



Évaluation de l'activité antimicrobienne de quatre feuilles utilisées comme emballages dans l'artisanat agroalimentaire au Bénin.

Onzo Caroline Fifamè^{1,2}, Azokpota Paulin^{1,2}, Dah-Nouvlessounon Durand³, Lehmane Toure Halfane³, Adjatin Arlette⁴, Baba-Moussa Lamine³

¹ Laboratoire de Biochimie Microbienne et de Biotechnologie Alimentaires (LMBA), Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-Calavi; 03 BP 2819 Jéricho ; Cotonou, Bénin.

² Laboratoire de Biologie Moléculaire et Formulations des Aliments (LAFAB) ; Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-Calavi; 03 BP 2819 Jéricho, Cotonou, Bénin

³ Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie ; Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, 05 BP 1604, Cotonou, Bénin

⁴ Laboratoire de Biotechnologie et des Ressources génétiques de la Faculté des Sciences et Techniques de Dassa, Université d'Abomey.

Original submitted in 3rd September 2015. Published online at www.m.elewa.org on 30th November 2015

<http://dx.doi.org/10.4314/jab.v95i1.11>

RESUME

Objectif : Le présent travail vise à évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de quatre feuilles (*Thalia geniculata*, *Musa spp*, *Manihot esculenta* et *Daniellia oliveri*) utilisées comme emballages alimentaires au Bénin.

Méthodologie et Résultats : Les extraits aqueux, éthanolique, hydroéthanolique, hexanique et acétate d'éthyle ont été testés sur la croissance *in vitro* de 10 souches de références par la méthode de diffusion en milieu solide. Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Bactéricides (CMB) ont été déterminées respectivement par les méthodes de macro-dilution en milieu liquide et ensemencement sur milieu gélosé. Les rendements à l'extraction varient d'une plante à une autre en fonction des solvants utilisés. De même la susceptibilité des souches microbiennes varie d'une espèce à une autre. Globalement les CMI sont élevées, excepté pour *D. oliveri* qui donnés 0, 78 mg/ml (*E. coli*) et 1,56 mg/ml (*S. aureus*). Par ailleurs, *Thalia généticulata* présente une CMI de 6, 25 mg/ml sur *S. oralis*. En général, les extraits présentent une plus forte activité sur les bactéries Gram+ que les Gram-.

Conclusion et applications : Les résultats obtenus confirment les observations des productrices des denrées alimentaires qui pensent que *Daniellia oliveri* et *Thalia geniculata* utilisées comme emballages alimentaires conservent mieux les aliments au cours de leur stockage. Les extraits de ces plantes peuvent être utilisés comme des agents antimicrobiens pour la conservation des denrées alimentaires emballées. Il est souhaitable que les mêmes travaux se poursuivent sur les autres espèces de plantes identifiées et utilisées dans l'artisanat agroalimentaire en Afrique.

Mots-clés : Concentration Minimale Inhibitrice ; Concentration Minimale Bactéricide ; antibiogramme ; *Musa spp*; *Manihot esculenta*; *Daniellia oliveri*; *Thalia geniculata*

ABSTRACT

Objectives: Plant leaves used as food packaging having thus a protective effect could present an advantage if they have preservative effect on the packaged food. The present work aims to evaluate the antimicrobial activity of extracts of four species sheets (*Thalia geniculata*, *Musa spp*, *Daniellia oliveri* and *Manihot esculenta*) used as food packaging.

Methodology and results: The research approach was to make the extracts of each of these plants with appropriate solutions. Then, susceptibility testing was performed with the extracts in order to determine the *in vitro* minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of each of the reference strains used (Gram + and Gram -; Yeast and Mould). It appeared that the highest extraction yields are of the order of 20.8% for *Manihot esculenta*, 11.6% for *Daniellia oliveri* extract in aqueous medium. The lowest yield was around 0.2% for *Musa sp* extracted with hexane solution. Overall, the MIC of the test plants were greater than 100 mg / ml, except for *Daniellia oliveri* has an MIC of 0,78mg/ml and 1.56 mg / ml, respectively *E. coli* and *S.aureus* and 3, 12 mg / ml for *P. aerpginas*. Furthermore, *Thaila généticulata* has a MIC of 6.25 mg /ml of *S. oralis*. It shows that among the four species of plants studied, *Daniellia oliveri* and *Thalia geniculata* have relatively stronger antimicrobial activities while *Musa spp* and *Manihot esculenta* are less active. In general, the extracts have a higher activity on Gram + bacteria.

Conclusion and application of findings: The results confirm the observations of food processors who think that *Daniellia oliveri* and *Thalia geniculata* used as food packaging preserve better foods during storage. Extract from the investigated plants can be used as biological antimicrobial agent for the long storage of the packaged foods. Future investigation should be performed on other species of plants identified and used as vegetal food packaging in Africa.

