



Original Paper

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Evaluation *in vitro* de l'activité des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* (DC) Guill. et Perr. (Combretaceae) sur des bactéries responsables de maladies courantes en Afrique et criblage phytochimique

Y. SANOGO^{1,2,3*}, N.K. GUESSENND², H.F. TRA BI¹, N.J. KOUADIO^{1,2,3},
F.K. KONAN², M. BAMBA^{1,2,3}, N. DANHO¹, A. BAKAYOKO^{1,3}, K. YAO³ et
M. DOSSO²

¹Université Nangui Abrogoua (UNA) UFR des Sciences de la Nature. Laboratoire de Plantes Médicinales et Pharmacologie. Abidjan, Côte d'Ivoire.

²Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Institut Pasteur, Côte d'Ivoire.

³Centre Suisse de Recherche Scientifique, Laboratoire de Phytochimie, Côte d'Ivoire.

*Auteur correspondant ; E-mail : sonogoyac01@yahoo.fr; Tel : (225) 08687153

RESUME

Les bactéries sont à l'origine de réel problème de santé publique à cause de leur implication dans de nombreuses maladies. Leur résistance aux antibiotiques est devenue l'un des problèmes les plus importants dans la lutte contre les maladies infectieuses dans le monde. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits hexanique, méthanolique 70% (v/v) et aqueux des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* (DC) Guill. et Perr. (Combretaceae), une plante médicinale de la flore ivoirienne, contre les bactéries des genres *Staphylococcus*, *Pseudomonas* et les entérobactéries (*Shigella* sp., *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*) par la méthode de diffusion en milieu gélosé dans des cupules et la méthode de macro-dilution en milieu liquide. Les extraits aqueux et méthanolique 70% (v/v) ont été retenus pour la détermination des paramètres antibactériens (CMI et CMB), en raison de leurs activités sur l'ensemble des bactéries sélectionnées. Par ailleurs, une analyse qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM), effectuée sur les différents extraits, a permis de détecter plusieurs groupes de composés chimiques parmi lesquels les saponosides, les tanins, les flavonoïdes, les polyphénols, les alcaloïdes et les sesquiterpènes dont des effets antibactériens sont connus. Les CMI obtenues, sont comprises entre $0,7 \pm 0,0$ et $12,5 \pm 0,0$ mg/ml. Quant aux CMB, elles varient de $3,1 \pm 0,0$ à $25,0 \pm 0,0$ mg/ml. Ce travail justifie l'utilisation traditionnelle de *Anogeissus leiocarpus* dans le traitement de diverses pathologies et plus particulièrement celles d'origine bactérienne.

© 2016 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : Antibactérienne, *Anogeissus leiocarpus*, flore ivoirienne, analyse qualitative.

***In vitro* evaluation of the activity of *Anogeissus leiocarpus* (DC) Guill. and Perr. (Combretaceae) stem bark on bacteria responsible for common diseases in Africa and phytochemical screening**

ABSTRACT

The bacteria are causing real public health problem because of their involvement in many diseases. Antibiotic resistance has become one of the most important issues in the fight against infectious diseases worldwide. The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of extracts hexane, methanol 70% (v/v) aqueous *Anogeissus leiocarpus* (DC) Guill. and Perr. (Combretaceae) stem bark, a medicinal plant from the Ivorian flora against bacteria of the genus *Staphylococcus*, *Pseudomonas* and Enterobacteriaceae (*Shigella* spp., *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*) by the middle diffusion method agar in the wells and method in liquid medium macro-dilution. The aqueous extracts methanol and 70% (v/v) were used to determine antibacterial settings (MIC and MBC), because of their activities on all of the selected bacteria. Moreover, a qualitative analysis by thin layer chromatography (TLC) carried out on the different extracts was detected more chemical compounds of groups including saponins, tannins, flavonoids, polyphenols, alkaloids and sesquiterpenes including antibacterial effects are known. The MICs obtained are between 0.7 ± 0.0 and 12.5 ± 0.0 mg/ml. As for the WCD, they range from 3.1 ± 0.0 to 25.0 ± 0.0 mg/ml. This work justifies the traditional use of *Anogeissus leiocarpus* in the treatment of various diseases especially those of bacterial origin.

© 2016 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: Antibacterial, *Anogeissus leiocarpus*, Ivorian flora, qualitative analysis.

INTRODUCTION

Dans de nombreux pays africains, l'avènement de la médecine moderne et ses progrès dans le traitement des affections bactériennes ont conduit les populations à se détourner, quelque peu, de la médecine traditionnelle. En effet, l'apparition des antibiotiques a constitué une véritable consolation pour l'humanité puisqu'ils ont contribué à réduire considérablement la propagation de ces pathologies. Cependant, plusieurs antibiotiques conventionnels rencontrent, de plus en plus, des résistances vis-à-vis des bactéries (Ben et al., 2007). C'est le cas des entérobactéries productrices des béta-lactamases à spectre élargi qui ne sont sensibles qu'à un nombre très limité d'antibiotiques comme l'imipénème et l'amikacine (Paterson et Bonomo, 2005). En Côte d'Ivoire, de nombreux cas de bactéries multi résistantes, ont été rapportés (Benbachir et al., 2001 ; Akoua et al., 2004 ; Guessennd et al., 2009). Ces résistances bactériennes dues à l'utilisation continue voire incontrôlée des antibiotiques, ont contribué à faire des pathologies liées aux microbes la première cause de mortalité au monde, tuant plus de 50.000 personnes par jour (Iqbal et Anna, 2001). Les bactéries sont responsables de 70% de ces décès (Gangoue, 2007). Pour pallier à

