

Criblage phytochimique et activité antibactérienne des extraits aqueux et hydroéthanolique d'une association de trois plantes médicinales

**Nadège OKEMY ANDISSA^{1*}, Rachel MOYEN³, Comlan DE SOUZA²
et Ange Antoine ABENA¹**

¹*Laboratoire de Pharmacologie et Biochimie, Faculté des Sciences de la santé,
Université M. Ngouabi, Congo-Brazzaville*

²*Laboratoire de Biologie et de Contrôle Qualité Alimentaire, Ecole Supérieure de Techniques
Biologique et Alimentaire, Université de Lomé, Togo*

³*Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Faculté des Sciences et Techniques,
Université M. Ngouabi, Congo-Brazzaville*

* Correspondance, courriel : okemyandissa@yahoo.fr

Résumé

L'objectif de cette étude est de réaliser la phytochimie et d'évaluer l'effet antibactérien de l'association des trois plantes médicinales. Pour cela, nous avons procédé par les méthodes classiques utilisées, afin de déterminer des familles chimiques de cette recette. L'activité antibactérienne a été évaluée par la Les méthodes de la diffusion en milieu gélosé et en milieu liquide ont été utilisées pour le test de sensibilité et la détermination de la CMI et de la CMB. Les résultats obtenus du screening phytochimique ont révélé la présence des flavonoïdes, saponines, stéroïdes, alcaloïdes et terpènes alors que, les extraits de la recette aux concentrations de 25, 3,33 et 50 mg/mL inhibent la croissance in vitro des *E. Coli*, *P. Aeruginosa*, *S.Aureus* et *C. albicans* avec une CMI de 50 µg/mL. Ainsi, cette association de trois plantes possèdent à la fois des pouvoirs antibactériens et antifongiques sur les germes testés. Ces extraits auraient des potentialités bactériostatiques et bactéricides. Ce qui revient à dire qu'il est possible de formuler un phytomédicament ayant des potentialités sur les maladies bactériennes et inflammatoires ou encore. Cela confirme donc, son utilisation fréquente par les populations.

Mots-clés : *association, criblage phytochimique, antibactérien, plantes médicinales CMI.*

Abstract

Phytochemical screening and antibacterial activity of aqueous and hydroéthanolic extracts of herbal association constitute of three medicinal plants

The objective of this study is to phytochemistry and assesses the antibacterial effect of two extracts of the herbal association of three plants tested. However, the phytochemical, was used for determinate the chemical family. The antibacterial activity of extracts from the association of the three plants is evaluated by the method of liquid medium diffusion (agar). The results of chemical screening revealed the presence of saponins, steroids, alkaloids, flavonoids and terpenes.

Furthermore, the antibacterial activity of these two extracts showed that the aqueous extract and hydroethanolic of this preparation at concentrations of 25, 3.33, inhibit the growth such germs *E. Coli* and *P. Aeruginosa*, *S. Aureus*, *C.albicans* and 50 mg/mL with a MIC of 50µg/mL. These extracts have bacteriostatic and bactericidal property. The study on the association of three plants has shown that both tested extracts have antibacterial and antifungal powers on germs both such as: *E. Coli*, *S. Aureus* and *P. Aeruginosa*, *C.albicans* at concentrations of 25, 3.33, and 50 mg/mL. This is to say that it is possible to formulate a phytomedicament with potential on bacterial and inflammatory disease. This proves so frequent its use by people.

