique 70% et 4 fois plus bactéricide que l'extrait éthanolique 100%;
- ✓ pour les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques; 256 plus bactéricide que l'extrait résiduel 70%, 16 plus bactéricide que l'extrait total aqueux, 4 fois plus bactéricide que l'extrait éthanolique 70% et 2 fois plus bactéricide que l'extrait éthanolique 100%;
- ✓ pour les souches d'*Enterococcus faecalis*; 64 fois plus bactéricide que l'extrait résiduel 70%, 32 plus bactéricide que l'extrait total aqueux, 8 fois plus bactéricide que l'extrait éthanolique 70% et 4 fois plus bactéricide que l'extrait éthanolique 100%.

Cette amélioration progressive des extraits lors du passage de l'extrait total aqueux à l'extrait butanolique est due à la technique de purification utilisée.

En effet, c'est de l'extrait total aqueux qu'a été préparé l'extrait éthanolique 70% et l'extrait éthanolique 100%.

L'extrait éthanolique 70% a été obtenu en utilisant un mélange hydroalcoolique éthanol-eau (70/30: V/V). Alors que l'extrait éthanolique 100% a été préparé à partir de l'éthanol pur.

Quant à l'extrait butanolique, il a été préparé à partir de l'extrait éthanolique 100% en utilisant successivement des solvants tels que l'hexane, l'acétate d'éthyle 50% et le butanol 50%.

Ainsi, l'obtention de l'extrait butanolique par partition de l'extrait éthanolique 100% dans successivement ces différents solvants est à la base de l'activité bactéricide beaucoup plus nette et plus élevée de cet extrait sur la croissance *in vitro* des souches bactériennes utilisées pendant cette étude.

Dans l'ordre d'activité des extraits sur la croissance *in vitro* des souches bactériennes, il a été déterminé en premier lieu l'extrait butanolique, ensuite l'extrait éthanolique 100%, l'extrait éthanolique 70%, l'extrait total aqueux et enfin l'extrait du résidu 70%.

L'extrait éthanolique 100% est:

- ✓ sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes, 128 fois plus bactéricide que l'extrait résiduel 70%, 4 fois plus bactéricide que l'extrait total aqueux et 2 fois plus bactéricide que l'extrait éthanolique 70%.
- ✓ sur les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques, 128 fois plus bactéricide que l'extrait résiduel 70%, 8 fois plus bactéricide que l'extrait total aqueux et 2 fois plus bactéricide que l'extrait éthanolique 70%.
- ✓ sur les souches d'*Enterococcus faecalis*, 16 fois plus bactéricide que l'extrait résiduel 70%, 8 fois plus bactéricide que l'extrait total aqueux et 2 fois plus bactéricide que l'extrait éthanolique 70%.

L'extrait éthanolique 70% est:

- ✓ sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes, 64 fois plus bactéricide que l'extrait résiduel 70% et 2 fois plus bactéricide que l'extrait total aqueux.
- ✓ sur les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques, 64 fois plus bactéricide que l'extrait résiduel 70% et 4 fois plus bactéricide que l'extrait total aqueux.
- ✓ sur les souches d'*Enterococcus faecalis*, 8 fois plus bactéricide que l'extrait résiduel 70% et 4 fois plus bactéricide que l'extrait total aqueux.

L'extrait total aqueux est:

- ✓ sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes, 32 fois plus bactéricide que l'extrait résiduel 70%.
- ✓ sur les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques, 16 fois plus bactéricide que l'extrait résiduel 70%.
- ✓ sur les souches d'*Enterococcus faecalis*, 2 fois plus bactéricide que l'extrait résiduel 70%.

Par conséquent, la plus grande efficacité de l'extrait butanolique sur la croissance *in vitro* des souches bactériennes est la preuve que l'utilisation de la combinaison de solvants favorise l'isolement dans le cas d'espèce des molécules actives (terpènes et stérols, et polyphénols) ayant cette activité bactéricide. En réalité, l'amélioration de l'activité bactéricide de l'extrait total aqueux à l'extrait butanolique est aussi la preuve irréfutable que les molécules impliquées dans cette activité de l'extrait butanolique étaient masquées par un ensemble de molécules qui peuvent être qualifiées de molécules encombrantes. La technique d'amélioration de l'activité de l'extrait total aqueux à l'extrait butanolique est appelée la méthode de modélisation. Cette méthode a été bio-guidée, puisque, les différents extraits ont été directement testés sur la croissance *in vitro* des souches bactériennes testées. En fait, pendant chaque test expérimental, seul l'extrait le plus actif a été retenu et fractionné par partition dans un solvant précis. Ce sont ces tests qui ont permis de déterminer les paramètres anti-bactériens de chaque extrait utilisé.

La méthode par partition considérée a permis d'améliorer considérablement l'activité anti-bactérienne de l'extrait de base (l'extrait total aqueux) utilisé traditionnellement contre les infections cutanées.

Par ailleurs, l'activité apparente de l'extrait résiduel 70%, de l'extrait issu du surnageant de l'acétate d'éthyle 50% et de l'extrait issu du dépôt du butanol 50% est due au fait que la technique utilisée pour améliorer les extraits a laissé des traces de principes actifs (terpènes et stéroïdes, et polyphénols) dans ces extraits lors de la décantation des phases.

L'extrait butanolique est bactéricide sur les souches bactériennes testées, dans l'ordre décroissant suivant:

- ✓ les souches de staphylocoques méticillino-résistantes avec les paramètres anti-bactériens suivants: CMI = 0,78 mg/ml, CMB = 0,2 mg/ml et CI<sub>50</sub> = 0,02 mg/ml;
- ✓ les souches de streptocoques β-hémolytiques avec les paramètres antibactériens suivants: CMI = 3,13 mg/ml, CMB = 0,39 mg/ml et CI<sub>50</sub> = 0,02 mg/ml;
- ✓ les souches d'*Enterococcus faecalis* avec les paramètres antibactériens suivants: CMI = 12,5 mg/ml, CMB = 1,56 mg/ml et CI<sub>50</sub> = 0,06 mg/ml.

En clair, les souches de staphylocoques méticillino-résistantes sont plus sensibles à l'extrait butanolique que les souches de streptocoques β-hémolytiques. De toutes ces souches testées, seules les souches d'*Enterococcus faecalis* sont les moins sensibles à l'extrait butanolique.

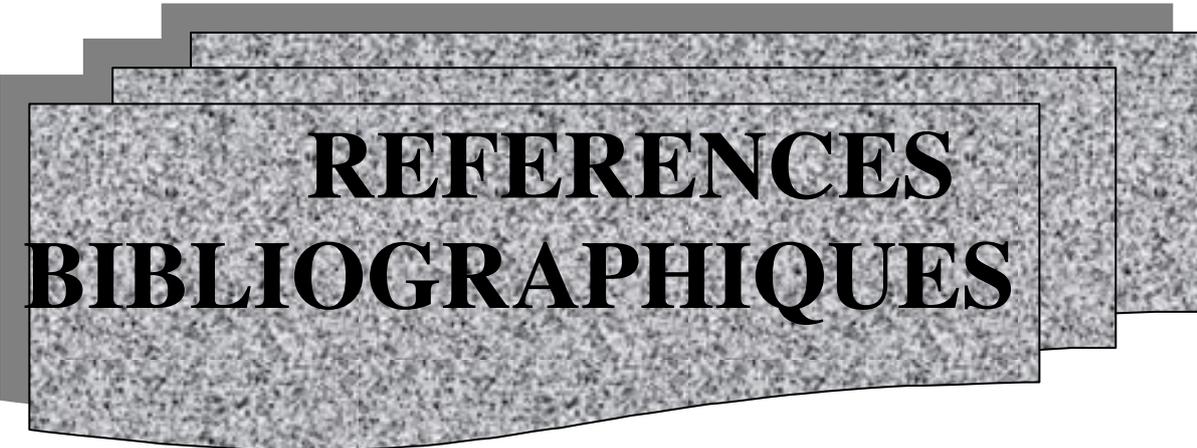
Ainsi, il est possible de dire que tous les extraits de MISCA testés miment très bien l'activité anti-bactérienne de l'acide fusidique (antibiotique standard). Cependant avec un potentiel anti-bactérien beaucoup plus grand de l'extrait butanolique, qui est ici l'extrait le plus amélioré. Tous les extraits de MISCA testés pourraient donc avoir les mêmes propriétés thérapeutiques que l'acide fusidique.

## **2- PERSPECTIVES**

Les résultats obtenus montrent que des médicaments de source naturelle peuvent être améliorés contre les souches de staphylocoques, les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques et les souches d'entérocoques (*Enterococcus faecalis*), des germes mis en cause dans la plupart des infections cutanéomuqueuses humaines et donc qui constituent des préoccupations médicales de chaque jour.

Les tests ont montré une meilleure activité des extraits butanoliques de MISCA sur les trois germes, cela semble démontrer que les actions anti-bactériennes des substances actives (terpènes et stérols, et polyphénols) sur les cocci Gram positif se trouvent concentrées dans ces dits extraits. Les extraits butanoliques constituent par conséquent un espoir certain pour faire un médicament contre les infections dues à ces souches bactériennes.

La prochaine étape du travail sera d'identifier, d'isoler et de purifier la molécule la plus active de ces 3 composés (terpènes et stérols, et polyphénols). Cette étape du travail permettra certainement d'améliorer les paramètres anti-bactériens (CMI, CMB et CI<sub>50</sub>) de *Mitracarpus scaber*, de mettre au point des antibiotiques contre les cocci Gram positif étudiés et donc de pallier les échecs constatés ça et là des antibiotiques usuels contre ces germes. Le test d'amélioration des paramètres anti-bactériens de *Mitracarpus scaber* permettra sûrement de savoir si ce principe actif isolé, identifié et purifié agissait en synergie avec les autres molécules ou peut agir de façon indépendante sur ces cocci Gram positif.



**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

**ABOUGHE S. A. (1998).** Evaluation de l'effet cardio-dépresseur de MISCA en comparaison avec l'action des anti-calciques usuels. Mémoire de DEA de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 30 pages.

**ABERE T.A., ONYEKWELI A.O and UKOH G.C. (2007).** *In vitro* antimicrobial activity of the Extract of *Mitracarpus scaber* leaves formulated as syrup. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, Volume 6, N°1, pp. 679-682.

**ACAR J. F. (1980).** The disc susceptibiliy. In: Antibiotics in Laboratory Medicine, Williams et Wilkins Edition, Pays-Bas, pp. 24-54.

**ACKAH J. (2004).** Spectre anti-infectieux de MISCA-F3 sur la croissance *in vitro* de *C. albicans*, *C. neoformans*; *A. flavus*, *A. fumigatus*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*. Mémoire de DEA de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 30 pages.

**ADJANOHOUN E. J. et De SOUZA C. (1977).** Quelques plantes béninoises à propriétés thérapeutiques largement confirmées. In: Conseil Africain et Malgache pour Enseignement Supérieur (CAMES). Deuxième Colloque du CAMES, Ouagadougou, Burkina Faso, pp. 22-36.

**ADJANOHOUN E. J. (1979).** Les plantes africaines à propriétés thérapeutiques largement confirmées par l'ethno-médecine. In: Communications scientifiques présentées au 3<sup>e</sup> symposium inter-africain OUA/CSTR sur la pharmacopée traditionnelle et les plantes médicinales africaines. 25-29 Septembre, Abidjan, Côte d'Ivoire, pp. 89-91.

**ADJANOHOUN E. J. et AKE-ASSI L. (1979).** Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire CRES. Centre national de floristique. Université de Côte d'Ivoire, 358 pages.

**ADJANOHOUN E. J., AKE-ASSI L., EYME J., GASSITA J. N. et GOUDATE E. (1983).** Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethno-botaniques et floristiques à Maurice. (Iles Maurice et Rodrigues), 4<sup>e</sup> édition, Paris, France, A.C.C.T., pp. 53-71.

**ADJANOHOUN E. J., AKE-ASSI L., AHY M. R. A., AKPAGANA K., FLORET J. J., GUINKO S., KOUMARE M. et RAYNAL J. (1985).** Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethno-botaniques et floristiques du Mali. 4<sup>e</sup> édition Paris, France, A.C.C.T., pp. 27-117.

**ADJANOHOUN E. J., AHY M. R. A. et AKE-ASSI L. (1986).** Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethno-botaniques et floristiques du Togo. Paris, France, A.C.C.T., pp. 47-395.

**ADJANOHOUN E. J., AKE-ASSI L., EYME J., AHY M. R. A. et AKPAGANA K. (1988).** Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethno-botaniques et floristiques du Congo. Paris, France, A.C.C.T., pp. 75-313.

**ADJANOHOUN E. J., CUSSET G., ISSA L. O., KEITA A., Le BRAS M., LEJOLY J. et WAECHTER P. (1993).** Banque de données de Médecine traditionnelle et pharmacopée. Pharmel 2<sup>e</sup> édition, A.C.C.T., Lejoly Journée Universitaire Libre de Bruxelles, Belgique.

**AKE-ASSI L. (1984).** Flore de la Côte d'Ivoire. Etude description et bio-géographique avec quelques notes ethno-botaniques. Thèse, Faculté des Sciences et Techniques (FAST), Université d'Abidjan, Côte d'Ivoire, 3 tomes, 6 volumes, 1206 pages.

**AKE-ASSI L., ABEYE J., GUINKO S., GIGUET R. et BANGAVOUVOU X. (1985).** Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethno-botaniques et floristiques en République Centrafricaine. 4<sup>e</sup> édition Paris, France, A.C.C.T., pp. 21-69.

**ALIBERT G., RANJEVA R. et BOUDET M. A. (1977).** Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques, pp. 279-301.

**ALI-EMMANUEL N., MOUDACHIROU M., AKAKPO J. A. and QUETIN-LECLERCQ J. (2003).** Treatment of bovine dermatophilosis with *Senna alata*, *Lantana camara* and *Mitracarpus scaber* leaf extracts. Journal of Ethnopharmacology, Volume 86, N°2-3, pp. 167-71.

**ANONYME (2005).** Lexique de l'industrie agro-alimentaire (consulté le 22 juin 2005). <http://www.agro-job/définition-flavonides/définition-2458.aspx>. (ou [www.google.fr](http://www.google.fr)).

**ANONYME (2005).** La Pharmacologie médicale en ligne (dernière modification le 25/10/2005). [http://www.pharmacomedicale.org/Fiche\\_335.html](http://www.pharmacomedicale.org/Fiche_335.html)

**ANONYME (1994).** De la nature à la médecine de quelques plantes médicinales. Actualités Innovation. Médecine, Volume 32, pp. 39-41.

**AMVAM Z. P. H., BYTI L., CHOUMBOUGNANG F. T., MENUTE C., LAMRTI G. and BOUCHET P. H. (1998).** Aromatics plants of central of Africa. Part XXXII. Chemical composition and activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroun. Flavour and fragrance Journal, Volume 13, pp. 107-104.

**ASPERGILLA M., SMEGO R. A. and SCOTT J. L. K. (1990).** Quinolones antibiotics in treatment of *Salmonella* infections. Reviews of Infectious Diseases, Volume 12, N°5, pp. 873-889.

**ASSEMIAN P. (1988).** Enquête sur le terrain concernant la diarrhée et la rougeole. Faculté des Sciences et Techniques (FAST), Département de physiologie végétale, Université d'Abidjan, Côte d'Ivoire, multigr.

**AUBRY P. (1984).** Rubiacées à activité anti-fongique utilisées en médecine traditionnelle africaine. Thèse de Pharmacie, Faculté de Pharmacie, Université d'Abidjan, Côte d'Ivoire, 125 pages.

**AUJARD Y., RAJGURU M. et BINGEN E. (2000).** Infections nosocomiales en pédiatrie: Problèmes et perspectives: Infections nosocomiales chez la mère et l'enfant. Pathologie et biologie. Paris, France, Volume 48, N°10, pp. 909-920.

**BABIN R. (1972).** Les antibiotiques. Cours de pharmacie chimique 4<sup>e</sup> année, 96 pages.

**BAHI C. (1998).** Mécanismes biochimiques d'une action cholinolytique de BGG, une substance anti-diarrhéique de source naturelle. Thèse 3<sup>e</sup> cycle, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 103 pages.

**BAIN K. T. and WITTBRODT E. T. (2001).** Linezolid for the treatment of resistant Gram positive cocci. (The) Annals of pharmacotherapy. USA, Volume 35, N°51, pp. 566-575.

**BERGOGNE B. E. (2000).** Résistances et nouvelles stratégies antibiotiques: Nouveaux antibiotiques anti-staphylococciques: Résistances et nouvelles stratégies antibiotiques. (La) Presse médicale: (1983). France., Volume 29, N°37, pp. 2023-2027.

**BISIGNANO G., SANOGO R., MARINO A., AQUINO R., D'ANGELO V., GERMANO M. P., DE PASQUALE R. and PIZZA C. (2000).** Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract isolated and constituents. Letters in applied microbiology. Grande Bretagne, Volume 30, N°2, pp. 105-108.

**BONGA G. M., VANGAH-MANDA M., De SOUZA C. et GUEDE-GUINA F. (1995).** Mise en évidence des phyto-stéroïdes anti-fongiques contre *Cryptococcus neoformans*. Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines, Volume 9, N°1, pp. 21-30.

**BONGA G. M., KRA A. K. M et GUEDE-GUINA F. (1998).** Identification chimique et pharmacologique de phyto-stérois anti-cryptococciques de MISCA, un anti-fongique de source naturelle. Les premières journées biologiques nationales sur les supports scientifiques des pharmacopées africaines. 30 Novembre-04 Décembre, Abidjan, Côte d'Ivoire.

**BOUQUET A. et DEBRAY M. (1974).** Plantes médicinales de Côte d'Ivoire. Travaux et documents de l'ORSTOM. Paris, France, N°32.

**BOUVET A. (1992).** Endocardite infectieuse: Enquête en France 1990-1991. Sensibilité aux antibiotiques des streptocoques et entérocoques. Médecine et maladies infectieuses, prophylaxie de l'endocardite infectieuse. France, Volume 22, N°Décembre, pp.987-992.