cette situation qui vient s'ajouter aux coûts élevés des médicaments modernes, beaucoup d'espoirs restent placés dans les secrets des plantes médicinales, et l'émergence d'une médecine alternative basée sur ces plantes est plus que jamais à l'ordre du jour. Cela justifierait ces dernières décennies, le regain d'intérêt des populations africaines pour l'usage de ces plantes (Koné et al., 2010). En effet, selon les estimations de l'OMS (2002), plus de 80% de la population en Afrique, utilisent encore la médecine traditionnelle pour répondre à leurs besoins de soins de santé. L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites (Waridel, 2003). Cette source semble inépuisable puisque chaque espèce sur les 400.000 connues, peut contenir plusieurs milliers de constituants différents dont les divers usages ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (Nostro et al., 2000 ; Tra Bi et al., 2008). Dans ce cadre, certains chercheurs ont réalisé des tests antimicrobiens avec bons nombres de ces plantes (Zihiri et al., 2003 ; Olakunle et al., 2005 Tra Bi, 2008 ; Konan, 2013). Afin de contribuer à développer davantage ce domaine

de la pharmacopée ivoirienne, nous avons choisi d'évaluer l'activité antibactérienne des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* (DC) Guill. et Perr. (Combretaceae) sur des bactéries (entérobactéries, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*) de phénotypes sensible et résistant, responsables de maladies courantes en Afrique telles que la fièvre typhoïde, les méningites, les diarrhées, les infections urinaires, les fièvres, les sinusites, les otites, ... et à réaliser un criblage phytochimique.

MATERIEL ET METHODES

Préparation des extraits bruts

Les échantillons récoltés en saison sèche dans les savanes du nord de la Côte d'Ivoire ont subi plusieurs extractions. Ces extractions ont été réalisées avec trois solvants de polarité croissante (hexane, méthanol 70% (v/v) et eau distillée) selon la méthode décrite par Zihiri et al. (2003). Pour ce faire, 125 g de poudre de végétal ont été macérés dans 1 litre d'hexane pendant 24 heures. Les filtrats obtenus ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40 °C puis séchés sous la hotte pour obtenir les extraits hexaniques. Le résidu a été séché sur du papier buvard et pesé puis introduit dans 1 litre de méthanol 70% (v/v). Après 24 heures de macération, le filtrat est évaporé au rotavapor pour éliminer l'alcool et le résidu aqueux est lyophilisé pour donner l'extrait méthanolique 70% (v/v). Quant à l'extrait aqueux, il a été obtenu par macération de 125 g de poudre végétale dans 1 litre d'eau distillée pendant 24 heures et lyophilisation du filtrat. Ces extraits ont été conservés au réfrigérateur.

Les souches bactériennes

Le matériel bactérien provient de la banque de souches bactériennes de l'Unité des Antibiotiques, des Substances Naturelles et de la Surveillance des Microorganismes aux Anti-infectieux (ASSURMI) du Département de Bactériologie et virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et des CHU (Centres Hospitaliers Universitaires) de Cocody et de Yopougon (Abidjan). Il est composé de 15

isolats bactériens dont trois souches de référence (*E. coli* ATCC 25922 ; *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *S. aureus* ATCC 25923) permettant le contrôle de qualité et 12 isolats cliniques repartis selon les phénotypes résistant (*E. coli* 1218Y/12 ; *P. aeruginosa* 261Y/12 ; *S. aureus* 926C/12 ; *P. mirabilis* 1048Y/12) et sensible (*E. coli* 1161Y/12 ; *S. Typhimurium* 1176Y/12, 1938Y/10 ; *P. mirabilis* 779C/12 ; *Shigella* sp. 915C/12, 1177Y/12 ; *P. aeruginosa* 872C/12 ; *S. aureus* 1227C/12).

Etude antibactérienne

Préparation d'inoculum pour les tests en milieu solide

L'inoculum a été préparé à partir d'une colonie jeune de 24 heures. Elles ont été émulsionnées dans 2 ml de suspension NaCl 85%. Ensuite, la densité optique a été ajustée à 0,5 MC Farland à l'aide d'un densimat. Le volume prélevé est de 100 µl pour les entérobactéries, 1000 µl pour les *S. aureus* et 10 µl pour les *P. aeruginosa*. Cette suspension a été délayée dans 10 ml d'eau physiologique (NaCl 0,9%), constituant ainsi l'inoculum bactérien estimé à 10⁶ bactéries/ml.

Tests de sensibilité des germes aux extraits

Avant d'évaluer toute activité, les extraits ont subi un test de stérilité visant à vérifier la contamination ou non des extraits par un germe.

L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé dans des cupules (puits) et la méthode de macro-dilution en milieu liquide ont été utilisés pour réaliser les tests (Dosso et Faye-Kette, 2000 ; Koné et al., 2004). Une solution de concentration 50 mg/ml d'extrait a été préparée. Des boîtes de Pétri contenant de la gélose Muller-Hinton ont été ensemencées par écouvillonnage avec l'inoculum préparé. Ensuite, des cupules ont été creusées en enfonçant le gros bout d'une pipette Pasteur dans la gélose et remplies avec 50 µl de la solution d'extraits préparés. L'ensemble a été incubé à 37 °C pendant 24 heures. Après ce délai, le diamètre d'inhibition autour de chaque cupule a été mesuré à l'aide d'un pied

à coulisse. L'appréciation de l'efficacité des extraits a été faite selon le critère de Poncé et al. (2003). Ainsi, une substance est dite inefficace si le diamètre d'inhibition est inférieur à 8 mm alors qu'elle est dite efficace si le diamètre est compris entre 9 et 14 mm. Par contre, elle est jugée très efficace lorsque le diamètre est compris entre 15 et 19 mm puis extrêmement efficace si le diamètre est supérieur à 20 mm. Ce test a permis la sélection des extraits les plus actifs pour la détermination des paramètres antibactériens.

Préparation de l'inoculum pour les tests en milieu liquide

Deux colonies bactériennes de 24 heures ont été prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur et émulsionnées dans un tube à essai contenant 10 ml de bouillon Muller-Hinton stérile. Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 3 heures. Après cette incubation, une suspension de 0,3 ml de cette pré-culture a été prélevée et diluée dans 10 ml de bouillon Muller-Hinton stérile puis homogénéisée.

Préparation de la gamme de concentration

La gamme de concentration a été obtenue par la méthode de la double dilution. Pour ce faire, une solution de concentration de 50 mg/ml des extraits retenus a été préparée. Une série de dilutions de raison 2, a été effectuée à partir de cette solution afin d'obtenir des gammes de concentrations allant de 50 à 0,78 mg/ml.