Keywords : *association, phytochemical screening, antibacterial, medicinal plants, MIC.*

1. Introduction

Ageratum conyzoides L. (Asteraceae), *Lippia multiflora* M. (Rubiaceae) and *Cymbopogon citratus* (Poaceae) sont des plantes médicinales panafricaines que l'on trouve en Afrique du sud, Asie et en Amérique : Est and Ouest Afrique [1]. Ce sont les plantes aromatiques de pleine saison, qui bordent les voisinages humides des environnements. Quelques données de la littérature affirment que ces plantes utilisée de façon isolée étaient présumées guérir des pathologies inflammatoires, la douleur, l'athérosclérose, les plaies, les infections bactériennes [2 - 6]. Au Congo comme dans d'autres pays en développement, la question sur les infections et les pathologies parasitaires demeurent un véritable problème de santé publique, de par leur sévérité et de leur fréquence [7]. Cette situation est devenue plus délicate à cause de l'émergence et à la résistance des germes aux antibiotiques existants [8]. Face à ces obstacles rencontrés par l'utilisation des antibactériens déjà présents, il est nécessaire de rechercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces et agissant à large spectre. Une de ces stratégies de cette recherche est d'explorer le domaine de la thérapie par les plantes. En effet, certains travaux scientifiques ont confirmé les différentes propriétés thérapeutiques de ces plantes, notamment : analgésique, antipyrétique, anti-inflammatoire, hepatoprotecteur, Néphroprotecteur, antihypertensive, cicatrisant, antiulcerogénique, antiarthritique et antihyperglycémiant, etc. [9 - 16]. Toutes les études préliminaires réalisées sur ces trois ont été faites de façon isolée. Cependant, il n'existe quasiment pas de données scientifiques sur l'association de ces plantes, qui en synergie peut nous permettre d'isoler des molécules capable d'abolir la virulence et la résistance de certains germes. Raison pour laquelle, ce travail est mené, afin d'évaluer le pouvoir antibactérien des extrait aqueux et hydroalcoolique cette préparation sur quelques germes tels que : *Pseudomonas aeruginosa*, *salmonella sp*, *E.coli*, etc.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué des feuilles fraîches d'*Ageratum conyzoides* Lin. (herbarium No. 648 of 18/01/1963 De NERE), *Cymbopogon citratus* DC.Staph. (Poaceae) and *Lippia multiflora* Mold. (Herbarium No. 2047 of 16/06/1953 by J. Koechler) récoltées en 2006 à Inoni Falaise situé à 185 km de la zone septentrionale de Brazzaville. L'identification de ces plantes a été faite au Centre d'Etudes sur les Ressources Végétales, par Dr. Jean Marie Moutsamboté.

2-2. Souches microbiennes

Les bactéries Gram⁺ : *Staphylococcus aureus*, Bacilles Gram⁺ catalase⁺ ; les bactéries Gram⁻ : *Escherichia coli*, *Salmonelle sp*, *Pseudomonas aeruginosa* et une levure (*Candida albicans*) ont été utilisées. Ces germes issus des prélèvements frais (urine et sang), ont été fournis par le laboratoire de Microbiologie de l'École Supérieure des techniques Biologiques et Alimentaires (ESTBA) de l'Université de Lomé en provenance du Département de Microbiologie de l'Institut of Tropical Medicine du professeur Vandepitte en Belgique.

2-3. Préparation des extraits de l'association des plantes

Les feuilles fraîches des trois plantes ont été séchées à l'air ambiant au laboratoire à la température de 25°C, pendant 07 jours. Puis une fois sèche, elles ont été broyées à l'aide d'un moulinex et la poudre recueillie a servi pour la préparation des extraits selon la méthode utilisée par [17].

2-3-1. Extrait aqueux (REA)

300 g de poudre de feuilles des trois plantes (1 :1 :1) sont mélangés à 1500 mL d'eau distillée et chauffés pendant 30 minutes à 55 °C, puis filtrés avec le papier Wattman N°1. Les filtrats ont été évaporés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif R114 à 55°C. Le résidu sec obtenu est soluble dans la solution de chlorure de sodium à 9 ‰.

2-3-2. Extrait hydroéthanolique (RHA)

300 g de poudre de feuilles des trois plantes (1 :1 :1) sont macérés dans 1000 mL du mélange eau-éthanol (20 : 80) sous agitation magnétique pendant 72 heures, puis filtrés à l'aide du papier wattman N°1. Le filtrat obtenu est évaporé sous vide au rotavapor R114 à 55°C et le résidu obtenu est solubiliser dans la solution de chlorure de sodium à 9 ‰. Afin de réaliser d'éventuels tests.

