



Evaluation de l'activité des feuilles de *Mallotus oppositifolius* (Geisel.) Müll.-Arg (Euphorbiaceae) sur des bactéries multirésistantes et criblage phytochimique

N. J. KOUADIO^{1,2,3*}, N. K. GUESSENND², M. W. KONE^{1,2,3},
B. MOUSSA^{2,3}, Y. M. KOFFI^{1,3}, K. B. GUEDE^{1,2}, K. YAO³,
A. BAKAYOKO^{1,3}, H. F. TRABI¹ et M. DOSSO²

¹UFR des Sciences de la Nature, Université Nangui Abrogoua (UNA), Côte d'Ivoire.

²Laboratoire de Bactériologie- Virologie, Institut Pasteur, Côte d'Ivoire.

³Centre Suisse de Recherche Scientifique en Côte d'Ivoire, Côte d'Ivoire.

*Auteur correspondant ; E-mail: kouadiongnessanjules@gmail.com; Tel : (+225)06130288

RESUME

Mallotus oppositifolius (Geisel.) Müll.-Arg (Euphorbiaceae) est une plante de la flore ivoirienne couramment utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de plusieurs pathologies telles que : la diarrhée, les infections urinaires, les plaies chroniques, l'ulcère de Burili... La complexité curative de certaines maladies associées à la résistance bactérienne, a mis en évidence l'inefficacité de certains antibiotiques conventionnels. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits bruts hexanique, hydro-méthanolique et aqueux des feuilles de cette plante sur des bactéries multirésistantes et de caractériser les composés chimiques présents dans l'extrait le plus efficace. La méthode de dilution en milieu liquide utilisant la gélose Muller-Hinton® a permis d'évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait. Pour le criblage phytochimique, la méthode de caractérisation par chromatographie sur couche mince a été utilisée. Les résultats obtenus montrent que les extraits aqueux et hydro-alcooliques ont été actifs sur toutes les souches étudiées et sont bactéricides sur la majorité. Le criblage phytochimique a mis en évidence une richesse en métabolites secondaires tels que: les saponosides, les tanins, les flavonoïdes, lactones sesquiterpéniques, les polyphénols, les alcaloïdes, les coumarines pouvant être bénéfiques dans la prise en charge de nombreuses pathologies dont celles causées par les bactéries étudiées. Ce travail a permis de donner un fondement scientifique à l'utilisation de *Mallotus oppositifolius* dans la pharmacopée traditionnelle notamment dans le traitement des pathologies bactériennes.

© 2015 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés: Antibactérienne, plantes médicinales, flore ivoirienne, extraits bruts, *Mallotus oppositifolius*.

INTRODUCTION

Dans les pays en développement, les maladies infectieuses constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence et de leur gravité. En effet, elles sont à l'origine

de plus de 17 millions de décès par an dans le monde dont plus de la moitié provient du seul continent africain (OMS, 2006). Ainsi, la découverte des antibiotiques a été un véritable soulagement pour l'humanité car ces remèdes

© 2015 International Formulae Group. All rights reserved.

DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v9i3.10>

ont permis de réduire considérablement l'incidence des maladies infectieuses surtout dans les pays développés. Mais, l'usage déraisonné et souvent incontrôlé de ces molécules a provoqué un phénomène de résistance chez beaucoup d'agents infectieux (Guessennd et al., 2009). Dans les pays en développement, pour des raisons culturelles et de difficultés économiques, les populations ont toujours eu recours aux plantes pour se soigner. Aussi, de nos jours, avec le coût sans cesse élevé des prix des médicaments disponibles, associé à l'émergence des agents pathogènes multirésistants, on note un regain d'intérêt pour la pharmacopée africaine (Akoua et al., 2004; Guillemot et al., 2004 ; Konan et al., 2013). Face à ces différents obstacles d'ordre financier et aux échecs répétés des traitements dus à la résistance des microorganismes aux anti-infectieux, il est indispensable de rechercher de nouvelles substances efficaces pour la prise en charge effective des malades. Pour le faire, le principal réservoir à explorer est le domaine des plantes médicinales. Afin d'identifier davantage des substances possédant des propriétés antibactériennes et de rationaliser leur utilisation, nous nous sommes intéressés à *Mallotus oppositifolius* (Euphorbiaceae). Cette plante est utilisée dans la pharmacopée ivoirienne pour traiter plusieurs pathologies telles que la pneumonie, la stérilité féminine, la toux, la diarrhée, les infections urinaires, la tuberculose, l'ulcère de Burili et les plaies chroniques (Ké Kukuia et al., 2012 ; Kouadio, 2013; Soladoye et al., 2013). Le présent travail vise à évaluer l'activité antibactérienne des feuilles de *M. oppositifolius* sur des souches d'*Escherichia coli* productrices de betalactamase à spectre élargi (BLSE), de *Staphylococcus aureus* résistantes à la Mécicilline (SARM) et de *Pseudomonas. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes (PARC) qui ont été isolées dans des cas de diarrhée, d'infections urinaires, des pus de plaies... et à réaliser un criblage phytochimique.

