

# Activité antibactérienne des proanthocyanes de *Entada africana*

I. SANOU<sup>1</sup>, J. B. NIKIÉMA<sup>1</sup>, I. P. GUISSOU<sup>1</sup>, O. G. NACOUлма-OUÉDRAOGO<sup>2</sup>

## Résumé

*Entada africana* est très largement utilisée en médecine traditionnelle burkinabè. L'étude des proanthocyanes de cette plante par la méthode de diffusion en milieu gélosé montre une activité antibactérienne sur toutes les souches testées. La mesure de cette activité en établissant des courbes d'étalonnage avec l'ampicilline, la tétracycline et le cotrimoxazole indique que cette activité est faible. Ainsi sur *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, 100 µg de proanthocyane ont une activité équivalente à celle d'environ 0,33 µg d'ampicilline ; 1,53 µg de tétracycline ; 2,07 µg de cotrimoxazole. Sur *Escherichia coli* ATCC 8739, 100 µg de proanthocyane ont une activité équivalente à celle de environ 0,58 µg d'ampicilline ; 2,75 µg de tétracycline ; 2,46 µg de cotrimoxazole.

Mais contrairement à ces antibiotiques, aucun cas de résistance contact n'a été noté avec des souches pathogènes identifiées en milieu hospitalier.

**Mots-clés :** *Entada africana*, proanthocyane, antibactériens.

## Antibacterial activity of *Entada africana* proanthocyanes

### Abstract

This article shows that *Entada africana* from Burkina Faso contains proanthocyanes with anti-microbial activity on all the tested strains. This activity is lower than that of ampicillin, tetracyclin and cotrimoxazol. On *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, 100 µg of proanthocyanes act as 0,33 µg of ampicillin; 1,53 µg of tetracyclin and 2,07 µg of cotrimoxazol. On *Escherichia coli* ATCC 8739, 100 µg of proanthocyanes act as 0,58 µg of ampicillin; 2,75 µg of tetracyclin and 2,46 µg of cotrimoxazol. But contrarily to antibiotics tested, no case of contact resistance in clinical bacteria strains was noticed with proanthocyan.

**Keywords:** *Entada africana*, plant, Proanthocyan, antibacterial.

<sup>1</sup>Unité de formation et de recherche des sciences de la santé, Université de Ouagadougou 03, B.P. 7021.

<sup>2</sup>Unité de formation et de recherche des sciences de la vie et de la terre, Université de Ouagadougou 03, B.P. 7021.

## Introduction

*Entada africana* (Guill. et Perr.) est un petit arbre de la famille des Mimosaceae qui très utilisé dans la pharmacopée traditionnelle en région sahélienne. Au Burkina Faso et au Sénégal, il est utilisé pour ses propriétés anti-inflammatoires, antitussives, cicatrisantes, fortifiantes, diurétiques, fébrifuges, stimulant utérin, abortives, spasmolytiques, antalgiques, tranquillisantes, hémostatiques, anti- hémorroïdaires... (ADJANOHOUN *et al.*, 1979 ; KHERARO et ADAM, 1974 ; NACOUлма-OUÉDRAOGO, 1996).

Les investigations chimiques indiquent la présence de tanins, de procyanidols, de saponosides, de triterpénoïdes, de la roténone, de la gomme, des alcaloïdes, des isoflavones (BEP BEVER-OLIVER, 1986 ; KHERARO et ADAM, 1974). Cette plante ne semble présenter aucun effet toxique sur les humains (BEP BEVER-OLIVER, 1986). Des études ont montré que les proanthocyanes possèdent des propriétés antibactériennes et antivirales (De BRUYNE et PIETERS., 1995 ; BALDÉ *et al.*, 1990 ).

L'objectif de ce travail est de déterminer l'activité antibactérienne des proanthocyanes extraits de *E. africana*.

## Matériel et méthode

### Matériel végétal

Les écorces de tige de *E. africana* (Guill. et Perr.) ont été récoltées en mars 1998 sur un site de peuplement naturel à Gampèla au Burkina Faso. Les échantillons ont été reconnus par le département des plantes médicinales de l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé. Les écorces séchées ont été réduites en poudre à l'aide d'un broyeur.

### Production des proanthocyanes

L'extraction des proanthocyanes de *E. africana* a été faite à partir d'une méthode proposée par Howell A. B. (HOWELL, 1999) dans le but de produire des proanthocyanes antibactériens à partir de camberges. En pratique, l'extraction a été réalisée par macération pendant 6 heures, de 20 g de poudre dans 600 ml d'un mélange acétone - méthanol - eau - acide ascorbique (40 : 40 : 20 : 0,1). Après filtration, le surnageant a été réduit au rotavapor pour éliminer les solvants organiques, puis dégraissé avec de l'éther de pétrole (3 x 100 ml) avant d'être purifié.

