

Manuscrit reçu le 17 janvier 2013 et accepté le 25 janvier 2013

Évaluation *in-vitro* de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes

TOTY A A.^{1,2}, GUESSENND N.², BAHIC¹., KRA A. M¹.,

OTOKORE D. A.¹ et DOSSO M.²

¹Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, UFR Biosciences, Université Abidjan Cocody, Côte d'Ivoire, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

²Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, 08 BP 1563 Abidjan 08.

RÉSUMÉ

Les échecs thérapeutiques et les coûts de plus en plus élevés des traitements des infections dues aux bactéries résistantes appellent à trouver d'autres alternatives de soins. La présente étude a été initiée dans le but d'évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur des souches multi-résistantes. Les méthodes de la diffusion en milieu gélosé et en milieu liquide ont été utilisées pour le test de sensibilité et la détermination de la CMI et de la CMB. Les différents tests ont été effectués sur cinq souches multi-résistantes isolées de patients malades et deux souches de référence. Les concentrations minimales inhibitrices des extraits varient entre 6,25 mg/ml et 25 mg/ml et les concentrations minimales bactéricides entre 6,25 mg/mL et 100 mg/mL. La plus faible valeur de CMI et de CMB a été observée avec *S. aureus* ATCC 25923 tandis que la plus grande valeur de ces mêmes paramètres a été obtenue sur *S. Typhi*. Cet extrait a exercé une activité bactéricide sur *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. mirabilis* et une activité bactériostatique sur *S. Typhi*. Ceci pourrait justifier l'utilisation de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* dans le traitement de diverses infections en milieux traditionnels.

Mots clés : *Harungana madagascariensis*, extrait aqueux, souches bactériennes multi-résistantes, CMI, CMB

ABSTRACT

Treatment failures and the more high cost of treatment of infections caused by resistant bacteria called to find other care alternatives. This study was initiated to evaluate the antibacterial activity of the aqueous extract from *Harungana madagascariensis* stem bark on multi-resistant strains. The methods of diffusion in agar and liquid media were used for susceptibility testing and MIC and MBC determination. The tests were performed on five multi-resistant strains isolated from patients and two reference strains were used as control. The minimum inhibitory concentrations of the extracts ranged from 6.25 mg/mL and 25 mg/mL and minimum bactericidal concentrations between 6.25 mg/mL and 100 mg/mL. The lowest value of MIC and MBC was observed with *S. aureus* ATCC 25923, while the greatest value of these parameters was obtained on *S. Typhi*. The aqueous stem bark extract of *Harungana madagascariensis* had a bactericidal activity on *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. mirabilis* and bacteriostatic activity on *S. Typhi*. This could

justify the use of *Harungana madagascariensis* stem bark in the treatment of various diseases in traditional society.

Key words: *Harungana madagascariensis*, aqueous extract, multiresistant bacterial strains, MIC, MBC

INTRODUCTION

Depuis leur apparition, les antibiotiques sont restés le moyen privilégié de lutte contre les infections bactériennes. Parmi les nombreux antibiotiques, les bêta-lactamines sont à l'heure actuelle les plus utilisées dans le monde entier et plus particulièrement dans les pays en voie de développement comme la Côte d'Ivoire. Elles le sont à un tel degré du fait de leur large spectre d'action, leur innocuité, leur efficacité et surtout leurs faibles coûts [1].

Cependant, du fait d'une utilisation anarchique, inadéquate et abusive des antibiotiques en santé humaine et vétérinaire, on assiste aujourd'hui à l'émergence de bactéries multi-résistantes [2]. De nombreux cas de multi-résistance ont été rapportés pour la côte d'Ivoire et d'autres pays d'Afrique subsaharienne [3, 4].

Si la découverte et l'utilisation des antibiotiques ont été à l'origine des plus grands succès de la médecine, aujourd'hui, l'émergence et la diffusion des bactéries multi-résistantes dans les populations humaines sont devenues des problèmes de santé publique très préoccupants [5]. La progression de la multi-résistance et l'absence de réelles perspectives de découverte de nouveaux antibiotiques dans les années à venir, nous a conduits à étudier l'efficacité des plantes à vertus thérapeutiques afin d'en isoler les principes actifs. Ainsi, nous avons utilisé *Harungana madagascariensis* pour ce travail. Des études antérieures ont montré que les feuilles possèdent une activité antibactérienne, antifongique, anti-hépatotoxique et peuvent être utilisées dans le traitement des otites externes de chiens et de chats [6, 7, 8]. Il a été également montré que les écorces du tronc ont une activité anti-protazoaire et anti-malariale [9]. Pour compléter ces études, le présent travail a eu pour objectif d'évaluer les propriétés antibactériennes de l'extrait aqueux de l'écorce du tronc sur la croissance *in-vitro* de souches bactériennes multi-résistantes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué des écorces de tronc de *Harungana madagascariensis* récoltées dans la région de l'Agnéby au Sud de la Côte d'Ivoire en Septembre 2010 dont l'identification a été faite par le Centre National de Floristique de Côte d'Ivoire.

