

**ORIGINAL ARTICLE**

# Traitement Alternatif a Base Plante De L'eau Contaminée : Cas De L'activité Antimicrobienne Des Extraits Des Plantes *Bidens Pilosa* Et *Moringa Stenopetala* Sur *Vibrio Cholerae* Et *Aeromonas Hydrophila* Isolés Du Cours D'eau Olézoa, Centre Cameroun

Olive Vivien Noah Ewoti<sup>1\*</sup>, Lucie Leme Banock<sup>1</sup>, Gaëlle Takoukam Mba<sup>1</sup>, et Serge Hubert Zébazé Togouet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Hydobiology and Environment, Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Sciences, University of Yaounde 1, PO Box 812

\*Corresponding Author: Olive Vivien Noah Ewoti,

Associate Professor, Laboratory of Hydobiology and Environment, Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Sciences, University of Yaoundé 1, PO Box 812.

**Résumé :**

La présente étude vise de façon générale à étudier l'activité antimicrobienne des extraits de *Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala* sur la cultivabilité de certains microorganismes aquatiques d'importance sanitaire. Les plantes *B. pilosa* et *M. stenopetala* ont été récoltées puis séchées et broyées avant de subir une extraction par macération. Les différents extraits préparés aux concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 g/L et laissés aux températures d'incubation 37°C et 44°C ont servi à la détermination des différentes activités antimicrobiennes par les méthodes d'étalement à la surface des milieux gélosés et de microdilution en milieu liquide réalisées sur deux espèces microbiennes isolées des eaux de l'environnement de Yaoundé *Aeromonas hydrophila* et *Vibrio cholerae*. Le criblage phytochimique a révélé la présence des classes de métabolites secondaires telles que les alcaloïdes, les polyphénols, les saponosides, flavonoïdes entre autres. Les différents extraits ont présenté des activités variables sur les microorganismes aquatiques testés. L'extrait aqueux et hydroéthanolique a montré une activité remarquable (100 % d'inhibition entre 9h et 24h) sur *B. pilosa*. En ce qui concerne *M. stenopetala*, l'extrait hydroéthanolique a montré une activité remarquable sur *A. hydrophila* de même que l'extrait aqueux sur *V. cholerae*. Les taux d'inhibition de la cultivabilité cellulaire les plus élevées ont été enregistrées aux concentrations d'extrait de 1,5g/L et 2 g/L. La température du milieu influence significativement l'inhibition bactérienne ( $P < 0,05$ ), la meilleure activité a été observé à 44°C. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits variaient de 0,488 à 62,5 mg/mL. Les souches testées ont montré une certaine activité pour certains extraits. L'extrait aqueux et hydroéthanolique de *Bidens pilosa* ont possédé une meilleure activité avec un important effet bactéricide et les CMI ont varié entre 0,97 et 1,95 mg/mL pour *A. hydrophila* et entre 0,488 et 62,5 mg/mL pour *V. cholerae*. De même que l'extrait aqueux de *M.stenopetala* sur *V.cholerae* (CMI=0,488mg/mL). Les résultats obtenus justifient l'utilisation alternative de ces plantes dans la réduction du flux de bactériopolluants contenus dans les eaux destinées à la consommation et dans le traitement des maladies hydriques.

**Mots clés :** Extraits, criblage phytochimique, antibiotique, activité antimicrobienne, *Bidens pilosa*, *Moringa stenopetala*

**Abstract**

The general aim of the present study is to assess the sensitivity of *Bidens pilosa* and *Moringa stenopetala* extracts to the cultivability of certain aquatic microorganisms of health importance. The *B.pilosa* samples were collected in Nomayos and the *M.stenopetala* sample in Damascus, then dried and ground respectively, before undergoing extraction by maceration.

The various extracts prepared at concentrations of 0.5; 1; 1.5 and 2 g/L and stored at incubation temperatures of 37°C and 44°C were used to determine the different antimicrobial activities by agar surface spreading and liquid microdilution methods performed on two microbial species isolated from Yaoundé environmental waters: *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio cholerae*. Phytochemical screening revealed the presence of secondary metabolite classes such as alkaloids, polyphenols, saponosides, flavonoids and others. The different extracts showed variable activity on the aquatic microorganisms tested. The aqueous and hydroethanol extracts showed remarkable activity (100% inhibition between 9h and 24h) on *B.pilosa*. With regard to *M.stenopetala*, the hydroethanol extract showed remarkable activity against *A.hydrophila*, as did the aqueous extract against *V.cholerae*. The highest rates of inhibition of cell cultivability were recorded at an extract concentration of 2 g/l. The temperature of the medium significantly influenced bacterial inhibition ( $P < 0.05$ ), with the best activity observed at 44°C. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of the extracts ranged from 0.488 to 62.5 mg/mL. The strains tested showed some sensitivity to certain extracts. The aqueous and hydroethanol extracts of *Bidens pilosa* showed the best activity, with a significant bactericidal effect and MICs ranging from 0.97 to 1.95 mg/mL for *A. hydrophila* and from 0.488 to 62.5 mg/mL for *V. cholerae*. The same applies to the aqueous extract of *M. stenopetala* on *V. cholerae* (MIC=0.488mg/mL). The results obtained justify alternative use of these plants to reduce the flow of bacterial pollutants contained in drinking water and in the treatment of water-borne diseases.

**Key words:** Extracts, phytochemical screening, antibiotic, antimicrobial activity, *Bidens pilosa*, *Moringa stenopetala*.

**Introduction**

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

Cette insuffisance amène les populations à se tourner vers d'autres sources alternatives d'approvisionnement en eau de qualité microbiologique douteuse telles les eaux issues de milieux lents (puits, sources, forages) et les rivières (Baleng et al., 2021). D'autres études menées dans quelques sources et forages des villes

de Yaoundé et de Douala ont montré qu'il existe un lien entre la contamination des différents points d'approvisionnement en eau et les maladies hydriques enregistrées dans les hôpitaux des dites zones notamment les gastro-entérites (Ako et al., 2009 ; Noanja et al., 2014. ; Baleng et al., 2021). Une étude plus récente a montré la sensibilité ou la résistance *Salmonella typhi* et *Shigella sp* isolés du bassin versant du cour d'eau Olezoa a quelques antibiotiques (Leme Banock et al., 2023) .

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

la consommation (Gamage et Zhang, 2010).

Pour remédier à cette situation, des méthodes de désinfection de l'eau par des extraits de plantes ont été proposées comme nouvelles alternatives dans le traitement des eaux de consommation. De même, ces dernières années, diverses ressources naturelles, en particulier les plantes médicinales ont été utilisées par la médecine traditionnelle pour lutter contre les maladies hydriques (Tawfeek et al., 2021 ; Atrahimovich et al., 2021). La richesse des plantes en métabolites secondaires et leur accessibilité justifient leurs usages en médecine traditionnelle par la population africaine (près de 80 %) qui parfois de façon concomitante font recours aux médicaments conventionnels (Tawfeek et al., 2021). Ces plantes sont dotées de plusieurs activités biologiques (antibactérienne, antifongique, antivirale, anti-inflammatoire et même antioxydante) (Ndoye, 2016 ; Nyegue et al., 2017 ; Ngongang et al., 2018 ; Moni, 2019). L'Afrique en général et le Cameroun en particulier regorge d'une grande variété de plantes naturelles, utilisées en médecine traditionnelle pour soigner plusieurs maladies. Ainsi, *Bidens pilosa* de la famille des Astéracées est une plante utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de la fièvre. De plus, le broyat des feuilles sert à accélérer la coagulation du sang dans les plaies fraîches et au traitement des otites. De même, cette décoction de poudre de feuilles est utilisée pour traiter les problèmes rénaux ; et une tisane à base de plante diminue les flatulences (Bartolomé et al., 2013). Par ailleurs, *Moringa stenopetala* de la famille des Moringacées est utilisé dans le traitement des maladies inflammatoires et infectieuses (Ferreira et al., 2007).

Malgré ces informations, l'on dispose de peu de données sur les classes des composés chimiques de ces plantes susceptibles d'avoir une activité antibactérienne et utilisé comme produit alternative dans le traitement des eaux bactérioccontaminées. On sait peu de choses sur l'influence de la variation de la concentration et de la température sur la cultivabilité des bactéries isolées des eaux. De plus, la comparaison des extraits aqueux et des extraits hydroéthanoliques avec un antibiotique de référence n'a pas encore été élucidée. La présente étude vise à étudier l'activité antimicrobienne des extraits de plantes *Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala* vis-à-vis des

bactéries *Vibrio cholerae* et *Aeromonas hydrophila* lors du traitement d'une eau contaminée et la comparaison de cette activité par rapport à un antibiotique de référence.

