



Action antibactérienne de l'extrait éthanolique 70% de *Clerodendrum splendens* (G. Don) (Verbenaceae) sur des souches bactériennes isolées de selles chez des enfants diarrhéiques

Fernique KONAN KOUADIO ^{1*}, Nathalie K. GUESSENND ², Ouattara KARAMOKO ³,
Calixte BAH ³, Coulibaly ADAMA ³ et Mireille DOSSO ⁴

¹ Université Félix Houphouët Boigny, Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, Laboratoire de Bactériologie-virologie, Unité des Antibiotiques, des Substances Naturelles et de la Surveillance des Résistances des Micro-organismes aux anti-Infectieux, Côte d'Ivoire.

² UFR de Sciences Médicales, Université Félix Houphouët Boigny, Côte d'Ivoire, Unité de Surveillance de la Résistance des Micro-organismes aux Anti-Infectieux (ASSURMI), Département de Bactériologie Virologie de l'Institut Pasteur, Côte d'Ivoire.

³ Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, Université Félix Houphouët Boigny, Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire.

⁴ Laboratoire de Bactériologie- Virologie, Institut Pasteur, Côte d'Ivoire.

*Auteur correspondant ; E-mail : ferniquekonan@yahoo.fr; Tél : (225) 08 409 170

RESUME

L'apparition des bactéries résistantes aux antibiotiques et leur diffusion dans la population humaine constituent un réel problème de santé publique. C'est ainsi que le monde scientifique a découvert de nombreux traitements qui ont permis de réduire l'indice des maladies causées par ces germes. Malgré ce succès, on ne cesse d'enregistrer la résistance des bactéries aux antibactériens. Ainsi, le développement de nouveaux agents antibactériens s'avère indispensable pour lutter contre ces fléaux. C'est dans ce but que notre objectif vise à tester l'extrait éthanolique 70% de *Clerodendrum splendens* (G. don) sur quelques entérobactéries isolées de selles chez des enfants diarrhéiques. La méthode de dilution en milieu liquide gélosé Muller-Hinton[®] utilisant différentes concentrations d'extrait a permis d'évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches bactériennes sont sensibles à l'extrait éthanolique 70%. Cet extrait est bactéricide sur *Proteus mirabilis* et bactériostatique sur *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Shigella* sp.
© 2013 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés: Extrait éthanolique 70%, *Clerodendrum splendens*, Entérobactéries, Diarrhée, Bactériostatique, Bactéricide.

INTRODUCTION

La découverte des antibiotiques au début du XXe siècle a constitué une véritable révolution pour le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Depuis leur

première utilisation en 1942, les β -lactamines représentent la famille d'antibiotiques la plus développée et la plus utilisée dans le monde. Cette utilisation est due à leur large spectre

d'action, leur faible toxicité, leur efficacité et leur faible coût.

Cependant, l'utilisation massive et parfois abusive des antibiotiques a modifié considérablement l'écologie microbienne et tend à faire augmenter le taux de bactéries résistantes. L'apparition de ces bactéries et leur diffusion dans les populations humaines constituent un phénomène émergent majeur ; cette évolution se concrétise par des taux élevés de résistance de certaines espèces bactériennes à plusieurs familles d'antibiotiques qui étaient sensibles il y a quelques années (Guillemot, 2004; Guessennd et al., 2009).

A l'instar de certains pays d'Afrique, de nombreux cas de bactéries multirésistantes sont rapportés en Côte d'Ivoire (Kacou-N'douba et al., 2001; Akoua et al., 2004). Selon Guessennd et al. (2009), les souches bactériennes résistantes à l'imipénème étaient de 1,9% en 2005 et de 5,9% en 2009 et la fréquence des bactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi est passée de 5,3% en 2005 à 16,8% en 2009. Elles sont devenues de nos jours, un réel problème de santé publique.