1.2. Matériel bactérien

Constitué de deux souches de référence et de cinq souches multi-résistantes fournies par le Laboratoire de Bactériologie et Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Tableau I: Profil des bactéries testées

| Souches | Profil | Origines |
|---------------------------------|---------------------------|-----------|
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | Sensible à l'imipenème | référence |
| <i>P. aeruginosa</i> n°261 | résistant à l'imipenème | urines |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | sensible à la méticiline | référence |
| <i>S. aureus</i> n°926 | résistant à la méticiline | sang |
| <i>E. coli</i> n°1218 | BLSE | urines |
| <i>P. mirabilis</i> n°1048 | BLSE | pus |
| <i>S. Typhi</i> n°1938 | C3GR | sang |

2. Méthodes

2.1. Préparation de l'extrait végétal

Les écorces ont été découpées en petits morceaux et séchées à l'abri du soleil, à la température du laboratoire pendant environ trois semaines. Une fois sèches, elles ont été rendues en poudre fine à l'aide d'une broyeuse IKA Labortechnik type MFC®. Cette poudre a servi à la préparation des extraits aqueux selon les méthodes de Zirihi et Kra [10].

2.2. Étude de l'activité antibactérienne des extraits végétaux

2.2.1. Test de sensibilité

La sensibilité des souches aux extraits de plantes a été réalisée par la technique de diffusion en milieu gélosé. Les milieux de Mueller Hinton ont été ensemencés par inondation. A l'aide

d'un emporte-pièce stérile, des puits d'environ 6mm de diamètre ont été effectués dans la gélose. Chaque puits a reçu 80 µl de la substance à tester aux concentrations 100, 50 et 25 mg/ml. Après 30 min de diffusion à la température du laboratoire, les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pendant 18 à 24 h. La présence ou non d'une zone d'inhibition a été observée [11]. L'interprétation a été faite selon Duraffourd *et al.*, Ponce *et al.*, [12, 13].

2.2.2. Préparation de l'*inoculum*

L'*inoculum* bactérien a été préparé à partir de colonies de moins de 24 h en bouillon Mueller Hinton (BMH). Une colonie isolée de la culture bactérienne a été prélevée à l'aide d'une anse de platine et homogénéisée dans 10 ml du bouillon puis incubé pendant 3 à 5 h à 37 °C pour avoir une pré-culture. Un volume de 0,01 ml ou 0,1 ml ou 1 ml a été prélevé respectivement pour les *Pseudomonas*, les *entérobactéries* et les *Staphylocoques* et a été ajouté à 10ml de BMH stérile. Cette suspension bactérienne réalisée est évaluée à environ 10^6 cellules/ml et constitue la dilution 10^0 ou le l'*inoculum* pur.

2.2.3. Numération de l'*inoculum*

La numération de l'*inoculum* a été réalisée par une dilution au $10^{\text{ème}}$ à partir de l'*inoculum* pur. On a obtenu 4 dilutions à 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Ces différentes dilutions ainsi que l'*inoculum* pur ont étéensemencés à l'aide d'une anse calibrée de 2 µl par stries de 5 cm de long sur une gélose Mueller Hinton puis incubés à 37 °C pendant 24 h. Cette préparation constitue la boîte A.

2.2.4. Préparation de la gamme de concentration des extraits végétaux

La gamme de concentration de l'extrait végétal a été préparée dans sept tubes à essais numérotés de 1 à 7 par la méthode de la double dilution selon une progression géométrique de raison 1/2.

