

Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises.

Auteurs : Biyiti L.F.*, Meko'o D.J.L**, Tamze V.*, Amvam Zollo P.H.**.

* Centre de Recherche en Plantes Médicinales et Médecine Traditionnelle (CRPMT), Yaoundé, Cameroun

**Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I

Résumé :

L'activité antibactérienne des extraits hydroéthanoliques de *Cissus petiolata*, *Harrissonia abyssinica*, *Maesopsis eminii* et *Pyrenacantha staudtii*, quatre plantes médicinales utilisées traditionnellement pour traiter les maladies infectieuses, a été étudiée *in vitro*. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* ont été utilisés pour cette étude. Par la méthode de diffusion en milieu solide, toutes les quatre plantes se sont révélées actives sur une ou plusieurs bactéries. L'extrait de *P. staudtii* a été le plus actif en induisant des diamètres d'inhibition de croissance de 11, 14,6 et 15 mm sur *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* respectivement.

Par la méthode de dilution en milieu liquide, *P. staudtii* et *H. abyssinica* ont montré des effets bactéricides aussi bien sur *P. aeruginosa*, à 4,68 et 9,37 mg/ml, que sur *S. aureus* à 9,37 et 18,75 mg/ml respectivement. *P. staudtii* a présenté la plus grande activité. Cette importante activité a été manifestée sur *P. aeruginosa* avec une CMI de 2,34 mg/ml.

L'analyse phytochimique des quatre plantes a montré que 2/4 contenaient des alcaloïdes, 3/4 des tanins, 1/4 des glucosides d'anthocyanes, 2/4 des flavonoïdes, 3/4 des substances réductrices, 4/4 des stérols et/ou des triterpènes. Les anthraquinones n'ont été détectés dans aucun de ces échantillons.

Ces résultats confirment certaines utilisations ethnopharmacologiques des quatre plantes médicinales.

Mots-clé : Plantes médicinales, *Cissus petiolata*, *Harrissonia abyssinica*, *Maesopsis eminii*, *Pyrenacantha staudtii*, activité antibactérienne, tanins, alcaloïdes, flavonoïdes, huiles essentielles.

INTRODUCTION

Au Cameroun comme dans les autres pays en voie de développement, les maladies infectieuses et parasitaires constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence et leur gravité (Bourgeois,1999).

La situation est davantage plus préoccupante à cause de l'apparition des souches de microorganismes antibiorésistants et l'émergence des infections non communes (Vanden et Vlietinck,1991) qui compromettent les traitements à l'aide des médicaments existants.

Face à ces nombreux obstacles que présente l'utilisation des antibactériens disponibles, il est indispensable de rechercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces et à large spectre d'action.

Une des stratégies pour cette recherche consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle.

En effet, l'OMS (2002) estime que, pour se soigner, 80 % de la population africaine recourt toujours à la médecine traditionnelle pour laquelle la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs des plantes médicinales. Ces espèces végétales d'aussi grande importance pour la santé des populations méritent d'être étudiées scientifiquement pour leur meilleure utilisation.

Ce d'autant plus que la flore du Cameroun est riche et variée, mais elle demeure très peu exploitée scientifiquement.

Le présent travail porte sur quatre plantes souvent utilisées efficacement dans le traitement traditionnel de diverses maladies infectieuses au Cameroun et ailleurs (tableau 1). Il s'agit d'étudier les effets des extraits hydroéthanoliques de ces plantes sur la croissance in vitro de certains des germes impliqués dans les pathologies pour lesquelles nos plantes sont indiquées. Notre objectif est d'identifier toujours davantage des substances possédant des propriétés antibactériennes ainsi que de rationaliser l'utilisation des plantes médicinales.