**BOWMAN W. C. and RAND M. J. (1980).** Textbook of Pharmacology. Drugs used to relieve pain, Chapter 16, Second Edition. Blackwell Scientific Publication.

**BRUNETON J. (1993).** Pharmacognosie phytochimie des plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> édition, pp. 203-642.

**CANILLAC N. et MOUREY A. (2001).** Activité anti-bactérienne de l'huile essentielle de *Picea excelsa* sur les Listeria, staphylocoques et bactéries coliformes. Food microbiology. Grande Bretagne, Volume 18, N°3, pp. 261-268.

**CARBONNELLE B., DENIS F., MARMONIER A., PINON G. et VARGUES R. (1990).** Bactériologie médicale: Techniques usuelles, 333 pages.

**CHABBERT Y. A. (1972).** Les antibiotiques en bactériologie médicale. In: Techniques en bactériologie, Flammarion Edition. Paris, France, Tome 3, 158 pages.

**COLLIGNON P., TURNIDGE J. (1999).** Fusidic acid in vitro activity. International journal of antimicrobial agents, Volume 12, Supplément 2, S45-S58.

**COMOE L. (1987).** Apport de la médecine traditionnelle africaine à la chimio-thérapie anti-cancéreuse: Activité anti-humorale et différenciante de la Fagaronine extraite de *Fagara xanthoxyloïdes* Lim. (Rutacées). Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences pharmaceutiques: Reims, France, N°402/P, 345 pages.

**COQUE T. M., SINGH K. V. and MURRAY B. E. (1996).** Comparative *in vitro* activity of the new fluoroquinolone trovafloxacin (CP-99,219) against Gram positive cocci. Journal of antimicrobial chemotherapy. Grande Bretagne, Volume 37, N°5, pp. 1011-1016.

**COULIBALY K. S. (1995).** Etude de la tolérance cardio-vasculaire de MISCA, un anti-infectieux de source naturelle. Mémoire de DEA de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 30 pages.

**COWAN M. M. (1999).** Plants products as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews. Etats unis d'Amérique, Volume 12, N° 4, pp. 564-582.

**CROCKETT C. O., GUEDE-GUINA F., PUGH D. A., VANGAH-MANDA M., BODO B., SMITH M. O. and OCHILLO R. F. (1992).** Antifungal activity of water extract of MISCA. Federation of the association for science and experimental biology (FASEB) meeting, April 5-9, Anaheim, California, USA.

**De GHELDRE Y. et SCHLEMMER B. (2000).** Données européennes sur la résistance des cocci à Gram positif. Réanimation urgences: (Paris), infections hospitalières à cocci à Gram positif résistants épidémiologie et perspectives thérapeutiques. France, Volume 9, Supplément 1, 5s-8s.

**DECOSTER A. (2003).** Cours de Bactériologie et Virologie. <http://anne-decoستر.free.fr/bindex.htm> (mis à jour 25/ 03/ 2003)

**DELMEE M. (2000).** Epidémiologie microbienne des infections communautaires Louvain médical. Le Printemps à Mont-Godinne. Samedi 18 Mars. Belgique, Volume 119, N°3, S75-S81.

**DEMBELE I. (1988).** Les tradi-praticiens et les soins de santé primaire. Thèse de Médecine, Tome II, Faculté de Médecine, Université d'Abidjan, Côte d'Ivoire, 404 pages.

**DJAMAN A. J., DJE K. M. et GUEDE-GUINA F. (1998).** Evaluation d'une action anti-plasmodiale d'*Olox subscorpioides* (OLSU) sur les souches chloroquino-résistantes de *Plasmodium falciparum*. Les premières journées biologiques nationales sur les supports scientifiques des pharmacopées africaines. 30 Novembre-04 Décembre, Abidjan, Côte d'Ivoire.

**DJAMAN A. J., DJE K. M., SANGARE A. N. et GUEDE-GUINA F. (1998).** Essai préliminaire *in vitro* de l'action potentialisatrice d'OLSU, un anti-paludique naturel dans l'efficacité de la chloroquine. Les premières journées biologiques nationales sur les supports scientifiques des pharmacopées africaines. 30 Novembre-04 Décembre, Abidjan, Côte d'Ivoire.

**DJE M. K., DJAMAN A. J., MAZABRAUD A. et GUEDE-GUINA F. (1997).** Activité anti-plasmodiale des alcaloïdes totaux de *Mitragyna ciliata* (Mitragynacées) sur *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistant. Afrique Biomédical, Volume 2, N°Spécial Février, pp. 4-9.

**DJYH B. N. (1999).** Evolution de quelques paramètres ioniques et biochimiques chez le lapin au cours d'un traitement avec MISCA. Les premières journées biologiques nationales sur les supports scientifiques des pharmacopées africaines. 30 Novembre-04 Décembre, Abidjan, Côte d'Ivoire.

- DJYH B.N. (2003).** Evolution de quelques paramètres sériques de la bio-tolérance de trois phyto-médicaments anti-infectieux (MISCA), anti-diarrhéique (BGG) et anti-plasmodial (MYTA). Thèse 3<sup>e</sup> cycle, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, 104 pages.
- DOUMBIA I. (2001).** Etude de la toxicité chez la souris de *Mareya micrantha* et MISCA délipidés (2 substances végétales anti-infectieuses). Mémoire de DEA Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 30 pages.
- DOS SANTOS C., MASAROTTO G., CAPELO A. and FERRARA A. (2002).** Bactericidal activity, post-antibiotic and post-antibiotic sub-MIC effects of moxifloxacin compared with ciprofloxacin, clarithromycin, cefdinir and amoxicillin-clavulanate against some respiratory pathogens. *Antibiotiques*: (Paris). France, Volume 4, N°2, pp. 95-102.
- DROMER F. and DUPONT B. (1996).** The increasing problem of fungal infections in immunocompromised host. *Journal of Mycology Medical*, Volume 6, Supplement I, pp. 1-6.
- DUPONT B. F., DROMER F. and IMPROVISI L. (1996).** The problem of azole resistance in *Candida*. *Journal of Mycology Medical*, Volume 6, Supplement II, pp. 12-19.
- EKPENDU T. O., AKAH P. A., ADESOMOJU A. A. et OKOGUN J. L. (1994).** Antiinflammatory and antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* extracts. *International journal of pharmacognosy*, Volume 32, N°2, pp.191-196.
- EL SOLH N. (2000).** Le point sur la résistance aux antibiotiques des staphylocoques. *Antibiotiques*. France, Volume 2, N°1, pp. 52-63.
- ELOUENNASS M., BAJJOU T. et BAAJ A. J. (2002).** Peut-on surveiller l'infection nosocomiale à partir du laboratoire de microbiologie? Expérience de 4 mois à l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V. Rabbat. *Revue internationale des services de santé des forces armées*. Belgique, Volume 75, N°2, pp.74-79.

**ENTENZA P. J. M. et MOREILLON P. (1998).** Traitement de l'Endocardite Expérimentale à Staphylocoque Résistant à la Méricilline: Problèmes et Stratégies. Juin, Thèse de Doctorat, Université de Paris 07, France, 178 pages.

**GAMBAROTTO K., PLOY M. C. et DENIS F. (2000).** Situation actuelle des résistances aux antibiotiques des staphylocoques. Spectra biologie. France, Volume 19, N°109, pp. 33-38.

**GANTER P. et JOLLES G. (1969).** Histochimie normale et pathologie. Tome I Paris: Gauthier-Villars. 923 pages.

**GARRABE E., CAVALLO J. D., BRISOU P., CHAPALAIN J. C., COUE J. C., COURRIER P., GRANIC G., HERVE V., KOECK J. L., MORILLON M., CLAUDE J. D. Perrier Gros, ROUBY Y. et TEYSSOU R. (2000).** Sensibilité aux antibiotiques des bactéries d'infections nosocomiales: Evolution dans les services de réanimation des hôpitaux des armées. (La) Presse médicale: (1983). France, Volume 29, N°27, pp. 1497-1503.

**GARRIGUES B. (2002).** Programme de prescription d'urgence Synercid\*\* (A) reg: L'expérience française. La Presse médicale: (1983). France, Volume 31, N°7, pp. 297-301.

**GARRIGUES J. C., PEREZ E., LINAS M. O., RICO-LATTES, SEGUELA J. P. et LATTES A. (1996).** Tests *in vitro* et étude quantitative de relation structure-activité (QSAR) pour la détermination des propriétés anti-aspergillaires d'une série d'analogues de glycolipides. Journal de Mycologie Médical, N°6, pp. 111-117.

**GAUZIT R. (2003).** Apport du linézolide dans le traitement des infections compliquées de la peau et des tissus mous. La Presse médicale: (1983). Nouvelles opportunités dans la prise en charge des infections sévères à Gram positif. France, Volume 32, N°13, 1S17-1S20.

**GBAGUIDI F., MUCCIOLI G., ACCROMBESSI G., MOUDACHIROU M. and**

**QUETIN-LECLERCQ J. (2005).** Densitometric HPTLC, quantification of 2-

Azaanthraquinone isolated from *Mitracarpus scaber* and antimicrobial activity against  
*Dermatophilus congolensis*. Journal of Planar Chromatography, Volume 18,

N°Septembre/Octobre, pp. 377-379.

**GIBERT C. et TROUILLET J. L. (2001).** Traitement des infections à staphylocoques  
résistants à la méthicilline: Optimisation des traitements disponibles ou utilisation de  
nouvelles molécules? Réanimation. France, Volume 10, N°3, pp. 329-335.

**GNALEI M. (2004).** Tri phytochimique de BGG. Mémoire de DEA Biotechnologies, UFR  
Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 33 pages.

**GORIS AL., LIOT A., JANOT M. M. et GORIS An (1949).** Pharmacie galénique.

Tome I, 3<sup>ème</sup> édition entièrement révisée. Paris, Masson, 1051 pages.

**GOULD K., RAMIREZ R. C. H., HOLMES R. K. et SANFORD J. P. (1975).**

Adhérence des bactéries aux valvules cardiaques *in vitro*. Journal of Clinical Investigation.

USA, Volume 56, N°6, pp. 1364-1370.

**GOURDET V. et FARRET D. (2000).** Les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques dans  
les services de soins: rôle du cadre de santé face aux *Staphylococcus aureus* résistants à la  
méticilline. Assistance Publique. Hôpitaux de Paris (A.P.H.P.). Institut de Formation des  
Cadres de Santé (I.F.C.S.). Paris, France.

**GUEDE A. A. (2003).** Effets physiologiques anti-hémorroïdaires de ZTCO un extrait de  
*Landorphia hirsuta* et formulation de ses suppositoires anti-hémorroïdaires. Thèse de  
Pharmacie, UFR des sciences pharmaceutiques, Université de Cocody, Abidjan,  
Côte d'Ivoire, 200 pages.

**GUEDE-GUINA F. (1975).** Etude de quelques effets physiologiques et biochimiques de "Glow", un poison extrait du bois Bété: *Mansonia altissima* (Sterculiacées). Thèse 3<sup>e</sup> Cycle, FAST, Université d'Abidjan, Côte d'Ivoire, 105 pages.

**GUEDE-GUINA F. (1989).** Etude pharmacologique et biochimique de la mansonine:

1- Propriétés cardiovasculaires de la mansonine, une pharmacologie expérimentale,

2- Réactivité de la mansonine avec les récepteurs aux digitaliques d'Atpase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.

Thèse de Doctorat d'Etat, Université d'Abidjan, Côte d'Ivoire, 110 pages.

**GUEDE-GUINA F., TSAI C. S., SMITH M. O. and OCHILLO R. F. (1991).**

Pharmacological effects of an aqueous extract of *Mareya micrantha* (MAR) on the muscularis muscle of *Bufo marinus*. Association of science pharmacology and experimental technology (ASPET), August 16-20, San Diego, California, USA.

**GUEDE-GUINA F., WASHINGTON B., TSAI C. S., VANGAH-MANDA M., SMITH M. O. and OCHILLO R. F. (1991).** Isolation of G243, a cholinergic agent from *Mareya micrantha*. 12<sup>th</sup> annals of South eastern pharmacology of science (SEPS) meeting, November 8-9, Abstract N°9, New Orleans, USA.

**GUEDE-GUINA F., AKA K. S., SMITH M. O. and OCHILLO R. F. (1992).**

Cardiotonic effects of a new and novel cardiac glycoside (MSN) on the monkey myocardium. Federation of the association for science and experimental biology (FASEB) meeting, Anaheim, California, USA.

**GUEDE-GUINA F., CROCKETT C. O., PUGH D. A., VANGAH-MANDA M.,**

**BODO B., SMITH M. O. and OCHILLO R. F. (1992).** Antifungal activities of water extract of MISCA. 2<sup>nd</sup> annual conference, RCMI, September 5-6, Atlanta, Georgia.

**GUEDE-GUINA F., VANGAH-MANDA M., BONGA G. M. et De SOUZA C. (1995).**

Activité anti-microbienne d'un extrait végétal contre des germes opportunistes au cours du SIDA. Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines, volume 9, N°1, pp. 13-19.

**GUEDE-GUINA F. and MAIXANT J. (1996).** Molecular basis of the double action of MSN, a new and novel cardiac glycoside. First panafrican conference on biochemistry and molecular biology, September 2-6, Nairobi, Kenya.

**GUEDE-GUINA F et SMITH M. O. (1996).** La modélisation du phyto-médicament. Séminaire international sur le développement des phyto-médicaments éthiques. 15-16 Mai, Lomé, Togo.

**GUEDE-GUINA F., KRA A. K. M., VANGAH-MANDA M. et BONGA G. M. (1996).** Inhibition par MISCA F2 de la croissance de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*, trois germes fongiques opportunistes du SIDA. Afrique Biomédical, Volume 2, N°1, pp. 11-16.

**GUEDE-GUINA F., De SOUZA C., YAPO A., TOUDJI-BANDJE C., DJAMAN A. J. et KOUMAGLO K. (1997).** Evaluation de la propriété immunogène des hétérosides de MYTA 12 un anti-transcriptase Reverse. 10<sup>e</sup> Conférence internationale sur le SIDA et les MST (CISMA) en Afrique. 7-11 Décembre, Abidjan, Côte d'Ivoire.

**GUEDE-GUINA F., KRA A. K. M., MOBIE D. P., VANGAH-MANDA M. et BONGA G. M. (1997).** Inhibition par MISCA F2 de la croissance de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* 3 germes opportunistes du SIDA. Les premières journées biologiques nationales sur les supports scientifiques des pharmacopées africaines. 30 Novembre-04 Décembre, Abidjan, Côte d'Ivoire.

**GUEDE-GUINA F., TA BI DJO F., OUEDRAOGO Y. et De SOUZA C. (1998).** Action immuno-stimulante de  $\pi$  12 un peptide de source végétale. Les premières journées biologiques nationales sur les supports scientifiques des pharmacopées africaines. 30 Novembre-04 Décembre, Abidjan, Côte d'Ivoire.

**GUEDE-GUINA F., BROU F., DJAMAN A. J. and DJYH B. N. (1998).** Synthesis and evaluation of the immunopharmacological activity of Mansonin peptidic on the *in vivo* cardiotoxic and antihypertensive treatment. 29 September-3 October, Potchestroom, Afrique du Sud.

**GUEDE-GUINA F., MOBIE D. P., KRA A. K. M. et BONGA G. M. (1998).** Extension du spectre d'action anti-infectieuse de MISCA. 10<sup>e</sup> journée de parasitologie de Dakar. 4 au 7 février, Dakar, Sénégal.

**GUIGNARD J-L., COSSON L., HENRY M., (1985).** Abrégé de phytochimie. Paris, Masson. 224 pages.

**GUTMANN L. (1994).** Résistance des entérocoques aux  $\beta$ -lactamines et conséquences sur les synergies. Médecine et maladies infectieuses. L'entérocoque et sa pathologie. France, Volume 24, N°Février, pp. 165-171.

**HALL S. L. (1991).** Coagulase-negative staphylococci infections in neonates. Pediatric Infectious Disease, Volume 10, pp.57-67.

**HEINZ L., KLAUS M. et ALBRECHT Z. (1998).** Atlas de poche de pharmacologie Médecine-Science Flammarion.

**JOLY G. M. L. (1998).** Le point sur les infections nosocomiales. La Presse médicale: (1983). France, Volume 27, Supplément 5, pp. 47-50.

- KABORE I. Z, BONGA G. M. et GUEDE-GUINA F. (1998).** Analyse du spectre RMN de MISCA. Les premières journées biologiques nationales sur les supports scientifiques des pharmacopées africaines. 30 Novembre-04 Décembre, Abidjan, Côte d'Ivoire.
- KASSIS C. N. et MULLER S. C. (2002).** Intérêt du linézolide pour le traitement des infections à cocci à Gram. Antibiotiques: Paris, France, Volume 4, N°1, pp. 38-44.
- KOFFI A. (1997).** Recherche d'une formulation galénique appropriée de MISCA contre cinq mycoses superficielles en Côte d'Ivoire. Mémoire de DEA de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 30 pages.
- KONE S. (1997).** Etude de la tolérance cardio-vasculaire de MISCA, un extrait végétal anti-cryptococcique. Mémoire de DEA de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 30 pages.
- KONIN K.G. (2002).** Evaluation de la concentration sérique de sodium et de potassium chez le lapin traité par deux phyto-médicaments anti-infectieux (THOS et MISCA). Mémoire de DEA de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 30 pages.
- KOUA T. R. S. (1998).** Contribution à l'étude des plantes à huiles essentielles de Côte d'Ivoire. Etude botanique, triphyto-chimique, analyse des composés et essai bactériologique préliminaire sur l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae). Thèse de Pharmacie, UFR des sciences pharmaceutiques, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 100 pages.
- KOUAME K. I. (2006).** Evaluation de l'activité antimycosique *in vitro* et tri phytochimique de quelques extraits de MISCA. Mémoire de DEA de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 30 pages.

**KPOROU E. (2004).** Spectre anti-infectieux de MISCA-F1 sur la croissance *in vitro* de *C. albicans*, *C. neoformans*; *A. flavus*, *A. fumigatus*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*. Mémoire de DEA de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 30 pages.