### Matériel et méthodes

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

### Préparation des extraits

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

#### Préparation des extraits aqueux

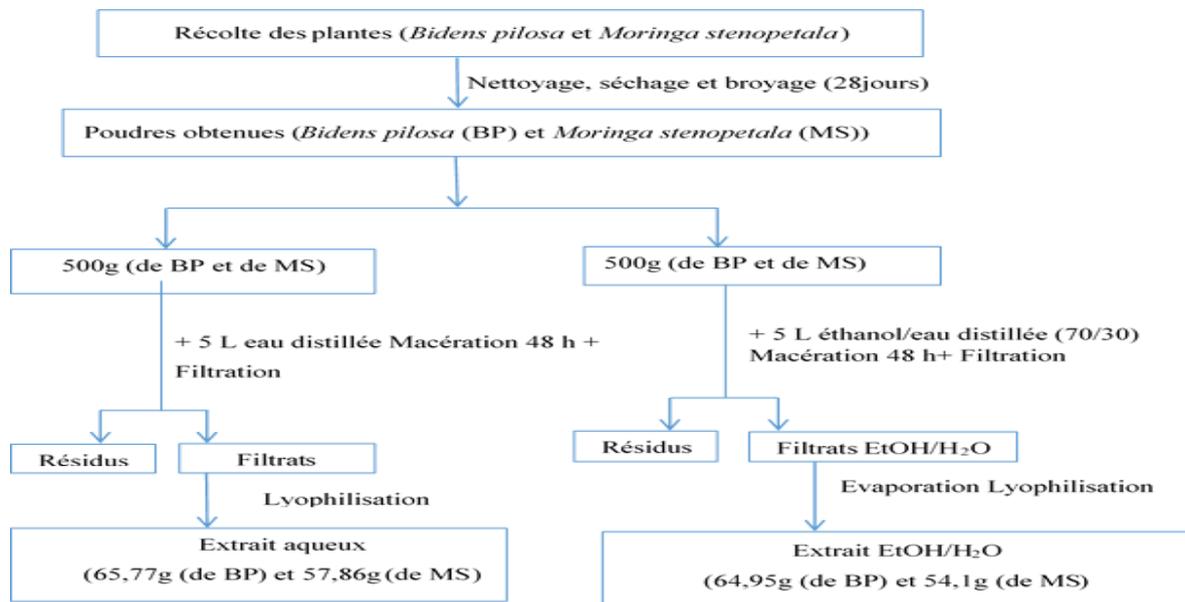
500g du broyat des feuilles de *B. pilosa* et de *M. stenopetala* ont été mélangés à 5000mL d'eau distillé respectivement pendant 48h et remué matin et soir. Le macérât obtenu a été filtré successivement à l'aide du coton et du papier Whatman n° 4. 4328mL et 4845mL de filtrat de feuille des différentes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

#### Préparation des extraits hydro éthanoliques

La figure 1 présente le protocole d'extraction par macération des extraits aqueux et hydroéthanoliques des différentes plantes. Pour l'obtention des extraits hydroéthanoliques, les solvants utilisés étaient l'éthanol à 70° et l'eau distillée. 500g du broyat des feuilles ont été macérés respectivement à 5000 mL du mélange éthanol /eau distillée dans les proportions 70/30, pendant 48 h et remué matin et soir. Le macérât obtenu a été filtré successivement à l'aide du coton hydrophile et du papier Whatman n°4. 4984mL et 4979mL de filtrat des feuilles des différentes plantes ont été séchés au rotavapor dans un premier temps, ensuite à l'étuve à une

température de  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  jusqu'à évaporation totale du solvant. Après séchage, 64,95g feuilles de *Bidens pilosa* et 54,1g de feuilles de *Moringa stenopetala* ont été obtenus des extraits

éthanoliques. Les extraits obtenus sous forme pâteuse ont été introduits dans les flacons en verre stériles puis conservé au frais.



**Figure 1: Protocole d'extraction par macération des extraits hydroéthanoliques et extraits aqueux.**

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

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

R= rendement

#### Criblage phytochimique

Le screening phytochimique est un test qualificatif permettant de mettre en évidence les composés chimiques (composés bioactifs) se trouvant dans un produit végétal. Le principe du criblage phytochimique est basé sur la formation des complexes insolubles, utilisant respectivement des réactions de précipitation et de coloration, dues à la formation d'une conjugaison ou d'une insaturation dans la molécule. L'intensité de la coloration ou le degré de turbidité sera ainsi proportionnel à la quantité de complexes formés (Harbone, 2001 ; Nguessan *et al.*, 2009 ; Alilou *et al.*, 2014 et Mbayo *et al.*, 2015).

#### Recherche des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir du réactif de Dragendorff (iodo-bismuthate de potassium) et de Mayer (réactif iodomercurique). A 20 mL de solution mère, on ajoute 4 mL d'acide sulfurique 10 %. On transfère par la suite 5 mL de

solution obtenue dans trois tubes numérotés 1 à 3. Dans le tube 1, on ajoute trois gouttes du réactif de Mayer et on laisse agir pendant 15 minutes. La présence d'alcaloïdes est mise en évidence par l'apparition d'un précipité blanc jaune ou jaune clair. Dans le tube 3, on ajoute trois gouttes du réactif de Dragendorff, l'apparition d'un précipité jaune-orangé indique la présence des alcaloïdes. Le tube 2 sert de témoin négatif.

#### Mise en évidence des phénols totaux

Les polyphénols ont été recherchés par le test au chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ). Dans un tube contenant 2 mL d'extrait, on ajoute quatre gouttes d'une solution de perchlorure de fer dilué à 10 %. L'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence des polyphénols.

#### Mise en évidence des flavonoïdes

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

- Rose orangé : présence des flavones ;
- Rose violacé : présence des flavanones ;

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

### Mise en évidence des tanins

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

### Mise en évidence des anthocyanes

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

### Mise en évidence des anthraquinones

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

### Mise en évidence des triterpènes et stéroïdes

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

### Recherche des saponines

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

### Test d'identification des hétérosides cardiotoniques

A 2 mL d'extrait, on ajoute 1 mL d'acide acétique glacial, puis une à deux gouttes de FeCl<sub>3</sub> et 1 mL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. L'apparition d'un anneau brun à l'interface indiquera la présence des hétérosides cardiotoniques. Un anneau violet pourra également apparaître sous l'anneau brun.

### *Evaluation de l'influence de la température, la durée d'incubation sur l'activité antimicrobienne de Bidens pilosa et Moringa stenopetala*

#### *Isolement, identification et préparation des suspensions des microorganismes*

#### *Isolement et identification des bactéries*

La technique d'étalement en boîtes de pétri et la technique de filtration sur membrane ont été utilisées pour la collecte des souches de bactéries dans les échantillons d'eau issus de l'environnement plus précisément dans le cours d'eau Olézoa (Yaoundé) dans des flacons en verre stériles de 250 mL (Holt *et al.*, 2000). *Vibrio cholerae* a été isolé sur le milieu gélosé TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose), incubé à la température de 37°C pendant 24 à 48 heures. Les colonies jaunes ont été cultivées sur la gélose ordinaire et coulées en pente pour les analyses biochimiques. L'isolement de *Aeromonas hydrophyla* a été effectué par la technique des membranes filtrantes sur le milieu gélosé ADA (*Ampiciline Dextrine Agar*), coulé en boîte de Pétri et incubé à la température de 37°C pendant 24 heures. Les colonies jaunes, ont été repiquées sur la gélose ordinaire coulée en pente pour les analyses biochimiques.

