

# *Activités Antiplasmodiale Et Antibactérienne d'Extraits De Senecio Pleistophyllus (Asteraceae), Plante Endémique De Madagascar*

Maminiaina Christian Randriamboangiarivonisoa<sup>1\*</sup>, Manitriniaina Rajemiarimiraho<sup>2</sup>, Bernard Anselme Ravelonjato<sup>1</sup>, Jesuka Rasolofomanana<sup>1</sup>, Stephan Rakotonandrasana<sup>1</sup>, Andriamalala Rakotondrafara<sup>1</sup>, Rovantsoa Jemima Andrianarison<sup>2</sup>, Rianasoambolanoro Rakotosaona<sup>2</sup>; Edouard Ravalison Andrianarison<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques, Ambodivoanjo Ambohijatovo, BP 702, 101 Antananarivo, Madagascar.

<sup>3</sup> Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo, Université d'Antananarivo, BP 1500, 101 Antananarivo Madagascar.

\*Correspondance courriel : maminiaiac@gmail.com



**Résumé** – Dans la dynamique de recherche de nouvelles molécules bioactives issues des plantes endémiques de Madagascar, une étude biologique de la plante entière de *Senecio pleistophyllus* (Asteraceae) connu localement sous les noms vernaculaires « angea » ou « betefaka », a été menée. L'évaluation des activités biologiques des extraits de la plante entière de *Senecio pleistophyllus* a révélé que les extraits recueillis après trois extractions séquentielles à l'hydroéthanolique 90/10 : v/v sont dotés d'activités antibactériennes et antiplasmodiales encourageantes. Les tests d'activité biologique ont démontré que cet extrait est principalement actif vis-à-vis de deux souches bactériennes Gram (+) : *Bacillus cereus* et *Streptococcus pyogenes* puis contre quatre souches bactériennes Gram (-) : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* et *Enterobacter aerogenes*.

L'extrait F<sub>3</sub> obtenu après la troisième séquence d'extraction éthanolique présente une activité antiplasmodiale in vitro notoire sur la souche chloroquino-résistante *Plasmodium falciparum* FCM 29 avec une CI<sub>50</sub>=4.17 µg/ml, tandis que l'extrait butanolique et l'extrait aqueux épuisé sont inactifs.

**Mots clés** – *Senecio pleistophyllus*, activité antiplasmodiale, activité antimicrobienne, *Plasmodium falciparum*, antibiogramme.

**Abstract** – Antiplasmodial and antibacterial activities of whole plant extracts of *Senecio pleistophyllus* (Asteraceae)

As part of the dynamics of research on new bioactive compounds from Madagascar's unique plants, a biological investigation of the entire *Senecio pleistophyllus* (Asteraceae) plant was carried out. The evaluation of the biological activities of extracts of the whole plant of *Senecio pleistophyllus* (Asteraceae) revealed that the alcoholic extract shows beneficial antibacterial and antiplasmodial properties. This extract is effective against two Gram (+) bacteria: *Bacillus cereus* and *Streptococcus pyogenes*, as well as four Gram (-) bacteria: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, and *Enterobacter aerogenes*.

The alcoholic extract F<sub>3</sub> from the third maceration has in vitro antiplasmodial activity, with an IC<sub>50</sub> of 4.17 g/ml. However, the butanol and water extracts are inactive.

**Keywords** – *Senecio pleistophyllus*, antiplasmodial activity, antibacterial activity, *Plasmodium falciparum*, antibiogram.

## I. INTRODUCTION

Le paludisme, une endémie parasitaire majeure, constitue un problème de santé publique dans les pays en développement, notamment dans les régions tropicales et subtropicales de l'hémisphère sud [1], [2]. Le développement des phénomènes de

résistance du *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à d'autres antipaludiques [1], [3] ainsi que la difficulté d'accès des populations aux médicaments disponibles sur le marché justifient le besoin urgent de trouver de nouveaux antipaludiques.

L'investigation à partir des plantes représente une voie prometteuse pour la découverte de nouvelles substances bioactives, étant donné que chaque plante élabore un grand nombre de métabolites secondaires [4], [5]. Actuellement, environ 25 % des médicaments modernes sont développés à partir de plantes [6].

Pour des raisons chimiotaxonomiques nous avons entrepris une étude biologique des extraits de *Senecio pleistophyllus* (Asteraceae), une plante endémique de Madagascar, afin d'évaluer ses activités antibactériennes et plus particulièrement sa propriété antiplasmodiale.