Keywords : Minimum Inhibitory Concentration ; Minimum bactericidal concentration ; susceptibility; *Musa spp*; *Manihot esculenta*; *Daniellia oliveri*; *Thalia geniculata*

INTRODUCTION

Étymologiquement les microorganismes sont de « petits organismes », des êtres vivants si petits qu'ils ne sont observables qu'au microscope (Majdi, 2008). Omniprésents dans la nature, ils se retrouvent dans l'eau, dans l'air, sur les surfaces, dans les denrées alimentaires, sur notre peau et à l'intérieure de notre organisme. Il en existe des espèces utiles à l'homme et d'autres pathogènes qui sont à l'origine de maladies infectieuses et de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) (Anani et al., 2000). Actuellement les toxi-infections alimentaires constituent un problème de santé publique et représentent une cause importante de mortalité dans les pays en voie de développement (Delmas et al., 2003). Plusieurs germes en sont responsable tels que ceux du genre *Staphylococcus* et spécifiquement *Staphylococcus aureus* qui fait partie des trois bactéries le plus souvent misent en cause dans 90% des cas de toxi-infections alimentaires collectives (Delmas et al., 2003). La pathogénicité des germes dans le cas des TIAC se manifeste soit par une charge élevée ou soit par la

libération des toxines. Pour traiter ces symptômes, la prise d'antibiotiques est souvent recommandée. Malheureusement, en raison d'un usage inadapté et trop souvent abusif de ces médicaments, les bactéries se sont très vite adaptées aux doses susceptibles de les tuer. Ainsi, l'espoir apporté par la découverte des antibiotiques a très vite fait place à un problème de prise en charge des infections bactérienne suite à l'apparition du phénomène de résistance. La résistance des bactéries aux antibiotiques représente l'un des problèmes les plus importants des thérapeutiques anti-infectieuses dans le monde et dans l'industrie pharmaceutique (Nascimento et al., 2000). De plus, presque la totalité des antibiotiques connus à ce jour sont confrontés à ce phénomène de résistance de souches bactériennes isolées même des produits destinés à la consommation (Atefeibu, 2002). En effet, de nombreux cas de bactéries multirésistantes sont rapportés au Benin (Sina et al., 2011), en Côte d'Ivoire (Benbachir et al., 2001 ; Kacou-N'Douba et al., 2001; Akoua Koffi et al., 2004 ; Attien et al.,

2013) et dans d'autres pays de l'Afrique subsaharienne comme le Nigéria (Akinyemi *et al.*, 2005). De ce fait, la maîtrise des infections bactériennes devient alors complexe avec le traitement conventionnel (Adejuwon *et al.*, 2011). Face à ce problème de résistance, plusieurs pistes peuvent être explorées parmi lesquelles la formalisation des connaissances endogènes à travers l'étude des plantes de la pharmacopée traditionnelle. Ces plantes sont reconnus pour leurs vertus médicinales dans le traitement des maladies contre lesquelles la médecine moderne a parfois du mal à trouver un remède (Millogo-koné *et al.*, 2008). Ainsi, les plantes pourraient être utilisées pour le traitement des infections causées par les bactéries résistantes (Maghrani *et al.*, 2005). C'est dans cet ordre d'idée que l'OMS, estimait que 80% de la population des pays en voie de développement utiliseraient des plantes médicinales pour divers problèmes de santé (OMS, 2002). En effet, pour le traitement des maladies, les guérisseurs traditionnels concoctent plusieurs recettes efficaces à bases de plantes médicinales retrouvées à près de 90% en Afrique (Amadou, 2004). Ces recettes représentent une source non négligeable de nouveaux médicaments surtout qu'elles présentent moins d'effets secondaires (Moroh *et al.*, 2008 ;

Kokora *et al.*, 2013). Plusieurs espèces de plantes ont été identifiées comme des plantes médicinales utilisées pour le traitement de diverses infections (Adjanohoun *et al.*, 1989 ; Sopkon et Ouinsavi, 2002 ; Biecke, 2004). Au Bénin, plusieurs études ethnobotaniques (Adjanohoun *et al.*, 1989 ; Sopkon et Ouinsavi, 2002 et Biecke, 2004) se sont attachées depuis plusieurs années à identifier les espèces médicinales. Parmi celles-ci on retrouve également des plantes utilisées pour les emballages alimentaires. *Musa spp* de la famille des *Musaceae*, *Manihot esculenta* de la famille des *Malvaceae*, *Daniellia oliveri* de la famille des *Leguminosae-Caesalpinioideae*, et *Thalia geniculata* sont des plantes utilisées régulièrement au Bénin pour emballer les produits alimentaires. La phytochimie et des études concernant l'activité des extraits de ces plantes sur des souches sont très rares. C'est dans le but de rechercher de nouvelles molécules pour lutter contre les infections alimentaires que la présente étude a été initiée. Cette étude se propose alors d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de quatre plantes (*Musa sapientum*, *Manihot esculenta*, *Daniellia oliveri* et *Thalia geniculata*) sur la croissance *in vitro* de 10 souches de références. Les objectifs spécifiques sont de plusieurs ordres, à savoir.

MATERIEL ET METHODES

Collecte des plantes et pulvérisation : Les feuilles des quatre plantes ont été collectées à Bohicon et à Porto-Novo dans le mois de Novembre 2014. Après récolte, les feuilles ont été lavées à l'eau puis séchées au laboratoire à température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant environ deux semaines. Elles ont été ensuite réduites en poudre à l'aide d'un broyeur Retsch de type SM 2000/1430/Upm/Smfet. Les poudres ont été utilisées pour les différentes extractions.

Obtention des extraits

Extraits aqueux : Les extraits totaux aqueux sont obtenus par une adaptation de la méthode mise au point par Guede-Guina *et al.* (1995). Cinquante grammes de poudre, ont été macérés dans 500 ml d'eau distillée sur un agitateur magnétique pendant 48 heures à la température ambiante. L'homogénat obtenu a été filtré 2 fois sur coton hydrophile et une fois sur papier Whatman N° 1. Ce filtrat a été ensuite séché à 45°C au four et la poudre ainsi obtenue constitue l'extrait total aqueux.