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

#### Préparation des suspensions des différents microorganismes

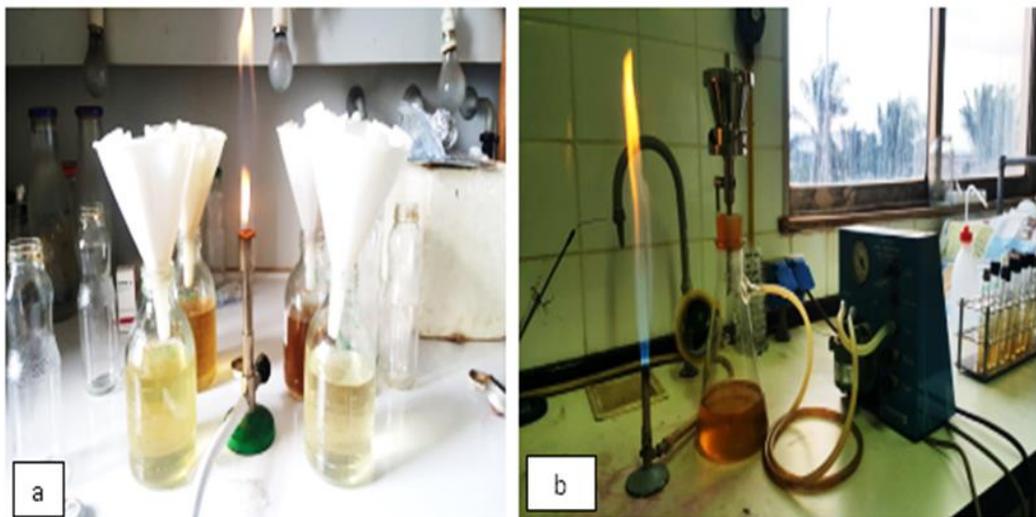
Les bactéries ont été activées sur la gélose ordinaire coulée en pente dans les tubes à essai stériles. Pour la préparation d'inoculum des bactéries. Les suspensions des différents microorganismes ont été réalisées sur des cultures âgées de 18 à 24 h, introduites dans une solution stérile de NaCl (8,5g / L) et comparées au standard 0,5 Mc Farland (0,5mL de 0,48 mol / L BaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O à 1,175% p / v) La concentration des bactéries dans la suspension mère a été de l'ordre

de  $2 \times 10^5$  UFC/mL. Quatre dilutions décimales pour *V. cholerae* et *A. hydrophila* ont ensuite été réalisées à partir de cette suspension mère, ceci dans le but de réduire la charge bactérienne (Diagnostic Pasteur, 1987). Par la suite, 0,1 mL de la suspension bactérienne a été prélevé à l'aide d'une pipette stérile et introduit dans les tubes à essai contenant 10 mL de solutions d'extrait aqueux et hydroéthanolique de *Bidens pilosa* et de *Moringa stenopetala* de concentration connue et dans 10mL d'eau physiologique uniquement pour la solution témoin. Cette opération a été réalisée en condition stérile autour d'un bec Bunsen avec un diamètre de 30cm et un rayon de sécurité de

15cm afin de limiter toute contamination (Tamsa, 2017).

### Préparation des solutions d'extrait

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



**Figure 2 : dispositif de filtration sous pression des extraits (source présente étude) : (A) filtration sur papier Whatman; (B): filtration sous vide avec une membrane en nitrate de cellulose de porosité 0,45 $\mu\text{m}$ .**

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

Après l'inoculation des espèces de bactéries dans 80 tubes à essai préalablement stérilisés à 121°C à l'autoclave pendant 15min, puis étiquetés contenant chacun une solution d'extrait de la plante. Ces derniers ont été reparti en 6 lots représentant les 2 espèces microbiennes et les 4 extraits (aqueux et hydroéthanoliques) des deux plantes. Soit 18 tubes pour *Vibrio cholerae* 18 tubes pour *Aeromonas hydrophila*. Chaque lot était constitué par des quadruplets de 11 tubes représentant les extraits de chaque plante étudié (11 tubes pour l'extrait hydro et 11 tubes pour l'extrait aqueux de la plante *Moringa stenopetala* ; 11 tubes pour l'extrait hydro et 11 tubes pour

l'extrait aqueux de la plante *Bidens pilosa*) qui tous étaient incubés aux températures 37°C et 44°C. Les analyses ont été faite après 3h, 6h, 9h et 24h de séjours des microorganismes dans l'extrait aqueux. Le même processus a été appliqué pour l'extrait hydroéthanoliques. La figure 12 montre les solutions de l'extrait de *Bidens pilosa* et de *Moringa stenopetala* dans les tubes à essai incubé à l'étuve.

### Analyse Microbiologique

Les analyses microbiologiques ont porté sur l'aspect quantitatif, réalisées en conditions stériles à côté d'une flamme de bec-bunsen. Elles ont été effectuées après 3 h, 6 h, 9 h et 24h d'incubation, en prélevant après homogénéisation 100  $\mu\text{L}$  de l'échantillon à analyser qui a été par la suite étalé à la surface du milieu de culture spécifique (gélose

TCBS pour *Vibrio cholerae* et gélose ADA pour *Aeromonas hydrophyla*). Le milieu a été préalablement séché dans une étuve à 44 °C selon la technique d'étalement en surface (Diagnostic Pasteur, 1987). La durée d'incubation a été de 24 h pour *V. cholerae* et *A. hydrophyla* à la température 37°C. Le dénombrement de germes viables isolés a été effectué par comptage direct sur boîte de pétri à l'aide d'un compteur de colonie de marque OSI. Les abondances bactériennes ont été exprimées en Unités Formants Colonies (UFC).

### **Comparaison de l'activité des extraits de *Bidens pilosa* et de *Moringa stenopetala* avec celle de la lévofloxacine**

#### **Détermination des paramètres d'inhibition**

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

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

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

Pour déterminer les CMI, une préparation de la solution mère d'extrait de concentration 500 mg/mL a été réalisé dans un volume de 5ml d'eau physiologique stérile. Le mélange obtenu a été homogénéisé au vortex ensuite, 5 ml du mélange a été prélevé puis filtré sur une membrane de porosité 0,20 µm. La solution mère de l'antibiotique de concentration 500mg/ml a été préparée dans un volume de 5 ml d'eau physiologique. Dans les puits des colonnes 1, 2 et 3 correspondants aux réplifications, il a été introduit une série de volume de 100 µL de solution mère d'extrait diluée, successivement afin d'obtenir une gamme de neuf concentrations allant de 500 à 0,488 mg/mL. La CMI correspond à la concentration du puits non coloré en rouge et dans lequel il y a la plus faible quantité de métabolite secondaire. Les tests ont été répétés en triplicata.

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

Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) des extraits

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

#### **Signification du rapport CMB/CMI**

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

- CMB/CMI ≤ 4, extrait bactéricide

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

#### Analyse des données

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

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

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

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

Les degrés de liaison entre les abondances microbiennes et durées d'incubation pour chaque concentration d'extrait d'une part, et entre les abondances microbiennes et les concentrations d'extrait pour chaque durée d'incubation, ont été

évalués par les tests de corrélations «  $r$  » de Spearman. Les comparaisons des moyennes de données ont été réalisées à l'aide du test H de Kruskal-Wallis et le test T de Wilcoxon. Toutes ces analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel R.

#### Résultats et discussion

Classe des composés chimiques des plantes susceptibles d'avoir des activités antibactériennes

Rendements d'extraction et caractérisation des extraits obtenus

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

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

Solvants	Masses de la poudre(g)		Masses de l'extrait (g)	Rendements (%)	Caractéristiques physiques
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<i>M.stenopetala</i>	500	57,86	11,57	Verte et aspect solide
	<i>B. pilosa</i>	500	65,77	13,15	Marron verdâtre
<b>EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30)</b>	<i>M.stenopetala</i>	500	54,1	10,82	Verte et aspect solide
	<i>B. pilosa</i>	500	64,95	12,99	Marron sombre

#### Criblage phytochimique

Un test qualitatif de mise en évidence des différents groupes de métabolites secondaires susceptibles d'être responsables de l'activité antimicrobienne a été réalisé et les résultats sont présentés dans le tableau II il ressort dans l'ensemble que quelques soit l'extrait et la plante

considérée, on note la présence des alcaloïdes, polyphénols, tanins et flavonoïdes entres autres (Tableau II). Le métabolite anthocyanine est absent dans les extraits de la plante *M. stenopetala*. Le même résultat a été obtenu avec le métabolite anthraquinone dans tous les extraits de *B. pilosa* et *M. stenopetala*.

**Tableau II : Criblage phytochimique des extraits de différentes plantes**

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

Flavonoïdes	+	+	+	+
Triterpènes	+	+	+	+
Stéroïdes	+	+	+	+
Anthocyanines	+	-	+	-
Anthraquinones	-	-	-	-

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

### Identifications biochimiques (Recherche des enzymes spécifiques)

Après isolement, les résultats des analyses biochimiques effectués sur *A. hydrophila* et *V. cholerae* sont consignés dans le tableau III. Dans l'ensemble, il a été observé que ces deux espèces

montrent des réactions qui témoignent la présence des enzymes catalase, oxydase ainsi qu'une réaction positive à leur mobilité sur le milieu mannitol-mobilité coulé en tube. Ces deux espèces produisent des gaz qui forment des bulles sur le Kligler-Hajna. Elles ne réduisent pas les substrats tels que le lactose ou glucose.