## II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1. Matériel végétal

La plante entière de *Senecio pleistophyllus* a été récoltée le 12 avril 2017 à Tsiafajavona dans la Commune Andranomiely du District d'Arivonimamo dans la région Itasy Madagascar aux coordonnées : latitude : 19° 21'08.5 '' S ; longitude : 047° 14'36.5 '' E (GPS). L'identification botanique a été réalisée par Dr Stephan Rakotonandrasana du Département de Botanique et Ethnobotanique du Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques (CNARP), Antananarivo Madagascar. Un spécimen d'herbier de référence RLL 1491 a été déposé au Centre d'herbier du CNARP Antananarivo, Madagascar. Les poudres de plantes entières de *Senecio pleistophyllus*, préalablement séchées à l'abri de la lumière du soleil, constituent le matériel d'étude.

### 2.2. Screening phytochimique

Le criblage phytochimique est une analyse chimique qualitative basée sur des réactions de coloration ou de précipitation, plus ou moins spécifiques à chaque classe de métabolites secondaires.

10 g de poudre sèche de plante entière ont été chauffés à reflux avec un mélange hydroéthanolique 90/10 : v/v pendant 1 h. L'extrait obtenu après évaporation sous pression réduite du solvant a fait l'objet de différents tests phytochimiques selon les méthodes développées par Houghton et Raman ainsi que Fong et Farnsworth [7], [8].

### 2.3. Extraction

La poudre sèche (300 g) de la plante entière est soumise à une macération à température ambiante dans un volume de 1,35 litre d'hydroéthanolique 90/10 : v/v. Au bout de 24 h, le mélange hétérogène est filtré sur papier filtre et le résidu est de nouveau extrait deux fois dans les mêmes conditions. Chaque extrait alcoolique est évaporé à sec sous pression réduite pour donner respectivement les extraits F<sub>1</sub> (m= 15,88 g), F<sub>2</sub> (m=12,82 g) et F<sub>3</sub> (m= 12,54 g). Après prélèvements pour des tests d'activités biologiques antibactériennes et antiplasmodiale, les restes des trois extraits sont repris avec l'éthanol 90°, rassemblés et évaporés sous vide pour donner un extrait rassemblé F<sub>4</sub> de masse m = 30,05 g.

L'extrait F<sub>4</sub> (m= 30,05 g) a été repris avec de l'eau distillée à 40 °C et soumis à un partage liquide-liquide successivement avec l'hexane pour un dégraissage puis avec l'acétate d'éthyle et le n-butanol donnant respectivement les extraits hexanique F<sub>4</sub>Hex (m = 6,43 g), à l'acétate d'éthyle F<sub>4</sub>Ac (m = 14,26 g) et butanolique F<sub>4</sub>Bu (m = 5,31 g). L'extrait aqueux épuisé est appelé F<sub>4</sub>Aq (m = 3,07 g).

De même, 10 g de poudres de feuilles sèches sont macérés dans le mélange hydroéthanolique 90/10 : v/v à température ambiante pendant 24 h. Le mélange hétérogène est ensuite filtré sur papier filtre et le filtrat est évaporé sous vide à 45 °C pour donner l'extrait brut éthanolique G (m= 1, 25 g).

### 2.4. Évaluation des activités biologiques

#### 2.4.1. Évaluation de l'activité antiplasmodiale

##### 2.4.1.1. Principe

La souche parasitaire *Plasmodium falciparum* FCM 29 utilisée est mise en contact avec des concentrations différentes d'extrait dans des puits d'une microplaque de 96 puits. La croissance intra-érythrocytaire du parasite est suivie en utilisant une sonde fluorescente, SYBR Green I, spécifique à l'ADN double brin. La fluorescence émise par le complexe ADN-SYBR Green I

formé est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque à fluorescence (Flx 800, Biotek). Cette fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN. [9], [10].

Un extrait ou une fraction est considéré actif si la concentration inhibitrice IC<sub>50</sub> inhibant 50 % de la croissance des parasites est inférieure à 20 µg/ml.

