

(Manuscrit reçu le 7 juillet 2008, accepté le 25 septembre 2008)

Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance *in-vitro* des souches d'*Escherichia coli*

Study of the antibacterial activity of *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (*rubiaceae*) acetatigue extract (ACE) on *in-vitro* growth of *Escherichia coli* strains

MOROH J.-L. A.¹, BAHI C.¹, DJE K.², LOUKOU Y. G.², GUEDE-GUINA F.¹

¹ Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique. UFR Biosciences, Université de Cocody – Abidjan

Email : moroh_aboaya@yahoo.fr Cel : (225) 07 61 85 81 ou (225) 21 56 05 06

² Laboratoire National de la Santé Publique – Côte d'Ivoire, Service Microbiologie

RÉSUMÉ

Nous avons évalué *in vitro* le pouvoir antibactérien de l'extrait acétatique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne Redheat (*Rubiaceae*) sur huit (8) souches d'*Escherichia coli*, germes bactériens communément rencontrés dans les diarrhées des enfants de 0 à 5 ans. Parmi ces huit souches, trois sont des souches de références à savoir *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739 et *Escherichia coli* 2361 ; trois de sérotype connu (*Escherichia coli* O26 H6, *Escherichia coli* O142 K86 et *Escherichia coli* O126 B16) ; une souche isolée d'une eau de puits et une d'origine hospitalière. Toutes ces souches bactériennes testées se sont révélées sensibles à l'extrait étudié. Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) enregistrées varient de 3,75 à 15 mg/ml tandis que les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) se retrouvent entre 7,5 et 30 mg/ml. Au bout de cette étude, nous retiendrons que l'extrait acétatique de *Morinda morindoides* exerce un effet bactéricide sur les souches étudiées et pourrait par conséquent être utilisé dans le traitement des diarrhées de l'enfant.

Mots clés : *Morinda morindoides*, *Escherichia coli*, Concentration Minimale Inhibitrice, Concentration Minimale Bactéricide.

ABSTRACT

We have analyzed antibacterial activity of the acetatic extract of *Morinda morindoides* (Baker) Redheat Milne (*Rubiaceae*) *in vitro*. This study was made on eight (8) strains of *Escherichia coli*, bacteria often found in the diarrhea of children from 0 to 5 years old. Among these eight strains, three are referenced strains namely *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Escherichia coli* 2361, three of them, were known serotype (*Escherichia coli* O26 H6, *Escherichia coli* O142 K86 and *Escherichia coli* O126 B16) : A strain was retrieved from well and another from hospital. All the strains tested proved to be sensitive to the studied extract. The Inhibitory Minimal Concentration (IMC) recorded, varies from 3.75 to 15.00 mg / ml and their Bactericidal Minimal Concentration (BMC) is between 7.50 and 30.00 mg / ml. At the end of this study, we can conclude that the acetatic extract of *Morinda morindoides* has a bactericidal effect on the studied strains and could therefore be used in the treatment of children diarrhea.

Keywords: *Morinda morindoides*, *Escherichia coli*, Inhibitory Minimal Concentration; Bactericidal Minimal Concentration.

INTRODUCTION

D'après FARNSWORTH et KASS (1986), 80% de la population mondiale utiliseraient des plantes médicinales pour divers problèmes de santé. Ceci par choix, mais aussi du fait de la pauvreté grandissante de nos populations qui n'ont pas accès aux médicaments modernes à cause de leurs coûts très onéreux. Parmi les nombreuses espèces exploitées, *Morinda morindoides* est traditionnellement utilisée dans le traitement de plusieurs maux. Ses feuilles sont utilisées par les peuples du Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire pour traiter les diarrhées en tout genre (BAHI, 2000). Les mêmes feuilles sont exploitées au Nigéria, Congo Brazzaville et en République Démocratique du Congo pour diverses affections tels que la diarrhée, le paludisme, les douleurs causées par le rhumatisme, le diabète, les éruptions cutanées, les dermatoses, les infections microbiennes et le prurit (CIMANGA *et al.*, 1999; LUTETE *et al.*, 2001 ; CIMANGA *et al.*, 2002 ; ADEYEMI, 2003 ; CIMANGA, 2006 ; MANKELE, 2006). Des études ont montré que les extraits totaux aqueux et éthanolique 70% (feuilles et tiges) relaxent l'activité contractile duodénale (BAHI *et al.*, 2000) inhibent la croissance *in-vitro* de *Salmonella OMA*, *Vibrio cholerea*, *Candida albicans*, *Cryptococcus néoformans*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus* (BAHI, 1993 ; KOUAME, 2004 ; KOFFI, 2004 ; BAGRE, 2006 ; 2007).