Extraits hydroéthanolique : Cinquante grammes de poudre végétale des feuilles de chaque espèce (*Musa sapientum*, *Manihot esculenta*, *Daniellia oliveri* et *Thalia geniculata*) ont été extraits avec 300 ml du mélange eau/éthanol (80:20) pendant 72 h. Le mélange obtenu a été filtré sur papier Whatman (Qualitative Circles 150 mm Cat No 1001 150). L'extraction est réalisée trois fois de suite. Le filtrat est concentré sous pression réduite à l'aide d'un rotavapor (RE 300). Le concentré est mis à l'étuve à 40°C jusqu'à évaporation totale. L'extrait hydroéthanolique obtenu a été conservé à 4°C .

Extraction successive à l'éthanol, l'hexane et à l'acétate d'éthyle : La méthode d'extraction utilisée est une adaptation au protocole utilisé dans les travaux de Sanogo *et al.* (2006) et N'Guessan *et al.* (2007). Elle a l'avantage de mettre la poudre correctement en contact avec le solvant grâce à une agitation continue. Cinquante grammes de poudre végétale ont été macérés sous agitation continue dans 500 ml d'éthanol 96° à l'aide d'un

agitateur va et vient Stuart Bioblock scientifique Fisher pendant 72 h. Le mélange est filtré et une moitié est évaporée comme précédemment. Après ajout de 25 ml d'eau distillée puis 50 ml d'hexane à l'autre moitié, la phase supérieure organique est récupérée et séchée à l'étuve pour l'obtention de l'extrait hexanique. Après ajout

$$R = \frac{M1}{M0} \times 100 \text{ avec } M1 = \text{quantité d'extrait}, M0 = \text{quantité de poudre}$$

Microorganismes utilisés : Les dix souches de référence sont composées des bactéries Gram+, Gram- et une levure : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* T22695, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* A24974, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris* A25015, *Streptococcus oralis*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Candida albicans* MHMR.

Antibiogramme : Il a été réalisé selon la méthode de disque s'inspirant de celle décrite par Bauer et al., (1966). Un millilitre d'une préculture (10^6 UFC/ml) de 18 h a permis d'ensemencer une boîte de pétri contenant le milieu de culture adéquat. Après l'ensemencement, des disques stériles en papier Whatman N° 1 de 5 mm de diamètre ont été déposés sur la boîte à l'aide d'une pince stérile. Les disques ainsi déposés sur les boîtes ont été soigneusement imprégnés de 30 µl d'extrait végétal de concentration 20 mg/ml. Les boîtes contenant les disques

de 50 ml d'acétate d'éthyle à la phase inférieure, le mélange est laissé décanté pendant 30 mn avant que la phase supérieure ne soit récupérée, évaporée et séchée pour l'obtention de l'extrait acétatique. Le rendement à l'extraction de chaque solvant est calculé par la formule suivante :

imprégnés ont été ensuite laissés pendant 15 à 30 min à température ambiante ($25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) pour une pré-diffusion des substances avant d'être incubées à 37°C à l'étuve pour 48h (Adesokan et al., 2007). Les diamètres des éventuelles zones d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'une règle graduée (Bauer et al., 1966 ; Carbonelle et al., 1987 ; Doughari et al., 2007) après des temps d'incubation de 24 h et 48 h. Pour chaque extrait, l'expérience a été dupliquée

Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Bactéricide (CMB) : La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) a été déterminée par la méthode de macro-dilution en milieu liquide (Delarras, 1998) avec appréciation visuelle de la croissance des microorganismes. La CMB a été déterminée conjointement à la détermination de la CMI par ensemencement des tubes en partant de la CMI vers les concentrations élevées

RESULTATS ET DISCUSSION

Rendement à l'extraction : Le tableau 1 présente le rendement à l'extraction des différents solvants avec les quatre plantes étudiées. Les rendements à l'extraction varient en fonction des plantes et d'un type d'extrait à un autre. En considérant les quatre plantes, les feuilles de *M. esculenta* présentent le rendement le plus élevé (20,8%) tandis que celles de *Musa sp* présentent la plus faible (0,2%). L'analyse de la capacité d'extraction de chaque solvant montre que le plus grand nombre de composé susceptible d'avoir des activités biologiques est extrait par l'eau chez *D. oliveri* (11,6%) et *T. geniculata* (6,4%). Par contre c'est le mélange hydroéthanolique qui extrait le plus grand nombre de composé chez *M.*

esculenta (20,8%) et *Musa sp* (11,4%). Par ailleurs, l'extrait hexanique présente le plus faible rendement quelque soit la plante utilisée, tandis que les rendements obtenus avec l'acétate d'éthyle décroissent dans le sens *Musa sp* > *M. esculenta* > *D. oliveri* > *T. geniculata*. La variabilité observée au niveau des rendements d'extraction serait probablement liée à la composition chimique des feuilles utilisées. En effet la capacité d'extraction d'un solvant dépend d'une part de l'affinité de ce solvant à l'égard des phytomolécules et d'autre part de la polarité de ce solvant (Dah-Nouvlessounon et al. 2015).