#### **2.4.1.2. Mode opératoire**

La souche *Plasmodium falciparum* FCM29 maintenue en culture continue par la méthode de Trager et Jensen est utilisée.[9]

Avant le test, la parasitémie est estimée par comptage visuel au microscope à partir d'un frottis sanguin, coloré au Diff-quick. Une dilution de la culture avec des hématies saines a été réalisée pour avoir un inoculum avec 1% de parasitémie et 2% d'hématocrite.

##### a) Préparation des extraits

Les extraits ou fractions à tester sont dissous dans un premier temps dans 20 µl de DMSO, ensuite l'ICM (Incomplet médias) est ajouté dans les préparations afin d'obtenir des solutions mères de concentration égale à 1 mg/ml. À partir des solutions mères, une dilution en cascade (coefficient de dilution de 1/2) avec l'ICM est réalisée (de 50 µg/ml à 0,39 µg/ml) puis par puits dans une microplaque de 96 puits.

##### b) Test proprement dit

L'ICM (50 µl) est distribué dans les microplaques à 96 puits. Chaque extrait à tester (50 µl) est ensuite réparti dans chaque puits et 100 µl d'inoculum enrichi de 20% de sérum humain O<sup>+</sup> y sont versés. Chaque test est effectué en triple.

Des antipaludiques de référence (la N-quinine, la quinine et la chloroquine), un témoin positif et un témoin négatif ont été utilisés :

- Témoin positif : 100 µl d'hématies saines additionnées de 100 µl d'inoculum (croissance des parasites).
- Témoin négatif : 200 µl d'hématies saines (pas de croissance des parasites).

Toutes les microplaques sont incubées à 37°C dans un incubateur contenant une cloche à bougie pendant 72 h.

Pour la lecture, une solution de SYBR Green I est préparée en ajoutant dans 900 µl de DMSO 100 µl de SYBR Green I. 50 µl de cette préparation sont ajoutés dans chaque puits. Après 1 heure d'incubation, la fluorescence émise par le complexe ADN-SYBR Green I est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque à fluorescence (Flx 800, Biotek).

L'IC<sub>50</sub> est calculée à partir de l'équation de la courbe obtenue en représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance parasitaire en fonction des concentrations de l'extrait.

#### **2.4.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne**

##### **2.4.2.1. Germes testés**

L'évaluation des activités antibactériennes et antifongiques des extraits de *S. pleistophyllus* a été faite par la méthode d'antibiogramme sur quatorze (14) souches bactériennes et fongiques de référence dont six (06) à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 11632, *Bacillus cereus* ATCC <sup>1</sup>14579, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305, *Bacillus megaterium*) et huit (08) à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* ATCC 13076, *Shigella flexnerii* ATCC 12022, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048) puis une (01) souche fongique *Candida albicans* ATCC 10231 ont été utilisées.

---

<sup>1</sup> ATCC: American Type Culture Collection.

### 2.4.2.2. Méthode de disque de diffusion sur milieu gélosé ou Antibiogramme standard sur milieu solide (Mueller Hinton Agar)

L'activité antimicrobienne *in vitro* des extraits alcooliques de la plante entière et des feuilles a été évaluée par la méthode d'antibiogramme développée par Jensen et *al.* en 2000 et Ngameni et *al.* en 2009 permettant de mesurer l'inhibition des bactéries par les extraits de la plante sur boîtes de pétri [11], [12].

La méthode consiste à déposer des disques stériles de 6 mm de diamètre, imprégnés de 10 $\mu$ L d'extrait brut de concentration de 1mg/disque à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une quantité de 2 ml de suspensions de bactéries correspondant à 0,5 Mac Farland. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h. L'extrait diffuse de manière circulaire au sein de la gélose. Après incubation, les zones d'inhibition de la croissance des bactéries par l'extrait, caractérisées par le diamètre de halo d'inhibition autour de chaque disque, sont mesurées en mm.

Dans cette auréole, les concentrations d'extrait diminuent du centre vers la périphérie. Le diamètre de halo d'inhibition varie en fonction du degré de sensibilité de la bactérie et de la levure à l'extrait [13]–[15]. Chaque essai biologique est réalisé en double.

Les antibiotiques Néomycine (30  $\mu$ g /disque), et Chloramphenicol (30  $\mu$ g /disque), ainsi que l'antifongique Myconazole de référence ont servi de témoins positifs.