2-4. Étude de l'activité antibactérienne des extraits de la préparation

La sensibilité des souches aux extraits de la recette a été réalisée par la technique de dilution en milieu liquide couplée à l'étalement sur milieu gélosé spécifique comme décrit par [18, 19].

2-4-1. Préparation de la gamme de concentrations des extraits de la recette

La gamme de concentration des extraits de la recette ont été préparée à 100 mg/mL par la méthode de la double dilution selon une progression géométrique de raison 1/2.

2-4-2. Stérilité des extraits

Les solutions d'extraits préparées sont stérilisées par filtration sur membrane millipore de 0.45 µm de porosité. Ensuite, on étale à l'aide d'une micropipette, 10 µL de l'extrait sur les milieux gélosés Mueller - Hinton. Les boîtes sont ensemencées et incubées à 30°C et 37°C pendant 24 heures selon les germes étudiés. L'absence de culture sur les milieux indique la stérilité de l'extrait. A l'échéance, la filtration et la stérilisation sont reprises davantage [20].

2-4-3. Préparation de l'inoculum

L'inoculum bactérien a été préparé à partir de colonies de moins de 24 h en bouillon Mueller Hinton (BMH). Une colonie isolée de la culture bactérienne a été prélevée à l'aide d'une anse de platine et homogénéisée dans 10 mL du bouillon puis incubé pendant 3 à 5 h à 37 °C pour avoir une pré-culture. Un volume de 0,001 mL a été prélevé respectivement pour les *Pseudomonas*, les entérobactéries et les Staphylocoques et a été ajouté à 0,5 mL de chaque extrait. Cette suspension bactérienne réalisée est évaluée à environ 10 cellules/ML et constitue l'inoculum pur.

2-4-4. Test présomptif

10 µL de la suspension microbienne dans un tube à hémolyse stérile contenant 0,5 mL d'extrait; l'action des extraits de la recette est évaluée comparativement aux témoins (bouillon Müller Hinton et eau distillée stérile), ainsi qu'aux contrôles positifs (Gentamicine ou nystatine). Les boîtes sont réparties de la manière suivante :

- 0,5 mL d'eau distillée stérile ou de bouillon Müller Hinton est ajouté à 10 µL de suspension bactérienne ;
- 0,5 mL d'extraits de la recette est ajouté à 10 µL de suspension bactérienne ;
- 0,5 mL de Gentamicine à 20 mg/mL est ajouté à 10 µL de la suspension bactérienne ;
- 0,5 mL de Nystatine à 500.000 UI est ajouté à 10 µL de la suspension de levures.

Les milieux sont directement incubés à l'étuve pendant 24 heures à la température variable, en fonction du germe utilisé.

2-4-5. Etalement et dénombrement

Vingt-quatre heures après incubation de la suspension microbienne, on prélève dans chaque tube, des aliquotes de 10 µL de la suspension microbienne que l'on étale sur le milieu Plate Count Agar. Après étalement, les boîtes repiquées sont incubées à 30 et 37 °C pendant 24 à 48 heures. Le dénombrement des colonies permet de calculer la survivance et/ou le pourcentage d'inhibition de la croissance in vitro des germes testés par les extraits de la recette. Le nombre de colonies dénombrées chez les témoins sont à 100 % de survivants et le pourcentage d'inhibition est évalué par la formule ci-après : Pourcentage d'inhibition des germes dénombrés = $100 (1 - N/10^5)$ où N est le nombre de colonies de germes dénombrés sur une boîte de pétri et 10^5 correspond à 100 % de survivance.

