

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
UNION – DISCIPLINE – TRAVAIL

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Année : 2015 – 2016

N°1748/16

THESE

Présentée en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Mlle SOMA KYNA AUGUSTINE

**PREFORMULATION DE GEL A BASE DE L'EXTRAIT D'ECORCE DE
SACOGLOTTIS GABONENSIS (HUMIRIACEAE) : EVALUATION DE
L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE**

Soutenu publiquement le 31/05/2016

Composition du jury

Président du jury : Monsieur KOUADIO Kouakou Luc, Professeur Titulaire

Directeur de thèse : Monsieur KOFFI Armand Angely, Professeur Agrégé

Assesseur : Madame KOUAKOU Siransy N'Doua Gisèle, Professeur Agrégé

Assesseur : Monsieur OUASSA Timothée, Professeur Agrégé

**ADMINISTRATION ET PERSONNEL
ENSEIGNANT DE L'UFR
SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET
BIOLOGIQUES**

I. HONORARIAT

Directeurs/Doyens Honoraires :	Professeur RAMBAUD André
	Professeur FOURASTE Isabelle
	Professeur BAMBA Moriféré
	Professeur YAPO Abbé †
	Professeur MALAN Kla Anglade
	Professeur KONE Moussa †

II. ADMINISTRATION

Directeur	Professeur ATINDEHOU Eugène
Sous-Directeur Chargé de la Pédagogie	Professeur Ag INWOLEY Kokou André
Sous-Directeur Chargé de la Recherche	Professeur Ag OGA Agbaya Serge
Secrétaire Principal	Madame NADO née AKPRO Marie Josette
Documentaliste	Monsieur N'GNIMMIEN Koffi Lambert
Intendant	Monsieur GAHE Alphonse
Responsable de la Scolarité	Madame DJEDJE Yolande

III. PERSONNEL ENSEIGNANT PERMANENT

1. PROFESSEURS TITULAIRES

Mme AKE Michèle Dominique	Chimie Analytique, Bromatologie
M ATINDEHOU Eugène	Chimie Analytique, Bromatologie
Mme ATTOUNGBRE HAUHOUOT M.L.	Biochimie et Biologie Moléculaire
M DANO Djédjé Sébastien	Toxicologie.
Mme KONE BAMBA Diéneba	Pharmacognosie
MM KOUADIO Kouakou Luc	Hydrologie, Santé Publique
MALAN Kla Anglade	Chimie Ana., Contrôle de qualité

	MENAN Eby Ignace	Parasitologie - Mycologie
	MONNET Dagui	Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme	SAWADOGO Duni	Hématologie
M	YOLOU Séri Fernand	Chimie Générale

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM	ABROGOUA Danho Pascal	Pharmacie Clinique
	AHIBOH Hugues	Biochimie et Biologie moléculaire
Mme	AKE EDJEME N'guessan Angèle	Biochimie et Biologie moléculaire
MM	AMARI Antoine Serge G.	Législation pharmaceutique
	AMIN N'Cho Christophe	Chimie analytique
	DEMBELE Bamory	Immunologie
	GBASSI K. Gildas	Chimie Physique Générale
MM	INWOLEY Kokou André	Immunologie
	KABLAN Brou Jérôme	Pharmacologie
	KOFFI Armand Angely	Pharmacie Galénique
Mme	KOUAKOU-SIRANSY Gisèle	Pharmacologie
MM	KOUASSI Dinard	Hématologie
	LOUKOU Yao Guillaume	Bactériologie-Virologie
	OGA Agbaya Stéphane	Santé publique et Economie de la santé
	OUASSA Timothée	Bactériologie-Virologie
	OUATTARA Mahama	Chimie organique, Chimie thérapeutique
	YAPI Ange Désiré	Chimie organique, Chimie thérapeutique
	YAVO William	Parasitologie – Mycologie
	ZINZENDORF Nanga Yessé	Bactériologie-Virologie

3. MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

M DIAFOUKA François Biochimie et Biologie de la Reproduction

4. MAITRES ASSISTANTS

Mme AFFI-ABOLI Mihessé Rosaline Immunologie
M ANGORA Kpongbo Etienne Parasitologie-Mycologie
Mme BARRO KIKI Pulchérie Parasitologie - Mycologie
MM BONY François Nicaise Chimie Analytique
CLAON Jean Stéphane Santé Publique
DALLY Laba Pharmacie Galénique
DJOHAN Vincent Parasitologie –Mycologie
Mme FOFIE N'Guessan Bra Yvette Pharmacognosie
Mme IRIE N'GUESSAN Amenan Pharmacologie
M KASSI Kondo Fulgence Parasitologie-Mycologie
Mmes KONATE Abibatou Parasitologie-Mycologie
Mme KOUASSI AGBESSI Thérèse Bactériologie-Virologie
MM MANDA Pierre Toxicologie
Mmes POLNEAU VALLEE Sandrine Mathématiques-Statistiques
SACKOU KOUAKOU Julie Santé Publique
SANGARE Mahawa Biologie Générale
SANGARE TIGORI Béatrice Toxicologie
VANGA ABO Henriette Parasitologie-Mycologie
M YAYO Sagou Eric Biochimie et Biologie moléculaire

5. ASSISTANTS

MM	ADJAMBRI Adia Eusebé	Hématologie
	ADJOUNGOUA Attoli Léopold	Pharmacognosie
Mme	AKA ANY-GRAH Armelle Adjoua S.	Pharmacie Galénique
M	AMICHIA Attoumou Magloire	Pharmacologie
Mmes	ALLOUKOU-BOKA Paule-Mireille	Législation
	APETE yah sandrine épse TAHOU	Bactériologie-Virologie
	AYE YAYO Mireille	Hématologie
MM	BROU Amani Germain	Chimie Analytique
	BROU N'GUESSAN Aime	Pharmacie Clinique
	CABLAN Mian N'Dédey Asher	Bactériologie-Virologie
	COULIBALY Songuigama	Chimie Thérapeutique
Mlle	DIAKITE Aïssata	Toxicologie
M	DJADJI Ayoman Thierry Lenoir	Pharmacologie
Mme	DOTIA Tiepordan Agathe	Bactériologie-Virologie
M	EFFO Kouakou Etienne	Pharmacologie
Mme	HOUNSA Annita Emeline Epse Alla	Sante Publique
MM	KABRAN Tano Kouadio Mathieu	Immunologie
	KACOU Alain	Chimie Thérapeutique
	KAMENAN Boua Alexis Thierry	Pharmacologie
	KOFFI Kouamé	Santé publique
	KONAN Konan Jeans Louis	Biochimie et Biologie molécula
Mme	KONE Fatoumata	Biochimie et Biologie moléculaire
MM	KOUAKOU Sylvain Landry	Pharmacologie
	KOUAME Denis Rodrigue	Immunologie

	KPAIBE Sawa Andre Philippe	Chimie Analytique
	LATHRO Joseph Serge	Bactériologie-Virologie
	N'GBE Jean Verdier	Toxicologie
M	N'GUESSAN Alain	Galénique
Mme	N'GUESSAN-BLAO Amino Rebecca J.	Hématologie
M	N'GUESSAN Deto Jean-Paul	Chimie Thérapeutique
Mmes	N'GUESSAN Kakwopko Clémence	Galénique
	OUAYOGODE-AKOUBET Aminata	Pharmacognosie
	SIBLI-KOFFI Akissi Joelle	Biochimie et biologie moléculaire
MM	TRE Eric Serge	Chimie Analytique
Milles	TUO Awa Nakognon	Pharmacie Galénique
	YAO ATTIA Akissi Régine	Santé publique
M.	YAPO Assi Vincent De Paul	Biologie Générale

6. ATTACHES DE RECHERCHE

Mme	ADIKO N'Dri Marcelline	Pharmacognosie
M	LIA Gnahoré José Arthur	Pharmacie Galénique

7. IN MEMORIUM

Feu	KONE Moussa	Professeur Titulaire
Feu	YAPO Abbé Etienne	Professeur Titulaire
Feu	COMOE Léopold	Maître de Conférences Agrégé
Feu	GUEU Kaman	Maître-Assistant
Feu	ALLADOUM Nambelbaye	Assistant
Feu	COULIBALY Sabali	Assistant
Feu	TRAORE Moussa	Assistant

Feu YAPO Achou Pascal

Assistant

8. ENSEIGNANTS VACATAIRES

1. PROFESSEURS

MM	ASSAMOI Assamoi Paul	Biophysique
	DIAINE Charles	Biophysique
	OYETOLA Samuel	Chimie Minérale
	ZOUZOU Michel	Cryptogamie

2. MAITRES DE CONFERENCES

MM	KOUAKOU Tanoh Hilaire	Botanique et Cryptogamie
	SAKO Aboubakar	Physique (Mécanique des fluides)
Mme	TURQUIN née DIAN Louise	Biologie Végétale
M	YAO N'Dri	Pathologie Médicale

3. MAITRES-ASSISTANT

M	KONKON N'Dri Gilles	Botanique, Cryptogamie
---	---------------------	------------------------

4. NON UNIVERSITAIRES

MM.	AHOUSSE Daniel Ferdinand	Secourisme
	DEMPAH Anoh Joseph	Zoologie
	GOUEPO Evariste	Techniques officinales
Mme	KEI-BOGUINARD Isabelle	Gestion
MM.	KOFFI ALEXIS	Anglais
	KOUA Amian	Hygiène

PREFORMULATION DE GEL A BASE DE L'EXTRAIT D'ECORCE DE *SACOGLOTTIS GABONENSIS* (HUMIRIACEAE):
EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

KOUASSI Amboise	Management
N'GOZAN Marc	Secourisme
KONAN Kouacou	Diététique
Mme PAYNE Marie	Santé Publique

**COMPOSITION DES DEPARTEMENTS DE
L'UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES
ET BIOLOGIQUES**

I. BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

Professeur	LOUKOU Yao Guillaume	Maître de Conférences Agrégé Chef de département
Professeurs	ZINZENDORF Nanga Yessé OUASSA Timothée	Maître de Conférences Agrégé Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	KOUASSI AGBESSI Thérèse APETE Sandrine CABLAN Mian N'Dédey Asher DOTIA Tiepordan Agathe LATHRO Joseph Serge	Maître- Assistante Assistante Assistant Assistante Assistant

II. BIOCHIMIE, BIOLOGIE MOLECULAIRE, BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION ET PATHOLOGIE MEDICALE

Professeur	MONNET Dagui	Professeur Titulaire Chef de Département
Professeurs	HAUHOLOT ép. ATTOUNGBRE M.L. AHIBOH Hugues AKE EDJEME N'Guessan Angèle DIAFOUKA François	Professeur Titulaire Maître de Conférences Agrégé Maître de Conférences Agrégé Maître de Conférences
Docteurs	YAYO Sagou Eric KONAN Konan Jean Louis KONE Fatoumata SIBLI-KOFFI Akissi Joelle	Maître-Assistant Assistant Assistante Assistante

III. BIOLOGIE GENERALE, HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Professeur	SAWADOGO Duni	Professeur Titulaire Chef du Département
Professeurs	INWOLEY Kokou André	Maître de Conférences Agrégé
	DEMBELE Bamory	Maître de Conférences Agrégé
	KOUASSI Dinard	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	AFFI-ABOLI Mihessé Roseline	Maitre-Assistant
	SANGARE Mahawa	Maitre-Assistant
	ADJAMBRI Adia Eusebé	Assistant
	AYE YAYO Mireille	Assistante
	KABRAN Tano K. Mathieu	Assistant
	KOUAME Denis Rodrigue	Assistant
	N'GUESSAN-BLAO R. S.	Assistante
	YAPO Assi Vincent De Paul	Assistant

IV. CHIMIE ANALYTIQUE, CHIMIE MINERALE ET GENERALE, TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

Professeur	ATINDEHOU Eugène	Professeur Titulaire Chef de Département
Professeurs	MALAN Kla Anglade	Professeur Titulaire
	AKE Michèle Dominique	Professeur Titulaire
	YOLOU Séri Fernand	Professeur Titulaire
	AMIN N'Cho Christophe	Maître de Conférences Agrégé
	GBASSI K. Gildas	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	BONY Nicaise François	Maître-Assistant

VII. PHARMACIE GALENIQUE, BIOPHARMACIE, COSMETOLOGIE, GESTION ET LEGISLATION PHARMACEUTIQUE

Professeur	KOFFI Armand A.	Maître de Conférences Agrégé Chef de Département
Professeur	AMARI Antoine Serge G.	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	DALLY Laba Ismaël	Maître-Assistant
	AKA ANY-GRAH Armelle A.S.	Assistante
	ALLOUKOU-BOKA Paule-Mireille	Assistante
	LIA Gnahoré José Arthur	Attaché de recherche
	N'GUESSAN Alain	Assistant
	N'GUESSAN Kakwopko C.	Assistante
	TUO Awa Nakognon	Assistante

VIII. PHARMACOGNOSIE, BOTANIQUE, BIOLOGIE VEGETALE, CRYPTOGAMIE,

Professeur	KONE BAMBA Diénéba	Professeur Titulaire Chef de Département
Docteurs	FOFIE N'Guessan Bra Yvette	Maitre-Assistante
	ADIKO N'Dri Marcelline	Attaché de recherche
	ADJOUGOUA Attoli Léopold	Assistant
	OUAYOGODE-AKOUBET Aminata	Assistante

IX. PHARMACOLOGIE, PHARMACIE CLINIQUE ET THERAPEUTIQUE, ET PHYSIOLOGIE HUMAINE

Professeurs	KOUAKOU SIRANSY N'Doua G.	Maître de Conférences Agrégé Chef de Département par intérim
	ABROGOUA Danho Pascal	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	IRIE N'GUESSAN Amenan G.	Maître-Assistante
	AMICHIA Attoumou M.	Assistant
	BROU N'GUESSAN Aime	Assistant
	DJADJI Ayoman Thierry Lenoir	Assistant
	EFFO Kouakou Etienne	Assistant
	KAMENAN Boua Alexis	Assistant
	KOUAKOU Sylvain Landry	Assistant

X. PHYSIQUE, BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, STATISTIQUES ET INFORMATIQUE

Professeur	ATINDEHOU Eugène	Professeur Titulaire Chef de Département par intérim
Docteur	POLNEAU VALLEE Sandrine	Maître-Assistant

XI. SANTE PUBLIQUE, HYDROLOGIE ET TOXICOLOGIE

Professeur	KOUADIO Kouakou Luc	Professeur Titulaire Chef de département
	DANO Djédjé Sébastien	Professeur Titulaire
	OGA Agbaya Stéphane	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	CLAON Jean Stéphane	Maître-assistant

PREFORMULATION DE GEL A BASE DE L'EXTRAIT D'ECORCE DE *SACOGLOTTIS GABONENSIS* (HUMIRIACEAE):
EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

MANDA Pierre	Maître-assistant
SANGARE TIGORI B.	Maître-assistante
DIAKITE Aissata	Assistante
HOUNSA-ALLA Annita Emeline	Assistante
KOFFI Kouamé	Assistant
N'GBE Jean Verdier	Assistant
YAO ATTIA Akissi Régine	Assistante

Sommaire

	Pages
Liste des abréviations.....	XXXV
Liste des figures.....	XXXVII
Liste des tableaux.....	XLI
Introduction.....	1
Première partie : REVUE DE LA LITTERATURE.....	5
Chapitre I : GENERALITES SUR L'ULCERE DE BURULI.....	6
I-Historique.....	7
II-Aspects épidémiologiques	8
III-Agent pathogène.....	12
IV- Physiopathologie.....	14
V-Traitement de l'ulcère de Buruli.....	18
VI-Prévention de l'ulcère de Buruli	25
Chapitre II : GENERALITES SUR SACOGLOTTIS GABONENSIS.....	26
I-Position Systémique.....	27
II-Origine et répartition géographique.....	27
III-Etude botanique de la plante.....	28
IV-Usage.....	31
V-Croissance et développement.....	32
VI- Multiplication et plantation	33
VII- Propriétés chimiques.....	33
Deuxième partie : ETUDE EXPERIMENTALE.....	35
Chapitre I : MATERIEL ET METHODES.....	36
I-Matériel.....	37

II-Méthodes.....	39
Chapitre II : RESULTATS.....	59
	Pages
I-Obtention et caractérisation Physico-chimique de l'extrait sec...60	
II-Détermination de l'activité antibactérienne de l'extrait de <i>Sacoglottis gabonensis</i>	61
III-Détermination des paramètres antibactériens CMI et CMB... 64	
IV-Résultats des ensemencements des cinq souches de <i>Mycobacterium ulcerans</i>	66
V-Calcul des Taux de Résistance de <i>Mycobacterium ulcerans</i>	72
Chapitre III : DISCUSSION.....	73
I- Obtention et caractéristiques physico-chimiques de l'extrait aqueux de <i>sacoglottis gabonensis</i>	74
II-Détermination des paramètres antibactériens CMB/CMI.....	75
III-Détermination des taux de résistance de <i>Mycobacterium ulcerans</i>	76
Conclusion.....	79
Perspectives	81
Références bibliographiques.....	83

Liste des abréviations

BAAR :	Bacille Acido-Alcool-Résistant
CMB :	Concentration minimale bactéricide
CMC :	Carboxymethylcellulose
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PCR :	Polymerase chain reaction
PVD :	Pays en voie de développement
P407	Poloxamer 407
SIDA :	Syndrome immunodéficientaire acquis
SG :	<i>Sacoglottis gabonensis</i>
UB :	Ulcère de Buruli
VIH :	Virus de l'immuno déficience humaine
AMC:	Amoxicilline
BLSE :	Beta Lactamase à Spectre Elargi
BT:	Bouillon de Thioglycolate
CDC:	Centers for Disease Control d'Atlanta
D :	Dilution
ED :	Eau Distillée
FOX :	Cefoxitine
GMH:	Gélose Mueller-Hinton
IMP :	Imipénème
IPCI:	Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
LJ:	Lowenstein-Jensen
MH:	Miller-Hinton
OX :	Oxacilline
PNUM :	Programme Nationale de lutte contre les Ulcères à mycobactéries
CNR :	Centre National de Référence
CASFM :	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
EUCAST:	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Liste des figures