Dans l'optique de compléter les travaux antérieurs sur les actions antimicrobiennes de *Morinda morindoides*, nous avons évalué l'activité antibactérienne de son extrait acétatique sur la croissance *in-vitro* de huit (8) souches d'*Escherichia coli*.

II MATÉRIEL ET MÉTHODE

II.1 Matériel biologique

II.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de feuilles fraîches de *Morinda morindoides*. Cette plante est une liane grimpante, glabre avec des feuilles opposées, oblongues elliptiques ou ovales elliptiques cunéiformes à la base. Ces feuilles longuement acuminées, glabres, mesurent 6 à 15 centimètres de longueurs sur 3 à 8 centimètres de largeur. Le limbe porte environ 6 paires de nervures latérales. Les fleurs, blanches, groupées en capitules, ont le tube de la corolle court et robuste. Les fruits, bosselés, jaunes à maturité, mesurent 4 centimètres de diamètre.

Les feuilles de cette plante ont été récoltées à Daloa, ville du Centre Ouest de la Côte d'Ivoire entre mars et avril 2007. Ces feuilles nous ont servi à réaliser des poudres puis des extraits aqueux, éthanoliques 70% (ETOH 70) et acétatique (EAC)

II.1.2 Les germes testés

Le support microbien utilisé est composé de huit (8) souches d'*Escherichia coli* fournies par le Service de Microbiologie du Laboratoire National de la Santé Publique (LNSP) de Côte d'Ivoire. Il est composé de :

- Trois (3) souches de référence d'origine américaine : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 2361 et *Escherichia coli* ATCC 8739
- Trois (3) souches entéropathogènes de sérotype connu : *Escherichia coli* O26 H6, *Escherichia coli* 0142 K86 et *Escherichia coli* 0126 B16.
- Deux (2) souches isolées dont une provenant d'une eau de puits d'Abidjan et l'autre d'un patient (source hospitalière).

II.2 Méthode

II.2.1 Préparation de l'extrait végétal

II.2.1.1 Pulvérisation

Les feuilles de *Morinda morindoides* récoltées, lavées, découpées en petit morceaux puis séchées à l'abri du soleil à la température du laboratoire (25° à 30°) sont rendues en poudre fine à l'aide d'une broyeuse IKA labortechnik type MFC.

II.2.1.2 Préparation de l'extrait acétatique de *Morinda morindoides*

L'extrait acétatique de *Morinda morindoides* a été préparé selon la méthode décrite par ZIRIHI (2007) et BAGRE (2007). Nous avons dissous 100 grammes de poudre de *Morinda morindoides* dans 2 litres d'eau distillée. Le tout a été homogénéisé pendant 48 heures à 80°C à l'aide d'un agitateur magnétique de type IKA-MAG RCT à 80°. L'homogénat obtenu a été ensuite filtré deux fois sur du coton hydrophile et une fois sur du papier filtre Whatman 3mm. Puis, le filtrat obtenu a été évaporé à pression réduite à la température de 50°C à l'aide d'un évaporateur rotatif BUCHI 161 Water Bath. Nous avons alors obtenu une poudre sèche de couleur noire constituant l'extrait total aqueux (ETA). Le recoupage de cet extrait en extrait éthanolique (ETOH 70) s'est fait à partir de 25g d'extrait total aqueux dissous dans un mélange de 350 ml d'éthanol et de 150 ml d'eau distillée. Le tout a été homogénéisé pendant 24 heures à la température ambiante (25°C – 30°C) sous agitation magnétique. L'homogénat obtenu a été filtré successivement sur du coton et sur du papier filtre Whatman 3mm. Le filtrat a été ensuite évaporé dans les mêmes conditions que précédemment. Nous avons obtenu une pâte marron qui a représenté notre extrait éthanolique 70%. A partir de cet extrait, nous avons préparé l'extrait acétatique (EAC). Pour ce faire, 25 grammes de EAC sont ajoutés dans un solvant composé d'acétate d'éthyle/eau distillée volume pour volume. Le tout a été vigoureusement agité pendant 10 à 20 minutes. Au bout de 30 à 50 minutes dans une ampoule à décanter, nous avons assisté à la formation de deux (2) phases. Après élimination de la phase inférieure aqueuse, la phase supérieure acétatique a été recueillie et évaporée à pression réduite à 25°C. Nous avons obtenu une pâte noire représentant notre extrait acétatique (BAGRE et coll., 2006 ; 2007). C'est à partir de cet extrait que nous avons préparé la gamme de concentration pour l'étude antibactérienne.