Détermination des paramètres antibactériens

La détermination des paramètres antibactériens a été réalisée par la dilution en milieu liquide selon la méthode utilisée par Kouadio et al. (2015). Ainsi, dans 10 tubes à hémolyse expérimentaux, 1 ml de chaque gamme de concentration d'extrait de plante, a été mis en contact avec 1 ml d'inoculum bactérien. Le tube témoin de croissance a reçu 1 ml d'eau distillée stérile en plus de l'inoculum alors que le témoin de stérilité n'a reçu que 2 ml du bouillon Muller-Hinton (BMH) stérile. Les tubes ont été incubés pendant 24 heures à 37 °C. Après ce temps d'incubation, une observation à l'œil nu a été effectuée et la plus faible concentration pour laquelle aucune croissance bactérienne n'a été

observée à l'œil nu correspond à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). Quant à la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), elle permet d'obtenir, après 24 heures d'incubation à 37 °C, 0,01% de bactéries viables. Sa détermination a commencé par la numération. Celle-ci a consisté à diluer l'inoculum de départ de 10^{-1} à 10^{-4} et à ensemencer ces différentes dilutions à l'aide d'une anse calibrée de 2 µl en stries de 5 cm de long, sur une Gélose Muller-Hinton puis incubé pendant 24 heures. Ces boîtes de Pétri ont été nommées A. Après la lecture des CMI, le contenu des tubes dans lesquels il n'y a pas eu de croissance visible a servi à ensemencer la GMH sur des stries de 5 cm. Cette série de boîtes de Pétri est nommée B. La CMB a été déterminée en comparant la croissance bactérienne des boîtes A et B (Figure 1). Ainsi, la plus petite concentration du tube qui a moins de 0,01% de bactéries viables par rapport à l'inoculum initial est la CMB.

Le rapport CMB/CMI a permis de préciser la modalité d'action de la substance (Fauchere, 2002). Selon Kamanzi (2002), l'extrait est bactéricide quand sa CMB est égale à sa CMI ou si le rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 4. Il est dit bactériostatique quand sa CMB est supérieure à sa CMI ou si le rapport CMB/CMI est plus élevé que 4. Lorsque ce rapport est égal à 32, la souche est dite tolérante.

Criblage phytochimique

La mise en évidence des différents composés chimiques dans les extraits s'est faite par chromatographie sur couche mince (CCM) selon la méthode utilisée par Kouadio et al. (2013). Cette méthode permet la mise en évidence de plusieurs groupes de métabolites secondaires par des colorations spécifiques, soit dans le visible ou à une longueur d'onde donnée (Koné, 2005 ; N'gaman et al., 2009). 10 milligrammes d'extraits ont été dissouts dans 1 ml de méthanol absolu pour obtenir une solution d'une concentration de 10 mg/ml. Dix microlitres (10 µl), soit 100 µg de cette solution ont été déposés en spot sur une

plaque de silicagel F₂₅₄ (phase stationnaire) à l'aide de tube microcapillaire. Les chromatogrammes ont été développés dans des cuves préalablement saturées d'éluant ou phase mobile CHCl₃-MeOH-H₂O (65 : 35 : 5 v/v/v), puis séchées. Ces plaques ont été observées avant et après révélation soit dans le visible ou sous une lampe UV, les rapports frontaux (Rf) des différentes taches observées sont calculés selon la formule suivante :

Mise en évidence des terpénoïdes et saponosides

Ces composés sont mis en évidence avec le réactif de Godin. Après pulvérisation de la plaque au réactif de Godin suivi du chauffage à 100 °C pendant 10 min, on note l'apparition des diverses colorations. Dans le visible, l'observation des tâches violettes, rouge indique la présence des monoterpènes et les saponines en bleue (Lhuillier, 2007).

Mise en évidence des Alcaloïdes

Après pulvérisation au réactif de Dragendorff et chauffage du chromatogramme à 100 °C pendant 10 min, les alcaloïdes apparaissent sous forme de taches orangées dans le visible.

Mise en évidence des Polyphénols

Après pulvérisation du chromatogramme par le réactif de Folin-Ciocalteu 10%, puis chauffage à 100 °C pendant 10 min, les taches bleues observées dans le visible attestent la présence des polyphénols (Mallikharjuna et al., 2007).

Mise en évidence des Flavonoïdes et lactones sesquiterpéniques

Après pulvérisation du chromatogramme avec du chlorure d'aluminium (AlCl₃) à 5% (m/v) et chauffage, la présence de flavonoïdes est indiquée par les taches jaunes (Figure 2) observables dans le visible ou sous UV à 366 nm (Chaaib kouri, 2004 ; Lhuillier, 2007). Quant aux lactones sesquiterpéniques, elles sont indiquées par des fluorescences de diverses couleurs à 366 nm (Lagnika, 2005 ; Lhuillier, 2007).

Mise en évidence des Coumarines

L'acétate de plomb basique (CH₃COO)₂Pb à 5% (m/v) a été utilisé pour la pulvérisation du chromatogramme. Les spots

de fluorescences vertes et bleues sous UV à 366 nm indiquent la présence des coumarines.

Mise en évidence des Tanins

L'apparition de taches de diverses couleurs (bleues, vertes, noires), observables dans le visible, après pulvérisation du chromatogramme par une solution de FeCl₃ à 10%, montre la présence de tanins.

Mise en évidence des Anthraquinones et anthrones

Une solution éthanolique de KOH 5% a été giclée sur le chromatogramme. Les taches rouges observables dans le visible et à 366 nm, confirme la présence des anthraquinones. Les anthrones, par contre, sont visibles à 366 nm sous forme de taches jaunes (Dohou et al., 2003). Après chauffage de la plaque, les terpènes sont indiqués en violet et les saponines en bleu.

Analyses statistiques des résultats

L'analyse des variances (ANOVA à une voie) suivi du test de Tukey, ont été utilisés, afin de comparer d'une part, les variations des CMI entre elles ainsi que les CMB entre elles, et d'autre part, vérifier si l'activité des extraits des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* a été statistiquement influencée par les phénotypes (sensible et résistant) des bactéries. Les résultats obtenus, ont été exprimés sous forme de moyennes ± Ecart-type. Les valeurs de probabilité P < 0,05 ont été considérées statistiquement significatives. Le logiciel R (R Core Team, 2013) a été utilisé pour la réalisation de ces tests statistiques.

