

Article original

Pharmacognosie

Mise en évidence des propriétés antistaphylococciques des flavonoïdes totaux de *Thonningia sanguinea* (Vahl), une plante de la pharmacopée ivoirienne

I. Bagre¹, K. Ouattara¹, B. Yoro¹, S. Meite², A. Coulibaly¹

¹Laboratoire de pharmacodynamie biochimique, UFR biosciences, université Félix-Houphouët-Boigny, BP 582, Abidjan, Côte-d'Ivoire

²Institut Pasteur de Côte-d'Ivoire (IPCI), 01 BP 490, Abidjan 01, Côte-d'Ivoire

Correspondance : bagrefre@ yahoo.fr

Résumé : Les activités antibactériennes des flavonoïdes totaux de *Thonningia sanguinea* ont été évaluées in vitro sur trois souches du genre *Staphylococcus*. Les essais antibactériens ont été réalisés par la méthode de diffusion en milieu solide et celle de dilution en milieu liquide couplée à l'étalement sur milieu gélosé. Une souche de référence (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et deux souches cliniques hospitalières (*Staphylococcus aureus* Méti-S et *Staphylococcus aureus* Méti-R) ont servi à cette étude. Des trois souches testées en présence des flavonoïdes, *Staphylococcus aureus* Méti-S a été la plus sensible avec des valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) et de concentration minimale bactéricide (CMB) de 50 mg/ml. À l'issue de ce travail, il ressort que les flavonoïdes totaux de *Thonningia sanguinea* ont des pouvoirs bactéricides sur toutes les souches testées. Cette activité antibactérienne observée pourrait justifier l'emploi de la plante dans le traitement des staphylococcoses dans certaines régions de la Côte-d'Ivoire.

Mots clés : *Thonningia sanguinea* – Flavonoïdes totaux – Activité antibactérienne – *Staphylococcus aureus*

Highlighting Antistaphylococcal Properties of the Total Flavonoids of *Thonningia sanguinea* (Vahl)

Abstract: The objective of this present work is to estimate the antibacterial activities of the total flavonoids extracted from *Thonningia sanguinea* (Vahl), on the in vitro growth of strains implied in the staphylococcosis. The antibacterial essays were realized on the methods of distribution in solid medium and dilution in liquid medium coupled with the spreading on Sabouraud agar medium. A reference strain (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) and two hospital clinical strains (*Staphylococcus aureus* Meti-S and *Staphylococcus aureus* Meti-R) were used in this study. Among the three strains tested, *Staphylococcus aureus* Meti-S is the most sensitive with 50 mg/ml as values of Minimal Inhibitive Concentration (MIC) and

Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Following this work, it appears that the total flavonoids of *Thonningia sanguinea* have bactericidal powers of all strains tested. This antibacterial activity observed could justify the use of the plant in the treatment of staphylococcosis in parts of Côte-d'Ivoire.

Keywords: *Thonningia sanguinea* – Total flavonoids – Antibacterial activity – *Staphylococcus aureus*

Introduction

En Côte-d'Ivoire 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 de leur gravité [4].

La situation est davantage préoccupante à cause de l'apparition des souches de micro-organismes antibiorésistants et de l'émergence des infections non communes [12] 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 [8] 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 en Côte-d'Ivoire est riche et variée, mais elle demeure très peu exploitée scientifiquement.

Le présent travail porte sur une plante nommée *Thonningia sanguinea* [Balanophoraceae (Vahl)] souvent utilisée efficacement dans le traitement traditionnel de diverses maladies infectieuses en Côte-d'Ivoire et ailleurs. Il s'agit d'étudier les propriétés antistaphylococciques des flavonoïdes totaux de cette plante sur la croissance in vitro de trois souches impliquées dans la staphylococcose. Notre objectif est d'identifier toujours davantage de substances possédant des propriétés antibactériennes ainsi que de rationaliser l'utilisation des plantes médicinales.

Matériel et méthodes

Matériel

Matériel végétal

Il est constitué par les inflorescences et les bractées de *Thonningia sanguinea* Vahl (Balanophoraceae) récoltées dans la région de Sandégué (Bondoukou) en août 2012. L'authentification a été effectuée par le Pr Aké-Assi du Centre national floristique (CNF) de l'université Félix-Houphouët-Boigny où un herbier est conservé sous le numéro 14162.