Tableau 1 : Plantes médicinales étudiées

Famille et Nom botanique	Organes utilisés	Usages traditionnels	
		Au lieu de récolte(kombo)	Dans la littérature
Vitacées <i>Cissus petiolata</i>	Feuilles	Gonococcie, fracture des os	Gonococcie, troubles intestinaux, fracture des os (Bouquet et Debray, 1974)
Simaroubacées <i>Harrisonia abyssinica</i>	Feuilles	Diarrhées	Diarrhées, troubles intestinaux, maladies vénériennes, Hémorroïdes, fébrifuge, antidote diabète, plaies profondes (Watt et Breyer, 1962 ; Ananil et al.,2000 ; Abamoyi, 1996)
Rhamnacées <i>Maesopsis eminii</i>	Ecorces de tige	Envoûtement(en association au jus de canne), gonococcie.	Gonococcie, purgatif, diurétique (Raonda et Silans, 1961) Alimentation (Dessoutier, 1999)
Icacinacées <i>Pyrenacantha staudtii</i>	Feuilles	Diarrhées	Menace d'avortement, diarrhées, coliques intestinales (Aguwa et Okunji , 1986 ; Agbakwuru, 2002)

MATERIEL ET METHODES

1.1 – Matériel végétal

Les plantes (tableau 1) ont été récoltées dans la localité de Kombo, village situé dans la province du Centre, Département du Nyong et Mfoumou, au mois de juillet 2002.

L'identification botanique a été réalisée à l'Herbier National de Yaoundé. Les échantillons acheminés au Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I ont été séchés à température ambiante à l'abri du soleil, puis finement broyés et extraits dans un mélange eau – éthanol V/V.

1.2 – Les microorganismes

Les germes testés sont souvent impliqués dans les pathologies pour lesquelles les quatre plantes sont indiquées. Il s'agit d'une souche de *Staphylococcus aureus* obtenue au Laboratoire d'Analyses Médicales T. Bella (Yaoundé-Cameroun), une souche de *Escherichia coli* et une souche de *Pseudomonas aeruginosa* obtenues au Centre Pasteur du Cameroun (Yaoundé). Ces germes ont été conservés par repiquage sur milieux gélosés.

1.3 – Obtention des extraits végétaux

Les extraits hydroéthanoliques ont été obtenus par macération (48 heures) de 100 g de matériel végétal pulvérisé dans 800 ml de mélange éthanol-eau V/V. Les filtrats obtenus sur papier filtre sont alors évaporés à l'aide d'un rotavapor. Les solutions résultantes sont séchées à l'étuve (50°C). Les résidus obtenus sont conservés à 4°C avant la réalisation des tests antibactériens.

1.4 – Essais antibactériens

Test de sensibilité : L'inhibition de la croissance bactérienne *in vitro* a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu solide (Ananil et al.,2000).

Avec un emporte – pièce des puits sont creusés dans la gélose de Mueller-Hinton coulée dans des boîtes de Pétri et ensemencée par un germe – test. Les diamètres d'inhibition sont ensuite mesurés autour des puits après une pré-incubation de 45 mn à température ambiante et une incubation à l'étuve à 37° C pendant 18 heures.

Mesure de l'activité : La macrométhode de dilution en milieu liquide (Delarras,1998) est utilisée pour déterminer les paramètres de l'inhibition de la croissance bactérienne (CMI, CMB), des extraits actifs.

Concentration minimale inhibitrice (CMI) : Une série de 10 dilutions de chaque extrait a été réalisée dans de l'eau peptonée contenant du rouge de phénol à 0.01 % et du glucose à 1%. Chaque tube de la série est ensemencé par un inoculum standardisé de 8.10^5 cellules. Après une incubation de 18 heures à 37°C, la CMI de l'extrait testé est déterminée. Elle représente la concentration du 1^{er} tube de la série dans lequel le rouge de phénol n'a pas viré au jaune (cas des bactéries fermentant le glucose). Pour les bactéries ne fermentant pas le glucose, la CMI correspond à la concentration du 1^{er} tube dans lequel il y a absence du trouble dû à la croissance, comparativement au témoin.