RESULTATS

Activité antibactérienne

Les extraits hydro-méthanoliques et aqueux ont été les plus actifs sur toutes les souches étudiées avec des diamètres d'inhibition compris entre 9,6 ± 0,0 et 23,4 ± 1,0 mm pour les extraits au méthanol 70% et entre 7, 9 ± 0,0 et 25,3 ± 0,3 mm pour les extraits aqueux (Tableaux 1, 2, 3). Les plus grands diamètres de zone d'inhibition sont observés sur *Proteus mirabilis* 779C/12 (25,3 ± 0,3 mm) pour l'extrait aqueux et *Shigella*

sp. 1177Y/12 ($23,4 \pm 1,0$ mm) pour l'extrait méthanolique 70%. Ces deux souches sont de phénotype sensible. Par contre, l'extrait hexanique n'a montré aucune activité sur les différentes souches bactériennes. Ainsi, cet extrait n'a pas été retenu pour la détermination des paramètres antibactériens.

L'extrait au méthanol 70% a présenté des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 1,5 et 12,5 mg/ml, alors que celles de l'extrait aqueux a varié de 0,79 à 12,5 mg/ml. En ce qui concerne les concentrations minimales bactéricides (CMB), elles ont varié de 3,1 à 16,6 mg/ml pour l'extrait méthanolique 70% et de 1,5 à 25,0 mg/ml pour l'extrait aqueux (Tableaux 4, 5, 6). Les extraits méthanolique 70% et aqueux des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* ont eu un effet bactéricide sur 100% des souches bactériennes.

L'analyse statistique a permis de comparer les valeurs moyennes \pm écart-types, obtenues pour six souches bactériennes de phénotype sensible (*S. Typhimurium*

1176Y/12, *P. mirabilis* 779C/12, *Shigella* sp. 1177Y/12, *Shigella* sp. 915C/12, *P. aeruginosa* 872C/12, *S. aureus* 1227C/12) ainsi que celles de quatre souches bactériennes de phénotype résistant (*P. mirabilis* (BLSE) 1048Y/12, *E. coli* ATCC, *P. aeruginosa* (IMP^R) 261Y/12, *S. aureus* (MET^R) 926C/12). L'analyse de la variance a montré que les différences observées au niveau des CMI ne sont pas significatives, il en est de même pour les CMB (Tableaux 7, 8 ; $P > 0,05$).

Criblage phytochimique

Les résultats des tests de recherche des grands groupes de composés chimiques dans les extraits aqueux, hexanique et méthanolique 70% (v/v) sont présentés dans le Tableau 9. Huit groupes de composés phytochimiques ont été mis en évidence. Les extraits aqueux et hydro-alcooliques ont révélé le plus grand nombre de phytoconstituants. Toutefois, les coumarines n'ont été décelées dans aucun des extraits.



Figure 1 : CMB (mg/mL) de l'extrait méthanolique 70% des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* sur *S. aureus* 926c/12 (MET^R).

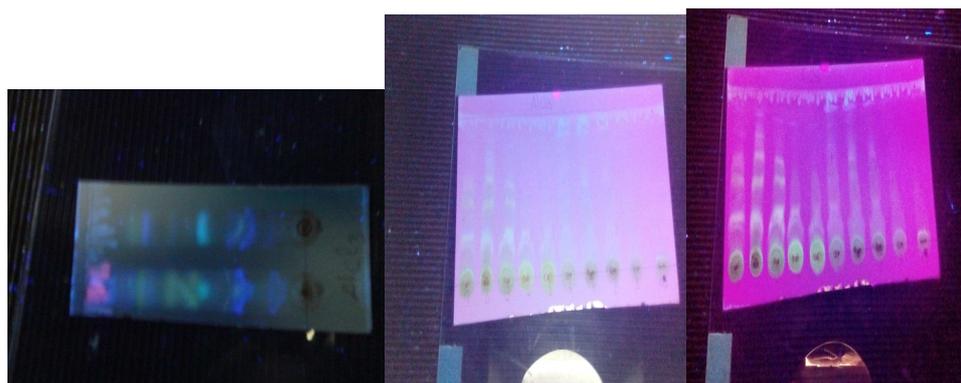


Figure 2 : Chromatogrammes de composés chimiques révélés après visualisation à l'UV.

Tableau 1 : Diamètre des zones d'inhibition des extraits des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* et d'antibiotique sur les entérobactéries et la souche de référence.

Bactéries	Codes	Diamètre d'inhibition (mm)				
		Ext. Hex.	Ext. MeOH	Ext. Aq.	H ₂ O Dist.	FEP
		70%				
<i>S. Typhimurium</i>	1938Y/10	6,0 ± 0,0	9,8 ± 0,6	7,9 ± 0,0	6,0 ± 0,0	10,5 ± 1,0
	1176Y/12	6,0 ± 0,0	12,3 ± 3,3	14,2 ± 0,5	6,0 ± 0,0	15,3 ± 0,1
<i>E. coli</i>	1218Y/12 BLSE	6,0 ± 0,0	9,6 ± 0,0	9,2 ± 1,8	6,0 ± 0,0	10,0 ± 0,5
	1161Y/12	6,0 ± 0,0	9,7 ± 0,3	9,9 ± 0,7	6,0 ± 0,0	18,3 ± 1,0
	ATCC 25922	6,0 ± 0,0	15,6 ± 1,0	14,4 ± 0,3	6,0 ± 0,0	17,6 ± 0,6
	779C/12	6,0 ± 0,0	16,6 ± 7,2	25,3 ± 0,3	6,0 ± 0,0	19,0 ± 0,1
<i>P. mirabilis</i>	1048Y/12 BLSE	6,0 ± 0,0	17,5 ± 0,3	16,4 ± 1,0	6,0 ± 0,0	14,5 ± 0,3
<i>Shigella sp.</i>	1177Y/12	6,0 ± 0,0	23,4 ± 1,0	23,0 ± 0,5	6,0 ± 0,0	24,5 ± 1,0
	915C/12	6,0 ± 0,0	22,8 ± 3,0	19,8 ± 0,3	6,0 ± 0,0	20,3 ± 0,3

Inclus le diamètre du puits, Ext. Hex. : Extrait hexanique ; Ext. MeOH : Extrait méthanolique ; Ext. Aq. : Extrait aqueux ; H₂O Dist. : Eau distillée ; FEP : Céfépime ; *S. Typhimurium*. : *Salmonella Typhimurium* ; *E. coli* : *Escherichia coli* ; *P. mirabilis* : *Proteus mirabilis* ; BLSE : bêta lactamase à spère élargi ; ATCC : American Type Culture Collection.