**Tableau III : Résultats de quelques tests biochimiques réalisés sur**

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

+ : test positif ; - : test négatif

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

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

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

En présence des extraits aqueux et hydroéthanoliques de *Bidens pilosa*, les densités cellulaires *A. hydrophila* observées ont diminué dans l'ensemble en comparaison aux témoins l'eau physiologique (NaCl : 0,85%). Ainsi, avec

l'augmentation de la concentration des extraits hydroéthanolique des feuilles de *Bidens pilosa* les abondances cellulaires de *Aeromonas hydrophila* à 37°C ont fluctué de 309 à 130 ; 320 à 136 ; 333 à 76 et de 289 à 56 (UFC/100 mL), aux périodes d'incubation de 3h, 6h, 9h et 24h respectivement. Aucune baisse totale des densités à toutes les concentrations et à la température 37°C n'a été observé. Par contre, une diminution totale de la densité est obtenue aux concentrations 1,5g/L et 2 g/L à 3h avec l'extrait aqueux à la température 37°C.

Lorsque la concentration de l'extrait aqueux de *Bidens pilosa* augmente, on assiste à une diminution des abondances cellulaires de *Aeromonas hydrophila* de 276 à 3 ; 236 à 6 ; 159 à 1 et 31 à 0 (UFC/100 mL), respectivement à la

température 44°C. Ces résultats se traduisent par une baisse générale de ces abondances à toutes les concentrations et en fonction de la concentration et du temps d'incubation.

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

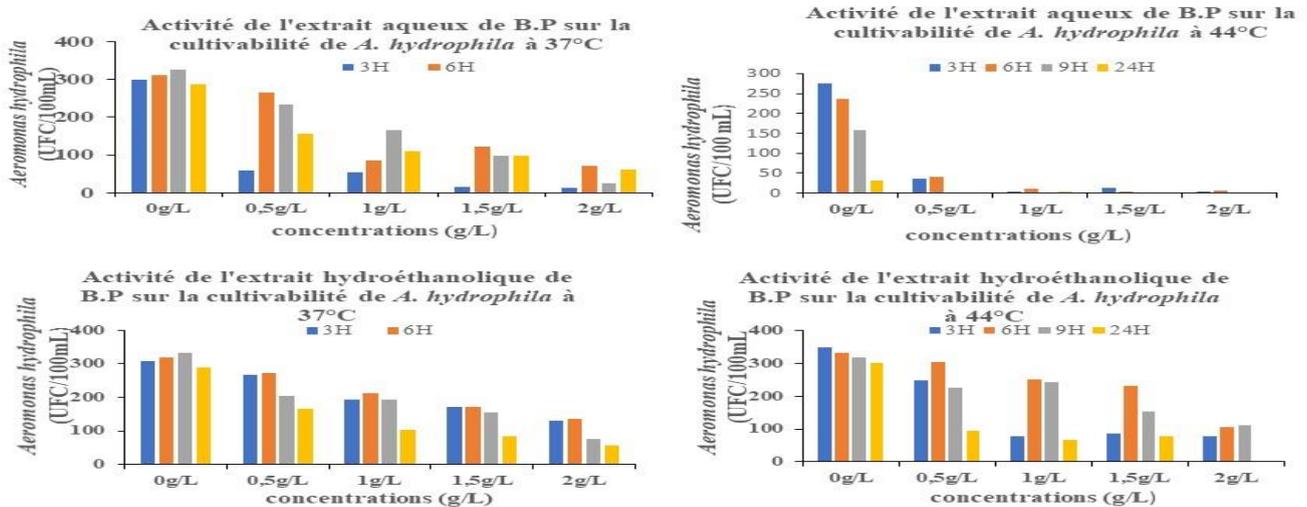


Figure 3 : Variation temporelle des densités cellulaires d’*Aeromonas hydrophila* en présence des extraits aqueux et hydroéthanolique de *Bidens pilosa* à 37°C et 44°C.

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

Les pourcentages d’inhibition de la croissance d’*A. hydrophila* pour chaque type d’extrait de *Bidens pilosa* ont été calculés après chaque

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

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

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

**Variation temporelle des abondances de *Aeromonas hydrophila* en présence des extraits**

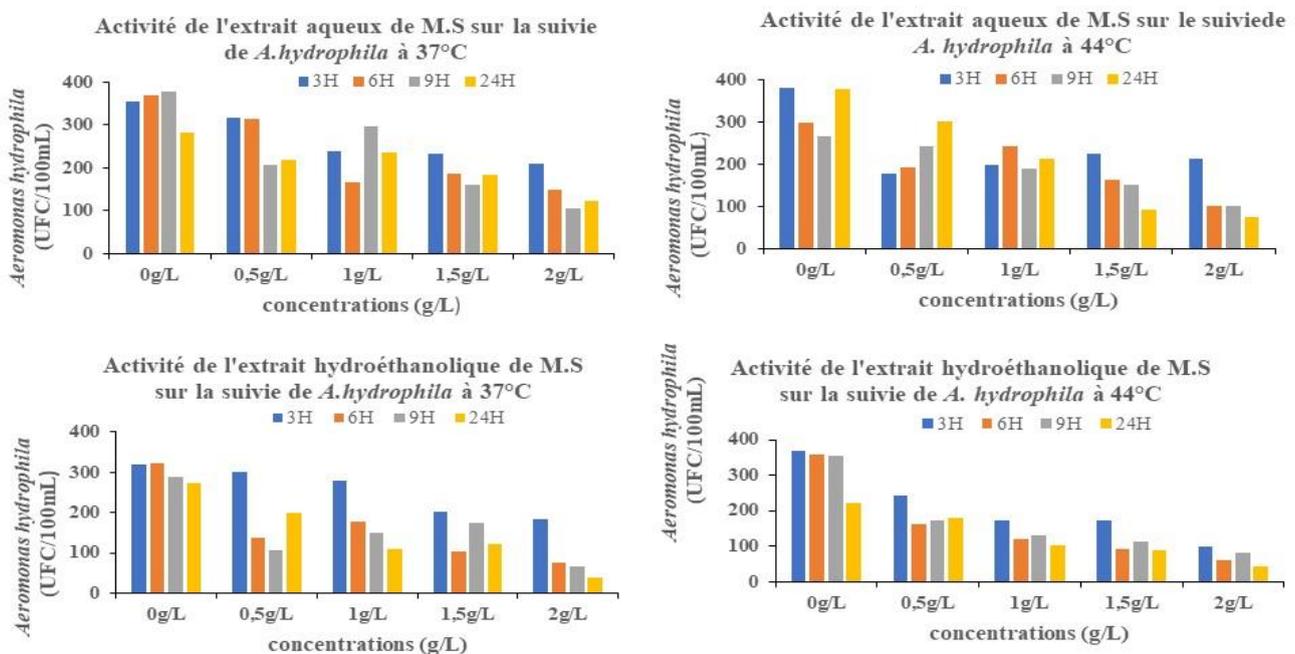
**de *Moringa stenopetala* aux températures 37°C et 44°C**

Avec l'augmentation de la concentration de l'extrait aqueux du *Moringa stenopetala*, à 37°C il a été observé par rapport aux témoins une diminution des abondances des cellules de *Aeromonas hydrophila*. Ils ont varié entre 360 et 184 ; 320 et 76 ; 287 et 67 ; 272 et 38 (UFC/100 mL), respectivement aux temps d'incubation (3h, 6h, 9h et 24h) (figure 4). Il a été noté en générale une baisse de ces abondances en fonction du temps d'incubation. Mais aucune inhibition totale à toutes les concentrations et températures n'a été observé. Avec l'extrait hydroéthanolique de la même plante à 37°C, une inhibition totale est obtenue à la concentration 2 g/L à 24h.

Par rapport à la variation croissante de la concentration de l'extrait aqueux du *Moringa*

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

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



**Figure 4 : Variation temporelle des densités cellulaires de *Aeromonas hydrophila* en présence des extraits aqueux et hydroéthanoliques de *Moringa stenopetala* à 37°C et 44°C.**

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

Les pourcentages d'inhibition de la croissance de *A. hydrophila* ont été calculés pour chaque type d'extrait *Moringa stenopetala* à chaque température et durée d'incubation (tableau V). Ces

pourcentages d'inhibition varient dans l'ensemble de 2,94% obtenu après 3h d'incubation à la concentration de 0,5 g/l en présence de l'extrait aqueux à 89,78% observé en présence de l'extrait hydroéthanolique après 24h d'incubation à la concentration 2 g/l. l'inhibition est la plupart du temps plus marquée en présence d'extrait hydroéthanolique de *M. stenopetala*.

