

# ETUDE ANTIBACTÉRIENNE IN VITRO D'EXTRAITS ALCALOÏDIQUES DE *Holarrhena floribunda*, VIS-À-VIS DE *Escherichia coli* ENTEROPATHOGENÈ, SÉROTYPE O<sub>127</sub>.

KABORE Z. I., MILLOGO K. H.

Institut de Recherche sur les Substances  
Naturelles du C.N.R.S.T.  
03 BP 7192 Ouagadougou 03 - Burkina Faso

## RESUME

Dans le cadre de cette étude, il est mis en évidence une activité antibactérienne des extraits alcaloïdiques de *Holarrhena floribunda* vis-à-vis d'*Escherichia coli* O<sub>127</sub> sérotype entéropathogène du nourrisson, fréquemment rencontré dans les services hospitaliers au Burkina Faso (DABIRE, 1990). Une étude comparative de l'activité antimicrobienne a été faite à partir d'extraits d'échantillons récoltés sur trois sites de cultures expérimentales de plantes médicinales au Burkina Faso.

La teneur en conessine des différents extraits alcaloïdiques a été évaluée. Les activités inhibitrices et bactéricides des échantillons ont été déterminées à travers les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (C.M.I. et C.M.B.)

**Mots clés :** *Holarrhena floribunda* - Plante médicinale - Pharmacopée traditionnelle - Activité antibactérienne - Gastro-entérites - Alcaloïdes.

## SUMMARY

In the framework of this research, an antimicrobial activity of alkaloid extracts of *Holarrhena floribunda* in relation to *Escherichia coli* O<sub>127</sub> B<sub>8</sub>, was shown. *E. coli* is an infant enteropathogen serotype generally met in hospital localities in Burkina Faso. A comparative study of the different alkaloid extracts was determined. Inhibiting and bactericid activities were evaluated through Minimum Inhibiting Concentration (MIC) and Minimum Bactericid Concentration (MBC).

**Key-words** : *Holarrhena floribunda* - Medicinale Plant - Traditional Pharmacopoeia  
- Antibacterial activity -Gastro-enteritis - Alkaloïds.

## 1. INTRODUCTION

Au cours d'une investigation microbiologique élargie à des Gram négatif et Gram positif dans le domaine de la recherche de nouveaux agents thérapeutiques d'origine végétale, il est apparu indiqué d'entreprendre l'étude approfondie de *Holarrhena floribunda*. Ce travail fait suite aux résultats dignes d'intérêt obtenus par MILLOGO-KONE, 1992 et SOURABIE, 1993.

En médecine traditionnelle de l'Afrique de l'Ouest les écorces de racines et de tiges de *Holarrhena floribunda* sont prisées dans le traitement des maladies dysentériques, parasitaires (Kherharo, 1973).

Les études chimiques antérieures effectuées sur *Holarrhena floribunda*, notamment par GOUTAREL et collaborateurs (1964), ont montré la richesse des écorces de la plante en principes chimiques alcaloïdiques actifs (Goutarel, cité par Kherharo, 1973).

*Holarrhena floribunda* étant recommandée dans la tradithérapeutique des diarrhées dysentériques au sens général du terme, l'activité antibactérienne des extraits alcaloïdiques, quasi-négligée jusqu'ici est évaluée.

Un essai comparatif d'efficacité a été réalisé dans le cadre de la présente étude, entre des échantillons végétaux en provenance de stations expérimentales de culture.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Matériel

a) **Le support biologique** : il est constitué d'*Escherichia coli* O<sub>127</sub>, bactérie entéropathogène prélevée et identifiée à partir des selles d'un nourrisson au Centre Médical Saint-Camille de Ouagadougou.

b) **Le matériel végétal** examiné est constitué d'écorces de tiges de *Holarrhena floribunda*; écorces prélevées sur trois stations expérimentales de cultures de plantes médicinales au Burkina Faso : zone Ouest (Farako-Bâ/Bobo), zone Centre (Gampèla/Ouaga) et Parc botanique - CNRST/Ouaga).

c) **Les extraits végétaux** sont constitués d'alcaloïdes totaux sous forme de chlorhydrates hydrosolubles.

d) **Les milieux de cultures** sont constitués de Trypcase soy agar (gélose) et de Polytone (bouillon).