Tableau 1 : Rendement à l'extraction

Plantes	Types d'extraits	Masse de poudre (g)	Masse d'extrait (g)	Rendement (%)
<i>D. oliveri</i>	Aqueux	25	2,9	11,6
	Hydroéthanolique	50	3,1	6,2
	Ethanolique	50	1,5	3
	Hexanique	93,6	1,3	1,4
	Acétate d'éthyle	93,6	2,8	2,9
<i>M. esculenta</i>	Aqueux	25	1,4	5,6
	Hydroéthanolique	50	10,4	20,8
	Ethanolique	50	2	4
	Hexanique	50	0,2	0,4
	Acétate d'éthyle	20	0,9	4,5
<i>M. sapientum</i>	Aqueux	25	1,5	6
	Hydroéthanolique	50	5,7	11,4
	Ethanolique	50	1	2
	Hexanique	50	0,1	0,2
	Acétate d'éthyle	20	1,4	7
<i>T.geniculata</i>	Aqueux	25	1,6	6,4
	Hydroéthanolique	50	2,8	5,6
	Ethanolique	50	1,2	2,4
	Hexanique	50	0,2	0,4
	Acétate d'éthyle	20	0,6	3

Susceptibilité des souches microbienne par rapport aux extraits de plante : Le test de sensibilité réalisé avec les extraits montre que la susceptibilité des souches microbienne varie d'une souche à une autre en fonction du type d'extrait. De même, les résultats diffèrent selon les concentrations d'extrait utilisées (Tableau 2). En effet, la quasi totalité des extraits testés à une dose initiale de 20 mg/ml n'ont eu aucun effet inhibiteur sur les souches testées. Pour cette raison, les concentrations ont été prises à la hausse dans l'ordre 40 mg/ml ; 60 mg/ml ; 80 mg/ml et 100 mg/ml. Comparé aux effets inhibiteurs des huiles essentielles extraites de certaines espèces de plantes et testées sur certains microorganismes isolés du fromage peuhl (*wagashi*) par Sessou *et al.* (2012), on peut dire que les activités antimicrobiennes des feuilles étudiées sont relativement faibles. Malgré les concentrations élevées, certains extraits n'ont présenté aucune activité face aux microorganismes étudiés. Le même constat a été fait d'une part par Patel *et al.* (2011) avec l'extrait méthanolique et acétonique de quelques plantes médicinales en Inde, et d'autre part par Sukesh *et al.* (2011) en Chine avec les extraits hexanique et chloroformique de deux plantes (*Gymnema sylvestre* et *Andrographis paniculata*). Il faut rappeler que l'activité

d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principe actif (Thangara *et al.*, 2000) puis l'origine des souches utilisées. Les extraits aqueux des quatre plantes n'ont eu aucune activité sur toutes les souches étudiées à la dose de 100 mg/ml. De pareil constat a été fait par Sharmila et Gomathi (2011) en Indonésie. Contrairement à ces résultats, Minh (1983) et Parveen *et al.* (2011) en Malaisie ont montré que l'extrait aqueux de certaines plantes étaient actifs sur des souches pathogène (*Streptococcus oralis*, *Staphylococcus aureus*). La différence observée peut s'expliquer par la variation de la concentration en principes actifs et de la solubilisation de ces principes actifs dans l'eau en passant d'une plante à une autre. Par ailleurs, il faut aussi remarquer que les souches *Proteus mirabilis* et *Enterococcus faecalis* ont présenté une résistance à tous les extraits quelque soit la concentration utilisée. Des observations semblables ont été faites par Kinyamasyo *et al.* (2014) sur les souches *C. albicans* et *R. stolonifera* avec les extraits chloroformique et éthanolique de *Aloe secundiflora*. L'explication se trouve dans l'inefficacité des molécules actives dans ces plantes par rapport à la structure membranaire et à l'origine des souches.

Tableau 2: Susceptibilité des microorganismes en fonction des concentrations d'extraits

Plantes	Type d'extraits	Souches									
		S.aur	S.ora	S.épi	Ps.aer	M.lut	E.coli	P.mir	E.foe	P.vul	C.alb
D. oliveri	Aqueux (100 mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hydroéthanolique (100 mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ethanolique	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
	Acétate d'Ethyle	(20 mg/ml)	-	(20 mg/ml)	(20 mg/ml)	(20 mg/ml)	(20 mg/ml)	-	-	-	(100 mg/ml)
	Hexanique	-	-	(100 mg/ml)	(20 mg/ml)	-	(20 mg/ml)	-	-	-	-
M. esculenta	Aqueux (100 mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hydroéthanolique (100 mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ethanolique (100 mg/ml)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	Acétate d'Ethyl (100 mg/ml)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	Hexanique (100 mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. sapientum	Aqueux (100 mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hydroéthanolique (100 mg/ml)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	Ethanolique (80mg/ml)	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	Acétate d'Ethyle (100 mg/ml)	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	Hexanique (100 mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T. geniculata	Aqueux (100 mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hydroéthanolique	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
	Ethanolique	(100 mg/ml)	(100 mg/ml)	(100 mg/ml)	(100 mg/ml)	(20 mg/ml)	-	-	-	(100 mg/ml)	-
	Acétate d'Ethyle (100 mg/ml)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	Hexanique (100 mg/ml)	(100 mg/ml)	(20 mg/ml)	(100 mg/ml)	-	-	+	-	-	-	-

NB: (+) = présence d'inhibition; (-) = Absence d'inhibition

S. épi : *Staphylococcus épideimidis*, S. ora : *Streptococcus oralis*, M. luteus : *Micrococcus luteus* ; P. mir : *Proteus mirabilis*, Ps. aer : *Pseudomonas aeruginosa*, P. vul : *Proteus vulgaris*, C. albicans : *Candida albicans*, E. foe : *Entéroccoccus foecalis*,