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

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

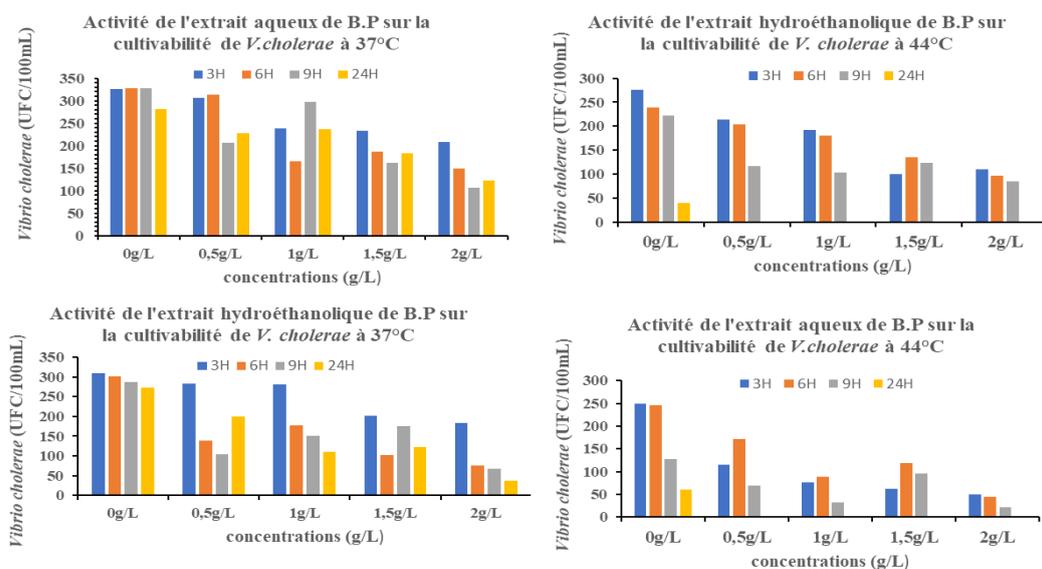
**Variation temporelle des abondances de *Vibrio cholerae* et pourcentage d'inhibition en présence des extraits des plantes *Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala* aux températures 37°C et 44°C**

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

Il a été obtenu que quand la concentration de l'extrait aqueux de *Bidens pilosa* augmente, on assiste à une diminution des abondances cellulaires de 320 à 208 ; 328 à 98 ; 308 à 106 et 270 à 123 (UFC/100 mL), à la température 37°C respectivement. En présence de l'extrait

hydroéthanolique à la même température, les abondances les plus faibles ont été de 200, 111, 122 et 38 (UFC/100 mL) après 24h d'incubation aux concentrations de 0,5 g/l, 1 g/l, 1,5 g/l, et 2 g/l respectivement.

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



**Figure 5 : Variation temporelle des densités cellulaires de *Vibrio cholerae* en présence des extraits aqueux et hydroéthanoliques de *Bidens pilosa* à 37°C et 44°C.**

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

Les pourcentages d'inhibition de la croissance de *Vibrio cholerae* ont été calculés pour chaque type d'extrait de *Bidens pilosa* et pour chaque température et durées d'incubations (tableau VI). Il en ressort dans l'ensemble que le pourcentage

d'inhibition le plus élevé (100%) a été obtenu avec l'extrait aqueux et l'extrait hydroéthanolique aux concentrations 0,5g/L-2g/L après 24 h d'incubation à la température de 44°C. Toutefois, il est à constater que dans l'ensemble, les pourcentages d'inhibition diminuent après 6h et 9h quel que soit la concentration de l'extrait de *B. pilosa* considérée à 44°C.

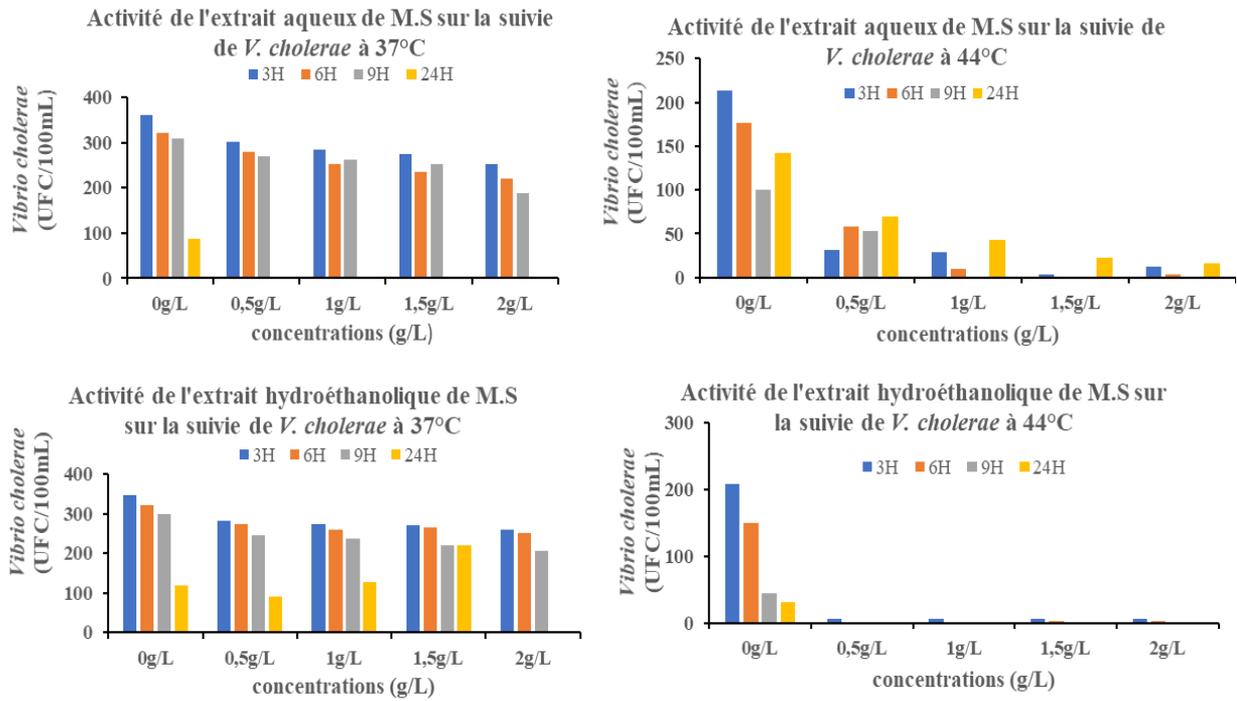
**Tableau VI : Pourcentages d'inhibition (%) de la croissance de *Vibrio cholerae* en présence des extraits de la plante *Bidens pilosa***

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

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

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

abondances cellulaires dans les différentes concentrations de l'extrait hydroéthanolique du *Moringa stenopetala* par comparaison aux témoins, ont diminué de 214 à 12 ; 176 à 3 ; 100 à 0 ; 112 à 16 (UFC/100 mL), à la température 44°C. Les résultats montrent que la cultivabilité des bactéries est rare lorsque les concentrations de l'extrait sont de 0,5 g/l et 2 g/L, à la température 44°C après 3h respectivement. Ce même résultat a été observé à la concentration de l'extrait de 2g/L après 24h d'incubation, et à la température de 37°C (figure 6).



**Figure 6 : Variation temporelle des densités cellulaires de *Vibrio cholerae* en présence des extraits aqueux et hydroéthanoliques de *Moringa stenopetala* à 37°C et 44°C.**

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

Les pourcentages d’inhibition de la croissance de *Vibrio cholerae* ont été calculés pour chaque type d’extrait de *Moringa stenopetala*, pour chaque température et durées d’incubations (tableau VII). Il en ressort que les meilleurs pourcentages d’inhibitions (100%) ont été obtenu en présence

de l’extrait aqueux aux concentrations 0,5 g/L 1g/L 1,5 g/L et 2g/L à 44°C et après après 9h et 24h d’incubation respectivement, de même aux concentrations 1 g/L, 1,5 g/L et 2 g/L à 37°C à 9h d’incubation. On note également qu’en présence de l’extrait hydroéthanolique aux concentrations comprises entre 0,5g/L 1 g/L et 2g/L après 24 h d’incubation à 44°C et à 2g/L à 37°C des pourcentages d’inhibition sont de 100% (tableau VII).

