

1 - ACTIVITE ANTI-BACTERIENNE DE *THONNINGIA SANGUINEA* (THOS) SUR *SALMONELLA ENTERICA* SEROTYPE *ENTERITIDIS* LYSOTYPE 6. UNE SOUCHE MULTIRESISTANTE

PAR : OUATTARA*, K. ; DJAMAN**, A.J. ; COULIBALY*, A. ; N'GUESSAN*, J.D. ; M'BAIASBE*, Y.J. ; GUEDE-GUINA*, F.

RESUME : Dans cette étude, nous avons inhibé la croissance *in vitro* de *Salmonella enterica* sérotype *Enteritidis* lysotype 6, un sérotype multirésistant, par une substance naturelle à base de plante codifiée THOS. En prouvant son efficacité sur une telle souche, THOS pourrait avoir certainement une action inhibitrice sur la croissance des autres salmonelles, voire des entérobactéries dans leur ensemble.

MOTS CLES : *SALMONELLA* ; THOS ; CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE ; CONCENTRATION MINIMALE BACTERICIDE

SUMMARY : In this study, we inhibited the *in vitro* growth of *Salmonella enterica* *Enteritidis* serotype lysotype 6, a multiresistant serotype by a natural substance made of plants codified THOS. THOS proved to be efficient against *S enterica ser. Enteritidis* lysotype 6 which caused diseases, so that we thought it could indubitably have inhibitory actions against any other strains of *Salmonella*, and all kinds of Enterobacteria.

KEY WORDS : *SALMONELLA* ; THOS ; MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION ; BACTERICIDE MINIMALE CONCENTRATION

INTRODUCTION

Malgré les avancées de l'antibiothérapie, les infections à salmonelles continuent de poser de sérieux problèmes de santé publique.

En effet, les salmonelloses ont été ces dernières années une des principales causes de toxi-infections alimentaires chez l'homme (MAILLOT et al, 1997 ; GILLES et al, 2001 ; ESPIE et al, 2002). Elles sont aussi à l'origine d'importantes pertes économiques, car elles déciment fréquemment les populations animales (GORDON, 1979 ; LAHELLEC et al, 1992). Parmi les divers sérovars incriminés, certains sont facilement éliminés par l'emploi d'antibiotiques. D'autres par contre ont développé de fortes résistances face à différentes familles de ces anti-infectieux (BREUIT et al, 2000 ; SPANU et al, 2002 ; THREFALL et al, 2003). Il s'avère donc nécessaire de rechercher de nouvelles substances pour lutter contre ce type de souches.

Plusieurs travaux effectués avec *Thonningia sanguinea* (THOS), substance naturelle d'origine végétale, ont montré qu'elle inhibait un nombre assez considérable d'entérobactéries (VANGAH-MANDA et al, 1994 ; KAZOCK, 2001 ; OUATTARA, 2001 ; M'BAIASBE et al, 2002 ; OUATTARA, 2003).

La présente étude vise à évaluer l'activité de THOS sur *Salmonella enterica ser Enteritidis* lysotype 6, une souche multirésistante (DOSSO, 1998).

* Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, Université de Cocody-Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22.

** Laboratoire de Microbiologie, Institut National de Santé Publique (INSP) d'Abidjan, BP V47 Abidjan
Auteur à qui toute correspondance doit être adressée : 04 BP 2393 Abidjan 04 Côte d'Ivoire.

MATERIELS ET METHODES

Matériels :

- Le matériel végétal utilisé était un extrait issu d'une plante parasite *Thonningia sanguinea* appartenant à la famille des Balanophoracées codifiée «THOS»
- Comme souche microbienne, *Salmonella enterica ser Enteritidis* lysotype 6 n° 981633 a été utilisée
- Les milieux de culture étaient le Bouillon Mueller-Hinton (BM-H) et la Gélose Mueller-Hinton (GM-H).

Méthodes.

- Extraction de THOS

Les inflorescences de THOS sont prélevées, découpées et séchées à l'abri du soleil pendant dix jours. Les éléments végétaux séchés sont broyés et traités selon la méthode suivante : 20 grammes de poudre de THOS sont ajoutés à 2 litres d'eau distillée et homogénéisée à la température ambiante pendant 48 heures à l'aide d'un agitateur magnétique.

