

Evaluation de l'activité antibactérienne, de sa sélectivité d'action et de la toxicité des extraits des racines de *Chrysopogon nigritanus* (Benth.) Veldkamp (1999)

Evaluation of the antibacterial activity, selectivity of action and toxicity of extracts from the roots of *Chrysopogon nigritanus* (Benth.) Veldkamp (1999).

Yolie K. YASOMBE^{1,2}, Merveille S. BOLIKANGO¹, Lionel S. ASAMBOA^{1,2,3}, Josué M. MBOBO^{1,2}, Jean-Marie K. KIJJI^{1,2}, Aimée A. OKITO¹, Marie-Claire D. YANDJU¹ & Odette N. KABENA^{1,2,4}

¹Mention Life Science, Faculty of Science and Technology, University of Kinshasa, P.O. Box 190, Kinshasa XI, DR Congo ;

²Laboratory of Microbiology Applied to Biological and Natural Resources, University of Kinshasa, P.O. Box 190, Kinshasa XI, DR Congo ;

³Center of Excellence for Chemical, Biological, Radiological, and Nuclear (CoE-CBRN), Ministry of Higher Education, Universities, Scientific Research, and Innovation, DR Congo ;

⁴National Committee for Protection against Ionizing Radiation (CNPRI), Ministry of Higher Education, Universities, Scientific Research, and Innovation, DR Congo.

RESUME:

En RD Congo, la survenue des résistances bactériennes contraint à chercher des alternatives thérapeutiques dans la pharmacopée traditionnelle. Cette recherche concerne l'activité antibactérienne, la sélectivité et le niveau de sécurité biologique des extraits racinaires de *Chrysopogon nigritanus*, appelé localement « Ngongoli ». Le dépistage phytochimique met en évidence une concentration élevée en composés phénoliques, flavonoïdes, anthocyanes et tanins qui sont les agents actifs antibactériens. Les tests de biosécurité montrent une faible cytotoxicité *in vitro* ($IC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ sur cellules Vero) et pas de létalité *in vivo* chez le rat ($DL_{50} > 2000 \text{mg/kg}$), bien qu'une dose élevée unique entraîne une cytolysse hépatique légère. Ces résultats préliminaires de toxicologie confirment que la plante est sûre pour une application topique. Ce travail ouvre donc la voie pour le développement d'une formulation gynécologique locale, sûre et économique.

Mots clés : *Chrysopogon nigritanus*, Infection urinaire, Indice de sélectivité, cytotoxicité, toxicité aigüe, antibactérien, infection urinaire et *Lactobacillus*.

ABSTRACT :

In the DR Congo, the development of bacterial resistance has forced a quest for therapeutic alternatives among the conventional drugs. This research focuses on the antibacterial potency, selectivity and biosafety of roots extracts from *Chrysopogon nigritanus*, known as "Ngongoli" in local. Phytochemical screening indicates a high amount of phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and tannins the active antibacterial agent. Biosafety assays indicate a low cytotoxicity *in vitro* ($IC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ on Vero cells) and absence of lethality *in vivo* in rats ($LD_{50} > 2000 \text{mg/kg}$), but a single high dose provokes mild hepatic cytolysis. These initial toxicology results support the use of the plant for topical application. This work thus facilitates the production of an economical, safe and locally delivered gynecological preparation.

Keywords: *Chrysopogon nigritanus*, urinary tract infection, selectivity index, cytotoxicity, acute toxicity, antibacterial, urinary tract infection and *Lactobacillus*

*Adresse des Auteur(s)

Yolie K. YASOMBE, Mention Life Science, Faculty of Science and Technology, University of Kinshasa, P.O. Box 190, Kinshasa XI & Laboratory of Microbiology Applied to Biological and Natural Resources, University of Kinshasa, P.O. Box 190, Kinshasa XI, DR Congo ;

E-mail : yasombeyolie@gmail.com

Tél : +243820812832.

Merveille S. BOLIKANGO, Mention Life Science, Faculty of Science and Technology, University of Kinshasa, P.O. Box 190, Kinshasa XI, DR Congo ;

Lionel S. ASAMBOA, Mention Life Science, Faculty of Science and Technology, University of Kinshasa, P.O. Box 190, Kinshasa XI, Laboratory of Microbiology Applied to Biological and Natural Resources, University of Kinshasa, P.O. Box 190, Kinshasa XI & Center of Excellence for Chemical, Biological, Radiological, and Nuclear (CoE-CBRN), Ministry of Higher Education, Universities, Scientific Research, and Innovation, DR Congo ;

Josué M. MBOBO, Mention Life Science, Faculty of Science and Technology, University of Kinshasa, P.O. Box 190, Kinshasa XI & Laboratory of Microbiology Applied to Biological and Natural Resources, University of Kinshasa, P.O. Box 190, Kinshasa XI, DR Congo ;

Jean-Marie K. KIJJI, Mention Life Science, Faculty of Science and Technology, University of Kinshasa, P.O. Box 190, Kinshasa XI & Laboratory of Microbiology Applied to Biological and Natural Resources, University of Kinshasa, P.O. Box 190, Kinshasa XI, DR Congo ;

Aimée A. OKITO, Mention Life Science, Faculty of Science and Technology, University of Kinshasa, P.O. Box 190, Kinshasa XI, DR Congo ;

Marie-Claire D. YANDJU, Mention Life Science, Faculty of Science and Technology, University of Kinshasa, P.O. Box 190, Kinshasa XI, DR Congo ;

Odette N. KABENA, Mention Life Science, Faculty of Science and Technology, University of Kinshasa, P.O. Box 190, Kinshasa XI, Laboratory of Microbiology Applied to Biological and Natural Resources, University of Kinshasa, P.O. Box 190, Kinshasa XI & National Committee for Protection against Ionizing Radiation (CNPRI), Ministry of Higher Education, Universities, Scientific Research, and Innovation, DR Congo ;

I. INTRODUCTION

Les infections bactériennes des voies urinaires (IBU) constituent une préoccupation majeure de santé publique à

l'échelle mondiale et 50-60% des femmes en sont affectées au cours de leur vie (Medina & Castillo-Pino, 2019). D'origine principalement *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Pseudomonas aeruginosa*, leur traitement est aujourd'hui compromis par une dissémination mondiale de souches multi-résistantes qui expose les patientes à des complications sévères telle que la pyélonéphrite (Mancuso et al., 2023). Considérant cet échec thérapeutique mondial, l'identification de nouvelles molécules provenant des pharmacopées traditionnelles apparaît comme une priorité sanitaire.

Parmi les produits végétaux les plus prometteurs, *Chrysopogon nigritanus* est utilisé dans le monde, particulièrement en Afrique pour le traitement des infections urinaires, le nettoyage du système reproducteur en post-partum et divers problèmes de reproduction (Diop et al., 2025 et Semde et al., 2017).

Toutefois, cette utilisation repose encore sur des connaissances empiriques dans la plupart des cas peu étayées par des preuves scientifiques rigoureuses au niveau local et international. En outre, son effet sur la sélection bactérienne doit être clarifié : une action non spécifique pourrait induire la destruction des bactéries protectrices de la flore vaginale (*Lactobacillus spp.*) et favoriser la récurrence (Rupé et al., 2018).

Bien que l'application traditionnelle de *Chrysopogon nigritanus* en post-partum soit répandue (Diop et al., 2025), son innocuité doit être encore prouvée. Bien que les composés bioactifs d'une plante peuvent exercer des effets cytotoxiques sur les cellules épithéliales (Somaïda et al., 2020), mais ils ne suffisent pas pour prédire les effets systémiques réels. En effet, certains métabolites secondaires ne montrent leur toxicité, hépatique ou rénale notamment, qu'après bioactivation dans l'organisme (Irie-N'guessan et al., 2019). Par conséquent, une étude in vivo sur modèle animal est essentielle pour confirmer la sécurité métabolique de cet extrait avant toute extrapolation clinique.

Pour répondre à ces questions, nous avons adopté une approche multi-échelle afin d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits des racines de *C. nigritanus*, la sélectivité de son action sur les souches commensales, ainsi que sa sécurité. Nous postulons que l'extrait de cette plante, utilisée de façon traditionnelle en RDC, a une activité bactéricide sur les pathogènes urinaires et ne nuit pas à la population de la flore bénéfique, tout en ayant un profil de faible toxicité. Le but ultime est d'apporter une validation scientifique de cette utilisation traditionnelle omniprésente dans le monde par la démonstration de son efficacité thérapeutique et sécurité cellulaire, hépatique et rénale.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel biologique

II.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des racines de *Chrysopogon nigritanus* achetés déjà sèches au marché de Zigida en provenance du Kongo central en la période de mars 2026 (République Démocratique du Congo). La plante a été identifiée et authentifiée par le Professeur botaniste Bikandu au sein de l'Herbarium de la mention de Sciences de la Vie (Faculté des Sciences et Technologies, Université de Kinshasa) sous le numéro d'herbier Breyne H. 5243. La réalisation du présent travail a nécessité 1000 g des racines sèches de ladite plante.

II.1.2. Matériel animal

Cellules Vero

La lignée cellulaire utilisée dans cette étude provient du Laboratoire Vétérinaire de Kinshasa notamment les cellules Vero. Les cellules congelées à -80 °C ont été dégelées et propagées en culture dans des boîtes spécialisées "Falcon" contenant 5 ml de DMEM complet (Volume approprié pour BD Falcons de 12,5 cm de surface) avec 10% (v/v) de sérum de veau fatal décomplémenté renfermant les nutriments nécessaires à leur croissance et 1% (v/v) de Pénicilline et Streptomycine pour prévenir une éventuelle contamination bactérienne ou fongique.

Rats wistar

Figure 1 : Rats Wistar albinos



La population ayant servi à l'étude expérimentale était constituée de 15 rats femelles de souche Wistar provenant de l'animalerie de l'Institut Nationale de Recherche Biomédicale (INRB). Leur sélection reposait sur les critères d'inclusion suivant : avoir 6 semaines d'âge au minimum, ne

pas présenter des signes de malformation physique, être nullipare, non gestante et avoir un poids compris entre 150 et 200g. Il s'en est suivi une acclimatation des rats aux conditions du laboratoire (12h de lumière, 12h d'obscurité, température 25 °C) pendant 7 jours puis une répartition en 5 lots de 3 animaux. Ces derniers ont été privés de nourriture 24h avant l'administration de l'extrait par gavage.

Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées dans le strict respect des standards internationaux de protection animale et des recommandations ARRIVE 2.0 relatives au soin et à l'utilisation des animaux de laboratoire pour la recherche impliquant des animaux. Le protocole a été approuvé éthiquement par le comité d'éthique approprié de l'INRB (Institut National de Recherche Biomédicale).

Ces procédures sont en accord avec les principes éthiques internationaux reconnus pour la recherche en animaux expérimentaux, qui cherchent à minimiser la souffrance de l'animal tout en assurant la rigueur scientifique (Eggel *et al.*, 2025)

II.1.3. Matériel microbiologique

Il était constitué de cinq souches cliniques multi résistantes isolées des urines des patientes à savoir *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Lactobacillus spp.* fournies par le Laboratoire de Bactériologie des Cliniques Universitaires de Kinshasa (CUK).

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation et conditionnement des échantillons

Les racines de la plante achetées déjà sèches en la période de mars 2026 ont été broyées à l'aide d'un broyeur et tamisé avec un tamis de marque USA Standard Testing Sieve de 1 mm de diamètre en vue d'obtenir une poudre fine de granulométrie égale à ± 1 mm. La poudre obtenue a été conservée dans un récipient en verre.

Les différentes analyses ont été réalisées concomitamment au Laboratoire de Microbiologie Appliquée aux Ressources Naturelles et Biologiques et au Laboratoire d'Analyse et de Recherche sur l'Alimentation et la Nutrition, tous logés à la Faculté des Sciences et Technologies, précisément au Département de Sciences de la Vie à l'Université de Kinshasa ; au Laboratoire Vétérinaire de Kinshasa ainsi qu'à l'Institut National de Recherche Biomédicale.

Pour la préparation des solutions mères des extraits de la plante, ayant servi à l'activité antibactérienne et au test de

viabilité cellulaire nous avons dissous 10 mg d'extrait sec dans 1 mL du mélange diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour l'extrait organique et 1 mL d'eau distillée pour les extraits aqueux (infusé et macérât).

La solution mère des extraits de la plante, ayant servi aux analyses de toxicité a été obtenue par infusion en portant à ébullition pendant 30 minutes, 1 litre d'eau distillée contenant 20g de poudre de racines séchées à l'abri de la lumière. Puis, s'en est suivi une filtration et un séchage à l'étuve (40 °C).

II.2.2. Conditionnement des animaux de laboratoire

• Groupe témoin (groupe 1)

Le groupe témoin (groupe 1) a reçu un régime alimentaire standard de laboratoire sans l'infusion de la plante, dans les mêmes conditions environnementales que les groupes exposés.

• Exposition alimentaire volontaire (groupes 2 à 5)

Les groupes 2, 3, 4 et 5 ont été gavés à des concentrations de 300, 600, 1200 et 2000 mg/kg. Le gavage oral est largement utilisé en toxicologie expérimentale car il permet une administration précise et reproductible de la dose en une seule prise dans l'estomac, indépendamment de la prise alimentaire spontanée ou de l'appétibilité. Cette méthode est considérée comme la référence pour l'administration orale contrôlée chez les rongeurs et garantit une exposition homogène entre les sujets expérimentaux (Nga *et al.*, 2020).

II.2.3. Analyse chimique quantitative : Dosage des métabolites secondaires

Les plantes sont une riche source de métabolites secondaires qui ont des propriétés médicinales et aromatiques. Les métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les iridoïdes et les composés phénoliques généralement produits par les plantes pour leurs mécanismes de défense ont été impliqués dans les propriétés thérapeutiques de la plupart des plantes médicinales.

Par conséquent, la quantification de ces métabolites aidera à découvrir de nouveaux médicaments efficaces à partir de sources végétales et également à valider scientifiquement les pratiques traditionnelles existantes (Masengo *et al.*, 2023). La quantification d'un grand groupe de composés phytochimiques tels que les phénoliques et les flavonoïdes est réalisée dans ce contexte.

Evaluation de l'activité antibactérienne, de sa sélectivité ...

• Dosage des polyphénols totaux

Principe

La quantité totale de polyphénols dans nos extraits a été mesurée avec le réactif de Folin-Ciocalteu selon le protocole de Bukatuka *et al.*, (2016).

Mode opératoire

10 mg/mL de chaque extrait ont été dilués dans le méthanol 80% de façon à obtenir une solution de 1 mg/mL pour chaque extrait. Ensuite nous avons préparé pour chaque extrait un mélange réactionnel composé de 0,5 mL d'extrait ; 5,0 mL d'eau distillée et 0,5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu. Après trois minutes, nous avons ajouté 1,0 mL d'une solution saturée de Na_2CO_3 20%. Les mélanges ainsi préparés sont agités et incubés à la température du laboratoire à l'abri de la lumière pendant une heure. Les absorbances sont lues au spectrophotomètre à 725 nm. Chaque dosage a été répété trois fois.

Expression des résultats

Les polyphénols totaux sont exprimés en mg d'équivalent acide gallique (GAE) par g d'extrait sec selon l'équation suivante provenant de la courbe d'étalon :

$$Y = 7,2852x + 0,0581$$

$$R^2 = 0,9922$$

Où X est l'absorbance et Y l'équivalent d'acide gallique (mg/g).

• Dosage des flavonoïdes totaux

Principe

Nous avons estimé la teneur en flavonoïdes totaux de nos extraits en suivant une méthode spectrophotométrique selon le protocole de Mbadiko *et al.*, (2019). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes qui absorbe à 415 nm.

Mode opératoire

Le mélange réactionnel contient 1 mL de la solution méthanolique (80%) de chacun des extraits de concentration 10 mg/mL et 1 mL d' AlCl_3 2% (dissout dans le méthanol) et le tout a été bien agité. Après une heure d'incubation à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière, nous avons mesuré les absorbances au spectrophotomètre à 415 nm. Les mélanges ont été préparés en triplicata pour chaque analyse et la valeur moyenne était retenue. Pour la

préparation du blanc, nous avons opéré de la même façon sauf qu'à la place de l'extrait, 1 mL de méthanol a été mis.

Expression des résultats

La teneur en flavonoïdes des extraits est exprimée en mg équivalent de quercétine (QE)/g d'extrait sec correspondant en utilisant l'équation issue de la droite d'étalonnage :

$$Y = 22,382x - 0,15$$

$$R^2 = 0,9826$$

Où X est absorbance et Y est la teneur en quercétine (mg/g).

• Dosage des anthocyanes

Principe

Nous avons estimé la teneur en anthocyanes totaux de nos extraits en suivant une méthode spectrophotométrique. Le principe repose sur la propriété chromatique des anthocyanes leur couleur change de façon réversible selon l'acidité (pH) du milieu.

Mode opératoire

Le dosage des anthocyanes a été établi d'après Lebreton et coll., (1967). Ils ont été dosés pour leur propriété de changement de couleur liée à l'acidité : ils sont rouges à pH 1,0 et virtuellement incolores à pH 4,5. Procédure De cette façon, deux mélanges sont préparés, incorporant 1 mL d'extrait et 1 mL de solution tampon (pH 1,0 et pH 4,5). Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, les absorbances sont prises à 530 nm (à turbidité 700 nm) en triplicata contre un blanc. La concentration est calculée à partir de la différence d'absorbance (ΔA) entre les deux pH, ce qui permet de capter spécifiquement le signal des anthocyanes des autres substances étrangères.

Expression des résultats

Le milligramme équivalent de D-catéchine par gramme de matière végétale sèche (CE/g) est calculé en utilisant l'équation suivante issue de la droite d'étalonnage :

$$Y = 0,0728x + 0,0171$$

$$R^2 = 0,994$$

Où X est absorbance et Y est l'équivalent de catéchine en (mg/g).

- **Dosage des tanins condensés**

Principe

Nous avons estimé la teneur en tanins condensés de nos extraits par la méthode à la vanilline en milieu acide. Le principe repose sur la capacité de la vanilline à se condenser spécifiquement avec les unités flavan-3-ols et les proanthocyanidols en milieu acide fort. Cette réaction chimique conduit à la formation d'un complexe coloré dont l'intensité de la coloration rouge-rose, mesurée par spectrophotométrie, est proportionnelle à la quantité de tanins présents dans l'échantillon.

Mode opératoire

Cette mesure est prise par le biais de la vanilline 1% préparée en acide sulfurique 70% (Price et al., 1978). Le mélange réactionnel contient 1 mL de l'extrait méthanolique (à 10 mg/mL) auquel on ajoute 2 mL du réactif à la vanilline fraîchement préparé (1 % de vanilline dissoute dans de l'acide sulfurique à 70 %). Le tout est vigoureusement agité. Après une période d'incubation de 15 à 20 minutes à la température du laboratoire (environ 20-25°C) et à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 500 nm. Les analyses sont réalisées en triplicate et la valeur moyenne est retenue. Pour le blanc, on remplace l'extrait par 1 mL de méthanol traité dans les mêmes conditions.

Expression des résultats

La quantité en tanins condensés est calculée d'après la formule :

$$Y = 34,358x - 0,0132$$

$$R^2 = 0,9994$$

Où X est absorbance et Y est l'équivalent de catéchine

II.2.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits de la plante se sont fait par la méthode de micro-dilution en milieu liquide pour la détermination des paramètres d'inhibition selon le protocole proposé par Kabena et al., (2024).

Nous avons utilisé une microplaque stérile en polystyrène de 96 puits de 8 lignes (A-H) et de 12 colonnes (1-12). A l'aide d'une micropipette multicanaux de 100 µL, 100 µL de Bouillon nutritif ont été placés dans tous les puits de la microplaque de A1- A9 jusqu'à E1-D9. Ensuite, à l'aide d'une micropipette de 100 µL, 100 µL de la solution mère de chaque extrait a été introduite dans les puits de la première

colonne (d'A1 à E1) et bien mélangés avec les bouillons par aspirations et rejets successifs dans les microplaques. De cette disposition, des dilutions en cascade de raison deux ont été effectués dans le Bouillon nutritif de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 1000 µg/mL et 1,95 µg/mL (c.à.d. 100 µL du premier puits ont été prélevés et transférés dans le deuxième puits ainsi de suite jusqu'au dixième puits. Les 100 µL du neuvième puits sont éliminés).