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

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

Comparaison de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes à celle de l'antibiotique de référence

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

Le calcul des CMI et CMB montre dans l'ensemble que les résultats varient en fonction du type d'extrait et de la plante. Les différents extraits ont montré de bonnes activités antimicrobiennes sur tous les microorganismes testés avec des CMI allant de 0,488 à 62,5 mg/mL. La CMI calculée a révélé que comparativement aux deux types d'extraits utilisés dans l'étude, l'extrait aqueux des deux plantes a montré une meilleure activité antimicrobienne sur *Vibrio cholerae* avec des CMI de 0,488 mg/mL. Cette activité a été faible lorsqu'on considère l'extrait hydroéthanolique de *Bidens pilosa* avec une valeur de 62,5 mg/ml. De plus, aucune activité antimicrobienne n'a été observée avec l'extrait hydroéthanolique de *Moringa stenopetala*. La

lévofloxacine utilisée comme antibiotique de référence a présenté une activité antibactérienne sur l'ensemble des souches testées avec des CMI allant de 0,488 mg/mL sur *A. hydrophila* à 1,953 mg/mL sur *V. cholerae*. Les CMI des extraits aqueux et hydroéthanoliques des différentes plantes et de l'antibiotique sont présentés dans le tableau VIII.

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

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

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

Corrélation « r » de Spearman entre les différentes variables considérées

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

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

Les coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les abondances des microorganismes et les concentrations d'extrait de *Bidens pilosa* à chaque

durée d'incubation, température et type d'extrait ont été calculés et sont présentés dans le tableau IX Il en ressort qu'aucune corrélation significative n'a été observée entre les densités de *Vibrio cholerae* aux différents types d'extrait et température à l'exception de l'extrait aqueux au temps d'incubation 9h à 37°C. L'augmentation de la durée d'incubation de l'extrait aqueux de *Bidens pilosa* a entraîné une diminution significative ( $p < 0,05$  et  $p \leq 0,01$ ) des cellules bactériennes de *Aeromonas hydrophila* à toutes les températures après 3h, 6 h, 9 h et 24 h d'incubation ; il en est de même avec l'extrait hydroéthanolique au temps 6h et 9h.

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

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

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

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

Les coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les abondances des microorganismes et les concentrations d'extrait de *Moringa stenopetala* à chaque durée d'incubation, température et type d'extrait ont été calculés et sont présentés dans le tableau X. Il en ressort que, les abondances des

cellules de *A. hydrophila* diminuent significativement ( $p < 0,05$  et  $p \leq 0,01$ ) avec la hausse des concentrations d'extraits aqueux de *M. stenopetala* à chaque durée d'exposition ; exception faite pour les extraits aqueux à 3h de 37°C et 44°C. Aucune corrélation significative n'a été observée entre les durées d'incubation des extraits hydroéthanoliques de *M. stenopetala* sur *Vibrio cholerae* à 37°C et 44°C. Une corrélation significative et négative a été obtenue à 24h avec l'extrait aqueux de *V. cholerae* à 37°C.

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

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

	44°C	-0.57	-	-	-	-0.95**	-0.95**	-0.95**	-
			0.90*	0.97**	0.98**				0.95**

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

### Corrélations entre les densités microbiennes et les durées d'incubation pour chaque concentration d'extrait

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

Les coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les densités microbiennes pour chaque concentration d'extrait de *Bidens pilosa* à chaque type d'extrait, température et durée d'incubation ont été calculés. L'augmentation de la durée

d'incubation a entraîné une diminution significative et négative ( $p < 0,05$  et  $p \leq 0.01$ ) de *A. hydrophila* en présence de l'extrait aqueux aux concentrations 1,5-2g/l (44°C) et de l'extrait hydroéthanolique aux concentrations 1-1,5 g/l (37°C). Entraînant l'inhibition des abondances de cellules cultivables de toutes les souches des microorganismes considérées. Par moment il a été observé des corrélations, non significatives et positives avec *V. cholerae* pour les deux types extraits à 44°C et avec l'extrait hydroéthanolique de *A. hydrophila* à 37°C (tableau XI).

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

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

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

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

Les coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les densités microbiennes pour chaque concentration d'extrait de *Moringa stenopetala* à chaque type d'extrait, température et durée d'incubation ont été calculés. Par moment il a été observé des corrélations, non significatives et

positives avec *V. cholerae* et *A. hydrophila* à 37°C de l'extrait aqueux.

De même, des corrélations significatives et négatives ( $p < 0,05$  et  $p \leq 0.01$ ) ont été notées entre la densité microbienne et l'augmentation de la durée d'incubation pour les concentrations 1,5 et 2g/l de *V. cholerae* (extrait aqueux) à 44°C ; 2g/l de *A. hydrophila* (extrait hydroéthanolique) à 37°C (tableau XII).

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

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

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

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

Des variations significatives des densités ont été observées aux différentes durées d'incubation pour les différents extraits, bactéries et températures de la plante *Bidens pilosa*. Une

variation significative ( $p < 0,05$ ) a été observée avec l'extrait hydroéthanolique de *A. hydrophila* à 44°C et au temps d'incubation 9h avec les différents extraits aux températures 37°C et 44°C pour les deux microorganismes (tableau XIII). Le même résultat a été observé avec *V. cholerae* après 24h d'incubation sur l'extrait aqueux.

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

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

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

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

Les valeurs des coefficients de significativité ont été observées aux différentes durées d'incubation pour les différents extraits, bactéries et

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

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

Souches	<i>Moringa</i>	Température	Durée
---------	----------------	-------------	-------

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

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

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

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

Les valeurs moyennes des abondances des microorganismes enregistrées dans différentes

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

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

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

\*= P < 0,05 ; ddl=5

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

Les abondances des cellules diffèrent significativement ( $p < 0,05$ ) ceci avec la

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

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

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

\* =  $P < 0,05$  ; ddl=5**Comparaisons des moyennes des densités microbiennes entre les différents extraits.**

Des résultats présentés dans le tableau XVII, il ressort que des différences significatives ( $P < 0,05$ ) ont été observées entre les moyennes des densités microbiennes et les différents extraits au contact

de *V. cholerae*, *A. hydrophila* pour les différents extraits de *Moringa stenopetala*. L'extrait aqueux et hydroéthanolique de *B. pilosa* auraient une bonne activité au contact de *A. hydrophila* mais pas d'activité au contact de *V. cholerae* (tableau XVII).

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

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

\*Différence significative à  $P < 0,05$  ddl= 3**Discussion****Screening phytochimique**

Les résultats obtenus dans la présente étude ont mis en évidence une forte activité antimicrobienne des extraits aqueux et éthanoliques testés (*Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala*) contre les bactéries isolées de l'environnement. Comme solvants

d'extraction, il a été utilisé de l'éthanol à 70% et l'eau distillée. Les rendements d'extraction obtenus par macération de 500g de poudre des feuilles de *B. pilosa* était de 13,15% et de 12,99% pour l'extrait aqueux et hydroéthanolique. Ces résultats sont proches par ceux obtenus par Ngoupayo *et al.*, (2019). Les rendements de *M. stenopetala* étaient de 11,57% et de 10,82%. Les

différents extraits sont de plus en plus débarrassés de macromolécules et moins solubles aux solvants utilisés pour ne contenir que des molécules bioactives et solubles à ces solvants (Okou *et al.*, 2018). Le criblage phytochimique a révélé la présence des composés chimiques tels que les polyphénols, flavonoïdes, tanins, triterpènes, stérols, alcaloïdes dans les extraits aqueux et hydroéthanolique de *B. pilosa*. Ce résultat est similaire à celui obtenu par (Chafla-Moine *et al.*, 2023) qui avaient rapporté la présence de ces composés dans l'extrait aqueux et éthanoliques de la même plante. Cependant, les résultats de Ngoupayo *et al.*, 2019, n'ont pas montré la présence de tanins et anthocyanes et de tanins et quinones dans l'extrait aqueux et dans l'extrait hydroéthanolique. Les composants mis en évidence dans les extraits *M. stenopetala* sont les tanins, les composés terpéniques, flavonoïdes, alcaloïdes, stéroïdes, saponines, phénols, coumarines et les anthraquinones. Au cours de cette étude il a été relevé l'absence de certains métabolites secondaires tels que les anthraquinones et les anthocyanines recherchés. Ceci corrobore avec les résultats des travaux menés par Kasolo *et al.*, (2010) en Ouganda, Dzotam *et al.*, (2016) au Cameroun et Milloghokone *et al.*, (2013) au Burkina-Faso sur les extraits méthanoliques, éthanol-eau et au chlorure de méthylène respectivement. Le criblage phytochimique a révélé la présence d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de tanins qui sont des composés cités par les auteurs précédents comme ayant un effet bactéricide significatif en milieu aquatique (Tamsa Arfao *et al.*, 2020).