II.2.2 Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait végétal

L'étude de l'activité antimicrobienne a consisté à déterminer des paramètres antibactériens (CMI et CMB) de notre extrait acétatique de *Morinda morindoïdes*. Pour sa réalisation, nous avons utilisé la méthode de la macrodilution en milieu liquide.

II.2.2.1 Repiquage des souches bactériennes

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées. Les colonies isolées ont servi à préparer l'inoculum.

II.2.2.2 Préparation de l'inoculum

L'inoculum s'est fait à partir des colonies jeunes préparées 18 à 24 heures plus tôt et du Bouillon Mueller Hinton (BMH) composé de 300g/l d'infusion de viande de bœuf, de 1,5 g/l d'amidon, de 17,5g/l d'hydrolysate de caséine, de 0,06 à 0,2 g/l de calcium, de 0,02 à 0,04 g/l de magnésium et d'une quantité suffisante d'eau distillée pour atteindre 1 litre avec un pH final de 7,4.

Une colonie isolée d'*E. coli* a été prélevée à l'aide d'une anse de platine et homogénéisée dans 10 ml de BMH puis porté à incubation pendant 3 à 5 heures à 37°C pour avoir une pré culture. On a prélevé ensuite 0,1 ml du bouillon de pré culture opalescent d'*E. coli* qu'on a introduit dans un tube contenant 10 ml de BMH concentré deux fois. Cette suspension bactérienne réalisée s'est évaluée à environ 10^6 germes/ml.

II.2.2.3 Détermination des paramètres antibactériens

a Préparation de la gamme de concentration de la substance végétale

Avant la préparation de la gamme de concentration, les extraits sous forme de poudre ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. La gamme de concentrations de l'extrait végétal a été préparée dans des tubes à essais par la méthode d'une dilution selon une progression géométrique de raison 2 avec des concentrations allant de 60,00 mg/ml à 1,87mg/ml.

b Inoculation

Dans une série de 7 tubes à hémolyse numérotés de C1 à C7, nous avons introduit 1ml de BMH concentré deux fois déjà contaminé par le germe à tester. Ensuite nous avons ajouté dans ces mêmes tubes 1ml d'extrait végétal de concentration bien connue selon la gamme de

concentrations préparées. Cette répartition d'extrait végétal s'est faite de sorte que 1ml d'extrait végétal de 60,00 mg/ml soit transféré dans le tube C1, celui de 30,00 mg/ml dans le tube C2 ainsi de suite jusqu'au tube C6 qui recevra 1ml d'extrait végétal de 1,87 mg/ml. Le tube C7 recevra, en lieu et place d'extrait végétal, 1 ml d'eau distillée stérile qui a servi de témoin de croissance. Cette répartition d'extrait végétal de concentration bien connue dans chacun des tubes contenant déjà 1 ml d'inoculum a ramené la concentration du milieu en extrait végétal à sa moitié. Ainsi la concentration du tube C1 est passée de 60,00 mg/ml à 30,00 mg/ml. Celui du tube C2 de 30,00 mg/ml à 15 mg/ml jusqu'au tube C6 avec une nouvelle concentration de 0,937 mg/ml. Les six (6) premiers tubes (de C1 à C6) sont appelés « *tubes expérimentaux* » et le dernier tube (C7) est noté « *tube témoin de croissance ou TC* ». Ces tubes chargés sont incubés à 37°C pendant 24 heures après avoir relevé les valeurs de leur turbidité initiale, lues au « *DENSIMAT* » fourni par BIOMERIEUX. L'expérience a été faite trois (3) fois

c Lecture et dénombrement des germes

Le dénombrement des germes après 24 heures d'incubation s'est effectué directement en milieu liquide par la mesure de la turbidité. Cette mesure s'est faite à l'aide d'un appareil appelé *DENSIMAT*.