**KRA A. K. M. (1997).** Evaluation des effets d'un nouvel anti-aspergillaire de source naturelle. Mémoire de DEA de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 30 pages.

**KRA A. K. M. et GUEDE-GUINA F. (1998).** Evaluation d'une activité anti-fongique de MISCA-F2 sur *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*. Les premières journées biologiques nationales sur les supports scientifiques des pharmacopées africaines. 30 Novembre-04 Décembre, Abidjan, Côte d'Ivoire.

**KRA A. K. M. (2001).** Evaluation et amélioration par séquençage chromatographique d'une action anti-fongique de MISCA contre *Aspergillus fumigatus*. Thèse 3<sup>e</sup> cycle, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 126 pages.

**LeBOURGEOIS T., MERLIER H. (1995).** Les adventices d'Afrique soudano-sahélienne. Montpellier, France, Cirad-ca., 640 pages.

**LECLERC H., IZARD H., HUSSON M.-O., WATTRE P. et JAKUBCZAK E. (1983).** Antibiotiques: Classification – Mode d'action, P. 298. Microbiologie générale. 369 pages.

**LECLERCQ R. et SCHLEMMER B. (2000).** Perspectives d'évolution de la résistance des cocci à Gram positif multi-résistants et nouveaux agents anti-infectieux. Réanimation urgences: (Paris). Infections hospitalières à cocci à Gram positif résistants épidémiologie et perspectives thérapeutiques. Volume 9, Supplément 1, 31s-35s.

**LOROUGNON G. J. (1995).** Médecine traditionnelle africaine, Tome II. Plantes et pharmacopée chez les Bété de la région de Daloa (Côte d'Ivoire)

(Communication personnelle).

**MANDA P. (1988).** Inventaire des plantes ornementales de la ville d'Abidjan et étude pharmacognosique d'une plante toxique, *Jatropha multifida*, Linn (*Euphorbiaceae*). Doctorat en Pharmacie. Université d'Abidjan : UFR Sciences pharmaceutiques et biologiques, 86pp.

**MARMONIER A. A. (1990).** Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. In: Bactériologie Médicale, Techniques usuelles, pp. 227-236.

**MARMONIER A. A. (1990).** Technique de diffusion en gélose: Méthode des disques. In: Bactériologie Médicale, Techniques usuelles, pp. 237-244.

**MAYNART G., MBOUP S., SAMB A., NDIAYE B., POUSSET J. L. et YAMEOGO A. M. (1982).** Plantes médicinales africaines. IX: Contribution à l'étude d'une plante spontanée sénégalaise *Mitracarpus scaber* zucc. Rubiaceae. Médecine d'Afrique noire, Volume 29, N°7, pp. 519-521.

**MAZURA G., FARAI C., LAMEK H. L. and MAVI S. (1999).** Phytoconstituants and antimicrobial activity of the leaf essential oil of *Clausena anisata*. Flavour and fragrance Journal, Volume 9.

**M'BAYE A. L. (2000).** Evaluation de l'activité anti-fongique de *Cassia alata*, de MISCA et de *Phyllanthus amarus* sur la croissance *in vitro* d'*Aspergillus flavus*. Mémoire de DEA de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 30 pages.

**MOBIE D. P. (1996).** Activité anti-fongique d'une huile essentielle de MISCA, un extrait végétal contre *Trichophyton rubrum*. Mémoire de DEA de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 30 pages.

**MOBIE D. P. et GUEDE-GUINA (1997).** Analyse de quelques éléments préliminaires du spectre de l'action anti-infectieuse des phyto-stérols de MISCA-F2. 10<sup>e</sup> Conférence internationale sur le SIDA et les MST (CISMA) en Afrique. 7-11 Décembre, Abidjan, Côte d'Ivoire.

**MOBIE D. P., VANGAH-MANDA M., BONGA G. M., De SOUZA C. et GUEDE-GUINA F. (1998).** Action anti-fongique d'une huile végétale sur *Trichophyton rubrum*. Afrique Biomédical, Volume 3, N°1, pp. 5-8.

**MOBIE D. P., KRA A. K. M., BONGA G. M., VANGAH-MANDA M., et GUEDE-GUINA F. (1998).** Quelques éléments du spectre préliminaire d'une action anti-infectieuse des phyto-stérols de MISCA-F2. Les premières journées biologiques nationales sur les supports scientifiques des pharmacopées africaines. 30 Novembre-04 Décembre, Abidjan, Côte d'Ivoire.

**MOBIE D. P., KRA A. K. M. et GUEDE-GUINA F. (1998).** Action anti-fongique d'une huile de MISCA sur *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton mentagrophytes*. Les premières journées biologiques nationales sur les supports scientifiques des pharmacopées africaines. 30 Novembre-04 Décembre, Abidjan, Côte d'Ivoire.

**MOREILLON P. (2000).** Moyens de défense des bactéries. Revue médecine des maladies infectieuses. Département de médecine interne, CHUV/1011 Lausanne/CHE.

**MULLER S. C. (1998).** Résistance bactérienne et nouvelles perspectives thérapeutiques. La Presse médicale: (1983). France, Volume 27, Supplément 5, pp. 42-46.

**MULLER S. C. (2000).** Kétolides et oxazolidinones: Mécanisme d'action et spectre anti-bactérien. (La) Presse médicale: (1983). France, Volume 29, N°37, pp. 2061-2064.

**MUTNICK A. H., ENNE V. and JONES R. N. (2003).** Linezolid resistance since 2001: SENTRY antimicrobial surveillance program. The Annals of pharmacotherapy. USA, Volume 37, N°6, pp. 769-774.

**NASSIF X., MARMONIER A. A. et CARBONELLE B. (1990).** Etude de l'activité bactéricide des associations binaires d'antibiotiques. In: Bactériologie Médicale, Techniques usuelles, pp. 253-260.

**N'DOUNGA M. and OUAMBA J. M. (1997).** Antibacterial and antifungal activities of essential oils of *Ocimum gratissimum* and *O. basilium* from Congo, Fitotherapia, Volume 68.

**NOK A. J. (2002).** Azaanthraquinone inhibits respiration and *in vitro* growth of long slender bloodstream forms of *Trypanosoma congolense*. Department of Biochemistry, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria. Cellular and Biochemistry Function, Volume 20, N°3, pp. 205-12.

**OKUNADE A. L., CLARK A. M., HUFFORD C. D. and OGUNTIMEIN B. O. (1999).** Azaanthraquinone an antimicrobial alkaloid from *Mitracarpus scaber*. Planta medica, Volume 65; N°5, pp. 447-448.

**PATRICK C. C. (1990).** Coagulase-negative staphylococci: pathogens with increasing clinical significance. Journal of Pediatric, Volume 116, pp. 497-507.

**POUSSET J. L. (1989).** Plante médicinale africaine. Possibilité de développement. Edition marketing. A.C.C.T., 3-12.

**POUSSET J. L. (1994).** Plantes médicinales africaines. Le Pharmacien d'Afrique, N°87, 16 pages.

**QUINCAMPOIX J. C. et MAINARDI J. L. (2001).** Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. Réanimation. France, Volume 10, N°3, pp. 267-275.

**RAFFI F. (2002).** Linézolide: expérience clinique pour le traitement des infections à cocci à Gram positif. La lettre de l'infectiologue. France, Volume 14, N°4, pp. 99-104.

**RICHARD M-A. et GROB J-J. (2005).** Item N°87 : Infections cutanéomuqueuses bactériennes et mycosiques : Impétigo, folliculite/furoncle, érysipèle. Annales de Dermatologie et Vénérologie. Volume 132, N°7, Supplément, 38-43

**SENET P., MEAUME S. et VEYSSIER P. (2001).** Infections bactériennes cutanées chez les malades âgés: Diagnostic et conduite thérapeutique. La revue de gériatrie, infections bactériennes du sujet âgé. France, Volume 26, N°7, SupplémentA, A.27-A.32.

**SIROT J. (1990).** Evaluation de l'activité anti-bactérienne des antibiotiques *in vitro*. In: Bactériologie médicale 2<sup>e</sup> édition/Flammarion, pp. 297-315.

**SOLIGNAC M. (1998).** L'émergence de bactéries à Gram positif de transmission nosocomiale. La Presse médicale: (1983). France, Volume 27, Supplément 3, pp. 21-26.

**TABONE M. D., VU THIEN H., MOISSENET D. et LEVERGER G. (2000).** Infections nosocomiales chez l'enfant immuno-déprimé: Infections nosocomiales chez la mère et l'enfant. Pathologie et biologie. Paris, France, Volume 48, N°10, pp. 893-900.

**TERRIEUX J. (1952).** Recherches botaniques, chimiques et pharmaco-dynamiques sur les *Mansonia* africains. (Travaux de Thèse L.M.M, 4<sup>e</sup> Paris).

**THES P. M. (2001).** Recherche du profil anti-microbien des huiles de G-243 et de MISCA sur quelques agents de mycoses de la peau. Mémoire de DEA de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 30 pages.

**TOURE ALIOU (2005).** Place de *Streptococcus pyogenes* dans les infections de peau et de gorge chez les enfants de Bamako. Thèse de Pharmacie, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie, Mali, 97 pages.

**TRA BI I. O. (1999).** Induction d'une cryptococcose expérimentale chez le cobaye et l'approche d'un traitement thérapeutique par MISCA. Mémoire de DEA de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 30 pages.

**TREBISSOU J. N. D. (1997).** Etude comparative des actions d'extraits de plantes anti-microbiennes MISCA (Ext-T, F1, F2) sur la contractilité du duodénum. Mémoire de DEA de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 30 pages.

**TREBISSOU J. N. D. (2001).** Action myo-stimulante de MISCA F2 et son mécanisme biochimique sur le duodénum. Thèse 3<sup>e</sup> Cycle, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 116 pages.

**TREBISSOU J. N. D. (2002).** Bases physiologiques de l'activité myo-stimulante de MISCA F2 (un extrait végétal) sur les contractions duodénales de lapin. *Afrique Biomédicale*, Volume 7, N°2, pp. 12-19.

**VANDENESCH F. et ETIENNE J. (1993).** L'endocardite infectieuse: Données bactériologiques actuelles. *Archives des maladies du cœur et des vaisseaux, endocardite infectieuse*. France, Volume 86, N°12, Supplément, pp. 1807-1810.

**VANGAH-MANDA M., HAROUNA D. et GUEDE-GUINA F. (1993).** Ciblage de l'action anti-fongique de MISCA, un concentré de source végétale contre *Cryptococcus neoformans*. 1<sup>er</sup> Congrès de la pathologie infectieuse tropicale, Abidjan, Côte d'Ivoire.

**VANGAH-MANDA M., BONGA G. M., De SOUZA C. et GUEDE-GUINA F. (1996).** Amélioration de l'action anti-fongique de MISCA, un extrait végétal contre *Cryptococcus neoformans*. *Afrique Biomédical*, Volume 1, N°1, pp. 16-19.

**VANGAH-MANDA M., KRA A. K. M., BONGA G. M. et GUEDE-GUINA F. (1996).** Amélioration de l'action anti-fongique de MISCA, un extrait végétal contre *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*, trois germes opportunistes du SIDA.. Afrique Biomédical, Volume 2, N°1, pp. 11-16.

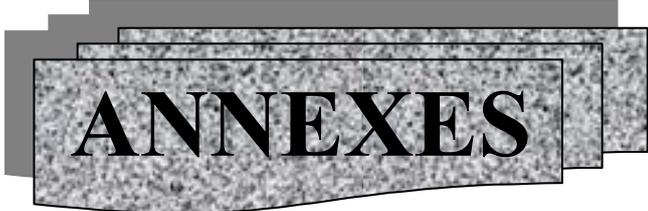
**VAUDAUX P. et SCHLEMMER B. (2000).** Impact des antibiotiques et des facteurs de résistance sur l'adhérence et la virulence du staphylocoque doré. Réanimation Urgences: (Paris). Infections hospitalières à cocci à Gram positif résistants épidémiologie et perspectives thérapeutiques. France, Volume 9, N°Supplément 1, 9s-12s.

**WOLFF M. (2001).** Endocardites infectieuses graves. Réanimation. France, Volume 10, N°3, pp. 282-290.

**ZIRIHI G. N. (1991).** Contribution au recensement, à l'identification et à la connaissance de quelques espèces végétales utilisées en médecine traditionnelle chez les Bété du Département d'Issia, Côte d'Ivoire. Thèse 3<sup>e</sup> Cycle, Université d'Abidjan, Côte d'Ivoire, 253 pages.

**ZIRIHI G. N., KRA A. K. M. et GUEDE-GUINA F. (2003).** Evaluation de l'activité anti-fongique de *Microglossa pyrifolia* (Lamarck) O. Kuntze (Asteraceae) "pymi" sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines, Volume 17, pp.11-18.

**ZIRIHI G. N., GRENIER P., GUEDE-GUINA F., BODO B. et MAMBU L. (2005).** Isolation, characterization and antiplasmodial activity of steroidal alkaloids from *Funtumia elastica* (Preuss) Stapf. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, Volume 15, pp. 2637-2640.



**ANNEXES**

## Composition des milieux utilisés et leur préparation

### 1- Milieu de conservation

Le lait écrémé stérile a été utilisé comme milieu de conservation des différentes souches bactériennes. Il était constitué des éléments nutritifs dans des proportions suivantes (pour 100g de poudre):

✓ protéines	34 g
✓ glucides	52,3 g
✓ lipides	1 g
✓ calcium	1850 mg
✓ fer	15 mg
✓ magnésium	113 mg
✓ zinc	15 mg
✓ vitamine A	810 µg
✓ vitamine C	75 mg
✓ vitamine B <sub>1</sub>	1,7 mg
✓ vitamine B <sub>2</sub>	1,9 mg
✓ vitamine PP	22 mg
✓ vitamine B <sub>6</sub>	2,4 mg
✓ vitamine B <sub>9</sub>	240 µg
✓ vitamine B <sub>5</sub>	2,7 mg
✓ vitamine B <sub>12</sub>	2,4 µg

Le milieu de conservation utilisé a été préparé en dissolvant 10 grammes de poudre de lait écrémé dans 100 ml d'eau distillée, afin d'obtenir une suspension homogène. La suspension obtenue a été stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Ensuite, la vérification de la stérilité a été faite en déposant, près d'une flamme de bec Bunsen, une goutte du lait écrémé stérile sur une boîte gélosée de Mueller-Hinton simple, ou de Mueller-Hinton additionnée de sang frais de mouton défibriné stérile. Une rotation du milieuensemencé a été effectuée. Le milieu gélosé simple et le milieu gélosé au sang ont été incubés respectivement à 37°C ou sous enceinte humide (atmosphère contenant 5 à 10% de gaz carbonique) à 37°C pendant 18 à 24 heures. Le lait a été ensuite réparti dans les cryotubes, près d'une flamme de bec Bunsen, après la confirmation de sa stérilité, et l'ensemble a été conservé à -80°C au congélateur. Il faut par ailleurs dire que les cryotubes ont tous été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes avant leur utilisation. Les cryotubes contenant le lait stérile ont été retirés du congélateur, chaque fois qu'il a eu des souches bactériennes à conserver. Chaque cryotube a servi à la conservation d'une souche bactérienne précise.

Les différentes souches bactériennes ont été conservées après avoir raclé à l'aide d'une anse de platine, le maximum de jeunes colonies (18 à 24 heures) obtenues à partir d'une souche bactérienne donnée, sur une boîte gélosée de Mueller-Hinton (simple ou additionné de sang frais de mouton défibriné stérile), puis transféré le tout dans le cryotube contenant le lait écrémé stérile. Cependant, avant son utilisation:

- le lait écrémé stérile contenu dans le cryotube a été préalablement fondu à la température du laboratoire,
- les souches bactériennes à conserver ont été initialementensemencées par inondation dans des boîtes gélosées:
  - ✓ de Mueller-Hinton simples pour les souches de staphylocoques et celles d'entérocoques,

✓ ou de Mueller-Hinton additionnées de 10% de sang frais de mouton défibriné stérile pour les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques,

puis incubées à:

- 37°C pour les souches de staphylocoques et celles d'entérocoques,
- 37°C sous enceinte humide pour les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques pendant 18 à 24 heures.

L'ensemble cryotube-germe a été à nouveau gardé -80°C avant toute utilisation.

## **2- Milieux de culture**

### **2-1 Milieu de Chapman**

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif (Bio-Rad, Référence 64134, Lot n°1G020J) pour l'isolement et l'identification des souches de staphylocoques. Sa composition en gramme par litre d'eau distillée est:

✓ peptone tryptique de caséine	2g
✓ extrait de viande	1g
✓ protéose peptone n°3	9g
✓ chlorure de sodium	75g
✓ mannitol	10g
✓ rouge de phénol	0,025g
✓ agar	15g
✓ pH	7,5±0,2

Pour la préparation du milieu, cent onze grammes de poudre du milieu de Chapman ont été dissous dans un litre d'eau distillée, homogénéisés, puis portés à ébullition jusqu'à dissolution complète.

L'homogénat obtenu a été réparti dans des flacons, stérilisé à l'autoclave à 121°C durant 15 minutes, ensuite conservé dans une chambre froide jusqu'à leur utilisation (CARBONNELLE *et al.*, 1990).

## **2-2 Milieu pour la mise en évidence d'une DNase**

Le milieu (Bio-Rad, Référence 64404, Lot n°4E2115) est composé des éléments dont les proportions en gramme par litre d'eau distillée sont:

✓ tryptose	20 g
✓ chlorure de sodium	5 g
✓ acide désoxyribonucléique	2 g
✓ agar	15 g
✓ pH	7,3±0,2

Le milieu a été utilisé pour différencier les espèces de staphylocoques entre elles.

Pour la préparation du milieu, quarante deux grammes de poudre du milieu ont été dissous dans un litre d'eau distillée, mélangés, chauffés sous agitation fréquente, puis bouillis pendant une minute pour obtenir une solution homogène. La solution obtenue a été répartie dans des flacons, stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes, après cela conservée dans une chambre froide pour être utilisée durant les manipulations (CARBONNELLE *et al.*, 1990).