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

#### Activité des extraits de *Bidens pilosa*

Les extraits aqueux et hydroéthanolique ont montré une activité bactérienne contre les souches bactériennes étudiées avec les pourcentages d'inhibition variant atteignant 100% (15,45% à 100% pour *V. cholerae* et 14,12 à 100% pour *A. hydrophila*). Ainsi, la diminution des densités microbiennes était significativement et négativement corrélée ( $P < 0,05$ ) à l'augmentation des concentrations des extraits sur les espèces étudiées. Les différences observées entre les résultats obtenus pour chaque type d'extrait

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

#### Activité des extraits de *Moringa stenopetala*

Une réduction importante des microorganismes en présence des extraits aqueux et éthanoliques de *Moringa stenopetala* a été notée, avec les gammes de concentrations choisies. Ainsi, la diminution des densités microbiennes était significativement et négativement corrélée ( $P < 0,05$ ) à l'augmentation des concentrations et de la durée de contact des extraits aqueux et hydroéthanolique sur les espèces *A. hydrophila* et de *V. cholerae*. Ces résultats se rapprochent de ceux de Mashiar *et al.*, (2009) et Nigussie *et al.*, (2021) dans lesquels l'efficacité d'une poudre était obtenue respectivement à partir de l'extrait éthanolique et méthanolique des feuilles de *M. oleifera*. Il en n'est de même des travaux de (Metsopkeng *et al.*, 2019), dans l'utilisation des concentrations des graines de *Moringa oleifera* pour le traitement de la microflore bactériennes contenu dans l'eau. Certains travaux sur les feuilles de *Moringa stenopetala* ont révélé une action inhibitrice sur

l'alpha amylasique et l'alpha glucosidasique (Adisakwattana *et al.*, 2011) ralentissant le transport du glucose à travers l'épithélium intestinal. Ce résultat pourrait être lié à la présence dans cet extrait d'alcaloïdes et de flavonoïdes qui agiraient par un mécanisme de toxicité sur les bactéries, soit par inhibition des enzymes hydrolytiques, par perturbation des fonctions des protéines membranaires, ou par inhibition de l'ADN gyrase (Wink, 2015). Ainsi les biomolécules responsables de cette activité anti alpha amylasique sont les alcaloïdes (Pan *et al.*, 2003). Les alcaloïdes des extraits aqueux de *Lantana camara*, *Cymbopogon stratus* et de *Hibiscus rosa simentis* sont cités par plusieurs auteurs comme ayant un effet bactéricide remarqué (Davenport, 2006). En effet, des ressources végétales riches en composés polyphénoliques, flavonoïdes, protéines, bêta-carotène, calcium, potassium, vitamines comme dans les feuilles de *Moringa oleifera* Lam. (Moringacées) peuvent être utilisées pour la prévention de nombreuses pathologies (Gülçin, 2012). Il en ressort que l'inhibition bactérienne significative ( $P < 0,05$ ) de l'extrait aqueux et hydroéthanolique des deux plantes a été observé sur *A. hydrophila* et *V. cholerae* à 44°C par rapport à 37°C, la température est l'un des paramètres explicatifs des changements dans l'abondance bactérienne.

Comparaison de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes à celle de l'antibiotique de référence: concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits des plantes

Les concentrations minimales inhibitrices des différents extraits de la plante *Bidens pilosa* variaient de 0,488 à 62,5 mg/mL. Tous les extraits de *B. pilosa* ont présenté une bonne activité antimicrobienne bactéricide sur les bactéries testées. Ce résultat diffère des travaux de Owoyemi *et al.*, 2017. En effet, ces auteurs montrent une sensibilité de l'extrait aqueux contre *Salmonella typhi* et *Shigella* avec des CMI allant de 50mg/mL à 512 mg/mL. Ces différences pourraient s'expliquer par l'utilisation dans leurs travaux de l'éthanol à 90% reconnu pour ses propriétés bactériostatiques lors de l'extraction des métabolites secondaires. D'autre part, l'extrait hydroéthanolique a été actif sur les microorganismes testés avec des CMI allant de 1,953mg/mL à 62,5mg/mL, ces résultats

corroboient avec ceux de Nguyen *et al.*, (2022) qui ont travaillé avec les extraits éthanoliques et ont obtenu les CMI allant de 0,625mg/mL à 1,250mg/mL avec *A. hydrophila*. Ceci parce que les extraits hydroéthanolique de *B. pilosa* présentent des phytoconstitués tels que des phénols, des flavonoïdes, des saponines, des stéroïdes et des terpènes (Chafla-Moina *et al.*, 2023). Les concentrations minimales inhibitrices des différents extraits de la plante *Moringa stenopetala* variaient de 0,488 à 62,5 mg/mL, Pour *Vibrio cholerae* seul l'extrait aqueux a montré la valeur la plus faible de la CMI (0,488 mg/mL). L'activité est marquée par la présence de la molécule 4H-1-benzopyran-4 one issus de la famille des coumarines et responsable de l'activité antibactérienne, également la protéine l'Oxazolidine E (Das *et al.*, 2005 ; Al-Majed *et al.*, 2017, Bhagat *et al.*, 2019). Un effet bactériostatique sur *A. hydrophila* avec l'extrait aqueux et hydroéthanolique a été obtenu. L'extrait hydroéthanolique de *Moringa stenopetala* par contre n'a montré aucune activité sur *Vibrio cholerae*, cela peut être dû à la résistance de ces souches face à cet extrait avec le problème de multirésistance (Hnich, 2017). En général les valeurs CMI de l'antibiotique de référence (la lévofloxacine) pour les bactéries sont plus faibles comparées à celle des extraits témoignant ainsi leur efficacité avérée. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la lévofloxacine est un produit synthétique qui possède une activité antimicrobienne spécifique sur les microorganismes. Elle inhibe l'ADN gyrase et les topoisomérase IV des cellules bactériennes G+ et G- (Hnich, 2017).

### Conclusion

Au terme de ce travail il ressort que le screening phytochimique des extraits de *Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala* a montré la présence d'une variété de familles de métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les phénols, les polyphénols, les tanins, les saponines, les flavonoïdes, les triterpènes et les stéroïdes jouant chacun un rôle important dans le traitement de nombreuses maladies ; les différents extraits ont présenté des activités variables sur les microorganismes aquatiques testés. L'extrait aqueux et hydroéthanolique a montré une activité remarquable (100 % d'inhibition entre 9h et 24h) sur *B. pilosa*. En ce qui concerne *M. stenopetala*,

l'extrait hydroéthanolique a montré une activité remarquable sur *A. hydrophila*. Un résultat similaire a été observé pour l'extrait aqueux de cette même plante sur *V. cholerae*. Les taux d'inhibition de la cultivabilité cellulaire les plus élevées ont été enregistrées pour les concentrations d'extrait de 1,5g/l et 2 g/l. La température du milieu influence significativement l'inhibition bactérienne ( $P < 0,05$ ), la meilleure activité a été observé à 44°C. Les souches testées ont montré une certaine activité pour certains extraits. L'extrait aqueux et hydroéthanolique de *Bidens pilosa* ont possédé une meilleure activité avec un important effet bactéricide et les CMI qui variaient entre 0,97 et 1,95 mg/mL pour *A. hydrophila* et entre 0,488 et 62,5 mg/mL pour *V. cholerae*. De même que l'extrait aqueux de *M. stenopetala* sur *V. cholerae* (CMI=0,488mg/mL). Ces résultats montrent que l'utilisation traditionnelle de *Bidens pilosa* et *Moringa stenopetala* dans le traitement de l'eau et des maladies infectieuses pourrait être une alternative.

#### Participation des auteurs

Le travail a été conduit sous la direction de Noah Ewoti Olive Vivien et la supervision de Zébazé Togouet Serge Hubert. Les autres auteurs ont participé à la mise en œuvre du sujet et à l'interprétation des résultats.

#### Conflit d'intérêt

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt.