Concentration minimale bactéricide(CMB) : La gélose nutritive coulée dans des boîtes de pétri est ensemencée en stries par 100 µl des contenus des tubes ayant une concentration \geq CMI dans la série de dilution précédente. La CMB est déterminée après une incubation de 24 heures à 37°C. C'est la plus petite concentration qui inhibe totalement la croissance.

1.5 – Screening phytochimique

Le matériel végétal pulvérisé est épuisé successivement par macération dans des solvants de polarité croissante (chloroforme, méthanol, eau). Les tests phytochimiques pour les tanins, les alcaloïdes, les anthraquinones, les flavonoïdes, les saponosides , les huiles essentielles ont été réalisés d'après la méthode décrite par Abayomi, (1996). Les résultats sont notés – (négatif) ou + (positif).

II – RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 2 : Diamètre d'inhibition de la croissance des germes testés

Microorganisme	Diamètre d'inhibition (en mm)				
	<i>C. petiolata</i>	<i>H. abyssinica</i>	<i>M. eminii</i>	<i>P. staudtii</i>	Gentamicine
<i>E. coli</i>	11	9,6	< 7	11	23,6
<i>P. aeruginosa</i>	12	13	< 7	15	25,6
<i>S. aureus</i>	< 7	11,6	15	14,6	27

Les résultats des tests préliminaires des activités antibactériennes sont présentés dans le tableau 2 . Il y apparaît que chacune des quatre plantes a une activité assez bien définie sur la croissance d'au moins une des bactéries testées. Les diamètres d'inhibition varient de 9,6 à 15 mm. Pour cette méthode de diffusion, un extrait est considéré comme actif lorsqu'il induit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm. Ainsi, l'extrait de *Pyrenacantha staudtii* s'est révélé le plus actif en induisant les diamètres de 11 ;14,6 et 15 mm sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* respectivement. *Harrissonia abyssinica* inhibe la croissance de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* avec des diamètres de 11,6 et 13 mm. Cette action de *H. abyssinica* confirme les résultats de Ananil et al (2000) sur les mêmes souches. *E. coli* et *P. aeruginosa* sont résistants vis à vis de l'extrait de *Maesopsis eminii* qui par contre a présenté une bonne action sur *S. aureus* (15 mm).

Dans l'ensemble, *P. aeruginosa* et *S. aureus* se sont révélés plus sensibles aux extraits étudiés.

Cependant, les diamètres d'inhibition induits par tous ces extraits restent inférieurs à ceux de l'antibiotique de référence ,la gentamicine, pour l'ensemble des souches.

Traditionnellement, les quatre plantes sont utilisées pour soigner la diarrhée, les infections urogénitales, les syndromes dysentériques et pour désinfecter les plaies (tableau 1). Par conséquent, l'inhibition de la croissance de *E. coli* , *P. aeruginosa* et *S. aureus* , bactéries responsables de ces pathologies (Fauchère et Avril,2002) , permet de justifier au moins partiellement les usages ethnopharmacologiques de ces plantes.

Tableau 3 : Composition chimique des échantillons

Echantillons	Flavonoïdes	Alcaloïdes		Huiles essentielles	Saponosides	Tanins		Glucosides d'anthocyane	Sterols et/triterpène	Glucosides stéréodiques	Anthraquinones	Substances réductrices	Glucosides triterpénoïdiques
		Bases	Sels			Galliques	Cathéchiques						
<i>Cissus petiolata</i>	++	-	-	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>Harrisonia abyssinica</i>	-	-	+	-	-	+	+	-	+	++	-	++	-
<i>Maesopsis eminii</i>	-	-	-	++	+	-	++	++	+	-	-	++	-
<i>Pyrenacantha staudtii</i>	++	-	++	-	++	++	-	-	++	++	-	++	-

Les activités observées sont par ailleurs expliquées par les résultats de l'analyse chimique des plantes (tableau 3) qui révèle la présence des composés tels que les alcaloïdes, les tanins, les huiles essentielles, les flavonoïdes dont les propriétés antimicrobiennes ont déjà été démontrées (Cowan, 1999 ; Kolodziej et al., 1999 ; Amvam et al. 1998). La plupart de ces composés ont été mis en évidence dans l'extrait de *P. staudtii*, ce qui permet d'expliquer son importante activité aussi bien sur les bactéries Gram(-) que sur les Gram(+).