## **2-3 Milieu bilié esculine azide (BEA)**

Ce milieu (Bio-Rad, Référence 64184, Lot n°8L111Y) a été utilisé pour l'isolement et l'identification des souches d'entérocoques spécifiquement les *Enterococcus faecalis*. Les proportions de ses éléments constitutifs par litre d'eau distillée sont:

✓ extrait de viande de bœuf	5 g
✓ protéose peptone n°3	3 g
✓ peptone tryptique de viande	17 g
✓ bile de bœuf déshydratée (Difco)	10 g
✓ esculine	1 g
✓ citrate de fer ammoniacal	0,5 g
✓ chlorure de sodium	5 g
✓ azide de sodium	0,15 g
✓ agar	15 g
✓ pH	7,1

Pour préparer ce milieu, cinquante six grammes de poudre du milieu bilié esculine azide ont été dissous dans un litre d'eau distillée, puis 5 minutes ont été attendues, ensuite la solution a été mélangée jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. La suspension obtenue a été chauffée, fréquemment agitée, ensuite portée à ébullition jusqu'à dissolution complète. La solution a été par la suite répartie dans des flacons, stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes, ensuite soigneusement conservée dans une chambre froide avant toute utilisation (CARBONNELLE *et al.*, 1990).

## **2-4 Bouillon de Mueller Hinton**

La composition de ce bouillon (Bio-Rad, Référence 69444, Lot n°2H0121) en gramme pour un litre d'eau distillée est la suivante:

✓ infusion de viande de bœuf	300 g
✓ hydrolysate de caséine	17,5 g
✓ amidon	1,5 g

✓ agar	15 g
✓ pH	7,3±0,2

Le bouillon de Mueller-Hinton est recommandé pour l'étude des antibiotiques.

Le bouillon de Mueller-Hinton a été préparé en dissolvant vingt cinq grammes de poudre du bouillon dans un litre d'eau distillée. La suspension obtenue a été portée à ébullition jusqu'à dissolution complète, répartie dans des flacons, puis stérilisée à l'autoclave à 121°C durant 15 minutes. Les flacons ont été conservés dans une chambre froide, puis utilisés 18 à 24 heures après la vérification de leur stérilité (CARBONNELLE *et al.*, 1990).

## 2-5 Milieu de Mueller Hinton

Le milieu de Mueller-Hinton est un milieu (Bio-Rad, Référence 64884, Lot n°1L0242) qui permet la croissance de nombreuses bactéries. Il ne contient pas d'inhibiteurs d'antibiotique. C'est par conséquent le milieu recommandé pour l'étude des antibiotiques. Il est constitué des éléments en gramme par litre d'eau distillée dans les proportions suivantes:

✓ infusion de viande de bœuf	300 g
✓ hydrolysate de caséine	17,5 g
✓ amidon	1,5 g
✓ agar	15 g
✓ pH	7,3±0,1

Le milieu de Mueller-Hinton a été préparé en dissolvant, trente cinq grammes de poudre du milieu dans un litre d'eau distillée. Après homogénéisation pendant 5 minutes, la solution obtenue a été portée à ébullition jusqu'à dissolution complète, répartie dans des flacons, après cela stérilisée à l'autoclave à 121°C durant 15 minutes. Les flacons ont été par la suite conservés dans une chambre froide jusqu'à leur utilisation (CARBONNELLE *et al.*, 1990).

## 2-6 Base pour gélose au sang +acide nalidixique

Ce milieu (Bio-Rad, Référence 51039, Lot n°669375A) est un excellent inhibiteur pour la flore bactérienne Gram négatif et des *Bacillus*. Les autres germes aérobies Gram positif se cultivent bien et aucun effet inhibiteur n'est observé à l'encontre des souches de streptocoques. Il comprend les éléments suivants en gramme pour un litre d'eau distillée:

✓ infusion de cœur et de muscle	375 g
✓ peptone pepsique de viande	10 g
✓ chlorure de sodium	5 g
✓ acide nalidixique	15 mg
✓ colimycine	10 mg
✓ agar	15 g
✓ pH	7,3

Pendant la préparation du milieu, quarante grammes de poudre base pour gélose au sang ont été dissous dans un litre d'eau distillée, mélangés pendant 5 minutes, puis portés à ébullition jusqu'à dissolution complète et obtention d'une solution homogène. L'homogénat obtenu a été réparti dans des flacons, stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes, ensuite conservé dans une chambre froide avant d'être utilisé pendant les tests expérimentaux (CARBONNELLE *et al.*, 1990).

## 2-7 Bouillon cœur-cerveille (BCC)

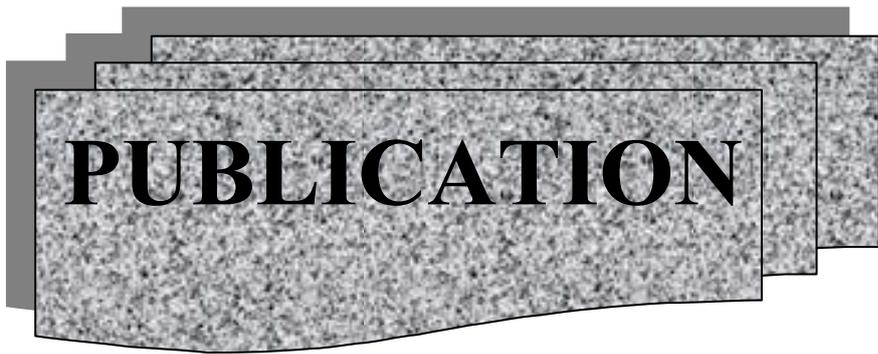
La composition de ce bouillon (Bio-Rad, Référence 64014, Lot n°7J115Y) en éléments en gramme pour un litre d'eau distillée est:

✓ bio-gelytone	10 g
✓ infusion de cervelle de veau	200 g

✓ infusion de cœur de bœuf	250 g
✓ chlorure de sodium	5 g
✓ phosphate disodique	2,5 g
✓ glucose	2 g
✓ pH	7,4

Le bouillon a été utilisé pour l'isolement nasal des souches de staphylocoques chez les caprins.

Le bouillon cœur-cerveille a été préparé en dissolvant trente sept grammes de poudre du bouillon dans un litre d'eau distillée. La solution obtenue a été bien mélangée, chauffée jusqu'à l'obtention d'une solution homogène, puis répartie dans les tubes à essai. Les tubes ont été ensuite stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes, conservés dans une chambre froide, puis utilisés 18 à 24 heures après la vérification de leur stérilité (CARBONNELLE *et al.*, 1990).



OKOU O.C. (\*)  
KRA A.K.M.  
ZIRIHI G.N.  
DOSSO M.  
GUEDE G.F.

**ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES EXTRAITS DE  
MITRACARPUS SCABER SUR LA CROISSANCE IN  
VITRO DES STREPTOCOQUES B HEMOLYTIQUES**

---

**RESUME**

Nous avons testé l'action des extraits (extrait total aqueux, extrait éthanolique 70%, résidu insoluble dans l'éthanol 70%, extrait éthanolique 100% et extrait butanolique) de *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae) sur la croissance *in vitro* des streptocoques  $\beta$  hémolytiques en milieu liquide et sur milieu solide de Milieu-Hinton. Cette plante codifiée MISCA dans notre étude, a toujours été utilisée dans la pharmacopée ivoirienne contre les infections cutanées. Les résultats de notre étude montrent que les souches

de streptocoques  $\beta$  hémolytiques sont sensibles à tous les extraits testés. Cependant, seul l'extrait butanolique a une meilleure activité bactéricide sur la croissance *in vitro* de ces souches. Les paramètres antibactériens obtenus sont les suivants : CMI = 3,13 mg/ml, CMB = 0,39 mg/ml et  $CI_{50}$  = 0,02 mg/ml.

**Mots-clés :** *Mitracarpus scaber*, Extraits végétaux, Bactéricide, *in vitro*, Antistreptococcique .

**ABSTRACT**

The effects of different extracts (aqueous extract, ethanol extract 70%, insoluble residue in ethanol 70%, ethanol extract 100% and butanol extract) of *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae) were tested on the  $\beta$  hemolytic streptococci *in vitro* growth in Mueller-Hinton broth and Mueller-Hinton naehrboden agar. This plant codified MISCA was always used in Côte d'Ivoire as folk remedy against skin infections. The results

showed that the  $\beta$  hemolytic streptococci were sensitive on all MISCA extracts tested. However, only butanol extract possessed a powerful bactericidal activity on the  $\beta$  hemolytic streptococci with those values : MIC = 3,13 mg/ml, MBC = 0,39 mg/ml and  $IC_{50}$  = 0,02 mg/ml.

**Key words :** *Mitracarpus scaber*, Vegetal extracts, Bactericidal, *in vitro*, Antistreptococci.

---

\* Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, UFR-Biosciences, Université de Cocody, 22 BP 582 Abidjan  
22 Côte d'Ivoire - Tel: (225) 22.50.45.14/ (225) 07.7.35.35 Oboufr@yahoo.fr.

## INTRODUCTION

A travers le monde et particulièrement en Afrique, les plantes médicinales occupent une place importante en thérapie, aussi bien dans les milieux urbains que ruraux. Cette pratique est encouragée par le manque d'infrastructures sanitaires et le coût très élevé des médicaments modernes. Dans la recherche de nouveaux médicaments efficaces contre les pathologies, les milieux scientifiques manifestent un intérêt de plus en plus croissant pour ces plantes (RASKIN *et al.*, 2002 ; TREBISSOU, 2002). Le patrimoine floristique africain, envisagé sous l'angle de la pharmacopée et de la médecine traditionnelle s'avère très riche en plantes médicinales dont l'efficacité est avérée. Notre continent regorge de plus de 5000 espèces végétales médicamenteuses (ADJANOHOOUN et AKE, 1979). Dans le souci d'exploiter rationnellement ce patrimoine, de donner une base scientifique à l'utilisation de ces plantes et d'apporter sa contribution à la découverte de nouvelles têtes de séries de médicaments, notre équipe a mené des enquêtes ethnobotaniques auprès des tradipraticiens. Parmi les nombreuses espèces sélectionnées, *Mitracarpus scaber*

figure non seulement au nombre de celles qui sont les plus sollicitées, mais aussi elle passe pour être la plus utilisée dans le traitement de diverses affections cutanées. Pour vérifier le bien fondé des vertus antiinfectieuses prêtées à cette plante, notre équipe a testé divers extraits de *Mitracarpus scaber* sur des souches bactériennes (GUEDE-GUINA, 1995), fongiques pathogènes (CROCKETT *et al.*, 1992 ; GUEDE-GUINA *et al.*, 1995 ; MOBIE, 1996 ; VANGAH-MANDA *et al.*, 1996 ; KRA, 1997 ; MOBIE *et al.*, 1998).

Des travaux réalisés dans d'autres laboratoires confirment cette action antibactérienne de *Mitracarpus scaber* (OKUNADE *et al.*, 1999 ; BISIGNANO *et al.*, 2000 ; ALI-EMMANUEL *et al.*, 2003) et antifongique (EKPENDU *et al.*, 1994).

C'est dans le but de compléter ces travaux que la présente étude a été initiée pour évaluer l'activité antistreptococcique de MISCA et chercher à l'optimiser par partition des extraits obtenus d'elle dans divers solvants.

## I- MATERIEL ET METHODES

### 1- MATÉRIEL

#### 1-1 Matériel végétal

Le matériel végétal est une poudre provenant des parties aériennes (feuilles, tiges, fleurs) et souterraines (racines) de *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae), une plante utilisée traditionnellement contre les infections cutanées.

#### 1-2 Bactéries utilisées

Pendant cette étude, nous avons travaillé avec une soixantaine de souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques appartenant aux groupes A, C et G. Ces souches

numérotées de 1 à 60 ont été prélevées de la gorge de personnes saines à l'aide d'écouvillons.

#### 1-3 Milieux utilisés

Une fois prélevée, ces souches ont été immédiatement repiquées sur la gélose au sang additionnée d'acide nalidixique (Bio-Rad, Référence 51039, Lot n°669375A) pour leur isolement et leur identification. Les cultures ainsi réalisées ont été incubées à 37°C sous cloche et la technique de Lancefield a été utilisée pour la détermination du groupe de chaque souche. Après leur isolement

et identification, les souches ont été cultivées sur la gélose Mueller-Hinton (Bio-Rad, Référence 64884, Lot n°1L0242) additionnée de 5 à 10 % de sang de mouton défibriné stérile, incubées une fois encore sous cloche pendant 18 à 24 heures et conservées dans du lait écrémé stérile à -80°C. Les tests antibactériens ont été réalisés avec du bouillon Mueller-Hinton (Bio-Rad, Référence 64444, Lot n°2H0121) et de la gélose Mueller-Hinton additionnée de 5 à 10 % de sang de mouton défibriné stérile. Ces tests ont permis d'évaluer la sensibilité des souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques en présence ou en absence des différents extraits.

## 2- MÉTHODES

### 2-1 Préparation des extraits

La plante fraîche a été récoltée, lavée à l'eau, découpée puis séchée à la température du laboratoire. Après leur séchage, ces organes végétaux ont été broyés en poudre fine. La méthode de ZIRIHI et *al.* (2003) a été celle utilisée pour la préparation des extraits végétaux. Selon cette méthode, la poudre végétale a été macérée dans un litre d'eau distillée sous agitation magnétique sur un agitateur de type IKA-Labortechnik pendant 24 heures.

L'homogénéisat aqueux a été filtré sur coton hydrophile et papier Wathman 3 mm. Le filtrat a été évaporé à sec sous pression réduite à 70°C dans un évaporateur rotatif de type BÜCHI pour donner une poudre marron foncée qui a constituée l'extrait total aqueux noté : MISCA-Aq. A partir de MISCA-Aq, les autres fractions ont été préparées par partition dans divers solvants comme suit :

- une partie de MISCA-Aq a été dissoute dans un mélange eau distillée-éthanol (30/70: V/V). La solution homogène obtenue a été ensuite laissée à décantation complète. Par la suite, le surnageant a été

séparé du dépôt et les deux phases ont été concentrées séparément sous pression réduite à 60°C au Rotavapor BÜCHI. Nous avons obtenu ainsi, une pâte de couleur marron qui a constituée l'extrait éthanolique 70% noté: MISCA-70Et et un résidu : MISCA-70R ;

- une partie de MISCA-Aq a servi aussi à préparer l'extrait éthanolique 100% (MISCA-100Et) par simple macération dans l'éthanol pur sous agitation magnétique jusqu'à homogénéité complète. Ensuite, les deux phases obtenues après décantation ont été concentrées séparément et nous avons obtenu ainsi : MISCA-100Et (le surnageant) et MISCA-100R (le résidu).

Les autres extraits ont été obtenus à partir de l'extrait éthanolique 100% (MISCA-100Et) comme suit :

- MISCA-100Et a été d'abord dégraissé à l'hexane puis la portion non liposoluble a été récupérée et soumise à partition dans un mélange eau distillée-acétate d'éthyle (50/50 : V/V). Après décantation, les deux phases ont été concentrées séparément, nous avons obtenu alors MISCA-Ac<sup>+</sup> (issu du surnageant) et MISCA-Ac<sup>-</sup> (issu du dépôt).

- MISCA-Ac<sup>-</sup> a été repris dans un mélange butanol-eau distillée (50/50: V/V). La concentration au Rotavapor BÜCHI de ces deux fractions a donné les extraits MISCA-But<sup>+</sup> (surnageant) et MISCA-But<sup>-</sup> (dépôt).

En définitive, ce sont les extraits MISCA-Aq, MISCA-70Et, MISCA-70R, MISCA-100Et et MISCA-But<sup>+</sup> qui ont été testés sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques.

### 2-2 Préparation du milieu de conservation

Nous avons dissout 10 grammes de poudre de lait écrémé dans 100 ml d'eau distillée, homogénéisé la solution et porté à stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°C. Le lait obtenu a été réparti dans

des cryotubes près d'une flamme du bec Bunsen, gardé à  $-80^{\circ}\text{C}$  au congélateur et a été utilisé pour la conservation des souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques.

## 2-3 Détermination des paramètres

### 2-3.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide

La gélose stérile préalablement préparée a été refondue, refroidie entre  $45$  et  $50^{\circ}\text{C}$  puis additionnée de sang frais défibriné stérile. Ce mélange homogène a été coulé dans des boîtes de Pétri et a servi pour la culture des souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques.

Trois souches différentes de streptocoques  $\beta$  hémolytiques préalablement conservées dans le lait écrémé stérile ont été repiquées distinctement dans des boîtes gélosées au sang précédemment préparées puis incubées sous cloche (atmosphère contenant 5 à 10% de gaz carbonique) à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 18 à 24 heures, afin d'avoir des colonies isolées. La culture des souches de streptocoques dans de telles conditions favorise fortement leur optimisation. Après ce temps d'incubation, trois à cinq colonies isolées obtenues à partir de chaque ensemencement ont été prélevées par une anse, délayées et homogénéisées dans 10 ml de bouillon Mueller-Hinton stérile qui a été par la suite réincubé à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 3 à 5 heures.

Pendant ce temps d'incubation, nous avons préparé les gammes de concentration de l'extrait végétal par la méthode de double dilution en milieu liquide. Les gammes de concentrations utilisées varient de 200 mg/ml à 3,13 mg/ml pour MISCA-Aq, 50 mg/ml à 0,1 mg/ml pour MISCA-100Et et MISCA-70Et, 200 mg/ml à 3,13 mg/ml pour MISCA-70R et 12,5 mg/ml à 0,05 mg/ml pour MISCA-But<sup>+</sup>. Pour chaque concentration d'extrait utilisée, 0,2 ml a été prélevé et réparti dans un tube précis d'une série de tubes expérimentaux. Dans

cette série appelée série test, un tube a servi de tube témoin de contrôle de croissance (contenant 0,2 ml d'eau distillée stérile). Après les 3 à 5 heures d'incubation, nous avons prélevé 0,6 ml du bouillon inoculé puis l'avons mélangé à 10 ml de bouillon Mueller-Hinton stérile, pour obtenir une opalescence comprise entre  $5.10^5$  et  $5.10^7$  bactéries/ml (conditions standard). Ensuite, 1,8 ml de ce bouillon a été prélevé pour compléter le volume (0,2 ml) des tubes de la série test à 2 ml.