## **2.2. Méthodes**

### **a) Obtention des alcaloïdes totaux**

100 g de poudre fine d'écorces de tiges sont alcalinisés avec 100 ml d'ammoniaque 12,5%. On laisse sécher à l'air libre durant 12 heures. Les bases libérées sont extraites par macération à l'aide de chloroforme (1 litre) avec agitation magnétique durant 15 heures. Après filtration, le marc est réextrait avec 500 ml de chloroforme par agitation pendant 30 mn. Cette dernière opération est répétée jusqu'au test de Mayer négatif indiquant l'épuisement de la drogue en alcaloïdes totaux. Les filtrats réunis sont séchés sur du sulfate de sodium anhydre puis concentrés au 1/3 du volume, sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif.

### **b) Purification des alcaloïdes totaux**

La solution chloroformique obtenue en a) est épuisée par traitements successifs par de petites quantités d'une solution aqueuse sulfurique à 5%. Les sulfates d'alcaloïdes hydrosolubles obtenus sont déplacés sous forme de bases en milieu fortement alcalin à l'aide d'ammoniaque 25% et en présence de chlorure de méthylène jusqu'à test de Mayer négatif.

Les solutions organiques réunies sont lavées à l'eau jusqu'à neutralité, séchées sur du sulfate de sodium anhydre, filtrées et évaporées à sec sous pression réduite. Le résidu pesé à poids constant constitue le totum alcaloïdique.

### **c) Préparation des chlorhydrates d'alcaloïdes**

Le totum alcaloïdique en b) est dissous dans un minimum d'acétone. Par barbotage de gaz chlorhydrique dans la solution, il se forme un précipité blanc-laiteux de chlorhydrates d'alcaloïdes. L'opération est terminée quand le pH du milieu est franchement acide. Le précipité est filtré puis rincé à l'acétone jusqu'à neutralité. Les chlorhydrates sont conservés sous dessiccateur à l'abri d'humidité avant leur emploi.

#### **d) Dosage de la conessine par spectrophotodensimétrie sur couche mince de silice :**

La teneur en conessine des différents échantillons végétaux est déterminée par dosage spectrophotodensimétrique sur couche mince à l'aide d'une courbe étalon de conessine.

Les échantillons de chlorhydrates d'alcaloïdes totaux des différents échantillons sont dissous dans l'eau distillée à la concentration de 5 mg/ml. Les échantillons sont déposés sur plaque TLC (1 microlitre) ainsi que les solutions étalons (1 microlitre). La plaque est séchée en atmosphère ambiante et plongée dans la cuve à chromatographie contenant le solvant de migration composé d'acétate d'éthyle, d'hexane, de diéthylamine dans les proportions 74-24-6.

Après migration, la plaque est séchée à l'étuve à 105°C pendant 2 heures. La révélation des spots se fait au Dragendorff. La densité des spots est mesurée au spectrophotodensimètre Shimadzu CS 930 High Speed TLC Scanner.

#### **e) Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB)**

Après 3 repiquages successifs de 24 heures de la souche *E. coli* O<sub>127</sub> sur milieu gélosé (TSA), une suspension bactérienne est mise en route pour 18 heures au bout desquelles on détermine sa densité. 50 µl de cette suspension sont mis en contact avec différentes concentrations de l'extrait à tester.

La CMI est déterminée par la plus petite concentration ne permettant pas de pousse visible à l'oeil nu. Pour déterminer la CMB, un prélèvement est effectué dans tous les tubes ne présentant pas de pousse visible, ensemencé en gélose profonde et mis en incubation à 37°C pendant 18 heures. La CMB est déterminée par la plus petite concentration qui tue 99,99% de la population bactérienne.

### **3. RESULTATS**

Les extraits totaux obtenus des échantillons en provenance des stations expérimentales de culture ont été dosés quant à leurs teneurs en principes alcaloïdiques ; ces résultats sont consignés dans les tableaux 1 et 3.

Le tableau 2 représente les valeurs de référence, en terme de concentration de conessine (courbe étalon).

**Tableau 1** : Teneur en alcaloïdes totaux des échantillons *H. floribunda* en provenance des stations expérimentales de culture.