2.2.5. Inoculation

Dans une série de huit tubes à hémolyse numérotées de C₁ à C₈, on a introduit 1mL de l'*inoculum* pur. Ensuite, on a ajouté dans les tubes, 1ml d'extrait végétal selon la gamme de concentration préparée. Cette répartition d'extrait végétal a été faite de sorte que 1ml d'extrait végétal de 200 mg/ml soit transféré dans le tube C₁, le tube C₂ a reçu 1 ml de 100 mg/ml ainsi de suite jusqu'au tube C₇ qui a reçu 1ml de la solution à 3,1 mg/ml. Le tube C₈ a reçu en lieu et place de l'extrait végétal, 1 ml de BMH stérile qui a servi de témoin de croissance. Du fait

de la dilution volume/volume ainsi réalisée, la concentration dans les tubes a été réduite de moitié. Ces tubes ont été incubés à 37 °C pendant 24 h.

2.2.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24 h. Sa détermination a été faite par observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque tube. La CMI a été la plus petite concentration pour laquelle il n'y a pas eu de trouble observé à l'œil nu.

2.2.7. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration de substance qui laisse au plus 0,01% de germes survivants. A l'aide d'une anse calibrée à 2 µl, les contenus des tubes dans lesquels aucun trouble n'a été observé ont été prélevés et ensemencés sur une gélose Mueller-Hinton en commençant par le tube de la CMI. L'ensemencement a été fait par stries parallèles de 5 cm de long à la surface de la gélose (Boîte B). Après 24 h d'incubation à l'étuve à 37 °C, le nombre de colonies sur les stries a été comparé à celles de la boîte de numération de l'*inoculum* (Boîte A). Ainsi, le premier tube expérimental dont le nombre de germes présents sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10^{-4} correspondra à la CMB.

RÉSULTATS

1. Tests de sensibilité

Les résultats consignés dans le tableau II ont montré que l'extrait aqueux a eu une bonne activité inhibitrice aux différentes concentrations testées sur les souches bactériennes avec un diamètre d'inhibition de 18 mm sur *S. Typhi* n° 1938 à la concentration de 100 mg/ml. Cependant, une faible sensibilité a été observée avec les souches d'*E. coli* n° 1218 et *S. aureus* n° 926 avec des diamètres d'inhibition respectifs de 0 mm et 11 mm à cette même concentration (tableau II).

Tableau II : Diamètres (mm) des zones d'inhibition induites par l'extrait

| Souches | Origine | Extraits aqueux (mg/ml) | | |
|---------------------------------|-----------|-------------------------|----|----|
| | | 100 | 50 | 25 |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | Référence | 17 | 12 | 15 |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | Référence | 17 | 15 | 12 |
| <i>P. aeruginosa</i> 261 | Urines | 14 | 11 | 8 |
| <i>S. aureus</i> 926 | Sang | 11 | 0 | 0 |
| <i>E. coli</i> 1218 | Urines | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. mirabilis</i> 1048 | Pus | 18 | 13 | 8 |
| <i>S. Typhi</i> 1938 | Sang | 18 | 16 | 14 |

2. Détermination des paramètres antibactériens (CMI et CMB)

Il a été observé une diminution progressive de l'intensité du trouble induit par la croissance des bactéries au fur et à mesure que la concentration de l'extrait végétal augmentait dans les tubes expérimentaux.

Les souches de *S. aureus* ont été plus sensibles avec des valeurs de CMI et CMB égales à 6,2 mg/mL. La plus grande valeur de CMI a été observée avec la souche d'*E. coli* (25 mg/ml) et celle de la CMB avec les souches de *S. Typhi*, *E. coli* (100mg/ml).

Les rapports CMB/CMI, pour la majorité des souches, étaient inférieurs ou égaux à 4 sauf pour la souche de *S. Typhi* pour laquelle ce rapport était supérieur à 8.

Tableau III : Paramètres antibactériens de l'extrait aqueux et leur interprétation.

| Souches bactériennes | Origine | CMI (mg/ml) | CMB (mg/ml) | CMB/CMI | Interprétation |
|---------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------------|
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | Référence | 12,5 | 25 | 2 | Bactéricide |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | Référence | 6,2 | 6,2 | 1 | Bactéricide |
| <i>P. aeruginosa</i> 261 | Urines | 12,5 | 25 | 2 | Bactéricide |
| <i>S. aureus</i> 926 | Sang | 6,2 | 6,2 | 1 | Bactéricide |
| <i>E. coli</i> 1218 | Urines | 25 | 100 | 4 | Bactéricide |
| <i>P. mirabilis</i> 1048 | Pus | 12,5 | 50 | 4 | Bactéricide |
| <i>S. Typhi</i> 1938 | Sang | 12,5 | >100 | >8 | Bactériostatique |

DISCUSSION

Cette étude nous a permis de réaliser l'extraction à l'eau des écorces de tronc de *Harungana madagascariensis* et d'évaluer l'activité antibactérienne de ces extraits sur la croissance *in-vitro* de souches bactériennes multi-résistantes.