La purification a été faite par chromatographie sur colonne de C-18 en éluant successivement avec l'eau, le mélange eau-méthanol (85 : 15) puis le mélange méthanol - acide acétique (100:0,01) pour donner respectivement les fractions f1, f2 et f3. La fraction f3 contenant les polyphénols (rendement = 60,40 %) a été débarrassée des traces de substances lipophiles par extraction liquide-liquide avec l'éther de pétrole (3 x 10 ml) puis des traces de solvants organiques par réduction au rotavapor à 30 °C avant d'être reprise par un volume équivalent d'éthanol. Le mélange obtenu a été fractionné sur une colonne de LH-20 en éluant successivement avec un mélange éthanol - eau (1:1 ) jusqu'à l'arrêt de la coloration rouge due aux anthocyanes (f3a) et avec un mélange acétone - eau (7:3) pour donner f3b contenant les proanthocyanes. Cette fraction f3b a été lyophilisée et conservée à 4 °C à l'abri de la lumière pour les tests.

## Test antibactérien

La méthode de diffusion en milieu gélosé de Müller Hinton (Sanofi Diagnostic Pasteur, Paris) a été utilisée en creusant des puits de 6 mm de diamètre à l'aide du bout non effilé d'une pipette Pasteur et en tapissant le fond des puits à l'aide d'une goutte de gélose en surfusion. Après ensemencement par inondation avec une suspension de  $10^6$  bactéries/ml environ, les substances à tester ont été déposées dans les cupules. Après 20 heures d'incubation, les diamètres d'inhibition ont été mesurés.

Les courbes d'étalonnage ont été réalisées en déterminant les diamètres d'inhibition en fonction des logarithmes des concentrations des antibiotiques suivants : ampicilline (BioMérieux) ; tétracycline (BioMérieux) ; cotrimoxazole (Sanofi Diagnostics Pasteur). Les dilutions d'antibiotiques ont été réalisées avec de l'eau distillée stérile pour donner des solutions mères aux concentrations de 0,4 mg/ml pour l'ampicilline ; 1,2 mg/ml pour la tétracycline et 1mg/ml pour le cotrimoxazole. Avec ces solutions, des dilutions au 1/4, au 1/40 puis au 1/400<sup>e</sup> ont été réalisées. Pour chaque dilution, 25  $\mu$ l ont été déposés.

Deux souches de référence ont été utilisées : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Escherichia coli* ATCC 8739.

## Résultats

### Activité des proanthocyanes

Après 24 heures d'incubation, les diamètres d'inhibition exercés par 100  $\mu$ g de proanthocyanes étaient de 16 mm sur la souche de *S. aureus* 6538 ATCC et de 14 mm sur la souche *E. coli* ATCC 8739. Ces diamètres représentent la moyenne obtenue après trois tests.

### Courbes d'étalonnage

Le tableau I indique les diamètres d'inhibition obtenus avec différentes concentrations d'antibiotiques testées. Les concentrations sont exprimées en masse déposée.

En projetant les valeurs des diamètres d'inhibition obtenus avec les proanthocyanes (16 mm pour *S. aureus* et 14 mm pour *E. coli*) sur les droites d'étalonnage, il est possible de déterminer la quantité d'antibiotique qui donnerait le même diamètre d'inhibition. Une analyse des résultats sur Microsoft Excel a donné les équations des courbes de tendance et les concentrations correspondantes (tableau II et figures 1 à 6).

### Action sur des souches hospitalières

Des tests de sensibilité par la méthode de diffusion sur des souches bactériennes isolées en milieu hospitalier ont donné des diamètres d'inhibition compris entre 8 et 19 mm pour *S. aureus* et 7 et 13 mm pour *E. coli* (tableau III) :

**Tableau I.** Diamètres d'inhibition en fonction des concentrations d'antibiotiques sur *S. aureus* et *E. coli*.

Conc ( $\mu\text{g}$ )	Ampicilline		Tétracycline		Cotrimoxazole			
	<i>S.aureus</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)	Conc ( $\mu\text{g}$ )	<i>S.aureus</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)	Conc ( $\mu\text{g}$ )	<i>S.aureus</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)
0,0025	8	0	0,0075	0	0	0,00625	0	0
0,025	12	0	0,075	7	0	0,0625	0	0
0,25	16	8	0,75	12	8	0,625	9	7
2,5	20	18	7,5	20	16	6,25	19	16
10	27	27	30	27	24	25	28	24

**Tableau II.** Équations des courbes de tendance et quantité d'antibiotique donnant le même diamètre d'inhibition que 100 $\mu\text{g}$  de proanthocyanes.