	Pages
Figure 1 : Nombre de cas d'ulcère de Buruli recensés en Côte d'Ivoire, de 1978 à 1997.....	9
Figure 2 : Répartition géographique des cas cumulés d'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire de 1978 à 1997.....	10
Figure 3 : Distribution selon l'âge et le sexe des 10382 cas d'ulcère de Buruli dénombrés en Côte d'Ivoire de 1978 à 1997.....	11
Figure 4 : Distribution selon la fréquentation ou non d'un point d'eau par les 10 382 cas d'ulcère de Buruli dénombrés en Côte d'Ivoire de 1978 à 1997.....	11
Figure 5 : Photo d'une punaise aquatique <i>Naucoris cimicoides</i> (Extrait de Nature Reviews.....	15
Figure 6 : Acte chirurgical sur une forme nodulaire.....	20
Figure 7 : Feuilles de <i>Sacoglottis gabonensis</i> (Humiriaceae).....	29
Figure 8 : Fruit de <i>Sacoglottis gabonensis</i> (Humiriaceae)	30
Figure 9 : Arbre de <i>Sacoglottis gabonensis</i> (Humiriaceae).....	30
Figure 10 : Méthode de la vérification de la stérilité de l'extrait aqueux de <i>Sacoglottis gabobnensis</i> (Humiriaceae).....	42
Figure 11 : Préparation des gammes de concentration de l'extrait aqueux de <i>Sacoglottis gabonensis</i> (Humiriaceae).....	43
Figure 12 : Méthode de préparation de l'inoculum bactérien des germes qui surinfectent l'ulcère de Buruli.....	44
Figure 13 : Numération de l'inoculum.....	46
Figure 14 : Schéma simplifié du principe de la méthode de diffusion en milieu solide.....	48
Figure 15 : Culture bactérienne en présence de l'extrait végétal.....	50

	Pages
Figure 16a : Méthode de détermination de la CMB.....	51
Figure 16b : Méthode de détermination de la CMB.....	52
Figure 17 : Différentes dilutions (D) de la souche CNR006.....	56
Figure 18 : Ensemencement des tubes témoins.....	57
Figure 19 : Ensemencement des 3 tubes à concentration $C_1 = 10$ mg/ml en SG.....	57
Figure 20 : Cristaux d'extrait sec.....	60
Figure 21 : Poudre d'extrait sec.....	60
Figure 22 : Activité antibactérienne de l'extrait de <i>Sacoglottis gabonensis</i> sur la souche 292c/13 de <i>Staphylococcus aureus</i>	63
Figure 23 : Activité antibactérienne de l'extrait de <i>Sacoglottis gabonensis</i> sur la souche 1089c/12 d' <i>Escherichia coli</i>	63
Figure 24 : Concentration minimale bactéricide (mg/ml) de l'extrait de <i>Sacoglottis gabonensis</i> sur la souche 292c/13 de <i>Staphylococcus aureus</i>	65
Figure 25 : Tubes témoins après 3 mois d'incubation.....	66
Figure 26 : Tubes à concentration $C_1 = 10$ mg/ml en SG après 3 mois d'incubation.....	67
Figure 27 : Tubes à concentration $C_2 = 20$ mg /ml en SG après 3 mois d'incubation.....	68
Figure 28 : Tubes à concentration $C_4 = 40$ mg/ml en SG après 3 mois d'incubation.....	68
Figure 29 : tubes à concentration $C_5 = 0,4$ mg/ml après 3 mois d'incubation.....	68

	Pages
Figure 30 : tubes à concentration $C_R = 0,04$ mg/ml en Rifampicine.....	69
Figure 31 : Tubes à concentration $C_O = 0,2$ mg/ml en Ofloxacin après 3 mois d'incubation.....	70

Liste des tableaux

	Pages
Tableau I : Tableau comparatif des essais réalisés sur les plantes utilisées par les tradipraticiens.....	23
Tableau II : Récapitulatif des gammes de concentration de l'extrait de <i>Sacoglottis gabonensis</i> (Humiriaceae).....	43
Tableau III : Classification CASFM/EUCAST des concentrations critiques et des diamètres des zones d'inhibitions des antibiotiques utilisés.....	49
Tableau IV : Tableau récapitulatif des diamètres d'inhibition.....	62
Tableau V : Paramètres antibactériens de l'extrait de <i>Sacoglottis gabonensis</i> sur les germes qui surinfectent l'ulcère de Buruli.....	64
Tableau VI : Récapitulatif du nombre de colonies obtenues à partir de souches de <i>Mycobacterium ulcerans</i> après 3 mois d'incubation.....	70
Tableau VII : Récapitulatif des Taux de résistance de <i>Mycobacterium ulcerans</i>	72

Introduction

L'ulcère de Buruli est une maladie infectieuse qui aboutit à de vastes délabrements cutanés chroniques provoqués par *Mycobacterium ulcerans*. Dans la plupart des pays, la maladie sévit sous forme de foyers endémiques bien délimités. L'insuffisance de données précises ne permet pas de connaître entièrement la charge de morbidité au niveau mondial. Cependant, l'ulcère de Buruli est considéré comme la troisième maladie mycobactérienne chez l'homme après la tuberculose et la lèpre **(30)**.

Cette maladie entraîne une destruction étendue de la peau et des tissus mous avec formation d'ulcères de grandes dimensions pouvant aboutir, en l'absence de traitement à des incapacités fonctionnelles durables.

À l'échelle mondiale, ce sont entre 5000 et 6000 cas qui sont recensés chaque année par 15 des 33 pays, mais la maladie est considérablement sous-notifiée dans les pays **(30)**.

L'ulcère de Buruli a été signalé dans 33 pays d'Afrique, des Amériques et du Pacifique occidental. Les cas sont observés en majorité dans les régions tropicales et subtropicales, cependant quelques cas ont été notifiés en Australie, en Chine et au Japon **(30)**.

L'Afrique de l'ouest est la région la plus touchée avec notamment le Bénin, le Ghana et la Côte d'Ivoire. La Côte d'Ivoire, pays le plus affecté, notifie plus de 2500 cas par an **(21)**.

Cette maladie est synonyme pour le malade de souffrances terribles, de dégradation de la qualité de vie, d'exclusion, et pour l'Etat, un véritable frein à tous les efforts de développement et de réduction de la pauvreté **(30)**.

Le traitement actuel recommandé par l'OMS préconise en 1^{ère} intention une bi antibiothérapie composée de la rifampicine per os et de la streptomycine en IM pendant 8 semaines **(33)**.

L'association rifampicine et streptomycine pendant 4 semaines, suivie d'une association par rifampicine et clarithromycine orale pendant 4 semaines a donné un taux de guérison comparable à l'association rifampicine et streptomycine pendant 8 semaines en cas d'UB évoluant depuis moins de 6 mois et mesurant moins de 10 cm de diamètre.

La chirurgie est recommandée en seconde intention **(33)**.

L'inconvénient majeur de ce traitement est qu'il ne peut pas se faire en ambulatoire mais plutôt dans des centres spécialisés qui sont rares et le plus souvent inaccessibles aux malades vu le coût élevé des frais d'hospitalisations **(25)**.

Le traitement traditionnel, pour des raisons aussi bien culturelles qu'économiques, devient un recours important pour les patients qui sont en général démunis. En effet, certaines plantes sont utilisées sous forme de décoctés ou de poudres pour le traitement de l'ulcère de Buruli. Il s'agit notamment de *Erythrophleum suaveolens*, *Strophanthus hispidus*, *Khaya senegalensis* et de *Sacoglottis gabonensis*. Cependant, les modes d'utilisation de ces plantes présentent des inconvénients. De fait, elles sont non reproductibles, non aseptiques et de nombreuses surinfections ont été rapportées **(25)**.

Il se pose, pour ces deux types de traitements (celui de l'OMS et le traitement traditionnel), un problème d'efficience de la prise en charge de l'UB.

Compte tenu de toutes ces difficultés, l'OMS a toujours considéré, depuis la création de l'initiative mondiale contre l'UB, que la mise au point

Commentaire [kS1]: Cette référence 22 est-elle la bonne ?

d'un traitement médicamenteux à base de plantes était une grande priorité de la recherche (5).

Commentaire [kS2]: Peux tu donner les références de l'initiative de l'OMS qui précise cette priorité ?

Prenant à notre compte cette initiative, nous avons identifié une plante, *Sacoglottis gabonensis* utilisée traditionnellement pour la prise en charge thérapeutique de l'ulcère de Buruli.

L'optimisation de l'utilisation de cette plante sous formes améliorées nécessite au préalable, l'évaluation de son activité microbiologique. Cette évaluation incluse dans l'étape de préformulation, est indispensable d'autant plus que très peu d'études ont démontré les activités microbiologiques de *Sacoglottis gabonensis* (28).

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude dont l'objectif général était d'évaluer l'activité microbiologique de l'extrait de *Sacoglottis gabonensis* sur *Mycobacterium ulcerans* et sur des germes qui surinfectent l'ulcère de Buruli.

Les objectifs spécifiques étaient les suivants :

- Préparer et caractériser sur le plan physico-chimique l'extrait aqueux de *Sacoglottis gabonensis*.
- Evaluer l'efficacité *in vitro* de l'extrait sur des germes opportunistes qui surinfectent l'ulcère.
- Evaluer l'efficacité *in vitro* sur *Mycobacterium ulcerans*, germe responsable de l'ulcère de Buruli.

Après une première partie consacrée à l'étude bibliographique, nous présenterons l'étude expérimentale.

Première partie
REVUE DE LA LITTERATURE

CHAPITRE I

GENERALITES SUR L'ULCERE DE BURULI

I- HISTORIQUE

En 1897, Sir Albert Cook, médecin britannique travaillant à l'hôpital Mengo de Kampala (Ouganda), fait une description d'ulcères cutanés compatibles avec ce que l'on connaît actuellement de l'ulcère de Buruli (43). En Australie en 1948, le professeur Peter MacCallum et ses collègues décrivent en détail la maladie chez six patients originaires de la région de Bairnsdale, près de Melbourne. Ils sont également les premiers scientifiques à isoler l'agent causal, *Mycobacterium ulcerans*. Cette maladie prend donc la dénomination d'ulcère de Bairnsdale (27). Plutard dans les années 60, de nombreux cas sont observés dans le Comté de Buruli (aujourd'hui le district de Nakasongola) en Ouganda, d'où la nouvelle appellation aujourd'hui la plus couramment utilisée pour cette maladie : ulcère de Buruli (43). Cette maladie s'est très vite répandue dans de nombreuses régions du monde depuis 1980, notamment en Afrique de l'Ouest où l'expansion de la maladie a amené l'OMS à lancer en 1997 en Côte d'Ivoire, une initiative mondiale de lutte. C'est ainsi qu'a suivi en 1998, la première conférence sur l'ulcère de Buruli qui a abouti à la déclaration de Yamoussoukro (Côte d'Ivoire), adoptée et paraphée par trois chefs d'état africains présents à la cérémonie d'ouverture. (4)

Compte tenu de l'extension géographique croissante, des graves conséquences et des connaissances limitées que l'on a de la maladie, l'OMS a adopté en 2004 une résolution pour améliorer la surveillance et la lutte, ainsi que pour accélérer les recherches afin de mettre au point de meilleurs outils de lutte (44).

Commentaire [kS3]: Pour tout ce qui vient d'être énoncé, tu as une seule référence bibliographique ?

Commentaire [kS4]: Vérifier ces références !!!

II- ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES

Les aspects cliniques et épidémiologiques varient en fonction des pays et des situations géographiques.

En Afrique, environ 48% des sujets touchés sont des enfants de moins de 15 ans, alors qu'en Australie et au Japon ils ne représentent respectivement que 10% et 19% des cas **(45)**.

La répartition selon le sexe est également variable. En Afrique, le sex-ratio est de 1,08 alors qu'au Japon, il est de 0,51 **(45)**.

En général, 35% des lésions se localisent sur les membres supérieurs, 55% sur les membres inférieurs et 10% sur d'autres parties du corps **(45)**.

En Afrique, la plupart des cas sont diagnostiqués à un stade tardif: catégorie I (32%), catégorie II (35%), catégorie III (33%). En Afrique du Nord, environ 26% des cas sont diagnostiqués avant l'ulcération alors qu'en Australie et au Japon, cette proportion n'est que de 10% pour les deux pays **(45)**.

Ces différences sont en grande partie dues aux caractéristiques démographiques des populations, au niveau d'endémicité, à la connaissance de la maladie, à l'intensité des efforts de surveillance active et à l'accessibilité du traitement **(45)**.

En Côte d'Ivoire, la première observation de la maladie a été faite en 1978 chez un jeune français qui avait fréquenté les bords du lac Kossou, au centre du pays. Un épisode épidémique à Daloa, au centre-ouest du

pays, en 1989, a suscité la réalisation d'une enquête et d'un essai clinique en collaboration avec le Centers of Disease Control d'Atlanta (CDC) (29).

En 1995, le gouvernement ivoirien crée le Programme National de lutte contre les Ulcères à Mycobactéries (PNUM), chargé du contrôle de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire. Sa première action est la réalisation d'une enquête nationale exhaustive en 1997 qui a permis de dénombrer les cas de façon rétrospective depuis 1978. Le total cumulé des cas ainsi recensés était de 10 382 cas avec une tendance évolutive nette à partir de 1989 (Figure1). Presque tous les départements sanitaires étaient affectés par l'ulcère de Buruli (Figure 2). (19)

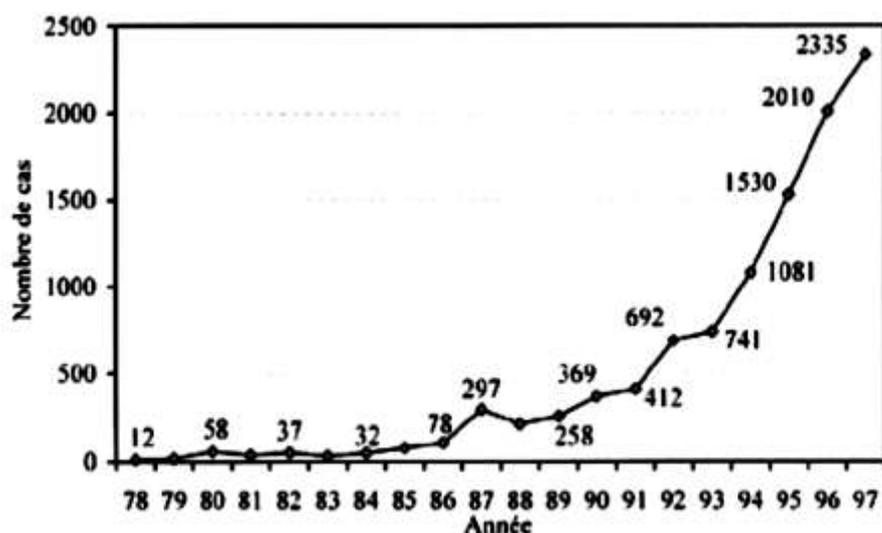


Figure 1 - Nombre de cas d'ulcère de Buruli recensés en Côte d'Ivoire, de 1978 à 1997.(19)



Figure 2 - Répartition géographique des cas cumulés d'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire de 1978 à 1997 (19).

L'incidence cumulative a évolué et est estimée en 2003 à plus de 17 000 cas.

Le profil épidémiologique des 10 382 cas montre une atteinte prédominante des enfants sans distinction de sexe (**Figure 3**). Le contact fréquent avec un point d'eau a été mis en évidence dans la plupart des cas (**Figure 4**).

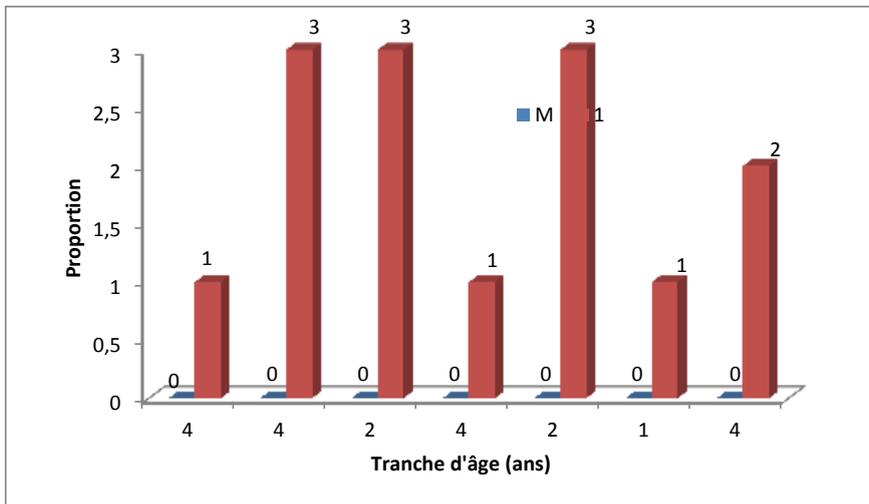


Figure 3 : Distribution selon l'âge et le sexe des 10382 cas d'ulcère de Buruli dénombrés en Côte d'Ivoire de 1978 à 1997 (19).

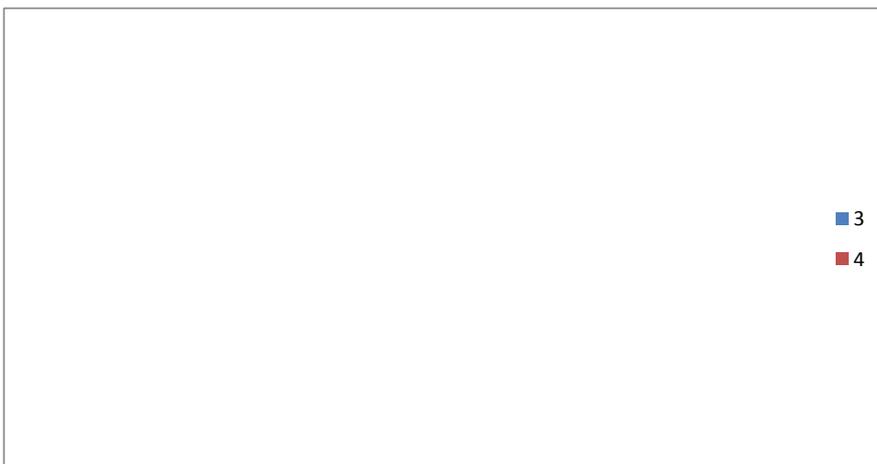


Figure 4 : Distribution selon la fréquentation ou non d'un point d'eau par les 10 382 cas d'ulcère de Buruli dénombrés en Côte d'Ivoire de 1978 à 1997(19)

III- L'AGENT PATHOGENE

1) Définition

L'ulcère de Buruli est dû à *Mycobacterium ulcerans*, une mycobactérie présente dans l'environnement.