2-4-6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMI est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24 h. Alors que, la concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration de substance qui laisse au plus 0,01 % de germes survivants. A l'aide d'une anse calibrée à 2 µL, les contenus des tubes dans lesquels aucun trouble n'a été observé ont été prélevés et ensemencés sur une gélose Mueller-Hinton par ordre décroissante allant de 50 ; 25 ; 12.5 ; 6.25 à 3.125 mg/kg pour REA, et de 50 ; 40 ; 33.33 et 25 mg/kg pour RHA. L'ensemencement a été fait par stries parallèles de 5 cm de long à la surface de la gélose. Après 24 h d'incubation à l'étuve à 37 °C, le nombre de colonies sur les stries a été comparé à celles de la boîte de numération de l'inoculum. Ainsi, le premier tube expérimental dont le -4 nombre de germes présents sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10 correspondra à la CMB (Amadi, 2007).

Ainsi, l'effet bactériostatique et bactéricide est fonction du rapport suivant : $R = \text{CMB/CMI}$; si $1 \leq R \leq 2$, l'effet est bactéricide et $4 \leq R \leq 16$, l'effet est bactériostatique [21].

2-5. Screening phytochimique

La méthode classique de recherche utilisée est celle décrite par [22], qui consiste à déterminer des grandes familles chimiques contenues dans REA et RHA.

2-6. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne plus ou moins erreur standard (ESM). La comparaison par rapport aux lots est réalisé par le test « t de student - Fischer couplé au test ANOVA ». Le seuil de significativité est fixé à $P < 0,05$.

3. Résultats

3-1. Tests de sensibilité

Les résultats des tests préliminaires des activités antibactériennes sont présentés dans le **Tableau 2**. Il Y apparaît que chacun des extraits de la recette a une activité assez bien définie sur la croissance d'au moins un des germes testées. De sorte que *S. aureus* est résistant vis à vis de l'extrait aqueux de la recette, qui par contre inhibe significativement ($p < 0.001$) la croissance in vitro et présente une bonne action sur le reste des germes testés ; avec les pourcentages d'inhibition compris entre 99, 94 et 100 %. Tandisque, l'extrait hydroéthanolique de la recette n'agit non plus sur la croissance in vitro de *P. aeruginosa*, mais inhibe celle de tous les autres germes testés (**Tableau 2**). Toutefois, ces deux Extraits n'ont aucun effet positif sur les Bacilles gram+. En effet, REA à faible concentration de 12,5 mg/mL inhibe la croissance de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* avec pourcentages d'inhibition respectifs de 49.66 et 99.98 %. Cette action de REA rejoint les travaux de certains auteurs sur les mêmes souches [23]. Dans l'ensemble, tous les germes se sont révélés plus sensibles à RHA à la concentration de 33,3 mg/mL, avec les pourcentages d'inhibition observés variant entre 94,99 % et 99,98 % ($p < 0.001$). Cependant, les pourcentages d'inhibition induits par tous ces extraits restent inférieurs à ceux de l'antibiotique de référence, la gentamicine, pour l'ensemble des souches bactériennes (**Tableau 3a, b et 4**). Par ailleurs, on constate qu'à 25 mg/mL RHA ne présente aucune sensibilité face aux germes testés, tout comme REA à 6,25 mg/mL. Cependant, ces deux extraits de la recette paraissent très sensibles sur *C.albicans* sur les autres concentrations (**Tableau 3a, b et 4**).

Tableau 2 : Résultats du test présomptifs des extraits de la recette sur les germes testés

Souches	Témoins	Pourcentage d'inhibition des extraits (%)	
		REA (100mg /mL)	RHA (100mg/mL)
<i>E.coli</i>	E.D	99.99	100
<i>P. aeruginosa</i>	00	99.96	00
<i>Salmonelle sp</i>	00	99.94	100
<i>S. aureus</i>	00	00	99.97
<i>Bacille gram+</i>	00	00	00
<i>C. albicans</i>	00	100	100