Antibiotiques	<i>S. aureus</i> ATCC 6538		<i>E. coli</i> ATCC 8739	
	Y	X pour y =16	Y	x pour y =14
Ampicilline	3,500 Ln(x)+ 19,894	0,3287	3,331 Ln(x)+ 15,820	0,5790
Tétracycline	3,129 Ln(x)+ 14,674	1,5277	2,965 Ln(x)+ 10,996	2,7542
Cotrimoxazole	3,476 Ln(x)+ 13,471	2,0700	2,961 Ln(x)+ 11,334	2,4605

Calcul :  $Y = a \text{Ln}(x) + b$  donc  $x = e^{(Y-b)/a}$ .

**Tableau III.** Diamètres d'inhibition en mm observés sur des souches pathogènes de *S. aureus* et de *E. coli* isolées chez des patients au Centre hospitalier national Yalgado Ouédraogo de ouagadougou.

Extr (100 $\mu\text{g}$ )	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>			
	Ampi (10 $\mu\text{g}$ )	Tétra (30 $\mu\text{g}$ )	Cotri (25 $\mu\text{g}$ )	Extr (100 $\mu\text{g}$ )	Ampi (10 $\mu\text{g}$ )	Tétra (30 $\mu\text{g}$ )	Cotri (25 $\mu\text{g}$ )
12	0	10	9	9	18	21	13
11	0	25	29	10	0	14	0
12	0	13	0	13	0	14	0
9	0	11	12	9	0	14	0
11	9	13	23	11	19	19	23
12	11	18	18	12	0	0	0
9	0	13	10	12	0	8	0
9	0	19	0	12	0	22	30
12	0	21	0	12	0	9	0
19	0	23	17	9	15	23	28
9	0	23	12	9	0	9	0
11	9	24	14	7	16	19	30
8	9	18	12	9	0	0	0
9	9	18	15	7	0	0	0

Ampi = ampicilline ; tétra = tétracycline ; cotri = cotrimoxazole ; extr = extrait.



Fig.2 : diamètres d'inhibition en fonction de la concentration en tétracycline (*S. aureus*)