Il s'agit en effet d'un densitomètre destiné à mesurer la densité d'un inoculum bactérien réalisé dans une ampoule de milieu liquide. L'appareil donne des valeurs en McFarland, proportionnellement à des valeurs moyennes de concentrations bactériennes obtenues avec des bacilles Gram négatifs rencontrés en bactériologie clinique. Le dénombrement s'effectue en faisant la différence entre la valeur relevée avant l'incubation et celle après l'incubation pour chaque tube. La valeur obtenue pour le tube N°7 (le tube témoin de croissance) représente 100% de survie. Les valeurs obtenues pour les six (6) autres tubes (tubes expérimentaux) sont par la suite exprimées en pourcentage de survie par rapport à celle du tube témoin. Ainsi, la méthode de calcul du pourcentage de survie des germes dans les tubes expérimentaux s'est faite selon la formule suivante :

$$S = \frac{(d_f - d_i)}{(D_f - D_i)} \times 100$$

Où S est le pourcentage de survie des germes, d_i la valeur densimat du tube expérimental avant incubation, D_i la valeur densimat du tube témoin avant incubation), D_f la valeur densimat du tube témoin après incubation) et d_f la valeur densimat du tube expérimental après

incubation. L'analyse des résultats a permis de tracer les courbes de sensibilité des germes (pourcentage de survie des germes en fonction de la concentration du milieu en extrait) (KRA *et al.*, 2004 ; ZIRIHI *et al.*, 2007).

d Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de façon générale est la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures. Ici sa détermination s'est effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance des germes étudiés. La CMI correspondra donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité. Par conséquent c'est le premier tube où la valeur d_i est égale à d_f ($d_i = d_f$).

e Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide (CMB), est la concentration de l'antimicrobien qui laisse au plus 0.01% de germes survivants. Pour sa détermination, le tube témoin a été dilué jusqu'à 10^{-4} . Cette dilution a représenté 0,01% de survie. Elle est repiquée par strie de 5 cm sur une Gélose Mueller Hinton puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Le nombre de germes obtenus sur la strie de la dilution 10^{-4} est comparé à celui de chaque tube expérimental également repiqué par strie de 5cm. Ainsi, le premier tube expérimental dont le nombre de germes présent sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10^{-4} correspondra à la CMB.

III RÉSULTATS

Les tubes expérimentaux numérotés de C1 à C6 contiennent à la fois les différents germes et l'extrait acétatique de *Morinda morindoides*. Dans ces tubes, on note que les concentrations croissantes en extrait végétal (0,93 ; 1,87 ; 3,75 ; 7,50 ; 15,00 et 30,00 mg/ml) provoquent une diminution progressive et dose-dépendante de la turbidité induite par la croissance des souches. Les différentes valeurs en McFarland de la turbidité induite par la croissance des *Escherichia coli* sont présentées dans le tableau I. Cette turbidité liée à la quantité de germes présents dans le tube est mesurée avant et après l'incubation. Ces valeurs pour chaque tube expérimental sont respectivement notées d_i et d_f . La différence entre ces deux valeurs nous a donné le niveau de la croissance bactérienne dans le tube concerné. Cette différence est notée

($d_f - d_i$). Ainsi, pour les souches *E coli* ATCC 25922, *E coli* ATCC2361, *E coli* ATCC8739, *E coli* O142 K86, *E coli* O126 B16 et *E coli* O26 B6, à 7,5mg/ml (Tube C3), nous avons noté une absence de la turbidité témoignée par la valeur $d_f - d_i = 0$ d'où un pourcentage de survie $S = 0$. En considérant comme 100 le pourcentage de survie dans le tube témoin de croissance, l'addition de 0 mg/ml d'extrait dans le milieu donne cette valeur. Les différentes valeurs obtenues par ce procédé en ajoutant les autres concentrations ont permis de tracer les courbes de sensibilité des chaque souche à notre extrait présentés par la figures B. Les courbes présentent une allure globale décroissante et s'annulent à **7,50 mg/ml** pour les souches de *E coli* ATCC 25922, ATCC 2361, ATCC 8739, O142 K86, O126 B16 et O26 B6. Pour la souche isolée à partir d'une eau de puits, la courbe s'annule à **3,75 mg/ml** et à **15,00 mg/ml** pour celle de source hospitalière.