MATERIEL ET METHODES

Préparation des extraits bruts

Les extraits bruts ont été obtenus selon la méthode décrite par Zihiri et al. (2003). Trois solvants ont été utilisés pour réaliser les extractions. Ce sont: l'hexane, le méthanol 70% et l'eau distillée. Dans 1 litre d'hexane, 125 g de poudre végétale ont été macérés pendant 24 heures. Les filtrats obtenus ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40 °C puis séchés sous la hotte pour obtenir les extraits hexaniques. Le résidu a été séché sur du papier buvard et pesé puis introduit dans 1litre de méthanol 70%. Après 24 heures de macération, le filtrat est évaporé au rotavapor pour éliminer l'alcool et le résidu aqueux est séché à l'étuve à 50 °C pour donner l'extrait méthanolique 70%. Quant à l'extrait aqueux, il a été obtenu par macération de 125 g de poudre végétale dans 1 litre d'eau distillée pendant 24 heures et le filtrat obtenu a été séché à 50 °C à l'étuve. Ces extraits ont été conservés au réfrigérateur à 4 °C.

Test de stérilité

Ce test avait pour but de vérifier que l'extrait ne comporte aucune bactérie ou champignon. Pour cela, 0,1 g de l'extrait à tester a été mis dans 10 ml de bouillon thioglycolate et incubé à 37 °C pendant 24 heures. Après ce délai, la turbidité du bouillon est appréciée à l'œil nu. Ce bouillon a été ensuite ensemencé sur une boîte de Pétri contenant la gélose nutritive et une autre contenant la gélose Sabouraud puis incubées dans les mêmes conditions, pendant trois jours avec une observation toutes les 24 heures pour vérifier si des germes ont poussé dans les boîtes de Pétri. La substance est dite stérile, si aucune colonie n'est visible sur la boîte gélosée.

Les souches bactériennes

Le support bactérien était composé de neuf isolats bactériens dont six isolats cliniques comprenant deux souches de *E. coli* (BLSE), deux souches de *S. aureus* (SARM) et deux souches de *P. aeruginosa* (PARC). Le

contrôle de qualité est assuré par trois souches de référence: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853. Toutes ces souches bactériennes proviennent de l'Unité des Antibiotiques, des Substances Naturelles et de la Surveillance des Microorganismes aux Anti-Infectieux (ASSURMI) du Département de Bactériologie et Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Un antibiogramme réalisé antérieurement nous a renseignés sur le profil de chaque souche utilisée dans cette étude.

Etude antibactérienne

Préparation d'inoculum pour les tests en milieu solide

L'inoculum a été préparé à partir d'une colonie jeune de 24 h. Elle a été émulsionnée dans 2 ml de suspension NaCl 85%. Ensuite, la densité optique a été ajustée à 0,5 Mac Farland à l'aide d'un densimat. Un volume de 100 µl pour *E. coli*, 1000 µl pour les *S. aureus* et 10 µL pour les *P. aeruginosa* ont été introduits dans 10 ml d'eau physiologique (0,9% de NaCl) constituant ainsi l'inoculum bactérien estimé à 10⁶ bactéries/ml.

Tests d'efficacité

Ce test a été réalisé par la méthode de diffusion en milieu solide (Dosso et Faye-Kette, 2000; Koné et al., 2004). Pour le faire, une solution de concentration 100 mg/ml d'extrait a été préparée. Des boîtes de Pétri contenant de la gélose Muller-Hinton ont étéensemencées par inondation avec l'inoculum préparé. Ensuite, des cupules ont été creusées en enfonçant le gros bout d'une pipette Pasteur dans la gélose et remplies avec 50 µl de la solution d'extraits préparés. L'ensemble a été incubé à 37 °C pendant 24 heures. Après ce délai, le diamètre d'inhibition autour de chaque cupule a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse. L'appréciation de l'efficacité des extraits a été faite selon le critère de Ponce et al. (2003). Ainsi, une substance est dite inefficace si le diamètre d'inhibition est inférieur à 8 mm alors qu'elle est dite efficace si le diamètre est compris entre 9 et 14 mm.

Par contre, elle est jugée très efficace lorsque le diamètre est compris entre 15 et 19 mm puis extrêmement efficace si le diamètre est supérieur à 20 mm.

Le test d'efficacité a permis la sélection des extraits les plus efficaces pour la détermination des paramètres antibactériens. Ainsi les extraits dont le diamètre d'inhibition est supérieur à 10 mm, ont été retenus.