Les puits de la colonne 11 ont servis de témoins positifs, à l'aide d'une micropipette multicanaux de 100 µL, 100 µL de Bouillon nutritif ont été placés. Les puits de la colonne 12 quant à elles ont servi de témoins négatifs et à l'aide d'une micropipette multicanaux de 100 µL, 100 µL de la solution mère de l'extrait ont été placés. Enfin, les microplaques seront recouvertes et incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

- **Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Après 24 heures d'incubation, la CMI était lue après ajout dans tous les puits de la microplaque de 4 µL de colorant resazurine (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) de concentration 0.1 mg/mL et incubation de 4 heures à 37°C ; un colorant bleu faiblement fluorescent. Le principe repose sur la capacité des cellules bactériennes vivantes à réduire la Resazurine bleue en Résorufine fluorescent coloré en rose par la succinate déshydrogénase mitochondriale en présence du NADH ou NADPH comme agent réducteur.

Les cellules mortes dépourvues de cette. Enzyme demeurent bleues La CMI est alors lue dans les premiers puits ne présentant aucune croissance bactérienne (Dieye et al., 2021). La croissance dans les puits contenant les extraits est comparée à celle des puits N°11 qui ont servi de contrôle positif de la croissance bactérienne. Le test n'est valide que si l'on observe une croissance acceptable dans ces puits de contrôle. Si la croissance est insuffisante dans ces puits, la microplaque est réincubée et la CMI est lue après 48 heures. Il est à noter que lorsque la CMI est ≤ 250 µg/mL, la drogue est considérée comme active sur la souche bactérienne (Kabena et al., 2024).

- **Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

La CMB a été déterminée en ensemencant en stries sur un milieu solide 10 µL du contenu des puits de la microplaque n'ayant donné aucune croissance bactérienne visible en partant de la CMI. Les boîtes ainsi ensemencées seront incubées pendant 24 heures à 37 °C. La plus faible

concentration à laquelle il n'y a pas croissance dans la subculture sera considérée comme CMB.

• Détermination du caractère bactéricide ou Bactériostatistique des extraits

Le rapport CMB/CMI nous a permis de confirmer le caractère bactéricide ou bactériostatique de la substance concernée (Caron et Boyer, 2019). Lorsque ce rapport est supérieur à 4 mais inférieur à 16, la drogue est dite bactériostatique ; si ce rapport est inférieur ou égal à 4, la drogue est considérée comme bactéricide. Par contre, lorsqu'il est égal à 1, la drogue est dite bactéricide absolue (Caron et Boyer, 2019). Cependant, lorsque ce rapport est égal ou supérieur à 32, les bactéries sont tolérantes à l'extrait (Kabena et al., 2024).

• Détermination de l'indice de sélectivité

La sélectivité antibactérienne des extraits a été évaluée à travers la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des souches pathogènes et commensale. La comparaison de ces paramètres nous a permis d'apprécier la capacité de l'extrait et/ou éliminer préférentiellement les bactéries pathogènes tout en préservant la flore bénéfique (Bagla et al., 2014).

Indice de sélectivité (IS) = CMI *Lactobacillus*/CMI pathogène

Lorsque $IS > 1$ il y a effet sélectif, lorsque qu'il est égal à 1 il n'y a pas de sélectivité tandis que lorsque $IS < 1$ la plante est dangereuse car elle tue plus les bonnes bactéries que les pathogènes.

• Cinétique de croissance de lactobacilles

Pour évaluer la reprise de croissance ou multiplication des *Lactobacilles*, nous avons utilisé une microplaque à 96 puits, dans lequel on a placé différentes concentrations de nos extraits (macérât, infusée et extrait méthanolique) dilués dans le milieu de culture liquide. Chaque puits a ensuite reçu une solution stérile de résazurine (à une concentration finale d'environ 0,01% m/v) ce colorant confère à l'ensemble des puits une teinte bleue homogène, confirmant le caractère oxydé du milieu avant toute réaction métabolique. Nous avons ensuite inoculé chaque puits avec un volume calibré de notre suspension bactérienne de *Lactobacillus spp.* Préalablement standardisée à une opacité de 0,5 sur l'échelle de MacFarland, puis réservés des puits de contrôle contenant du milieu avec résazurine sans extrait (témoin de croissance positive) et des puits sans bactéries (témoin stérile négatif).

L'observation se ensuite fait en deux phases à savoir :

- Incubation et cinétique visuelle précoce (0h – 16h)

Nous avons incubé la microplaque à 37°C. Dès le début de l'incubation et jusqu'à la 16e heure, nous avons effectués des lectures colorimétriques régulières aux temps 0h, 8h et 16h en observant visuellement le changement de couleur. Pendant cette première phase de latence, nous avons observé les premiers signes de réduction de la résazurine. Aux faibles concentrations sub-inhibitrices (comme 3,90 µg/mL et 7,0 µg/mL pour le macérât), la couleur bleu d'origine vire très lentement. Ce changement de teinte montre que le système cellulaire s'ajuste à la pression des composés végétaux, amorçant ainsi ses activités respiratoire et enzymatique.

- Suivi des points d'inflexion et de la reprise de croissance (16h – 48h)

L'incubation a été prolongée avec des suivis précis à 24h et 48h afin de cartographier l'ensemble de la cinétique. A la 24^e h un virage vers la zone violette a mis en évidence une chute de l'activité métabolique. Ce changement de couleur traduit un stress cellulaire maximal ainsi qu'un arrêt temporaire des divisions bactériennes induit par les composés phytochimiques.

Enfin, entre 24h et 48h, nous avons observé la remontée rapide des courbes vers la zone rose fuchsia pour les puits où les bactéries réussissent à surmonter l'inhibition (phase de resuscitation), tout en confirmant l'absence totale de virage (maintien de la couleur bleue) dans les puits contenant des doses bactéricides létales.

II.2.5. Evaluation de la toxicité

• Evaluation de la cytotoxicité sur les cellules Vero

L'évaluation de la viabilité cellulaire par le test à la résazurine est utilisée pour mesurer l'effet des extraits de plante après 24 heures d'exposition. Cette méthode colorimétrique et fluorimétrique permet une quantification rapide, sensible et non destructrice de la prolifération et de la viabilité cellulaire (Petiti et al., 2024).

Les cellules Vero ont été récoltées par trypsinisation le premier jour (J0), puis leur concentration est ajustée à 5×10^4 cellules/mL dans du milieu DMEM complet. À l'aide d'une pipette multicanaux, 100 µL de cette suspension cellulaire ont été déposés dans chaque puits de la rangée A à H d'une plaque de 96 puits. La plaque a été ensuite placée à l'incubateur (37 °C, 5 % CO₂) pendant 24 heures. Ce délai est

crucial pour que les cellules adhèrent fermement au fond du puits et forment un tapis homogène.

Le deuxième jour (J1), nous avons procédé au traitement. Avant de toucher à la plaque contenant les cellules, nous avons préparé la gamme de dilution de l'extrait végétal dans une plaque intermédiaire (plaque de dilution). La rangée A sert de point "Dose Maximale", on a effectué ensuite des dilutions successives de la rangée B jusqu'à la rangée G pour obtenir des concentrations décroissantes. La ligne H a été destinée à un témoin positif pour la cytotoxicité, traitée avec du DMSO en concentration finale de 10 %. Une fois la gamme prête, nous avons récupéré la plaque de cellules de l'incubateur puis récupérer délicatement la totalité du vieux milieu de culture (les 100 µL) de chaque puits en aspirant sur le bord pour ne pas décoller les cellules restées au fond. Immédiatement après, on transfère 100 µL de chaque dilution d'extrait dans les puits correspondants. La rangée H ne reçoit que du milieu neuf (sans extrait) pour servir de témoin de vie (100 % de viabilité). La plaque est remise à l'incubateur pour 24 heures d'exposition. Dans la rangée A, on ajoute 100 µL l'extrait pur (celui qui n'a pas encore été dilué dans ta plaque de dilution). C'est ton point "100% de concentration".

Le troisième jour (J2), on réalise la mesure de viabilité. Sans retirer le milieu cette fois-ci, on ajoute directement 20 µL de solution de résazurine (0,15 mg/mL) dans tous les puits. La plaque est incubée à nouveau pendant 2 à 4 heures. Durant ce temps, les cellules encore vivantes transforment la résazurine bleue en résorufine rose. Enfin, on place la plaque dans le lecteur de microtitrage pour mesurer la fluorescence ou l'absorbance. Les données obtenues permettront de calculer le pourcentage de survie par rapport au témoin de la rangée H et de tracer la courbe pour déterminer la CI₅₀.

$$CV = x = \frac{\text{moyenne des absorbances des extraits}}{\text{moyenne des absorbances du contrôle}} \times 100$$

Une courbe dose-réponse sera tracée afin de permettre le calcul des concentrations nécessaires pour tuer 50 % des cellules Vero/MCF-7 (CI₅₀).

• Evaluation de la toxicité aiguë sur les rats Wistar

La méthode utilisée pour le test de toxicité aiguë est celle décrite par Nga *et al.*, 2020. Elle a permis de tester la toxicité de l'extrait aux doses limites préalablement définies de 300, 600, 1200 et 2000 mg/kg. La répartition des animaux s'est faite au hasard et par la suite, ils ont été marqués et repartis en 5 lots. Chaque lot contenait 3 animaux en fonction de leur poids : 1 lot témoin (gavage à l'eau distillée) et 4 lots tests (gavage aux différentes concentrations de l'extrait aqueux).

Les doses à administrer ont été déterminées par la formule suivante :

$$V = \frac{D \times M}{C}$$

Avec : D comme la dose en mg/Kg ; M la masse des animaux en Kg ; C la concentration de la solution mère en mg/ml et V le volume en ml.

Après administration des différentes solutions mères, l'observation comportementale a été faite après 30 minutes, 2h et 4h. L'observation s'est poursuivie pendant 7 jours. Les animaux ont été pesés tous les jours à la même heure durant l'expérience et ont été sacrifiés par aspiration de l'éther le septième jour.