Face à ce phénomène d'antibiorésistant, il apparaît donc important d'orienter les recherches vers de nouvelles voies telles les extraits de plantes médicinales pour servir de base à l'obtention de nouveaux antibactériens. Selon les estimations de l'OMS en 2002, plus de 80% de la population en Afrique utilise encore la médecine traditionnelle pour répondre à leur besoin de soin de santé. Ainsi, pour aider ces populations à revenue modeste à tirer un réel avantage de l'usage des plantes médicinales de leur pharmacopée, il a été entrepris d'évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique 70% de *Clerodendrum splendens* sur la croissance *in-vitro* de quelques entérobactéries isolées de selles chez des enfants diarrhéiques. C'est une plante à

laquelle on attribue une vertu thérapeutique vis-à-vis de plusieurs maladies.

A la suite d'une enquête menée auprès des tradipraticiens du département d'Issia (Centre Ouest de la Côte d'Ivoire), les feuilles de cette plante sont utilisées pour traiter les diarrhées infantiles.

MATERIEL ET METHODES

Préparation de l'extrait éthanolique 70% de *Clerodendrum splendens*.

L'extrait éthanolique a été réalisé à partir de l'extrait total aqueux. Pour cela, 12 g de l'extrait total aqueux préalablement préparé selon la méthode de Zirihi et al. (2003), a été versé dans 240 mL d'un mélange Ethanol-Eau (70/30, V/V). Le mélange a été agité vigoureusement pendant 24 heures à l'aide d'un agitateur magnétique, puis laissé au repos pendant quelques minutes. La phase hydro-alcoolique a été séchée lentement à l'étuve à 50 °C. La poudre obtenue a constitué l'extrait éthanolique 70% (Zirihi et al., 2003). Elle a été conservée au réfrigérateur à 4 °C.

Test de stérilité de l'extrait éthanolique 70%

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, le bouillon a été ensemencé sur une boîte de Pétri contenant la gélose ordinaire et une autre contenant la gélose Sabouraud puis incubé dans les mêmes conditions. Pendant trois jours avec une lecture toutes les 24 heures. La substance est déclarée stérile, si aucune colonie n'est visible sur la boîte gélosée.

Souches bactériennes

Les souches 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. Ce sont des souches isolées des selles diarrhéiques suivants (*Escherichia coli* productrice de pénicillinase + céphalosporinase + bêta-lactamases à spectre élargi, *Salmonella typhi* avec phénotype sauvage aux bêta-lactamines, *Proteus mirabilis* productrice de bêta-lactamases à spectre élargi, *Shigella sp* productrice de pénicillinase de bas niveau) et une souche de référence *Escherichia coli* CIP 7624 (ATCC 25922).

Préparation de l'inoculum bactérien

Deux colonies isolées d'une culture bactérienne de 18 heures ont été homogénéisées dans 10 mL de bouillon Muller-Hinton et incubées pendant 3 heures à 37 °C pour avoir une préculture. Un prélèvement de 0,1 mL du bouillon de préculture a été délayé dans un tube contenant 10 mL de bouillon Muller-Hinton. Cette suspension bactérienne réalisée a constitué l'inoculum bactérien de dilution 10⁰.

Numération de l'inoculum bactérien

L'inoculum bactérien a été dilué de 10 en 10 jusqu'à la dilution 10⁻⁴. On obtient quatre dilutions successives de 10⁻¹ à 10⁻⁴. L'inoculum bactérien initial et les quatre dilutions successives ont étéensemencés à l'aide d'une anse calibrée de 2 µL sur des géloses Muller-Hinton portant des stries de 5 cm de long constituant la boîte A.

Préparation de la gamme de concentration de la substance

La gamme de concentration a été préparée dans 7 tubes à essais numérotés de T₁ à T₇, par la méthode de la double dilution en milieu liquide. Cette gamme de concentration varie de 150 mg/mL à 2,34 mg/mL. Pour cela, 10 mL d'eau distillée stérile ont été mis

dans le tube T₁ et 5 mL dans tous les autres tubes. Dans le tube T₁, 1,5 g d'extrait végétal ont été dissous à une concentration de 150 mg/mL. Un volume de 5 mL du tube T₁ a été transféré dans le tube T₂, puis homogénéisée. Cette opération a été répétée jusqu'au tube T₇, 5 mL du tube T₇ est rejeté. Le contenu des tubes a été filtré sur une membrane (MILLEX GV[®]) de diamètre 0,45 µm et conservée au réfrigérateur à 4 °C.