Tableau 1: Méthode de mesure du diamètre de la zone d'inhibition [16]

Diamètre de la zone d'inhibition (X) en mm	Sensibilité des germes	Résultats
X < 8mm	Insensible	-
9mm < X < 14mm	Sensible	+
15mm < X < 19mm	Très sensible	++
X > 20mm	Extrêmement sensible	+++

## III. RESULTATS ET DISCUSSION

### 3.1. Screening phytochimique

Le criblage phytochimique effectué sur un extrait hydroéthanolique 90/10 : v/v de la plante entière a conduit aux résultats consignés dans le tableau 2.

Tableau 2: Résultats du criblage phytochimique de l'extrait hydroéthanolique de la plante entière.

Famille chimique à détecter	Réactifs de caractérisation	Résultats
<b><i>Alcaloïdes</i></b>		
Alcaloïdes	KI, I <sub>2</sub> , HgCl <sub>2</sub> , Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , acide tartrique	-
<b><i>Composés phénoliques</i></b>		
Flavonoïdes, flavanols	HCl concentré, tournures de magnésium	+++
Flavones	HCl concentré, tournures de magnésium, alcool isoamylique	-
Anthocyanes	HCl 25% aqueux, ammoniac	-
Leucoanthocyanes	HCl concentré	-
Coumarines	NaOH 20% aqueux	++
Anthraquinones	NH <sub>4</sub> OH	-
Hétérosides anthraquinones	HCl 12 %, NH <sub>4</sub> OH 20%	-
Tanins	Gélatine salée 1 % (gélatine 1 % + NaCl 10 %, 50/50 v/v)	++
Tanins condensés	FeCl <sub>3</sub> 10%	+++
Polyphénols	Gélatine à 1 %	+++
<b><i>Terpénoïdes</i></b>		
Stéroïdes	Anhydride acétique, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentré	+++
Cardénolides	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> à 2 %, Acide trichloracétique à 20 %	-

Iridoïdes	HCl, CuSO <sub>4</sub> , Glycérol	-
-----------	-----------------------------------	---

- : test négatif : aucune réaction observée

+ : faible coloration ou formation de peu de précipités

++ : Coloration franche ou précipités abondants

+++ : Coloration intense ou floculation immédiate ou hauteur de mousse supérieure à 5cm.

Le screening phytochimique a révélé la présence dans la plante :

- de stéroïdes et de stérols insaturés,
- de composés phénoliques représentés par des flavonoïdes du type flavonols, de coumarines et des tanins catéchiques

Ces métabolites secondaires sont les plus caractéristiques du genre *Senecio* mentionnés dans les littératures, exemptés de l'alcaloïde.

### 3.1. Tests d'activité antiplasmodiale

Les extraits obtenus de l'extraction de la plante entière ont été testés *in vitro* contre *P. falciparum* FCM29 et les résultats sont consignés dans le tableau 3 suivant :

Tableau 3: Résultats des tests *in vitro* sur *P. falciparum* des différents extraits de la plante entière

N°	Extrait	IC <sub>50</sub> (µg /ml)
1	F <sub>1</sub>	14,21
2	F <sub>2</sub>	8,63
3	F <sub>3</sub>	4,17
4	F <sub>4</sub> Hex	14,59
5	F <sub>4</sub> Ac	28,94
6	F <sub>4</sub> Bu	NA
7	F <sub>4</sub> Aq	NA

Au fur et à mesure de l'épuisement du matériel végétal par macération dans l'alcool, l'activité antiplasmodiale s'améliore. Les extraits s'enrichissent probablement en principes actifs.

Les fractions F<sub>2</sub> et F<sub>3</sub> se sont avérées potentiellement actives sur *P. falciparum* avec des concentrations inhibitrices IC<sub>50</sub> respectives de 8,63 µg/ml et 4,17 µg/ml. Par contre, la fraction butanolique et la fraction aqueuse résiduelle se sont montrées inactives.

La fraction hexanique F<sub>4</sub>Hex montre une activité modérée avec une IC<sub>50</sub> = 14,59 µg/ml. Ce résultat indique que les molécules les plus actives sont manifestement des molécules apolaires ou peu polaires.