Sa paroi présente une structure particulière, riche en cire (acide mycolique) qui lui permet de retenir les colorants malgré l'action combinée d'acide dilué et d'alcool. Cette paroi lui confère une grande résistance aux antiseptiques, à certains antibiotiques, aux macrophages. Elle est dite «bacille acido-alcool-résistant» ou BAAR. Cette particularité de la paroi est utilisée pour la mettre en évidence lors d'examen microscopique par la coloration de ziehl-Neelsen où elle apparaît en rouge sur fond bleu **(17,26)**.

C'est une mycobactérie intracellulaire ou extracellulaire mais elle forme principalement des microcolonies extracellulaires.

Mycobacterium ulcerans est une mycobactérie thermodépendante qui ne se développe qu'à des températures comprises entre 30°C et 33°C. Ces températures correspondent à celles du derme profond et de l'hypoderme. Elle produit une exotoxine appelée mycolactone. Par ses effets cytotoxiques et immunosuppresseurs, cette mycolactone serait responsable de la nécrose tissulaire **(10,15,41)**. La virulence de la mycolactone semble varier en fonction de l'origine géographique des souches de *M. ulcerans* **(31)**. Cette bactérie sécrète également d'autres protéines ayant un rôle dans la pathogénie de la maladie : la phospholipase C, à activité hémolytique et d'autres protéines responsables d'une apoptose des cellules adipeuses **(10,15)**.

2) Taxonomie

La taxonomie du genre *Mycobacterium* repose sur la classification de Runyon (1954) fondée sur la vitesse de croissance et la pigmentation (4 groupes).

Dans la pratique courante, on retrouve le plus souvent *Mycobacterium tuberculosis* comprenant les espèces déterminant la tuberculose humaine (*Mycobacterium tuberculosis*), bovine (*Mycobacterium bovis*) ou celle observée le plus souvent en Afrique noire (*Mycobacterium africanum*) (26).

1^{er} groupe : espèces pathogènes pour l'homme du groupe *tuberculosis*

- *Mycobacterium tuberculosis* (BK = Bacille de Koch)
- *Mycobacterium africanum*
- *Mycobacterium bovis*
- BCG, le bacille de Calmette et Guérin, (souche de *Mycobacterium bovis* modifiée par Calmette et Guérin pour obtenir une souche vaccinale)

2^{ème} groupe : espèces pathogènes pour l'homme hors groupe *tuberculosis*

- *Mycobacterium leprae* (agent de la lèpre)
- *Mycobacterium ulcerans* (agent de l'ulcère de Buruli)
- *Mycobacterium marinum* (agent du granulome des aquariums)
- *Mycobacterium abscessus*

3^{ème} groupe : espèce non pathogène pour l'homme

- *Mycobacterium vaccae*

4^{ème} groupe : mycobactéries dites « atypiques »

Elles sont parfois pathogènes pour l'homme, notamment chez les immunodéprimés (cancers, SIDA) **(26)**.

IV- PHYSIOPATHOLOGIE

a) Réservoir et mode de transmission

L'ulcère de Buruli est une maladie liée à l'eau car les foyers sont situés près des marais, des lacs, des cours d'eau et des terrains inondables ou irrigués.

Ces conditions environnementales, qu'elles soient naturelles (inondations, marais, lacs naturels) ou provoquées par l'homme pour des besoins énergétiques ou agro-pastoraux (barrages, lacs artificiels, espaces irrigués, bas-fonds marécageux), jouent un rôle majeur dans l'éclosion de la maladie, en créant des zones faiblement drainées, propices au développement du germe.

Le mode de transmission est mal connu **(45)**.

Toutefois, *Mycobacterium ulcerans* a été mis en évidence par la Réaction de Polymérisation en chaîne (PCR) chez des petits animaux aquatiques filtrants dont des poissons et plus récemment, des punaises d'eau douce du genre *Naucoris* **(Figure 5)** et *Diplonychus* vivant en symbiose avec les racines de certaines plantes aquatiques.

Par ailleurs, il n'y a pas de preuve de contagion interhumaine, malgré l'observation de cas familiaux. Les sujets se contamineraient lors de contacts répétés avec le même milieu environnemental infectant (5).



Figure 5 : Photo d'une punaise aquatique *Naucoris cimicoides* (30).

b) Aspects cliniques

L'infection mycobactérienne peut être localisée, locorégionale diffuse ou multifocale. Elle reste le plus souvent focalisée au niveau de la peau et de la graisse sous-cutanée mais peut atteindre l'os et les articulations. Les atteintes viscérales ne sont pas encore connues même s'il a été observé en Côte d'Ivoire deux cas de pleurésie de type exsudatif (21).

La maladie évolue dans un contexte non fébrile et l'infection n'affecte pas l'état général du sujet.

Trois stades évolutifs de l'ulcère de Buruli ont été décrits **(21)** :

➤ **Le stade pré-ulcératif**

C'est le stade de début de la maladie qui peut se présenter sous quatre formes cliniques :

- **une papule prurigineuse**, adhérent à la peau, de diamètre inférieur à un centimètre ;
- **un nodule froid**, indolore, plus ou moins prurigineux, adhérent à la peau et mobile au plan profond avec parfois un halo œdémateux;
- **un placard froid**, indolore, aux bords tranchés et à surface hypopigmentée ;
- **un œdème froid**, plus ou moins douloureux, aux limites floues et s'étendant à un membre, à une région du tronc, à tout le visage ou à toute la région périnéale **(5,21)**.

Cette dernière forme peut être soit une tuméfaction diffuse, tendue ne prenant pas le godet avec parfois un aspect de peau d'orange (forme infiltrante diffuse), soit une tuméfaction étendue, composée de plusieurs placards juxtaposés ou coalescents (forme en placards multiples).

Ces formes de début doivent être différenciées de certaines pathologies rencontrées dans les mêmes régions, leishmaniose cutanée, nodule onchocerquien, léprome, tuberculose cutanée, lipome, nodule de la maladie de Kaposi, mycétome, basidiobolomycose, fasciite streptococcique subaigu de la jambe. La phase pré-ulcéreuse a une durée variable selon la forme clinique et selon le sujet **(5,21)**.

➤ **Le stade d'ulcération**

L'ulcération apparaît à n'importe quelle partie de la lésion initiale et s'agrandit plus ou moins rapidement. C'est une perte de substance dermo-épidermique, plus ou moins large, à fond nécrotique jaunâtre, à bords décollés, avec un pourtour œdémateux et noirâtre. Son évolution est longue et émaillée de complications surtout infectieuses. Des cas de survenue d'épithélioma spinocellulaire ont été observés **(5,21)**.

➤ **Le stade de cicatrisation-séquelles**

La cicatrisation spontanée des lésions apparaît après plusieurs mois d'évolution. Elle fait suite à la détersion de l'ulcère et à l'accolement des bords d'où part l'épidermisation **(21)**.

Le tissu cicatriciel est fibreux, scléreux et les invalidités définitives sont fréquentes à type de rétraction, d'ankylose, d'amputation de membre ou de perte d'organe, de lymphoedème par striction cicatricielle **(21)**.

A côté de la description classique, d'autres formes cliniques sont de plus en plus observées:

- Les atteintes ostéo-articulaires et des os longs

Cliniquement, elles se présentent sous la forme d'un œdème non inflammatoire siégeant au niveau d'une ou de deux articulations, sans ulcération. L'impotence fonctionnelle est partielle ou totale.

L'atteinte osseuse peut se manifester par un œdème localisé avec une petite fistule intarissable. La radiographie peut objectiver une géode ou un séquestre **(21)**.

- Les atteintes multifocales

Plusieurs lésions identiques ou différentes peuvent coexister chez le même patient avec cependant, une conservation relative de l'état général dans un contexte non fébrile.

Toutes ces formes cliniques se rencontrent en Côte d'Ivoire (21).

V- TRAITEMENT DE L'ULCERE DE BURULI

Il existe une relation entre le type de lésion qui fait l'objet de classification par catégorie et les modalités de prise en charge thérapeutique.

1) Classification par catégories de l'ulcère de Buruli

- **Catégorie I** : une lésion unique de diamètre < 5 cm pouvant guérir complètement avec le traitement antibiotique.

- **Catégorie II** : lésion unique de 5 à 15 cm de diamètre, pouvant guérir complètement avec le traitement antibiotique.

- **Catégorie III** : lésion unique de plus de 15 cm de diamètre, lésions multiples, une ou plusieurs lésions sur des localisations critiques (œil, sein, organes génitaux) et une ostéomyélite, nécessitant le recours à la chirurgie (excision, greffe cutanée ou amputation dans les cas graves) (33).

Cette classification oriente la prise en charge thérapeutique.

2) Antibiothérapie

En 2004, l'OMS a diffusé une recommandation tendant à utiliser l'antibiothérapie dans le traitement de l'UB, alors que les interventions chirurgicales constituaient la base du traitement (33).

Une antibiothérapie de 8 semaines entraîne une réduction de la taille des lésions et donc réduit l'étendue de l'intervention chirurgicale si elle est nécessaire.

En pratique, la rifampicine est prescrite (10 mg/kg une fois par jour per os) en association avec la streptomycine (15 mg/kg une fois par jour IM) pendant 4 semaines ; une évaluation est faite au bout de 4 semaines :

- en cas de régression ou de stabilisation, le traitement antibiotique est poursuivi pendant 8 semaines;
- en cas d'extension, la chirurgie intervient avec un examen anatomo-pathologique.

Les effets secondaires de l'association rifampicine et streptomycine se voient surtout chez les enfants, les plus touchés par l'UB : atteinte hépatique, rénale, auditive, vestibulaire.

L'association rifampicine et streptomycine pendant 4 semaines, suivie d'une association par rifampicine et clarithromycine orale (7,5 mg/kg deux fois par jour) pendant 4 semaines a donné un taux de guérison comparable à l'association rifampicine et streptomycine pendant 8 semaines en cas d'UB évoluant depuis moins de 6 mois et mesurant moins de 10 cm de diamètre.

De plus, c'est le traitement de la femme enceinte, la streptomycine étant contre-indiqué.

L'antibiothérapie est peu efficace sur les lésions osseuses **(37)**.

3) Chirurgie

Il s'agit d'un traitement réparateur de la perte de substances et des séquelles articulaires. Le traitement chirurgical consiste en une excision large avec greffe **(Figure 6)** ou en une exérèse limitée suivie de greffes en îlots **(17)**.

La fréquence des séquelles fonctionnelles nécessite une kinésithérapie précoce active et passive. Cependant, les rechutes après chirurgie sont fréquentes (17,1% en Côte d'Ivoire) ; elles surviennent de façon précoce en moyenne cinq (5) mois après l'intervention et se présentent sous formes d'ulcérations, pour la plupart localisées au niveau de la lésion initiale (33).

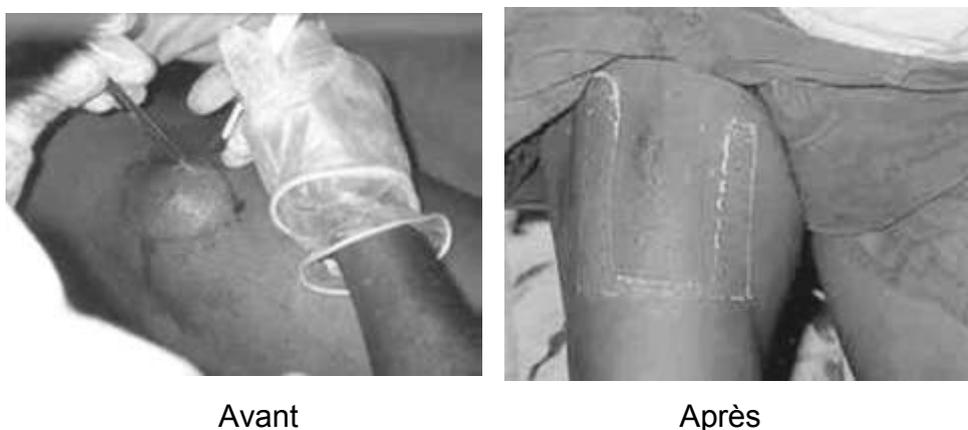


Figure 6: Acte chirurgical sur une forme nodulaire. (17)

4) Traitement topique

Le traitement topique a un rôle important à jouer dans la prise en charge médicale de l'ulcère de Buruli. En pratique clinique, il pourrait apporter un réel bénéfice pour le traitement des formes pré-ulcératives (nodule, papule) ou des petits ulcères (diamètre < 5 cm) en remplacement de la chirurgie. Pour les formes extensives, le traitement topique serait indiqué en préopératoire pour initialiser la guérison et simplifier l'intervention chirurgicale (réduction de l'excision ou précédant une greffe de peau). Une concentration locale suffisamment élevée du produit actif peut être obtenue avec une réduction du risque d'effets secondaires systémiques (3).

Les topiques peuvent être associés à un traitement chirurgical et/ou une antibiothérapie par voie générale.

Les différents produits topiques pouvant être utilisés dans le traitement de l'ulcère de Buruli sont les suivants **(3)** :

- **Le nitrate de cérium associé à la sulfadiazine argentée** qui constitue un topique usuel prometteur. Les indications les plus probables sont d'une part, en préopératoire, pour le traitement des petits ulcères non compliqués afin de simplifier la chirurgie, et d'autre part, en postopératoire pour le traitement des formes plus étendues afin de prévenir la surinfection locale et accélérer la cicatrisation. Cependant, même si son mécanisme d'action laisse penser qu'il est efficace sur l'Ulcère de Buruli, sa spécificité anti-mycobactérienne sur *M. ulcerans* n'est pas démontrée.
- **La pommade de kétansérine à 2%** peut jouer le rôle de traitement adjuvant en post opératoire après l'excision et avant la greffe de peau, pour accélérer l'épithélialisation et améliorer la vascularisation. Son efficacité démontrée sur *Mycobacterium leprae* est prometteuse pour *Mycobacterium ulcerans*.
- **Les oxydes d'azote** (oxyde nitrique par exemple) peuvent jouer un rôle dans le traitement de l'Ulcère de Buruli à la phase précoce (petits ulcères). L'application locale peut néanmoins provoquer des réactions cutanées locales de par sa toxicité sur la peau. L'oxyde d'azote associé à une membrane semi-perméable est un moyen de pallier cet effet toxique. La posologie et le rythme d'application restent encore à définir.
- **L'argile** peut être également utilisé pour le traitement de l'Ulcère de Buruli, quelle que soit sa forme clinique, à condition que les mesures

d'hygiène locales soient rigoureusement respectées (aseptisation, usage d'eau stérilisée...).

5) Traitement traditionnel

Dans les pays d'Afrique de l'Ouest tels le Ghana, le Bénin et la Côte d'Ivoire, la majorité des patients atteints d'ulcère de Buruli consultent en premier lieu un tradipraticien. Parmi les raisons qui conditionnent le choix de ce traitement, la religion, l'absence de structure adéquate de soins, les contraintes du traitement chirurgical, la durée d'hospitalisation et la peur des cicatrices peuvent être retenues. Quatre étapes sont individualisées dans le traitement traditionnel : le diagnostic, l'ablation des tissus nécrosés, les soins de la plaie et l'exorcisme **(19)**.

Le diagnostic étant difficile à poser, hors des centres de référence, la maladie reste encore souvent ignorée et non diagnostiquée, entraînant des formes cliniques évoluées et des séquelles **(5)**.

L'ablation des tissus nécrosés par les tradithérapeutes s'effectue de deux manières **(19)** :

- soit au moyen de cataplasmes de feuilles variées qui sont placés sur la partie malade. En effet, il est apparu qu'il existe des plantes spécifiques qui contribuent à enlever les nécroses sans qu'il ne soit nécessaire de faire intervenir la chirurgie.
- soit de façon mécanique au moyen de lame ou de ciseaux.

Le soin de la plaie est relativement plus aisé. Une guérison est obtenue après plusieurs pansements faits à base de plantes et de mixtures propres au tradithérapeute.

L'exorcisme intervient dans la plupart des cas et est destiné à remercier les ancêtres pour avoir facilité la guérison. Des poulets ou des cabris, selon la gravité du mal et la durée du traitement sont immolés (19).

La tradithérapie, malgré son importance pour les malades, reste peu documentée (46).

6) Plantes utilisées par les tradipraticiens

Plusieurs plantes sont utilisées par les tradipraticiens pour le traitement de l'ulcère de Buruli. L'étude de ces plantes révèle la présence de grands groupes chimiques dont de nombreux composés possèdent diverses propriétés notamment anti-œdémateuses, anti-inflammatoires, antibactériennes, antiseptiques, sédatives, analgésiques, anesthésiques, cicatrisantes qui pourraient intervenir dans le traitement de l'ulcère de buruli (23, 25, 46).

Certaines de ces plantes, ainsi que le niveau des travaux réalisés sur celles-ci sont confinées dans le tableau ci-dessous :

Tableau I : Tableau comparatif des essais réalisés sur les plantes utilisées par les tradipraticiens (23).

