

**ETUDE COMPAREE IN VITRO DE L'ACTION ANTIBACTERIENNE
DE NAUCLEA LATIFOLIA Sm. ET DE QUELQUES ANTIBIOTIQUES
USUELS VIS-A-VIS DE ESCHERICHIA COLI O₁₂₇'
SOUCHE ENTEROPATHOGENE**

KABORE Z. Issiaka*
SOURABIE S.*
DE SOUZA C.**

RESUME :

L'étude vise à discerner d'une part, les profils bactériostatiques et bactéricides des extraits hydroalcoolique et alcoolique de *NAUCLEA LATIFOLIA* Sm., vis-à-vis d'*Escherichia coli* O₁₂₇' ; à comparer d'autre part, l'action de la plante, à celle de quelques antibiotiques courants, actifs vis-à-vis de germes à GRAM (-).

MOTS CLES : pharmacopée traditionnelle - *nauclea latifolia* - activité antibactérienne - gastroentérites.

**COMPARED STUDY IN VITRO OF THE ANTIBACTERIAN ACTION OF
NAUCLEA LATIFOLIA Sm. AND OF SOME USUAL ANTIBIOTICS IN
RELATION TO ESCHERICHIA COLI O₁₂₇ ENTERO PATHOGENE STRAIN**

ABSTRACT

The aim of the study is to distinguish on the one hand, the bacteriostatic and bactericide profiles of hydroalcoholic and alkaloidic extracts of *Nauclea latifolia* Sm. with regard to *escherichia Coli* O₁₂₇'; on the other hand to compare the action of the plant with that of some usual active antibiotics with regard to GRAME germs.

KEY WORDS : traditional pharmacopoeia - *nauclea latifolia* - antibacterial activity - gastroenteritis.

I. INTRODUCTION

Les pathologies gastro-intestinales sont une des causes de mortalité infantile élevée au Burkina Faso (SAWADOGO, 1986). On note par ailleurs, l'utilisation fréquente de *Nauclea latifolia* Sm. en tradithérapeutique africaine dans le traitement d'affections digestives sévères (KERHARO, 1973 ; KAMBU, 1989).

Les composés alcaloïdiques, les dérivés stéroliques, les tanins et les saponines constituent les principaux groupes chimiques identifiés dans les extraits de *Nauclea latifolia* Sm. (ALMEIDA, 1963 ; HOTELLIER, 1979 - 1980 - 1981 ; SOURABIE, 1993). Ces principes chimiques seraient responsables de l'activité antimicrobienne mise en évidence par KAMBOU (1989), DEENI (1991), SOURABIE (1992).

* Institut de Recherche sur les Substances Naturelles (IRSN) 03 BP 7192 Ouagadougou
Burkina Faso

** Université du BENIN Lomé - République du TOGO

Ces données dignes d'intérêt méritaient d'être approfondies ; aussi, avons-nous entrepris dans le cadre de cette étude d'examiner le comportement d'une entérobactérie pathogène, *Escherichia coli* O₁₂₇, en présence des extraits de la plante. Le choix de ce sérotype se justifie pour la raison essentielle suivante : on connaît bien le profil immunologique de *E. coli* O₁₂₇, son antigénicité peut être mise à profit dans le diagnostic immunologique lors d'affections dues aux *E. coli* entéropathogènes.

II. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

Nos analyses ont porté sur divers organes de *Naucllea latifolia* Sm :

- feuilles
- écorces de racine

Elles sont récoltées en octobre 1988 (fin des saisons de pluies) dans la localité de Boromo (Zone Ouest du Burkina Faso), à 180 kms de Ouagadougou.

2.2. Matériel biologique

- Support biologique

Escherichia coli entéropathogène, sérotype O₁₂₇ (souche clinique du Centre Hospitalier National Yalgado Ouédraogo); la viabilité de la souche est entretenue par repiquage sur gélose (TSA), puis par ensemencements successifs d'une colonie dans du bouillon biopolytone.