Les figures A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 et A8 représentent d'une part (image de la gauche) les repiquages sur gélose des différents tubes témoins de croissance TC et ses dilutions au 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} et d'autre part (images de la droite), les repiquages de certains tubes expérimentaux par stries sur gélose. Ces repiquages sur gélose neuve (gélose Mueller Hinton sans extrait végétal) nous ont permis d'observer que le nombre de germes portés par les stries des différents tubes C3 (7,50 mg/ml) des 7 premières souches et le tube C1 (30,00 mg/ml) de la dernière souche étudiée est inférieur ou égale au nombre de germes portés par les stries de la dilution 10^{-4} de leur tube témoin de croissance (0,01% de survie). Ces concentrations représentent alors les différentes CMB des souches concernées.

Les paramètres antibactériens de l'extrait acétatique de *Morinda morindoides* sur les différentes souches d'*Escherichia coli* sont résumés dans les tableaux II, III et IV.

Tableau I : Variation de la turbidité induite par la croissance des *E. coli* en fonction de la concentration en extrait acétatique de *Morinda morindoides* sur les souches (répétition N=3).

		TC	C6	C5	C4	C3	C2	C1
		0,00	0,93	1,87	3,75	7,50	15,00	30,00
		(mg/ml)						
EC ATCC 25922	$d_f - d_i$ (McFarland)	5,0	1,1	1,0	0,4	0,0	0,0	0,0
	Ecart type	1,0	0,2	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0
EC ATCC 2361	$d_f - d_i$ (McFarland)	2,7	2,2	2,1	2,0	0,0	0,0	0,0
	Ecart type	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
EC ATCC 8739	$d_f - d_i$ (McFarland)	5,0	1,2	0,9	0,6	0,0	0,0	0,0
	Ecart type	0,8	0,2	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0
EC O142 K86	$d_f - d_i$ (McFarland)	1,8	1,1	0,8	0,7	0,0	0,0	0,0
	Ecart type	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
EC O126 B16	$d_f - d_i$ (McFarland)	5,5	2,0	1,5	1,3	0,0	0,0	0,0
	Ecart type	1,2	0,7	0,4	0,3	0,0	0,0	0,0
EC O26 B6	$d_f - d_i$ (McFarland)	0,8	0,7	0,6	0,4	0,0	0,0	0,0
	Ecart type	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
EC puits	$d_f - d_i$ (McFarland)	0,6	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
	Ecart type	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
EC SH	$d_f - d_i$ (McFarland)	1,7	1,6	1,3	1,0	0,9	0,0	0,0
	Ecart type	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,0	0,0

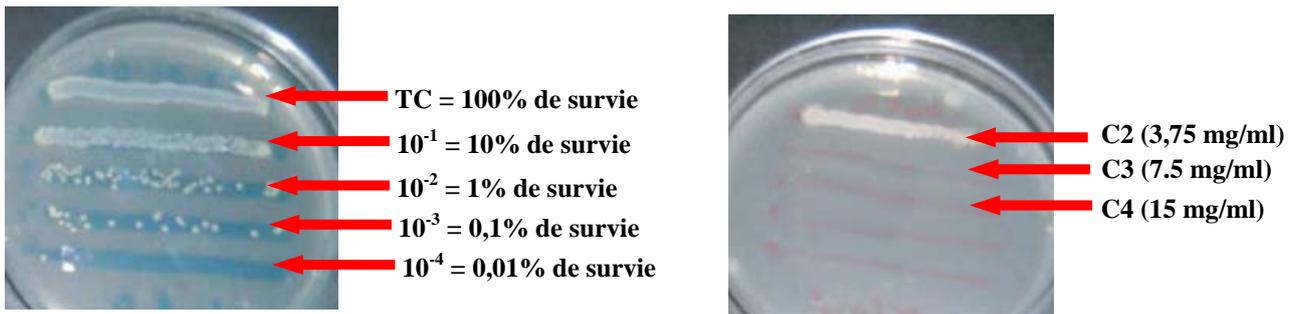


Figure A1 : Détermination de la CMB de l'extrait acétalique de **BGG** sur *E coli* ATCC 25922