Bacille G+ : Bacille Gram⁺ catalase⁺ oxydase⁺, ED : eau distillée ; n=3 ; *** $p < 0.001$ par rapport au témoin

Tableau 3a : Evaluation de l'effet antimicrobien de REA sur différentes concentrations

Souches	Pourcentage d'inhibition des produits						
	E.D.	Nyst. 50	Gent 50(µg/ml)	REA (mg/mL) 50	25	12.5	6.25
<i>E.coli</i>	00	00	100	100	49.82	49.66	00
<i>P. aeruginos</i>	00	00	100	99.95	99.65	99.59	00
<i>Salmonelle sp</i>	00	00	100	99.88	99.65	00	00
<i>C. albicans</i>	00	100	00	100	99.74	00	00

REA : Extrait aqueux de la recette, Gen : Gentamycine; Nys : Nystatine ; *** $p < 0.001$ par rapport au témoin

Tableau 3b : Evaluation de l'effet antimicrobien de RHA sur différentes concentrations

Souches	Pourcentage d'inhibition des produits						
	E.D.	Nyst. 50	Gent 50 (µg/mL)	RHA50	40	33.33	25(mg/mL)
<i>E.coli</i>	00	00	100	100	94.99	94.99	00
<i>S.aureus</i>	00	00	100	99.77	99.36	99.98	00
<i>Salmonelle sp</i>	00	00	100	99.97	99.99	99.99	00
<i>C. albicans</i>	00	100	00	100	99.97	49.52	00

RHA : Extrait hydro alcoolique de la recette, Gen : Gentamycine; Nys : Nystatine ; *, $p < 0.05$ et *** $p < 0.001$ par rapport au témoin

Tableau 4 : Résultats sur la détermination des CMI et CMB des extraits de la recette et leur interprétation

Souches	Interprétation	Concentrations d'inhibition des germes						
		REA (mg/mL)			RHA (mg/mL)			
		CMI	CMB	R1	CMI	CMB	R2	
<i>E.coli</i>	Bactéricide	50	50	1.00	33.33	50	1.05	
<i>P. aeruginosa</i>	Bactériostatique	12.5	ND	ND	ND	ND	ND	
<i>Salmonelle sp</i>	Bicide+ Bstique	25	50	2.00	33.33	100	3.00	
<i>S. aureus</i>	Bactéricide	ND	ND	ND	33.33	33.33	1.00	
<i>C. albicans</i>	Bactéride +Antif.	25	50		2.00	40	50	1.25

ND : Non déterminé ; antif : antifongique, Bcide : bactéricide ; bstique : bactériostatique

Il a été observé une diminution progressive de l'intensité du trouble induit par la croissance des bactéries au fur et à mesure que la concentration des REA ET RHA augmentait au cours de l'expérimentation. Les souches de *E.coli* et de *S. aureus* ont été plus sensibles avec des valeurs de CMI et CMB égales à 33.33 et 50 mg/mL. La plus grande valeur de CMI a été observée avec la souche de *E. coli* (50 mg/mL), suivi de *C. albicans* (40 mg/mL) et celle de la CMB avec les souches de *Salmonelle sp* (100 mg/mL). Seule la souche de *Salmonelle sp.* présente le rapports CMB/CMI supérieur ou égal à 3. Tandis que, pour tous les autres germes, ce rapport est inférieurs ou égaux à 2, excepté pour *P.aéruuginosa* (REA 50 mg/mL) ; dont le rapport reste indéterminé.