La détermination des paramètres d'inhibition (CMI et CMB) nous a permis non seulement de confirmer, quantifier et comparer les activités, mais aussi de caractériser la nature de l'effet révélé par un extrait sur un microorganisme donné.

Tableau 4 : Diamètre d'inhibition de la croissance (DIC), concentration minimale inhibitrice (CMI), concentration minimale bactéricide (CMB), rapport CMB/CMI des extraits actifs.

Extraits	DIC (mm)	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB/CMI	microorganismes
<i>Cissus petiolata</i>	11	9,37	75	8	<i>E. coli</i>
<i>Pyrenacantha staudtii</i>	11	9,37	18,75	2	
Gentamicine	23,6	2 (µg/ml)	2 (µg/ml)	1	
<i>Harrissonia abyssinica</i>	11,6	9,37	18,75	2	<i>S. aureus</i>
<i>Maesopsis eminii</i>	15	4,68	37,5	8	
<i>Pyrenacantha staudtii</i>	14,6	4,68	9,37	2	
Gentamicine	27	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	2	
<i>Cissus petiolata</i>	12	18,75	75	4	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Harrissonia abyssinica</i>	13	4,68	9,37	2	
<i>Pyrenacantha staudtii</i>	15	2,34	4,68	2	
Gentamicine	25,6	0,5 µg/ml	1 µg/ml	2	

Le tableau 4 compare les résultats obtenus par la méthode de diffusion en milieu solide d'une part et la méthode de dilution en milieu liquide d'autre part. Il relève que :

- Les valeurs de CMI concordent d'une manière générale avec celles des diamètres d'inhibition ; les extraits ayant induit une importante zone d'inhibition présentent les plus petites CMI sur les souches correspondantes . C'est le cas de *P. staudtii* sur *P. aeruginosa* et *S. aureus* , ou *M. eminii* sur *S. aureus*. *P. staudtii* présente la plus petite CMI (2,34 mg/ml) sur *P. aeruginosa* .
- Dans le cas de *C.petiolata*, et *H.abysinica* par contre, leurs activités sur *P.aeruginosa* par la méthode de diffusion sont identiques (12 et 13mm respectivement), alors que leurs CMI respectives (18,75 et 4,68 mg/ml) sont complètement différentes. Il apparaît donc que l'extrait de *H. abysinica* diffuse mal dans la gélose.

Il est par conséquent indispensable de compléter les tests en milieu solide par ceux effectués en milieu liquide.

Nous avons comparé les CMI et CMB d'un extrait sur un microorganisme donné. Selon la méthode de Fauchere et Avril (2002), pour laquelle une substance est bactéricide lorsque le rapport CMB/CMI est ≤ 2 , et bactériostatique lorsque ce rapport est > 2 .

Il en ressort que :

- *P. standtii* exerce un effet bactéricide sur *E.coli*, *P.aeruginosa* et *S.aureus* à 9,37 , 4,68 et 9,37 mg/ml respectivement.

Agbakwuru (2002) a observé une faible action bactériostatique de l'extrait méthanolique de cette dernière plante sur *E.coli* et *S.aureus*. Cette divergence entre les résultats des deux études est sûrement due à la nature des solvants d'extraction.

- *H abyssinica* est bactéricide à 9,37 mg/ml sur *P aeruginosa* et à 18,75 mg/ml sur *S. aureus*.
- *Cissus petiolata* et *Maesopsis eminii* par contre révèlent des effets bactériostatiques (CMB/CMl>2) sur les mêmes souches.

CONCLUSION

Ce travail préliminaire a permis de mettre en évidence les propriétés antibactériennes des extraits des organes, des quatre plantes étudiées. Les résultats obtenus révèlent la présence des principes actifs antibactériens dans chacune des plantes.