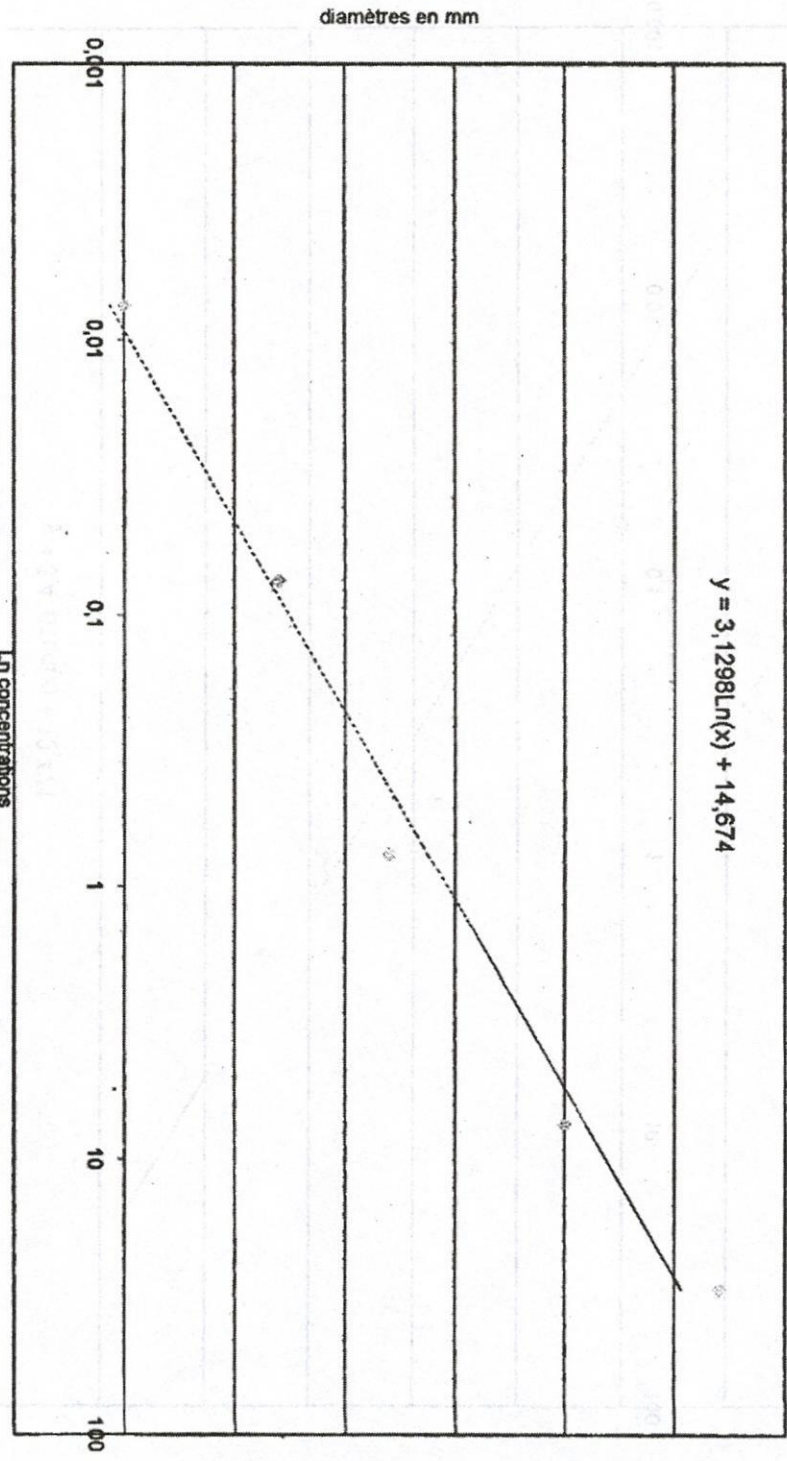


Fig. 3 : diamètres d'inhibition en fonction de la concentration en cotrimoxazole (S. aureus)

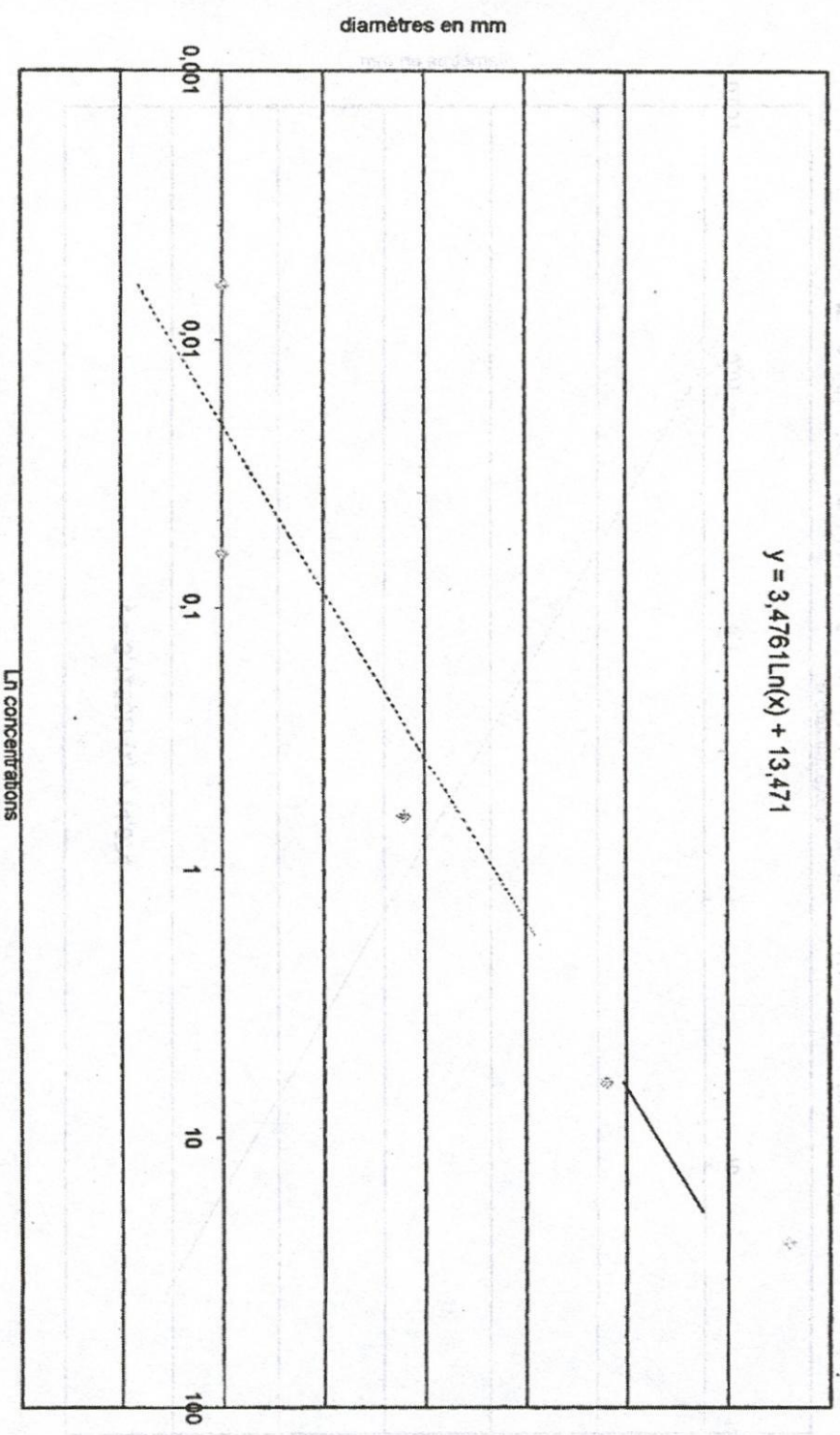


Fig. 2 : diamètres d'inhibition en fonction de la concentration en tétracycline en tétracycline (E. coli)