Le test de sensibilité des souches a permis de montrer la présence d'une activité antibactérienne. Ainsi, les souches de *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. Typhi* ont été plus sensibles avec des diamètres d'inhibition allant de 11 à 18mm aux concentrations 50 et 100 mg/mL. Cependant, les souches d'*E. coli* et *S. aureus* ont été moins sensibles [12, 13].

L'analyse des données expérimentales montre que comparativement au témoin de croissance, il y a une diminution du trouble provoqué par la croissance des germes dans les tubes expérimentaux au fur et à mesure que la concentration en extrait augmente. Nos résultats montrent que les extraits aqueux ont eu une activité antibactérienne en inhibant la croissance des germes bactériens selon une relation dose-réponse. Cela nous a donc permis de déterminer les différents paramètres antibactériens à savoir la CMI et la CMB.

Les plus faibles valeurs de paramètres antibactériens ont été obtenues avec la souche de référence de *S. aureus* ATCC 25923 et la souche de *S. aureus* Métricilline Résistant (Méti-R). Pour ces germes, la CMI a été égale à la CMB (6,2 mg/ml). Les plus fortes valeurs ont été obtenues avec la souche d'*E. coli* multi-résistante avec une CMI de 25 mg/ml et de *S. Typhi* pour laquelle la CMB n'a pu être déterminée à la concentration maximale de 100 mg/ml. On suppose donc que la CMB pourrait se situer au-delà de cette concentration. Ainsi, pour cet extrait, les souches de *S. aureus* se présentent comme les plus sensibles contrairement aux souches de *S. Typhi* et d'*E. coli* qui ont été les moins sensibles. Entre ces deux sensibilités, nous avons eu la sensibilité intermédiaire avec les souches de *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, Madubunyi *et al* et Okoli *et al* ont noté une activité antibactérienne des extraits aqueux et éthanolique 70 % des feuilles de la plante vis-à-vis des souches de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. Typhi* [6, 8].

L'activité d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principes actifs [14, 15]. Aussi, faut-il rappeler que le *Harungana madagascariensis* contient des flavonoïdes, des saponines, des glycosides, des alcaloïdes et

des tanins [9, 8]. Ces composés ayant des propriétés antibactériennes connues, leur présence pourrait donc expliquer les propriétés antimicrobiennes observées [16].

Les rapports CMB/CMI, pour la majorité des souches, étaient inférieurs ou égaux quatre sauf pour la souche de *S. Typhi* pour laquelle ce rapport était supérieur ou égal à 8. Il ressort donc de notre analyse que l'extrait aqueux des écorces du tronc de *harungana madagascariensis* a un pouvoir bactéricide sur les souches de *P. aeruginosa* (ATCC 27853 et n° 261), *S. aureus* (ATCC 25923 et n° 926), *E. coli*, *P. mirabilis* et un pouvoir bactériostatique sur la souche de *S. Typhi* [17].

Ces travaux montrent donc que l'utilisation de l'écorce de *Harungana madagascariensis* comme anti infectieux en milieux traditionnels est justifiée; puisque les extraits aqueux de cette plante ont eu une activité antibactérienne.

CONCLUSIONS

De cette étude qui avait pour but d'évaluer *in-vitro* l'activité antibactérienne des extraits totaux aqueux des écorces de tronc de *Harungana madagascariensis* sur des bactéries multi résistantes, il ressort que:

- Toutes les souches multi-résistantes étudiées ont été sensibles à l'extrait aqueux de *harungana madagascariensis*;
- La détermination de la sensibilité des souches aux différents extraits dépend des concentrations des extraits;
- L'extrait aqueux a exercé un pouvoir bactéricide sur les différentes souches à l'exception des souches de *Salmonella Typhi* pour laquelle il a eu un pouvoir bactériostatique;

La sensibilité des différentes souches à l'extrait aqueux de l'écorce de *Harungana madagascariensis* revêt une grande importance dans le traitement des pathologies qui leur sont associées car ces souches présentent des résistances élevées vis-à-vis des antibiotiques utilisés en pratique courante. Cette étude permet de justifier le bien fondé des vertus antimicrobiennes accordées à cette plante.