À la fin de la période expérimentale, le sang a été prélevé par ponction cardiaque sous anesthésie légère. Conformément aux protocoles décrits par Bamimore *et al.*, (2025), une partie du sang a été recueillie dans des tubes secs, puis centrifugée à 3000 tours/min pendant 10 minutes afin d'obtenir le sérum.

The serum prepared in this way was used to determine numerous biochemical variables, including liver enzymes (ALT, AST), renal indicators (urea, creatinine), and total protein and albumin. The analyses were performed using standard commercial kits, according to the manufacturer's instructions, as reported by Ballesteros-Ramírez *et al.* (2024) in toxicological studies using murine models.

II.2.6. Analyse statistique

Les données brutes ont été collectées sur Microsoft Excel avant d'être exportées pour analyse. Tous les tests statistiques ont été réalisés sous le logiciel R version 4.6.0 via son interface RStudio version 2026.05.0+218.

Afin de comparer nos différents groupes expérimentaux, nous avons utilisé une analyse de variance à un facteur, ANOVA, pour l'ensemble de nos analyses. Avant de lancer l'ANOVA, nous avons vérifié ses deux conditions d'application : la normalité des résidus (avec le test de Shapiro-Wilk) et l'homogénéité des variances entre groupes (avec le test de Levene).

Pour les données qui étaient classiquement distribuées de façon asymétrique, une transformation logarithmique en base 10 a été appliquée pour respecter ces deux conditions. Lorsque l'ANOVA révélait un effet significatif du facteur "Extrait", nous avons réalisé un test post hoc de Tukey HSD. Ce test permet d'identifier précisément quelles paires

d'extraits diffèrent entre elles, tout en corrigeant pour les comparaisons multiples.

Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0.05$. Ce seuil de 5% est le standard en sciences : il signifie qu'on accepte 5% de risque de conclure à tort qu'il existe une différence alors qu'en réalité il n'y en a pas.

Les moyennes ont été présentées avec leurs écarts-types et les groupes homogènes ont été indiqués par des lettres différentes selon le test de Tukey.

III. RESULTATS

III.1. Concentration en métabolites secondaires dans la plante

Les résultats du dosage des métabolites secondaires sont consignés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Teneur en métabolites secondaires des extraits, exprimée en mg CE/g, mg GAE/g, mg QE/g et %, (moyenne $\pm$ écart-type)

Extraits	Tanins Condensés mg CE/g	Flavonoïdes totaux (mg QE/g)	Polyphénols totaux (mg GAE/g)	Anthocyane %
Macérât	31,46 $\pm$ 0,48	89,49 $\pm$ 0,11	355,8 $\pm$ 3,96	10 $\pm$ 0,58
Infusée	27,54 $\pm$ 0,16	77,94 $\pm$ 0,18	715,64 $\pm$ 2,48	14,76 $\pm$ 0,60
Extrait méthanolique	38,29 $\pm$ 0,53	74,76 $\pm$ 0,15	774,73 $\pm$ 0,96	8,68 $\pm$ 0,56

Légende

CE/g : Équivalent de catéchine

GAE/g : Equivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec

QE/g : Equivalent de quercétine par gramme d'extrait sec

% : Pourcentage

Les résultats quantitatifs montrent d'importantes différences dans le profil phytochimique de *C. nigritanus* en fonction des méthodes d'extraction. La classe des métabolites la plus abondante est celle des polyphénols totaux indépendamment du type de solvant, cependant, la classe ayant la concentration la plus faible est celle des anthocyanes.

L'extrait méthanolique présente la plus grande activité pour la récupération des composés phénoliques avec les valeurs les plus élevées de polyphénols totaux (774,73 $\pm$ 0,96 mg EAG/g) et de tanins (38,29 $\pm$ 0,53 mg EC/g). En revanche, l'extraction aqueuse par macération est la plus médiocre pour ces classes chimiques avec la plus basse teneur en polyphénols (355,8 $\pm$ 3,96 mg EAG/g).

Une tendance contraire est observée chez les anthocyanes : L'infusée a la plus haute concentration (14,76 $\pm$ 0,60 mg CE/g) suivi par le macérât aqueux (10,00 $\pm$ 0,58 mg CE/g) et l'extrait méthanolique (8,68 $\pm$ 0,56 mg CE/g). La température associée à l'infusion et la polarité élevée de l'eau épuisent la plupart des composés disponibles dans les cellules en causant la dégradation de ses parois ainsi que le transfert dans la matrice aqueuse de ces pigments hydrosolubles.

Ces différences illustrent bien, encore une fois, que le solvant et la température ainsi que la nature chimique de la molécule ciblée ont un rôle essentiel. L'efficacité de l'extrait méthanolique est en accord avec la littérature générale concernant l'extraction des composés polaires. Cependant, nos rendements en polyphénols dépassent largement les valeurs rapportées par Absa Diop, Mareme Thiaw (2026), où la valeur maximum de l'extrait éthanolique (61,905 $\pm$ 4,033 mg EAG/g) était presque neuf fois inférieure au notre.

De plus, à la différence de ce que nous avons observé, ces auteurs mentionnent une rétention des tanins dans des systèmes à polarité faible (hexane : 44,257 mg EC/g). Ces disparités majeures dans les résultats peuvent être attribuées à la provenance géographique du matériel végétal, au stade physiologique de la plante, aux conditions écologiques (ou aux protocoles opératoires). La forte concentration de polyphénols, flavonoïdes et tanins chez *C. nigritanus* expose la richesse de ce dernier en produits phytochimiques. Ces résultats renforcent le potentiel élevé de cette espèce en tant que source de métabolites antibactériens, avec des rendements qui surpassent ceux rapportés pour d'autres monocotylédones médicinales de la région.

III.2. Activité antibactérienne

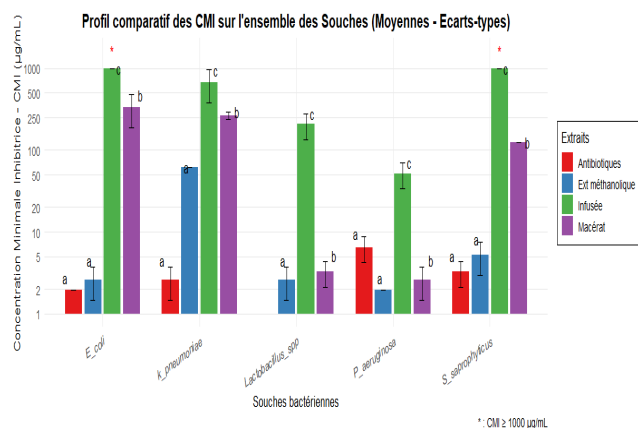
Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI), des concentrations minimales bactéricides (CMB), des rapports CMB/CMI et les indices de sélectivité par les extraits de *Chrysopogon nigritanus* sur les souches *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Lactobacillus spp* ainsi que la cinétique de reprise de croissance de *Lactobacillus spp* après leurs inhibitions sont repris dans les tableaux ci-dessous.

• Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Figure 2 : Concentration minimale inhibitrice des extraits et de l'antibiotique sur cinq souches

La Figure 2 présente les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différents extraits de racines de *Chrysopogon nigritanus* ainsi que celles des antibiotiques de

référence vis-à-vis des cinq souches bactériennes étudiées. L'analyse de variance (ANOVA) a révélé une différence hautement significative entre les traitements ($p < 0,001$), indiquant que l'activité antibactérienne dépend fortement du type de solvant d'extraction.



Le test post-hoc de Tukey montre que l'extrait infusé présente des CMI significativement plus élevées (500 à 1000 µg/mL), traduisant une faible activité antibactérienne. Ce résultat suggère que l'extraction aqueuse à chaud est peu efficace pour solubiliser les composés bioactifs responsables de l'activité antimicrobienne. Plusieurs études récentes confirment que les solvants aqueux extraient principalement des composés très polaires, tandis que les composés antibactériens majeurs (flavonoïdes, alcaloïdes, terpènes) sont mieux extraits par des solvants organiques comme le méthanol ou l'éthanol (Wahyuni et al., 2024 ; Zouine et al., 2024).

À l'inverse, l'extrait méthanolique présente des CMI faibles (1,95 à 7,81 µg/mL) sur *E. coli*, *K. pneumoniae* et *S. saprophyticus*. Ces valeurs indiquent une activité antibactérienne élevée des composés extraits. Selon des travaux récents, les extraits méthanoliques tendent à concentrer davantage de métabolites secondaires actifs, ce qui explique leur efficacité supérieure par rapport aux extraits aqueux (Ngolo et al., 2025).

La littérature récente sur les plantes médicinales montre que la variabilité des résultats antibactériens dépend fortement de la méthode d'extraction, du type de solvant, ainsi que de la composition phytochimique de la plante. Ces facteurs influencent directement la concentration en composés bioactifs et expliquent les différences observées entre les études (Wahyuni et al., 2024).

Concernant *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie connue pour sa forte résistance intrinsèque liée à la faible perméabilité membranaire, aux pompes d'efflux et à la formation de biofilms (Botelho et al., 2021), les extraits méthanolique et

macéré ont présenté des CMI identiques de 1,95 µg/mL. Ces valeurs, inférieures à celles de l'antibiotique de référence, suggèrent la présence de molécules bioactives capables d'agir sur des bactéries multi résistantes, bien que des études mécanistiques soient nécessaires pour confirmer ce potentiel.

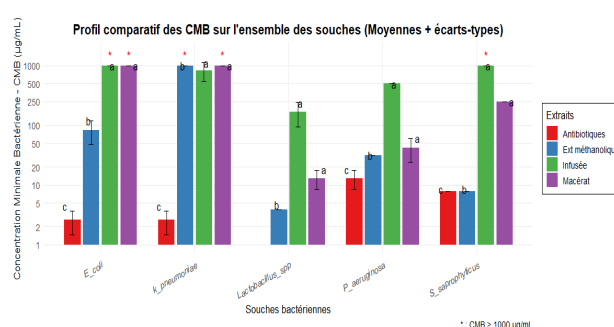
Le *Lactobacillus spp.* a également montré une forte sensibilité aux extraits testés, avec des CMI de 3,25 µg/mL pour le macérât et 2,60 µg/mL pour l'extrait méthanolique. Cette observation est importante car les lactobacilles jouent un rôle central dans le maintien de l'équilibre du microbiote intestinal et vaginal (O'Toole et al., 2020). Ainsi, bien que les extraits présentent une activité antibactérienne intéressante, leur impact potentiel sur les bactéries bénéfiques doit être pris en compte dans une perspective d'application thérapeutique.