Pour des extraits bruts tels l'extrait F<sub>1</sub> et l'extrait hexanique F<sub>4</sub>Hex, les valeurs de concentrations inhibitrices IC<sub>50</sub> respectives de 14,21 µg/ml et de 14,59 µg/ml sont encourageantes. En effet, les substances actives qu'ils renferment peuvent être à faible concentration étant diluées parmi un grand nombre d'autres molécules inactives. L'extrait hexanique exhibe une activité encourageante avec une IC<sub>50</sub> de 14,59 µg/ml. En effet, l'activité d'un extrait brut dépend de deux paramètres : l'activité intrinsèque des produits actifs et leur quantité ou leur concentration relative dans l'extrait. Elle peut aussi bien être le reflet d'une faible quantité de constituants très actifs que d'une grande quantité de constituants peu actifs. Les résultats obtenus justifient l'entreprise en perspective d'une étude phytochimique et biologique approfondie de la plante entière.

### 3.2. Tests d'activité antimicrobienne

Les résultats des tests antimicrobiens de l'extrait éthanolique rassemblés F<sub>4</sub> et l'extrait de feuilles G ainsi que ceux des antibiotiques de référence sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Diamètre de la zone d'inhibition (mm/souche/extrait)

Souches bactériennes	Extrait F <sub>4</sub>	Extrait G	Néomycine	Chloramphenicol	Myconazole
<b>Bacillus cereus</b>	11±0	0±0	21	NT	NT
<b>Staphylococcus aureus</b>	0±0	0±0	NT	19	NT
<b>Streptococcus pneumoniae</b>	0±0	0±0	23	NT	NT
<b>Escherichia coli</b>	13±0	0±0	NT	25	NT
<b>Pseudomonas aeruginosa</b>	12±0	0±0	20	NT	NT
<b>Candida albicans</b>	0±0	0±0	NT	NT	25
<b>Streptococcus pyogenes</b>	16±0	16±0	30	NT	
<b>Shyella flexnerii</b>	0±0	0±0	NT	25	
<b>Yersinia enterocolitica</b>	10±0	0±0	NT	25	
<b>Chlostridium perfringens</b>	0±0	0±0	21	NT	
<b>Bacillus megaterium</b>	01±0	0±0	NT	30	
<b>Proteus mirabilis</b>	0±0	0±0	NT	15	
<b>Enterobacter cloacae</b>	0±0	0±0	27	NT	
<b>Enterobacter aerogenes</b>	10±0	0±0	NT	26	
<b>Salmonella enterica</b>	0±0	0±0	NT	23	
<b>Listeria monocytogene</b>	0±0	0±0	22	NT	

La lecture des diamètres des zones d'inhibition (ZI) conformément aux méthodes adoptées par Ponce et al (2003) [16] montre que l'extrait alcoolique de *Senecio pleistophyllus* est actif contre deux souches bactériennes à Gram (+) : *Bacillus cereus* et *Streptococcus pyogenes*. À une concentration de 1mg/disque, il inhibe la croissance de ces deux bactéries à Gram (+) avec un diamètre de halo d'inhibition variant de 11mm à 16 mm. La souche bactérienne *Streptococcus pyogenes* a été très sensible (16 mm ± 0) à l'extrait éthanolique. Ce dernier est aussi actif contre quatre souches bactériennes à Gram (-) : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter aerogenes* en inhibant leur croissance avec un diamètre de halo d'inhibition allant de 10 à 13 mm. .

Les souches bactériennes à Gram positif *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus megaterium* et à Gram négatif *Salmonella enterica*, *Shigella flexnerii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* ainsi que la souche fongique *Candida albicans* ont été résistantes à l'extrait.

L'extrait alcoolique des feuilles de *Senecio pleistophyllus* n'est actif que sur *Streptococcus pyogenes*. Les autres souches microbiennes testées ont été résistantes à cet extrait.

Les deux extraits alcooliques présentent une activité faible par rapport aux antibiotiques de référence dont les diamètres d'halo d'inhibition varient de 20 mm à 30 mm pour Néomycine et de 19 mm à 30 mm pour Chloramphénicol.

Selon Paris et Moyse en 1965, Bruneton en 1993 et Mansour en 2014 les flavonoïdes et certains terpénoïdes possèdent une activité antimicrobienne et jouent un rôle important dans la défense de la plante contre les microorganismes. Ces familles chimiques ont été décelées dans l'extrait alcoolique de la plante entière de *Senecio pleistophyllus*, les activités biologiques de cet

extrait pourraient être liées à la présence de ces classes de métabolites secondaires ou de la composition chimique de l'extrait. [17] – [19].