Spectre d'activité des extraits actifs sur les microorganismes testés : Les diamètres d'inhibitions des extraits actifs varient d'une souche à une autre en fonction de la feuille utilisée. Cette variation n'est pas significative ($p > 0,05$) dans le temps (24h et 48h) pour les différents types d'extrait (tableau 3). Pour les quatre feuilles utilisées, les meilleurs résultats ont été observés avec *D. oliveri* et *T. gëniculota*. Pourtant le criblage phytochimique réalisé sur ces feuilles par Onzo et al. (2014) révèle dans les feuilles des *M. sapuentum* et *M. esculenta* la présence des tanins, leucoanthocyane et des flavonoïdes qui ont des propriétés anti microbiennes (Bruneton, 1999 ; Ortuno et al., 2006). Les résultats observés peuvent s'expliquer par le fait que ces composés sont présents dans les feuilles mais pas en quantité suffisante pour induire une bonne activité. Avec *T. gëniculata*, l'extrait hydroéthanolique est le plus actif en inhibant 60% des souches testées. De même, le plus grand diamètre d'inhibition (17,5 mm) est obtenu en 24h avec l'extrait hydroéthanolique sur *Pseudomonas*

aeruginosa. La variation observée après 48h d'incubation n'est pas significative ($p > 0,05$). De toutes les souches sensibles aux extraits de cette plante, *E. coli* est la moins sensible avec un diamètre d'inhibition de $09 \pm 0,00$ mm. Avec *D. oliveri*, bien que l'extrait éthanolique ai inhibé une large gamme (60%) de microorganismes, il ne présente pas le plus grand diamètre d'inhibition. En effet, l'extrait acétate d'éthyle de cette feuille présente la plus grande zone d'inhibition ($13 \pm 0,00$ mm) avec la souche *S. ëpidermidis* sans aucune variation dans le temps (24h et 48h). L'explication probable est que le solvant acétate d'éthyle concentrerait mieux les principes actifs anti Staphylococciques. Avec *M. sapuentum* le plus grand diamètre d'inhibition (12 mm) est obtenu avec l'extrait éthanolique sur la souche *S. oralis* tandis que celui de *M. esculenta* est obtenu avec l'extrait acétate d'éthyle sur *E. coli*. Mais il faut remarquer que ces diamètres diminuent dans le temps (48h) ce qui montre que l'utilisation de ces deux feuilles comme emballage ne résisterait pas dans le temps aux agressions et contaminations microbiennes.

Tableau 3 : Diamètres des zones d'inhibitions des différents types d'extrait actif des quatre feuilles (Diamètre moyen \pm écart type (mm))

Feuilles	Type d'extrait	S. Aureus		S. oralis		S. épidermidis		M. luteus		E. coli		Ps. aeruginosa		P. vulgaris		C. albicans	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>M. sapientum</i>	Hydroéthanolique	na	na	10 \pm 0,00	10 \pm 0,00	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	10,25 \pm 0,35	10 \pm 0,00
	Ethanolique	na	na	12 \pm 0,00	11,75 \pm 0,35	11,25 \pm 0,35	11,75 \pm 0,35	na	na	na	na	na	na	12 \pm 0,00	12 \pm 0,00	na	na
	Acétate d'éthyle	07,5 \pm 0,70	07,5 \pm 0,70	11 \pm 0,00	11 \pm 0,00	na	na	na	na	na	na	na	na	10,5 \pm 0,70	10,25 \pm 0,35	na	na
<i>T. geniculata</i>	Hydroéthanolique	10,25 \pm 0,70	10,25 \pm 0,70	11,25 \pm 0,35	10,75 \pm 0,35	12 \pm 0,00	12 \pm 0,00	12 \pm 0,00	12 \pm 0,00	na	na	17,5 \pm 0,70	16,75 \pm 0,35	12 \pm 0,00	12 \pm 0,00	na	na
	Ethanolique	12,25 \pm 0,35	12 \pm 0,00	11,25 \pm 0,35	11 \pm 0,00	11 \pm 0,00	11 \pm 0,00	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
	hexanique	na	na	9 \pm 0,00	9 \pm 0,00	na	na	na	na	na	na						
<i>D. oliveri</i>	Ethanolique	10 \pm 0,00	10 \pm 0,00	na	na	11 \pm 0,00	10 \pm 0,00	13,25 \pm 0,35	12 \pm 0,00	10 \pm 0,35	10 \pm 0,35	10,75 \pm 0,35	10,75 \pm 0,35	na	na	12 \pm 0,00	11,5 \pm 0,70
	hexanique	na	na	na	na	10 \pm 0,00	9,75 \pm 0,35	12,25 \pm 0,35	12 \pm 0,00	11 \pm 0,00	11 \pm 0,00	11,5 \pm 0,00	11,5 \pm 0,00	na	na	na	na
	Acétate d'éthyle	na	na	na	na	13 \pm 0,00	13 \pm 0,00	na	na	10 \pm 0,00	10 \pm 0,00	11,25 \pm 0,35	11,25 \pm 0,35	na	na	na	na
<i>M. esculenta</i>	Ethanolique	na	na	na	na	11,75 \pm 0,35	11,75 \pm 0,35	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
	Acétate d'éthyle	09 \pm 0,70	8,25 \pm 0,35	na	na	na	na	7,75 \pm 1,06	7 \pm 0,00	12 \pm 1,41	11,75 \pm 1,06	na	na	na	na	na	na

na = non actif

Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des différents extraits de plante : En utilisant la méthode de macrodilution, la figure 3 présente l'aspect dans les tubes

après 24 h d'incubation. Les Concentrations Minimales Inhibitrices obtenues varient en fonction des souches et du type d'extrait (Tableau 4).