Préparation de l'inoculum pour les tests en milieu liquide

Deux colonies bactériennes de 24 heures ont été prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur et émulsionnées dans un tube à essai contenant 10 ml de bouillon Muller-Hinton stérile. Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 3 heures. Après cette incubation, une suspension de 0,3 ml de cette pré-culture a été prélevée et diluée dans 10 ml de bouillon Muller-Hinton stérile puis homogénéisée.

Préparation de la gamme de concentration

Une solution de concentration à 50 mg/ml des extraits retenus a été préparée. Une série de dilutions de raison 2, a été effectuée à partir de cette solution afin d'obtenir, des gammes de concentrations allant de 50 à 0,097 mg/ml.

Détermination des paramètres antibactériens

La détermination des paramètres antibactériens a été réalisée par la dilution en milieu liquide selon la méthode utilisée par Konan et al. (2013). Ainsi, dans 10 tubes à hémolyse expérimentaux, 1 ml de chaque gamme de concentration d'extrait de plante, a été mis en contact avec 1 ml d'inoculum bactérien. Le tube témoin de croissance a reçu 1 ml d'eau distillée stérile en plus de l'inoculum alors que le témoin de stérilité n'a reçu que du Bouillon Muller-Hinton (BMH) stérile. Les tubes ont été incubés pendant 24 heures à 37 °C. Après ce temps d'incubation, une observation à l'œil nu a été effectuée et la plus faible concentration pour laquelle aucune croissance bactérienne n'a été observée à l'œil nu correspond à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). Quant à la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) qui désigne: la Concentration Minimale Bactéricide, est la

concentration d'une substance permettant d'obtenir, après 24 h d'incubation à 37 °C, 0,01% de bactéries viables. Sa détermination a commencé par la numération. Celle-ci a consisté à diluer l'inoculum de départ de 10⁻¹ à 10⁻⁴ et à ensemer ces différentes dilutions à l'aide d'une anse calibrée de 2 µl en stries de 5 cm de long, sur une Gélose Muller-Hinton (GMH) puis incubé pendant 24 heures. Ces boîtes de Pétri ont été nommées A. Après la lecture des CMI, le contenu des tubes dans lesquels il n'y a pas eu de croissance visible a servi à ensemer la gélose Muller-Hinton sur des stries de 5 cm. Cette série de boîtes de Pétri est nommée B. La CMB a été déterminée en comparant la croissance bactérienne des boîtes A et B. Ainsi, la plus petite concentration du tube qui a moins de 0,01% de bactéries viables par rapport à l'inoculum initial est la CMB.

Le rapport CMB/CMI a permis de préciser la modalité d'action d'une substance (Fauchere, 2002). Si le rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 2, la substance est dite bactéricide. Par contre, s'il est supérieur à 2, la substance est dite bactériostatique.

Criblage phytochimique

La mise en évidence des différents composés chimiques dans les extraits s'est faite par chromatographie sur couche mince (CCM). Cette méthode permet la mise en évidence de plusieurs groupes de métabolites secondaires par des colorations spécifiques soit dans le visible ou à une longueur d'onde donnée (Koné, 2005 ; N'gaman et al., 2009). Dix (10) mg d'extraits ont ainsi été dissouts dans 1 ml de méthanol absolu pour obtenir une solution d'une concentration de 10 mg/ml. Dix microlitres (10 µl), soit 100 µg de cette solution ont été déposés en spot sur une plaque de silicagel F₂₅₄ (phase stationnaire) à l'aide de tube micropillaire. Les plaques ont été mises dans des cuves préalablement saturées d'éluant ou phase mobile CHCl₃-MeOH-H₂O (65 : 35 : 5 v/v/v), puis séchées. Ces plaques ont été observées avant et après révélation, soit dans le visible ou sous une

lampe U.V., les rapports frontaux (Rf) des différentes tâches observées sont calculés selon la formule suivante.

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par le composé}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

Mise en évidence des terpénoïdes et saponosides

Ces composés sont mis en évidence avec le réactif de Godin. Après pulvérisation de la plaque au réactif de Godin suivi du chauffage à 100 °C pendant 10 min, on note l'apparition des diverses colorations. Dans le visible, l'observation des taches violettes, bleues et rouge indique la présence des monoterpènes. (Lhuillier, 2007). A l'UV 366 nm, l'observation de fluorescence jaune ou orange indique la présence de flavonoïdes (Chaaib Kouri, 2004).

Alcaloïdes

Après pulvérisation au réactif de Dragendorff et chauffage du chromatogramme à 100 °C pendant 10 min, les alcaloïdes apparaissent sous forme de taches orangées dans le visible.

Polyphénols

Après pulvérisation du Chromatogramme par le réactif de Folin-Ciocalteu 10%, puis chauffage à 100 °C pendant 10 min, les taches bleues observées dans le visible attestent la présence des polyphénols (Mallikharjuna et al., 2007).