- Disques d'antibiotiques standard

Ce sont quatre disques prêts à l'emploi des Laboratoires Bio-Mérieux et de Diagnostic-Pasteur, chargés individuellement de :

- * Néomycine (Neomycine)
- * Kanamycine (kanamycine)
- * Polymyxine (polymyxine B)
- * Colistine (Colimycine)

- Disques de papier Wattman pour extraits végétaux

Il s'agit de disques de 9 mm de diamètre, découpés dans du papier wattman, maintenus dans un flacon stérile et conservés à l'abri de l'humidité et de l'air ambiant jusqu'au moment de l'emploi.

- Milieux

- * Gélose trypticase soja (TSA)
- * Bouillon trypticase soja (TSB)
- * Bouillon Eugon
- * Bouillon biopolytone
- * Gélose Müller-Hinton (gélose MH)

2.3. Méthodes

- Solution tamponnée de Na cl avec de la peptone (F.I.P.)

- * KH₂ PO₄ : 3,56 g ; Na₂ HPO₄ : 7,23 g ; Nacl ; 4,3 g ;

- Peptone : 1 g ;
* Eau distillée : Q.S.P. 100 ml.

- Solution inactivante

- * Letheen broth : 25,7 g ; Lécithine : 2,3 g ; Tuwen : 80 ;
* L-Histidine : 1 g ; Thiosulfate de Na : 5 g ; H₂O : Q.S.P. :
1000 ml.

2.3.1. Obtention des extraits végétaux bruts

Les extraits hydroalcooliques (45 g de poudre végétale en macération durant 3 heures dans l'EtOH-H₂O 7:3), et les extraits d'alkaloïdes totaux bases (100 g de poudre végétale extraits au Soxhlet en milieu ammoniacal) sont obtenus selon les protocoles classiques déjà décrits (SOURABIE, 1992).

Une partie aliquote (10 ml) des extraits hydroalcooliques est évaporée à sec sous pression réduite jusqu'à poids constant afin d'évaluer la quantité de principes dissous dans la solution mère (Voir III résultats, 3.1.).

2.3.2. Préparation des extraits d'écorces de racines pour la cinétique

2.3.2.1. Extrait hydroalcoolique de macération

- Solution mère d'extrait : 36 mg/ml
- Tube réactionnel comprenant :
 - . solution mère hydroalcoolique : 3,6 ml (prise d'essais)
 - . suspension microbienne : 0,4 ml
 - . eau distillée stérile : 6 ml

2.3.2.2. Extrait alcaloïdique (alkaloïdes totaux)

- solution mère : 6,8 mg/ml environ 7 mg/ml
- tube réactionnel comprenant :
 - . extrait alcaloïdique : 6 ml
 - . suspension microbienne : 0,4 ml
 - . eau distillée stérile : 3,6 ml

2.3.3. Préparation des extraits de feuilles pour la cinétique

2.3.3.1. Extrait hydroalcoolique de macération

- solution mère d'extrait : 15,2 mg/ml
- tube réactionnel comprenant :
 - . solution hydroalcoolique : 1,5 ml (prise d'essai)
 - . suspension microbienne : 0,4 ml
 - . eau distillée stérile : 8,1 ml

2.3.3.2. Extrait alcaloïdique (alcaloïdes totaux)

- solution mère : 9,2 mg/ml
- tube réactionnel comprenant :
 - . solution hydroalcoolique : 1,5 ml (prise d'essai)
 - . suspension microbienne : 0,4 ml
 - . eau distillée stérile : 8,1 ml

2.3.4. Essais antimicrobiens qualitatifs

- Réalisation d'un antibiogramme

La méthode utilisée est celle couramment pratiquée en bactériologie médicale (BAUER - KIRBY, 1966). Elle consiste à rechercher l'inhibition du développement microbien sur un milieu gélosé : la bactérie est ensemencée à la surface de la gélose en boîte de pétri, de façon à obtenir une culture juste confluyente de colonies. Après séchage, on dépose à des distances convenables, les disques imprégnés d'antibiotiques.

- Essais proprement dits

Ils sont effectués selon le même principe que précédemment. Les extraits de plante de concentration connue en principes dissous sont déposés à raison de 10 µl sur les disques de papier Wattman de 9 mm de diamètre.

Les disques ainsi imprégnés d'extraits de plante sont ensuite déposés à la surface de la gélose ensemencée par le germe de l'étude.