4. Discussion

Les résultats consignés dans les **Tableaux 2, 3 et 4** ont montré que le test de sensibilité des souches a permis de montrer la présence d'une activité antibactérienne REA et RHA ont eu une bonne activité inhibitrice aux différentes concentrations testées sur les souches bactériennes avec un des pourcentages d'inhibitions allant de 99.97 à 100 % sur les germes à la concentration de 100 mg/mL. Cependant, il a été observé également d'une part, la résistance des souches de *P. aeruginosa* et *S. aureus* avec RHA et REA et de l'autre, une inhibition significative de la croissance in vitro des souches de *C. albicans* par REA et RHA avec des pourcentages d'inhibition respectifs variant de 100 à 99.74 % et de 100 à 49.52 % (**Tableau 4**). Cette étude nous a permis de déterminer également les paramètres antibactériens de ces extraits de la recette. Ce qui revient à dire que REA et RHA possèdent tous, une activité antibactérienne en inhibant la croissance des souches de *E.coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonelle sp*, *S.aureus* et de *C.albicans* de façon concentration- dépendante (relation dose-effet). A propos de ces germes, la CMI a été égale à la CMB pour *E.coli* (REA 50 mg/mL) et *S.aureus* (RHA 33.33 mg/mL). Les plus faibles valeurs ont été obtenues avec les souches de *S. aureus* avec une CMI de 33.33 mg/ml (RHA) et de *P. aéru ginosa* à large spectre de sensibilité avec une CMI de 12.5 mg/mL et pour laquelle la CMB n'a pu être déterminée jusqu'à la concentration de 50 mg/mL. On suppose cette CMB pourrait se situer au-delà de cette concentration.

Il ressort donc de notre constat, que REA et RHA sont bactéricides sur les souches de *E.coli* et de *S.aureus* et un pouvoir bactériostatique sur la souche de *P. aeruginosa* [Toty]. Nous avons remarqué également qu'il existe un pouvoir antibactérien intermédiaire avec les souches de *Salmonella sp*. Contrairement, à *C. albicans*, qui est bactéricide et antifongique. Ces résultats pourraient s'expliquer par plusieurs facteurs tels que : la forme de l'extrait, la dose utilisée et encore les molécules actives contenues ces extraits. En effet, nos travaux révèlent la présence des : flavonoïdes, trace d'alcaloïdes, les tannins, les saponines et les terpènes/stéroïdes dans REA et RHA. Or, les données de la littérature affirment que ces différentes familles chimiques posséderaient des effets contre ces microorganismes pathogènes [24 - 26]. Dans ce cas, des effets antibactériens et antifongiques observés avec de REA et RHA seraient attribuer à leur présence. Ainsi nos résultats rejoignent donc les travaux menés par [27 - 30]. A travers ces résultats obtenus, on peut émettre l'hypothèse telle que REA et RHA peuvent faire l'objet de la mise en place d'un phytomédicament amélioré à potentialité anti-infectieux, ce qui est indispensable et bénéfique, pour les soins de santé primaires des populations Africaine particulièrement.

5. Conclusion

Ce travail de recherche a permis d'évaluer les propriétés antimicrobiennes des extraits aqueux et hydroethanolique de l'association des plantes médicinales étudiées sur les germes bactériennes partiellement pathogènes. Ces extraits sont bactéricides et bactériostatique par rapport à la concentration utilisée. Cela nous conduit à affirmer que *Ageratum conyzoides* L. Est une plante indispensable dans la lutte contre les maladies infectieuses. Ainsi cette étude justifie l'usage de cette plante dans la pharmacopée et la médecine traditionnelle congolaise.

Remerciements

Nous remercions sincèrement "Third World Organization of Women of Science (TWOWS)", pour avoir financé entièrement ce projet, et nous ne saurions gratifier les Professeurs : Comlan DE SOUZA et Messanvi GBEASSOR, pour avoir mis à notre disposition tout le matériel requis, pour mener à bien ce travail.