Flavonoïdes et lactones sesquiterpéniques

Après pulvérisation du chromatogramme avec du chlorure d'aluminium (AlCl₃) à 5% (m/v) et chauffage, la présence de flavonoïdes est indiquée par les taches jaunes observables dans le visible ou sous UV à 366 nm (Lhuillier, 2007). Quant aux lactones sesquiterpéniques, elles sont indiquées par des fluorescences de diverses couleurs à 366 nm (Lagnika, 2005 ; Lhuillier, 2007).

Coumarines

L'acétate de plomb basique (CH₃COO) 2 Pb) à 5% (m/v) a été utilisé pour la pulvérisation du chromatogramme. Les spots de colorations vertes et bleues sous UV à 366 nm indiquent la présence des coumarines.

Tanins

L'apparition de taches de diverses couleurs (bleues, vertes, noires), observables dans le visible, après pulvérisation du chromatogramme par une solution de FeCl₃ à 10%, montre la présence de tanins.

Anthraquinones et anthrones

Une solution éthanolique de KOH à 5% a été giclée sur le chromatogramme. Les taches rouges observables dans le visible et à 366 nm confirme la présence des anthraquinones. Les anthrones par contre sont visibles à 366 nm sous forme de taches jaunes (Dohou et al., 2003). Après chauffage de la plaque par exemple les terpènes sont indiqués en violet et les saponines en bleu.

Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique a été faite à partir de l'analyse de la variance ANOVA-one way suivi du test Tukey pour la comparaison l'activité des extraits de feuilles de *M. oppositifolius* entre eux d'une part et avec les témoins à savoir le témoin négatif qui l'eau distillée et les antibiotiques (FEP, FOX et IPM), témoins positifs d'une part selon l'espèce bactérienne. Les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne ± Ecart-type. Les valeurs de probabilité P<0,05 ont été considérées statistiquement significatives. Tous les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel d'analyse statistique *GraphPad Prism 5*.

RESULTATS

Activité antibactérienne

Les extraits hydro-alcooliques et aqueux sont efficaces sur toutes les souches

étudiées avec des diamètres d'inhibition compris entre 11,00±0,57 et 24,33±0,67 mm pour les extraits au méthanol 70% et entre 10,67±0,67 et 18,33±0,33 mm pour les extraits aqueux (Tableaux 1a, 2b, 3c). Ces deux extraits sont plus actifs sur la souche 1541C/14 qui est une souche de *S. aureus* résistante à la méticilline avec une résistante croisée aux fluoroquinolones. A l'inverse, l'extrait hexanique n'a eu aucune activité sur ces souches. Ces deux premiers extraits ont alors été les extraits qui ont été retenus pour la détermination des paramètres antibactériens.

En ce qui concerne les paramètres antibactériens, la turbidité induite par la croissance des bactéries diminuait inversement avec la concentration d'extraits dans les tubes expérimentaux. Il est ressorti de cette expérience que l'extrait au méthanol 70% a présenté des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 0,097 et 1,56 mg/ml, alors que celles de l'extrait aqueux variaient de 0,78 à 3,125 mg/ml. Quant aux concentrations minimales bactéricides (CMB), elle variait de 0,19 à 3,125 mg/ml pour l'extrait méthanolique et de 1,56 à 6,25 mg/ml pour l'extrait aqueux (Tableaux 2a, 2b, 2c). L'extrait au méthanol 70% des feuilles de *Mallotus oppositifolius* est bactéricide sur 100% des souches testées, alors que l'extrait aqueux l'est sur 88,89% des souches.

Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique réalisé avec les extraits de feuilles *M. oppositifolius* a permis de déceler la présence de divers groupes de composés chimiques (Tableau 3). Ce sont les saponosides, les tanins, les flavonoïdes, les lactones sesquiterpéniques, les polyphénols, les alcaloïdes, les coumarines aussi bien dans les extraits hydro-alcoolique et aqueux, à l'exception des anthrones qui n'ont été caractérisés que dans l'extrait au méthanol 70%. Cependant, ces composés sont apparus que sous forme de trace dans l'extrait hexanique.

Tableau 1a: Diamètres des zones d'inhibition de feuilles de *M. oppositifolius* et d'antibiotiques sur les souches de *E. coli* BLSE et la souche de référence.

Bactéries	Codes	Diamètre d'inhibition (mm)				
		Ext Hex	Ext MeOH 70%	Ext Aq	H2O dist	FEP
<i>E. coli</i>	478C/14	6,00±0,0 ^c	11,33±0,67 ^b	10,67±0,67 ^b	6,00±0,0 ^c	16,33±0,67 ^a
	533C/14	6,00±0,0 ^b	11,00±0,57 ^a	11,00±0,57 ^a	6,00±0,0 ^b	6,67±0,67 ^b
	ATCC25922	6,00±0,0 ^d	14,67±0,33 ^b	12,67±0,33 ^c	6,00±0,0 ^d	27,67±0,33 ^a

Inclus le diamètre du puits, Ext Hex: extrait hexanique; Ext MeOH70%: extrait méthanolique 70%; Ext H₂O: extrait aqueux; ATCC: American Type Culture Collection FEP: Céfepime.