Certains extraits présentent des effets bactéricides. Les présents résultats justifient certains usages ethnopharmacologiques (diarrhées, maladies vénériennes, désinfection des plaies). Ils démontrent que ces plantes peuvent être utilisées pour soigner les maladies infectieuses.

Il serait par conséquent intéressant d'entreprendre des études de toxicité des extraits purifiés de ces plantes et d'envisager la mise au point des médicaments traditionnels améliorés (MTA) à court terme.

A cet effet, les MTA préparés à base de *P.staudii* et *H.abysinica*, plantes qui présentent les CMI les plus faibles ainsi qu'une activité de nature bactéricide pourraient être les plus efficaces.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre profonde gratitude à l'Herbier National (Yaoundé) pour l'identification des plantes ; au Laboratoire d'Analyses Médicales T.BELLA (Yaoundé), au Centre Pasteur du Cameroun (Yaoundé) pour la fourniture des souches.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1-ABAYOMI S. , (1996) *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d' Afrique. A la recherche d'agents bio-actifs*. Edition KARTHALA :191-219

2- AGBAKWURU E.O.P. (2002), The mouth, the rose, the medicine and the environment. Journées scientifiques de l'Université du Bénin.

3-AGUWA CN. And OKUNJI CO. , (1986), Gastrointestinal study of *Pyrenacantha staudtii* leaf extracts .*J. Ethnopharmacol.* 15(1):45-55

4 -AMVAM ZOLLO P. H. , BIYITI L. , TCHOUMBOUGNANG F. , MENUT C. , LAMATY G., et BOUCHET PH. , (1998) Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part XXXII Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal* 13 : 107-114.

5-ANANIL K. , HUDSON J. B. de SOUZAL C. , AKPAGANAL K. , TOWE G. H.N. , AMASON J. T. and GBEASSOR. (2000) Investigation of medicinal plants of TOGO for antiviral and antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology* 38 (1) : 40-45

6-BOUQUET A et DEBRAY M , 1974 , *Plantes médicinales de la Côte – d'Ivoire*. Travaux et document de l'ORSTOM ,32 Paris : 15-16.

7-BOURGEOIS A., 1999 , *Les MST/SIDA au Cameroun .Biodiagnostic and therapy .Magazine bilingue de santé au Cameroun N°004*

8-COWAN M. M., 1999, Plants products as anti-microbial activity. *Clinical Microbiology Reviews* 4 (12) : 564-582.

9-DELARRAS C., 1998 , *Microbiologie. 90 heures de travaux pratiques*. Gaétan Morien Editeur. : 169-178.

10- DESSOUTIER, (1999), Les données statistiques sur les produits forestiers non ligneux au Rwanda EC/FAO. Rapport technique AFDCA/IN15

11-FAUCHERE J-L , AVRIL J-L (2002) *Bactériologie générale et médicale*. Editions Ellipses.

12-KOLODZIEJ H., KAYSER O. , LATTE P. K. and FERREIRA D., 1999 , Evaluation of the anti-microbial potency of tannins and related compounds using the microdilution broth method. *Planta Medica* 65 : 444-446.

12-OMS , (2002) Stratégie de l'OMS pour la médecine Traditionnelle pour 2002-2005

13-RAPONDA-WALKER A. et SILLANS R. , 1961 , *Les plantes utiles du Gabon . Essai d'inventaire et de concordance des noms vernaculaires et scientifiques des plantes spontanées et introduites. Description des espèces, propriétés , utilisations économiques ,ethnographiques et artistiques.* Edition Paul Lechevalier. : 354-355

14-VANDEN B.D.A. and VLIETINCK A.J., 1991, Screening methods for antibacterial and antiviral agent from higher plants. Academic Press 6 : 47-58.

15-WATT JM and BREYER-BRANDWIJK M.G.(1962) The medicinal poisonous plants of Southern and Eastern Africa 2nd edition.