Plantes	Partie utilisée	Usage traditionnel	Tri phytochimique	Essai In vitro (Mu)	Essai In vivo
<i>Erythrophleum suaveolens</i>	Ecorce	+	+	-	-
<i>Strophanthus hispidus</i>	Racine	+	+	-	-
<i>Securidaca longepedunculata</i>	Racine	+	+	-	-
<i>Khaya senegalensis</i>	Ecorce	+	+	-	-
<i>Acacia nilotica</i>	Gousse	+	+	-	-
<i>Sacoglottis gabonensis</i>	Ecorce	+	+	+	-

Réalisé (+) et Non réalisé (-)

De toutes ces plantes, seule *Sacoglottis gabonensis* (*Humiriaceae*) a fait l'objet d'essais *in vitro* et a démontré une activité inhibitrice effective sur *Mycobacterium ulcerans*, avec une CMI = 0,78 mg/ml et une CMB = 12,5 mg/ml sur la souche Côte d'Ivoire 1 (23) mais ces résultats ont besoin d'être consolidés avant de procéder à la mise en formulation

Commentaire [kS5]: Est-ce la bonne référence ?

7) Kinésithérapie et ergothérapie

La fréquence des séquelles fonctionnelles qu'entraîne la maladie nécessite une kinésithérapie et une ergothérapie précoces actives et passives (28).

8) Les rechutes

Elles surviennent de façon précoce, en moyenne 5 mois après l'intervention chirurgicale et se présentent sous forme d'ulcérations, pour la plupart localisées au niveau de la lésion initiale. Les rechutes signalées dans 16 à 30% des cas après un traitement exclusivement chirurgical ont été ramenées à moins de 2% après l'introduction des antibiotiques. Le traitement de l'ulcère de Buruli associant une bi-antibiothérapie (rifampicine + streptomycine) à tous les stades de la maladie pendant 4 à 8 semaines à un traitement anticoagulant et un programme de rénutrition entraîne la guérison des lésions précoces, une stabilisation de la maladie ou une régression des lésions permettant une exérèse chirurgicale moins délabrante (19,20).

VI- PREVENTION DE L'ULCERE DE BURULI

La prévention repose sur l'utilisation des moustiquaires, le lavage fréquent des vêtements et les soins des plaies avec des solutions antiseptiques.

L'éducation sanitaire vise à la mise en garde des populations rurales contre le risque de contamination par le milieu hydro-tellurique lors de la fréquentation des points d'eau **(19,20)**.

Il est nécessaire de réaliser des campagnes de masse pour une détection précoce en Côte d'Ivoire où le dépistage des formes nodulaires a progressé, passant de 54% des cas en 1998 à 72% en 2001. Les meilleurs résultats sont observés en Australie et en Guyane française où les malades consultent à des stades peu avancés de la maladie et bénéficient d'un traitement précoce **(19,20)**.

Pour lutter contre l'ulcère de Buruli, la plupart des malades privilégient l'automédication et le recours au traitement traditionnel. Le traitement en milieu hospitalier n'intervient qu'en dernière intention. Le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli se fait principalement à base de plantes **(19,20)**.

CHAPITRE II :
GENERALITES SUR SACCOGLOTTIS
GABONENSIS

I- POSITION SYSTEMIQUE (23)

Règne : végétal

Embranchement : spermaphytes

Sous-Embranchement : angiospermes

Classe : dicotylédones

Sous-Classe : diapétales

Ordre : malpighiales

Famille : *humiriaceae*

Genre : *sacoglottis*

Espèce : *gabonensis*

II- ORIGINE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Sacoglottis gabonensis est présent dans la forêt sempervirente, sur les berges de rivières, le long des lagunes, en lisière de forêt et de savane ainsi que dans la forêt secondaire. C'est l'un des arbres dominants des forêts pluviales côtières d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique centrale ; il est surtout abondant au Cameroun et au Gabon. En Côte d'Ivoire, il est caractéristique des forêts sempervirentes les plus humides. On le trouve généralement en petits groupes, mais parfois en peuplements assez grands et presque purs (24,40).

Le genre *Sacoglottis* comprend 9 espèces toutes retrouvées en Amérique du Sud sauf *Sacoglottis gabonensis* considérée comme étroitement apparentée à *Sacoglottis amazonica* Mart. d'Amérique du Sud et des Caraïbes. Les fruits de *Sacoglottis amazonica* sont consommés au Venezuela pour soigner la diarrhée. Le bois d'œuvre est apprécié en construction lourde au Venezuela et au Brésil.

Il est possible que *Sacoglottis gabonensis* ait évolué à partir de graines sur la côte Ouest africaine depuis l'Amérique du Sud, et ce serait l'un des cas les plus représentatifs de dispersion par l'eau de l'Amérique du Sud vers l'Afrique. Les compartiments remplis de résine du noyau des graines les font flotter sur l'eau et les graines restent viables pendant quatre ans.

Sacoglottis gabonensis se retrouve dans plusieurs pays d'Afrique parmi lesquels, le Sénégal, la Gambie, la Centrafrique, l'Angola et la Côte d'Ivoire **(24,40)**.

III- ETUDE BOTANIQUE DE LA PLANTE

Sacoglottis gabonensis est un arbre de grande taille, sempervirent, atteignant 40 m de haut avec un fût dépourvu de branches sur une hauteur de 20 m, mais souvent à ramification basse, souvent tordu, noueux et profondément cannelé, atteignant 180 cm de diamètre, à contreforts de 2,5 m de haut **(Figure 9)**.

L'écorce est relativement lisse chez les jeunes arbres et à lenticelles horizontales brunes à brun foncé chez les arbres âgés, très ramifiée, arrondie et relativement ouverte.

Les feuilles sont alternes, simples, stipulées d'environ 1 mm de long, tombant rapidement ; les pétioles sont de 6 à 10 mm de long ; le limbe ovale à elliptique ou oblongue de 6 à 15cm sur 2,5 à 6 cm à base cunéiforme, l'apex est acuminé, à bord crénelé, pennatinervé à 6 à 12 paires de nervures latérales. **(Figure 7)**

L'inflorescence présente une courte cyme axillaire atteignant 5 cm de long. Les fleurs sont bisexuées, régulières, 5-mères, à pédicelle de 0,5 à 1,5 mm de long, articulées à la base ; les sépales sont d'environ 1,5 mm de long, poilus à l'extérieur ; les pétales sont libres, linéaires d'environ 7 mm de long, poilus à l'extérieur, blancs ; les étamines au nombre de 10, soudées à la base, 5 étamines longues d'environ 5mm et 5 plus courtes d'environ 3,5 mm de long ; l'ovaire est supère, ovoïde, à 5 loculaires, glabre, le style est cannelé, d'environ 4 mm de long.

Le fruit est une drupe ellipsoïde à globuleuse de 3 à 4 cm de long sur 2,5 à 3,5 cm ; lisse, verte à jaune, à noyau à 10 sillons et à nombreuses cavités résineuses contenant 1 à 3 graines oblongues d'environ 15 mm sur 3 mm (**Figure 8**).

La plantule est à germination épigée ; hypocotyle de 6 à 9 cm de long, épicotyle d'environ 3 cm de long ; les cootylédons sont foliacés, ovales d'environ 1,5 cm sur 0,5 cm; les 2 premières feuilles sont opposées (**24,40**).



Figure 7 : Feuilles de *Sacoglottis gabonensis* (Humiriaceae) (40)



Figure 8 : Fruit de *Sacoglottis gabonensis* (Humiriaceae) (24)



Figure 9 : Arbre de *Sacoglottis gabonensis* (Humiriaceae)

IV- USAGE

Des infusions d'écorces de tige de *Sacoglottis gabonensis* sont couramment utilisées pour traiter la fièvre, la diarrhée, la gonorrhée et les douleurs abdominales, et elles s'emploient parfois pour traiter l'hypertension artérielle et le diabète.

Dans les régions côtières du Cameroun, les Pygmées Kolas et les Mvaes se servent de la décoction d'écorce broyée mélangée aux feuilles de *Dioscorea minutiflora* en lavement rectal pour traiter les douleurs abdominales aiguës.

Au Congo, l'écorce de tige en décoction sert à soigner les dermatites rebelles **(24,40)**.

En Sierra Leone, la décoction d'écorce est utilisée pour traiter les douleurs d'estomac ; elle sert aussi à épicer les aliments pour provoquer des chaleurs chez les femmes qui allaitent ou les femmes enceintes.

Dans les régions côtières de la Côte d'Ivoire, le jus de tige dilué s'emploie en bain de siège pour redonner du tonus musculaire aux femmes après un accouchement.

Au Gabon, l'extrait de l'écorce de tige est bu pour ses vertus émétiques.

Au Sénégal et au Congo, la décoction de tige mélangée à d'autres plantes et ajoutée à l'eau du bain sert à traiter les affections ovariennes, les infections vaginales et la fièvre chez les enfants.

L'écorce de tige sert d'adjuvant de conservation au vin de palme qu'elle corserait, dont elle réduirait la mousse et auquel elle donnerait une saveur amère. Des sources indiquent qu'elle aurait des vertus aphrodisiaques. L'écorce est utilisée comme poison de pêche **(24,40)**.

Le bois de *Sacoglottis gabonensis* est couramment utilisé, mais seulement au niveau local, pour la construction des maisons et des ponts, les revêtements de sol, les moulures intérieures, la menuiserie, les étais de mines, les poteaux électriques, la construction navale, les meubles, l'ébénisterie, les traverses de chemin de fer, les jouets, les bibelots, les châssis de véhicule, le tournage et la fabrication de gabarits.

Au Liberia et au Nigeria, le bois entre dans la confection des pirogues et au Gabon des membrures de bateaux.

Il est utilisé pour le feu et produit du charbon de bois de qualité.

Le fruit, comestible et sucré, a le goût de pain aux bananes ; ce sont surtout les enfants qui en mangent et il peut servir à fabriquer une boisson alcoolisée.

Dans les régions côtières du Cameroun, les Pygmées font rôtir les graines et les consomment. Le goût sucré de la résine emmagasinée dans les cavités du noyau est très recherché par les abeilles **(24,40)**.

V- CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT

La floraison de *Sacoglottis gabonensis* a lieu durant la période allant de Décembre à Mars. Les fruits sont disséminés par les éléphants. Ils se développent lentement pendant la saison sèche, mûrissent entre les mois

de septembre et décembre et restent vert terne. Ils tombent à maturité et dégagent une forte odeur de levure **(24,40)**.

Les chimpanzés et les mandrills mangent aussi les fruits. *Sacoglottis gabonensis* est capable de s'établir en lisière de savane humide. Il peut dominer ce milieu, car ses branches forment des arches gigantesques, faisant disparaître la végétation en dessous et de ce fait atténuent l'ardeur des incendies de savane annuels qui sans cela brûleraient son tronc. Les spécimens pionniers possèdent une canopée basse et arrondie et des branches à faible hauteur du sol, mais les générations successives se développent plus en hauteur et se ramifient plus haut pour parvenir à la lumière. Les jeunes arbres proches des lisières de savane sont souvent multi-troncs parce qu'ils ont recépé après avoir été brisés par les éléphants qui se nourrissent de leurs feuilles et de leur écorce **(24,40)**.

VI- MULTIPLICATION ET PLANTATION

La multiplication naturelle de *Sacoglottis gabonensis* se fait seulement par graines. La régénération naturelle n'est pas très abondante car de nombreuses graines sont endommagées par les insectes. Le poids de 100 noyaux est de 560 à 1000 g. Les graines mettent 2 à 4 mois à germer. Les taux de germination sont assez faibles **(24,40)**.

VII- PROPRIETES CHIMIQUES

La bergénine, une isocoumarine a été identifiée comme étant le composé majoritaire de l'extrait total d'écorce de tige de *Sacoglottis gabonensis* **(35)**.

La bergénine a la propriété de protéger pendant un certain temps les huiles de table stockées contre une détérioration par peroxydation.

Un extrait d'écorce de tige ajouté à l'eau et donné à boire à des rats a fait augmenter les niveaux de prothrombine et de thrombine du plasma sanguin **(24,40)**.

D'autres analyses de l'extrait d'écorce de tige ont fait ressortir la présence de tanins en quantité non négligeable, avec des traces de saponines. Ils ont également révélé la présence de 2 isomères cis/trans de lignanes (la calopitine et la galgravine), qui peuvent jouer un rôle dans la prévention du cancer.

La teneur en alcool du vin de palme de *Raphia hookeri* dans lequel on avait ajouté l'écorce de tige de *Sacoglottis gabonensis* a presque doublé par rapport à celle du vin de palme non traité **(24,40)**.

Il a été découvert que l'extrait d'écorce renforcerait la tolérance à l'éthanol et l'osmotolérance de la levure de *Saccharomyces cerevisiae*, tandis que l'activité de floculation et l'activité d'invertase avait diminué **(24,40)**.

DEUXIEME PARTIE :
ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : **MATERIEL ET METHODES**

INTRODUCTION

Après l'identification et la récolte des écorces de *Sacoglottis gabonensis*, nous avons réalisé successivement une extraction aqueuse, la caractérisation physico-chimique de l'extrait obtenu après évaporation du solvant, la détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides de l'extrait sur certains germes qui surinfectent l'ulcère de Buruli, et l'activité sur cinq souches de *Mycobacterium ulcerans*.

Toutes ces évaluations bactériologiques qui constituent des essais de préformulation nous permettront de déterminer les quantités utiles d'extrait à introduire dans des formulations galéniques à mettre au point.

I- MATERIELS

I-1. Matières premières

Les matières premières utilisées sont les suivantes :

- **Matériel végétal** constitué de la poudre d'écorce de *Sacoglottis gabonensis* et de la bergénine.
- **Eau distillée**
- **Eau physiologique (NaCl 9‰)**
- **Bouillon thioglycolate**
- **Oeufs de poule de 24 heures**
- **Solution de soude à 5%**
- **Alcool éthylique à 70°**
- **Disques de papier buvard**

Commentaire [PK6]: Le matériel végétal doit être en première position de la liste des matières premières

- **Matériel bactérien** : il est constitué de :
 - Souches de *Pseudomonas*, *Staphylocoques*, *Escherichia coli* productrice de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) issues de la biobanque de l'IPCI (Institut Pasteur de Côte d'Ivoire).
 - Cinq souches de *Mycobacterium ulcerans* : CNR012, 13/21, CNR006, CNR008, 13/29 toutes issues de la biobanque de l'IPCI,
- **Disques d'antibiotiques** pour les *Pseudomonas* (imipenème : IPM, ceftriaxone : CRO), les staphylocoques (oxacilline : OX, céfoxitine : FOX), les *Escherichia coli* (amoxicilline : AMC, ceftriaxone : CRO),
- **Milieux de culture** constitués de :
 - gélose Miller-Hinton (MH),
 - gélose ordinaire,
 - milieu de Lowenstein-Jensen servant à la culture des mycobactéries et dont la base est constituée d'asparagine, de phosphate monopotassique, de sulfate de magnésium, de farine de pomme de terre et de vert malachite.

I-2 Appareillage

Les différents appareils qui ont permis la réalisation de l'étude sont :

- **Une étuve** de marque JOUAN (30-250°C)
- **Une balance de précision** de marque METTLER TOLEDO®.
- **Un évaporateur rotatif** (Rotavapeur) de marque HEIDOLPH®.
- **Un broyeur** de marque JEFFREY®

II- METHODES

II-1 Identification et récolte du matériel végétal

Les écorces de tronc de *Sacoglottis gabonensis* (*humiriaceae*) ont été prélevées le 22 Septembre 2013 dans la forêt de Keibly à 12 km de Taï dans la région de Guiglo (Man, Côte d'Ivoire), par un botaniste du Centre Suisse de Recherche Scientifique à Abidjan du nom de M TERE. Ces écorces ont ensuite fait l'objet d'une identification par un spécialiste du Centre National de Floristique de l'Université de Cocody (Abidjan).

II-2 Extraction aqueuse du matériel végétal

Les écorces récoltées ont été séchées sur la paille, à température ambiante (entre 26°C et 27°C) et à l'abri de la lumière, pendant trois semaines. Elles ont été ensuite réduites en poudre à l'aide d'un broyeur.

La méthode d'extraction a consisté à faire une décoction aqueuse de 1kg de poudre d'écorces de tronc pendant une heure à 100°C dans 5 litres d'eau. Le décocté obtenu a été refroidi et filtré sur verre frité, additionné de cellite. Le filtrat a été ensuite concentré au Rotavapeur à 60°C. Puis l'extrait obtenu a été pulvérisé au mortier **(36)**.

II-3 Caractérisation physico-chimique de l'extrait

II-3-1 Solubilité dans l'eau

La solubilité est la quantité maximale de substance qui peut se dissoudre dans un certain volume d'eau. Celle de notre poudre d'extrait a été déterminée par la méthode des ajouts successifs.

Selon la pharmacopée européenne **(36)**, des volumes d'eau ont été ajoutés successivement à environ 0,1 g d'échantillon, à température ambiante, dans un flacon gradué de 10 ml fermé par un bouchon en verre. Après chaque ajout d'eau, le mélange a été agité à l'aide d'un agitateur magnétique, pendant 10 minutes. Ensuite, nous avons fait une vérification macroscopique de la dissolution complète de l'échantillon. Si des parties non dissoutes subsistaient après l'addition de 10 ml d'eau, l'essai se poursuivait dans un flacon gradué de 100 ml jusqu'à dissolution complète de la poudre.

II-3-2 Détermination du PH

Le principe repose sur la détermination de la quantité d'ions hydronium (H^+) dans une solution.

Le pH a été mesuré électroniquement au moyen d'un pH-mètre à lecture directe de type HANNA instruments, en utilisant une électrode de verre et de référence au chlorure de potassium-calomel à saturation. Nous avons étalonné le pH-mètre avec des solutions tampon vendues dans le commerce (solution pH tampon 4 et solution pH tampon 7) selon les instructions fournies par le fabricant. L'électrode a ensuite été séchée et plongée dans un bécher contenant une solution aqueuse à 10% d'extrait, de manière à ce qu'elle baigne bien dans la solution. Enfin, nous avons branché l'appareil sur l'échelle de lecture et noté le pH à 0,1 unité près **(36)**.

II-3-3 Détermination du taux d'humidité

Le principe repose sur la perte de poids de l'échantillon à 105°C pendant 30 minutes pour permettre l'élimination d'eau.

Une prise d'essai de 1 g est pesée dans une capsule en verre préalablement tarée. La capsule contenant l'échantillon est introduite à l'étuve réglée à 105°C pendant 30 minutes. Elle est ensuite retirée et pesée après refroidissement au dessiccateur.