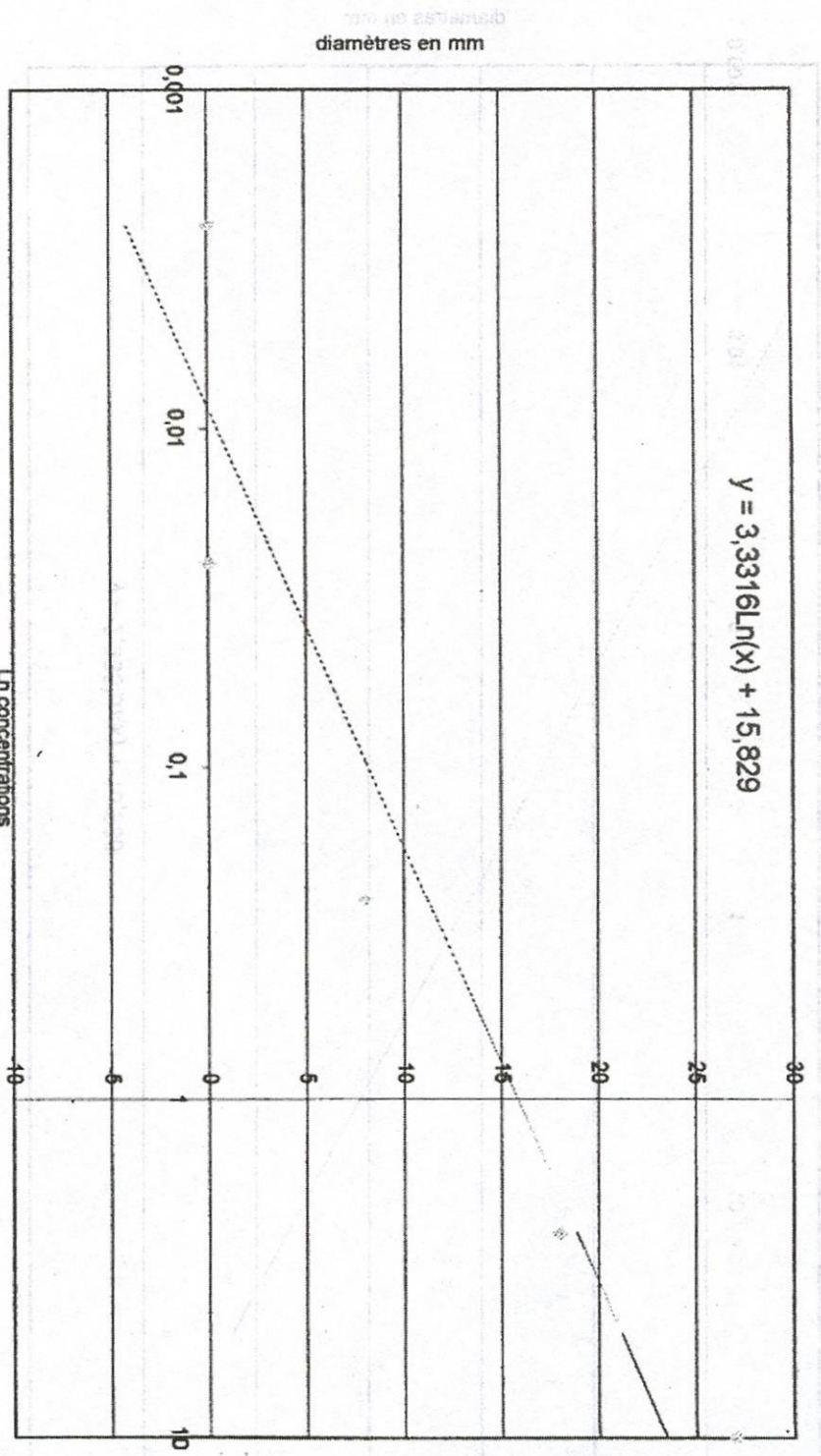


Fig. 4 : diamètres d'inhibition en fonction de la concentration en ampicilline (E. coli)