Figure 3 : Aspect des tubes après 24h d'incubation

Tableau 5 : Concentrations Minimales Inhibitrices des extraits sur les bactéries Gram+, Gram- et la levure *Candida albicans* (CMI en mg/ml)

Feuilles	Type d'extrait	Bactérie Gram +				Bactérie Gram -			Levure
		<i>S. aur</i>	<i>S. ora</i>	<i>S. épi</i>	<i>M.lut</i>	<i>E.coli</i>	<i>Ps.aer</i>	<i>P. vul</i>	<i>C. alb</i>
<i>M. sapuentum</i>	Hydroéthanolique	-	100	-	-	-	-	-	100
	Ethanolique	-	80	80	-	-	-	50	-
	Acétate d'éthyle	>360	>360	-	-	-	-	41,25	-
<i>T. geniculata</i>	Hydroéthanolique	100	100	100	6,25	-	50	100	-
	Ethanolique	100	6,25	100	-	-	-	-	-
	hexanique	-	-	-	-	100	-	-	-
<i>D. oliveri</i>	Ethanolique	1,56	-	1,56	1,56	3,12	10	-	100
	hexanique	-	-	100	6,25	100	100	-	-
	Acétate d'éthyle	-	-	100	-	0,78	1,56	-	-
<i>M. esculenta</i>	Ethanolique	-	-	>100	-	-	-	-	-
	Acétate d'éthyle	100	-	-	100	100	-	-	-

S. épi : *Staphylococcus épideididis*, *S. ora* : *Streptococcus oralis*, *M. luteus* : *Micrococcus luteus* ; *P. mir* : *Proteus mirabilis*, *Ps. aer* : *Pseudomonas aeruginosa*, *P. vul* : *Proteus vulgaris*, *C. albicans* : *Candida albicans*, *E. foe* : *Entérocooccus foecalis*,

Les CMI obtenues dans le présent travail sont très différentes de celles qui ont été rapportées par Sessou et al. (2013a) qui ont montré la possibilité d'utiliser l'huile essentielle extraite de *S. aromaticum* pour la conservation de wagashi contre la contamination des moisissures (Sessou et al., 2013c). On observe que les extraits des différentes feuilles utilisées à travers les CMI exercent différemment leurs actions sur les bactéries

Gram- et les Bactéries Gram +. Mais globalement les extraits sont moins actifs sur les Gram- que sur les Gram+. Cette observation pourrait s'expliquer par la nature ou la complexité de la structure et la nature des bactéries (Gram- et Gram+). En effet, la paroi des bactéries Gram+ est presque exclusivement constituée de peptidoglycane, auquel sont associés des polymères d'acide teichoïque (Guinoiseau, 2011). La paroi des

bactéries Gram- est plus complexe. Le peptidoglycane, réduit à une fine couche, est entouré par deux membranes. La membrane interne comporte majoritairement des phospholipides alors que la membrane externe présente une structure asymétrique, avec une face interne constituée de phospholipides et une face externe, caractérisée par la présence du lipopolysaccharide (LPS) (Cronan *et al.*, 1987). Le LPS représente 75% de la surface totale de la membrane externe et établit des interactions spécifiques avec des protéines membranaires, telles que les porines. Le LPS est constitué de trois domaines structuraux, comprenant le lipide A, qui assure son ancrage à la membrane externe, un oligosaccharide central et l'antigène O, formé de plusieurs unités oligosaccharidiques. Son caractère hydrophile rend la membrane externe des bactéries Gram négatives imperméable à la plupart des macromolécules hydrophobes. Cette particularité structurale est, en partie, responsable de la résistance intrinsèque des entérobactéries et de *P. aeruginosa* à certains antibiotiques hydrophobes, comme les macrolides

CONCLUSION

L'activité antibactérienne des quatre plantes utilisées comme emballage alimentaire a été réalisée sur dix souches de référence. A l'issue de cette étude, il ressort que *T. geniculata* est la plante la plus active suivi de *D. oliveri* tandis que *Musa spp* est la plante la moins active. De façon générale, les extraits sont actifs sur les

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre du Projet PROVEAO financé par l'UEMOA à qui nous exprimons nos remerciements et nos sentiments de profonde

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adejuwon A. O., Agbaje E. O., Idika N. (2011): Antifungal and antibacterial activities of aqueous and methanolic root extracts of *Carica papaya* linn. International Research Journal of Microbiology. 2: 270-277.

Adjanohoun E., Aké-Assi L., (1989): Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire. Université d'Abidjan. Centre National de Floristique, ronéoté, 358p.

Akinyemi K. O., Oladapo O., Okwara C. E., Ibe C. C., Fasura K. A. (2005): Screening of crude extracts of six medicinal plants used in South-West Nigerian unorthodox medicine for antimethicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. BMC

(Guinoiseau, 2011 ; Normak et Normak, 2002). La forte charge négative du LPS facilite néanmoins le passage des antibiotiques cationiques. Des modifications chimiques, visant à diminuer la charge négative nette du LPS, ont ainsi été observées dans certains cas de résistances. Le transfert de groupements polaires, comme la phosphoéthanolamine ou le 4-amino-4-désoxy-L-arabinose sur le lipide A, confère à certaines souches de *Salmonella enterica* une résistance accrue à la polymyxine B (Helander *et al.*, 1998)

Concentration Minimale Bactéricide (CMB) des différents extraits de plante : La CMB des tous les extraits a été déterminée conjointement à la CMI, la figure 4 montre l'aspect des boîtes après 24 h d'incubation. Les résultats montrent qu'aucun extrait des quatre plantes en étude ne dispose d'une Concentration Minimale Bactéricide à la dose correspondante à chaque type d'extrait. Toutes les CMB sont alors supérieures à la concentration de départ (Concentration de l'antibiogramme).

bactéries Gram+ que les Gram-. Les résultats montrent également que l'activité de chaque type d'extrait dépend de la polarité des phytomolécules à l'égard des solvants. Il faut retenir que les extraits des quatre plantes agissent à forte dose, par conséquent les quatre plantes étudiées n'ont pas une bonne activité antimicrobienne.

gratitude. Nos remerciements vont aussi à l'endroit des élus locaux, les enquêteurs et les productrices de denrées alimentaires enquêtées.