L'opération est répétée toutes les 30 minutes jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

La teneur en eau (Te) est exprimée en pourcentage (%) de masse comme suit **(36)** :

$$Te = \frac{(m_2 - m_3)}{(m_2 - m_1)} \times 100$$

m_1 = masse du verre de montre séché (cristalliseur)

m_2 = m_1 + 1 g de poudre

m_3 = (m_1 + 1 g de poudre) après séchage entre 100°C et 105°C pendant 30 minutes

Te = taux d'humidité

II-3-4 Test de stérilité de la poudre de *Sacoglottis gabonensis* (13)

Ce test permet de vérifier que l'extrait ne comporte aucun germe. Pour cela, dans 10 ml de bouillon de thioglycolate (BT), nous avons incubé à 37°C pendant 24 heures 0,1g de l'extrait à tester. Après ce délai, le bouillon a été ensemencé sur une boîte de Pétri contenant de la gélose ordinaire puis incubé dans les mêmes conditions. La substance était déclarée stérile, lorsqu' aucune colonie n'était visible sur la boîte gélosée **(Figure 10)**.

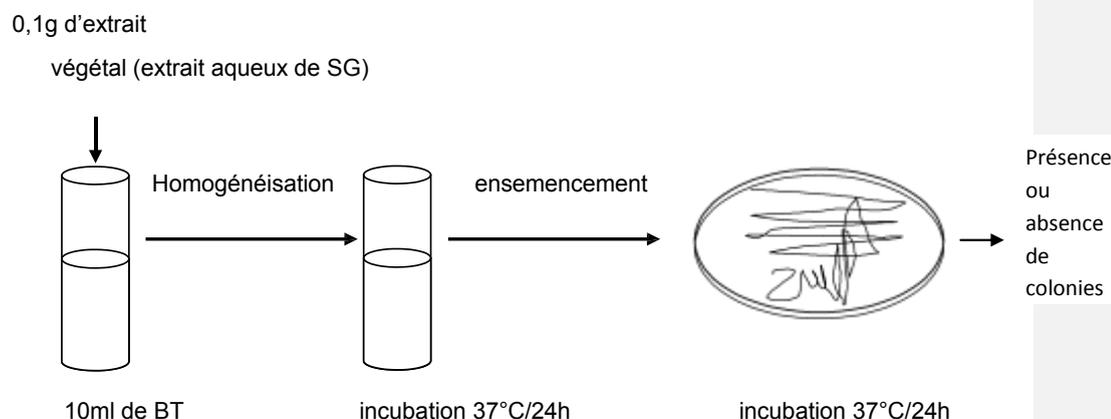


Figure 10: Méthode de la vérification de la stérilité de l'extrait aqueux de *Sacoglottis gabonensis* (Humiriaceae)(13).

II-4 Préparation des gammes de concentration de l'extrait aqueux de *Sacoglottis gabonensis* (Humiriaceae)

Elles sont préparées dans 7 tubes (T) à essais numérotés de T₁ à T₇, par la méthode de la double dilution en milieu liquide. Pour cela, 10 ml d'eau distillée ont été mis dans le tube T₁ et 5 ml dans tous les autres tubes. Ensuite, une masse de 1 g de poudre de l'extrait végétal préalablement déterminée a été dissoute dans le tube T₁, puis homogénéisé complètement pour donner la concentration C₁ = 100 mg/ml.

Ensuite, la moitié du volume du tube T₁ (5 ml) est transférée dans le tube T₂, puis homogénéisée. Cette opération est répétée jusqu'au tube T₇, après quoi, la moitié du volume est rejetée (**Figure 11**).

Les gammes de concentration sont ensuite filtrées sur une membrane (MILLEX GV®) de diamètre 0,45 µm et conservées au réfrigérateur (14).

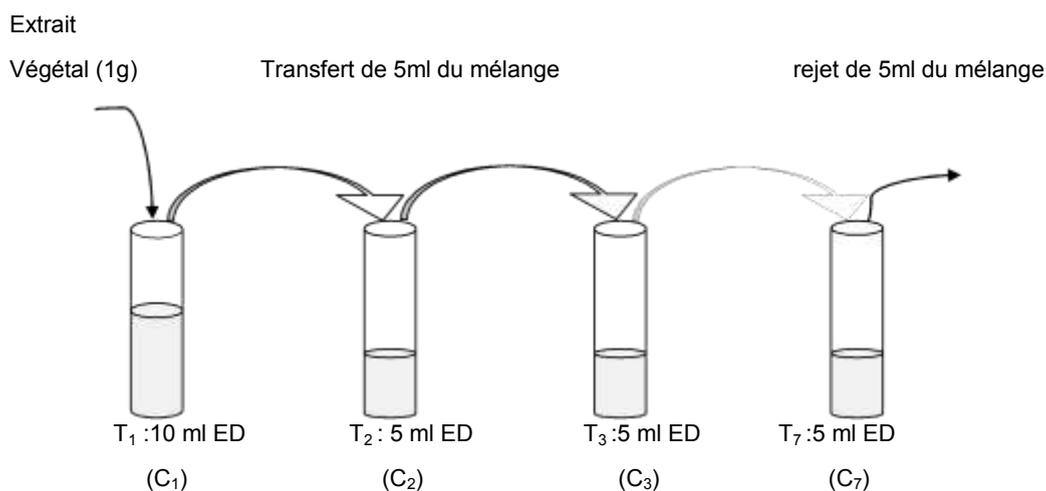


Figure 11: Préparation des gammes de concentration de l'extrait aqueux de *Sacoglottis gabonensis* (Humiriaceae) (14).

Pour 1 g d'extrait, les concentrations obtenues ont été résumées dans le **tableau II**:

Tableau II : récapitulatif des gammes de concentration de l'extrait de *Sacoglottis gabonensis* (Humiriaceae)

Tubes	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇
Concentrations CT ₁₋₇ (mg/ml)	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,565

II-5. Préparation de l'inoculum bactérien des germes surinfectant l'ulcère de Buruli (13)

Deux colonies isolées d'une culture bactérienne de 18 heures ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine puis homogénéisées dans 10 ml de bouillon de Miller-Hinton (BMH) et incubées pendant 3 heures à 37°C pour avoir une pré-culture.

0,1 ml ou 0,3 ml du bouillon de pré-culture opalescent respectivement pour les *Escherichia coli* et les genres *Staphylococcus* ou *Pseudomonas* été prélevé ensuite et délayé dans un tube contenant 10ml de BMH concentré deux fois. Cette suspension bactérienne réalisée, permet d'avoir environ 10^6 UFC/ml (condition standard) et constitue l'inoculum bactérien de dilution 10^0 (**Figure 12**).

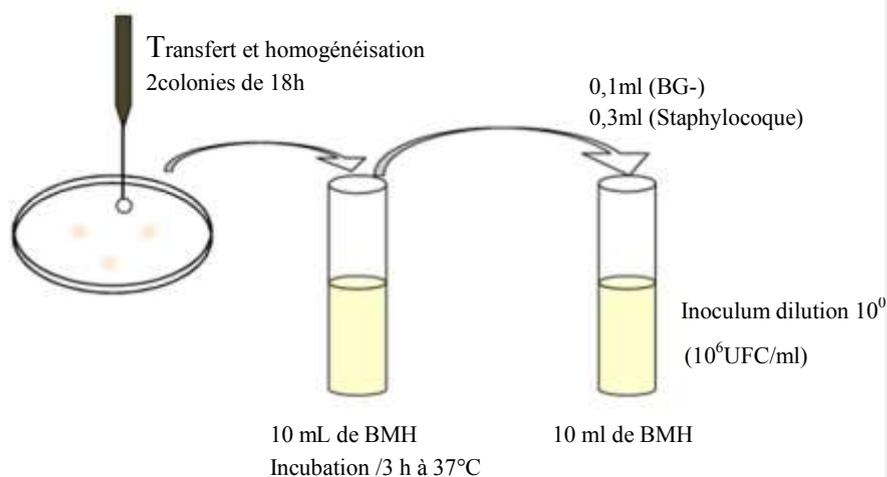


Figure 12: Méthode de préparation de l'inoculum bactérien des germes qui surinfectent l'ulcère de Buruli (**13**).

II-6. Numération de l'inoculum bactérien des germes surinfectant l'ulcère de Buruli (13)

Pour réaliser la numération, l'inoculum bactérien précédemment préparé est homogénéisé puis dilué de 10 en 10 jusqu'à la dilution 10^{-4} . On obtient 4 dilutions successives à 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} . Ensuite, l'inoculum bactérien initial et les 4 dilutions successives sontensemencés à l'aide d'une anse calibrée de 2 μ l dans des boîtes gélosées de Miller-Hinton (MH), sur des stries de 5 cm de long. Cette préparation constitue la **boîte A (Figure 13)**.

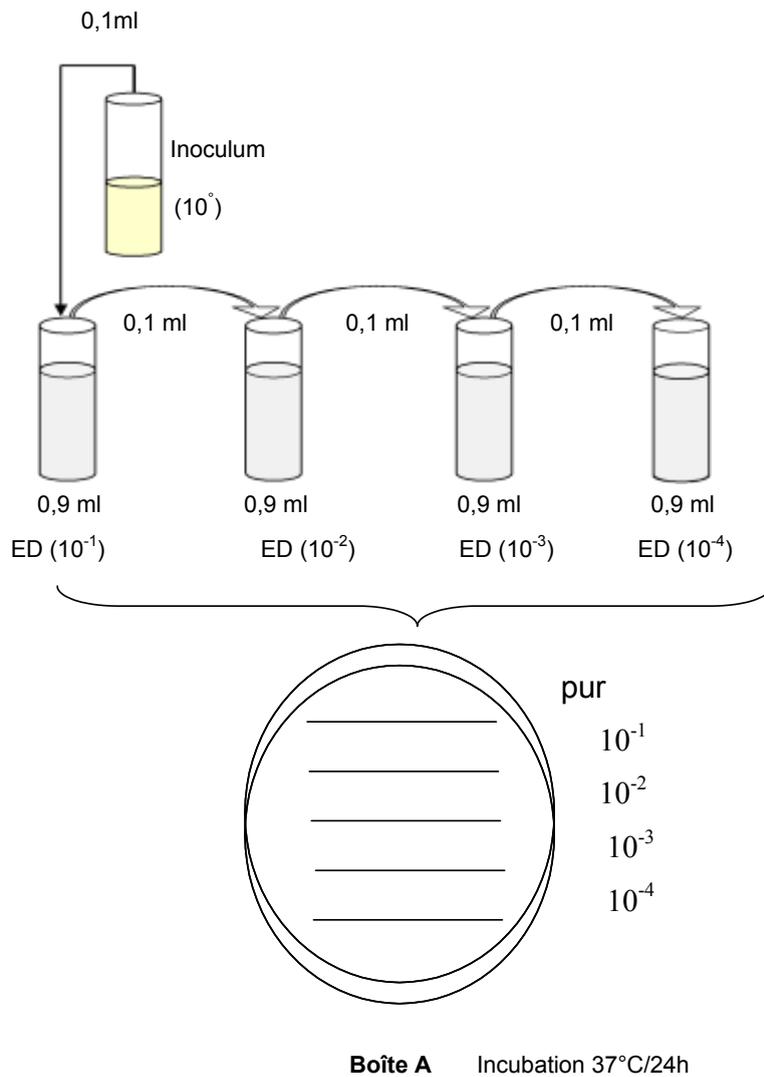


Figure 13 : Numération de l'inoculum (13).

II-7. Détermination des paramètres antibactériens : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB) sur les germes surinfectant l'ulcère de Buruli

a) Détermination de l'activité antibactérienne

La boîte gélosée de Muller-Hinton a été uniformémentensemencée avec une suspension calibrée de bactéries à étudier et séchée pendant 15 minutes à l'étuve.

Ensuite des puits ont été faits à l'aide d'une pipette Pasteur et une quantité de 50 μ l de la substance à tester y a été déposée. La gélose a été par la suite incubée à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

La lecture de l'activité antibactérienne s'est faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque cupule à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle graduée en millimètre (**Figure 14**).

Et en fonction du diamètre de la zone d'inhibition (D), les résultats sont exprimés comme suit : **(38)**

Si $D < 8$ mm		Résistante
Si $9 \text{ mm} < D < 14$ mm		Sensible
Si $15 \text{ mm} < D < 19$ mm		Très Sensible
Si $D \geq 20$ mm		Extrêmement Sensible

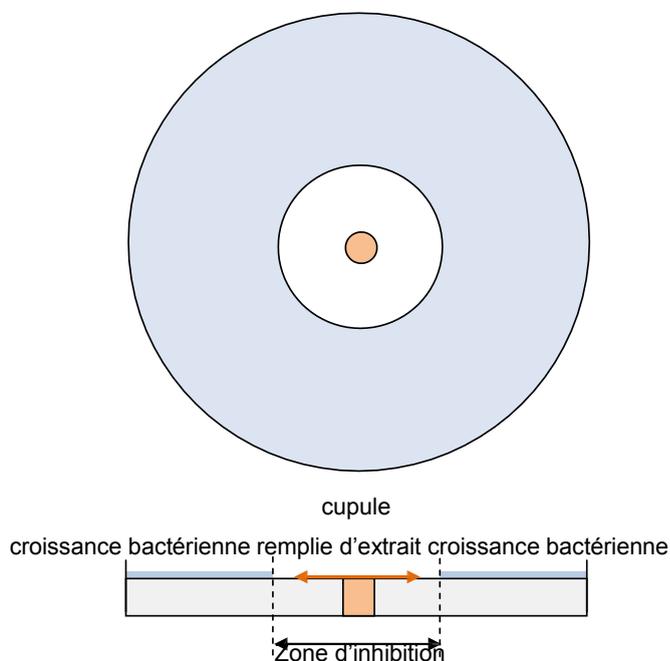


Figure 14: Schéma simplifié du principe de la méthode de diffusion en milieu solide (38).

Des disques d'antibiotiques de 6 mm de diamètre sont également déposés sur la gélose. Ces antibiotiques sont choisis en fonction de la souche de bactérie étudiée et sont dits antibiotiques marqueurs. Ces marqueurs ont été mis en évidence par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) et le Comité Européen pour l'étude de la sensibilité aux antimicrobiens (EUCAST) (**Tableau III**).

Tableau III : Classification CASFM/EUCAST des concentrations critiques et des diamètres des zones d'inhibitions des antibiotiques utilisés (39)

Familles	Antibiotiques	Sigle	Charge (µg)	Diamètre critique (mm)	
				S ≥	R <
Pénicilline	Oxacilline	OX	30	22	18
	Amoxicilline + Acide clavulanique	AMC	20/10	19	19
Carbapénèmes	Imipenème	IPM	10	22	16
Céphalosporine	Céfoxitine	FOX	30	8	16
	Ceftriaxone	CRO	30	23	20

b) Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide

Les différentes gammes de concentration d'extrait végétal à tester ont été ajoutées à l'ensemble des 7 tubes expérimentaux contenant chacun 1 ml de l'inoculum bactérien (13).

Ainsi, 1 ml d'extrait de la plus grande concentration est transféré dans le tube T₁, celui de concentration suivante dans le tube T₂, ainsi de suite jusqu'à la plus faible concentration dans le tube T₇. Cette démarche a fait qu'en fin de compte du tube T₁ au tube T₇, les concentrations sont passées du double au simple.

1 ml d'eau distillée stérile a été mis dans le tube Tc désigné tube témoin de croissance. Tandis que, 2 ml de BMH stérile ont été mis dans le tube Ts et sert de tube de contrôle de stérilité.

Tous ces tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures.

La CMI correspond à la concentration du premier tube à partir duquel l'on n'observe aucun trouble à l'œil nu. Cette opération a été répétée trois fois de suite (**Figure 15**).

Dans notre cas, étant donné la teinte rougeâtre de l'extrait après le mélange, la détermination de la CMI à l'œil nu était difficile. Nous avons donc procédé à l'ensemencement par strie des différents tubes. La CMI correspondait donc à la première strie sans colonies.

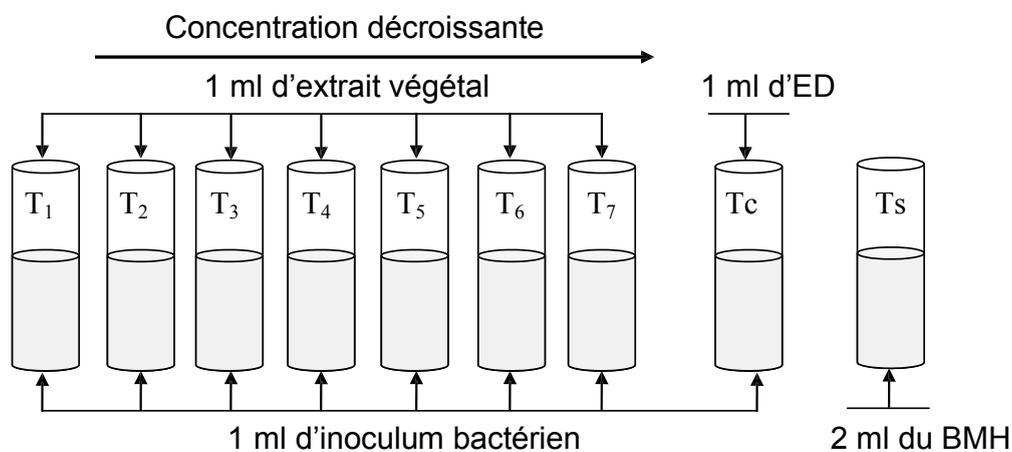
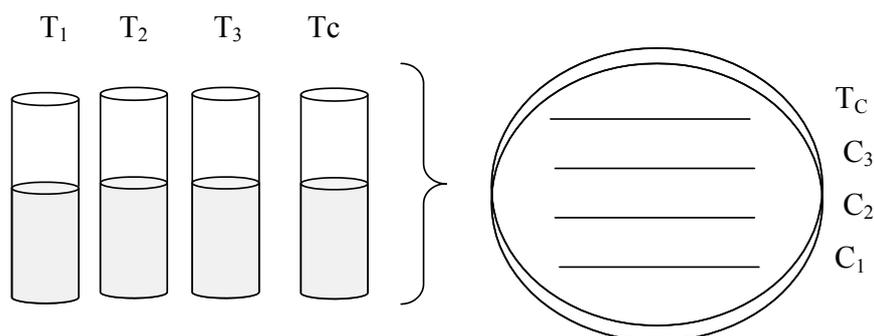


Figure 15: Culture bactérienne en présence de l'extrait végétal (13)

c) Détermination de la CMB

La Concentration Minimale Bactéricide est la plus faible concentration de substance qui laisse au plus 0,01% de germes survivants. A l'aide d'une anse calibrée de 2 μ l, nous avons prélevé les contenus des tubes dans lesquels aucun trouble n'a été observé et nous les avons ensemencés sur Gélose Mueller-Hinton (GMH), en commençant par le tube de la CMI (13).