#### Références bibliographiques

- Adisakwattana S., Jiphimai P., Prutanopajai P., Chanathong B., Sapwar S et Ariyapitipan T., (2011). Evaluation of alpha-glucosidase, alpha-amylase protein glycation inhibitory activities of edible plants. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 61: 295-305.
- Ajanaku C., Echeme J., Mordi R., Balade O., Okoye S., Hassana J., Ejulude O., (2018). In Vitro Antibacterial, phytochemical, antimycobacterial activities and GC-MS analyses of *Bidens Pilosa* leaf extract. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 8 (1): 721-725.
- Angelini P., Matei F., Flores GA., Pellegrino RM., Vuguziga L., Venanzono R., Tirillini B., Emiliani C., Orlando G., Menghin L., (2021). Metabolomic profiling, Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Bidens pilosa*, 9,903.
- Atrahimovich D., Harris R., Eitan R., Cohen M., Khatib S., (2021). Galantamine quantity and alkaloid profile in the bulbs of *Narcissus tazetta* and Daffodil cultivars (Amaryllidaceae) grown in Israel. *Metabolites*, 11(3).
- Baleng S.D., Noah Ewoti O.V., Koji E., Tamsa Arfao A., Moungang L.M., Tuekam Kayo R.P., Kolkossok Badouana U., Poutoum Yogne Y., Nola M., (2021). Qualité microbiologique et physicochimique de quelques cours d'eau de l'arrondissement de Nkolafamba (région du centre, Cameroun)
- Bartolome A.P., Villasenor I.M., Yang W.C, (2013). *Bidens pilosa*. (Asteraceae): botanical properties, traditional uses, phytochemistry and pharmacology Evidence-based complementary and alternative medicine
- C.L.S.I (Clinical Laboratory Standards Institute) ., (2021). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard m27-a9, wayne. *Clinical and Laboratory Standards Institute* ; 32 : 12-28
- Chafla-Moina AL., Silva DL., (2023). In Vitro evaluation of the antibacterial effet of extracts of *Bidens Pilosa* Y *Eryngium foetidum*; 55 : 109-119
- Diagnosics Pasteur., (1987). Milieux et réactifs de laboratoire. Microbiologie et immunologie, 3<sup>e</sup> édition, Paris
- Dzotam J.K., Touani K.F., Kuete V., (2016). Antibacterial and antibiotic-modifying activities of three food plants (*Xanthosoma mafaffa* Lam., *Moringa oleifera* (L.) Schott and *Passiflora edulis* Sims) against multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria. *BioMedical Central Complementary and Alternative Medicine* 16:9: 2-8.
- Gamage J., Zhang Z., (2010). Application of photocatalytic disinfection, *International journal of photoenergy*. Article 764870.
- Gülçin I., (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview, *Archeology Toxicology* 86 (3): 345-391.
- Harbone J.B. (1998). *Phytochemical method: a guide to modern technique of plants*. Third edition. ISBN: 0412-57260-5.
- Hnich H., (2017). La résistance bactérienne : mécanismes et méthodes de détection au

- laboratoire. Thèse pour l'obtention de diplôme doctorat en médecine. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, 149 pages.
15. ISO., 2006. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices Part 1. Geneva: International Organization for Standardization
  16. Jennifer M., Andrew., (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48: 5-16
  17. Kasolo N.J., Bimenya G.S., Ojok L., Ochieng J and Ogwal-Okeng W.J., (2010). Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Uganda rural communities *Journal of Medicinal Plants Research* 4 (9): 753-757.
  18. Kuete V., (2010). Potential of Cameroonian plants and Derived products against microbial infections: A review. *Plant med*, 76:1479-1491.
  19. Metsopkeng C. S., Lontsi D. C., Noah Ewoti O. V., Mounang L.M., Nana P. A, Tamsa Arfao A., (2019). *Moringa oleifera* seeds extract activity on Enteropathogenic *Escherichia coli* and *Aeromonas hydrophila* cells in aquatic microcosm. *J. Appl. Biotechnol.* 7(2), 13-30.
  20. Moni N.E.D.F., (2019). Huiles essentielles de quatre plantes utilisées dans le traitement de la tuberculose dans deux localités du Nkam (Littoral) : activité antimycobactérienne et cibles cellulaires. Thèse Université de Yaoundé I, Cameroun.
  21. Ndoye Foe F.M. C., Nyegue M. A., Kamdem S.L. S., Riwom Essama H.S., Etoa F-X. (2016). Chemical composition, antioxidant effects and antimicrobial activities of some spices' essential oils on food pathogenic bacteria. *African Journal of Biotechnology*; 15(16): pp. 649-656.
  22. Newton S. M., Lau C., Gurcha S. S., Besra G. S., Wright C. W. (2002). The Evaluation of Forty-Three Plant Species for in vitro Antimycobacterial Activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 57–63.
  23. Ngongang T.D., Nyegue M.A., Djondji M.F., Ngonsu K.H., Moni N.E., Etoa F-X., (2018). *In vivo* assessment of four essential oils against bacterial species isolated from patients with oral infection. *Asian Journal of Research in Biological and Pharmaceutical Science*; 6(2): 44-57.
  24. Ngoupayo J., Nteme Tsayo F.E., Sipowo Tala V., Kouamouo J., (2019). Chemical screening and identification of secondary metabolites by HPLC-MS-UV and antimicrobial activity of *Bidens Pilosa* (Asteraceae) extracts. *Arg. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(4): 1001-1006.
  25. Nigussie, D., Davey, G., Legesse, B.A., Fekadu, A. and Makonnen, E. (2021). Antibacterial activity of methanol extracts of the leaves of three medicinal plants against selected bacteria isolated from wounds of lymphoedema patients. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03183-0>.
  26. Nyegue M.A., Moni N.E.D.F., Ndoyé-Foé F., Etoa F-X., Menut C. (2017). Bioactivity of essential oils from medical plants of Cameroon and their combination against infant diarrhea induced by bacteria. *African Journal of Traditional and Complementary Alternative Medicine*; 6:27-37.
  27. Okou, (2018). Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de feuilles de *solanum torvum swartz (solanaceae)* sur la croissance in vitro de 3 souches d'entérobactéries
  28. Omotanwa A.N., Ekeleme I.K., Jibril E.O., Danladi NA., Smart O.O., (2023). Antibacterial activity and phytochemical screening of some medicinal plant extracts against bacteria isolated from food materials sold in Keffi, Nasarawa state, Nigeria. *GSC Biological and pharmaceutical Sciences*, 22(01): 321-329.
  29. OMS, (2009) : Statistiques Sanitaires Mondiales, 149 pages
  30. Oussou K.R., Yolou S., Boti J.B., Guessenn K.N., Kanko C., Ahibo C., Casanova J., (2008). Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*, 24 (1): 94-103.
  31. Owoyemi O.O., Muftau K.O., (2017). Phytochemical screening and Antibacterial activities of *Bidens Pilosa L.* and *Tridax procumbens L.* on skin pathogens.

- International Journal of Modern Biology and Medecine*, 8(1): 24-46.
32. Pan G.Y., Huang Z.J., Wang G.J., Fawcett J.P., Liu X.D., Zhao X.C., Sun J.G and Xie Y.Y. (2003). The anti-hyperglycaemic activity of berberine arises from a decrease of glucose absorption. *Planta Medica* 69: 632-636. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-41121>.
33. Rodier J., Legube B., Merlet N., Mialocq J.C., Leroy P., Houssin M., Lavison G., Bechemin C., Vincent M., (2009). L'analyse de l'eau. Dunod, 9e édition, Paris, 1579 p.
34. Tamil SA., Dinesh MG., Satyan RS., Chandrasekaran B., et Rose C. (2011). Les extraits de feuilles et de graines de *Bixaorellana* L. exercent une activité antimicrobienne contre les pathogènes bactériens. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences*, 1:116–120
35. Tamsa Arfao A., Noah Ewoti O.V., Onana F.M., Lontsi Djimeli C., Tchakonté S and Djafsia B. (2020). The combined effect of *Eucalyptus microcorys* plant extract and light on enteropathogenic *Escherichia coli* survival in aquatic microcosm. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 9(5):1003-1008, doi:10.15414/jmbfs.2020.9.5.1003-1008.
36. Tamsa Arfao A. (2017). Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Eucalyptus microcorys* Müller, 1860 sur la cultivabilité de quelques bactéries d'importance sanitaire. Thèse de Doctorat PhD, Université de Yaoundé 1 (Cameroun), Faculté des Sciences, Département de Biologie et Physiologie Animales, Laboratoire d'Hydrobiologie et Environnement, 237p.
37. Tassou C.C., Koutsoumanis K., Nychas, G.J.E. (2000). Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *staphylococcus aureus* in Nutrient Broth by Mint Essential Oil. *Food Research International*, 33, 273-280.
38. Tawfeek N., Mahmoud F., Hamdan I., Sobeh M., Farrag N., Wink M et El-Shazly M. (2021). Phytochemistry, Pharmacology and Medicinal Uses of Plants of the Genus *Salix*: An Updated Review. *Frontiers in Pharmacology*, 12 : 1-30p.
39. Zaman B., Hussain A., Nye R., Mehta V., Mamun T et Hossain N. (2017). A Review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus*, 9(6): 12-22p.