Parallèlement à la série test, nous avons réalisé une série de référence. Dans cette dernière, les tubes expérimentaux ont contenu chacun, 0,2 ml de chaque concentration d'extrait végétal préparée et le tube témoin 0,2 ml d'eau distillée stérile. A l'ensemble des tubes de la série de référence, nous avons ajouté 1,8 ml de bouillon stérile. L'ensemble des tubes expérimentaux de la série test et les tubes expérimentaux de la série de référence ont été incubés à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 18 à 24 heures. Après un jour d'incubation, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée par lecture directe, à l'œil nu et à la lumière du jour. Elle a été déterminée en comparant concentration par concentration, les tubes de la série test avec ceux de la série de référence pour la recherche d'absence de turbidité. La CMI déterminée a été avérée la même pour les 3 espèces différentes de souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques simultanément testées. Les tests expérimentaux ont été répétés 4 fois pour chaque extrait utilisé. Ainsi, pour un extrait végétal considéré, 12 (4x3) espèces différentes de souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques ont été testées. Ce qui fait que pour les 5 extraits végétaux testés, 60 (12x5) espèces différentes de souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques ont été utilisées.

Pour mieux apprécier l'évolution de la sensibilité des souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques en présence ou en absence d'extrait végétal, nous avons ensemencé

les inocula obtenus à partir d'une espèce bactérienne précise, dans des boîtes gélosées de Mueller-Hinton au sang différentes, sur des stries de 5 cm à l'aide d'une anse calibrée. Les inoculaensemencés ont été l'inoculum du tube témoin, les inocula où la turbidité n'a pas été visible et quelques inocula précédents le tube qui nous a permis de déterminer la CMI (charge bactérienne élevée). Toutes ces cultures ont été ensuite incubées à 37°C sous cloche pendant 18 à 24 heures.

### **2-3.2 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

Une série de culture de la série test obtenue à partir d'une espèce bactérienne précise, a été isolée. Et chaque tube de la série expérimentale isolée, a été distinctement dilué de 10 en 10, puis séparémentensemencé dans différentes boîtes gélosées de Mueller-Hinton au sang, sur des stries de 5 cm à l'aide d'une anse calibrée. Ces ensemencements ont été ensuite incubés à 37°C sous cloche pendant 18 à 24 h. Après l'incubation, le

dénombrement des bactéries survivantes par tube a été effectué en établissant une relation entre le diamètre (2,1 mm) de l'anse calibrée, le volume prélevé (3 µl), le nombre de bactéries survivantes sur la dernière strie et les dilutions successives réalisées pour obtenir les colonies isolées. Un dénombrement par test expérimental a été effectué. Au cours de 3 tests expérimentaux successifs, 3 dénombrements consécutifs ont été effectués par extrait végétal. Ce qui fait que 15 (3x5) dénombrements ont été réalisés pour les 5 extraits utilisés. Tous les volumes ont été exprimés en millilitre et la formule de calcul peut être résumée comme suit :

Nombre de Bactéries = Nombre de colonies x 1 ml/ volume prélevé.

La moyenne des bactéries dénombrées par tube après les 3 dénombrements successifs, nous a permis de déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB). En identifiant la concentration qui laisse 0,01% de bactéries survivantes comparativement au tube témoin de contrôle de croissance (sans extrait végétal).

## **II- RESULTATS**

Les figures 1, 2, 3, 4 et 5 montrent l'activité des extraits (extrait total aqueux, extrait éthanolique 70%, extrait éthanolique 100% et extrait butanolique et extrait résiduel 70%) sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques β hémolytiques.

Les figures 1 à 4 montrent les résultats des cultures en stries des souches de streptocoques β hémolytiques. Sur ces résultats, la comparaison de l'épaisseur de la nappe de colonies sur les stries des autres concentrations avec celle du strie témoin, révèlent qu'il y a une diminution progressive de cette épaisseur au fur et à mesure que la concentration d'extrait

augmente. Ce constat est le même quelque soit l'extrait de MISCA considéré. Pour certaines valeurs fortes de concentration d'extrait, nous remarquons que la strie devient clairsemée jusqu'à obtenir des colonies isolées et des traces de stries sans croissance bactérienne.

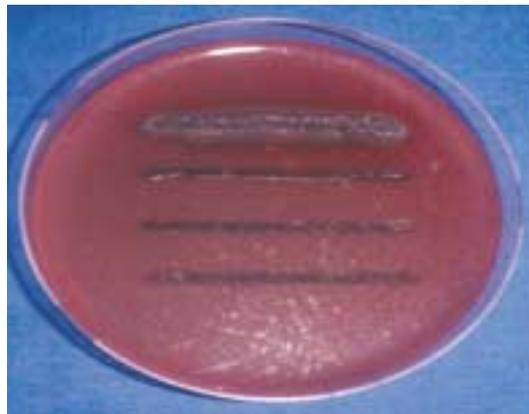
Cette action décrite plus haut est perceptible à 6,25 mg/ml de l'extrait butanolique (MISCA-But\*), 12,5 mg/ml de l'extrait éthanolique 100% (MISCA-100Et), 25 mg/ml de l'extrait éthanolique 70% (MISCA-70Et) et 200 mg/ml de l'extrait total aqueux (MISCA-Aq).



**Figure 1 :** Action de MISCA-Aq sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques

Du haut en bas après incubation pendant 18 à 24 heures :

- inoculum témoin (pur) en absence de MISCA-Aq
- inoculum témoin en présence de 25 mg/ml de MISCA-Aq
- inoculum témoin en présence de 50 mg/ml de MISCA-Aq
- inoculum témoin en présence de 100 mg/ml de MISCA-Aq
- inoculum témoin en présence de 200 mg/ml de MISCA-Aq.



**Figure 2 :** Action de MISCA-70Et sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques

Du haut en bas après incubation pendant 18 à 24 heures :

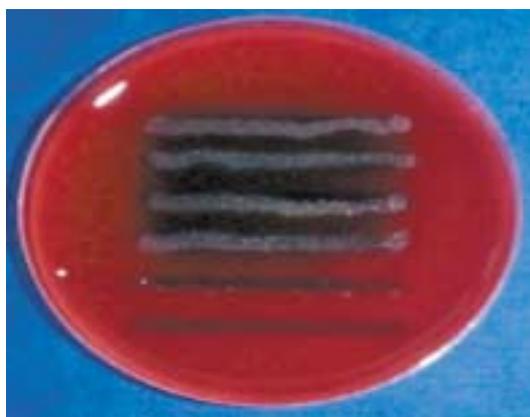
- inoculum témoin (pur) en absence de MISCA-70Et
- inoculum témoin en présence de 12,5 mg/ml de MISCA-70Et %
- inoculum témoin en présence de 25 mg/ml de MISCA-70Et
- inoculum témoin en présence de 50 mg/ml de MISCA-70Et.



**Figure 3 :** Action de MISCA-100Et sur la croissance *in vitro* des souches destreptocoques  $\beta$  hémolytiques

Du haut en bas après incubation pendant 18 à 24 heures :

- inoculum témoin (pur) en absence de MISCA-100Et
- inoculum témoin en présence de 12,5 mg/ml de MISCA-100Et
- inoculum témoin en présence de 25 mg/ml de MISCA-100Et
- inoculum témoin en présence de 50 mg/ml de MISCA-100Et.



**Figure 4 :** Action de MISCA-But<sup>+</sup> sur la croissance *in vitro* des souches destreptocoques  $\beta$  hémolytiques

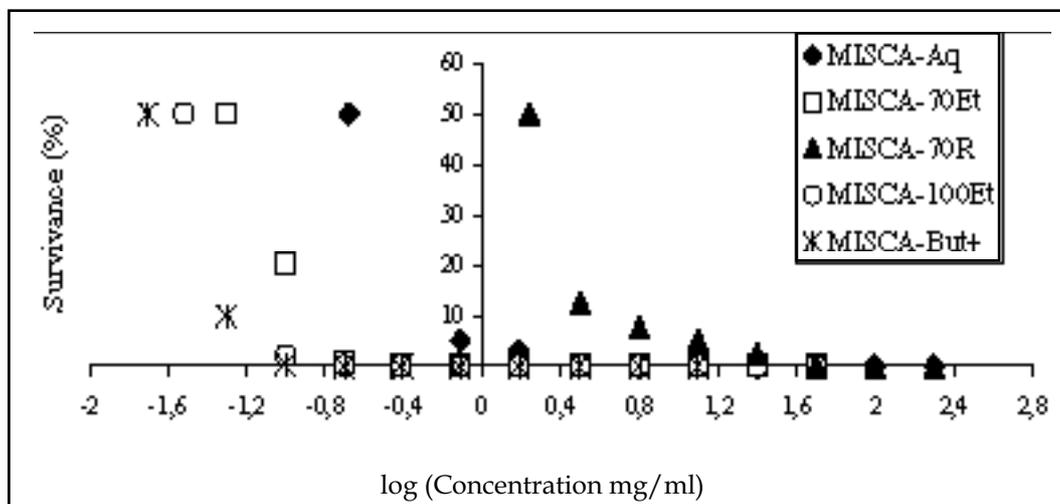
Du haut en bas après incubation pendant 18 à 24 heures :

- inoculum témoin (pur) en absence de MISCA-But<sup>+</sup>
- inoculum témoin en présence de 0,78 mg/ml de MISCA-But<sup>+</sup>
- inoculum témoin en présence de 1,56 mg/ml de MISCA-But<sup>+</sup>
- inoculum témoin en présence de 3,13 mg/ml de MISCA-But<sup>+</sup>
- inoculum témoin en présence de 6,25 mg/ml de MISCA-But<sup>+</sup>
- inoculum témoin en présence de 12,5 mg/ml de MISCA-But<sup>+</sup>.

Les résultats de la figure 5 récapitulent la courbe de sensibilité des souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques aux 5 extraits de MISCA. C'est une courbe logarithmique qui prend en compte les concentrations à partir de la  $CI_{50}$  jusqu'aux concentrations élevées des extraits.

Les courbes situées dans la zone négative montrent une sensibilité plus grande des souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques aux extraits de MISCA. Cette sensibilité des souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques aux extraits est classée dans l'ordre décroissant suivant : l'extrait butanolique (MISCA-But<sup>+</sup>), l'extrait éthanolique 100% (MISCA-100Et), l'extrait éthanolique 70% (MISCA-70Et) et l'extrait total aqueux (MISCA-Aq).

Tandis que la courbe de l'extrait résiduel 70% (MISCA-70R) est situé dans la zone positive de la figure 5.



**Figure 5 :** Courbe récapitulatif de la sensibilité des souches de streptocoques aux extraits de MISCA.

Dans le tableau I sont récapitulés toutes les valeurs des paramètres antimicrobiens de nos tests.

**Tableau I :** Les valeurs des paramètres antimicrobiens des 5 extraits de MISCA

	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	$CI_{50}$ (mg/ml)
MISCA-Aq	25	6,25	0,21
MISCA-70Et	12,5	1,56	0,05
MISCA-70R	50	100	1,72
MISCA-100Et	12,5	0,78	0,03
MISCA-But <sup>+</sup>	3,13	0,39	0,02

## DISCUSSION

Les résultats montrent que les souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques sont sensibles à tous les extraits de MISCA.

Si nous considérons l'extrait total aqueux qui est l'extrait de base, les valeurs des paramètres antimicrobiens (concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB)) sont respectivement 25 mg/ml et 6,25 mg/ml.

Le rapport:  $CMB_{MISCA-Aq}/CMI_{MISCA-Aq} = 6,25/25 = 0,25 < 4$ . Selon MARMONIER (1990), si ce rapport est inférieur à 4, la substance étudiée est bactéricide. Par conséquent, nous en déduisons que l'activité de MISCA-Aq sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques est une action bactéricide.

Cette bactéricidie obtenue s'améliore à deux niveaux :

- lorsque nous passons de MISCA-Aq à MISCA-But<sup>+</sup>. L'inhibition nette est obtenue à 6,25 mg/ml de MISCA-But<sup>+</sup>, 12,5 mg/ml de MISCA-100Et, 25 mg/ml de MISCA-70Et et 200 mg/ml de MISCA-Aq. Ce qui signifie que cette bactéricidie est fonction de l'état de pureté de l'extrait utilisé ;

- pour un extrait considéré, comparativement à l'inoculum témoin, il y a non seulement une diminution progressive de l'épaisseur de la nappe de colonies sur les stries mais aussi une diminution du nombre de colonies par stries en passant des faibles concentrations aux fortes concentrations (figures 1 à 5 et tableau I). Ce qui veut dire que cette bactéricidie est dose-dépendante.

Ainsi, cette bactéricidie est dose-dépendante mais aussi liée à l'état de pureté de l'extrait testé.

Il ressort de l'analyse de ces résultats que l'extrait le plus bactéricide est MISCA-But<sup>+</sup> car sa valeur de CMB (0,39 mg/ml) est la plus faible. Alors que l'extrait le moins bactéricide de tous est MISCA-70R

à cause de la valeur élevée de sa CMB (100 mg/ml).

De plus, le rapport établi sur la base des concentrations minimales bactéricides (CMB), montre que :

- $CMB_{MISCA-70R}/CMB_{MISCA-But^+} = 100/0,39 = 256$  ; MISCA-But<sup>+</sup> est 256 fois plus bactéricide que MISCA-70R.

- $CMB_{MISCA-Aq}/CMB_{MISCA-But^+} = 6,25/0,39 = 16$  ; MISCA-But<sup>+</sup> est 16 fois plus bactéricide que MISCA-Aq.

- $CMB_{MISCA-70Et}/CMB_{MISCA-But^+} = 1,56/0,39 = 4$  ; MISCA-But<sup>+</sup> est 4 fois plus bactéricide que MISCA-70Et.

- $CMB_{MISCA-100Et}/CMB_{MISCA-But^+} = 0,78/0,39 = 2$  ; MISCA-But<sup>+</sup> est 2 fois plus bactéricide que MISCA-100Et.

Ces rapports prouvent donc que MISCA-But<sup>+</sup> améliore 16 fois l'activité de MISCA-Aq qui a servi de base à sa préparation. Ces résultats révèlent aussi que la partition MISCA-Aq dans une combinaison successive de solvants, permet une meilleure concentration des principes actifs de MISCA.

Cette moindre performance de MISCA-70R est normale et s'expliquerait par le fait qu'il concentre beaucoup plus de macromolécules (sucres, protéines et glycoprotéines) qui n'ont pas d'effet inhibiteur sur la croissance *in vitro* des souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques. L'activité apparente de MISCA-70R s'explique par le fait que cet extrait contient des traces de principes actifs laissés lors de la décantation des phases pendant la préparation des extraits.

Cette étude montre que notre méthode d'extraction est une bonne voie qui permet de concentrer les principes actifs et d'améliorer l'activité de l'extrait total aqueux de MISCA traditionnellement utilisé contre les infections cutanées. En effet, nous avons abouti à MISCA-But<sup>+</sup> qui est 16 fois plus bactéricide que MISCA-Aq.

## CONCLUSION

Cette étude nous a permis de montrer que les souches de streptocoques  $\beta$  hémolytiques testées sont sensibles à tous les extraits de MISCA. Tous ces extraits sont plus ou moins actifs mais la plus bactéricide est MISCA-But<sup>+</sup> (CMB = 0,39 mg/ml) (extrait le plus purifié) et le moins bactéricide est MISCA-70R (CMB = 100 mg/ml). Ces extraits agissent selon un effet dose-réponse.

Notre méthode de préparation des extraits par partition dans divers solvants est une bonne voie permettant d'améliorer l'activité antistreptococcique de l'extrait de base. Elle nous a permis d'accroître

considérablement (16 fois) l'activité de l'extrait total aqueux traditionnellement utilisé contre les infections cutanées.

Une analyse plus poussée par la triphytochimique, la chromatographie (sur colonne et sur couche mince) et la spectroscopie nous permettra d'isoler et d'identifier les différentes molécules contenues dans MISCA-But<sup>+</sup> afin de préciser la nature des molécules actives et leurs paramètres. Cette analyse permettra de savoir si ces molécules sont actives en synergie ou peuvent agir isolément.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADJANOHOUN E.J. et AKE A.L. (1979). *Contribution au recensement des plantes médicinales en Côte d'Ivoire*. Centre National de floristique de l'Université de Côte d'Ivoire (Université de Cocody). Tome 1, 23-300.
- ALI-EMMANUEL N., MOUDACHIROU M., AKAKPOJ.A. and QUETIN-LECLERCQJ. (2003). Treatment of bovine dermatophilosis with *Senna alata*, *Lantana camara* and *Mitracarpus scaber* leaf extracts. *J. Ethnopharmacol.*, 86 (2-3) :167-171.
- BISIGNANO G., SANOGO R., MARINO A., AQUINO R., D'ANGELO V., GERMANO M.P., DE PASQUALE R. and PIZZA C. (2000). Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract isolated constituents. *Letters in applied microbiology. GBR*, Vol. 30, N°2, 105-108.
- CROCKET C.O., GUEDE-GUINA F., PUGH D.A., VANGAH-MANDA M., BODO B., SMITH M.O. and OCHILLO R.F. (1992). Antifungal activity of water extract of MISCA. *The FASEB J.* 6, (4), Abstract 3785. A. 1590.
- EKPENDU T.O., AKAH P.A., ADESOMOJU A.A. and OKOGUN J.L. (1994). Antiinflammatory and antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* extracts. *International journal of pharmacognosy*. Vol. 32, N°2, 191-196.
- GUEDE-GUINA F., VANGAH-MANDA M., BONGA G.M. et De SOUZA C. (1995). Activité antimicrobienne d'un extrait végétal contre les germes opportunistes au cours du SIDA. *Revue de Médecine et Pharmacopée Africaine* 9 (1), 13-19.
- KRA A.K.M. (1997). Evaluation des effets d'un nouvel antiaspergillaire de source naturelle. *DEA Biotech. Opt. Pharmacologie des Substances Naturelles*, Univ. Cocody, 30 pages.
- MARMONIER A.A. (1990). Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. In *Bactériologie Médicale, techniques usuelles*, 227-236.
- MOBIE D.P. (1996). Activité antifongique d'une huile essentielle de MISCA, un extrait végétal contre *Trichophyton rubrum*. *DEA de Biotech. FAST Univ. Abidjan*, 30 pages.
- MOBIE D.P., VANGAH-MANDA M., De SOUZA C. et GUEDE-GUINA F. (1998). Action antifongique d'une huile végétale sur *Trichophyton rubrum*. *Afrique Biomédicale*, 3, (1), 5-8.
- OKUNADE A.L., CLARK A.M., HUFFORD C.D. and OGUNTIMEIN B.O. (1999). Azaanthraquinone : An antimicrobial alkaloid from *Mitracarpus scaber*. *Planta medica. DEU*, Vol. 65, N°5, 447-448.
- RASKIN L., RIBNICKY M.D., KORMARTSKYY. S., ILIC N. and POULEV A. (2002). Plants and human health in the twenty first century. *Trends in Biotechnology*, 20(12): 522-531.
- TREBISSOU J.N.D. (2002). Bases physiologiques de l'activité myostimulante de MISCA F2 (un extrait végétal) sur les contractions duodénales de lapin. *Afrique Biomédicale*, Vol. 7, N°2, 12-19.