L'incubation dans les deux cas est effectuée en étude à 37° C pendant 24 heures.

L'essai est répété cinq fois de suite en boîtes de pétri gélosées. L'évaluation des diamètres moyens d'inhibition microbienne permet :

- de comparer les effets des antibiotiques avec ceux des extraits ;
- de comparer les effets des extraits de plante entre eux.

Les résultats de cette étude qualitative sont consignés dans le tableau I.

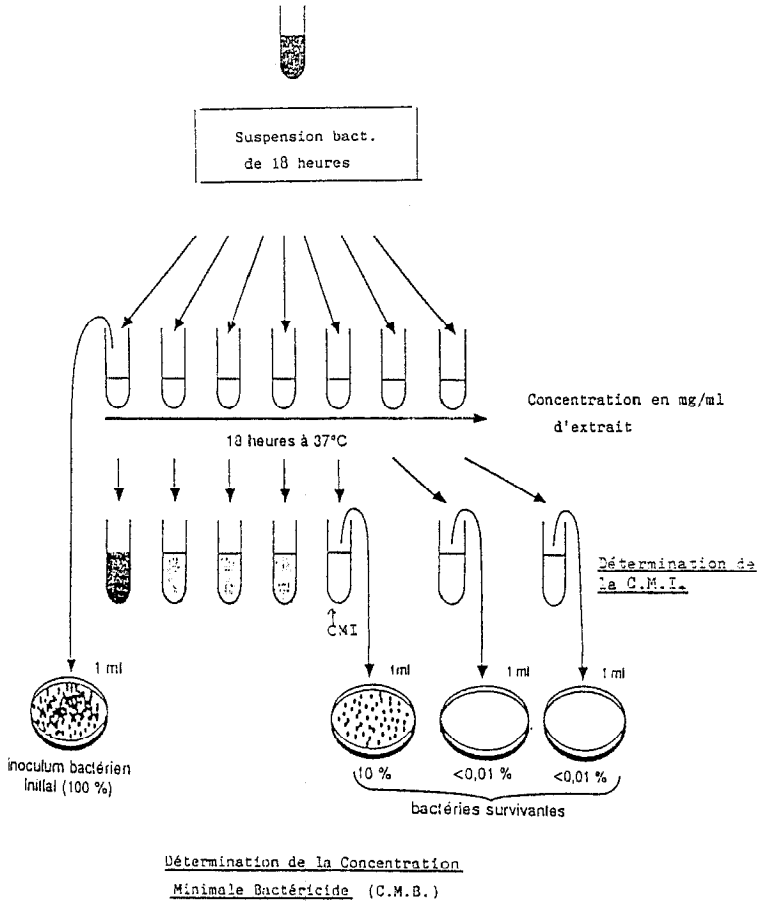
2.3.5. Essais quantitatifs

2.3.5.1. Evaluation de la Concentration Minimale Inhibitrice et de la Concentration Minimale Bactéricide (CMI et CMB)

- l'étude de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide est réalisée suivant la méthode de Chabbert (CHABBERT, 1972).

- la Concentration Minimale Bactéricide est réalisée au départ des tubes utilisés pour la CMI 50 µl provenant de chaque tube ne présentant pas de culture visible sont incorporés à de la gélose fondue. Après refroidissement, les boîtes de pétri sont placées à 37 °C pendant 18-24 heures. La Concentration Minimale Bactéricide est donnée par la plus petite quantité d'extraits permettant une réduction logarithmique du nombre de germes d'au moins 3 unités par rapport à l'inoculum de départ (schéma n°1).

Schéma N° 1 : Détermination des CMI et CMB des extraits végétaux



2.3.5.2. Evaluation de l'efficacité in-vitro des extraits au cours du temps (Etude cinétique d'Inhibition du germe)

Cette étude est réalisée suivant le schéma n° 2 et comprend :

a) La préparation de l'inoculum :