Cet ensemencement a été fait sur des stries parallèles de 5 cm de long à la surface de la GMH (**boîte B**) (**Figure 16a**).



Boîte B incubation 37°C/24h

Figure 16a : Méthode de détermination de la CMB

Après 24 heures d'incubation à l'étuve à 37°C, le nombre de colonies sur les stries de la **boîte B** et celui de la **boîte A** a été comparé. Cette opération a été répétée trois fois de suite (**Figure 16b**).

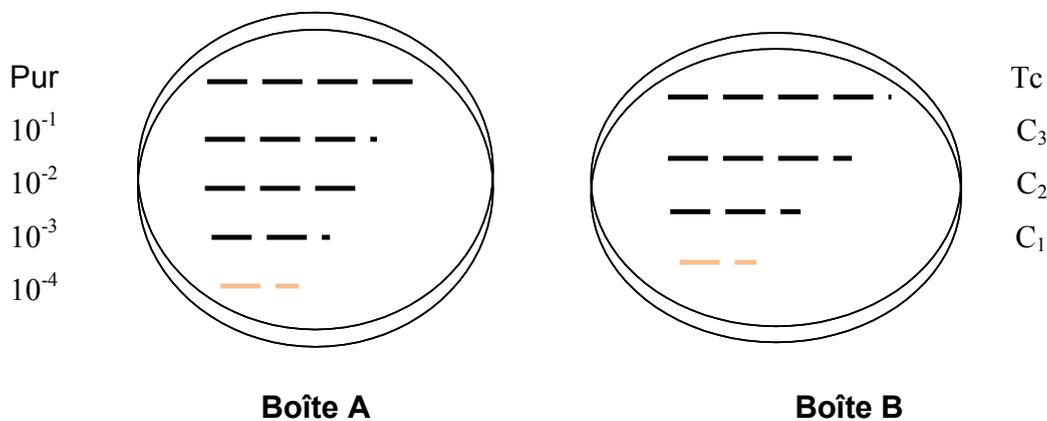


Figure 16b : Méthode de détermination de la CMB (13)

A chacune des dilutions correspond un pourcentage de germes survivants comme suit :

- Dilution 10^0 correspond à 100% de survivants
- Dilution 10^{-1} correspond à 10% de survivants
- Dilution 10^{-2} correspond à 1% de survivants
- Dilution 10^{-3} correspond à 0,1% de survivants
- Dilution 10^{-4} correspond à 0,01% de survivants

d) Modalité d'action de l'extrait de *Sacoglottis gabonensis* (*Humiriaceae*) sur les germes surinfectant l'ulcère de Buruli

Le rapport CMB/CMI permet de préciser la modalité d'action d'une substance. Si le rapport (34) :

- $CMB/CMI \leq 2$, la substance est dite bactéricide
- $CMB/CMI > 2$, la substance est dite bactériostatique

II-8- Détermination de l'activité antibactérienne de l'extrait de *Sacoglottis gabonensis* (Humiriaceae) sur les souches de *Mycobacterium ulcerans* (14)

a- Décontamination des œufs

La décontamination des œufs se fait en six (6) étapes qui consistent à :

- dépoussiérer les œufs avec une brosse douce,
- les tremper dans une solution de soude à 5% pendant 20 minutes,
- les rincer à l'eau distillée stérile,
- les tremper dans l'alcool éthylique à 70° ,
- les retirer et les rincer à l'eau distillée stérile,
- puis à les poser dans un récipient stérile pour les casser.

b- Préparation du milieu de Lowenstein-Jensen (L-J) (14)

Il s'agit d'un milieu solide à l'œuf entier de poule avec un culot en pente (œufs frais de 24 heures).

Nous avons préparé un milieu sans substances antimicrobiennes d'une part et d'autre part un milieu auquel nous avons incorporé l'extrait de *Sacoglottis gabonensis*.

➤ Milieu sans substance antimicrobienne

Pour un litre d'œuf entier, nous avons pesé 37,2 g de poudre du milieu base que nous avons dissoute dans 600 ml d'eau distillée. Après avoir ajouté 12 ml de glycérol, le tout est porté à ébullition en agitant le flacon pendant 1 minute de manière à dissoudre parfaitement la poudre.

Nous avons procédé ensuite à la stérilisation à l'autoclavage à 121°C pendant 15 mn, avant de refroidir entre 45° et 50°C et passer à la conservation du milieu au bain-marie.

Ce milieu a été ensuite mélangé parfaitement à 1L d'œuf recueilli stérilement, puis après passage au mixeur, le mélange a été filtré sur compresse stérile afin d'avoir un milieu sans débris.

Après une répartition du milieu dans des tubes à vis stériles en raison de 6 ml par tube sans incorporation de bulles, nous les avons disposé dans le coagulateur réglé à 85°C avec une pente de 45° pendant 45 minutes.

Les tubes de milieu ont été enfin refroidis et conservés à +4°C avec un délai de conservation de 3 à 6 mois.

➤ **Milieu avec substances antimicrobiennes**

Nous avons préparé stérilement le milieu de Löwenstein-Jensen comme précédemment décrit en y incorporant d'une part l'extrait de *Sacoglottis gabonensis* et d'autre part certains antibiotiques utilisés dans le traitement de l'ulcère de Buruli.

En effet, après ajout de l'œuf au milieu, nous avons recueilli 100 ml du mélange dans 3 béchers différents auxquels nous avons incorporé respectivement 1 g, 2 g puis 4 g de SG de sorte à obtenir des concentrations finales de $C_1 = 10 \text{ mg/ml}$, $C_2 = 20 \text{ mg/ml}$ et $C_4 = 40 \text{ mg/ml}$, Le même procédé est effectué avec 0,2 mg d'Ofloxacin, 0,4mg de Streptomycine et 4 mg de Rifampicine de sorte que finalement nous obtenions comme concentration respectivement 0,002 mg/ml, 0,4 mg/ml et 0,04 mg/ml,

Les différents mélanges ont été mixés et filtrés sur compresse stérile pour recueillir le milieu sans débris puis répartis dans des tubes à vis stériles en raison de 6 ml par tube sans incorporation de bulles,

Après avoir porté les tubes à coagulation à 85°C (avec une pente de 45°) pendant 45 minutes, nous les avons refroidi et conservé à +4°C.

c- Ensemencement des milieux de L-J avec les souches de *Mycobacterium ulcerans*

Les différentes étapes de la préparation des dilutions et de l'ensemencement sont illustrées par les figures ci-dessous (**Figure 17 à 19**) :

➤ **Préparation des différentes dilutions de la souche CNR006**

Une colonie de la souche à étudier est prélevée puis introduite dans un tube à visse contenant cinq (5) billes de verre et 1 ml d'eau distillée ; le tube est ensuite passé au vortex pour homogénéiser le mélange.

Pour la préparation des dilutions, 1ml de la solution obtenue est prélevée à l'aide d'une micropipette puis introduite dans 9 ml d'eau distillée stérile contenue dans un deuxième tube : c'est la dilution au 1/10^e.

A partir de la dilution 1/10^e, le même procédé est utilisé pour obtenir la dilution 1/100^e puis 1/1000^e (**Figure 17**).

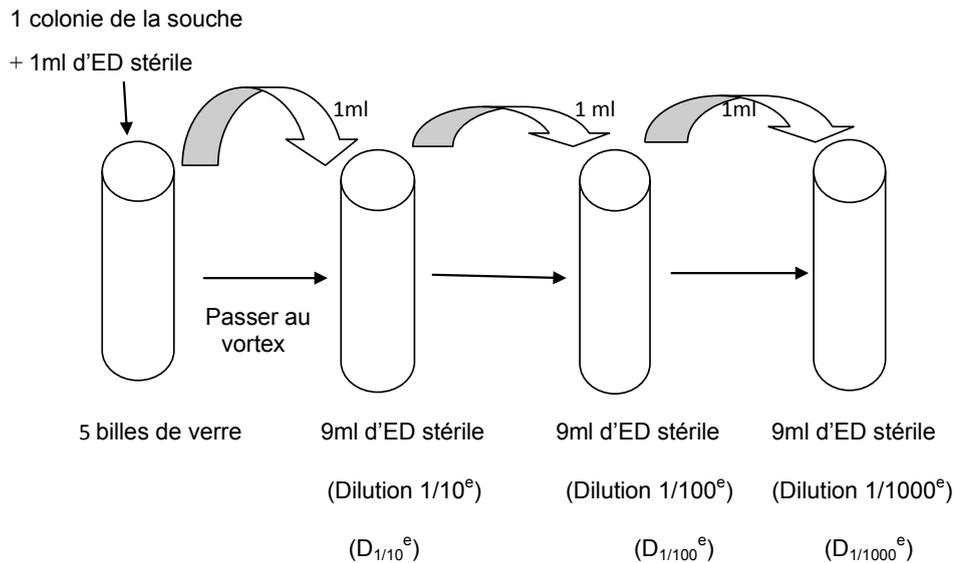


Figure 17 : Différentes dilutions (D) de la souche CNR006

➤ **Ensemencement des 6 tubes témoins**

Les 6 tubes témoins contiennent uniquement le milieu de L-J sans substance antimicrobienne.

Pour les différents ensemencements, quatre (4) gouttes de la dilution de la souche à ensemercer sont déposées à la surface de chaque tube comme illustré par les figures 18 et 19.

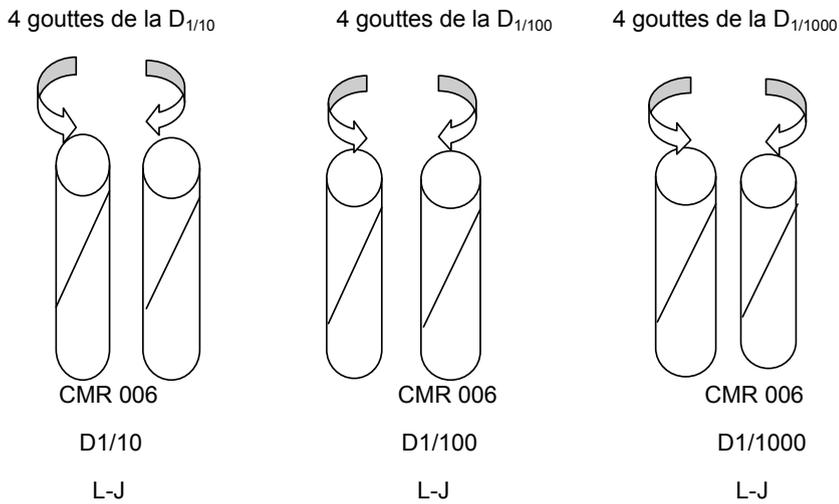


Figure 18 : Ensemencement des tubes témoins

➤ **Ensemencement des 3 tubes à concentration $C_1 = 10$ mg/ml en SG**

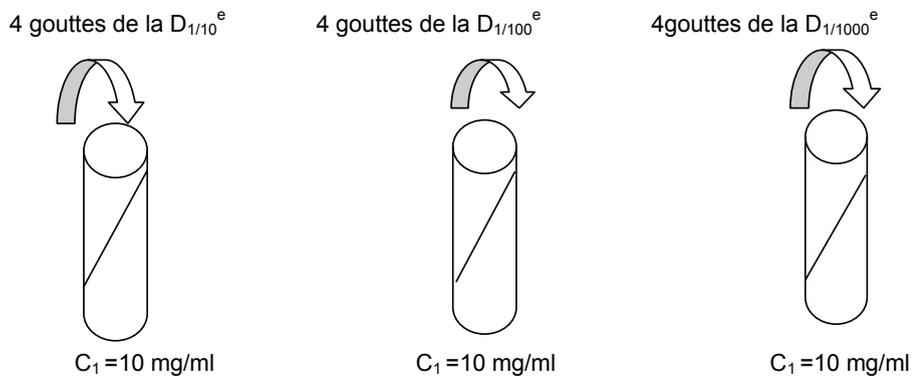


Figure 19: Ensemencement des 3 tubes à concentration $C_1 = 10$ mg/ml en SG

Le même procédé d'ensemencement a été répété avec les 4 autres souches de *Mycobacterium ulcerans* c'est-à-dire les souches CNR012, 13/12, CNR008 et 13/29.

Après avoir reparti uniformément les 4 gouttes à la surface du milieu de L.J, les différents tubes ont été posés sur des plateaux à plan incliné et laissés à incubation à température ambiante pendant 3 mois,

Durant les deux premières semaines de l'incubation, nous avons devissé et vissé à nouveau légèrement les tubes tous les deux jours, de façon à ce que l'oxygène puisse y pénétrer puis à partir de la troisième semaine, nous l'avons fait une fois par semaine Jusqu'au troisième mois d'incubation.

II-11-Calcul du taux de résistance des souches de *Mycobacterium ulcerans* (14)

Le Taux de résistance correspond au produit du nombre de colonies ayant poussées sur tube avec antibiotique sur le nombre de colonie sur tube témoin.

$$\text{Taux de résistance} = \frac{\text{Nombre de colonie sur le tube avec antibiotique}}{\text{Nombre de colonie sur le tube témoin}}$$

Si le Taux de résistance < 1 —————> Souche sensible à la substance

Si le Taux de résistance ≥ 1 —————> Souche résistante à la substance

CHAPITRE II : **RESULTATS**

I- OBTENTION ET CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE L'EXTRAIT SEC

I-1- Obtention de l'extrait sec de *Sacoglottis gabonensis* (Humiriaceae)

L'extrait sec d'écorce de tronc de *Sacoglottis gabonensis* (Humiriaceae) obtenu après extraction et évaporation, s'est présenté sous forme de cristaux de couleur marron foncé (**Figure 25**), avec un rendement d'extraction de 8,30%. Ces cristaux ont ensuite été transformés en poudre fine par trituration au mortier (**Figure 26**), puis par passage à travers les mailles d'un tamis de marque TAMISOR®, d'ouverture 80µ. Cette opération avait pour but de réduire le temps de dissolution de la poudre d'extrait sec dans l'eau.

La poudre d'extrait sec ainsi obtenue a fait l'objet d'une caractérisation physicochimique :



Figure 20 : Cristaux d'extrait sec



Figure 21 : Poudre d'extrait sec

I-2- Obtention et caractérisation physico-chimique de l'extrait sec de *Sacoglottis gabonensis* (Humiriaceae)

La solubilité de la poudre d'extrait sec à 27°C était de 5,5 g/l.

Le pH était de 4,5 à 24,3°C, le taux d'humidité était de 9 % et la granulométrie inférieure à 0,08 mm.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures le test de stérilité a révélé un extrait stérile.

Commentaire [PK7]: Quelle est la solubilité ?

Commentaire [PK8]: Qu'est ce que cela signifie ?

II- DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'EXTRAIT DE *SACOGLOTTIS GABONENSIS*

Les différents diamètres d'inhibition obtenus en fonction de la concentration de l'extrait de *Sacoglottis gabobnensis* et selon les antibiotiques marqueurs utilisés sont consignés dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV: Tableau récapitulatif des diamètres d'inhibition

Code	Souches	Diamètre d'inhibition (mm)						
		C _{T1} [*]	C _{T2}	C _{T3}	C _{T4}	ATB ₁ [*] (Au centre)	ATB ₂ [*]	Témoin (ED) [*]
122C/11	<i>Staphylococcus aureus</i>	14	13	13	12	40	22	0
1393C/13	<i>Staphylococcus aureus</i>	15	11	11	11	26	26	0
292C/13	<i>Staphylococcus aureus</i>	28	25	21	18	40	32	0
1093C/13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	13	11	4	20	26	0
1089C/12	<i>Escherichia coli</i>	30	28	25	12	30	28	0

Pour *Staphylococcus aureus*, l'antibiotique 1 (ATB 1) était l'oxacilline (OX) et l'antibiotique 2 (ATB 2) la cefoxitine (FOX).

Pour *Pseudomonas aeruginosa*, l'antibiotique 1 (ATB 1) était l'imipénème (IPM) et l'antibiotique 2 (ATB 2) était la ceftriaxone (CRO).

Pour la souche d'*Escherichia coli*, l'antibiotique 1 (ATB 1) correspondait à l'amoxicilline + l'acide clavulanique (AMC), tandis que l'antibiotique 2 correspondait à la ceftriaxone.

CT₁= concentration du tube 1

ED= eau distillée

L'extrait de *Sacoglottis gabonensis* a montré une meilleure activité avec la souche 292c/10 de *Staphylococcus aureus* et la seule souche d'*Escherichia coli* (1089c/12) soumise à notre étude car les plus grands diamètres d'inhibition sont observés avec ces deux souches.