- VANGAH-MANDAM, BONGAG.M., DeSOUZA C. et GUEDE-GUINA F. (1996). Amélioration de l'action antifongique de MISCA, un extrait végétal contre *Cryptococcus neoformans*. *Afrique Biomédicale*, 1, (1), 16-19.
- ZIRIHI G.N., KRA A.K.M. et GUEDE-GUINA F. (2003). Evaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Lamarck) O. Kuntze (Asteraceae) "pymi" sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Revue Méd. Pharm. Afr.* Vol. 17, 11-18.



Research Article

## Evaluation Of *Mitracarpus Scaber* (Rubiaceae) Extracts Activity On Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*

Okou<sup>\*1,2</sup>, O.C., Angaman<sup>1</sup>, D.M., Ackah<sup>1,2</sup>, J.A.B. and Djaman<sup>2</sup>, A.J.

<sup>1</sup>UFR Agroforesterie, Filière Biochimie-Microbiologie, Université Jean Lorougnon Guédé, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire.

<sup>2</sup>Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, UFR-Biosciences, Université Félix Houphouët-Boigny Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

\*Corresponding Author: Dr. Obou Constantin Okou; Email: [constinokob@gmail.com](mailto:constinokob@gmail.com)

### ABSTRACT

Our objective was to test the antibacterial activity of *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae) extracts, a plant used in Cote d'Ivoire as folk remedy against skin infections. The extracts (aqueous extract, ethanolic extract 70%, insoluble residue in ethanol 70%, ethanolic extract 100% and butanolic extract) obtained from this plant were tested on the *in vitro* growth of methicillin-resistant *Staphylococci* in Mueller-Hinton broth and Mueller-Hinton naehrboden agar. The results revealed that all the staphylococci used were sensitive to all MISCA extracts. Nevertheless, only butanolic extract possessed a powerful bactericidal activity with those values: MIC = 0,78 mg/ml, MBC = 0,2 mg/ml and IC<sub>50</sub> = 0,02 mg/ml.

**Keywords :** *Staphylococcus aureus*, bactericidal, extracts, *in vitro*, *Mitracarpus scaber*

### INTRODUCTION

The widespread use of antibiotics or vaccines in medicine and agriculture, their misdirected prescriptions, non-compliance with the basic rules of care and hygiene have promoted the emergence and progression of bacterial resistance and have resulted in treatment failure. In order to remedy this situation, the search of new antibacterial agents becomes a necessity (Dromer and Dupont, 1996; Dupont et al., 1996; Garrigues et al., 1996; Zirihi et al., 2003). Many ethnobotanical surveys have shown anti-infective plants in West African pharmacopoeia (Adjanohoun and De Souza, 1977; Aké-Assi et al., 1985; Zirihi et al., 2003). Among these many species, antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae) has been extensively studied (Vangah-Manda et al., 1996; Bonga et al., 1995). Moreover, this same study was conducted by (Maynard et al., 1982; Ekpendu et al., 1994; Nok, 2002).

However, the antibacterial activity of *Mitracarpus scaber* (MISCA) is largely unknown, we initiated this work to test the activity of the MISCA extracts on *in vitro* growth of *Staphylococcus*. Preliminary tests were performed on methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus* strains and have shown that these extracts were active on both strains of *Staphylococcus*. However, given the incidence of clinical strains of resistant *Staphylococcus* to methicillin leading to human skin pathology, we preferred to deepen knowledge the action of MISCA plant extracts on this strain.

### MATERIALS AND METHODS

#### Plant material

*Mitracarpus scaber* (Rubiaceae) were collected in Abidjan (Côte d'Ivoire) and identified by the Botany Department of Université de Félix Houphouët Boigny de Cocody. voucher specimens are preserved in the herbarium for future reference. This plant is traditionally used against skin infections.

#### Preparation of extracts

Whole *Mitracarpus scaber* plants were washed, cut and dried at room temperature. After drying, the plant organs were ground to a fine powder and 100 g were macerated for 24 h in 1 L of distilled water on a shaker-type IKA Labor Technik water. The aqueous homogenate was filtered through hydrophilic cotton and Whatman paper 3 mm. The filtrate was evaporated to dryness under reduced pressure at 70°C with the Buchi Rotavapor to give a dark brown powder which formed the crude aqueous extract noted: MISCA-Aq. From MISCA-Aq, other fractions were prepared according to the method of Zirihi et al. (2003). 10 g of MISCA-Aq were dissolved in 200 ml ethanol:water (70:30, v/v). The supernatant and pellet were concentrated separately at 50°C to obtain MISCA-70Et (70% ethanol extract from supernatant) and MISCA-70R (70% residual extract from pellet). Another part of MISCA-Aq was used to prepare the ethanol extract 100% (MISCA-100Et) simply by

maceration 30 g MISCA-Aq in 600 ml of absolute ethanol under magnetic stirring until complete homogeneity. Then the two phases obtained after decantation were concentrated separately to obtain MISCA-100Et (supernatant) and MISCA-100R (pellet). MISCA-100Et has been used as basis for preparing further extracts. From this sample, 15 g were first defatted with hexane in soxhlet, and the aqueous fraction was subjected to partition into 600 ml ethyl acetate : water (50/50, v/v) and then decanted. After separation, the two phases were concentrated separately at 50°C to obtain MISCA-Ac<sup>+</sup> (from supernatant) and MISCA-Ac<sup>-</sup> (from pellet). With MISCA-Ac<sup>-</sup> 15 g were added in 600 ml butanol:water (50:50, v/v) and then decanted. Evaporation of these two fractions gave extracts MISCA-But<sup>+</sup> (supernatant) and MISCA-But<sup>-</sup> (pellet). The MISCA-Aq, MISCA-70Et, MISCA-70R, MISCA-100Et and MISCA-But<sup>+</sup> extracts were tested on *in vitro* growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

### Bacteria isolation and determination

Methicillin-resistance of *Staphylococcus* strains was determined using oxacillin, a reference antibiotic which was much more stable in *in vitro* culture than methicillin. These germs are methicillin-resistant and were isolated from patients came achieving their biological analyzes at the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire. On the other hand, they were isolated from the goat nostrils to the slaughter of Port-bouët (Abidjan).

For the isolation of nasal staphylococcal strains, we used sterile swabs and brain-heart broth (Bio-Rad). Each sample obtained was transplanted on a selective medium, the Chapman medium (Bio-Rad). To differentiate the human or animal origin of staphylococci species, we used the medium for the detection of DNase (Bio-Rad), novobiocin and oxacillin discs 5 µg and 1µg respectively. After identification and isolation, the strains were stored in sterile skim milk at -80°C. The antibacterial tests were performed with Mueller-Hinton broth (Bio-Rad) and Mueller-Hinton agar (Bio-Rad).

### Antibacterial activity

The minimum inhibitory concentration (MIC) values were evaluated by the Mueller-Hinton broth macrodilution test, as described by (Nassif et al., 1990) and using the standard inoculum of  $5.10^5$ - $5.10^7$  cfu ml<sup>-1</sup>. The concentration ranges of each plant extract were prepared according to the method of double dilution with a geometric progression of ratio 1/2. The range from 200 to 0.39 mg/ml for MISCA-Aq, 25 to 0.39 mg/ml for MISCA-70Et and MISCA-100Et, 200 to 12.5 mg/ml for MISCA-70R and 12.5 to 0.05 mg/ml for MISCA-But<sup>+</sup>. The MIC is defined as the lowest concentration of drug which inhibits the visible growth after 18 h. With fusidic acid (reference antibiotic), we used concentrations ranges from 500µg/ml to 3.91 g/ml and we used the same procedure.

To determine the minimal bactericidal concentration (MBC), each tube of the experimental series was separately diluted according to a geometric progression of ratio 10<sup>-1</sup>. Then each of the different dilutions were plated with Mueller-Hinton agar. All inoculated plates were then incubated at 37 °C for 24 h. After incubation, the enumeration of surviving bacteria per tube was

done by establishing a relation between the diameter (2.1 mm) of the calibrated loop, the sampled volume (3 µl), the number of surviving bacteria on a streak data and subsequent dilutions made to obtain isolated colonies.

$$\text{Number of bacteria} = \text{Number of colonies} \times 1 \text{ ml} / \text{volume sampled}$$

The MBC was defined as the lowest concentration that did not permit any visible microorganism colony growth on the medium after the period of incubation fixed in the present study.

The tests (MIC and MCB) were repeated three times consecutively over 3 successive different experiments. The bactericidal determination was based on the principle of (Marmonier, 1990). According to this principle, if the MBC/MIC ratio is less than or equal to 4, the test substance is bactericidal.

### RESULTS AND DISCUSSION

In liquid medium, no turbidity was observed for strains of MRSA from the concentrations of:

- 6.25 mg/ml of crude aqueous extract of MISCA (MISCA-Aq);
- 3.13 mg/ml of ethanolic extract of 70 % MISCA (MISCA-70Et);
- 100 mg/ml of residual extract of 70 % MISCA (MISCA-70R);
- 3.13 mg/ml of ethanolic extract of 100% MISCA (MISCA-100Et);
- 0.78 mg/ml of butanolic extract of MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>).

Agar medium helped to see generally the thicknesses of the layers of colonies decreased gradually as the concentrations of the extracts tested increase. This decrease is most often followed by appearances from a few isolated colonies and total disappearance of colonies on some streaks. This observed phenomenon is based on the improvement MISCA extracts. Thus, the test extract most improved (MISCA-But<sup>+</sup>) gives the following result (Fig.1). This figure shows that isolated colonies are observed from 1.56 mg/ml. They gradually decrease with increasing concentration until complete disappearance at 12.5 mg/ml.

Colony counts in the experimental tubes allowed to have the following Fig. 2 and Table No 1. The results in Fig. 2 show the sensitivity curves of MRSA on 5 MISCA extracts. These are logarithmic curves which take into account the concentrations from the IC<sub>50</sub> up to high concentrations of extracts. The curves located in the negative area are those with the logarithmic values of the lowest antibacterial parameters. However, we find that the curve described by MISCA-But<sup>+</sup> has lower logarithmic values than that described by MISCA-100Et. While the curve obtained by MISCA-100Et merges with that described by MISCA-70Et. All the curves of the negative area only this obtained by MISCA-Aq has the highest values of log antibacterial parameters. As for the curve obtained from MISCA-70R, it is set in the positive area of Fig. 2. It has logarithmic values of parameters antibacterial higher than all other samples tested *in vitro* on the growth of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.



Fig. 1: Action of MISCA-But+ on the in vitro growth of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.

From top to bottom  
 Pure inoculum without MISCA-But+; Inoculum with 0.78 mg/ml;  
 Inoculum with 1.56 mg/ml; Inoculum with 3.13 mg/ml;  
 Inoculum with 6.25 mg/ml; Inoculum with 12.5 mg/ml.

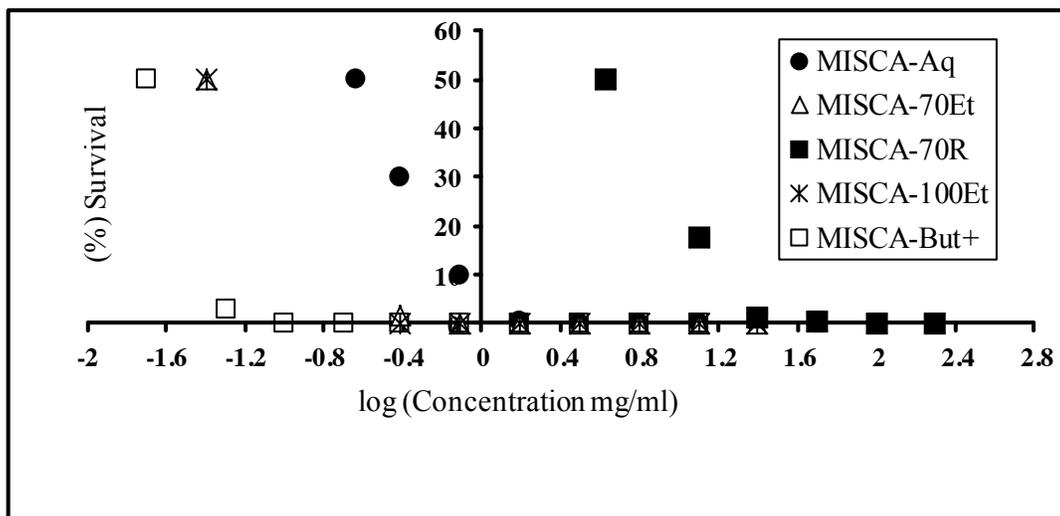


Fig. 2: Summary plot of the sensitivity of MRSA to MISCA extracts

**Table No.1: The values of the parameters of 5 antibacterial MISCA extracts**

	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
MISCA-Aq	6,25	3,13	0,23
MISCA-70Et	3,13	1,56	0,04
MISCA-100Et	3,13	0,78	0,04
MISCA-But <sup>+</sup>	0,78	0,2	0,02
MISCA-70R	100	100	4,31

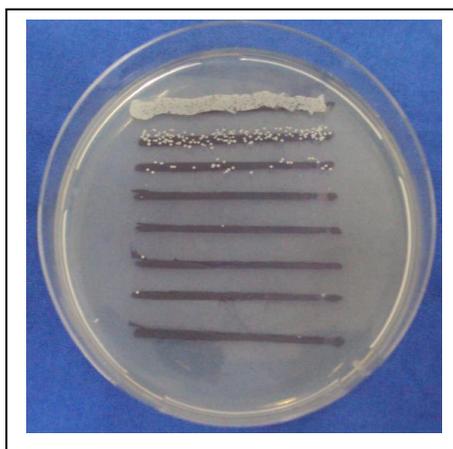


Fig. 3: Action of fusidic acid in vitro on the growth of strains of MRSA.

From top to bottom,  
 Pure inoculum without fusidic acid; Inoculum with 1.95 µg/ml;  
 Inoculum with 3.91 µg/ml; inoculum with 7.81 µg/ml;  
 Inoculum with 15.63 µg/ml; Inoculum with 31.25 µg/ml ;  
 Inoculum with 62.5 µg/ml; Inoculum with 125 µg/ml.

Values of antibacterial parameters obtained for all samples are shown in Table No.1. Antibacterial values obtained show that,  $MBC_{MISCA-But^+} < MBC_{MISCA-100Et} < MBC_{MISCA-70Et} < MBC_{MISCA-Aq} < MBC_{MISCA-70R}$ .

It is clear from this analysis that the most bactericidal extract is MISCA-But<sup>+</sup> because its MBC value (0.2 mg/ml) is the lowest. While the less bactericidal extract is MISCA-70R because of the high value of the MBC (100 mg/ml). Between MISCA-But<sup>+</sup> and MISCA-70R there are in descending bactericidal order, MISCA-100Et (0.78 mg/ml), MISCA-70Et (1.56 mg/ml) and MISCA-Aq (3.13 mg/ml). Phytochemical screening of MISCA-But<sup>+</sup> revealed the presence of polyphenols and abundant terpenes and sterols. With the fusidic acid test (standard steroid), the liquid medium was not turbid from 250 µg/ml. In agar medium, we observed the same decrease of the layers thicknesses of colonies as fusidic acid concentrations increase resulting by an appearance of isolated colonies and a total disappearance from 125 µg/ml (Fig. 3).

Inasmuch no turbidity was observed for each sample tested from MISCA-Aq (6.25 mg/ml) ; MISCA-70Et (3.13 mg/ml); MISCA-70R (100 mg/ml); MISCA-100Et (3.13 mg/ml); MISCA-But<sup>+</sup> (0.78 mg/ml); fusidic acid (0.25 mg/ml). These concentrations are therefore MICs of these substances (Marmonier, 1990). If we consider only MISCA-Aq which is the basic extract, the ratio is:

$$MBC_{MISCA-Aq}/MIC_{MISCA-Aq}=3.13/6.25=0.5 < 4.$$

Therefore, we can deduce that the action of MISCA-Aq on *in vitro* growth of MRSA has bactericidal activity. This activity improves at 2 levels:

-when we spend MISCA-Aq (basic extract) to MISCA-But<sup>+</sup> (improved extract). This proves that the bactericidal action is related to the state of purity of the extract tested.

- For any extract, there is not only a gradual reduction of the thicknesses of layers of settlements but also a decrease in the number of colonies by streaking when the concentrations increase.