Essai antibactérien

Les essais antibactériens ont été réalisés selon la méthode de dilution en milieu liquide (Dosso et al., 2001 ; Koné et al., 2004) dans une série de 7 tubes expérimentaux, un tube témoin pour la croissance et un tube témoin pour le test de stérilité. 1 mL d'extrait de la plus grande concentration est transféré dans le tube T₁, celui de concentration suivante dans le tube T₂, ainsi de suite jusqu'à la plus faible concentration dans le tube T₇. Cette démarche a fait qu'enfin de compte du tube T₁ au tube T₇, les concentrations sont passées du double au simple, c'est-à-dire de 150 mg/mL à 2,34 mg/mL, on obtient respectivement 75,0 mg/mL à 1,17 mg/mL.

Le tube témoin de stérilité reçoit 2 mL de bouillon Muller-Hinton. L'ensemble de ces tubes a été incubé pendant 24 heures à 37 °C. Cette opération a été répétée 3 fois de suite.

Ensuite, le contenu des tubes dans lesquels aucun trouble n'a été observé a servi à ensemencer la gélose Muller-Hinton sur des stries de 5 cm en commençant par le premier tube sans trouble et incubée à 37 °C pendant 24 heures. Ainsi, la CMI a été donc la concentration du premier tube à partir duquel aucun trouble à l'œil nu n'a été observé.

Après 24 heures d'incubation à 37 °C, la concentration minimale bactéricide (CMB) a été déterminé en comparant la densité des stries à celle de la boîte A préalablement préparée.

RESULTATS

Rendement de la méthode d'extraction

Nous avons extrait 10,1 g d'extrait éthanolique 70% à partir de 12 g d'extrait total aqueux, soit un rendement d'extraction des feuilles de *C. splendens* de 84,1%.

Test de stérilité

Les tests de stérilité de l'extrait éthanolique 70% ont permis de vérifier la stérilité de l'extrait à tester. L'extrait éthanolique 70% des feuilles de *C. splendens* n'a présenté aucun signe de contamination

après trois lectures espacées de 24 heures d'incubation.

Essai antibactérien

Après 24 heures d'incubation à 37 °C, les concentrations croissantes de l'extrait éthanolique 70% ont entraîné une diminution progressive de la croissance bactérienne et une dose-dépendante de la turbidité du milieu de culture et cela pour chaque souche bactérienne étudiée. Les valeurs des paramètres antibactériens obtenues pour chaque souche bactérienne sont consignées dans le Tableau 1 et illustrées par la Figure 1.

Tableau 1: Valeurs des paramètres antibactériens de l'extrait éthanolique 70% de *C. splendens* sur les souches bactériennes testées.

Souches Bactériennes	Code	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMB/CMI	Activité
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	4,68	75,00	16	Bactériostatique
<i>E. coli</i>	1218C/10	4,68	37,50	8	Bactériostatique
<i>S. typhi</i>	1176C/10	2,34	18,75	8	Bactériostatique
<i>P. mirabilis</i>	1048C/10	9,37	37,50	4	Bactéricide
<i>Shigella sp</i>	1177C/10	2,34	37,50	16	Bactériostatique

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice, CMB : Concentration Minimale Bactéricide.