Souches bactériennes

Le support bactérien est composé d'une souche de référence (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et deux souches cliniques hospitalières (*Staphylococcus aureus* Méti-S et *Staphylococcus aureus* Méti-R). L'identification des souches a été réalisée au laboratoire de bactériologie de l'institut Pasteur de Côte-d'Ivoire (IPCI) tel que le recommande le NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) [7].

Méthodes

Extractions des flavonoïdes

Environ 20 g de matière sèche finement broyée de *Thonningia sanguinea* est mélangée avec 200 ml de méthanol (85 %). Le mélange est filtré sur un tissu 24 heures plus tard. Après deux extractions successives avec le méthanol 85 %, trois fois, et du méthanol 50 %, deux fois, les filtrats sont combinés, filtrés sur du papier-filtre puis soumis à une évaporation à basse pression à 35 °C (Rotavapor, Buchi 461) ; la phase aqueuse ainsi obtenue est conservée pendant 48 heures à 4 °C puis filtrée. Le filtrat est débarrassé des cires, des lipides et de la chlorophylle par trois lavages successifs avec du n-hexane (v/v) pour donner une phase aqueuse. Cette phase aqueuse est lyophilisée, et l'on obtient une poudre qui représente les flavonoïdes totaux [5].

Activité antibactérienne

Préparation de la gamme de concentration

Une gamme de concentrations des flavonoïdes totaux allant de 200 à 0,56 mg/ml a été préparée par la méthode de la double dilution [9].

Préparation de l'inoculum

Pour chaque souche bactérienne, un inoculum a été préparé en homogénéisant 0,3 ml d'une suspension opalescente de trois heures dans 10 ml de bouillon Mueller-Hinton afin d'avoir des suspensions ayant une turbidité voisine à celle de McFarland 0.5 (10^6 UFC/ml).

Détermination des zones d'inhibition de croissance

Les diamètres des zones d'inhibition ont été déterminés en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé. Ainsi, des disques stériles de papier Whatman n° 1 de 6 mm de diamètre, imprégnés de concentrations croissantes d'extraits à raison de 10 µl par disque, ont été déposés stérilement sur la surface de la gélose préalablement ensemencée avec l'inoculum préparé. Après une prédiffusion de 30 minutes à température ambiante sous la hotte, l'ensemble a été incubé à l'étuve à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Parallèlement, l'oxacilline (5 µg) et la céfoxitine (30 µg) ont servi de contrôles positifs. Après l'incubation, l'action des extraits est appréciée par la mesure d'une zone d'inhibition de croissance (absence de colonies) autour des disques à l'aide d'une règle graduée. Chaque test a été repris trois fois.

Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB)

La macrométhode de dilution en milieu liquide a été utilisée [3]. Par cette méthode, la CMI des extraits correspond à la concentration du premier tube dans lequel il y a absence de croissance visible à l'œil nu des bactéries testées après une incubation de 18 à 24 heures à 37 °C. Pour déterminer la CMB, on ensemence ensuite la surface d'une gélose Mueller-Hinton neuve coulée en boîte de Pétri avec 0,1 ml du contenu des tubes ayant une concentration supérieure ou égale à la CMI. Cette CMB correspond à la plus petite concentration qui laisse survivre au plus 0,01 % des germes de la suspension de départ en 24 heures. Par ailleurs, le rapport CMB/CMI de l'extrait a été calculé afin d'apprécier son pouvoir antibactérien.

Résultats

Diffusion en milieu solide

La méthode de diffusion ou méthode de puits a pour but d'étudier l'activité antibactérienne des substances naturelles.

Elle a permis d'obtenir les résultats mentionnés dans le Tableau 1. Ces résultats montrent une activité antibactérienne des flavonoïdes totaux de *Thonningia sanguinea*, pour les souches de *Staphylococcus aureus*.