Références

- [1] - Enda Tiers monde Encyclopédie médicale de l'Afrique, Vol.4 (1986) 1150.
- [2] - E. J. ADJANOHOON, A. M. R. AHYI, L. AKE ASSI et al., Médecine Traditionnelle et Pharmacopée Contribution aux études ethnobotaniques et floristique au Congo, Ed. ACCT, Paris, (1988) 605p.
- [3] - E. J. ADJANOHOON, M. R. A. AHYI, L. AKE ASSI et al., Médecine Traditionnelle et Pharmacopée Contribution aux études ethnobotaniques et floristique au Bénin - ACCT Ed. Paris(1989), 895p.
- [4] - BOUQUET et al., Féticheurs et médecine traditionnelle du Congo Brazzaville, Paris ; Mémoires Orstom, pp : 282.
- [5] - A. I. OKUNADE, Review *Ageratum conyzoides* L (Asteraceae), (2002).
- [6] - A. A. ABENA, J. K. ATIPO-EBATA, T. C. HONDI ASSAH, psychopharmacological properties of crude extract and essential oil of *Lippia multiflora* Mold. Encephale, (2001) 27(4) 360-364.
- [7] - VANDEN and VLIETINCK, Emergence of Quinolone Resistance amongst *Escherichia coli* strains isolated from clinical infections in some Lagos State Hospitals in Nigeria. Nigeria Journal of Health and Biomedical Science, (1991) 3 (2) 73-78.
- [8] - B. K. NOAMESSI, G. J. ADEBAYO et D. A. BANGBOSE, Muscle relaxant properties of aqueous extract of *Lippia multiflora* Mold. Planta Med., (1985) 69(3) 235-255.
- [9] - A. A. ABENA, M. DIATEWA, G. GAKOSSO, M.GBEASSOR, TH. HONDI-ASSAH et J. M. OUAMBA, Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. Fitoterapia, 74, (2003) 231-236.
- [10] - T. C. HONDI-ASSAH, A. A. ABENA, J. KOKOLO, C. BADILA et M. DIATEWA, Effets hépatoprotecteurs de *Lippia multiflora* et d'un phytomédicament Congolais : le Tetra*. Phytothérapie, 5 (2003), 135-140.
- [11] - A. W. ETOU-OSSIBI, J. NZONZI, J. V. MOMBOULI, G. E. NSONDE-NTANDOU, J. M. OUAMBA, et A. A. ABENA, Screening chimique et effets de l'extrait aqueux du *Lippia multiflora* Moldenke sur le cœur isolé du crapaud ; phytothérapie, springer paris, vol. 3 (2005) pp 193-99.
- [12] - N. OKEMY ANDISSA, J. M. OUAMBA, J. KOUDOU, M. GBEASSOR and A. A. ABENA, Comparative study of Analgesic Activity of Tetra and Association of tree plants : *Ageratum conyzoides*, *Cymbopogon citratus* and *lippia multiflora*. International Journal of pharmacology, (2006) 2 (1) : 42 - 44.
- [13] - S. A. U. MOUSSOUNGOU, Evaluation de l'effet néphroprotecteur du sirop à base de l'extrait aqueux de *Ageratum conyzoides* chez la souris Balb-c. mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Etude Approfondies. Faculté des Sciences et Technique Université Marien Ngouabi, Congo-Brazzaville, (2012) 39p.
- [14] - N. OKÉMY ANDISSA and A. A. ABENA, Phytochemical screening and pharmacological Effects of extracts Preparations of Three Medicinal Plants. African Journal of Integrated Health, Vol 5: Issue 2; (2015) P 38-43.
- [15] - NKOUKA BERTHIER, Evaluation de l'extrait aqueux et de la pomade de *Ageratum conyzoides* L. sur l'arthrite inflammatoire chez le rat Wistar. Mémoire pour l'obtention du Master Enseignement ; Université Marien Ngouabi, (2015) p 1-63.
- [16] - F. S. OUATTARA-SORO, J. AKA, P. ZAÏBO et M. DOSSO, Effets pharmacologiques de *Ageratum conyzoides* sur la glycémie chez le lapin. Journal of Animal & Plant Sciences, (2015) (24), Issue 1: 3691-3699p.
- [17] - G. N. ZIHIRI et A. K. M. KRA, Évaluation de l'activité antifongique de *Microglosa Pirifolia* (LARMARCK) (Asteraceae) « PYMI » sur la croissance in vitro de *Candida albicans*. Rev. Med. Pharm. Afr., (2003) 1711 - 19.
- [18] - M. GBEASSOR, C. DE SOUZA, K. KOUMAGLO, K. AKLIKOKOU et AL., Contribution à l'étude des propriétés pharmacologique de *Morinda lucida*, Actes des journées Scientifiques de l'Université du Benin, Vol. 2 Pres. UB, (1990) 298-301.