Tableau 2 : Diamètres des zones d'inhibition des extraits des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* et d'antibiotique sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et la souche de référence.

Bactéries	Codes	Diamètre d'inhibition (mm)				
		Ext. Hex.	Ext. MeOH	Ext. Aq.	H ₂ O Dist.	IPM
		70%				
<i>P. aeruginosa</i>	872C/12	6,0 ± 0,0	21,5 ± 3,4	17,8 ± 0,7	6,0 ± 0,0	25,6 ± 0,6
	261Y/12 IMP^R	6,0 ± 0,0	22,8 ± 1,7	23,0 ± 1,0	6,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0
	ATCC 27853	6,0 ± 0,0	9,7 ± 3,3	8,7 ± 3,3	6,0 ± 0,0	20,3 ± 1,3

Inclus le diamètre du puits, Ext. Hex. : Extrait hexanique ; Ext. MeOH : Extrait méthanolique ; Ext. Aq. : Extrait aqueux ; H₂O Dist. : Eau distillée ; IMP : imipénème ; *P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa* ; IMP^R : souche résistante à l'antibiotique imipénème.

Tableau 3 : Diamètres des zones d'inhibition des extraits des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* et d'antibiotique sur les souches de *Staphylococcus aureus* et la souche de référence.

Bactéries	Codes	Diamètre d'inhibition (mm)				
		Ext. Hex.	Ext. MeOH 70%	Ext. Aq.	H ₂ O Dist.	FOX
<i>S. aureus</i>	926C/12 MET ^R	6,0 ± 0,0	22,5 ± 3,0	16,6 ± 0,7	6,0 ± 0,0	23,5 ± 1,0
	1227C/12	6,0 ± 0,0	22,5 ± 0,1	18,5 ± 1,1	6,0 ± 0,0	21,0 ± 0,1
	ATCC 25923	6,0 ± 0,0	9,6 ± 0,3	8,2 ± 3,3	6,0 ± 0,0	15,5 ± 0,5

Inclus le diamètre du puits, Ext. Hex. : Extrait hexanique ; Ext. MeOH 70% : Extrait méthanolique 70% ; Ext. Aq. : Extrait aqueux ; H₂O Dist. : Eau distillée ; FOX : Céfoxitine ; MET^R : souche résistante à la méticilline.

Tableau 4 : Valeurs moyennes (moyenne ± SD de trois essais) des paramètres antibactériens des extraits des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* sur les entérobactéries et la souche de référence.

Bactéries	Extrait MeOH 70% (mg/ml)				Extrait aqueux (mg/ml)				FEP(µg/ml) CMI
	CMI	CMB	CMB/ CMI	Pouvoir	CMI	CMB	CMB/ CMI	Pouvoir	
<i>S. Typhimurium</i> 1176Y/12	4,1	8,3	2	Bcide	8,3	16,6	2	Bcide	< 4
<i>P. mirabilis</i> 779C/12	4,1	4,1	1	Bcide	3,1	4,1	1	Bcide	< 4
<i>P. mirabilis</i> 1048Y/12 BLSE	4,1	8,3	2	Bcide	12,5	12,5	1	Bcide	> 4
<i>Shigella</i> sp. 1177Y/12	1,5	3,1	2	Bcide	4,1	8,3	2	Bcide	< 4
<i>Shigella</i> sp. 915C/12	1,5	3,1	2	Bcide	1,5	3,1	2	Bcide	< 4
<i>E. coli</i> ATCC	8,3	16,6	2	Bcide	8,3	16,6	2	Bcide	> 4

Ext. MeOH 70% : Extrait méthanolique 70% ; Ext. Aq. : Extrait aqueux ; CMI : concentration minimale inhibitrice ; CMB : concentration minimale bactéricide ; FEP : Céfepime ; Bcide : bactéricide.

Tableau 5 : Valeurs moyennes (moyenne ± SD de trois essais) des paramètres antibactériens des extraits des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Bactéries	Extrait MeOH 70% (mg/ml)				Extrait aqueux (mg/ml)				IMP(µg/ml) CMI
	CMI	CMB	CMB/ CMI	Pouvoir	CMI	CMB	CMB/ CMI	Pouvoir	
<i>P. aeruginosa</i> 872C/12	4,1	8,3	2	Bcide	12,5	25,0	2	Bcide	< 8
<i>P. aeruginosa</i> 261Y/12 IMP ^R	4,1	8,3	2	Bcide	8,3	12,5	2	Bcide	> 8

Ext. MeOH 70% : Extrait méthanolique 70% ; Ext. Aq. : Extrait aqueux ; CMI : concentration minimale inhibitrice ; CMB : concentration minimale bactéricide ; IPM : imipénème ; Bcide : bactéricide.

Tableau 6 : Valeurs moyennes (moyenne \pm SD de trois essais) des paramètres antibactériens des extraits des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* sur les souches de *Staphylococcus aureus*.

Bactéries	Ext. MeOH 70% (mg/ml)				Ext. aqueux (mg/ml)				FOX(μ g/ml) CMI
	CMI	CMB	CMB/ CMI	Pouvoir	CMI	CMB	CMB/ CMI	Pouvoir	
<i>S. aureus</i> 926C/12 MET ^R	1,5	3,1	2	Bcide	0,7	1,5	2	Bcide	CMI > 32
<i>S. Aureus</i> 1227C/12	1,5	1,5	1	Bcide	1,5	3,1	2	Bcide	CMI < 32

Ext. MeOH 70% : Extrait méthanolique 70% ; Ext. Aq. : Extrait aqueux ; CMI : concentration minimale inhibitrice ; CMB : concentration minimale bactéricide ; FOX : Céfoxitine ; Bcide : bactéricide.