Tableau 1b: Diamètres des zones d'inhibition de feuilles de *M. oppositifolius* et d'antibiotiques sur les souches de SARM et la souche de référence.

Bactéries	Codes	Diamètre d'inhibition (mm)				
		Ext Hex	Ext MeOH 70%	Ext Aq	H2O dist	FOX
<i>S. aureus</i>	1541C/14	6,00±0,0 ^d	24,33±0,67 ^a	18,33±0,33 ^b	6,00±0,0 ^d	14,67±0,33 ^c
	499C/14	6,00±0,0 ^c	24,33±0,67 ^a	17,33±0,67 ^b	6,00±0,0 ^c	18,33±1,00 ^b
	ATCC25923	6,00±0,0 ^d	18,67±0,88 ^b	14,67±0,33 ^c	6,00±0,0 ^d	27,00±1,00 ^a

Inclus le diamètre du puits, Ext Hex: extrait hexanique; Ext MeOH70%: extrait méthanolique 70%; Ext H₂O: extrait aqueux; ATCC: American Type Culture Collection FOX: Céfoxitine.

Tableau 1c: Diamètres des zones d'inhibition de feuilles de *M. oppositifolius* et d'antibiotiques sur les souches de PARC et la souche de référence.

Bactéries	Codes	Diamètre d'inhibition (mm)				
		Ext Hex	Ext MeOH 70%	Ext Aq	H2O dist	IPM
<i>S. aureus</i>	489C/11	6,00±0,0 ^b	18,67±0,67 ^a	17,33±0,67 ^a	6,00±0,0 ^b	6,00±0,0 ^b
	1076C/11	6,00±0,0 ^d	15,67±0,57 ^a	13,67±3,33 ^b	6,00±0,0 ^d	11,00±0,57 ^c
	ATCC27853	6,00±0,0 ^c	13,67±0,67 ^b	13,67±0,33 ^b	6,00±0,0 ^c	28,33±0,33 ^a

Inclus le diamètre du puits, Ext Hex: extrait hexanique; Ext MeOH70%: extrait méthanolique 70%; Ext H₂O: extrait aqueux; ATCC: American Type Culture Collection; IPM: imipénème.

Tableau 2a : Paramètres antibactériens des extraits de feuilles de *M. oppositifolius* sur les souches de *E. coli* BLSE et la souche de référence.

Bactéries	Extrait MeOH 70% (mg/ml)				Extrait aqueux (mg/ml)				FEP (µg/ml)
	CMI	CMB	CMB /CMI	Pouvoir	CMI	CMB	CMB /CMI	Pouvoir	CMI
478C/14	0,78	1,56	2	Bcide	3,12	6,25	2	Bcide	CMI > 4
533C/14	1,56	3,12	2	Bcide	3,12	6,25	2	Bcide	CMI > 4
ATCC25922	0,39	0,78	2	Bcide	0,78	1,56	2	Bcide	CMI < 4

CMI: Concentration Minimale inhibitrice; CMB: concentration minimale bactéricide; Bcide: Bactéricide; Bstatische: Bactériostatique, FEP: Céfepime.

Tableau 2b: Paramètres antibactériens des extraits de feuilles de *M. oppositifolius* sur les souches de *S. aureus* (SARM) et la souche de référence.

Bactéries	Extrait MeOH 70% (mg/ml)				Extrait aqueux (mg/ml)				FOX (µg/ml)
	CMI	CMB	$\frac{CMB}{CMI}$	Pouvoir	CMI	CMB	$\frac{CMB}{CMI}$	Pouvoir	
1541C/14	0,78	0,78	1	Bcide	1,56	3,12	2	Bcide	CMI > 32
499C/14	0,19	0,39	2	Bcide	0,78	1,56	2	Bcide	CMI > 32
ATCC25923	0,09	0,19	2	Bcide	0,78	1,56	2	Bcide	CMI < 32

CMI : Concentration Minimale inhibitrice; CMB : concentration minimale bactéricide;
Bcide : Bactéricide ; Bstatique : Bactériostatique ; FOX: Céfoxitine.

Tableau 2c: Paramètres antibactériens des extraits de feuilles de *M. oppositifolius* sur les souches de *P. aeruginosa* (SARM) et la souche de référence.

Bactéries	Extrait MeOH (mg/ml)				Extrait H ₂ O (mg/ml)				ATB (µg/ml)
	CMI	CMB	$\frac{CMB}{CMI}$	Pouvoir	CMI	CMB	$\frac{CMB}{CMI}$	Pouvoir	
489C/11	1,56	3,12	2	Bcide	1,56	3,12	2	Bcide	IPM : CMI > 8
1076C/11	1,56	3,12	2	Bcide	1,56	6,25	4	Bstatique	IPM : CMI > 8
ATCC27853	1,56	3,12	2	Bcide	1,56	3,12	2	Bcide	IPM : CMI < 8

CMI : Concentration Minimale inhibitrice; CMB : concentration minimale bactéricide;
Bcide : Bactéricide ; Bstatique : Bactériostatique ; IPM : imipenème.