Les résultats obtenus montrent que l'activité antibactérienne de *Chrysopogon nigritanus* est fortement influencée par le procédé d'extraction. L'infusé présente une faible efficacité, tandis que l'extrait méthanolique montre une activité plus marquée sur plusieurs souches pathogènes. Selon les critères récents d'évaluation des extraits végétaux, des CMI inférieures à 10 µg/mL traduisent une activité antimicrobienne très forte (Zouine et al., 2024). Dans ce contexte, les valeurs obtenues pour l'extrait méthanolique suggèrent un potentiel pharmacologique intéressant, justifiant des investigations phytochimiques approfondies afin d'identifier les composés responsables de cette activité.

• Concentration minimale bactéricide (CMB)

Figure 3 : Concentration minimale bactéricide des extraits et de l'antibiotique vis-à-vis de cinq souches

La figure 3 présente les concentrations minimales bactéricides des extraits et des antibiotiques vis-à-vis de cinq souches. Le test de l'ANOVA montre une différence globale hautement significative ($p < 0,001$) pour toutes les souches. Le test de Tukey quant à lui révèle que l'extrait méthanolique et le macérât se démarquent de façon statistiquement significative par rapport à l'infusé, qui s'avère incapable d'atteindre une bactéricidie efficace sur la majorité des germes.



Evaluation de l'activité antibactérienne, de sa sélectivité ...

Le test post-hoc de Tukey met en évidence que l'extrait infusé se distingue significativement des autres traitements, avec une absence d'effet bactéricide sur la majorité des souches, même à des concentrations élevées ($\geq 1000 \mu\text{g/mL}$). Cette faible activité des extraits aqueux peut être attribuée à une extraction insuffisante des métabolites secondaires bioactifs, souvent peu solubles dans l'eau. Plusieurs travaux récents montrent en effet que les solvants aqueux présentent une capacité limitée à extraire les composés antimicrobiens lipophiles ou de polarité intermédiaire (Azwanida, 2015 ; Zouine et al., 2024).

À l'inverse, l'extrait méthanolique présente les meilleures performances globales, avec des activités bactéricides observées sur plusieurs souches. Sur *Escherichia coli*, une CMB moyenne de $83,33 \mu\text{g/mL}$ est obtenue, bien que cette valeur reste significativement plus élevée que celle de l'antibiotique de référence ($2,60 \mu\text{g/mL}$), ce qui indique une efficacité bactéricide inférieure mais biologiquement notable.

Sur *Staphylococcus saprophyticus*, la CMB de l'extrait méthanolique ($7,81 \mu\text{g/mL}$) est identique à celle de l'antibiotique témoin, et aucune différence statistiquement significative n'a été observée. Ce résultat suggère une activité bactéricide comparable dans ce modèle expérimental, bien qu'une extrapolation clinique ne soit pas possible sans études pharmacologiques complémentaires.

Sur *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie opportuniste connue pour sa forte résistance intrinsèque liée à sa membrane externe, ses pompes d'efflux et sa capacité de formation de biofilms (Pang et al., 2019), l'extrait méthanolique présente une CMB de $31,25 \mu\text{g/mL}$, contre $13,02 \mu\text{g/mL}$ pour l'antibiotique de référence. Bien que moins performant que l'antibiotique, cet effet bactéricide indique néanmoins la présence de composés actifs capables d'agir sur une bactérie multi résistante.

Concernant *Lactobacillus spp.*, l'extrait méthanolique présente une bonne activité bactéricide à faible concentration ($3,90 \mu\text{g/mL}$), indiquant une forte sensibilité de cette souche commensale face à l'extrait. Cette observation est importante car les lactobacilles jouent un rôle fondamental dans la stabilité des microbiotes vaginal et intestinal (Heczko et al., 2024). Une activité aussi marquée contre ces bactéries bénéfiques suggère que l'usage thérapeutique non ciblé des extraits pourrait entraîner une perturbation du microbiote et une dysbiose potentielle.

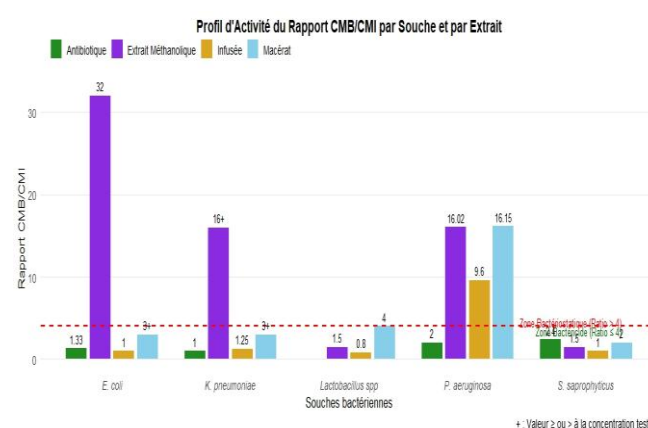
Globalement, les résultats montrent une nette divergence d'activité bactéricide en fonction du solvant d'extraction. Les extraits aqueux présentent une faible efficacité, voire une absence d'effet bactéricide, tandis que les extraits

méthanoliques montrent une activité plus marquée sur plusieurs souches pathogènes. Cette différence peut s'expliquer par la capacité du méthanol à extraire un spectre plus large de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques, fréquemment associés à des effets antimicrobiens (Arya et al., 2025).

Ces résultats soulignent l'importance du type de solvant dans la valorisation du potentiel antibactérien de *Chrysopogon nigritanus*, ainsi que la nécessité d'études complémentaires visant à isoler les molécules actives, à déterminer leur mécanisme d'action et à évaluer leur innocuité.

• Caractère bactéricide ou bactériostatiques des extraits

Figure 4 ; Rapport CMB/CMI de différents extraits sur les cinq souches



Les rapports CMB/CMI de différents extraits des racines de *Chrysopogon nigritanus* à l'encontre des cinq souches bactériennes étudiées sont résumés dans la figure 4. Ce rapport donne une idée qualitative sur la nature de l'effet : un ratio proche de 1 indique généralement une activité bactéricide, tandis qu'un rapport élevé indique que l'effet est plutôt bactériostatique.

Pour les extraits aqueux, le rapport CMB/CMI sont d'environ 1 pour *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus saprophyticus*. Cette situation est due au fait que la CMB et la CMI sont toutes les deux égales à la concentration maximale testée ($1000 \mu\text{g/mL}$). Même si ce profil pouvait être interprété comme un effet bactéricide, une telle interprétation doit être atténuée car ces hautes concentrations représentent une faible efficacité pratique de l'extrait. Cela implique que l'extraction aqueuse ne concentre pas suffisamment les substances bioactives responsables de l'activité antibactérienne.

L'extrait méthanolique est actif, mais avec des rapports CMB/CMI élevés, égal à 32 pour *E. coli* et supérieur à 16

pour *K. pneumoniae*. Ces résultats indiquent une activité généralement bactériostatique, ce qui signifie que les composés extraits peuvent inhiber la croissance bactérienne sans causer la destruction des cellules à de basses concentrations et bien d'avantage dans certains cas. Ce résultat coïncide avec la structure des entérobactéries possédant une membrane externe composée de lipopolysaccharides formant une barrière très peu perméable au passage de nombreuses molécules antimicrobiennes (Silhavy et al., 2015).

Pour *Pseudomonas aeruginosa*, les différents extraits présentent un profil globalement homogène avec des rapports CMB/CMI supérieurs à 4 (variant approximativement de 9,60 à 16,15). Ce comportement suggère une activité majoritairement bactériostatique. Malgré des CMI relativement faibles, la transition vers une activité bactéricide nécessite des concentrations nettement plus élevées. Cette observation est cohérente avec les mécanismes de résistance intrinsèque de cette espèce, notamment la faible perméabilité membranaire et les systèmes d'efflux actifs (Pang et al., 2019).

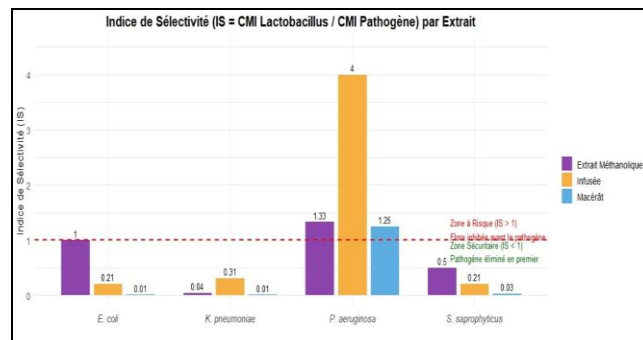
À l'inverse, *Staphylococcus saprophyticus* et *Lactobacillus* spp. présentent une sensibilité plus marquée aux extraits testés. Les rapports CMB/CMI obtenus avec le macérât et l'extrait méthanolique sont généralement inférieurs ou proches de 4 (variant de 1,50 à 4), suggérant une activité bactéricide plus prononcée sur ces souches. Cette sensibilité peut s'expliquer par l'absence de membrane externe chez les bactéries à Gram positif, facilitant la diffusion des composés actifs à travers la paroi de peptidoglycane (Rohde, 2019).

Globalement, ces résultats indiquent que l'activité antibactérienne des extraits de *Chrysopogon nigrifolius* dépend à la fois de la nature du solvant d'extraction et de l'architecture cellulaire des bactéries cibles. Les bactéries Gram négatives, en particulier les entérobactéries, présentent une résistance plus élevée, tandis que les bactéries Gram positives apparaissent plus sensibles aux composés bioactifs extraits, notamment par le méthanol.

• Indice de sélectivité

Figure 5 : Indice de sélectivité des extraits vis-à-vis de différentes souches

La Figure 5 illustre les valeurs des IS des divers extraits de *Chrysopogon nigrifolius* sur les bactéries testées. Cet indice est une bonne estimation pour évaluer la puissance relative d'un extrait à inhiber une souche cible et laisse tout compte fait un certain niveau de sensibilité des bactéries commensales, dans le cas présent, *Lactobacillus* spp.