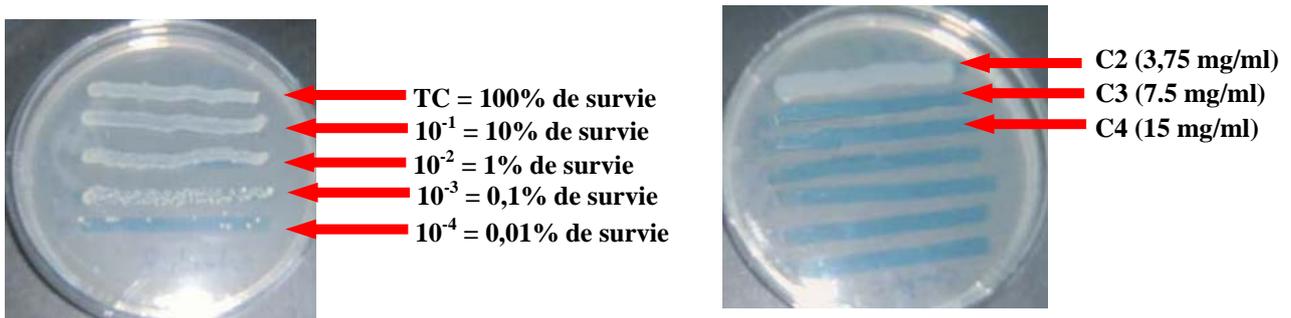


Figure A2 : Détermination de la CMB de l'extrait acétalique de **BGG** sur *E coli* ATCC 2361

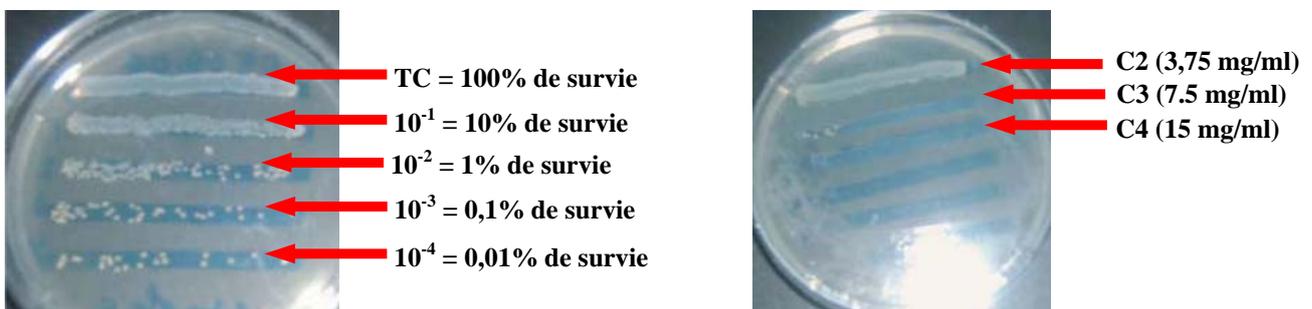


Figure A3 : Détermination de la CMB de l'extrait acétalique de **BGG** sur *E coli* ATCC 8739

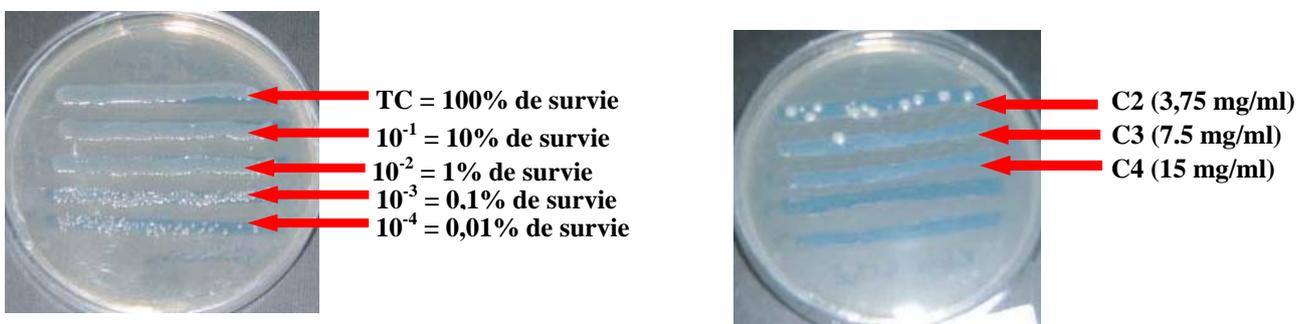


Figure A4 : Détermination de la CMB de l'extrait acétalique de **BGG** sur *E coli* O:142 K:86