Le pouvoir antibactérien le plus élevé des flavonoïdes totaux de *Thonningia sanguinea* est observé pour *Staphylococcus aureus* Méti-S avec une zone d'inhibition de 13,1 mm à la concentration de 200 mg/ml. Par contre, pour *Staphylococcus aureus* Méti-R, il est de 11 mm à la même concentration. Aucune zone d'inhibition n'a été observée pour les trois souches de *Staphylococcus* à la concentration de 6,25 mg/ml.

Pour déterminer les CMI et les CMB, on a utilisé la méthode de dilution en milieu liquide. Les résultats sont mentionnés dans le Tableau 2.

Pour *Staphylococcus aureus* Méti-S, la CMI des flavonoïdes de *Thonningia sanguinea* (Vahl) est de 50 mg/ml. Il est de même pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La CMI de *Staphylococcus aureus* Méti-R est de 100 mg/ml. Les CMB sont 50, 100 et 200 mg/ml respectivement pour *Staphylococcus aureus* Méti-S, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* Méti-R. Les flavonoïdes totaux de *Thonningia sanguinea* (Vahl) ont montré un pouvoir bactéricide contre toutes les souches bactériennes testées. Les CMI sont comprises entre 50 et 100 mg/ml contre les souches de *Staphylococcus aureus*. Ces CMI sont de 50 mg/ml

pour *Staphylococcus aureus* Méti-S et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, et de 100 mg/ml pour *Staphylococcus aureus* Méti-R (Tableau 2).

D'après les résultats obtenus, on remarque que les substances naturelles de *Thonningia sanguinea* (Vahl) sont de bons agents antistaphylococciques, on peut donc en déduire que les extraits de cette plante agissent comme des antibiotiques.

Discussion

Cette étude avait pour objectif de mettre en évidence des propriétés antistaphylococciques des flavonoïdes totaux de *Thonningia sanguinea* (Vahl).

Les propriétés antistaphylococciques des flavonoïdes totaux de *Thonningia sanguinea* (Vahl) ont donné des résultats intéressants avec 200 mg/ml d'extrait végétal sur *Staphylococcus aureus* Méti-R. Dans ces mêmes conditions, cette souche s'est montrée résistante à l'oxacilline et à la céfoxitine respectivement à la dose de 5 µg et de 30 µg. Toutes les souches de *Staphylococcus* testées ont été sensibles aux flavonoïdes totaux de *Thonningia sanguinea* (Vahl) selon une relation dose-effet, cela s'est traduit par une augmentation progressive des diamètres de la zone d'inhibition au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration de l'extrait végétal.

Tableau 1. Diamètres des zones d'inhibition observées avec les flavonoïdes totaux de *Thonningia sanguinea*.

Bactéries	Concentrations des extraits végétaux (mg/ml)								FOX	OX
	1,56	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200	30 µg	5 µg
Diamètres des zones d'inhibition (mm)										
<i>Staphylococcus aureus</i> Méti-S	–	–	0	0	0	10 ± 0,8	11 ± 0,4	13,1 ± 1,1	27 ± 1,7	30 ± 1,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	–	–	0	0	0	10,2 ± 0,4	10,5 ± 0,9	12 ± 0,7	25 ± 1,4	25 ± 1,6
<i>Staphylococcus aureus</i> Méti-R	–	–	0	1,4 ± 0,09	5,6 ± 0,5	7,7 ± 0,3	10 ± 0,17	11 ± 0,25	0	0

OX : oxacilline (5 µg) ; FOX : céfoxitine (30 µg).

Tableau 2. Valeurs des paramètres antibactériens des flavonoïdes totaux de *Thonningia sanguinea* (Vahl) sur les souches testées.

Souches testées	Paramètres antibactériens (mg/ml)			
	CMI	CMB	CMB/CMI	Pouvoir antibactérien
<i>Staphylococcus aureus</i> Méti-S	50	50	1	Bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	50	100	2	Bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i> Méti-R	100	200	2	Bactéricide

En effet, les résultats obtenus à partir de cette concentration montrent que les flavonoïdes totaux de *Thonningia sanguinea* (Vahl) possèdent des propriétés antistaphylococciques. Une activité antibactérienne est connue pour les flavonoïdes. En effet, ils sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Staphylococcus aureus* [1].