Tableau 7 : Comparaison des valeurs moyennes (moyenne \pm SD de trois essais) de CMI et CMB de l'extrait aqueux en fonction des phénotypes des souches bactériennes.

Paramètres antibactériens	Souches bactériennes sensibles	Souches bactériennes résistantes	P-valeur
	CMI	4,5 \pm 4,6	
CMB	8,8 \pm 14,6	13,8 \pm 1,2	0,2278 > 0,05

CMI : concentration minimale inhibitrice ; CMB : concentration minimale bactéricide.

Tableau 8 : Comparaison des valeurs moyennes (moyenne \pm SD de trois essais) de CMI et CMB de l'extrait méthanolique 70% en fonction des phénotypes des souches bactériennes.

Paramètres antibactériens	Souches bactériennes sensibles	Souches bactériennes résistantes	P-valeur
	CMI	2,8 \pm 15,4	
CMB	4,5 \pm 19,7	11,1 \pm 16,2	0,1711 > 0,05

CMI : concentration minimale inhibitrice ; CMB : concentration minimale bactéricide.

Tableau 9 : Composés identifiés par CCM dans les écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus*.

Développant : Chloroforme / méthanol / eau (65 : 35 : 5)									
Extraits		Avant révélation			Après révélation				Composés chimiques possibles
		Godin	dragend	Folin	AlCl ₃	FeCl ₃	KOH		
Méthanol 70% (v/v)	Rf	0,67	0,88	0,88	0,52	0,25	0,52	Saponosides, tanins catéchique et gallique, polyphénols, polyterpènes, anthocyanes, flavonoïdes, alcaloïdes	
	Couleur	bleu	violet	Orange	Bleu	Jaune	Noir		Jaune
Aqueux	Rf	0,67	0,87	0,88	0,52	0,52	0,52	Saponosides, tanins catéchique et gallique, polyphénols, polyterpènes, anthocyanes, flavonoïdes,	
	Couleur	bleu	violet	Orange	Bleu	Jaune	Noir		Jaune

DISCUSSION

L'activité antibactérienne des extraits de *Anogeissus leiocarpus* a été évaluée sur la croissance *in vitro* de 10 souches bactériennes, dont, une souche de référence, trois souches multi résistantes et six souches sensibles. Les tests ont montré que les extraits méthanolique 70 % (v/v) et aqueux sont actifs à des degrés divers sur les souches bactériennes. Cela est démontré par les différences notées au niveau des diamètres d'inhibition. Au niveau de l'extrait aqueux de cette plante, le plus grand diamètre d'inhibition ($25,3 \pm 0,3$ mm) est obtenu sur *P. mirabilis* 779C/12 à la concentration de 50 mg/ml. Cette bactérie est responsable des infections urinaires, de la méningite chez le nourrisson et des diarrhées. Cela pourrait donc justifier l'utilisation traditionnelle de *A. leiocarpus* dans le traitement de ces affections (Kamzizi, 2002). Les diamètres d'inhibition de $23,0 \pm 1,0$ mm, sont obtenus sur *shigella* sp. 1177Y/12 et *Ps. aeruginosa* (IMP^R) 261Y/12 (souche résistante). Cette plante pourrait être conseillée dans le traitement de pathologies telles que les diarrhées, la dysenterie, les fièvres, induites par ces bactéries (Koné, 2005). L'extrait méthanolique 70% de cette même plante, a été plus actif sur *Shigella* sp. 1177Y/12 avec un diamètre d'inhibition de $23,4 \pm 1,0$ mm et sur les souches *Ps. aeruginosa* et de *S. aureus* avec des diamètres d'inhibition autour de 22,5 mm à 50 mg/ml. Les résultats obtenus avec les deux types d'extraits sont presque similaires. Cela laisse à supposer que les composés actifs sont solubles dans les deux types de solvant.

Les paramètres antibactériens, à savoir la (CMI), la (CMB) et le rapport CMB/CMI ont été déterminés avec les extraits de *A. leiocarpus*. La plus petite valeur à laquelle, l'action inhibitrice de l'extrait aqueux commence à s'exercer est 0,78 mg/ml. Cette valeur est obtenue avec *S. aureus* 926C/12. On peut, donc, dire que l'extrait aqueux a une action plus efficace contre cette souche. Les résultats obtenus corroborent ceux d'Oluronké et al. (2000). En effet, ces auteurs ont montré que les extraits aqueux et méthanolique de

Anogeissus leiocarpus ont une activité efficace contre les bactéries multi résistantes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline), responsables des infections opportunistes. Par contre, selon une classification de l'activité des extraits des plantes en fonction de la valeur de leur CMI révélé par Kuete (2010), les extraits utilisés dans cette étude sont faiblement actifs sur l'ensemble des bactéries. En effet, pour cet auteur, l'activité d'un extrait est significative si la CMI < 100 µg/ml. Elle est dite modérée lorsque la CMI est comprise entre 100 et 625 µg/ml ($100 < \text{CMI} \leq 625$ µg/ml) et est faible si la CMI > 625 µg.

L'étude statistique a indiqué que les différences observées au niveau des CMI et des CMB des deux catégories de souches ne sont pas significatives. Nous pouvons, donc, dire que l'activité des extraits, n'a pas été statistiquement influencée par les phénotypes des bactéries.

Par ailleurs, les extraits de cette plante ont une activité bactéricide sur l'ensemble des souches bactériennes soumises à cette étude car les rapports CMB/CMI sont tous inférieurs ou égal à 4 (Kamzizi, 2002).