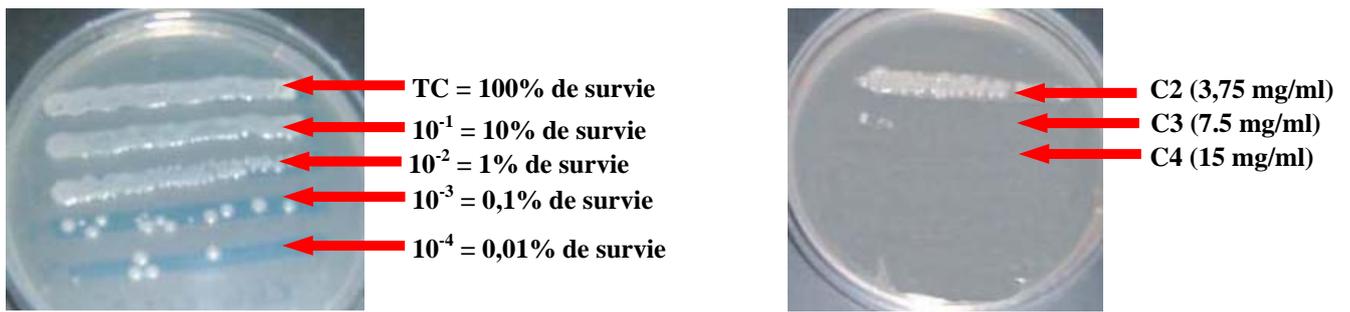


Figure A5 : Détermination de la CMB de l'extrait acétalique de **BGG** sur *E coli* O:126 B:16

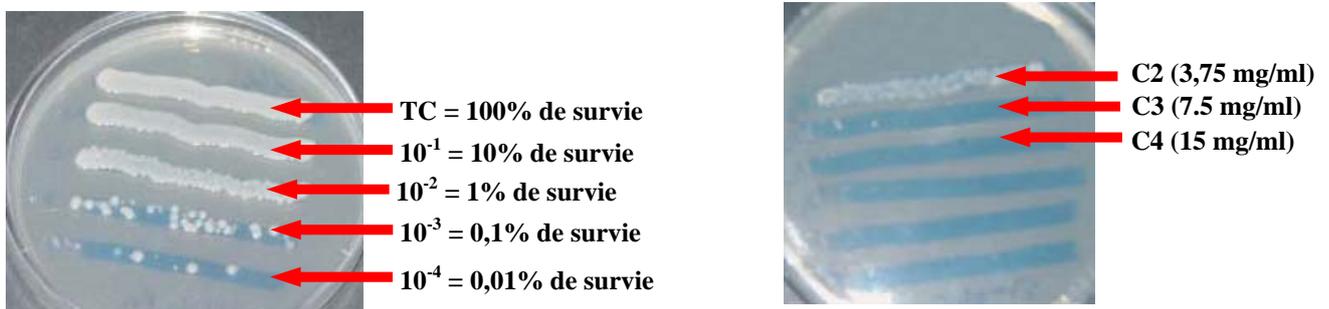


Figure A6 : Détermination de la CMB de l'extrait acétalique de **BGG** sur *E coli* O:26 B:6

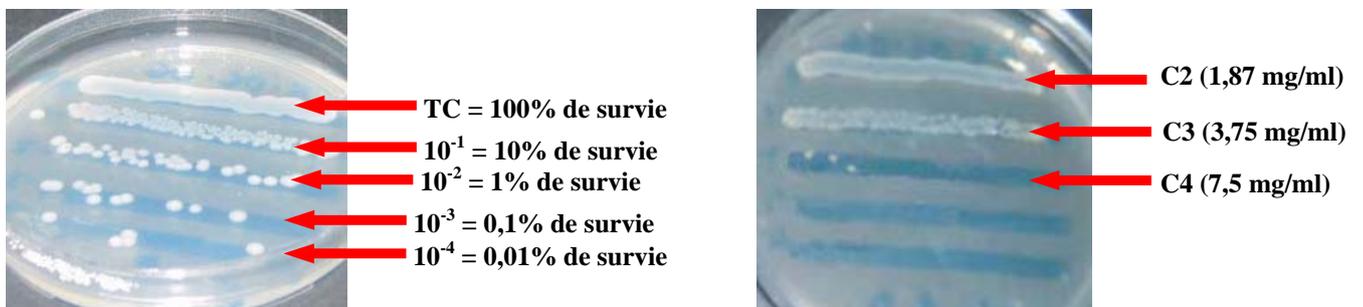


Figure A7 : Détermination de la CMB de l'extrait acétalique de **BGG** sur *E coli* d'eau d'un puits