L'homogénat est filtré sur du coton hydrophile, puis sur du papier Wattmann 3MM. Le filtrat obtenu est évaporé sous vide à 30°C dans un Rotavapor Büchi. L'évaporat sec est récupéré sous forme de poudre qui constitue l'extrait total aqueux (M'BAIASBE et al, 2002).

- Préparation de l'inoculum bactérien.

A partir d'une culture âgée d'environ 24 heures, on prélève 2 à 3 colonies isolées de *S. Enteritidis* lysotype 6 qu'on ensemence dans 10 mL de bouillon M-H. Après une incubation de 3 à 4 heures à 37°C, 0,1 mL du bouillon précédemment inoculé est ajouté à 10 mL d'eau distillée stérile pour constituer l'inoculum à 10^6 bactéries/mL à utiliser.

- Préparation des milieux de culture

Le Bouillon M-H et la gélose M-H sont préparés selon les recommandations du fabricant.

- Détermination des CMI et CMB.

Pour la détermination de ces paramètres antimicrobiens nous avons utilisé l'incorporation de l'extrait de THOS au milieu de culture gélose, l'imprégnation des disques par l'extrait de THOS et le test en milieu liquide. Pour chacune de ces trois méthodes, 200 mg de l'extrait total de THOS sont mélangés à 8mL d'eau distillée stérile pour constituer la concentration initiale $C_1=25$ mg/mL. 5 mL de cette solution sont ajoutés à 5mL d'eau distillée stérile pour donner $C_2=12,5$ mg/mL, et on procède ainsi par double dilution jusqu'à $C_7=0,39$ mg/mL.

La méthode d'incorporation de l'extrait de THOS au milieu de culture gélosé a consisté à ajouter à 2 mL de chaque concentration de THOS contenus dans une boîte de Pétri, 18 mL de gélose M-H en surfusion à 47°C. La gamme de concentration réelle va donc de 2,5 mg/mL à 0,039 mg/mL. Après solidification et prise en masse à la température ambiante, les milieux sont séchés à l'étuve à 37°C pendant 15 min. On prélève ensuite 0,01 mL de l'inoculum à l'aide d'une anse calibrée qu'on ensemence en stries de 5 cm de long à la surface de chaque milieu. Une croissance témoin est réalisée en ensemençant un milieu sans inhibiteur. Toutes les boîtes sont mises à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

La méthode des disques imprégnés de l'extrait de THOS a consisté à imprégner des disques en papiers stériles de 10 µl de chaque concentration de THOS puis à les sécher à l'étuve à 37°C pendant 15 min. 10 mL de l'inoculum préparé titrant 10⁶/mL sont utilisés pour inonder la surface d'une gélose M-H contenue dans une boîte de Pétri. La boîte est agitée pour uniformiser l'ensemencement. Le surplus est aspiré à l'aide d'une pipette Pasteur adaptée à une poire. Après avoir séché la surface de la boîte durant une quinzaine de minutes à 37°C, on y dépose par ordre croissant de concentration les disques préalablement imprégnés de THOS. La boîte est incubée pendant 24 heures à 37°C.

Enfin pour le test en milieu liquide, il s'est agi de mélanger dans des tubes à essai 1 mL de chaque concentration de THOS à 9 mL de l'inoculum préalablement préparé à l'exception d'un tube témoin où l'extrait de THOS est remplacé par de l'eau distillée stérile.

Pour déterminer le pouvoir inhibiteur de THOS, le protocole habituel de la détermination de la CMB a été légèrement modifié. A cet effet, après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, 1 mL du contenu de chaque tube précédemment préparé est utilisé pour ensemencher la surface d'une gélose M-H. "neuve" et sans antimicrobien, en boîtes de Pétri. Les boîtes sont incubées à 37°C durant 24 heures. Après incubation, un dénombrement est réalisé pour déterminer les colonies " survivantes".