Complementary and Alternative Medicine. 5: 6-12.

Akoua-Koffi C., Guessennd N., Gbonon V., Faye-Kette A. Y. H., Dosso M. (2004): Methicillin resistant of *staphylococcus aureus* in Abidjan (1998-2001) : a new hospital problem. Médecines et Maladies Infectieuses. 34: 132-136.

Amadou B. S. (2004): Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutinosum* Perr. Thèse de pharmacie Université de Bamako. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie ,2p.

Anani K., Hudson J. B., de Souza L. C., Akpagana K., Towe G. H. N., Amason J. T., Gbeassor M. (2000): Investigation of medicinal plants of Togo

- for antiviral and antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*. 38: 40-45.
- Atefeibu E. S. I. (2002): Contribution à l'étude des tanins et de l'activité antibactérienne de *Acacia nilotica* var *adansonii*. Thèse de pharmacie Université de Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal, 37p.
- Attien P., Sina H., Moussaoui W., Dadié T., Chabi K., Djéni T., Bankole H.S., Kotchoni S.O., Edoh V., Prévost G., Djè M., and Baba-Moussa L. (2013)., "Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus* strains isolated from meat products sold in Abidjan streets (Ivory Coast)," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 7, no. 26, pp. 3285-3293,
- Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Turck M. (1966): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45: 493-496.
- Benbachir M., Benredjeb S., Boye C. S., Dosso M., Belabbes H., Kamoun A., Kane O., Elmdaghri N. (2001): Two-year surveillance of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in four African cities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45: 627-629.
- Biecke B. (2004): Etnobotanische studie van geneeskrachtige planten in Manigri en Igbère, Benin. Universiteit Gent., Bioingenieurin hetland, En Bos Beheer, 420p.
- Bruneton J. (1999). Les tanins. *Ed. médicales internationales, Paris*, 369-404.
- Carbannelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G. et Vargues R. (1987): Bactériologie médical. Techniques usuelles. Ed. SIMEP, Paris. p. 141-144.
- Dah-Nouvlessounon D, Adoukonou-Sagbadja H, Diarrassouba N, Sina H, Adjonohoun A, Inoussa M, Akakpo D, Gbenou JD, Kotchoni SO, Dicko MH, Baba-Moussa L (2015). Phytochemical analysis and biological activities of *Cola nitida* bark. *Biochem. Res. Int*. 2015:1-12.
- Delarras C. (1998). Microbiologie. 90 heures de travaux pratiques. *Gaétan Morien* Editeur, ISBN : 291074907X, 9782910749071 : 169-178.
- Delmas G., Le Querrec F., Weill F-X., Gallay A., Espié E., Haeghebaert S., Vaillant V. (2003): Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001-2003. Institut de veille sanitaire, Direction générale de l'alimentation, Centre national de référence des *Salmonella*.
- Doughari J.H., Pukuma M.S. et De N. (2007): Antibacterial effects of *Balanites aegyptiaca* L. Drel. and *Moringa oleifera* Lam. on *Salmonella typhi*. *African Journal of biotechnology*. 6 (19): 2212–2215.
- Guede-Guina F, Vangah-Mandah M, Bonga GM, de Souza C. Acticité antibactérienne d'un extrait végétale contre les germes opportunistes au cours du SIDA. *Rev Med Pharm* 1995 ; 9:13-9.
- Guinoiseau, E. (2011). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat soutenue le 6 Décembre 2010. Université de Corse-Pasquale Paoli, 149 pages.
- Helander IM, Alakomi HL, Latva, Kala K, Mattila, Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, von Wright A (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3590-3595
- Kacou-N'Douba A., Bouzid S. A., Guessened K. N., Kouassi M., Bengue A. A., Faye-Kette A. Y. H., Dosso M. (2001) : Antimicrobial resistance of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* in health carriers/ report of a study in 5-year-olds in marcory; Abidjan Côte d'Ivoire. *Annals of Tropical Paediatrics: International child health*. 21: 149-154.
- Kinyamasyo E. M, Mwangandi C. L, Kaingu F B & Gicharu G. K (2014). In Vitro Analysis of Antibacterial and Antifungal Potency of Tissue Cultured and Indigenous Aloe Secundiflora Plant Extracts. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences* 3(2) 53-64.
- Kokora P. A. et al., (2013): Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of four medicinal plants on the *in vitro* growth of *escherichia coli* and *staphylococcus aureus*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 3:113-116
- Maghrani M., Zeggwagh N., Michel J., Eddoules M. (2005): Antihypertensive effect of *Lepidium sativum* L. in spontaneously hypertension rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 100: 193-197.
- Majdi A. (2008): Maitrise de la technologie fromagère et contrôle qualité des fromages. Consulté le 02 décembre 2013. http://www.memoireonline.com/01/13/6660/m_maitrise
- Millogo-Koné H., Guissou I. P., Nacoulma O., Traore A. S. (2008): Antimicrobial effects of the stem bark extracts of *Parkia biglobosa* (Jacq.) benth. on *shigellae*. *African Journal Traditional of complementary and alternative medecines*. 4: 392 – 396.