Parmi les résultats, *Pseudomonas aeruginosa* a les indices de sélectivité les plus élevés. Les valeurs d'IS rapportées pour le macérât (IS = 1,25), pour l'infusé (IS = 4) et l'extrait méthanolique (IS = 1,33) sont supérieures à 1, ce qui signifie que la bactérie est plus sensible que *Lactobacillus* spp. aux extraits. Cette remarque laisse supposer une activité globalement plus sélective pour *P. aeruginosa* que pour les bactéries lactiques. Étant donné la pertinence clinique de cette espèce, considérée comme l'un des principaux agents en cause dans le cadre d'infections nosocomiales et présentant une résistance intrinsèque élevée aux antibiotiques (Botelho et al., 2021 ; Murray et al., 2022), ce résultat apparaît comme étant particulièrement prometteur.

Cette sélectivité pourrait être liée à la capacité des métabolites secondaires à interférer avec certains mécanismes de virulence directement durant les structures de biofilm de *P. aeruginosa*, par exemple dans ses systèmes de quorum sensing ou encore les pompes d'efflux. Ces mécanismes sont aujourd'hui ciblés dans la recherche d'agents antimicrobiens nouveaux issus des plantes (Abass et al., 2024). Les faibles concentrations minimum inhibitrices constatées dans cette étude confirment que les racines de *C. nigrifolius* contiennent des composés bioactifs pouvant affecter ces mécanismes de résistance. Cependant, il est nécessaire de poursuivre les études visant à isoler et à identifier ces composés.

Par contre, les facteurs de sélectivité obtenus pour *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Klebsiella pneumoniae* sont inférieurs à 1. Ces résultats démontrent que les doses nécessaires pour inhibition de ces entérobactéries sont supérieures ou égales à celles pouvant affecter *Lactobacillus* spp. Une sélectivité aussi faible laisse entendre que l'application d'extraits bruts à des doses permettant le contrôle de ces bactéries se traduirait sans doute par des dommages collatéraux chez certaines populations de bactéries bénéfiques.

Cette observation est d'autant plus importante que les lactobacilles jouent un rôle clé dans le maintien de

Evaluation de l'activité antibactérienne, de sa sélectivité ...

l'homéostasie du microbiote intestinal et vaginal. Il s'avère que ces microorganismes sont impliqués dans la protection contre la colonisation par des agents pathogènes, dans le maintien du pH physiologique et dans la modulation des réponses immunitaires hôte (O'Toole et al., 2020; Walter et al., 2020). Une diminution significative de leur abondance pourrait prédisposer à la dysbiose, qui pourrait perturber les mécanismes de défense naturels du corps.

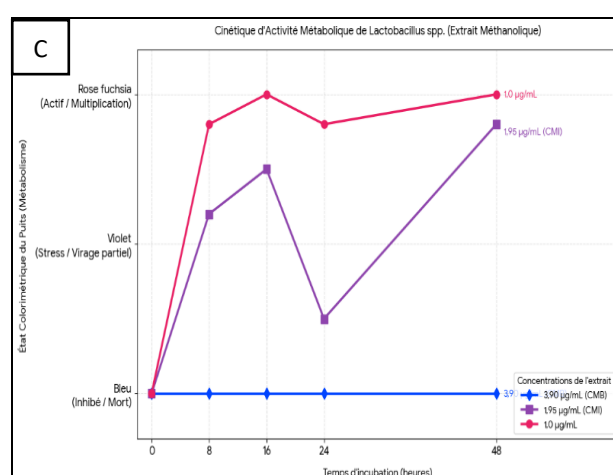
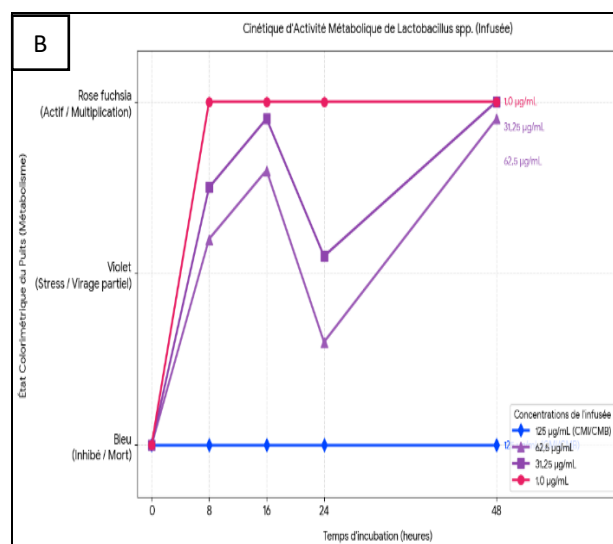
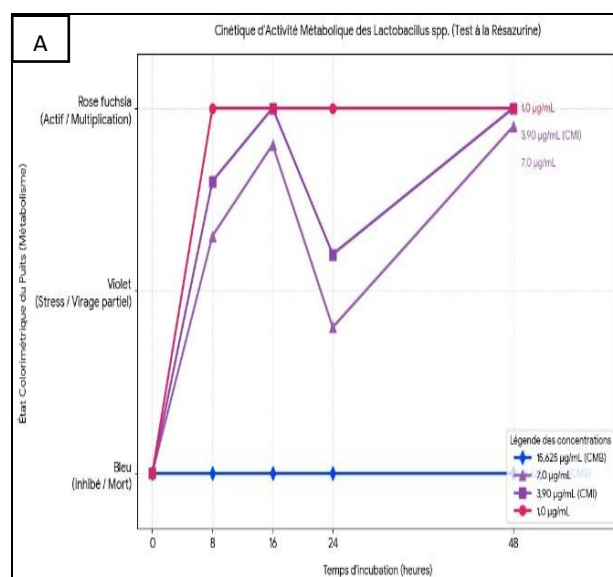
Donc, même si les extraits de *Chrysopogon nigritanus* montrent une activité antibactérienne prometteuse, leur faible sélectivité à l'égard des entéro bactéries conseille de la réserve quant à leur usage sous forme brute. Ces résultats démontrent qu'il sera possible par fractionnement suivi purification bioguidée d'isoler des molécules actives anti – *Pseudomonas* sans entraîner potentiel d'effets indésirables sur Bactéries commensales.

Ces résultats sont témoins d'une sélectivité plus ou moins grand pour les extraits de *C. nigritanus* avec chaque souche bactérienne. La sélectivité obtenue vis-à-vis de *P. aeruginosa* est sans doute l'un des résultats les plus prometteurs de cette étude et justifie des travaux complémentaires en vue d'identifier les composés actifs, d'élucider leurs mécanismes d'action et d'évaluer leur innocuité dans des modèles biologiques plus complexes.

• Cinétique de croissance de *Lactobacillus* spp. Après inhibition par les extraits

Figure 6 : Cinétique de croissance de *Lactobacillus* spp. après inhibition par le macérât (A), l'infusée (B) et l'extrait méthanolique (C)

L'analyse de la figure 6 met en évidence quatre profils distincts d'activité métabolique révélant la capacité et le temps requis par *Lactobacillus* spp pour réamorcer une multiplication normale après inhibition par nos extraits. Elle révèle une réponse dose-dépendante stricte, oscillant entre une bactériostase transitoire à faible concentration et une bactéricidie totale au-delà d'un seuil critique.



Phase de latence induite et de blocage précoce [0h - 16h]

Dès le contact avec les extraits, toutes les cinétiques débutent au stade initial Bleu, confirmant l'absence de métabolisme immédiat. Durant ces 16 premières heures, on observe une

lente amorce de réduction de la résazurine pour les concentrations sub-inhibitrices.

Phase critique d'inhibition maximale et point d'inflexion [16h - 24h]

Le point charnière de la cinétique se situe à 24 heures. C'est à ce moment précis que le dessin montre une cassure et une chute des courbes vers la zone violette, traduisant une phase de stress cellulaire intense et une inhibition métabolique sous l'effet des composés phytochimiques de la plante. Chronologiquement, 24 heures représentent le pic d'action des molécules de la plante sur la machinerie cellulaire. Les bactéries subissent un stress maximal qui stoppe temporairement leur division, créant une phase de latence secondaire (plateau métabolique) bien visible sur le tracé graphique.

Phase reprise de multiplication normale [24h - 48h]

Le phénomène majeur de cette cinétique se produit dans l'intervalle entre 24h et 48h. Le dessin montre une remontée verticale et rapide des courbes vers la zone Rose fuchsia. Chronologiquement, il a fallu précisément un délai de 24 heures d'adaptation (entre la 24e et la 48e heure) pour que les *Lactobacillus* réactivent leurs fonctions de division. À 48h, les pentes des courbes deviennent parallèles à celle de la concentration témoin (1,0 µg/mL). Ce parallélisme des pentes sur le dessin prouve rigoureusement que la bactérie a retrouvé son temps de multiplication normal (vitesse maximale de croissance) après avoir surmonté le blocage. Ce comportement suggère soit une dégradation progressive des principes actifs de la plante par les enzymes bactériennes, soit une régulation positive des voies métaboliques de secours chez *Lactobacillus spp.*

Profil d'inhibition irréversible

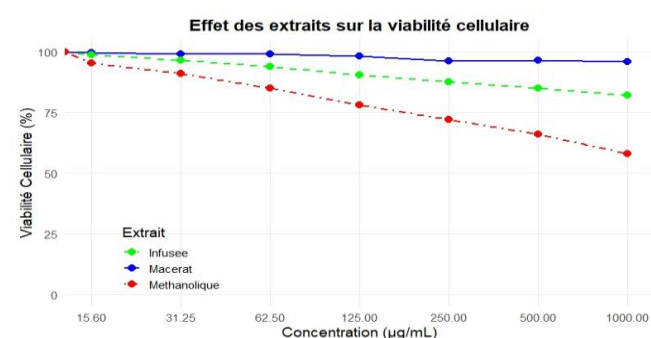
La courbe métabolique reste parfaitement plane et stagne au niveau de l'état colorimétrique Bleu tout au long des 48 heures d'incubation. La résazurine n'est pas réduite, indiquant une inhibition complète de la respiration et des enzymes des bactéries. Le dessin illustre ici visuellement la fin irréversible de la division cellulaire à partir de la première heure, sans période de latence de mise en récupération. Ce profil illustre que la lacto-flore est soumise à une réponse dose dépendante très stricte influencée par le macérât, l'infusée et l'extrait méthanolique, allant d'une transie-bacteriostase en dose faible à une bactéricidie dès le seuil critique est franchi. L'efficacité biologique est fortement influencée par le solvant et la méthode d'extraction utilisée. L'extrait méthanolique est le plus efficace, induisant une bactéricidie pure à seulement 3,90 µg/mL. Pour un effet

létal similaire sur la lacto-flore, les extraits aqueux doivent être utilisés en des doses beaucoup plus grandes : le macérât une proportion de 4 (15,625 µg/mL), tandis que l'infusée la plus faible à 32 fois la quantité (125 µg/mL). Ces dynamiques montrent que le méthanol concentre plus principes actifs, et que la macération à froid préserve mieux le potentiel biologique de la plante que l'infusion thermique.