S'agissant des pouvoirs antibactériens des flavonoïdes totaux de *Thonningia sanguinea* (Vahl), les résultats enregistrés indiquent que le rapport d'activité CMB/CMI varie entre 1 et 2 respectivement pour *Staphylococcus aureus* Méti-S d'une part et d'autre part pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* Méti-R. Selon Berche et al. [2], ces valeurs qui sont égales à 1 et 2 nous permettent d'affirmer que les flavonoïdes totaux sont bactéricides. Car d'après ces chercheurs, lorsque le rapport CMB/CMI d'une substance est inférieur ou égal à 4, cette substance est jugée bactéricide tandis qu'elle est dite bactériostatique, si ce rapport est supérieur à 4. Ces résultats confirment ceux de plusieurs autres chercheurs qui ont déjà démontré les activités antibactériennes de *Thonningia sanguinea* (Vahl) sur divers germes dont *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Tricophyton rubrum*, *Cryptococcus neoformans* et *Klebsiella pneumoniae* productrices de bêta-lactamases à spectre élargi [6,10,11].

Cette étude pourrait justifier l'utilisation de cette plante dans le traitement traditionnel des maladies microbiennes comme les infections à staphylocoque.

Conclusion

Les résultats de cette étude ont montré que *Staphylococcus aureus* Méti-S, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* Méti-R sont sensibles aux flavonoïdes totaux de *Thonningia sanguinea* (Vahl). L'évaluation du pouvoir antibactérien a révélé que les flavonoïdes totaux possèdent un pouvoir antibactérien, dose-dépendant, sur les souches *Staphylococcus aureus*.

Les flavonoïdes totaux testés ont inhibé la croissance de *Staphylococcus aureus* Méti-R alors que l'oxacilline (5 µg) et le céfoxitine (30 µg) n'ont pas pu. Les flavonoïdes totaux pourraient donc constituer une alternative moins coûteuse

pour le traitement des infections à staphylocoque. Une étude plus poussée permettra de séparer les flavonoïdes afin de déterminer le ou lesquels possède(nt) l'activité.

Conflit d'intérêt :

les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

1. Babayi H, Kolo I, Okogum JI (2004) The antimicrobial activities of methanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogen microorganism. *Biochimisten* 16: 102-5
2. Berche P, Gaillard JL, Simonet M (1991) Les bactéries des infections humaines. Éditeur Flammarion Médecine-Sciences, 660 p
3. Bolou GEK, Attioua B, N'guessan AC, et al. (2011) Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bull Soc R Sci* 80: 772-90
4. Bourgeois A (1999) Les MST/SIDA au Cameroun. *Biodiagnostic and therapy*. Magasine bilingue de santé au Cameroun, n° 004
5. Bruneton (1999) *Journal de pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (3^e éd). Éditions médicales internationales, éditions Tec & Doc Lavoisier, Paris 1120 p
6. N'guessan JD, Dinzedi MR, Guessennd N, et al. (2007) Antibacterial activity of the aqueous extract of *Thonningia sanguinea* against extended-spectrum-β-lactamases (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Trop J Pharm Res* 6: 779-83
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1995) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixth International Supplement M100-S6. NCCLS, Wayne, PA
8. OMS (2002) Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005
9. Ouattara B, Kra AM, Coulibaly A, Guede-Guina F (2007) Efficacité de l'extrait éthanolique de *Thonningia sanguinea* sur *Cryptococcus neoformans*. *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé* 17: 219-22
10. Ouattara K, Coulibaly A, N'guessan JD, et al. (2005) Activité antidiarrhéique de *Thonningia sanguinea* (THOS) sur les infections à *Salmonella enterica* ser *Enteritidis* lysotype 6 chez la poule pondeuse. *Revue ivoirienne de sciences et technologie* 6: 151-60
11. Ouattara K, Djaman AJ, Coulibaly A, et al. (2007) Activité antibactérienne de *Thonningia sanguinea* (THOS) sur *Salmonella enterica* ser *Enteritidis* lysotype 6, une souche multirésistante. *Revue de médecines et pharmacopées africaines* 20: 1-8
12. Vanden BDA, Vlietinck AJ (1991) Screening methods for antibacterial and antiviral agent from higher plants. *Academie Press* 6: 47-58