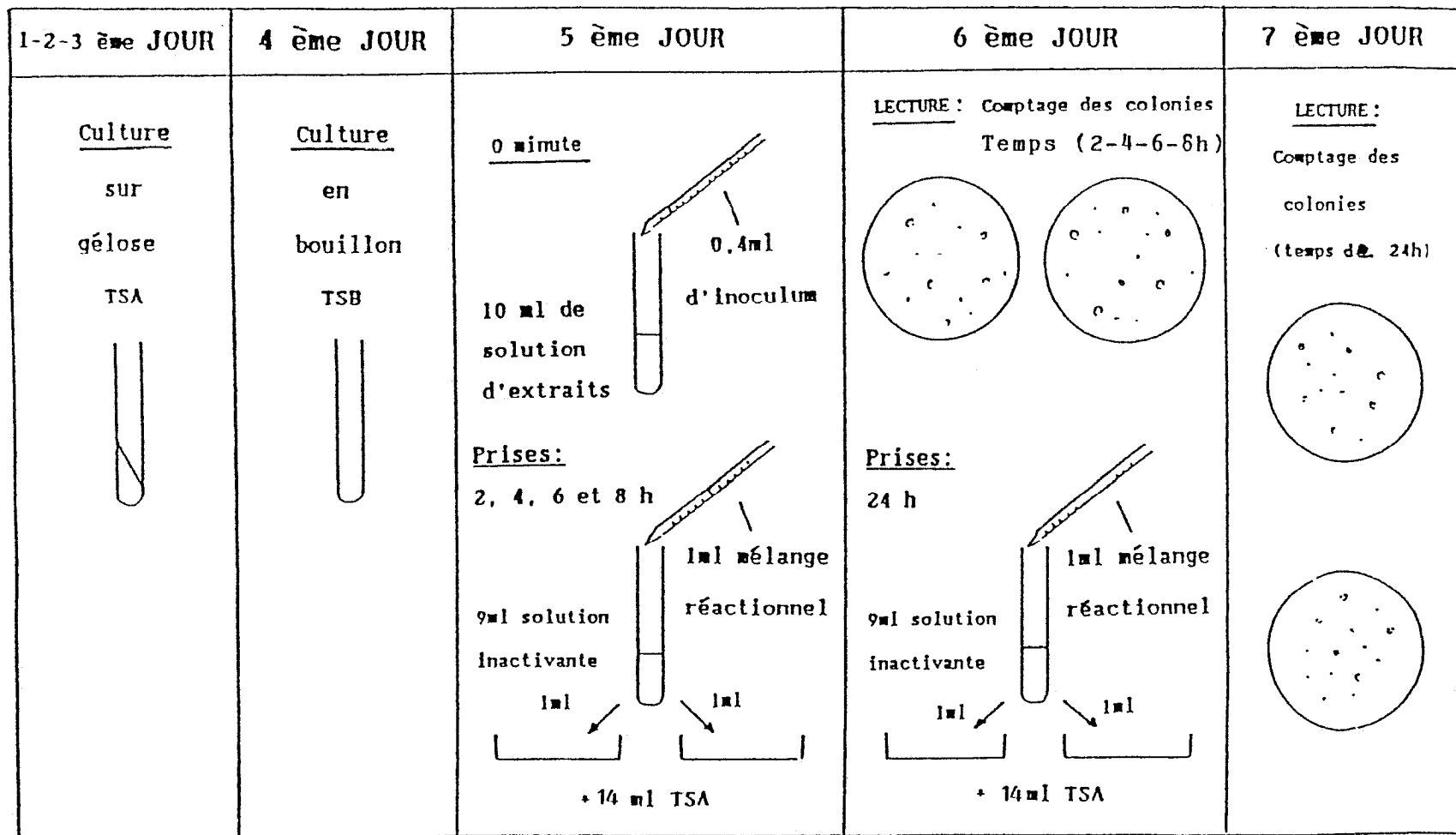
Après 3 repiquages successifs pendant 3 jours sur gélose incliné TSA, les germes sont incubés pendant 16 heures à 37 °C dans un bouillon TSB.

La culture est homogénéisée par agitation, en présence de billes de verre stériles, pendant 10 minutes. On utilise un inoculum de l'ordre de 10^9 germes/ml. Le nombre de germes est évalué par un dénombrement.

b) Essai proprement dit :

A 10 ml de milieu réactionnel contenant l'extrait à tester, on ajoute 0,4 ml d'inoculum. Chaque prise de 1 ml est transférée dans 9 ml de solution inactivante. Le nombre de bactéries est estimé par le dénombrement des germes revivifiables au temps 0,5-2-4-6-8 et 24 heures.