III.3. Evaluation de la toxicité

• Evaluation de la cytotoxicité sur les cellules Vero

Figure 7 : Viabilité cellulaire en présence de différentes concentrations d'extraits



Les résultats obtenus mettent en évidence un effet cytotoxique dose-dépendant pour les trois types d'extraits. Alors que le contrôle positif de la cytotoxicité (DMSO à 10%) confirme la validité des tests en induisant la chute de la viabilité cellulaire à 100%, le macérât se distingue par sa remarquable innocuité, même poussé à sa dose maximale de 1000 µg/mL les cellules vivent à plus de 95 %. Cette faible toxicité est le résultat de l'influence de la solubilité des métabolites secondaires dans l'eau du traitement, le traitement à l'eau froide étant incapable d'extraire certains métabolites secondaires lipophiles ou potentiellement cytotoxiques. En effet, les solvants aqueux favorisent l'extraction de composés hydrophiles qui sont moins nocifs pour la membrane cellulaire, et donc limite l'exposition à des molécules bioactives réactives hautement (Shiriki *et al.*, 2019).

À l'opposé, l'infusé amorce une baisse progressive de la viabilité à partir de 62,5 µg/mL pour atteindre environ 82 % à la dose maximal. Cette baisse modérée suggère une extraction plus efficace de composés bioactifs sous chaleur. Une élévation de la température lors de l'infusion pourrait effectivement augmenter le taux de diffusion des métabolites secondaires, et permettre la coextraction de composés thermosensibles ou davantage bioaccessibles. Plusieurs études ont rapporté que les extractions thermiques peuvent accroître la teneur en polyphénols et en alcaloïdes, qui

Evaluation de l'activité antibactérienne, de sa sélectivité ...

pourraient posséder des effets biologiques plus intenses sur les cellules eucaryotes (Dai & Mumper, 2010 ; Gil-Martín *et al.*, 2022)

L'extrait méthanolique s'impose quant à lui comme le traitement le plus agressive, faisant chuter la survie cellulaire à près de 58 % à la plus forte dose. Du fait de la polarité intermédiaire du méthanol, il est réputé pour extraire une large gamme de métabolites secondaires, tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes, les saponines et les composés phénoliques. Ces molécules sont très bien documentées pour leur impact biologique y compris leur capacité à perturber les membranes cellulaires, modifier le cycle cellulaire, ou activer des mécanismes de mort programmée tels que l'apoptose (Zhou *et al.*, 2025 ; Newman & Cragg, 2020). Cette activité cytotoxique supérieure suggère ainsi une concentration plus élevée de composés bioactifs dans l'extrait méthanolique.

Ces écarts flagrants prouvent une chose essentielle, changer de solvant ou modifier la méthode d'extraction redessine complètement le profil de sécurité et de l'activité biologique d'une même plante. La viabilité n'étant pas descendue en dessous du seuil de (50%), la valeur expérimentale de l'IC₅₀ est supérieure à la plus forte dose testée (IC₅₀ > 1000 µg/mL).

Cette estimation a été vérifiée par modélisation non linéaire de la courbe dose-réponse sous la forme de l'équation logistique à quatre paramètres :

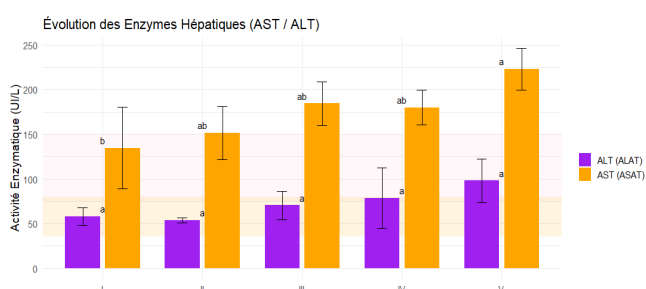
$$Y = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / (1 + 10^{(\log \text{IC}_{50} - X) \times \text{Pente de Hill}})$$

Où Y, X, Max-Min et la pente de Hill sont le pourcentage de viabilité cellulaire, le logarithme de la concentration de l'extrait, les plateaux de réponses maximale et minimale, et le degré de coopération de Hill, respectivement. Les ajustements des courbes de régression et les calculs des paramètres de toxicité cellulaire ont été réalisés en utilisant le logiciel R.

• Evaluation de la toxicité aigüe sur les rats Wister

Les paramètres biochimiques hépatiques des rats par lot sont repris dans la figure ci-dessous.

Figure 8 : Evolution des enzymes hépatiques des rats par lots



Une analyse de variance (ANOVA à un facteur) a été réalisée pour évaluer l'impact de différentes concentrations du produit administré par gavage sur les paramètres biochimiques sanguins des rats.

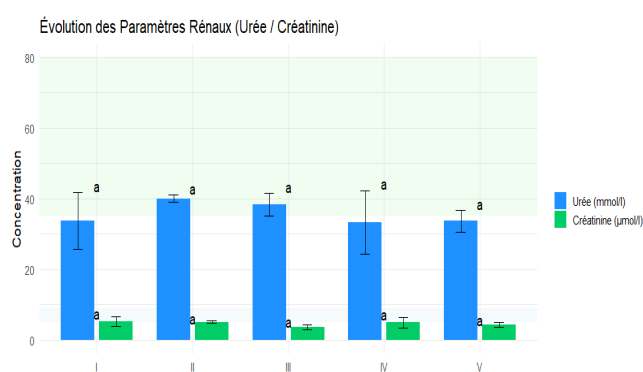
Concernant l'AST (ASAT) l'analyse montre une différence statistiquement significative entre les lots ($F = 3,821$; $p = 0,0389$). On observe une augmentation progressive et dose-dépendante de la moyenne de l'AST, passant de $134,67 \pm 45,80$ UI/l chez le témoin à $223,00 \pm 23,58$ UI/l au lot V (2000 mg/kg). La valeur moyenne du lot V dépasse largement la limite supérieure de référence (150 UI/l).

Concernant l'ALT (ALAT) bien que l'ANOVA globale montre une tendance non significative à un seuil strict de 5% ($F = 2,213$; $p = 0,1406$), l'augmentation numérique est marquée au lot V ($98,00 \pm 24,58$ UI/l contre $58,00 \pm 10,15$ UI/l pour le témoin). Le lot V sort de l'intervalle physiologique normal (35 - 80 UI/l).

Le rapport moyen AST/ALT reste globalement inférieur à 2 (Lot V = 2,27) individuellement pour le rat 2). L'élévation combinée de l'AST et de l'ALT indique une cytolysé hépatique induite par la substance à forte dose (2000 mg/kg). L'élévation isolée de l'AST aux doses intermédiaires (Lot III, IV) peut aussi être accentuée par un traumatisme musculaire lié à la procédure de gavage.

Les paramètres biochimiques rénaux des rats par lot sont repris dans la figure ci-dessous.

Figure 9 : Evolution des paramètres rénaux des rats par lot



Concernant l'Urée l'ANOVA ne révèle aucune différence significative entre les groupes ($F = 1,228$; $p = 0,3589$). Toutes les moyennes restent comprises ou légèrement en dessous de la zone de référence (5 - 9 mmol/l), indiquant l'absence d'insuffisance rénale aiguë ou de catabolisme protéique exagéré.

Pour la créatinine, aucune variation statistique n'est enregistrée ($F = 0,890$; $p = 0,5044$). Les concentrations

sériques restent stables et physiologiques dans tous les groupes (33 à 40 $\mu\text{mol/l}$), confirmant que la fonction de filtration glomérulaire des rats est totalement préservée à toutes les doses testées.

Puisque nous n'avions enregistré aucun décès de rats à la dose maximale recommandée par l'OCDE (2000 mg/kg), la valeur de $\text{DL}_{50} > 2000 \text{ mg/kg}$, nos extraits sont de ce fait classés dans la catégorie des substances à faible toxicité aiguë. Les données récentes de Yeram *et al.*, 2025 sur les racines de *Chrysopogon zizanioides* espèce proche du notre confirment d'ailleurs que les extraits globaux sont extrêmement sûrs à l'ingestion, avec des DL_{50} réelles qui dépassent souvent les 5000 mg/kg).

IV. CONCLUSION

Pour résumer, cette étude révèle un effet intéressant des extraits de racines de *Chrysopogon nigritanus* contre les agents bactériens en particulier dans l'inhibition spécifique de *Pseudomonas aeruginosa*. Parmi les extraits préparés en utilisant les différentes méthodes d'extraction testées, l'extrait méthanolique s'est avéré être le plus efficace en raison de sa puissance d'extraction élevée des métabolites secondaires bioactifs et d'une forte activité antimicrobienne.

Cependant, les résultats préliminaires acquis indiquent qu'une confirmation de l'ensemble de cette ressource végétale nécessiterait une étude approfondie, ce qui retient la réalisation d'études supplémentaires avant la mise en application clinique sécurisée. Il faut maintenant procéder à un fractionnement bio-guidé afin déterminer la fraction active anti-*Pseudomonas*, parallèlement à une analyse histopathologique approfondie afin d'apprécier la modification cellulaire microscopique dans les organes vitaux.