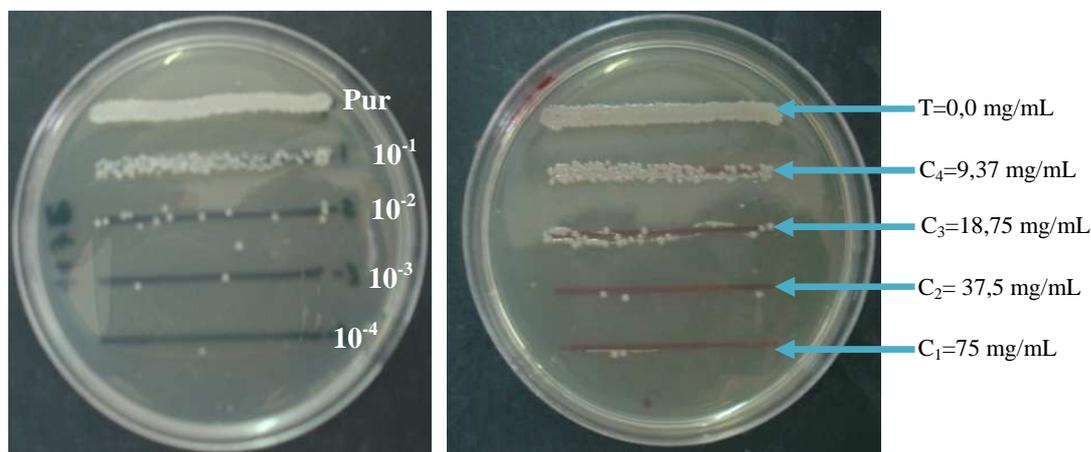


Figure 1: Détermination de la concentration minimale bactéricide de l'extrait éthanolique 70% de *C. splendens* sur *Shigella sp*. Ici, la CMB est égale à 37,5 mg/mL.

DISCUSSION

L'extrait éthanolique 70% a donné un fort rendement d'extraction des feuilles de *C. splendens* de 84,1%. L'éthanol dilué à 70% pourrait être un bon solvant d'extraction des principes actifs des feuilles de *C. splendens*.

Les tests antibactériens de l'extrait éthanolique 70% montrent qu'il possède une activité antibactérienne. Emelia (2008) et Gbedema (2010) ont déjà montré que l'extrait de *C. splendens* a une action antibactérienne sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif et positif.

Ainsi, les tests de l'extrait éthanolique 70% des feuilles de *C. splendens* en milieu liquide gélosé ont montré, comparativement aux témoins de croissance, une variation décroissante de la turbidité des tubes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. Cela montre que cet extrait manifeste une activité antibactérienne en inhibant la croissance *in-vitro* des souches d'*E. coli*, *P. mirabilis*, *S. typhi* et *Shigella sp* selon une relation dose-réponse. Le Tableau 1 montre les paramètres antibactériens et l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique 70%. Toutes les souches bactériennes testées ont présentées différentes sensibilités à l'extrait éthanolique 70% des feuilles *C. splendens*. Ainsi, *S. typhi* et *Shigella sp* se présentent comme les plus sensibles avec une CMI égale à 2,34 mg/mL. La comparaison de l'activité de l'extrait éthanolique 70% des feuilles de *C. splendens* sur la base des CMB par rapport aux souches d'infection et de référence, montre que l'extrait éthanolique 70% est deux fois plus actif sur *E. coli* résistante aux bêta-lactamines, *P. mirabilis* résistante à la Triméthoprim sulfaméthoxazole et *Shigella sp* résistante à l'amoxicilline (CMB = 37,5 mg/mL) qu'*E. coli* ATCC 25922 (CMB = 75 mg/mL) d'une part et d'autre part quatre fois sur *S. typhi* sensible aux bêta-lactamines (CMB = 18,75 mg/mL) qu'*E. coli* ATCC 25922. Nous déduisons que l'extrait éthanolique 70% exerce différentes actions inhibitrices sur les souches bactériennes testées à différentes concentrations. Le tableau des valeurs des paramètres antibactériens montre aussi les différentes activités de l'extrait éthanolique 70% des feuilles *C. splendens* sur les souches

bactériennes. Selon Marmonier en 1990, lorsque le rapport d'activité CMB/CMI d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à quatre (≤ 4) cette dernière est qualifiée de substance bactéricide et si le rapport CMB/CMI est supérieur à quatre (> 4), alors elle est dite bactériostatique. En effet, l'extrait est bactériostatique sur *S. typhi*, *Shigella sp*, *E. coli* et *E. coli* ATCC 25922. Il est par contre bactéricide sur souche de *P. mirabilis* avec un rapport de CMB/CMI égal à 4. Les travaux d'Emelia (2008) et de Donatus et Friday (2009) ont montré que *C. splendens* contient entre autre des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins, des saponines et des phénols qui possèdent des propriétés antibactériennes. La présence de ces composés chimiques pourrait expliquer son activité sur les souches différentes étudiées. L'ensemble de ces résultats donne un fondement scientifique à l'usage traditionnel de cette plante, notamment dans le traitement des plaies, des collecteurs suppurés et des diarrhées. Déjà en 1995, Misra et al. ont montré qu'une espèce du même genre, *C. colebrookianum* possède une activité antibactérienne. Plus tard, Reid et al. (2006) ont rapporté que *C. myricoides* a présenté une activité antibactérienne sur *S. typhi*. On pourrait donc penser que les espèces du même genre possèdent une activité antibactérienne similaire.