Une plante recensée contre une affection microbienne est souvent prescrite dans le traitement de plusieurs autres pathologies courantes. Elle a donc des usages multiples, qui s'expliquent, par la présence de nombreux groupes de composés chimiques biologiquement actifs que les criblages chimiques révèlent dans ces organes (Tra Bi, 2008). En effet, les investigations phytochimiques ont permis de mettre en évidence huit grands groupes de composés chimiques dont les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpènes, les saponosides, les tanins. Ces phytoconstituants sont donc à l'origine des effets pharmacologiques observées avec l'usage de cette plante, et par conséquent, déterminent son intérêt thérapeutique. Parmi ces composés, nombreux sont reconnus pour leurs effets antibactériens ; Les alcaloïdes jouent un rôle important dans les structures biologiques et apparaissent comme de

puissants anti-cholinergiques (Scazzocchio et al., 2001 ; Muster, 2004). Leur présence dans les écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* pourrait expliquer l'intervention de cette espèce dans le traitement des céphalées, de la carie dentaire, du rhume, de la toux car selon Jacques (2000), certains alcaloïdes ont une activité directe sur le corps, réduisant les spasmes et soulageant la douleur. De même, les flavonoïdes (flavones et flavonols) sont aussi présents dans cette espèce végétale. Ces métabolites secondaires sont connus pour leurs propriétés de protection contre les maladies hormonodépendantes (Cimanga et al., 2006). Ce qui expliquerait leurs effets anti-œdémateux (chez la femme enceinte). Les saponosides sont aussi reconnus pour leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-œdémateuses, analgésiques, antibactériennes (Hoffman, 2003). Leur présence justifierait l'intervention de cette plante dans le soulagement des pathologies telles que les ulcères, la carie dentaire, les céphalées, la gonococcie qui provoquent des douleurs atroces. Les tanins sont reconnus pour leurs propriétés antiseptique, bactéricide et astringente (Sepulveda et al., 2011). Le traitement des boutons sur la peau par l'écorce de tige de *Anogeissus leiocarpus*, des démangeaisons par cette même partie de la plante, pourrait être dû aux tanins, aussi bien catéchiques que galliques.

Conclusion

Les travaux menés ont permis de confirmer l'activité antibactérienne des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* sur différentes souches d'entérobactéries, de *Staphylococcus* et de *Pseudomonas aeruginosa*, de phénotypes différents. La détermination des CMI et CMB a révélé un effet bactéricide de l'espèce végétale sur la totalité des souches bactériennes. Par ailleurs, les grands groupes de composés chimiques, probablement responsables de cette activité, ont été mis en évidence et sont mieux concentrés dans le solvant hydro-alcoolique. Au vu de ces résultats, cette plante pourrait constituer un espoir dans le soulagement des

affections microbiennes, véritable menace de santé publique.

Il est donc envisageable d'approfondir les études ethnopharmacologiques sur *A. leiocarpus*, confirmer les résultats obtenus *in vitro* par des tests *in vivo* et faire des tests de toxicité.

CONFLIT D'INTÉRÊT

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

MD a permis d'obtenir le laboratoire pour la réalisation des travaux. HFTB a participé à l'élaboration de tout le document en supervisant de près tous les travaux contribuant à la confection du manuscrit. NKG a permis la réalisation des tests antibactériens en y apportant toute l'aide nécessaire aussi bien sur le plan technique et matériel. AB et ND ont contribué dans l'adaptation des protocoles utilisés. FKK a supervisé les tests antibactériens. NJK et MB ont apporté une aide considérable au niveau de la recherche bibliographique. KY a contribué considérablement à la réalisation du criblage phytochimique au laboratoire de phytochimie du Centre Suisse de Recherche Scientifique de Côte d'Ivoire.

REMERCIEMENTS

L'expression de notre profonde gratitude va à l'endroit de tous ceux qui ont, de loin ou de près, aidé à réaliser ces travaux. Particulièrement, le Département de Bactériologie et de Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) et le Département de Phytochimie du Centre Suisse de Recherche Scientifique de Côte d'Ivoire (CSRS CI), pour leur appui matériel et technique.

REFERENCES

- Akoua KC, Guessenn N, Gbonon V, Faye-Kette AYH, Dosso M. 2004. Methicillin-resistant of *Staphylococcus aureus* in Abidjan (1998-2001): a new hospital

- problem. *Méd. Mal. Inf.*, **34**(3): 132-136.
- Alex A, Alfred AO, Geoege TO, Monique SJS. 2005. Ethnobotanical study of some Ghanaian anti-malarial plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **99**(2): 273-279. DOI: 10.1016/j.jep.2005.02.020.
- Benbachir M, Benredjeb S, Boye CS, Dosso M, Belabbes H, Kamoun A, Kane O, Elmdaghri N. 2001. Two-year surveillance of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in four African cities. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **45**(2): 627-629. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.2.627-629.2001>.
- Ben F, Romdan CH, Bougerra O, Sahnoun CH, Loussaies V, Kacem M, Mastouri R, Tavka-Stanbouli M, Chakroun V, Bouzouaia N. 2005. Les bactéries multi résistantes isolées chez les malades hospitalisés dans un service de maladies infectieuses. *Rev. Tin Infectiol.*, **1**(4): 12-15.
- Chaaib Kouri F. 2004. Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) (Rutaceae); p 42.
- Cimanga K, Kambu K, Tona L, Hermans N. 2006. Cytotoxicity and *in vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents. *Journal of Ethnopharmacology*, **107**(1): 83-90. DOI:10.1016/j.jep.2006.02.010.
- Dohou N, Yamni K, Tahrouch S, Idrissi Hassani LM, Badoc A, Gmira N. 2003. Screening Phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine *Thymelaea lithroides*. *Bull Soc Pharm Bordeaux*, **142**(1-4): 61-78.
- Dosso M, Faye-kette H. 2000. Contrôle de qualité de l'antibiogramme en pratique Courante : Expérience du laboratoire de bactériologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. *Bactériolo int, n° spécial*: p 53.
- Fauchere IL, Avril JL. 2002. Bactériologie générale et médicale. *Editions Ellipses*. Paris1, p 368. <http://www.sudoc.fr/069011605>.
- Gangoue PJ. 2007. Caractérisation des Béta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de Doctorat es sciences en biochimie. Université Liège. Belgique, p 104.
- Guessennd N, Gbonon VC, Tiékoura KB, Kakou-N'douba A, Ouattara DN, Boni-Cissé C, Dosso M, le GER-BMR. 2009. Evolution de la résistance bactérienne à l'imipénème en Côte d'Ivoire de 2005 à 2009. Colloque scientifique de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire: pathologies émergentes et biologie intégrative, p 17.
- Hoffman D, 2003. *Medical Herbalism: The Science and Praice of Herbal Medicine*. Inner Traditions bear and Company: Rochter, Vermont (USA); 83.
- Iqbal A, Anna ZB. 2001. Antimicrobial and Phytochemical Staties on forty five Indian medicinal plants against multidrugs resistance Human pathogen. *J. Ethnopharmacologie*, **74**: 103-123.
- Jacques EP. 2000. Les alcaloïdes In Dictionnaire de la botanique *Encyclopaedai universalis*. Eds Albin M : Paris ; 23-26.
- Kamanzi AK. 2002. Plantes médicinales de Côte d'ivoire : Investigations phytochimiques guidées par des essais biologiques. Thèse de doctorat, Université de Cocody, Abidjan, p 176.
- Konan KF, Guessennd KN, Oussou KR, Bahi C, Coulibaly A, Djaman AJ, Dosso M. 2013. Effet antibactérien de l'extrait aqueux de l'écorce de *Terminalia Glaucescens* Planch ex Benth (Combretaceae) sur la croissance *in vitro* des Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (EBLSE). *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **8**(3): 1192-1201. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v8i3.30>.
- Koné WM, Kamanzi AK, Terreaux C, Hostettmann K, Traore D, Dosso M.