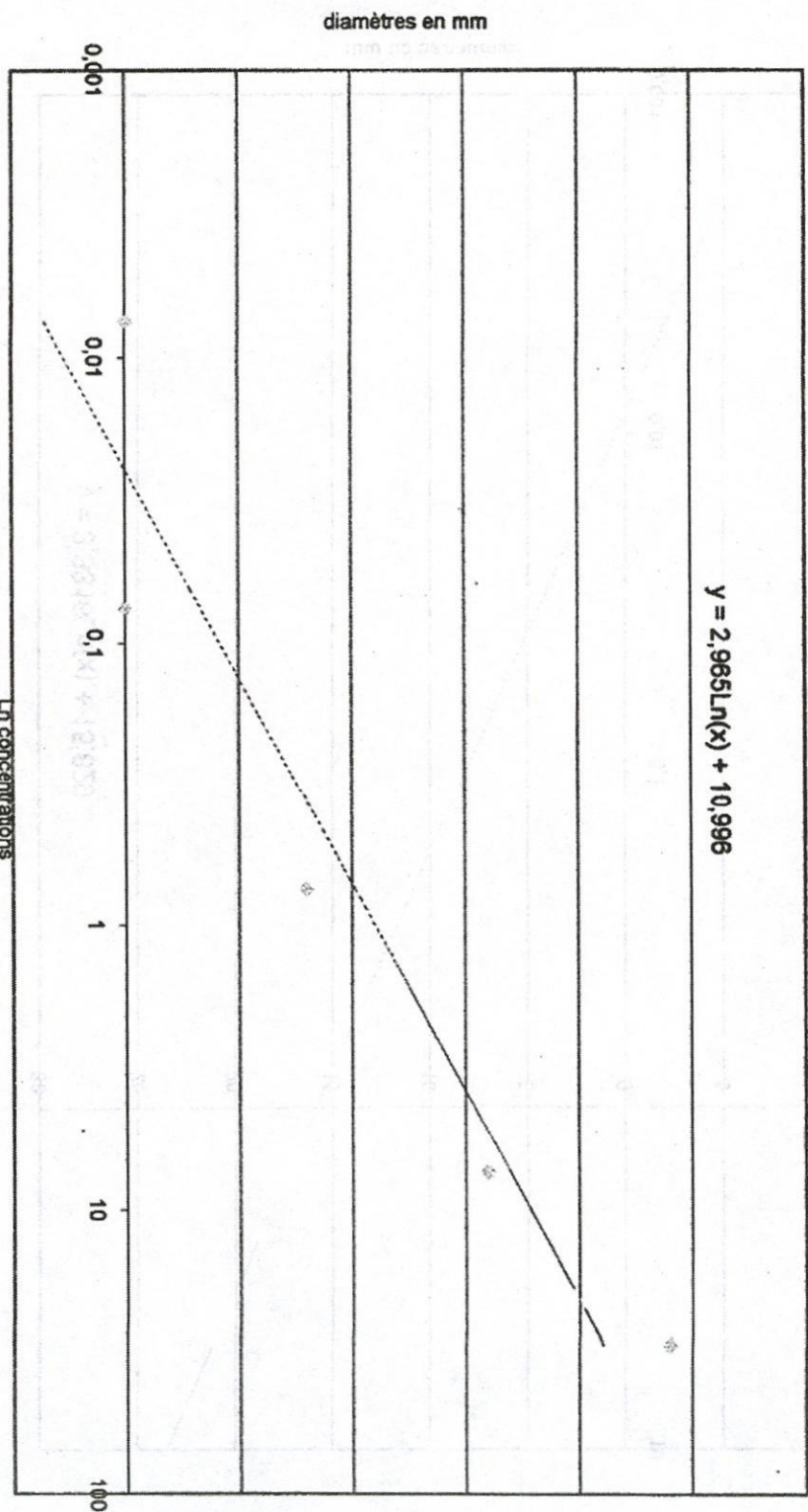


Fig.5 : diamètres d'inhibition en fonction de la concentration en tétracycline (*E. coli*)