Conclusion

Notre étude a montré que, l'extrait éthanolique 70% des feuilles de *C. splendens* a montré une activité antibactérienne sur les souches isolées de selles chez des enfants diarrhéiques.

En effet, cet extrait a été actif sur *Shigella sp*, *S. typhi* (CMI = 2,34 mg/mL) mais cette activité était moyenne sur *E. coli* ATCC 25922 avec une CMI plus importante de 4,68 mg/mL. Par contre, cette activité était plus faible sur *P. mirabilis* avec une CMI de 9,37 mg/mL. Cette sensibilité revêt une grande importance car ces souches présentent de grandes résistances aux antibiotiques utilisés en pratique courante. L'extrait des feuilles de *C. splendens* pourrait donc constituer une alternative moins coûteuse pour le traitement des infections bactériennes.

Une analyse plus poussée permettra de fractionner cet extrait afin d'améliorer son activité et de déterminer la (les) molécule (s) responsable (s) de son activité.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient sincèrement le laboratoire de pharmacodynamie-Biochimique de l'université de Côte d'Ivoire et l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire pour leur appui technique dans ce travail.

REFERENCES

- Akoua KC, Guessennnd N, Gbonon V, Faye-Kette AYH, Dosso M. 2004. Methicillin-resistant of *Staphylococcus aureus* in Abidjan (1998-2001): A new hospital problem. *Medicines et Maladies Infectieuses*, **34**(3): 132-136.
- Donatus EO, Friday I. 2009. Phytochemical Composition and Biological Activities of *Uvaria chamae* and *Clerodendron splendens*. *E-Journal of Chemistry*, **6**: 553-560.
- Dosso M, Faye-Kette H. 2001. *Savoir, Lire et Interpréter un AntibioGramme. A l'Attention du Bio Technologiste. INFAS/CHU de Treichville : Abidjan, RCI.*
- Emelia K. 2008. Antimicrobial and Wound Healing Activities of *Clerodendron splendens* G. Don. PhD thesis, Faculty of pharmacy and pharmaceutical sciences college of health sciences Kumasi, Ghana, p101.
- Gbedema Stephen Y, Kisseih Emelia, Adu Francis, Kofi Annan, Woode Eric, 2010. Wound healing properties and kill kinetics of *Clerodendron splendens* G. Don, a Ghanaian wound healing plant. *Pharmacognosy Res.*, **2**(2): 63-68.
- Guessennnd N, 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, Chauvin C, Serme C. 2004. Consommation des antibiotiques en France. *BEH.*, **3233**: 141-147.
- Kacou-N'douba A, Bouzid SA, Guessennnd KN, Kouassi M, Bengue AA, Faye-Kette AYH, Dosso M. 2001. Antimicrobial resistance of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* in health carriers/report of a study in 5-year-olds in marcorry; Abidjan Côte d'Ivoire. *Annals of Tropical Paediatrics: International Child Health*, **21**(2): 149-154.
- 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**(1): 43-49.
- Livermore DM. 2008. Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect.*, **14**(1): 3-10.
- Marmonier AA. 1990. Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. In *Bactériologie Médicale, Techniques Usuelles*. Doin: Paris, France; 227-236.
- Misra TN, Singh SR, Pandey HS, Kohli YP. 1995. Antibacterial and antifungal activity of three volatile hexane eluates extracted from the leaves of *C. colebrookianum*. International Seminar on Recent Trends in Pharmaceutical Sciences, Ootacamund.
- Reid KA, Maesa J, Maesa A, van Staden J, Kimpec ND, Mulholland DA, Verschaeve L. 2006. Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **106**(1): 44-50.
- Zirih G, Kra AKM, Guédé-Guina F. 2003. Evaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Lamarck O. Kuntze Asteraceae) «PYMI» sur la croissance *in-vitro* de *Candida albicans*. *Revue Med. Pharm. Afric.* **17**(3): 11-18.