- Minh N.D. (1983): Des plantes médicinales à propriétés antibactériennes. La revue française de Médecine Traditionnelle Chinoise. 100: 303-312.
- Moroh J. L. A., Bahi C., Dje K., Loukou Y. G., Guedeguina F. (2008): Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance *in-vitro* des souches d'*Escherichia coli*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège. 77: 44-61.
- N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G. N., Traoré D., Aké- Assi L. (2009): Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). Sciences et Nature.6: 1-15.
- Nascimento G. G. F., Locatelli J., Freitas P. C., Silva G. L. (2000) : Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Brazil Journal Microbiology 31: 247-256.
- Normak HB, Normak S (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. Journal of International Medicine 252: 91-106
- Onzo C. F. 1,2, Azokpota P, Agbani P, Gbaguidi F, Hounhouigan J.D., Et Kossou D. (2014). Caractéristiques physico-chimiques, phytochimiques et toxicité des espèces végétales utilisées comme emballages alimentaires en Afrique de l'Ouest. Int. J. Biol. Chem. Sci. 8(4): 1504-1516.
- Organisation Mondiale de la Santé (2002). Stratégies de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005, Genève.
- Ortuno A., Baidez A., Gomez P., Arcas M.C., Porras I., Garcia-Lidon A., Del Rio J.A. (2006). *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids. Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. Food Chem., 98 (2): 351-8.
- Parveen J, Ismail A. K, Erlina A, Raha A.R and Yumi Z.H. (2011). Phytochemical screening for antibacterial activity of potential Malaysian medicinal plants. African Journal of Biotechnology Vol. 10(81), pp. 18795-18799.
- Patel J. P., Gami B., Patel K. and Solanki R. (2011). Antibacterial activity of methanolic and acetone extract of some medicinal plants used in indian folklore. International Journal of Phytomedicine 3 (2011) 261-269.
- Sanogo R., Diallo D., Diarra S., Ekoumou C., Bougoudogo A. (2006) : Activité antibactérienne et antalgique de deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. Mali Médical. 21: 18-24.
- Sessou P., Farougou S., Azokpota P., Youssao I., Sohounhloué D. (2012a). *In vitro* antifungal activities of essential oils extracted from fresh leaves of *Cinnamomum zeylanicum* and *ocimum gratissimum* against foodborne pathogens for their use as traditional cheese wagashi conservatives. Research Journal of Recent Sciences, 1(9):67-73.
- Sessou P., Farougou S., Alitonou G., Djenontin T.S, Yèhouénou B., Azokpota P., Youssao I., Sohounhloué D. (2012b). Chemical composition and antifungal activity of essential oil of fresh leaves of *Ocimum gratissimum* from Benin against six mycotoxigenic fungi isolated from a traditional cheese wagashi. International Research Journal of Biological Sciences, 1(4):22-27.
- Sessou P., Farougou S., Noudogbessi J.P., Fanou B., Azokpota P., Youssao I., Sohounhloué D. (2012c). Chemical composition and *in vitro* antifungal activity of *Zingiber officinale* essential oil against foodborne pathogens isolated from a traditional cheese wagashi produced in Benin. International Journal of Biosciences, 2(9):20-28
- Sessou P., Farougou S., Ahounou S., Yedomonhan H., Azokpota P., Youssao I., Sohounhloué D. (2013a). Comparative study of antifungal activities of six selected essential oils against fungal isolates from cheese wagashi in Benin. Pakistan Journal of Biological Sciences, 16(23):1751-1757.
- Sessou P., Farougou S., Yèhouénou B., Agniwo B., Alitonou G., Azokpota P., Youssao I., Sohounhloué D. (2013b). Biological control of spoilage and pathogens moulds in culture medium and Beninese traditional cheese wagashi by *Syzygium aromaticum* essential oil. African Journal of Microbiology Research, 7(21):2454-2463.
- Sessou P., Farougou S., Azokpota P., Youssao I., Yèhouenou B., Ahounou S., Sohounhloué D. (2013c). Endogenous methods for preservation of wagashi, a Beninese traditional cheese. African Journal of Agricultural Research, 8 (31), 4254-4261.

- Sharmila N., Gomathi N. (2011). Antibacterial, Antioxidant activity and Phytochemical studies of *Crossandra infundibuliformis* leaf extracts. International Journal of Phytomedicine 3 (2011) 151-156.
- Sina H., Baba-Moussa F., Ahoyo T. A., Mousse W., Anagonou S., Gbenou J. D., Prévost G., Kotchoni S. O., Baba-Moussa L. (2011): Antibiotic susceptibility and Toxins production of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples from Benin. African journal of Microbiology Research. 5: 2797-2808.
- Sopkon N., Ouinsavi C. (2002) : Utilisations du *Khaya senegalensis* en médecine traditionnelle au Bénin. Revue de Médecine et Pharmacopées Africaines. 16: 9-19.
- Sukesh K, Shafi Thompson T, Densingh J (2011). Phytochemical investigation and antibacterial activity of *Gymnema sylvestre* and *Andrographis paniculata* from western ghats. International Journal of Phytomedicine 3 (2011) 254-260.
- Thangara J.H.S., Adjei O., Allen B.W.et Portaels F. (2000): *In vitro* activity of ciprofloxacin, Sparfloxacin, Ofloxacin, Amikacin and Rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*. Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45 (2): 231-233.