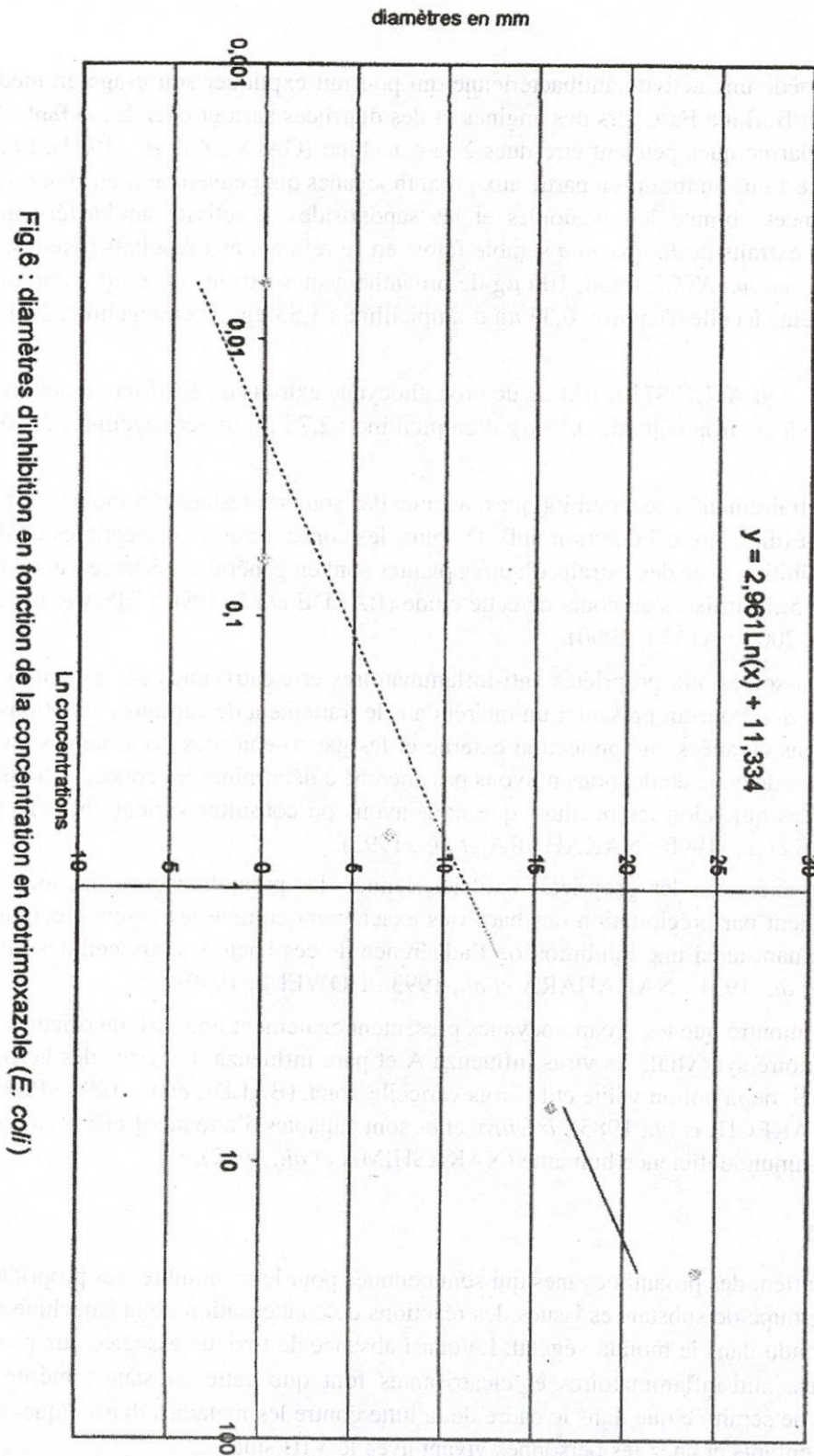


Fig.6 : diamètres d'inhibition en fonction de la concentration en cotrimoxazole (*E. coli*)

## Discussion

*E. africana* possède une activité antibactérienne qui pourrait expliquer son usage en médecine traditionnelle au Burkina Faso lors des angines et des diarrhées surtout chez les enfants. Si les propriétés antidiarrhéiques peuvent être dues à la catéchine (GALVEZ *et al.*, 1993), l'activité antibactérienne est due au moins en partie aux proanthocyanes qui peuvent agir en synergie avec d'autres substances comme les alcaloïdes et les saponosides. L'activité antibactérienne des proanthocyanes extraits de *E. africana* semble faible en se référant aux résultats obtenus. Ainsi sur la souche *S. aureus* ATCC 6538, 100 µg de proanthocyanes extraits de *E. africana* ont une activité équivalente à celle d'environ 0,33 µg d'ampicilline ; 1,53 µg de tétracycline ; 2,07 µg de cotrimoxazole.

Sur la souche *E. coli* ATCC 8739, 100 µg de proanthocyanes extraits de *E. africana* ont une activité équivalente à environ celle de 0,58 µg d'ampicilline ; 2,75 µg de tétracycline ; 2,4 µg de cotrimoxazole.

Cependant, contrairement à ces antibiotiques, aucune des souches testées n'a montré une résistance de contact (diamètre d'inhibition nul). De plus, les concentrations susceptibles de donner des zones d'inhibition avec des extraits d'autres plantes sont en général supérieures aux 4 mg/ml (100 µg dans 25 µl) utilisées au cours de cette étude (BALDÉ *et al.*, 1990 ; EISA *et al.*, 2000 ; HWANG *et al.*, 2000 ; AJALI, 2000).

Ces avantages associés aux propriétés anti-inflammatoires et cicatrisantes des proanthocyanes font que *E. africana* pourrait présenter un intérêt dans le traitement de certaines affections telles que les infections cutanées en application externe et les gastro-entérites bactériennes en usage interne. Au cours de cette étude, nous n'avons pas cherché à déterminer les concentrations minimales inhibitrices qui selon les résultats que nous avons pu consulter varient entre 10 et 250 mg/ml (BALDÉ *et al.*, 1990 ; NAKAHARA *et al.*, 1993).

Les recherches axées sur les propriétés antibactériennes des proanthocyanes ont montré que celles-ci agissaient par précipitation des bactéries exactement comme les tanins précipitent les protéines entraînant ainsi une inhibition de l'adhérence de ces bactéries aux cellules infectées (KAKIUCHI *et al.*, 1991 ; NAKAHARA *et al.*, 1993 ; HOWELL, 1999).