This also shows that the bactericidal activity is dose-dependent. The results in Fig. 2 indicate that MRSA are much more sensitive to MISCA-But<sup>+</sup> > MISCA-100Et > MISCA-70Et > MISCA-Aq > MISCA-70R. This decreasing of sensitivity to MRSA is explained by the fact that from MISCA-But<sup>+</sup> to MISCA-70R the logarithmic values of anti-bacterial parameters become higher (Table No.1).

It appears from the analysis of these results that the most bactericidal extract is MISCA-But<sup>+</sup> because its MBC value (0.2 mg/ml) is the lowest. While the less bactericidal extract is MISCA-70R because of the high value of MBC (100 mg/ml). In addition, the ratio on the basis of MBC shows that MISCA-But<sup>+</sup> is 500 times more bactericidal than MISCA-70R; 16 times more bactericidal than MISCA-Aq; 8 times more bactericidal than MISCA-70Et; 4 times more bactericidal than MISCA-100Et. These results reveal that the extraction method which implements the total aqueous extract partition in successive combinations of solvents allows a better concentration of MISCA active compound. Because it helped lead to MISCA-But<sup>+</sup> which improves significantly the activity of the basic extract. On the other side, MISCA-70R is the least active extract. This lower performance of MISCA-70R is normal. It contains much more macromolecules (sugars, proteins and glycoproteins). These substrates generally have no inhibitory effect on the growth of strains of staphylococci. The apparent activity MISCA-70R can be explained by the presence of trace amounts of active compound left in the settling of the phases during the preparation of the extracts.

Phytochemical screening of MISCA-But<sup>+</sup> revealed that its active components are mainly sterols and polyphenols. In this extract, there is much more sterols than polyphenols.

The work done by Bisignano et al., (2000) on MISCA and reference strains (25923 and 33591) of *S. aureus* (methicillin - susceptible strains) showed that on these strains, gallic acid and 2,4,5 - trimethoxybenzoic acid are active. These compounds belong to the group of tannins. From the same plant, Okunade et al., (1999) and Gbaguidi et al., (2005) have isolated azaanthraquinone. This molecule belongs to the group of alkaloids possessing quinone structures, and antibacterial activity on bovine *Dermatophilus congolensis*. All these compounds (terpenes and sterols, alkaloids, tannins, alkaloids possessing quinone structures and polyphenols) form part of anti-bacterial molecules from medicinal plants (Cowan, 1999).

Insofar different bacterial cultures show the same decrease colonies as the concentrations of fusidic acid gradually increase and the total disappearance of colonies is visible at a concentration of 125 µg/ml of standard steroid; it is possible that this compound has a dose-dependent anti-bacterial activity on these bacterial strains.

The antibacterial activity (or anti-staphylococcal) of fusidic acid was demonstrated by Leclerc et al. (1983) and Collignon et al. (1999). They have even shown that this substance was also active on other bacteria Gram +, some bacilli Gram- and cocci Gram-.

The MIC of the butanolic extract of MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) is 0.78 mg/ml; while that of fusidic acid (standard molecule) is 7.81 µg/ml against strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Fusidic acid is about 100 times more inhibitory than MISCA-But<sup>+</sup> extract. Also the completely disappearance of MRSA colonies using the concentration of 12.5 mg/ml MISCA-But<sup>+</sup> and 125 µg/ml fusidic acid can be explained by the purity of fusidic acid (standard steroid) unlike the butanolic extract of MISCA is still a pool of active molecules (terpenes and polyphenols).

## CONCLUSIONS

This study allowed us to show methicillin-resistance of *Staphylococcus aureus* tested were sensitive to the different MISCA extracts used. All these samples have a bactericidal dose response on their *in vitro* growth. However, the most improved extract (butanol extract) has the most bactericidal activity (MBC = 0.2 mg/ml). MBC is 16 times smaller than crude aqueous (basic extract). The partition extraction of crude aqueous extract in various solvents allowed to better focus the substances responsible of the bactericidal activity. Phytochemical screening showed that bactericidal effect is related to the presence in the extract of polyphenols, and abundant terpenes and sterols. These compounds are among the many molecules with anti-bacterial action synthesized by medicinal plants. Testing a standard steroid, fusidic acid confirmed the anti-bacterial activity of terpenes and sterols on methicillin-resistance of *Staphylococcus aureus*. Indeed, it was demonstrated that compared with the pure

molecule of MISCA butanolic extract is about 100 times more active against strains of MRSA.

## REFERENCES

- Adjanohoun, E.J. and De Souza, S. (1977). Quelques plantes béninoises à propriétés thérapeutiques largement confirmées: Conseil Africain et Malgache pour Enseignement Supérieur. Deuxième Colloque du Cames; Pp.22-36.
- Aké-Assi, L., Abeye, J., Guinko, S., Giguët, R. and Bangavouvou, X. (1995). Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République centrafricaine, 4nd ed. Editions ACCT, Paris, Pp.21-69.
- Bisignano, G., Sanogo, R., Marino, A., Aquino, R., D'angelo, V., Germano, M.P., De Pasquale, R. and Pizza, C. (2000). Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract isolated and constituents. *Lett. Appl. Microb.*, 30(2):105-108.
- Bonga, G.M., Vangah-Manda, M., De Souza, C. and Guede-Guina, F. (1995). Mise en évidence des phytostéroïdes antifongiques contre *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Méd. Pharm. Afr.*, 9(1):21-30.
- Collignon, P. and Turnidge, J. (1999). Fusidic acid *in vitro* activity. *Int. J. Antimicrob. Agt.*, 12(2):45-58.
- Cowan, M.M. (1999). Plants products as antimicrobial agents. *Clin. Microb. Rev.*, 12(4):564-582.
- Dromer, F. and Dupont, B. (1996). The increasing problem of fungal infections in immunocompromised. *host. J. Mycol. Med.*, 6(1):1-6.
- Dupont, B.F., Dromer, F. and Improvisi, L. (1996). The problem of azole resistance in *Candida*. *J. Mycol. Med.*, 6(2):12-19.
- Ekpandu, T.O., Akah, P.A., Adesomoju, A.A. and Okogun, J.L. (1994). Antiinflammatory and antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* extracts. *Int. J. Pharmacog.*, 32(2):191-196.
- Garrigues, J.C., Perez, E., Linas, M.O., Rico-Lattes, Seguela, J.P. and Lattes, A. (1996). Tests *in vitro* et étude quantitative de relation structure-activité (QSAR) pour la détermination des propriétés anti-aspergillaires d'une série d'analogues de glycolipides. *J. Mycol. Méd.*, 6:111-117.
- Gbaguidi, F., Muccioli, G., Accrombessi, G., Moudachirou, M. and Quetin-Leclercq, J. (2005). Densitometric HPTLC, quantification of 2-Azaanthraquinone isolated from *Mitracarpus scaber* and antimicrobial activity against *Dermatophilus congolensis*. *J. Pl. Chromat.*, 18:377-379.
- Leclerc, H., Izard, H., Husson, M.O., Wattré, P. and Jakubczak, E. (1983). Microbiologie générale 2nd ed. Doin, Paris, Pp 69-298.
- Marmonnier, A.A. (1990). Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques: Bactériologie Médicale, techniques usuelles, Paris, Simep & Maury-Imprimeur; p227-36.
- Maynard, G., M'boup, S., Samb, A., N'diaye, B., Pousset, J.L. and Yameogo, A.M. (1982). Plantes médicinales africaines. IX: Contribution à l'étude d'une plante spontanée sénégalaise *Mitracarpus scaber* zucc. Rubiaceae. *Méd. Afri. Noire*, 29(7):519-521.

- Nassif, X., Marmonier, A.A. and Carbonelle, B. (1990). Etude de l'activité bactéricide des associations binaires d'antibiotiques: Bactériologie Médicale, techniques usuelles, Paris, Simep & Maury-Imprimeur, Pp253-60.
- Nok, A.J. (2002). Azaanthraquinone inhibits respiration and *in vitro* growth of long slender bloodstream forms of *Trypanosoma congolense*. *Cell. Biochem. Funct.*, 20(3):205-212.
- Okunade, A.L., Clark, A.M., Hufford, C.D. and Oguntimein, B.O. (1999). Azaanthraquinone an antimicrobial alkaloid from *Mitracarpus scaber*. *Pl. Med.*, 65(5):447-448.
- Vangah-Manda, M., Bonga, G.M., De Souza, C. and Guede-Guina, F. (1996). Amélioration de l'action antifongique de MISCA, un extrait végétal contre *Cryptococcus neoformans*. *Afri. Bioméd.*, 1(1):16-19.
- Zirihi, G.N., Kra, A.K.M. and Guede-Guina, F. (2003). Evaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Lamarck) O. Kuntze (Asteraceae) "pymi" sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Rev. Méd. Pharm. Afr.*, 17:11-18.

\*\*\*IJAPR\*\*\*

## ACTIVITY OF *MITRACARPUS SCABER* ON *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

OKOU Obou Constantin<sup>\*1,2</sup>, ACKAH Jacques Auguste Alfred Bognan<sup>1,2</sup>, ANGAMAN Djédoux Maxime<sup>1</sup>, DJAMAN Allico Joseph<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>UFR Agroforesterie, Filière Biochimie-Microbiologie, Université Jean Lorougnon Guédé, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire.

<sup>2</sup>UFR-Biosciences, Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, Université Félix Houphouët-Boigny Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

Article Received on  
06 March 2015,

Revised on 29 March 2015,  
Accepted on 19 April 2015

**\*Correspondence for  
Author**

**Dr. OKOU Obou  
Constantin**

UFR Agroforesterie,  
Filière Biochimie-  
Microbiologie, Université  
Jean Lorougnon Guédé,  
BP 150 Daloa, Côte  
d'Ivoire.

### ABSTRACT

In order to ascertain the antibacterial activity of *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae), we tested five different extracts (aqueous extract, ethanolic extract 70%, insoluble residue in ethanol 70%, ethanolic extract 100% and butanolic extract) obtained from this plant on the *in vitro* growth of *Enterococcus faecalis* in Mueller-Hinton broth and Mueller-Hinton naehrboden agar. The results showed that all extracts were actives. Among those, the butanolic extract showed the highest bactericidal activity, with those values: MIC = 12,5 mg/ml, MBC = 1,56 mg/ml et IC<sub>50</sub> = 0,06 mg/ml.

**KEYWORDS:** Bactericidal, extracts, *Enterococcus faecalis*, *in vitro*, *Mitracarpus scaber*.

### INTRODUCTION

The emergence of resistant bacterial strains and treatment failures observed in modern therapy to usual molecules against these strains have led our research team, to scrutinize the Ivorian floristic heritage, in order to isolate molecules to overcome this state of fact. In the search for effective new drugs against diseases, some scientific groups show an interest in medicinal plants. The African floristic heritage considered in terms of the pharmacopoeia and traditional medicine is very rich in medicinal plants whose effectiveness is recognized. Indeed, our continent is full of over 5,000 medicinal plant species.<sup>[1]</sup> Research in our different laboratories have the desire to make rational and efficient, exploitation of this heritage by

providing a scientific basis for the use of these plants. *Mitracarpus scaber* (MISCA) is one of the plants tested extensively in the evaluation of its antifungal components.<sup>[2]</sup> Clinical trials on the effectiveness of MISCA have even been made to the development of pharmaceutical creams dealing successfully superficial and cutaneous mycoses.<sup>[3,4]</sup> Studies conducted elsewhere have also confirmed its antimicrobial activity.<sup>[5,6,7,8]</sup> and even anti-parasitic.<sup>[9]</sup> Insofar, the antibacterial activity of *Mitracarpus scaber* is very little known, we initiated this study to test the action of plant extracts MISCA on the in vitro growth of *Enterococcus faecalis*. These strains are with *Staphylococci* and *Streptococci*  $\beta$  hemolytic, the most incriminated Gram + cocci in human skin pathology.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

*Mitracarpus scaber* (Rubiaceae) were collected in Abidjan (Ivory Coast) and identified by the Botany Department of Université Félix Houphouët Boigny of Cocody. Voucher specimens are preserved in the herbarium for future reference. This plant is traditionally used against skin infections.

### Preparation of extracts

As described by<sup>[10]</sup> whole *Mitracarpus scaber* plants were washed, cut and dried at room temperature. After drying, the plant organs were ground to a fine powder and 100 g were macerated for 24 h in 1 L of distilled water on a shaker-type IKA Labortechnik water. The aqueous homogenate was filtered through hydrophilic cotton and Whatman paper 3 mm. The filtrate was evaporated to dryness under reduced pressure at 70 °C with the Buchi Rotavapor to give a dark brown powder which formed the crude aqueous extract noted: MISCA-Aq. From MISCA-Aq, other fractions were prepared according to the method of.<sup>[11]</sup> 10 g of MISCA-Aq were dissolved in 200 ml ethanol : water (70/30, v/v). The supernatant and pellet were concentrated separately at 50 °C to obtain MISCA-70Et (70% ethanol extract from supernatant) and MISCA-70R (70% residual extract from pellet). Another part of MISCA-Aq was used to prepare the ethanol extract 100% (MISCA-100Et) simply by maceration 30 g MISCA-Aq in 600 ml of absolute ethanol under magnetic stirring until complete homogeneity. Then the two phases obtained after decantation were concentrated separately to obtain MISCA-100Et (supernatant) and MISCA-100R (pellet). MISCA-100Et has been used as basis for preparing further extracts. From this sample, 15 g were first defatted with hexane in soxhlet, and the aqueous fraction was subjected to partition into 600 ml ethyl

acetate : water (50/50, v/v) and then decanted. After separation, the two phases were concentrated separately at 50 °C to obtain MISCA-Ac<sup>+</sup> (from supernatant) and MISCA-Ac<sup>-</sup> (from pellet). With MISCA-Ac<sup>-</sup> 15 g were added in 600 ml butanol : water (50/50, v/v) and then decanted. Evaporation of these two fractions gave extracts MISCA-But<sup>+</sup> (supernatant) and MISCA-But<sup>-</sup> (pellet). The MISCA-Aq, MISCA-70Et, MISCA-70R, MISCA-100Et and MISCA-But<sup>+</sup> extracts were tested on *in vitro* growth of *Enterococcus faecalis*.

### Antibacterial activity

The minimum inhibitory concentration (MIC) values were evaluated by the Mueller-Hinton broth macrodilution test, as described by<sup>[12]</sup> and using the standard inoculum of  $1.10^5$ – $5.10^5$  cfu ml<sup>-1</sup>. The concentration ranges of each plant extract were prepared according to the method of double dilution with a geometric progression. The range from 200 to 0.39 mg/ml for MISCA-Aq, 25 to 0.39 mg/ml for MISCA-70Et and MISCA-100Et, 200 to 12.5 mg/ml for MISCA-70R and 12.5 to 0.05 mg/ml for MISCA-But<sup>+</sup>. The MIC is defined as the lowest concentration of drug which inhibits the visible growth after 18 h. With fusidic acid (reference antibiotic), we used concentrations ranges from 500 µg/ml to 3.91 g/ml and we used the same procedure.

To determine the minimal bactericidal concentration (MBC), each tube of the experimental series was separately diluted according to a geometric progression of ratio 10<sup>-1</sup>. Then each of the different dilutions were plated with Mueller-Hinton agar. All inoculated plates were then incubated at 37 °C for 24 h. After incubation, the enumeration of surviving bacteria per tube was done by establishing a relation between the diameter (2.1 mm) of the calibrated loop, the sampled volume (3 µl), the number of surviving bacteria on a streak data and subsequent dilutions made to obtain isolated colonies.

### Number of bacteria = Number of colonies x 1 ml / volume sampled

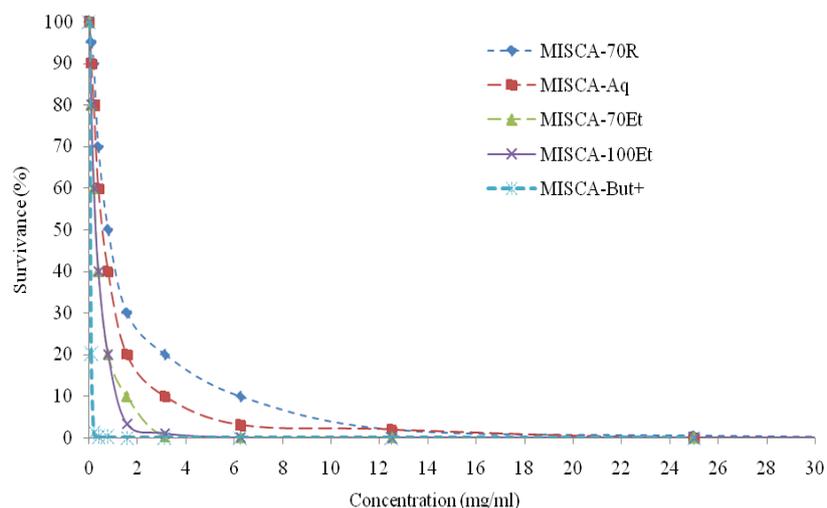
The MBC was defined as the lowest concentration that did not permit any visible microorganism colony growth on the medium after the period of incubation fixed in the present study. The tests (MIC and MCB) were repeated three times consecutively over 3 successive different experiments. The bactericidal determination was based on the principle of<sup>[13]</sup>. According to this principle, if the MBC/MIC ratio is less than or equal to 4, the test substance is bactericidal.

## RESULTS AND DISCUSSION

In liquid medium, no turbidity was observed for strains of *Enterococcus faecalis* from concentrations of.

- 50 mg/ml for MISCA-Aq,
- 25 mg/ml for MISCA-70 Et,
- 50 mg/ml for MISCA-70R,
- 25 mg/ml for MISCA-100Et,
- 12.5 mg/ml for MISCA-But<sup>+</sup>.

In solid medium, seeding inoculum growth control lamp tube inocula where turbidity was not visible and some previous inoculated the tube that was used to determine the MIC (high bacterial load) have allowed have the curves in Fig. 1 and Table I.