Le pourcentage de survivance du germe est exprimé par la relation : $S = 100 \times n/N$, avec : S : survivance du germe (en %) ; N : nombre de colonies provenant du tube témoin et n : nombre de colonies provenant du tube expérimental.

RESULTATS

Incorporation de l'extrait de THOS

On observe une croissance du germe pour les concentrations de THOS allant de 0,039 à 0,312mg/mL ainsi que pour le témoin. Cette croissance est matérialisée par la présence de colonies dans les boîtes de pétri.

A 0,625 mg/mL, les performances de notre appareil photographique ne nous ont pas permis de mettre en évidence les quelques colonies visibles à l'œil nu sur la figure 1. La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) se définit comme l'absence de culture visible à l'œil nu ; ici la CMI est égale à 1,25 mg/mL.

Disques imprégnés de l'extrait de THOS

On observe après une incubation de 24 heures, une zone d'inhibition aux concentrations C₁=2,5 mg/mL et C₂=1,25 mg/mL. Le diamètre du halo autour des disques correspond à la zone où il n'y a pas eu de croissance du germe c'est-à-dire à la zone d'inhibition. Le diamètre de ces zones d'inhibition augmente avec la concentration de THOS (Tableau 1).

Test en milieu liquide

Après 24 heures d'incubation, la CMI est de 1,25 mg/mL (CMI=1,25 mg/mL). Les résultats du dénombrement effectué à partir des ensemencements réalisés après 24 heures d'incubation pour la détermination des pourcentages d'inhibition montrent une

diminution progressive du nombre de colonies en fonction de la concentration de THOS, traduisant ainsi son activité anti-bactérienne dose-réponse vis-à-vis de *S. Enteritidis* lysotype 6 (Tableau 2) ; puis, une absence de colonies à partir de 1,25 mg/mL après repiquages. La concentration de THOS qui donne plus 99,99% d'inhibition de *S. Enteritidis* lysotype 6 c'est-à-dire la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) est de 1,25 mg/mL (CMB=1,25 mg/mL).

Par ailleurs, sur la courbe de survivance (Figure 1), la CI_{50} qui correspond à la concentration pour 50% d'inhibition de la croissance du germe testé est de 0,189 mg/mL.

DISCUSSION

L'extrait aqueux de THOS a une réelle activité inhibitrice sur la croissance *in vitro* de *S. Enteritidis* lysotype 6.

En effet, les résultats des trois méthodes d'évaluation sont concordants et montrent clairement que THOS entraîne une inhibition de la croissance du germe testé en fonction de la concentration. De plus, la CMI=CMB=1,25 mg/mL, ce qui signifie que THOS a un effet bactéricide.

Ces résultats sont en accord avec ceux de différents auteurs qui ont montré que THOS inhibait la croissance *in vitro* des germes tels que *Salmonella Gallinarum* (M'BAÏASBE et al, 2002), *Salmonella Typhi* et *Escherichia coli* (DOSSO, 1998), *Salmonella Enteritidis* (M'BAÏASBE et al, 2002), *Cryptococcus neoformans* (OUATTARA, 2003), *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* et *Shigella Sonnei* (DOSSO, 1998), *Salmonella Enteritidis* lysotype 6 (OUATTARA, 2001 ; M'BAÏASBE et al, 2002).

Des études ont prouvé que l'extrait ethanologique de THOS est encore plus actif sur *C. neoformans* (OUATTARA, 2003). Aussi nous envisageons d'évaluer l'activité anti-salmonellaire d'un extrait alcoolique de THOS. Outre son activité bactéricide, plusieurs travaux effectués avec THOS ont montré qu'il possède des propriétés anti-oxydatives et des actions hémato-protectrices (GYAMFI et al, 1999 ; GYAMFI et al, 2000 ; OHTANI et al, 2000 ; GYAMFI et ANIYA, 2003).

CONCLUSION

THOS, par son activité bactéricide sur *Salmonella Enteritidis* lysotype 6 donne certainement un espoir dans la mise au point d'un médicament anti-salmonellaire très efficace et à large spectre. La réalisation d'un trphytochimique par chromatographie sur couche mince (CCM) nous permettra de mettre en évidence les différentes molécules contenues dans cet extrait.