Tableau 3 : Composés chimiques présents dans les feuilles de *M. oppositifolius*.

Composés chimiques	Extraits		
	Hexane	Méthanol	Eau
Saponosides	-	+	+
Tanins	-	+	+
Coumarines	-	+	+
Alcaloïdes	-	+	+
Flavonoïdes	-	+	+
Anthocyanes	-	+	+
Sesquiterpènes	-	+	+
Polyphénols	-	+	+
Anthrones	-	+	--

-- : Absence ; +: Présence.

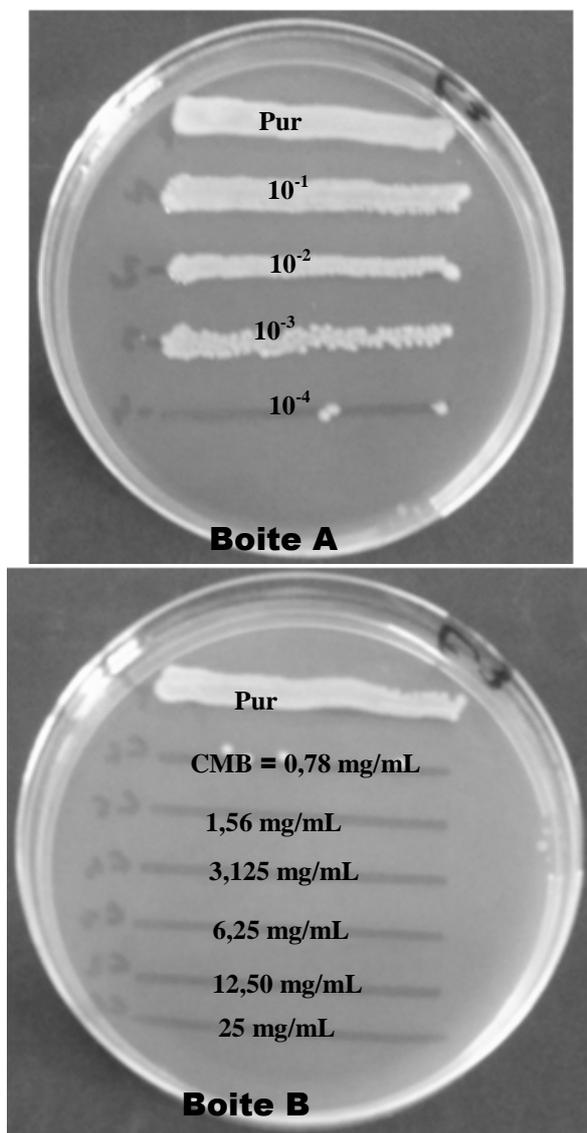


Photo 1 : CMB de l'extrait méthanolique de feuilles de *Mallotus oppositifolius* sur *S. aureus* 1541C/14.

DISCUSSION

Cette étude a eu pour objectif d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits hexanique, méthanolique 70% et aqueux de feuilles de *Mallotus oppositifolius* sur la croissance *in vitro* de bactéries multirésistantes. Cette étude a montré que les extraits méthanolique 70% et aqueux ont été actifs sur toutes les souches testées et sont respectivement bactéricides sur 100% et

88,89% des souches. Les extraits hexaniques n'ont présenté aucune activité sur les souches c'est-à-dire qu'il n'y a pas une différence significative entre l'activité de cet extrait et celle du témoin négatif qu'est l'eau distillée. Les résultats des tests phytochimiques ont révélé que ces composés ne sont que sous forme de trace dans ce solvant. Cette absence d'activité révélerait du fait que les composés

actifs semblent être presque insolubles dans l'hexane.

Les extraits méthanolique et aqueux de *M. oppositifolius* présentent une activité inhibitrice sur la croissance *in vitro* des bactéries étudiées. Cependant, sur les souches 1541C/14, 1076C/11 ainsi que sur toutes les souches de référence, l'extrait méthanolique 70% est significativement plus efficace que l'extrait aqueux ($P < 0,05$). Cela pourrait se justifier par une synergie entre un composé extractible dans l'eau et un autre extractible dans le méthanol (Kouadio, 2013).