Schéma 2 : Méthode de l'étude cinétique d'inhibition du germe



III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Teneurs en principes chimiques dissous dans les différents extraits de NAUCLEA LATIFOLIA

L'évaporation à sec d'une partie aliquote de la solution mère, sous pression réduite jusqu'à poids constant (2.3.1. dans méthodes), permet d'évaluer le poids du résidu brut qui est exprimé en pourcentage ; on a obtenu pour les quatre extraits les résultats suivants :

- * Extraits hydroalcooliques : 11,9 % (feuilles) et 10,71 % (écorces racines)
- * Extraits alcaloïdiques totaux : 0,53 % (feuilles) et 0,40 % (écorces racines)

3.2. Antibiogrammes comparatifs

Les antibiogrammes réalisés en 2.4. ont permis d'évaluer en mm, des diamètres moyens d'inhibition. Les résultats de ces essais sont consignés dans le tableau I.

Tableau I : Diamètres moyens d'inhibition du développement d'E. COLI 0₁₂₇ sur disques d'antibiotiques et disques imprégnés d'extraits d'écorces de racines de Nauclea latifolia Sm.

1. Disques d'antibiotiques Standard	Diamètres moyens d'inhibition en mm. (± 1 mm)
Néomycine (Néomycine)	18,00
Kanamycine (Kamycine)	15,00
Colistine (Colimycine)	16,00
Polymyxine (Polymyxine B)	09,05
2. Disque de papier Wattman imbibés d'extrait hydroalcoolique	13,50
3. Dique de papier Wattman imbibés d'extrait alcaloïdique	15,50

3.3. Etudes comparatives des C.M.I. et C.M.B. des extraits

Celle-ci a été effectuée avec les solutions hydroalcooliques des racines et des feuilles. Les résultats de cette étude sont consignés dans le tableau II.

Tableau II : Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI et CMB) des extraits hydroalcooliques vis à vis d'E. Coli 0₁₂₇

Organes \ Extraits	Solution hydroalcoolique de macération (36 mg/ml)
Ecorces de racines de N. latifolia	CMI = CMB = 9 mg/ml Inoculum = 9.10 ⁸ germes/ml
Feuilles de N. latifolia	CMI = 3,8 mg/ml CMB = 7,8 mg/ml Inoculum = 9,6.10 ⁸ germes/ml

3.4. Etude cinétique de l'activité antibactérienne de la solution hydroalcoolique d'écorces de racines à 36 MG/ML

Les résultats de cette étude sont consignés dans le tableau III.

- La première colonne du tableau III indique le temps de contact - extrait végétal - germe de l'étude.

- La deuxième colonne représente la densité de l'inoculum bactérien au temps T aux dilutions correspondantes. Le temps de contact "germe -extrait végétal" détermine le temps T_0 qui est le point de départ de l'étude. Au temps T_0 , l'on introduit dans le tube réactionnel : 3,6 ml d'extrait végétal, 0,4 ml de suspension bactérienne et 6 ml d'eau distillée stérile.

- La troisième colonne représente la densité moyenne de colonies ayant survécu à l'action de la drogue à chaque temps de prélèvement.

Ainsi, pour chaque prélèvement, des dilutions sont effectuées ; celles ayant permis des lectures fiables de colonies sont celles qui ont été retenues.

m représente le nombre de colonies formées à partir de ces dilutions au bout de 24 heures d'incubation au temps T ; m correspond à la moyenne obtenue à partir des germes dénombrés.