Le fractionnement nous permettra également de déterminer la fraction active et d'isoler a terme la ou les molécules responsables de l'action anti-microbienne et plus précisément anti-salmonellaire.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le service de Bactério-virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) pour nous avoir gracieusement fourni la souche de *Salmonella Enteritidis* lysotype 6.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ESPIE, E. ; AUBRY-DAMON, H. ; DE VALK, H. ; VAILLANT, V. ; HAEGHEBAERT, S. ; BOUVET, P. ; DESENCLOS, J.C. (2002) : Salmonellose collective : les enjeux d'une déclaration immédiate. Rev Prat., Vol. 577, pp.873-876.
- 2 - GILLES, C. ; HAEGHEBAERT, S. ; THOMAS, D. ; EVEILLARD, M. ; EB, F. ; GRIMONT, F. ; LEJAY-COLLIN, M. ; BOUVET, P. ; JCOT, J.C. (2001) : Bouffée épidémiologique de salmonellose liée à la consommation de steaks hachés en France. Novembre-décembre 1999. Med Mal Infect., Vol.31, n°3, pp.144-147.
- 3 - MAILLOT, J.L. ; VAILLANT, V. ; BRISABOIS, A. ; BOUVET, P. ; GRIMONT, F. ; INFUSO, A. ; HAEGHEBAERT, S. ; DELAROCQUE, ASTAGNEAU, E. ; MOURY, F. ; DESENCLOS, J.C. ; GRIMONT, P.A.D.(1997) : Salmonelloses humaines et Salmonelloses bovines. Bulletin des GTV., Vol.2, pp.5-15.
- 5 - GORDON, R.F. (1979) : Pathologie des Volailles. Paris : Maloine S.A. éditeur : 267p.
- 6 - LAHELLEC, C. ; CORBION, B. ; FREMY, S. (1992) : Salmonelloses chez les animaux. Med Mal Infect., n° spécial, pp.258-263.
- 7 - BREUIT, J. ; BRISABOIS, A. ; CASIN, I. ; ARNAUD, L.I. ; FREMY, S. ; COLLATZ, E. (2000) : Antibiotic resistance in salmonellae isolated from humane and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. J Antimicrobial Chemotherapy., Vol. 46. n°6. pp.965-971.
- 8 - SPANU, T. ; LUZZARO, F. ; PERILLI, M. ; AMICOSANTE, G. ; TONIOLO, A. ; FADA, G. (2002) : Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy : implications for resistance to beta-lactams and other microbial drugs. Antimicrob Agents Chemother., Vol. 46, pp196-202.
- 9 - CORMICAN, M. ; LUZZI, I. ; SCHNIEDER, F. ; WANNET, W. ; MACHADO, J. ; EDWARDS (2003) : Résistance aux antibiotiques d'isolats de *Salmonella enterica* issu de cas de salmonellose humaine en Europe en 2000. Résultats d'une surveillance multicentrique internationale. Euro Surveillance, Vol. 8, n°2, pp41-45.
- 10 - M'BAÏASBE, Y.J. ; TOURE, K. ; GUEDE-GUINA, F. (2002) : Evaluation d'une action thérapeutique de THOS, un antisalmonellaire naturel, sur les salmonelloses aviaires. Afr Biomed, Vol. 7. pp32-35.