- [19] - C. DE SOUZA, K. K. AMEGLAVI, K. KOUMAGLO et M. GBEASSOR, Etude de l'activité antimicrobienne des extraits aqueux totaux de dix plantes médicinales. *Revue de Médecines et pharmacopées africaines*, Vol.7, (1993) PP 109-115.
- [20] - A. KODJO, Etude des propriétés anti-inflammatoire et antimicrobienne de la moutarde et de l'extrait de graine de *Parkia biglobosa* (jacq). Mémoire pour l'obtention du diplôme d'ingénieur des travaux d'analyse médicales et biologiques ; Université de Lomé, (2000) 35-37.
- [21] - L-L. FAUCHERE et J-L. AVRIL, *Bactériologie générale et médicale*. Editions Ellipses, (2002).
- [22] - A. SOFOWORA, *Plantes médicinales et médecines traditionnelles d'Afrique*. Karthala, paris, (1996), 378p.
- [23] - A. A. TOTY, N. GUESSENND, C. BAHU, A. M. KRA, D. A OTOKORE et M. DOSSO, Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 28 (2013), p 12-21.
- [24] - A. GHANI, *Introduction to Pharmacognosy*. 1st Ed. ABU Press Ltd Zaria- Nigeria, (1990); 187-197; Trease GE, Evans WC; *Pharmacognosy*. 15th ed. Elsevier publishers Ltd. Edinburgh London, (2002); 20-23.
- [25] - I. PODOLAK, A. GALANTY et D. SOBOLEWSKA, Saponins as Cytotoxic Agents: *Phytochemistry Reviews*, (2010); 9(3) 425-474.
- [26] - Cowan MM. *Plant Products as Antimicrobial Agents*. *Clinical Microbiology Reviews*, (1999); 12(4): 564-582.
- [27] - K. CIMANGA, K. KAMBU, L. TONA, S. APERS, T. DE BRUYNE, N. HERMANS, J. TOTTE, L. PIETERS et A. J. VLIETINCK, Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oil of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79 (2002) 213 - 220.
- [28] - O. YI, 2* ABA, I.TI EZURUIKE, R.G1 AYO, J. D1 HABILA and G.1. NDUKWE, Isolation, antibacterial and antifungal evaluation of α -amyrenol from the root extract of *Acacia ataxacantha* DC. *Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP)* (2015) 4(2) 124-131.
- [29] - K. KOKA, K. SANDA, C. RAYNAUD, D. MANDIN, J. MILLET et J. P. CHAUMONT, Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *cymbopogon citratus* L. (DC) stapf., *C. nardus* L. (DC) L. Rendle et *C. schoenanthus* L. Spreng. *J. Mycol. Méd.*, (2003); 13,175-185; Moody J.O., Adebisi O.A., Adninyi B.A. Do *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the antimicrobial activity of traditional medicinal self soaps (Osedudu)? *Journal of Ethnopharmacology*, 92 (2004) 57 - 60.
- [30] - E. NANCY, T. M. L. HERNÁNDEZ et L. R. ABDALA, Antimicrobial activity of flavonoids, in medicinal plants from Tafidel Valle (*Tucumán Argentina*). *Journal of Ethnopharmacology*, 73 (2000) 317 - 22.
- [31] - W. AALBERSBERG et Y. SINGH, Essential oil of Fijian *ageratum conyzoides*. *Flavor and fragrance journal* 6, (1991) 117 - 120 p.