Tableau III : Dénombrement au cours du temps des germes survivants à l'action de l'extrait hydroalcoolique des écorces de racines de *Nauclea latifolia Sm.*

Temps de contact (heures)	m	m + s
1/2	790.10 ⁵ 742.10 ⁵ 542.10 ⁶ 628.10 ⁶	3,30.10 ⁸ ± 2,95
2	503.10 ⁵ 519.10 ⁵ 410.10 ⁶ 403.10 ⁶	2,38.10 ⁸ ± 2,17
4	487.10 ⁵ 503.10 ⁵ 385.10 ⁶ 351.10 ⁶	2,08.10 ⁸ ± 1,14
6	290.10 ⁵ 225.10 ⁵ 287.10 ⁶ 279.10 ⁶	1,54.10 ⁸ ± 1,48
8	160.10 ⁴ 114.10 ⁴ 112.10 ⁵ 98.10 ⁵	5,93.10 ⁶ ± 5,30
10	70.10 ⁴ 58.10 ⁴ 50.10 ⁵ 40.10 ⁵	2,57.10 ⁶ ± 2,26
24	27.10 ² 40.10 ² 21.10 ³ 10.10 ³ 13.10 ⁴ 9.10 ⁴	4,30.10 ⁴ ± 5,38

3.5. Etude cinétique de l'activité antibactérienne de la solution hydroalcoolique des feuilles à 15 mg/ml

La concentration de la solution mère est environ 2,5 fois moins élevée que précédemment : les feuilles s'étant révélées plus actives que les racines (voir tableau II : détermination des CMI et CMB).

Les germes dénombrés selon le même protocole expérimental que précédemment aux différents temps sont consignés dans le tableau IV.

Tableau IV : Dénombrement au cours du temps des germes survivants à l'action de l'extrait hydroalcoolique des écorces des feuilles de *Nauclea latifolia Sm.*

Temps en heures	m	m + s
1/2	800.10 ⁵ 760.10 ⁵ 782.10 ⁶ 576.10 ⁶	3,78.10 ⁸ ± 3,57
2	590.10 ⁵ 600.10 ⁵ 570.10 ⁶ 162.10 ⁶	2,87.10 ⁸ ± 2,67
4	554.10 ⁵ 438.10 ⁵ 490.10 ⁶ 416.10 ⁶	2,51.10 ⁸ ± 2,34
6	380.10 ⁵ 362.10 ⁵ 350.10 ⁶ 300.10 ⁶	1,81.10 ⁸ ± 1,67
8	192.10 ⁴ 174.10 ⁴ 160.10 ⁵ 128.10 ⁵	8,11.10 ⁶ ± 7,37
10	107.10 ⁴ 125.10 ⁴ 89.10 ⁵ 73.10 ⁵	4,63.10 ⁶ ± 4,08
24	42.10 ² 57.10 ² 36.10 ³ 25.10 ³ 30.10 ⁴ 18.10 ⁴	9,18.10 ⁴ ± 1,21

3.6. Tableau de synthèse des études cinétiques

Les résultats obtenus en 3.4. et 3.5. sont représentés dans le tableau V sous forme d'expression logarithmique.

Tableau V : Expression logarithme du dénombrement des germes survivants à l'action des extraits hydroalcooliques d'écorces de racine et de feuilles.

Temps en heures	Extrait hydroalcoolique à 36 mg/ml de principes actifs (Ecorces de racines)		Extrait hydroalcoolique à 15 mg/ml de principes actifs (feuilles)	
	log. m	dim. logm	log. m	dim. logm
0,5	8,51	0,42	8,57	0,34
2	8,37	0,56	8,45	0,46
4	8,31	0,62	8,39	0,52
6	8,18	0,75	8,25	0,66
8	6,77	2,16	6,90	2,01
10	6,40	2,53	6,66	2,25
24	4,63	4,30	4,96	3,95

log m = logarithme de la densité bactérienne aux différents temps;

dim. log m = diminution logarithmique de cette même densité bactérienne.

IV- DISCUSSION - CONCLUSION

Les antibiogrammes réalisés avec les extraits de la drogue confirment l'action antimicrobienne de *Nauclea latifolia* tant pour les feuilles que pour les racines, au regard des diamètres d'inhibition significatifs du germe de l'étude (tableau I).

Les diamètres moyens d'inhibition de croissance du germe sont pour les extraits de la drogue plus accentués, sauf en ce qui concerne la polymyxine B.

Au plan de l'étude cinétique de l'activité antibactérienne, les extraits hydroalcooliques des feuilles et des racines présentent un profil similaire : diminution progressive et non brutale de la densité de l'inoculum bactérien au cours du temps.