- 11 - OUATTARA, B. (2003) : Evaluation de l'activité antifongique de THOS sur *Cryptococcus neoformans*. DEA de Pharmacologie des substances naturelles. Université de Cocody , 34p.
- 12 - OUATTARA, K. (2001) : Activité antibactérienne de THOS sur la croissance *in vitro* de *S. Enteritidis* lysotype 6. DEA de Pharmacologie des substances naturelles. Université de Cocody, 34p.
- 13 - KAZOCK, J.Y. (2001) : Activité antibactérienne de THOS contre *S. Typhi*. DEA de Pharmacologie des substances naturelles. Université de Cocody, 30p.
- 14 - VANGAH-MANDA, M. ; DJE, M. ; GUEDE-GUINA, F. ; DE SOUZA, C. (1994) : Evaluation des effets antimicrobiens et cytotoxiques des extraits aqueux totaux de THOS. Rev Med Pharm Afr., Vol. 8 n°2, pp154-157.
- 15 - DOSSO, M. (1998) : Résistance de *Salmonella enterica* ser *Enteritidis* lysotype 6 aux drogues. 1^{ères} Journées Biologiques Nationales d'Abidjan. Communication personnelle.
- 16 - GYAMFI, MA. ; ANIYA, Y. (2002) : Antioxidant properties of Thonningianin isolated from the African medicinal herbs *Thonningia sanguinea*. Biochem Pharmacol., Vol. 63, n°9, pp1725-1737.
- 17 - GYAMFI, MA. ; HOKOMA, N. ; OPPONG -BOACHIE, K. ; ANIYA, Y. (2000) : Inhibitory effects of medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, on liver drug metabolizing enzymes of rats. Bourdonnement. Exp Toxicol., Vol. 19, pp623-631.
- 18 - GYAMFI, MA. ; YONAMINE, M. ; ANIYA, Y. (1999) : Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana : *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. General Pharmacol., Vol. 32, n°6. pp661-667.
- 19- OHTANI, II. ; GOTOH, N. ; TANAKA, J. ; HIGA, T. ; GYAMFI, MA. ; ANIYA, Y. (2000) : Thonningianins A and B, new antioxidants from the African medicinal herb *Thonningia sanguinea*. J. Nat Prod., Vol. 63, pp676-679.

ACTIVITE ANTI-BACTERIENNE DE *THONNINGIA SANGUINEA* (THOS)

Tableau I : Diamètres d'inhibition en fonction des différentes concentrations de THOS

	Concentrations de l'extrait de THOS (mg/mL)						
	C ₇	C ₆	C ₅	C ₄	C ₃	C ₂	C ₁
	0,039	0,078	0,156	0,312	0,625	1,25	2,5
Diamètres des zones d'inhibition (mm)	0	0	0	0	0	10,10	15,20

Tableau II : Détermination des CMI et CMB de l'extrait de THOS sur *S. Enteritidis* lysotype 6 en bouillon Mueller-Hinton

Tubes	T	7	6	5	4	3	2	1
Concentrations (mg/mL)	0	0,039	0,078	0,156	0,312	0,625	1,25	2,5
Nombre de colonies	10 ¹⁰	90,4·10 ⁸	80,1·10 ⁸	59,6·10 ⁸	20,4·10 ⁸	4,5·10 ⁸	0	0
Survivance (%)	100	90,4	80,1	59,6	20,4	4,5	0	0

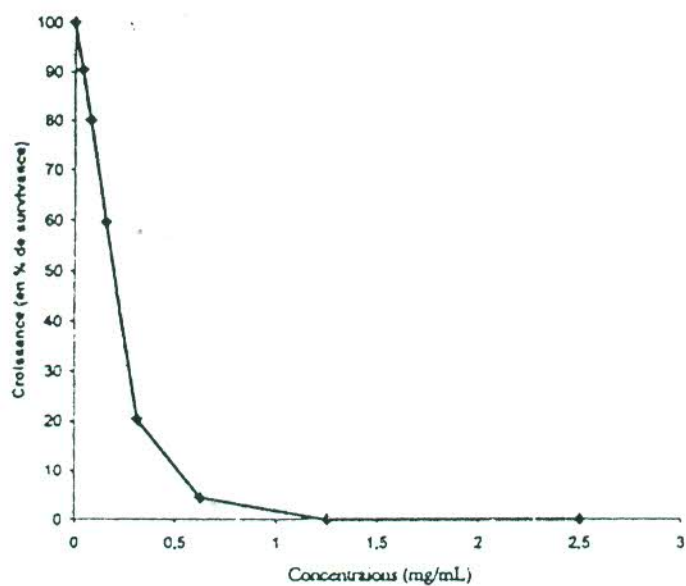


Figure 1 Pourcentage de survivance de *Salmonella enterica ser Enteritidis lysotype 6* en fonction de l'extrait de THOS