#### IV. CONCLUSION

Le criblage phytochimique a révélé la présence dans la plante de stéroïdes et de stérols insaturés, des flavonoïdes du type flavonols, de coumarines et des tanins catéchiques. En effet, les activités antibactériennes des extraits actifs de *S. pleistophyllus* pourraient être dues aux flavonoïdes, aux terpénoïdes ou autres composés naturels dont la présence est prépondérante dans ces extraits.

Notre étude a mis en évidence les activités antiplasmodiale et antibactérienne de quelques extraits de la plante entière de *Senecio pleistophyllus*. L'évaluation de l'activité antibactérienne a permis d'identifier les germes résistants à l'extrait alcoolique de la plante entière.

L'étude de l'extrait alcoolique des feuilles pourrait conduire à l'isolement d'une molécule active uniquement contre *Streptococcus pyogenes*.

#### RÉFÉRENCES

- [1] WHO, « World\_Malaria\_Report », 2021.
- [2] A. Rinaldi, « Fighting malaria at the crossroads », *EMBO Rep*, vol. 5, no 9, p. 847-851, sept. 2004, doi: 10.1038/sj.embor.7400244.
- [3] X. Anglaret et E. Mortier, *Maladies infectieuses*. : 3ème édition. Editions Estem, 2002.
- [4] K. Hostettmann et A. Marston, « Twenty years of research into medicinal plants: results and perspectives », *Phytochemistry Reviews*, vol. 1, no 3, p. 275-285, 2002.
- [5] P. Principe, « The economic significance of plants and their constituents as drugs. In: Wagner, H., Hikino, H., Farnsworth N.R. (eds.), Vol 3. », in *Economic and Medicinal Plant Research*, Academic Press, London., vol. 3, London, 1989.
- [6] Y. Liu et M.-W. Wang, « Botanical drugs: challenges and opportunities: contribution to Linnaeus Memorial Symposium 2007 », *Life Sciences*, vol. 82, no 9-10, p. 445-449, 2008.
- [7] P. Houghton et A. Raman, *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [8] H. H. S. Fong, M. Tin-Wa, et N. R. Farnsworth, *Phytochemical screening*. Chicago: College of Pharmacy, University of Illinois, 1964. J.-C.
- [9] W. Trager et J. B. Jensen, « Human malaria parasites in continuous culture », *Journal of Parasitology*, vol. 91, no 3, p. 484-486, 2005.
- [10] T. N. Bennett et al., « Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy », *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 48, no 5, p. 1807-1810, 2004.
- [11] A. Jensen, L. Hagelskjaer Kristensen, H. Nielsen, et J. Prag, « Minimum requirements for a rapid and reliable routine identification and antibiogram of *Fusobacterium necrophorum* », *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 27, no 7, p. 557-563, juill. 2008, doi: 10.1007/s10096-008-0468-8.
- [12] B. Ngameni et al., « Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae) », *South African Journal of Botany*, vol. 75, no 2, p. 256-261, 2009.
- [13] T. A. Davies, L. M. Kelly, M. R. Jacobs, et P. C. Appelbaum, « Antipneumococcal activity of telithromycin by agar dilution, microdilution, E test, and disk diffusion methodologies », *J Clin Microbiol*, vol. 38, no 4, p. 1444-1448, avr. 2000, doi: 10.1128/JCM.38.4.1444-1448.2000.
- [14] J. Duval et C. J. Soussy, *Antibiothérapie: bases bactériologiques pour l'utilisation des antibiotiques*. Masson, 1990.
- [15] Ferron, « La résistance des bactéries aux antibiotiques », in *Bactériologie médicale*, 15th éd., Paris, 1994.

- [16] A. G. Ponce, R. Fritz, C. Del Valle, et S. I. Roura, « Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard », *LWT-Food Science and Technology*, vol. 36, no 7, p. 679-684, 2003.
- [17] R. R. Paris et H. Moyses, *Précis de matière médicale*, Paris: Masson, 1965.
- [18] J. Bruneton, *Éléments de phytochimie et de pharmacognosie*. Paris: Tec & Doc, 1993.
- [19] H. Mansour-Djaalab et al., « Phytochemical screening and antifungal activity of phases obtained from the extracts of *Juglans Regia* L., *Lawsonia inermis* L. and *Pistacia lentiscus* L », *Int J Pharmacognosy and Phytochem Res*, vol. 15, no 7, p. 1, 2014.