Station de culture:	Prise d'essai en g	Diam. des rameaux en cm	Poids d'alcaloïdes totaux en g	Teneur d'alc. (%)
Gampèla	250	5<x<7	1,28	0,51
	100	7<x<9	1,04	1,04
Farako-Bâ	250	5<x<7	6,51	2,60
	100	7<x<9	2,86	2,86
CNRST/Parc	250	5<x<7	2,40	0,96
	100	7<x<9	0,99	0,99

**Tableau 2** : Valeurs de référence en terme de concentration en conessine (courbe étalon)

Prise d'essai de conessine en mg/ml	Concentration en conessine en unité arbitraire
0,40	9.972,65 ± 787,15
0,60	15.496,29 ± 1.581,08
0,80	17.072,10 ± 971,66

**Tableau 3** : Teneur en conessine des échantillons en provenance des stations de culture

Station de culture de :	Alcaloïdes totaux en mg/ml	Concentration en conessine en unité arbitraire	Conessine en mg/ml	Teneur en conessine en %
Farako-Bâ	2	15.732,05	0,34	17,25 ± 0,2
CNRST	2	27.360,81	0,66	33,5 ± 0,30
Gampèla	5	9.138,270	0,16	3,28 ± 0,35

**Tableau 4** : Concentrations Minimales Inhibitrices et Concentrations Minimales Bactéricides des extraits alcaloïdiques des échantillons de culture.

Stations de culture de :	Teneur en conessine en %	C.M.I. en mg/ml	C.M.B. en mg/ml
Farako-Bâ	17,25	1,25	1,25
CNRST	33,5	1,25	1,25
Gampèla	3,28	0,625	0,625

## CONCLUSION

Les alcaloïdes totaux des échantillons du CNRST et de Farako-Bâ présentent les mêmes profils inhibiteurs et bactéricides vis-à-vis de *E. coli* O<sub>127</sub> (CMI = CMB = 1,25 mg/ml), ceci malgré une différence significative du point de vue de la teneur en conessine (33,5 % et 17,25 %).

L'échantillon végétal de Gampèla, le plus pauvre en conessine s'avère cependant plus efficace vis-à-vis de *E. coli* (CMI = CMB = 0,625 mg/ml). Cette différence d'activité laisse présumer que la conessine ne pourrait être considérée comme le seul élément déterminant dans l'activité antibactérienne de l'extrait étudié. Issus de rameaux de même origine et transférés sur des sites de cultures différents, les pieds de *H. floribuna* des trois

stations expérimentales présentent des différences significatives du point de vue de leurs teneurs en principes alcaloïdiques (tableau 1 et 4). A la lumière de ces observations, la station expérimentale de Farako-Bâ paraît la plus indiquée pour l'exploitation future à grande échelle d'alcaloïdes totaux de *H. floribuna*.

## BIBLIOGRAPHIE

- DABIRE C. (1990)** : Rapport annuel des activités du laboratoire biologique du Centre Hospitalier Saint-Camille de Ouagadougou.
- GUINKO S. (1984)** : Végétation de la Haute Volta, Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences, Université de Bordeaux III.
- GOUTAREL R. (1964)** : Les alcaloïdiques des Apocynacées, Hermann Edit., Paris, pp. 166-171
- KERHARO J. (1973)** : La Pharmacopée sénégalaise traditionnelle - Plantes médicinales et toxiques, Edit. Vigot Frères, Paris 163.
- MILLOGO-KONE H. (1992)** : Contribution à l'étude chimique et microbiologique de *H. floribuna* (G. Don) Dur. et Schinz. (Apocynacées) : étude de l'activité antimicrobienne des alcaloïdes et leur évaluation toxico-pharmacologique - Thèse de Doctorat de 3ème cycle - Université de Ouagadougou, 117p.
- SOURABIE S. (1993)** : Contribution à l'étude chimique et microbiologique de *Nauclea latifolia* Sm (Rubiacees) : étude de l'activité antimicrobienne comparée des extraits hydroalcooliques et alcaloïdiques vis-à-vis d'Entérobactéries responsables de gastro-entérites au Burkina Faso - Thèse de Doctorat de 3è cycle - Université de Ouagadougou, 142 p.