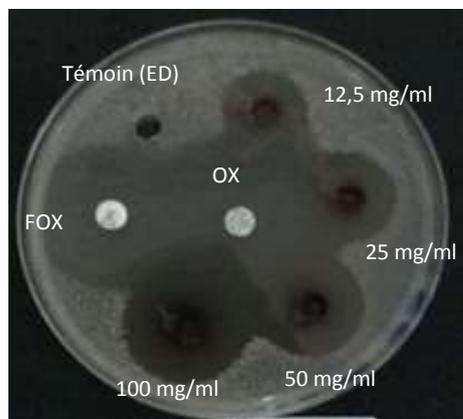


Figure 22: Activité antibactérienne de l'extrait de *Sacoglottis gabonensis* sur la souche 292c/13 de *Staphylococcus aureus*

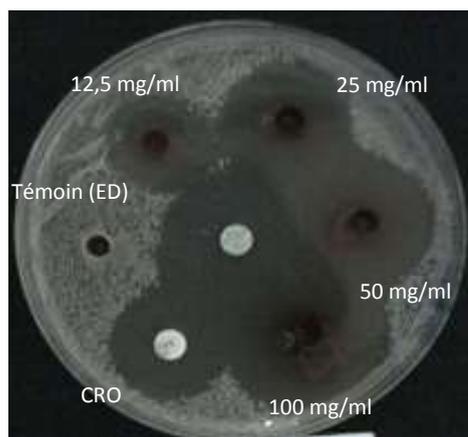


Figure 23 : Activité antibactérienne de l'extrait de *Sacoglottis gabonensis* sur la souche 1089c/12 de *Escherichia coli*

III-DETERMINATION DES PARAMETRES ANTIBACTERIENS: CMI et CMB

Les résultats des paramètres antibactériens de l'extrait de *Sacoglottis gabonensis* vis-à-vis des germes qui surinfectent l'ulcère de Buruli sont consignés dans le **tableau V**.

Tableau V : Paramètres antibactériens de l'extrait de *Sacoglottis gabonensis* sur les germes qui surinfectent l'ulcère de Buruli

Code	souche	CMI milieu liquide (mg/ml)	CMB	Pouvoir
122c/11	<i>Staphylococcus Haemolyticus</i>	3,125	3,125	Bactéricide
1393c/13	<i>Staphylococcus aureus</i>	25	100	Bactériostatique
292c/13	<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5	12,5	Bactéricide
1093c/13	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	100	—	Résistant
1089c/12	<i>Escherichia coli</i>	6,25	50	Bactériostatique

Ce tableau nous révèle que :

– **Pour les souches de Staphylocoque**

La CMI de la souche 122c/11 était de 3,125 mg/ml en milieu liquide.

La CMB étant également de 3,125 mg/ml, ce qui donnait un rapport CMB/CMI égal à 1, donc inférieur à 2. L'extrait est dit bactéricide vis-à-vis de cette souche.

La CMI de la souche 1393c/13 étant de 25 mg/ml en milieu liquide et la CMB de 100 mg/ml, le rapport CMB/CMI est supérieur à 2. L'action de l'extrait sur cette souche est donc bactériostatique.

Pour la souche 292c/13 la CMI étant égale à 6,25 mg/ml et la CMB de 12,5 mg/ml (**Figure 30**), l'action de l'extrait sur cette souche est bactéricide.

– **Pour la souche de *Pseudomonas***

Cette souche s'est avérée résistante à l'extrait de SG

– **Pour la souche d'*Escherichia coli***

En milieu liquide, cette souche a eu une CMI de 6,25 mg/ml. La CMB était de 50 mg/ml. Les rapports CMB/CMI sont tous supérieurs à 2. Pour cette souche donc l'action de l'extrait est bactériostatique.

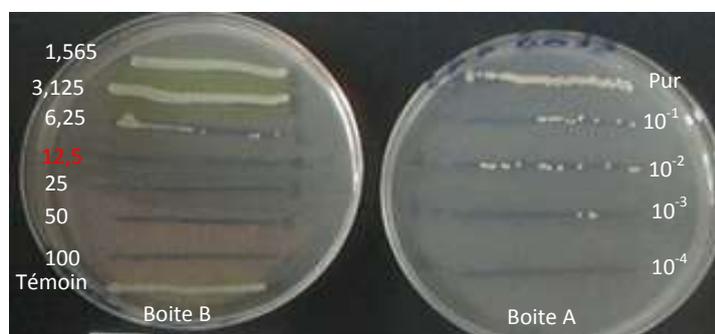


Figure 24: Concentration Minimale Bactéricide (mg/ml) de l'extrait de *Sacoglottis gabonensis* sur la souche 292c/13 de *Staphylococcus aureus*

La bergénine, utilisée dans les mêmes conditions que l'extrait de *Sacoglottis gabonensis* n'a montré aucune activité antibactérienne.

IV- RESULTATS DES ENSEMENCEMENTS DES CINQ SOUCHES DE MYCOBACTERIUM ULCERANS

Pour l'ensemencement des cinq souches de *Mycobacterium ulcerans*, nous avons utilisé pour chaque souche :

- 6 tubes témoins,
- 3 tubes à concentration $C_1 = 10$ mg/ml en SG,
- 3 tubes à concentration $C_2 = 20$ mg/ml en SG,
- 3 tubes à concentration $C_4 = 40$ mg/ml en SG,
- 3 tubes à concentration $C_S = 0,4$ mg/ml en Streptomycine,
- 3 tubes à concentration $C_R = 0,04$ mg/ml en Rifampicine,
- 3 tubes à concentration $C_O = 0,2$ mg/ml en Ofloxacine

En somme, nous avons utilisé pour les cinq souches 120 tubes. Nous n'avons illustré en image que la souche CNR006.

a) Illustration de la souche CNR006

- Les 6 tubes témoins



D_{1/10}

D_{1/100}

D_{1/1000}

Nous avons compté :

- 124 colonies pour la dilution 1/10
- 71 colonies pour la dilution 1/100
- 24 colonies pour la dilution 1/1000

Figure 25 : Tubes témoins après 3 mois d'incubation

- Les 3 tubes à concentration C₁ = 10 mg/ml en SG



D_{1/1000}

D_{1/100}

D_{1/10}

Nous avons compté :

- 110 colonies pour la dilution 1/10
- 67 colonies pour la dilution 1/100
- 29 colonies pour la dilution 1/1000

Figure 26: Tubes à concentration C₁ = 10 mg/ml en SG après 3 mois d'incubation

- Les 3 tubes à concentration $C_2 = 20$ mg/ml en SG



D_{1/1000} D_{1/100} D_{1/10}

Nous n'avons observé aucune pousse de colonies sur les trois dilutions

Figure 27: tubes à concentration $C_2 = 20$ mg /ml en SG après 3 mois d'incubation

- Les 3 tubes à concentration $C_4 = 40$ mg/ml en SG



D_{1/1000} D_{1/100} D_{1/10}

Aucune pousse de colonies n'a été observée au niveau des trois tubes.

Figure 28: Tubes à concentration $C_4 = 40$ mg/ml en SG après 3 mois d'incubation

- **Les 3 tubes à concentration $C_S = 0,4$ mg/ml en Streptomycine**



$D_{1/1000}$ $D_{1/100}$ $D_{1/10}$

Aucune pousse de colonies n'a été observée sur les trois tubes.

Figure 29 : Tubes à concentration $C_S = 0,4$ mg/ml après 3 mois d'incubation

- **Les 3 tubes à concentration $C_R = 0,04$ mg/ml en Rifampicine**



$D_{1/1000}$ $D_{1/100}$ $D_{1/10}$

Nous avons compté :

- 10 colonies pour la dilution 1/10
- 7 colonies pour la dilution 1/100
- 3 colonies pour la dilution 1/1000

Figure 30 : Tubes à concentration $C_R = 0,04$ mg/ml en Rifampicine

- **Les 3 tubes à concentration $C_0 = 0,2$ mg/ml en Ofloxacin**



D_{1/1000} D_{1/100} D_{1/10}

Nous avons compté :

- 4 colonies pour la dilution 1/10
- 2 colonies pour la dilution 1/100
- Aucune colonie pour la dilution 1/1000

Figure 31 : Tubes à concentration $C_0 = 0,2$ mg/ml en Ofloxacin après 3 mois d'incubation

- **Nombre de colonies dans les différents tubes**

Le nombre de colonies ayant poussé dans les différents tubes après 3 mois d'incubation est répertorié dans le tableau ci-dessous :

Tableau VI : Récapitulatif du nombre de colonies obtenues à partir de souches de *Mycobacterium ulcerans* après 3 mois d'incubation

Souche	Dilution de la souche	Rifampicine	Streptomycine	Ofloxacine	C ₁ =10 mg/ml	C ₂ =20 mg/ml	C ₄ =40 mg/ml	T ₁	T ₂
CNR012	1/10 ^e	0 colonie	0 colonie	35 colonies	75 colonies	0 colonie	0 colonie	200 colonies	205 colonies
	1/100 ^e	0 colonie	0 colonie	5 colonies	56 colonies	0 colonie	0 colonie	134 colonies	140 colonies
	1/1000 ^e	0 colonie	0 colonie	0 colonie	34 colonies	0 colonie	0 colonie	26 colonies	40 colonies
13/21	1/10 ^e	0 colonie	200 colonies	70 colonies	300 colonies	0 colonie	0 colonie	300 colonies	150 colonies
	1/100 ^e	0 colonie	100 colonies	22 colonies	100 colonies	0 colonie	0 colonie	176 colonies	183 colonies
	1/1000 ^e	0 colonie	30 colonies	3 colonies	86 colonies	0 colonie	0 colonie	56 colonies	60 colonies
CNR006	1/10 ^e	10 colonies	0 colonie	4 colonies	110 colonies	0 colonie	0 colonie	120 colonies	128 colonies
	1/100 ^e	07 colonies	0 colonie	2 colonies	67 colonies	0 colonie	0 colonie	73 colonies	70 colonies
	1/1000 ^e	03 colonies	0 colonie	0 colonie	29 colonies	0 colonie	0 colonie	25 colonies	23 colonies
CNR008	1/10 ^e	0 colonie	0 colonie	30 colonies	67 colonies	40 colonies	0 colonie	300 colonies	280 colonies
	1/100 ^e	0 colonie	0 colonie	23 colonies	42 colonies	30 colonies	0 colonie	30 colonies	44 colonies
	1/1000 ^e	0 colonie	0 colonie	1 colonie	24 colonies	0 colonies	0 colonie	14 colonies	20 colonies
13/29	1/10 ^e	355 colonies	357 colonies	230 colonies	400 colonies	0 colonie	0 colonie	400 colonies	400 colonies
	1/100 ^e	230 colonies	189 colonies	123 colonies	200 colonies	0 colonie	0 colonie	250 colonies	235 colonies
	1/1000 ^e	121 colonies	46 colonies	57 colonies	20 colonies	0 colonie	0 colonie	24 colonies	25 colonies

T₁ = Témoin 1

T₂ = Témoin 2

C₁, C₂ et C₄ = Concentration du milieu en *Sacoglottis gabonensis*

V- CALCUL DES TAUX DE RESISTANCE DE *MYCOBACTERIUM ULCERANS*

Les différents taux de résistance de *Mycobacterium ulcerans* à l'égard de l'extrait aqueux de *Sacoglottis gabonensis* sont consignés dans le **Tableau VII**

Souche	Dilution de la souche	Rifampicine	Streptomycine	Ofloxacine	C ₁ =10mg/ml	C ₂ =20mg/ml	C ₄ =40mg/ml
CNR012	1/10 ^e	0	0	0,17	0,37	0	0
	1/100 ^e	0	0	0,03	0,40	0	0
	1/1000 ^e	0	0	0	1,03	0	0
13/21	1/10 ^e	0	0,88	0,31	1,33	0	0
	1/100 ^e	0	0,55	0,12	0,55	0	0
	1/1000 ^e	0	0,51	0,05	1,48	0	0
CNR006	1/10 ^e	0,08	0	0,03	0,88	0	0
	1/100 ^e	0,09	0	0,02	0,93	0	0
	1/1000 ^e	0,12	0	0	1,20	0	0
CNR008	1/10 ^e	0	0	0,10	0,23	0,13	0
	1/100 ^e	0	0	0,62	1,13	0,81	0
	1/1000 ^e	0	0	0,05	1,41	0	0
13/29	1/10 ^e	0,88	0,89	0,57	1	0	0
	1/100 ^e	0,94	0,77	0,50	0,82	0	0
	1/1000 ^e	4,93	1,87	2,32	0,81	0	0

 : Taux de résistance supérieur à 1 (souche résistante)

 : Taux de résistance inférieur à 1 (souche sensible)

Tableau VII: Récapitulatif des Taux de résistance de *Mycobacterium ulcerans*

Ce tableau montre que toutes les cinq souches de *Mycobacterium ulcerans* étudiées sont sensibles à l'extrait de *Sacoglottis gabonensis* à partir de la concentration de 20 mg/ml.

CHAPITRE III : **DISCUSSION**

L'objectif de ce travail a consisté en l'évaluation in vitro de l'activité antibactérienne de *Saccoglottis gabonensis* sur certains germes en particulier sur *Mycobacterium ulcerans*. Pour cela nous avons procédé à l'extraction aqueuse de SG, à la détermination de ses caractéristiques physico-chimiques puis nous l'avons mis en contact sur milieu gélosé (Muller-Hilton) avec quelques germes (Staphylocoque, Pseudomonas et Escherichia coli). Ce qui nous a permis de déterminer les paramètres antibactériens en l'occurrence la CMI et la CMB.

Nous avons préparé le milieu de Lowenstein-Jensen auquel nous avons incorporé l'extrait aqueux de SG afin de déterminer les différents taux de résistance des cinq souches de *Mycobacterium ulcerans* soumises à notre étude.

I- OBTENTION ET CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUES DE L'EXTRAIT SEC DE *SACOGLOTTIS GABONENSIS* (HUMIRIACEAE)

L'extrait sec d'écorce obtenu après extraction et évaporation, s'est présenté sous forme de cristaux de couleur marron foncé, avec un rendement d'extraction de 8,30%.

La solubilité de l'extrait aqueux de *Sacoglottis gabonensis* était de 5,5 g/l à 27°C, le PH de 4,5 à 24,3°C et le taux d'humidité à 9%. Ces résultats sont superposables à ceux de GUEI-MONIN GABRIELLE qui a mis au point des hydrogels à base de *Sacoglottis gabonensis*. En effet, elle a trouvé une solubilité de 5,55 g/l, un PH de 5,4 à 20°C et un rendement d'extraction de 8,29%. **(16)**

II- DETERMINATION DES PARAMETRES ANTIBACTERIENS : CMB / CMI

Sur les cinq souches de germes opportunistes utilisées, l'extrait de SG a été actif sur quatre souches, à savoir les trois souches de staphylocoque et la seule souche de *Pseudomonas* étudiée. En effet, l'extrait possède une activité bactéricide vis-à-vis de deux souches de staphylocoques en l'occurrence les souches 122c/11 et 292c/13 avec respectivement un rapport CMB/CMI qui est de 1 pour la souche 122c/11 et de 2 pour la souche 292c/13 en milieu liquide. Ces rapports sont tous inférieurs ou égaux à 2 (deux) ce qui justifie l'action bactéricide que les travaux de **Fauchere et col (12)** ont démontré.

L'effet bactériostatique s'est observé à l'égard d'une souche de Staphylocoque (1393c/13) et de la seule souche d'*Escherichia coli* (1089c/12) soumis à notre étude avec un rapport de CMB/CMI respectivement de 4 et 8 en milieu liquide. Ces résultats sont identiques à ceux trouvés par **Fauchere et col (12)**.

La Bergenine, un composé isolé de l'extrait de SG par **(Aka Any-Grah et al** lors d'une étude phytochimique **(2)**, a également été testée sur ces souches dans les mêmes conditions que précédemment sans aucune activité observée ; cela pourrait être imputable soit à l'insolubilité de ce produit dans l'eau, soit au fait que la bergénine ne représenterait pas le principe actif à la base de l'activité antibactérienne de l'extrait de SG, ou soit, à la température et à la durée de conservation de la bergénine ou bien encore au fait que les extraits constituent des totums qui agissent en synergie.

Commentaire [PK9]: Cette références est elle la bonne ? A revoir ?

En effet, la bergénine étant le composé majoritaire de l'extrait de *Sacoglottis gabonensis* (**Patel et al**) (**35**) agirait en synergie avec les tanins et les polyphénols selon **Paris et Hurabeille**, soutenu par **Bruneton**, (**34,7**).

III- DETERMINATION DES TAUX DE RESISTANCE DE *MYCOBACTERIUM ULCERANS* (HUMIRIACEAE)

Toutes les cinq souches de *Mycobacterium ulcerans* testées ont été sensibles à l'extrait aqueux de *Sacoglottis gabonensis* selon une relation dose-effet; cela s'est traduit par une diminution progressive du nombre de survivants au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration de l'extrait.

Cet effet inhibiteur de croissance de *Sacoglottis gabonensis* s'est accru à partir de la concentration de 20 mg/ml. En effet, les résultats obtenus à partir de cette concentration montrent qu'aucune souche de *Mycobacterium ulcerans* n'a survécu. Cette observation suggère que cette plante contiendrait des substances qui inhiberaient les mycobactéries. Ceci justifierait l'utilisation de la plante en milieu traditionnel dans le traitement de plusieurs autres pathologies.

Ce résultat est relativement meilleur que celui de **Coulibaly Bakary et al** (**9**) qui ont évalué l'activité in vitro des extraits *Phyllanthus amarus* sur des souches de *Mycobacterium ulcerans* avec une CMI de 32 mg/ml.

Cette activité de *Sacoglottis gabonensis* pourrait s'expliquer par la présence dans l'extrait aqueux de groupes chimiques tels les stéroïdes, polyterpènes, polyphénols, flavonoïdes, tanins catéchiques, saponosides

et les alcaloïdes qui ont été antérieurement isolés par **Mama Koné et al** lors d'une étude phytochimique (28).

En effet, les tanins sont reconnus pour leurs effets antiseptiques et leurs propriétés de renouvellement des tissus selon **Kerharo et Adam et Bruneton (22,7)** ce qui pourrait justifier l'utilisation de cette plante pour le traitement de l'ulcère de Buruli.

Quant à l'activité antibactérienne, elle serait due à l'action concomitante de la présence des tanins, des polyphénols et des alcaloïdes (**Paris et Hurabeille; Bruneton) (6, 32)**.