** Les extraits alcaloïdiques paraissent plus actifs que les extraits hydroalcooliques ;

* L'extrait hydroalcoolique des feuilles à 15 mg/ml, apparaît plus actif que l'extrait hydroalcoolique des racines à concentration plus élevée (15 mg/ml contre 36 mg/ml : tableau V) ;

* Une étude cinétique comparative entre extraits bruts alcaloïdiques et extraits bruts hydroalcooliques mériterait d'être entreprise.

Les extraits de *Nauclea latifolia* examinés au cours de cette étude ont présenté une activité inhibitrice de croissance vis-à-vis de *Escherichia coli* O₁₂₇, sérotype entéropathogène ; les antibiogrammes réalisés en comparaison avec les disques

d'antibiotique standard ont confirmé le pouvoir antibiotique de la drogue. La différence d'activité, non significative (in vitro), entre principes chimiques de feuilles et des racines, laisse présumer l'opportunité d'utiliser les feuilles dans le traitement des gastroentérites en tradithérapeutique ; ce qui peut contribuer à sauvegarder *Nauclea latifolia* qui fait l'objet d'exploitation irrationnelle au niveau des tradithérapeutes africains.

Il est à noter que les antibiotiques standard ont été choisis non pas en raison des indications thérapeutiques, mais en fonction de leurs propriétés (action antibactérienne vis-à-vis des germes à GRAM (-)).

BIBLIOGRAPHIE

- 1. ALMEIDA SILVA, L. ; NOGUEIRA PRISTA, L. ; CORREIA ALVES A. :** Primeiros ensaios quimicos exécutados com a raiz de sarcocephalus esculentus. Alz : Gardia de Orta (Lisboa) ; vol. 11 (n° 1) (1963) pp. 89-95.
- 2. BAUER A. W., KIRBY W. M. M., SHERRIS J. C. et TURCK M.**
Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method.
Am. J. Clin. Pathol., 45, 493-496, (1966).
- 3. CHABBERT, Y. A. :**
Les antibiotiques en bactériologie médicale dans : Techniques en bactériologie, DAGUET, G. L. ; CHABBERT Y. A. : Ed. Flammarion. Médecine-Sciences, Paris, 3, (1972) pp. 143-172.
- 4. DEENI, Y. Y. and HUSSAN, H S. N. :**
Screening fo antimicrobial activity and for alkaloids of Nauclea latifolia Sm. Journal of Ethopharmacology (1991) vol. 35, pp. 91-96.
- 5. HOTELLIER F. ; DELAVEAU P. ; POUSSET J. L. :**
a) Alcaloïdes et Glucoalcoloïdes des feuilles de Nauclea latifolia Sm. : Planta medica (1979) vol. 35, pp. 242-246.

b) Naucleidinal et Epinaucleidinal, alcaloïdes de Nauclea latifolia Sm. : Phytochemistry (1980) vol. 19, pp. 1884-1885.
- 6. KAMBU K. ; TONA L. ; LUKI N. ; CIMANGA K. ; MAKUBA W. :** Evaluation de l'activité antimicrobienne de quelques préparations traditionnelles antidiarrhériques utilisées dans la ville de Kinshasa, Zaïre : Bull. Méd. Trad. Pharm. (1989) vol. 3 n° 1, pp. 15-24.
- 7. KERHARHO J. ; ADAM J. G. :**
La pharmacopée sénégalaise traditionnelle, plantes médicinales et toxiques : ed. VIGOT (1973) Paris, pp. 702-703.
- 8. SAWADOGO A. :**
Travaux inédits du Service de Pédiatrie du Centre National Hospitalier Yalgado Ouédraogo de Ouagadougou (1986).
- 9. SOURABIE S. ; GUISSOU I P. ; KABORE I. Z. :**
Mise en évidence d'une activité antimicrobienne de Nauclea latifolia Sm. (Rubiaceae) vis-à-vis d'entérobactéries responsables de gastro-entérites infantiles au Burkina Faso. Publications Médicales Africaines (1992) n° 120, pp. 18-23.
- 10. SOURABIE S. :**
Contribution à l'étude chimique et microbiologique de Nauclea latifolia Sm. (Rubiaceae) : thèse de Doctorat de spécialité - 3è cycle (1993), Fac. des Sc. et Techn. Université de Ouagadougou, Burkina Faso, 142 p.