**Figure 1: Curves of the sensitivity of *Enterococcus faecalis* of MISCA extracts**

The results in Fig. 1 show decreasing curves until become zero on the x-axis. However, we note that the passage of the curve described by MISCA-70R to MISCA-But<sup>+</sup>, the curves resemble more of the axes of the graph. These observations mean that the curve described by MISCA-Purpose<sup>+</sup> has antibacterial parameter values lower than those of MISCA-100Et. While MISCA-100Et has relatively lower values than those of MISCA-70° and. As described by MISCA-70° and has smaller values of parameters than MISCA-Aq. Finally, the curve described by MISCA-Aq has smaller values of parameters as described by MISCA-70R.

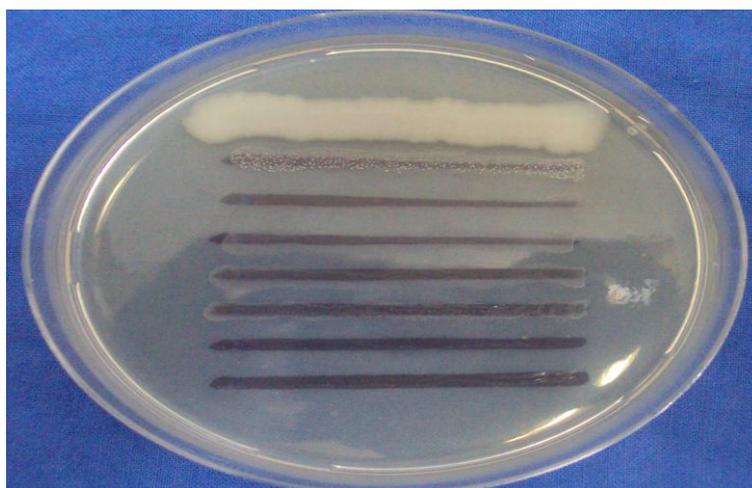
**Table (1). Antibacterial parameters values of MISCA extracts.**

	<b>CMI (mg/ml)</b>	<b>CMB (mg/ml)</b>	<b>CI<sub>50</sub> (mg/ml)</b>
MISCA-Aq	50	50	1,72
MISCA-70Et	25	12,5	0,55
MISCA-100Et	25	6,25	0,49
<b>MISCA-But<sup>+</sup></b>	<b>12,5</b>	<b>1,56</b>	<b>0,06</b>
MISCA-70R	50	100	3,28

The comparison between these values of MBC (Minimum Bactericidal Concentration) of the different MISCA extracts tested on *Enterococcus faecalis* strains of table I shows that:

$$\text{MBC}_{\text{MISCA-But}^+} < \text{MBC}_{\text{MISCA-100Et}} < \text{MBC}_{\text{MISCA-70Et}} < \text{MBC}_{\text{MISCA-Aq}} < \text{MBC}_{\text{MISCA-70R}}$$

The results of this analysis confirms that the most bactericidal extract is MISCA-But<sup>+</sup> because its MBC (1.56 mg/ml) is the lowest. While MISCA-70R is the lowest of all bactericidal because of the high value of the MBC (100 mg/ml). However, in addition to MISCA-But<sup>+</sup> and MISCA-70R, it was obtained MISCA-100Et, MISCA-70 Et and MISCA-Aq extracts that are bactericidal in the following descending order : MISCA-100Et (6.25 mg/ml) , MISCA-70 Et (12.5 mg/ml) and MISCA-Aq (50 mg/ml). The phytochemical sort MISCA-But<sup>+</sup> showed the presence of polyphenols and abundant terpenes and sterols. However, the use of fusidic acid (steroid standard) revealed that the liquid medium was not turbid from the concentration 250 µg/ml. In solid medium, we noted that the isolated colonies appear at the concentration 7.81 µg/ml.



**Figure 2: Action of fusidic acid in vitro on the growth of *Enterococcus faecalis*. From top to bottom, Pure inoculum without fusidic acid; inoculum with 7.81 µg/ml; inoculum with 15.63 µg/ml; inoculum with 31.25 µg/ml; inoculum with 62.5 µg/ml; inoculum with 125 µg/ml ; inoculum with 250 µg/ml; inoculum with 500 µg/ml.**

## DISCUSSION

Inasmuch no turbidity was observed for each sample tested from MISCA-Aq (50 mg/ml); MISCA-70Et (25 mg/ml); MISCA-70R (50 mg/ml); MISCA-100Et (25 mg/ml); MISCA-But<sup>+</sup> (12.5 mg/ml); fusidic acid (0.25 mg/ml).

These concentrations are therefore MICs of these substances.<sup>[13]</sup> If we consider only MISCA-Aq which is the basic extract, antibacterial parameter values (MIC) and (MBC) are identical (50 mg/ml). The ratio  $MBC_{MISCA-Aq}/MIC_{MISCA-Aq}=50/50=1<4$ . Therefore, we can deduce that the action of MISCA-Aq on *in vitro* growth of *Enterococcus faecalis* has bactericidal activity. It improves when we pass from MISCA-Aq to MISCA-But<sup>+</sup>. This proves that the bactericidal action is related to the state of purity of the extract tested. The results in Fig. 1 indicate that *Enterococcus faecalis* are much more sensitive to MISCA-But<sup>+</sup> > MISCA-100Et > MISCA-70Et > MISCA-Aq > MISCA-70R. It appears from the analysis of these results that the most bactericidal extract is MISCA-But<sup>+</sup> because its MBC value (1,56 mg/ml) is the lowest. While the less bactericidal extract is MISCA-70R because of the high value of MBC (100 mg/ml). MISCA-70Et (12.5 mg/ml) and MISCA-100Et (6.25 mg/ml) have average bactericidal actions on the *in vitro* growth of *Enterococcus faecalis*.

We can compare the bactericidal potential of extracts by dividing the MBC value of each one by the most bactericidal (MISCA-But<sup>+</sup>, 1.56 mg/ml). In addition, the ratio on the basis of MBC shows that MISCA-But<sup>+</sup> is 4 times more bactericidal than MISCA-100Et; 8 times more bactericidal than MISCA-70Et; 32 times more bactericidal than MISCA-Aq; 64 times more bactericidal than MISCA-70R. These results reveal that the extraction method which implements the total aqueous extract partition in successive combinations of solvents allows a better concentration of MISCA active compound. Because it helped lead to MISCA-But<sup>+</sup> which improves significantly the activity of the basic extract. On the other side, MISCA-70R is the least active extract. This lower performance of MISCA-70R is normal. It contains much more macromolecules (sugars, proteins and glycoproteins). These substrates generally have no inhibitory effect on the growth of strains of *Enterococcus faecalis*. The apparent activity MISCA-70R can be explained by the presence of trace amounts of active compound left in the settling of the phases during the preparation of the extracts. Phytochemical screening of MISCA-But<sup>+</sup> revealed that its active components are mainly sterols and polyphenols. In this extract, there is much more sterols than polyphenols. Studies performed by<sup>[6,7,14]</sup> revealed that MISCA also contained alkaloids possessing quinone structure and

tannins. All these results show that MISCA have abundant active substances which are expressed by the method and the extraction solvent used. Indeed, the work of<sup>[15]</sup> revealed that generally, the use of a specific solvent for the extraction of active compounds from a medicinal plant put more in evidence specific active substances.

Insofar different bacterial cultures show the same decrease colonies as the concentrations of fusidic acid gradually increase and the total disappearance of colonies is visible at a concentration of 250 µg/ml of standard steroid; it is possible that this compound has a dose-dependent anti-bacterial activity on these bacterial strains. The antibacterial activity of fusidic acid was demonstrated by.<sup>[16,17]</sup> They have even shown that this substance was also active on other bacteria Gram<sup>+</sup> like *Enterococcus faecalis*.

The MIC of the butanolic extract of MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) is 12.5 mg/ml; while that of fusidic acid (standard molecule) is 250 µg/ml against strains of *Enterococcus faecalis*. Fusidic acid is about 50 times more inhibitory than MISCA-But<sup>+</sup> extract. Also the completely disappearance of *Enterococcus faecalis* colonies using the concentration of 12.5 mg/ml MISCA-But<sup>+</sup> and 250 µg/ml fusidic acid can be explained by the purity of fusidic acid (standard steroid) unlike the butanolic extract of MISCA is still a pool of active molecules (terpenes and polyphenols).

## CONCLUSION

This study allowed us to show *Enterococcus faecalis* tested were sensitive to the different MISCA extracts used. All these samples have a bactericidal dose response on their *in vitro* growth. However, the most improved extract (butanol extract) has the most bactericidal activity (MBC = 1,56 mg/ml). MBC is 32 times smaller than crude aqueous (basic extract). The partition extraction of crude aqueous extract in various solvents allowed to better focus the substances responsible of the bactericidal activity. Phytochemical screening showed that bactericidal effect is related to the presence in the extract of polyphenols, and abundant terpenes and sterols. These compounds are among the many molecules with anti-bacterial action synthesized by medicinal plants. Testing a standard steroid, fusidic acid confirmed the anti-bacterial activity of terpenes and sterols on *Enterococcus faecalis aureus*. Indeed, it was demonstrated that compared with the pure molecule of MISCA butanolic extract is about 50 times more active against strains of *Enterococcus faecalis*.

## REFERENCES

1. Adjanohoun EJ, Aké-Assi L. Contribution au recensement des plantes médicinales en Côte d'Ivoire, Volume1, Abidjan; Centre National de floristique de l'Université de Côte d'Ivoire., 1979.
2. Mobié DP, Vangah-Manda M, Bonga GM, De Souza C, Guédé-Guina F. Action antifongique d'une huile végétale sur *Trichophyton rubrum*. J Afri Biomed, 1998; 3(1): 5-8.
3. Guédé-Guina F, Vangah-Manda M, Bonga GM, De Souza C. Activité antimicrobienne d'un extrait végétal contre les germes opportunistes au cours du SIDA. Rev Med Pharm Afri, 1995; 9(1): 13-19.
4. Bonga GM, Vangah-Manda M, De Souza C, Guédé-Guina F. Mise en évidence des phytostéroïdes antifongiques contre *Cryptococcus neoformans*. Rev Med Pharm Afri, 1995; 9(1): 21-30.
5. Ekpendu TO, Akah PA, Adesomoju AA, OKOGUN JL. Antiinflammatory and antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* extracts. Int J Pharmacog, 1994; 32(2): 191-196.
6. Okunade AL, Clark AM, Hufford CD, Oguntimein BO. Azaanthraquinone: An antimicrobial alkaloid from *Mitracarpus scaber*. Planta medica, 1999; 65(5): 447-448.
7. Bisignano G, Sanogo R, Marino A, Aquino R, D'angelo V, Germano MP, De Pasquale R, Pizza C. (2000). Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract isolated constituents. Lett Appl Microbiol, 2000; 30(2): 105-108.
8. Ali-Emmanuel N, Moudachirou M, Akakpo JA, Quetin-Leclercq J. Treatment of bovine dermatophilosis with *Senna alata*, *Lantana camara* and *Mitracarpus scaber* leaf extracts. J Ethnopharmacol, 2003; 86(2-3): 167-171.
9. Nok AJ. Azaanthraquinone inhibits respiration and *in vitro* growth of long slender bloodstream forms of *Trypanosoma congolense*. Cell Biochem Funct, 2002; 20(3): 205-212.
10. Okou OB, Angaman DM, Ackah JAB, Djaman AJ. Evaluation of *Mitracarpus Scaber* (Rubiaceae) extracts activity on Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. IJAPR, 2014; 1(6): 24-29.
11. Zirihi GN, Kra AKM, Guédé-Guina F. Evaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Lamarck) O. Kuntze (Asteraceae) "pymi" sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. Rev. Méd Pharm Afri, 2003; 17: 11-18.

12. Nassif X, Marmonier AA, Carbonelle B. Etude de l'activité bactéricide des associations binaires d'antibiotiques. In: Bactériologie Médicale, techniques usuelles. Paris: Simep s.a. & Maury-Imprimeur s.a., 1990 ; 253-260.
13. Marmonier AA. Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. In: Bactériologie Médicale, techniques usuelles. Paris: Simep s.a. & Maury-Imprimeur s.a., 1990; 227-236.
14. Gbaguidi F, Muccioli G, Accrombessi G, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J. Densitometric HPTLC, quantification of 2-Azaanthraquinone isolated from *Mitracarpus scaber* and antimicrobial activity against *Dermatophilus congolensis*. JPC., 2005; 18: 377-379.
15. Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev., 1999; 12(4): 564-582.
16. Leclerc H, Izard H, Husson MO, Watre P, Jakubczak E. (1983). Antibiotiques: Classification – Mode d'action. In: Microbiologie générale, Paris., 1983; 69-298.
17. Collignon P, Turnidge J. (1999). Fusidic acid in vitro activity. Int. J. Antimicrob. Agents, 1999; 12(2): 45-58.

# RESUME

L'objectif de cette étude a été d'établir les bases scientifiques de l'action anti-bactérienne de *Mitracarpus scaber* Zucc. ex Schult + Scult.f. (Rubiaceae), une plante médicinale utilisée en médecine traditionnelle contre les infections cutanées. Les extraits (extrait total aqueux, extrait éthanolique 70%, résidu insoluble dans l'éthanol 70%, extrait éthanolique 100% et extrait butanolique) obtenus à partir de cette plante codifiée MISCA ont été testés sur la croissance *in vitro* des souches de staphylocoques méticillino-résistantes, de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques et d'*Enterococcus faecalis*. Les tests de survivance des divers germes en présence des différentes concentrations des extraits de MISCA ont été effectués à la fois en milieu liquide et sur milieu solide.

Les résultats révèlent que les souches de staphylocoques méticillino-résistantes, de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques et d'*Enterococcus faecalis* sont sensibles à tous les extraits de MISCA utilisés selon une relation dose-réponse. Cependant, seul l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) (extrait le plus amélioré) a la meilleure activité bactéricide sur la croissance *in vitro* des différentes souches bactériennes utilisées à cause de la présence dans cet extrait, d'abondants terpènes et stéroïdes et de la présence de polyphénols. En effet, l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) a donné les valeurs de paramètres anti-bactériens suivants:

- ✓ CMI = 0,78 mg/ml, CMB = 0,2 mg/ml et CI<sub>50</sub> = 0,02 mg/ml, pour les souches de staphylocoques méticillino-résistantes,
- ✓ CMI = 3,13 mg/ml, CMB = 0,39 mg/ml et CI<sub>50</sub> = 0,02 mg/ml, pour les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques,
- ✓ CMI = 12,5 mg/ml, CMB = 1,56 mg/ml et CI<sub>50</sub> = 0,06 mg/ml, pour les souches d'*Enterococcus faecalis*.

Le test d'un stéroïde standard, l'acide fusidique sur ces souches bactériennes a confirmé la probable activité des terpènes et stéroïdes sur celles-ci.

Cependant, l'action comparée de l'activité de l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) avec celle de l'extrait total aqueux de MISCA (MISCA-Aq) (extrait de base) a montré que cet extrait était 32 fois plus actif sur les souches d'*Enterococcus faecalis* et 16 fois plus actif sur les souches de staphylocoques méticillino-résistantes et de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques. Aussi, la comparaison de l'action de l'extrait butanolique de MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) sur les différentes souches bactériennes a permis de constater que les souches de staphylocoques méticillino-résistantes sont plus sensibles à cet extrait que celles de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques. Alors que les souches de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques sont plus sensibles à l'extrait que celles d'*Enterococcus faecalis*.

**Mots clés** : bactéricide, extraits végétaux, *Enterococcus faecalis*, *in vitro*, *Mitracarpus scaber* (MISCA), staphylocoques, streptocoques  $\beta$  hémolytiques.

# ABSTRACT

The objective of this study was to establish the scientific basis for the anti-bacterial action of *Mitracarpus scaber* Zucc. ex Schult + Scult.f. (Rubiaceae), a medicinal plant used in traditional medicine against skin infections. The extracts (total aqueous extract, ethanolic extract 70%, ethanolic residue 70%, ethanolic extract 100% and butanolic extract 100%) obtained from this codified plant MISCA were tested on the *in vitro* growth of strains of methicillin-resistant staphylococci,  $\beta$ -hemolytic streptococci and *Enterococcus faecalis*. Survival tests of the various germs in the presence of the different concentrations of MISCA extracts were performed in both liquid and solid media.

The results reveal that the strains of methicillin-resistant staphylococci,  $\beta$ -hemolytic streptococci and *Enterococcus faecalis* are sensitive to all MISCA extracts used in a dose-response relationship. However, only butanolic extract of MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) (the most improved extract) has the best bactericidal activity on the *in vitro* growth of the different bacterial strains used because of the presence of abundant terpenes and sterols and the presence of polyphenols in this extract. Indeed, the butanolic extract of MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) gave the following antibacterial parameter values:

- ✓ MIC = 0.78 mg/ml, MBC = 0.2 mg/ml and IC<sub>50</sub> = 0.02 mg/ml, for methicillin-resistant staphylococci strains,
- ✓ MIC = 3.13 mg/ml, MBC = 0.39 mg/ml and CI<sub>50</sub> = 0.02 mg/ml, for  $\beta$ -hemolytic streptococci strains,
- ✓ MIC = 12.5 mg/ml, MBC = 1.56 mg/ml and CI<sub>50</sub> = 0.06 mg/ml, for *Enterococcus faecalis* strains.

The test of a standard steroid, fusidic acid on these bacterial strains confirmed the probable activity of terpenes and sterols on them.

However, the comparative action of the activity of butanolic extract of MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) with that total aqueous extract of MISCA (MISCA-Aq) (base extract) showed that this extract was 32 times more active on *Enterococcus faecalis* strains and 16 times more active on methicillin-resistant staphylococci and  $\beta$ -hemolytic streptococci strains. Also, a comparison the action butanolic extract of MISCA (MISCA-But<sup>+</sup>) on the different bacterial strains showed that methicillin-resistant staphylococci strains are more sensitive to this extract than those of  $\beta$ -hemolytic streptococci. While  $\beta$ -hemolytic streptococci strains are more sensitive to the extract than those of *Enterococcus faecalis*.

**Keywords:** bactericidal, plant extracts, *Enterococcus faecalis*, *in vitro*, *Mitracarpus scaber* (MISCA), staphylococci,  $\beta$  hemolytic streptococci.