Les extraits méthanolique 70% et aqueux de cette plante sont bactéricides sur la majorité des souches étudiées avec des CMI comprises entre 0,097 et 3,125 mg/ml. Kamanzi-Attindehou (2002), avait également montré que l'extrait hydro-alcoolique des feuilles de cette plante a une activité inhibitrice sur *S. aureus*. Cependant, les zones d'inhibition obtenues dans ce travail sont nettement supérieures. Cette différence peut se justifier par les méthodes utilisées car c'est la méthode de cupules qui a été utilisée en lieu et place de la méthode de disques buvards imprégnés. Selon Kamanzi-Attindehou (2002), toute la quantité d'extrait diffuse dans le cas des cupules alors qu'une partie est retenue dans le cas des disques buvards. Cette différence pourrait aussi se justifier par le moment de la récolte car les drogues végétales ont été prélevées au coucher du soleil alors que dans son étude, les récoltes ont eu lieu en pleine journée. Or, selon Kouadio (2013), les principes actifs sont plus concentrés dans les plantes du coucher du soleil jusqu'à minuit.

Traditionnellement, cette plante est utilisée dans le traitement de plusieurs pathologies d'origine bactérienne telles que des infections cutanées, les diarrhées et les infections urinaires (Ogni et al., 2014; Dibong et al., 2012; Kouadio, 2013). De même, *M. oppositifolius* est utilisée en médecine traditionnelle contre l'ulcère de Burili.

Or, Koné en (2001), a montré que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont impliquées dans la surinfection de cette maladie. En

outre, le criblage phytochimique réalisé sur les différents extraits de cette plante a révélé la présence de groupes chimiques tels que les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les hétérosides anthraquinones et les polyterpènes, dont les propriétés antibactériennes sont connues (Morel, 2011; Daliga, 2011). Les tanins par exemple, sont réputés pour leur capacité à inhiber la croissance de nombreux microorganismes dont les bactéries (Sepúlveda et al., 2011). En plus de cette propriété, les tanins sont dotés de pouvoir astringent et cicatrisant. Cela donne une justification scientifique à l'usage de cette plante dans le traitement de l'ulcère de Burili. Quant aux flavonoïdes, ils sont dotés de propriétés antifongiques et antibactériennes. En plus de ces deux premiers groupes, il y a aussi le groupe des quinones et dérivés qui possèdent des propriétés antimicrobiennes (Jackson, 2000; Hoffman, 2003). Les propriétés biologiques de ces composés permettent de justifier les activités antimicrobiennes manifestées dans cette étude et de mettre en relation ces activités et l'usage traditionnel de *M. oppositifolius* dans le traitement des pathologies d'origine bactérienne.

Conclusion

En définitive, cette étude a permis de montrer l'activité antibactérienne des feuilles de *M. oppositifolius* sur des souches d'*Escherichia coli* productrices de betalactamase à spectre élargi (BLSE), de *Staphylococcus aureus* résistantes à la Méricilline (SARM) et de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes (PARC) et aussi de déterminer les CMI et CMB. Cette activité est de nature essentiellement bactéricide. Par ailleurs, les groupes de composés chimiques, probablement responsables de cette activité ont été mis en évidence et sont mieux concentrés dans le solvant hydro-alcoolique. Ces travaux doivent se poursuivre afin de prouver l'innocuité de la plante et réaliser un fractionnement bioguidé afin d'isoler la ou les

molécules responsables de cette activité biologique.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Centre Suisse de Recherche Scientifique en Côte d'Ivoire (CSRS) le Département de Phytochimie du Centre Suisse de Recherche Scientifique de Côte d'Ivoire (CSRS CI) et le Département de Bactériologie et de Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) pour leur soutien technique dans la réalisation de ce travail.

REFERENCES

- Akoua KC, Guessend N, Gbonon V, Faye-kette AYH, Dosso M. 2004. Methicillin-resistant of *S. aureus* activity in Abidjan (1998-2001): A new hospital problem. *Medecines Maladies Infectieuses*, **34**(3): 132-136.
- Chaaib Kouri F. 2004. Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) (Rutaceae). Thèse de doctorat, Université de Lausanne, p 42.
- Daglia M. 2011. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **23**: 1-8.
- Dibong SD, Tchataat M, Yinyang J, Mvogo OPB, Ndjib RC, Mpondo ME. 2012. Valorisation des produits forestiers non ligneux spéciaux d'origine végétale vendus dans les marchés EST la ville de Douala (Cameroun). *J. Anim. Pl. Sc.*, **20**(1): 3067-3078
- Dohou N, Yamni K, Tahrouch S, Idrissi Hassani LM, Badoc A, Gmira N. 2003. Screening Phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine *Thymelaea lithroides*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. **142**: 61-78.
- Dosso M, Faye-Kette H. 2000. Contrôle de qualité de l'antibiogramme en pratique courante : Expérience du laboratoire de bactériologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. *Bactériolo int, n° spécial*, 53
- Fauchere LL, Avril JL. 2002. *Bactériologie Générale et Médicale*. Editions Ellipses : Paris.
- Guessennnd KN, Gbonon VC, Tiékoura KB, Kakou-N'douba A, Ouattara DN, Boni-Cissé C, Dosso M. Le GER-BMR. 2009. Evolution 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, p.17
- Guillemot D, Maugendre P, Vhauvin STC. 2004. Consommation des antibiotiques en France. *BEH.*, **3233**:141-147.
- Hoffman D. 2003. *Medical Herbalism: The Science and Practice of Herbal Medicine*. Inner traditions Bear & Company, Rochter: Vermont, USA.
- Jackson RS. 2000. *Wine Science: Principles, Practice, Perception*. Elsevier : San Diego.
- Lagnika L. 2005. Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes Béninoises. Thèse, Université Louis Pasteur Starsbourg/Université d'Abomey Calavi, p. 280.
- Lhuillier A. 2007. Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauriasalicifolia* Hook. F ex Oliver, *Agauria polyphylla* baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). France: Toulouse p. 280
- Kamanzi AK. 2002. Plantes médicinales de Côte d'Ivoire : Investigations phytochimiques guidées par des essais biologiques. Thèse, Université de Cocody, Abidjan, p.176.
- Ké Kukuia K, Ameyaw OE, Mante KP, Adongo WD, Woode E. 2012. Examen préalable des effets centraux des feuilles de *Mallotus oppositifolius* (Geiseler) Mull. Arg. chez la souris. *Pharmacologia*, **3**: 683-692.
- Konan KF, Guessennnd KN, Oussou KR, Bahi C, Coulibaly A, Djaman AJ, DOSSO M. 2013. Effet antibactérien de l'extrait