2004. Traditional medicine in North Côte d'Ivoire : screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **93**: 43-49.
- Koné MW. 2005. Potentiel des plantes médicinales de Côte d'Ivoire dans le contrôle des haemochoses chez les ovins. Thèse de doctorat, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, p 224.
- Kouadio NJ, Guessennd NK, Koné MW, Moussa B, koffi YM, Guédé KB, Yao K, Bakayoko A, TRA BFH, Dosso M. 2015. Evaluation de l'activité des feuilles de *Mallotus oppositifolius* (Geisel.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) sur des bactéries multirésistantes et criblage phytochimique. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **9**(3): 1252-1262. DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v9i3.10>.
- Kuete V. 2010. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta Med.*, **76**: 1479-1491. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0078085> Sep 09, 2014.
- Lagnika L. 2005. Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes Béninoises. France/Bénin: Université Louis Pasteur Starsbourg /Université d'Abomey Calavi; p 280.
- Lhuillier A. 2007. Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook. F ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Institut national polytechnique de Toulouse : Toulouse, France; 214.
- Mallikharjuna PB, Rajanna LN, Seetharam YN, Sharanabasappa GK. 2007. Phytochemical studies of *Strchnos potatorum* L. F. a medical plant. *E. J. Chem.*, **4**(4): 510-223. DOI: 10.1155/2007/687859.
- Muster D, Lotfi BS. 2004. *Thérapeutique Médicale Buccodentaire: Moyens et Methods*. Elsevier Masson; 290.
- N'gaman KCC, Békro YA., Mamyrbékova-Békro JA, Bénéié A, Gooré BS. 2009. Sur la composition en métabolites secondaires et l'activité anti-oxydante d'extraits bruts de *Gmelina arborea* Roxb. (Verbanaceae) de Côte d'Ivoire, Afrique de l'Ouest: Analyse par Chromatographie en Couche Mince. *Eur. J. Sc. Res.*, **36**(2): 161-171.
- Nostro A, Germano MP, D'Angelo V, Marino A, Cannatelli MA. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.*, **30**(5): 379-384. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10792667>.
- Olakunle O, Kassim ML, Biaffra E, Andrew G, Henrietta A, Victor RG. 2005. Effects of Root Extracts of *Fagara zanthoxyloides* on the In Vitro Growth and Stage Distribution of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**(1): 264-268. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.1.264-268.2005>.
- Oluronké T, Hong XX, Song F. 2000. Antibacterial Activities of Extracts from Nigeria Chewing sticks. *Phytoter. Res.*, **13**(8): 675-679. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594937>.
- OMS. 2002. Stratégie de l'OMS pour la Médecine Traditionnelle pour 2002-2005. WHO/EDM/TRM/2002.1, Genève, p 74.
- Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum bêta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.*, **18**(4): 657-686. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16223952>.
- Ponce AG, Fritz R, Del Vallec, Rouras I. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Society of Food Science and Technology*, **36**(7): 679-684. DOI:

- [http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00088-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4).
- R Core Team. 2013. R: A Language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, vienna, austria (<http://www.R-project.Org>).
- Scazzocchio F, Cometa MF, Tomassini L, Palmery M. 2001. Antibacterial activity of Hydrastis Canadensis extract and its major isolated alkaloids *Planta med.*, **67** (6): 561-564. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11509983>.
- Sepulveda L, Ascacio A, Rodriguez-Herrera R, Aguilera-Carbo A, Aguilar CN. 2011. Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production Process. *Afr. J. Biotech.*, **10**(22): 4518-4523. DOI: 10.5897/AJB10.2201
- Soro D, Koné MW, Kamanzi AK. 2010. Evaluation des activités antimicrobiennes et anti-radicaux libres de quelques Taxons bioactifs de Côte d'Ivoire. *E. J. Res.*, **40**(2) : 307-317.
- Tra Bi FH. 2008. Evaluation de l'activité antifongique de quinze (15) plantes de la flore de la Côte d'Ivoire. Thèse doctorat d'Etat, Université d'Abobo-Adjamé, Abidjan, Côte d'Ivoire, p. 122.
- Waridel P. 2003. Investigation phytochimique des plantes aquatiques *Potamogeton pectinatus L.*, *P. lucens L.*, *P. perfoliatus et P. crispus L.* (Potamogetonaceae) Suisse: Université de Lausann, p 219.
- Zihiri G, Kra A. 2003. Evaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pirifilia* (LARMARCK) O. KUNTZE (Asteraceae) « PYMI » sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Rev. Méd. Pharm. Afr.*, **17**: 11-19.