Des études ont montré que les proanthocyanes présentent également une activité orientée contre le virus respiratoire syncytial, les virus influenza A et para influenza, les virus des herpès, des Hépatites A et B, de la poliomyélite et le virus varicelle-zona. (BALDÉ *et al.*, 1990 ; POUSSET *et al.*, 1993 ; TAKECHI *et al.*, 1985). *In vitro*, elles sont capables d'atténuer l'effet cytopathique du virus de l'immunodéficience humaine (NAKASHIMA *et al.*, 1992).

## Conclusion

*E. africana* contient des proanthocyanes qui sont connues pour leurs nombreuses propriétés biologiques. Ce groupe de substances issues des réactions de condensation de la catéchine est très largement répandu dans le monde végétal. La quasi absence de toxicité associée aux propriétés antidiarrhéiques, anti-inflammatoires et cicatrisantes font que cette substance mérite d'être mieux étudiée ne serait-ce que dans le cadre de la lutte contre les maladies diarrhéiques notamment chez les enfants et chez les personnes vivant avec le VIH sida.

## Références bibliographiques

- ADJANOHOUN E. J., AKE ASSI L., FLORET J. J., GUINKO S., KOUMARE A. M. R., AHYI R., 1979.** Médecine traditionnelle et pharmacopée : contribution aux études ethnobotanique et floristique au Mali. ACCT, Paris, 219 p.
- AJALI U., 2000.** Antibacterial activity of *Enantia polycarpa* bark. *Fitoterapia*, 71 (2000): 315-316.
- BALDÉ A. M., VAN HOOFF L., PIETERS L. A., VANDEN BERGHE D. A. VLIETINCK A. J., 1990.** Antiviral and antibacterial Procyanthocyanidins from the bark of *Pavetta owariensis*. *Phytotherapy Research*, 4 (5) : 182-190.
- BEP OLIVER-BEVER., 1986.** Medicinal plants in tropical West Africa. Cambridge University Press, Cambridge, England, 375 p.
- DE BRUYNE T., PIETERS L., 1997.** Condensed tannins : Spectroscopic characterisation and biological evaluation. *Pharmatonprijs voor Fytotherapie*, University of Anvers, Belgium, 73 p.
- EISA M. M., ALMAGBOUL A. Z., OMER M. E. A., ELEGAMI A. A., 2000.** Antibacterial activity of *Dichrostachys cinerea* *Fitoterapia*, 71 (2000): 324-327.
- GALVEZ J., CRESPO M. E., ZARZUELO A., WHITTE P., SPIESSENS C., 1993.** Pharmacological activity of a procyanidin. Isolation from *Sclerocarya birrea* Bark : Antidiarrhoeal activity and effects on isolated guinea-pig ileum. *Phytotherapy Research*, 7 : 25-28.
- HOWELL A. B., 1999.** Plant proanthocyanidins extract effective at inhibiting adherence of bacteria with p-type fimbriae to surfaces. *PCT WO 99/12541* : 1-65.
- HWANG J. K., SHIM J. S., PYUN Y. R., 2000.** Antibacterial activity of Xanthorrhizol from *Cucurma xanthorrhiza* against oral pathogens. *Fitoterapia*, 71 (2000) : 321-323.
- KAKIUCHI N., KASUMOTO I. T., HATTORI MASAO, NAMBA TSUNEO, HATANO T., OKUDA T., 1991.** Effect of condensed tannins and related compounds on reverse transcriptase. *Phytotherapy research.*, 5 : 270-272.
- KHERARO J., ADAM J. G., 1974.** La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. *Plantes médicinales et toxiques*. Vigot Frères, Paris , PP : 575-576.
- NACOLMA-OUEDRAOGO O. G., 1996.** Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles aux Burkina Faso. Cas du plateau central (tome I et II). Thèse de Doctorat d'État. Université de Ouagadougou.
- NAKAHARA K., KAWABATA S., ONO H., OGURA K., TANAKA T., OOSHIMA T., HAMADA S., 1993.** Antimicrobial properties of proanthocyanidins. *Environmental Microbiology*, 59 (4) : 968-973.
- POUSSET J. L., REY J. P., LEVESQUE J., COURSAGET P., GALEN F. X., 1993.** Hepatitis B surface antigen (Hbs Ag) inactivation and angiotensine-converting enzyme (ACE) inhibition in vitro by *Combretum glutinosum* Perr. (Combretaceae) extract. *Phytotherapy Research*, 7 : 101-102.
- TAKECHI M., TANAKA Y., TAKEHARA M., NONAKA G., NISHIOKA I., 1985.** Structure and antiherpetic activity among the tannins. *Phytochemistry*, 24 (10) : 2245-2250.