Des études de toxicité subchronique et une évaluation de la toxicité reproductive devront également être conduites afin d'évaluer les effets d'une exposition à long terme et s'assurer que la plante est sans danger pour la fertilité. Une analyse plus approfondie du microbiote sera également nécessaire pour mieux comprendre l'effet « global » de ces molécules sur la totalité de la flore commensale protectrice et décider ainsi de la sécurité d'emploi de *C. nigritanus*, tout en orientant le développement d'une formulation gynécologique locale, compatible à être mise à la disposition de la population congolaise.

REFERENCES

1. Abass, S., Parveen, R., Irfan, M., Malik, Z., Husain, S. A., & Ahmad, S. (2024). Mechanism of

antibacterial phytoconstituents: an updated review. *Archives of Microbiology*, 206(7).
<https://doi.org/10.1007/s00203-024-04035-y>

2. Absa Diop, Mareme Thiaw, I. S. and M. L. G. (2026). *World Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research determination of polyphenol content and evaluation of antioxidant activity in extracts from the chrysopogon nigritanus plant*. 8(1), 1–10.
3. Arya, P., Vaidya, D., Kaushal, M., Devi, S., Gupta, A., & Chand, S. (2025). Effects of different solvents on phytochemical constituents, in-vitro antimicrobial activity, and volatile components of *Boehmeria rugulosa* Wedd. wood extract. *Scientific Reports*, 15(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-14506-x>
4. Azwanida N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 04(03), 3–8.
<https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
5. Bagla, V. P., McGaw, L. J., Elgorashi, E. E., & Eloff, J. N. (2014). Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two biflavonoids and a flavone isolated from *Podocarpus henkelii* (Podocarpaceae) leaves. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 1–6.
<https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-383>
6. Bukatuka, F., Ngombe, K., Mutwale, K., Moni, B., Makengo, K., Pambu, L., Bongo, N., Mbombo, M., Musuyu, M., Maloueki, U., Ngbolua, K.-T.-N., & Mbemba, F. (2016). Bioactivity and Nutritional Values of Some Dioscorea Species Traditionally Used as Medicinal Foods in Bandundu, DR Congo. *European Journal of Medicinal Plants*, 14(1), 1–11.
<https://doi.org/10.9734/ejmp/2016/25124>
7. Caron, F., & Boyer, S. (2019). « *Le EUCAST / CA-SFM nouveau : les questions* » *Impact de la méthodologie CA-SFM / EUCAST 2015 sur l'évaluation de l'activité de Objectifs Méthodes Résultats*. 36, 12.
8. Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352.
<https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

9. Dieye, P. I., Ndiaye, S., Dione, F., Diop, A., Dieng, A., Diop, A., Ndiaye, B., Diop, Y. M., & Sarr, S. O. (2021). Étude corrélée de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits de *Jatropha chevalieri* et de *Cordylla pinnata*, et de leurs profils chromatographiques. *Journal of Applied Biosciences*, 159, 16396–16410. <https://doi.org/10.35759/jabs.159.4>
10. Diop, A., Thiaw, M., Seck, C., Samb, I., & Gaye, M. L. (2025). Ethnobotanical, Pharmacochemical and Cosmetic Study of the Plant *Chrysopogon Nigritanus* – A Review. *Plant Science Archives*, 10(4), 85–92. <https://doi.org/10.51470/psa.2025.10.4.85>
11. Gil-Martín, E., Forbes-Hernández, T., Romero, A., Ciansiosi, D., Giampieri, F., & Battino, M. (2022). Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. *Food Chemistry*, 378. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131918>
12. Heczko, P. B., Giemza, M., Ponikiewska, W., & Strus, M. (2024). Importance of Lactobacilli for Human Health. *Microorganisms*, 12(12), 1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122382>
13. Irie-N'guessan, A. G., Effo, K. E., Koua, K. B. D., Kouakou, S. L., Djadji, A. T. L., Adepo, A. A., Diarrassouba, N., & Kouakou-Siransy, N. G. (2019). La toxicité subaiguë de l'écorce de racines de *Dichrostachys cinerea* (L.) Wight et Arn. (Fabaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(2), 836. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v13i2.21>
14. Kabena, O. N. 1, 3, 4, Yasombe, Y. K.1, Amogu, J. D.1, 3, 4, Mubigalo, F. F.1, Mukania, J. M.2, Nzembo, F. M. ., & Mpungi, O. K.1, Asambo, L. S.1, 3, & Iteku, J. B. (2024). *Micrographic profiling and bio-optimisation of the antibacterial and antioxidant activities of Solanum lycopersicum L. (1753) by combining it with Curcuma longa L. (1753) extract*. 1–7.
15. Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., Marra, M., Zummo, S., & Biondo, C. (2023). Urinary Tract Infections: The Current Scenario and Future Prospects. *Pathogens*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens12040623>
16. Masengo, C. A., Ngbolua, J.-P. K.-T.-N., Omeonga, S. I., Nzuzi, N. ., Ilumbe, G. B., & Mpiana, P. T. (2023). Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-radicalaire, anti-inflammatoire, anti-drépanocytaire et cytotoxique des feuilles de *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenaceae). *Revue Marocaine Des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 11(3), 303–312. https://agrimaroc.org/index.php/Actes_IAPH2/article/view/1350
17. Mbadiko et al. (2019). Effect of Drying on the Composition of Secondary Metabolites in Extracts from Floral Parts of. *Asian Journal of Research in Botany*, 2(2), 1–6.
18. Medina, M., & Castillo-Pino, E. (2019). An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Therapeutic Advances in Urology*, 11, 3–7. <https://doi.org/10.1177/1756287219832172>
19. Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
20. Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
21. Nga, N., Ngolsou, F., M, N. N., V, S. L., Dph, B., Mekoulou, C., Npjs, M., Fifen, R., Ja, D., Mf, E., & E, M. M. (2020). Étude Toxicologique In Vivo de l'Extrait Aqueux des Feuilles de *Psychotria Calceata* Toxicological study of the aqueous extract of the leaves of *psychotria calceata* in vivo. *Health Sciences and Disease*, 21(10), 44–48.
22. Ngolo, L. M., Faraja, F. M., Ngandu, O. K., Kapepula, P. M., Mutombo, S. M., & Tshitenge, T. B. (2025). Phytochemical screening, UPLC analysis, evaluation of synergistic antioxidant and antibacterial efficacy of three medicinal plants used in Kinshasa, D.R. Congo. *Scientific Reports*, 15(1),

- 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-94301-w>
23. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
24. Petiti, J., Caria, S., Revel, L., Pegoraro, M., & Divieto, C. (2024). Standardized Protocol for Resazurin-Based Viability Assays on A549 Cell Line for Improving Cytotoxicity Data Reliability. *Cells*, 13(23), 1–12. <https://doi.org/10.3390/cells13231959>
25. Rohde, M. (2019). *The Gram-Positive Bacterial Cell Wall*. (1), 1–21. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018.Correspondence>
26. Ruppé, E., Martin-Loeches, I., Rouzé, A., Levast, B., Ferry, T., & Timsit, J. F. (2018). What's new in restoring the gut microbiota in ICU patients? Potential role of faecal microbiota transplantation. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(8), 803–805. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.05.020>
27. Semde, Z., Koudou, J., Zongo, C., Figueredo, G., Somda, M. K., Ganou, L., & Traore, A. S. (2017). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Vetiveria nigriflora* (Benth.) Stapf roots from Burkina Faso. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(04), 29–36. <https://doi.org/10.7324/jabb.2017.50405>
28. Shiriki, D., Ubwa, S. T., Ubwa, S. T., Yusufu, M. I., & Shambe, T. (2019). Extraction Methods and Inhibition Studies of Ten Plant Extracts on Nine Yam Rot Pathogenic Microorganisms. *Food and Nutrition Sciences*, 10(04), 439–458. <https://doi.org/10.4236/fns.2019.104033>
29. Silhavy, K. and W. (2015). The bacterial cell envelope. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1679), 1–17. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0019>
30. Somaida, A., Tariq, I., Ambreen, G., Abdelsalam, A. M., Ayoub, A. M., Wojcik, M., Dzoyem, J. P., & Bakowsky, U. (2020). Potent cytotoxicity of four cameroonian plant extracts on different cancer cell lines. *Pharmaceuticals*, 13(11), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ph13110357>
31. VO Bamimore a*, ED Manuel-Mosi b, OO Fayehun c, JI Olawuni d, E Ogunwole e, CA Elusiyan a, G. O. (2025). *Acute and Sub-Chronic Toxicological Evaluation of n -Hexane Fraction of Uvaria chamae Leaves* Department of Pharmacognosy University of Medical Sciences , Ondo City , Ondo State , Nigeria ; Department of Integrated Science , Adeyemi Federal University of E. 19, 89–98.
32. Wahyuni, D. K., Kharisma, V. D., Murtadlo, A. A. A., Rahmawati, C. T., Syukriya, A. J., Prasongsuk, S., Subramaniam, S., Wibowo, A. T., & Purnobasuki, H. (2024). The antioxidant and antimicrobial activity of ethanolic extract in roots, stems, and leaves of three commercial *Cymbopogon* species. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 24(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12906-024-04573-4>
33. Walter, J., Armet, A. M., Finlay, B. B., & Shanahan, F. (2020). Establishing or Exaggerating Causality for the Gut Microbiome: Lessons from Human Microbiota-Associated Rodents. *Cell*, 180(2), 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.025>
34. Yeram, P. B., Vora, A., & Kulkarni, Y. A. (2025). In vivo and in silico toxicity studies of hydroalcoholic extract of *Vetiveria zizanioides* roots. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 16(6), 101256. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2025.101256>
35. Zhou, L., Lu, S., Gao, X., Chen, Z., Zhang, Y., Zhong, W., Zhu, F., Li, B., & Lin, X. (2025). Antioxidant and Anticancer Mechanisms of Unique Polyphenols in *Camellia ptilophylla*: Focus on Galocatechin-3,5-di-O-gallate and 1,2,4,6-Tetra-O-galloyl-β-D-glucopyranose. *Molecules*, 30(9). <https://doi.org/10.3390/molecules30091919>
36. Zouine, N., Ghachtouli, N. El, Abed, S. El, & Koraichi, S. I. (2024). A comprehensive review on medicinal plant extracts as antibacterial agents: Factors, mechanism insights and future prospects. *Scientific African*, 26(August), e02395. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02395>