REMERCIEMENTS

Je voudrais dire merci à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire pour avoir fourni le matériel et l'appui technique nécessaires à la réalisation de ce travail et au Centre National de Floristique pour l'identification de la plante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Livermore D., M. β -lactamase mediated resistance: past, present and future, *J. Infect. Dis. Soc.*, **6**, (1995), 75-83.
- [2] Savard P. Y., Caractérisation structurale et dynamique de la bêta-lactamase TEM-1 de la bactérie *Escherichia coli* par RMN liquide, Philosophie Doctor de Biochimie et de Microbiologie, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Québec, (2003) 224 p.
- [3] Akinyemi k. O., Olopado O., Okwara C. E., Ibe C. C., and Fasura K. A., Screening of crude extracts of six medicinal plants used in South-West Nigerian unorthodox medicine for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. *BMC complementary and alternative Medicine*, **5**, (2005), 1-6.
- [4] Guessennd N., Gbonon V.C, Tiékoura K.B., Kakou-N'douba A., Ouattara D.N., Boni-Cissé C., Dosso M. et le GER-BMR, Évolution de la résistance bactérienne à l'imipénème en Côte d'Ivoire de 2005 à 2009. Colloque scientifique de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire: pathologies émergentes et biologie intégrative, (2009), 17 p.
- [5] Lozniewski A., Rabaud C., Résistance bactérienne aux antibiotiques, Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux–Infections associées aux soins, CCLIN, Sud-Est, Nancy (2010), 4 p.
- [6] Madubunyi I. I., Obi S. K. C., Nwebube N. I., and Chime A. B., Antihepatotoxic and antimicrobial activities of *Harungana madagascariensis* leaf extracts. *International Journal of Pharmacology*, **33** (2), (1995), 129-134.
- [7] Moulari B., Pellequer Y., Chaumont J. P., Guillaume Y. C., and Millet J., *In-vitro* antimicrobial activity of the leaf extract of *Harungana madagascariensis* Lam. Ex. Poir. (Hypericaceae) against strains causing otitis externa in dogs and cats. *Acta Vet. Hung*, **55** (1), (2007), 97-105.
- [8] Okoli A. S., Okeke M. I., Iroegbu C. U., and Ebo P. U., Antimicrobial activity of *Harungana madagascariensis* leaf extracts. *Phytherapy Research*, **16**, (2002), 174-179.
- [9] Iwalewa E. O., Omisore N. O., Adewunmi C. O., Gbolade A. A., Ademowo O. G., Nneji C., Agboola O. I., and Daniyan O. M., Anti-protozoan activities of *Harungana madagascariensis* Stem Bark extract on trichomonads and malaria. *Journal of Ethnopharmacology*, **117** (3), (2008), 507-511.
- [10] Zihiri G. N. et Kra A. K. M., Évaluation de l'activité antifongique de *Microglosa Pirifolia* (LARMARCK) O. KUNTZE (*Asteraceae*) « PYMI » sur la croissance in vitro de *Candida albicans*. *Rev. Med. Pharm. Afr.*, **17**, (2003), 11-19.

- [11] Bssaibis F., Gmira N. et Meziane M., Activité antibactérienne de *Dittrichia viscoa* (L.) W. Greuter. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn, **3** (1), (2009), 44-45.
- [12] Duraffourd C., D'Hervicourt L. et Lapraz J. C., Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique, Eléments Thérapeutiques Synergiques. 2^{ème} Edition, Masson (Paris), (1990), 87 p.
- [13] Ponce A. G., Fritz R., del Valle C., and Roura S. I., Antibacterial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Society of Food Science and Technology (Elsevier), **36**, (2003), 679-684.
- [14] Wagner H., Pharmazeutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe, Gustav Fisher Verlag. Stuttgart-New-York, (1993), 50 p.
- [15] Thangara J. H. S., Adjei O., Allen B. W., and Portaels F., *In-vitro* activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*. Journal Antimicrobial Agents Chemoter, **45** (2), (2000), 231-233.
- [16] Scalbert A., Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry, **30**, (1991), 3875-3883.
- [17] Marmonier A. A., Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. Bactériologie Médicale, techniques usuelles, (1990), 227-236.