- aqueux de l'écorce de *Terminalia glaucescens* Planch ex Benth (Combretaceae) sur la croissance *in vitro* des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (EBLSE). *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **8**(3): 1192-1201.
- Koné M. 2001. Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne de *Chromolaena odorata* L. sur des germes de surinfection de l'ulcère de Burili. Mémoire de DEA, Université d'Abobo-Adjamé Abidjan, p. 49.
- Koné WM, Kamanzi AK, Terreaux C, Hostettmann K, Traore D, Dosso M. 2004. Traditional medicine in North Côte d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **93**: 43-49.
- Koné MW. 2005. Potentiel des plantes médicinales de cote d'ivoire dans le contrôle des haemochoses chez les ovins. Thèse. Université de Cocody, Abidjan, p. 224
- Kouadio NJ. 2013. Evaluation de l'activité antibactérienne de quatre (4) plantes médicinales sur la croissance *in vitro* de bactéries multirésistantes. Mémoire de Master, Université Nangui Abrogoua, Abidjan, p. 53.
- Mallikharjuna P B, Rajanna L N, Seetharam Y N, Sharanabasappa G K. 2007. Phytochemical studies of *Strchnos potatorum* L. F. a medical plant. *E. J. Chem.*, **4**(4) : 510-223.
- Morel S. 2011. Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Thèse. Université d'Angers, p.263.
- N'gaman KCC, Békro Y-A, Mamyrbékova-Békro JA, Béné A, Gooré Bi S. 2009. Sur la Composition en Métabolites Secondaires et L'activité Anti-Oxydante D'extraits Bruts de *Gmelina Arborea* Roxb. (Verbanaceae) de Côte d'Ivoire, Afrique del'Ouest: Analyse par Chromatographie en Couche Mince. *Eur. J. Sc. Res.*, **36**(2): 161-171.
- Ogni CA, Kpodekon MT, Dassou HG, Boko CK, Koutinhoun BG, Dougnon JT, Youssao AKI, Yedomonhan H, Akoegninou A. 2014. Inventaire ethnopharmacologique des plantes utilisées dans le traitement des pathologies parasitaires dans les élevages extensifs et semi-intensifs du Bénin, *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **8**(3): 1089-1102.
- OMS. 2006. Maladies infectieuses en Afrique. Situation et perspectives d'action. 7^{ème} Réunion du forum pour le partenariat avec l'Afrique. Moscou, Russie. p.19.
- Ponce AG, Fritz R, Del Alle C, Roura SI. 2003. Antimicrobial activity of essential oil on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaftund Technologic*, **36**: 679-684.
- Sepúlveda L, Ascacio A, Rodríguez-Herrera R, Aguilera-Carbó A, Aguilar CN. 2011. Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes. *Afr. J. Biotech.*, **10**(22): 4518-4523.
- Soladoye MO, Ikotun T, Chukwuma EC, Ariwaodo JO, Ighanesebor GA, Agbo-Adediran O A, Owolabi SM. 2013. Our plants, our heritage: Preliminary survey of some medicinal plant species of Southwestern University Nigeria Campus, Ogun State. *Nigeria Annals of Biological Research*, **4**(12): 27-34.
- Zirih G, Kra AKM, Guédé-Guina F. 2003. Evaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Lamarck O. KuntzeAsteraceae) «PYMI» sur la croissance *in-vitro* de *Candida albicans*. *Revue Med.*, **17**(3): 11-18.