Par contre ce résultat est différent de celui de **Koné et al (23)** qui trouvaient une concentration efficace de 0,78 mg/ml. Plusieurs facteurs pourraient expliquer cette différence. En effet, selon **Sofowora A., (42)** la composition d'une plante en métabolites secondaires varie en fonction de la situation géographique, de l'organe prélevé, de la période, du moment de prélèvement et des conditions de stockage. Selon cet auteur, ces métabolites secondaires sont responsables des propriétés bioactives des plantes.

En ce qui concerne la concentration 10 mg/ml de l'extrait, les taux de résistance varient d'une souche à une autre et d'une dilution à une autre.

En effet, la souche CNR012 diluée au 1/10^e et 1/100^e est sensible à la concentration C₁ = 10 mg/ml de l'extrait de SG avec respectivement des taux de résistance de 0,37 et 0,40 mais résistante à la dilution 1/1000^e.

Les dilutions 1/10^e et 1/1000^e de la souche 13/21 sont résistantes à l'extrait à la concentration C₁= 10 mg/ml, seule la dilution 1/100 est sensible avec un taux de résistance de 0,55.

La souche CNR006 s'est montrée sensible aux dilutions 1/10^e et 1/100^e à la concentration C₁ = 10 mg/ml de l'extrait avec des taux de résistance de 0,88 et 0,93.

La souche CNR008 est sensible uniquement à la dilution 1/10^e à la concentration de C₁= 10 mg/ml de l'extrait contrairement à la souche 13/29 qui est résistante à cette dilution.

Ces variations pourraient trouver leur explication dans d'éventuelles contaminations lors des manipulations au laboratoire ou mutations génétiques des souches. En effet, plusieurs auteurs en l'occurrence **Abloordey A. et al** et **Chemlal K. et al** se sont basés sur ces variations génétiques pour classer les souches de *M. ulcerans* en fonction de leurs régions géographiques **(1, 8)**.

Les antibiotiques testés, c'est-à-dire la rifampicine, la streptomycine et l'ofloxacine ont tous été actifs sur les cinq souches à l'exception de la souche 13/29 qui a présenté une résistance et cela à la dilution 1/1000^e pour les trois antibiotiques. Ces trois antibiotiques ont tous été actifs à des concentrations respectivement de 0,04 mg/ml ; 0,4 mg/ml et 0,2 mg/ml.

Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues avec l'extrait aqueux de *Sacoglottis gabonensis*. En effet plusieurs travaux réalisés par des auteurs tels que **Yemoa A. et al** et **Abloordey A. et al** sur l'activité anti-infectieuse des plantes médicinales ont prouvé que l'activité des extraits totaux peut être améliorée par le fractionnement à l'aide des techniques chromatographiques qui permettent de cibler les fractions actives **(4,1)**.

CONCLUSION

Dans l'objectif de mettre au point des formulations pour le traitement par voie locale de l'ulcère de Buruli, notre étude qui est la première étape de préformulation, s'est proposée d'évaluer in vitro l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de *Sacoglottis gabonensis* sur des souches de Staphylocoque, de Pseudomonas, d'Escherichia et de *Mycobacterium ulcerans*.

L'extrait de SG a une action bactéricide sur deux des trois souches de staphylocoque (souche 122c/11 et 292c/13) avec des CMI et CMB respectivement de 3,125 mg/ml et de 12,5 mg/ml et une activité bactériostatique sur la souche 1393c/13 de staphylocoque avec une CMI de 25 mg/ml et une CMB de 100 mg/ml et la souche 1089c/12 de *Escherichia coli* avec une CMI de 6,25 mg/ml et une CMB de 50 mg/ml.

L'activité a également été démontrée sur toutes les cinq souches de *Mycobacterium ulcerans* étudiées avec des taux de résistance inférieurs à 1 à partir de la concentration de 20 mg/ml.

Sur la base de ces résultats, nous pourrions déterminer la dose d'extrait à introduire dans les formes galéniques à mettre au point.

Commentaire [PK10]: Il faut préciser les valeurs actives, les CMI et CMB

PERSPECTIVES

Les résultats préliminaires obtenus montrent que l'extrait aqueux testé témoigne d'une activité antibactérienne *in-vitro* de l'écorce du tronc de *Sacoglottis gabonensis*. D'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

1- Vu l'intérêt suscité par l'activité *in-vitro* de *Sacoglottis gabonensis*, nous envisageons élucider ses principes actifs. Il convient, en effet, d'identifier chez cette plante les molécules responsables de l'activité biologique, de la toxicité *in-vivo* sur des souris. Si ces produits sont différents des principes actifs, leur élimination peut permettre d'exploiter cette plante à des fins médicinales, en utilisant soit l'extrait purifié, soit des drogues semi-synthétiques à partir de ses principes actifs purs.

2- Partant du fait qu'une substance pouvant être très active *in-vitro*, peut perdre cette activité une fois pénétrée dans le corps, une étude *in-vivo* serait souhaitable, afin d'obtenir une vue globale sur l'activité antibactérienne de cet extrait.

3- Incorporer cet extrait dans des formulations directement utilisables par voie cutanée et présentant les propriétés suivantes :

- Adhérer sur la peau et les muqueuses pour éviter l'écoulement et créer un pansement occlusif ;
- Libérer de manière prolongée les substances actives ;
- Bien tolérer par les muqueuses ;
- Efficaces à tous les stades de l'évolution de l'ulcère de Buruli.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1- Abloordey A, Kotlowski R., Swings J. et Portaels F.

PCR amplification with primers based on IS2404 and GC- Rich reaped sequence reveals polymorphism in *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Micro*, 2005; 43:448-451.

2- Aka Any-Grah S. Koffi A.A, Dally I., N'Guessana, N'guessan c, Guei L., Kablan L., Dade J., Agnely F.

Formulation hydrogel à base de *Sacoglottis gabonensis* *J sci pharm biol* 2014;15, 1.

3- Ahoua L.

Prise en charge de l'ulcère de Buruli. Médicaments disponibles : perspectives. Genève : Epicentres, 2004, 29p

4- Asiedu k et Portaels F

Introduction. In : Asiedu K, Scherpbier R, Raviglione M (Eds), *Ulcère de Buruli. Infection à Mycobacterium ulcerans*. Organisation mondiale de la Santé, 2000, 5-7.

5- Asiedu K., Raviglione M.C., Scherpier R.

Ulcère de Buruli. *Infection à Mycobacterium ulcerans*. Genève : OMS, 2000 : 118p

6- Bérubé-Gagnon J.

Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Piceamariana*. Mémoire de Maîtrise en Ressources renouvelables. Université du Québec à Chicoutimi. 2000, 76p

7- Bruneton J.

Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. Paris, Ed .2, *Lavoisier*, 1993.895p.

8- Chemlal K., De Ridder K., Fonteyne P. A., Meyers W. M., Swings J. et Portels F.

The use of IS 2404 restriction fragment length polymorphisms suggests the diversity of *Mycobacterium ulcerans* from different geographical areas. *Am J Trop Med Hyg*, 2001; 64: 270-273.

9- Coulibaly B., N'guessan KR., Aka N., Ekaza E., N'golo DC., Trébissou N., Ouattara L., BAH C., Coulibaly A., Assandé JM., Mohui P., Yao H., Djaman AJ. et Dosso M.

Activité anti-mycobactérienne *in vitro* des extraits de *Phyllanthus amarus* (Schum et Thonn) sur les souches de *Mycobacterium ulcerans* en Côte d'Ivoire. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 2011 ; 80: 759 – 771

10- Dobos K., Small P., Deslauriers M. et al.

Mycobacterium ulcerans cytotoxicity in an adipose cell model.

Infect Immun. 2001; 69: 7182-7186

11- Dosso M. & Faye-kette H.

Contrôle de qualité de l'antibiogramme en pratique Courante : Expérience du laboratoire de bactériologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. *Bactériolo int*, n° spécial: 2000, 53p.

12 -Fauchere I. L & Avril J. L.

Bactériologie générale et médicale. *Editions Ellipses*. 2002, 122p.

13-Fernique Konan

Activite antibacterienne sur les enterobacteries productrices de beta-lactamases a spectre élargi, et potentiel antioxydant in vitro de *Terminalia glaucescens* Planch ex Benth. (combretaceae), une plante médicinale ouest-africaine, 11 Avril 2015 thèse en microbiologie 123p

**14- Fernique Konan K., Nathalie K. Guessennd, K. R. Oussou K. R.,
Calixte Bahi, Coulibaly A., Djaman A.J., Dosso M.**

Effet antibactérien de l'extrait aqueux de l'écorce de *Terminalia glaucescens* Planch ex Benth (Combretaceae) sur la croissance *in-vitro* des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (EBLSE)

Int. J. Biol. Chem. Sci. 8(3): 1192-1201, June 2014

15- Gomez A., Mve-Obiang A., Vray B. et al.

Detection of phospholipase C in nontuberculous mycobacteria and its possible role in hemolytic activity. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1396-1401

16- Guei-Monin Gabrielle Marie Love Emeraude,

Mise au point d'un hydrogel à base de *Sacoglottis gabonensis* pour le traitement de l'ulcère de Burili, 2013, thèse en pharmacie galénique 96p

17- <https://fr.wikipedia.org/wiki/mycobacterium> (MYCOBACTERIES mise à jour: 21-12-2006) (consulté le 21-06-2013)

18- Johnson R.C., Makoutode M., Hougnihin R. et al.

Traditional treatment for Buruli ulcer in Benin, *Med Trop.* 2004; 64 (2) : 145-150

19- Kanga J.M., Kacou E.D. et al

La lutte contre l'ulcère de Buruli : expérience de la Côte d'Ivoire. Rev.2005; 120 p

20- Kanga J.M.

Projet de création d'un comité national de lutte contre les ulcères à mycobactéries. Abidjan : CHU de Treichville, 1995.12 p

21- Kanga J.M., Kacou E., Kassi E. et al.

L'ulcère de Buruli : aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques en Côte d'Ivoire. *Med. Trop.*, 2004 ; 64 :238-242

22- Kerharo J. & Adam J.G.

La pharmacopée sénégalaise traditionnelle: plantes médicinales et toxiques. *Edition Vigot Frère*, Paris, 1974 ; 343-345

23- Kone M., Vangah-Mandah O.M., Kouakou H. et al.

Influence de *Sacoglottis gabonensis* (baille) urban et de *Okoubak aubrevillei* normand et *pellegrin* sur la croissance in vitro de *Mycobacterium ulcerans*. *Med Afr Noire*; 2007 ; 54 (11) : 549-554

24- Lemmens, R.H.M.J., Loupe, D. et Oteng-Moako.A.A.

Bois d'œuvre 2, volume 2, 633-636

25- Lia J.

Etude ethnobotanique de drogues utilisées pour le traitement de l'ulcère de Buruli à Abidjan. Mém. UFR SPB, 2010 DEA.

26- Lucas, F., Radomski, N., Moulin, L., Haenn, S., Betelli, L., et Cambau, E.

Détection des mycobactéries non tuberculeuses dans l'eau. *In Journée de veille sanitaire INVS*, 2008, 212p

27- Maccallum P.

A New *Mycobacterium* in man. Clinical aspects.

Journal of Pathology and Bacteriology.1948;60:93-122

28- Mama K., Nahounou M., Bleyere, Angoué PY., Madeleine OV. et Ehouan EE.

Evaluation de la toxicité d'un extrait aqueux de *Sacoglottis gabonensis* (Baille) Urban (Humiriaceae) chez les rongeurs, une plante utilisée dans le traitement de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 2009; 3(6): 1286-1296

29- Marston B.J.

Emergence of Buruli ulcer disease in the Daloa region of Côte d'Ivoire.

Am J Trop Med Hyg.1995; 52: 219-224

30- Mougin B.

L'ulcère de buruli en pays tropical, état des lieux : Pathologie exotique et des voyages. Toulouse, Mem DU, 2009.52p

31- Mve-Obiang A., Lee R., Portaels F. et al.

Heterogeneity of mycolactones produced by clinical isolates of *Mycobacterium ulcerans*: implications for virulence.

Infect Immun. 2003; 71: 774-783

32- Nyström B., Walderhang H.

Dynamic viscoelasticity of an aqueous system of a Poly (ethylene oxide)-Poly(propylene oxide) triblock copolymers during gelation. *J. Phys. Chem.* 1996; 100: 5433-5439

33- OMS. Genève

Recommandations provisoires pour certains antibiotiques dans la prise en charge de l'infection à *Mycobacterium ulcerans* (ulcère de buruli).

Genève : OMS. 2004 ; 33p

34- Paris M. & Hurabeille M.

Abregé de matière médicale. Pharmacognosie Tome 1 Généralité monographie. *Edition Masson*, Paris, 1981 ; 339p.

35- Patel DK, Patel K, Kumar R et al

Pharmacological and analytical aspects of bergerin: A concise report. *Asian Pacif. J. Trop. Dis.* 2012 ; 163-167.

36- Pharmacopée européenne 6.0

37- Pierre A, Bernard-Alex G.

Traitement de l'infection à mycobacterium ulcerans (ulcère de Buruli)
OMS, Avril 2012 66p (Mise à jour le 08/10/2015)

38- Ponce A.G., Fritz R., Del Alle C. & Roura S.I.

Antimicrobial activity of essential oil on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologic*, 2003; 36: 679-684.

39- Richard B, Jean-Pierre B, Francois C, Vincent C, Hubert C, Patrice C, Luc D, Vincent J, Thierry L, Agnes L, Audrey M, Marie-Helene N, Patrick P, Marie-Cecile P, Claude-James S, Emmanuelles V, Philippe W,

Europeen comittee on antimicrobial susceptibility testing / Comite de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, Edition Juillet. 2015; 117p.

40- Schmelwer, G.H et Gurib-Fakim A.

Ressources végétales de l'Afrique tropicale 11(1). *Prota Plantes médicinales* 1 : 550-554p

41- Snyder D., SMALL P.

Uptake and cellular actions of mycolactone, a virulence determinant for *Mycobacterium ulcerans*. *Microb Pathog.* 2003; 34: 91-101

42- Sofowora A.

Plantes Médicinales et Médecine Traditionnelle d'Afrique. Ed.
Kartaland; 1996; 378p.

43- The Uganda Buruli Group. Kampala

Clinical features and treatment of pre-ulcerative Buruli lesions
(*Mycobacterium ulcerans* infection): Report 2 *British Medical journal*.
1970;2:390-393

44- WHO. Genève.

Aide-mémoire N°199, mis à jour en Mars 2007. WHO. (Consulté le 20
Novembre 2013) [www.ongcoeursensibe.org/L'ULCERE DE BURILI.html](http://www.ongcoeursensibe.org/L'ULCERE_DE_BURILI.html)

45- WHO: Infection à *Mycobacterium ulcerans*

Aide-mémoire n°199 mis à jour en Juin 2013
www.who.int/mediacentre/factsheets/fs199/fr/index.html (consulté le
20/11/2013)

46- Yemoa A.L., Gbenou J.D., Johnson R.C. et al.

Identification et étude phytochimique de plantes utilisées dans le traitement
traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin. *Ethnopharmacologia*. 2008; 42 :
48-55

RESUME

L'ulcère de Buruli est une maladie infectieuse qui aboutit à de vastes délabrements cutanés chroniques provoqués par *Mycobacterium ulcerans*.

En effet, cette maladie entraîne une destruction étendue de la peau et des tissus mous avec formation d'ulcères de grandes dimensions pouvant aboutir en l'absence de traitement à des incapacités fonctionnelles durables.

L'ulcère de Buruli a été signalé dans 33 pays africains dont la Côte d'Ivoire qui reste le pays le plus touché avec 2500 cas par an.

Le traitement actuel recommandé par l'OMS présente l'inconvénient de ne pas pouvoir se faire en ambulatoire, mais plutôt dans des centres spécialisés qui sont rares et le plus souvent inaccessibles aux malades vu le coût élevé des frais d'hospitalisation.

Cet inconvénient amène la plupart des malades à se tourner vers le traitement traditionnel qui utilise certaines plantes telles que *Sacoglottis gabonensis* sous forme de décoctés ou de poudre. Cependant, les modes d'utilisation de ces plantes sont non reproductibles et non aseptiques.

Il se pose alors pour ces deux types de traitement un problème d'efficacité de la prise en charge de l'ulcère de Buruli. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude qui vise à améliorer la prise en charge de l'ulcère de Buruli par l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de *Sacoglottis gabonensis* sur quelques germes qui surinfectent l'ulcère et sur *Mycobacterium ulcerans*, l'agent causale.

Nos travaux se sont déroulés au laboratoire de pharmacie galénique à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, à l'Institut Pasteur de Cocody puis d'Adiopodoumé.

Nous avons procédé à l'identification de la plante, à la préparation de l'extrait aqueux et à sa caractérisation physico-chimique. Ensuite, nous avons évalué l'activité antimicrobienne sur des souches de Staphylocoque, de Pseudomonas, d'*Escherichia coli* sur gélose de Mueller Hinton en boîte de Petri, et sur *Mycobacterium ulcerans* qui a nécessité l'incorporation de l'extrait de *Sacoglottis gabonensis* au milieu de Lowenstein-Jensen.

Les résultats obtenus montrent que :

- La solubilité de la poudre d'extrait sec à 27°C était de 5,5 g/l. Le pH était de 4,5 à 24,3°C, le taux d'humidité était de 9 % et la granulométrie inférieure à 0,08 mm.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures le test de stérilité a révélé un extrait stérile.

- l'extrait de *Sacoglottis gabonensis* a une action bactéricide vis-à-vis des souches 122c/11 et 292c/13 de Staphylocoque et bactériostatique sur la souche 1393c/13 de Staphylocoque puis sur la seule souche d'*Escherichia coli* testée (1089c/12).

L'extrait a été actif sur toutes les 5 souches de *Mycobacterium ulcerans* soumises à notre étude avec un taux de résistance inférieur à 1 à partir de la concentration 20 mg/ml en *Sacoglottis gabonensis*.

Ce travail n'est que l'ébauche d'un axe de recherche, il mériterait d'être approfondi pour une utilisation médicinale efficace de l'extrait aqueux de *Sacoglottis gabonensis*.

Mots clés: Préformulation, Gel, *Mycobacterium ulcerans*, in vitro, *Sacoglottis gabonensis*