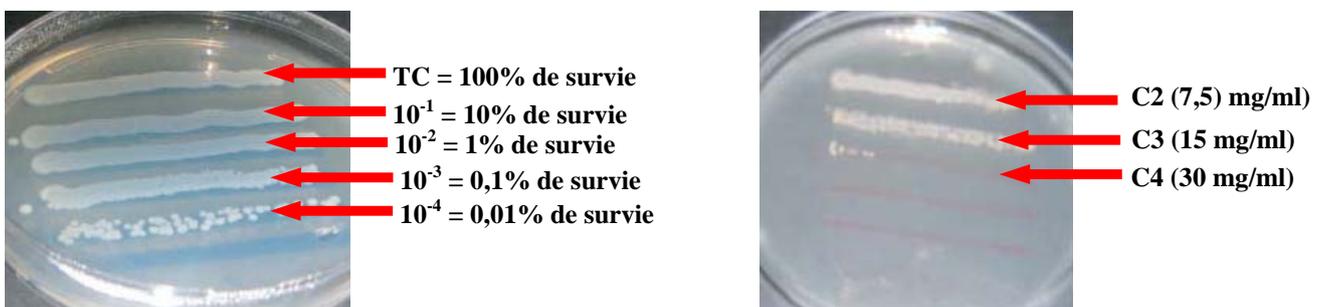


Figure A8 : Détermination de la CMB de l'extrait acétalique de **BGG** sur *E coli* de source hospitalière

Tableau II : Concentration Minimale Inhibitrice de l'extrait acétatique de *Morinda morindoides* sur les souches d'*E. coli* étudiées.

Souches		CMI (mg/ml)
<i>Souches de Référence</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	7,50
	<i>E. coli</i> ATCC 2361	7,50
	<i>E. coli</i> ATCC 8739	7,50
<i>Souches entéro-pathogène de Sérotype connu</i>	<i>E. coli</i> O142 K86	7,50
	<i>E. coli</i> O126 B16	7,50
	<i>E. coli</i> O26 B6	7,50
<i>Souches isolées</i>	<i>E. coli</i> d'une de puits	3,75
	<i>E. coli</i> de source hospitalière	15,00

Tableau III : Concentration Minimale Bactéricide de l'extrait acétatique de *Morinda morindoides* sur les souches d'*E. coli* étudiées.

Souches		CMB (mg/ml)
<i>Souches de Référence</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	7,50
	<i>E. coli</i> ATCC 2361	7,50
	<i>E. coli</i> ATCC 8739	7,50
<i>Souches entéro-pathogène de Sérotype connu</i>	<i>E. coli</i> O142 K86	7,50
	<i>E. coli</i> O126 B16	7,50
	<i>E. coli</i> O26 B6	7,50
<i>Souches isolées</i>	<i>E. coli</i> d'une de puits	7,50
	<i>E. coli</i> de source hospitalière	30,00

Tableau IV : Valeurs de rapports CMB/CMI de l'extrait acétatique de *Morinda morindoides* sur les souches d'*E. coli* étudiées.

Souches		CMB/CMI	Pouvoir
<i>Souches de Référence</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	Bactéricide
	<i>E. coli</i> ATCC 2361	1	Bactéricide
	<i>E. coli</i> ATCC 8739	1	Bactéricide
<i>Souches entéro-pathogène de Sérotype connu</i>	<i>E. coli</i> O142 K86	1	Bactéricide
	<i>E. coli</i> O126 B16	1	Bactéricide
	<i>E. coli</i> O26 B6	1	Bactéricide
<i>Souches isolées</i>	<i>E. coli</i> d'une de puits	2	Bactéricide
	<i>E. coli</i> de source hospitalière	2	Bactéricide

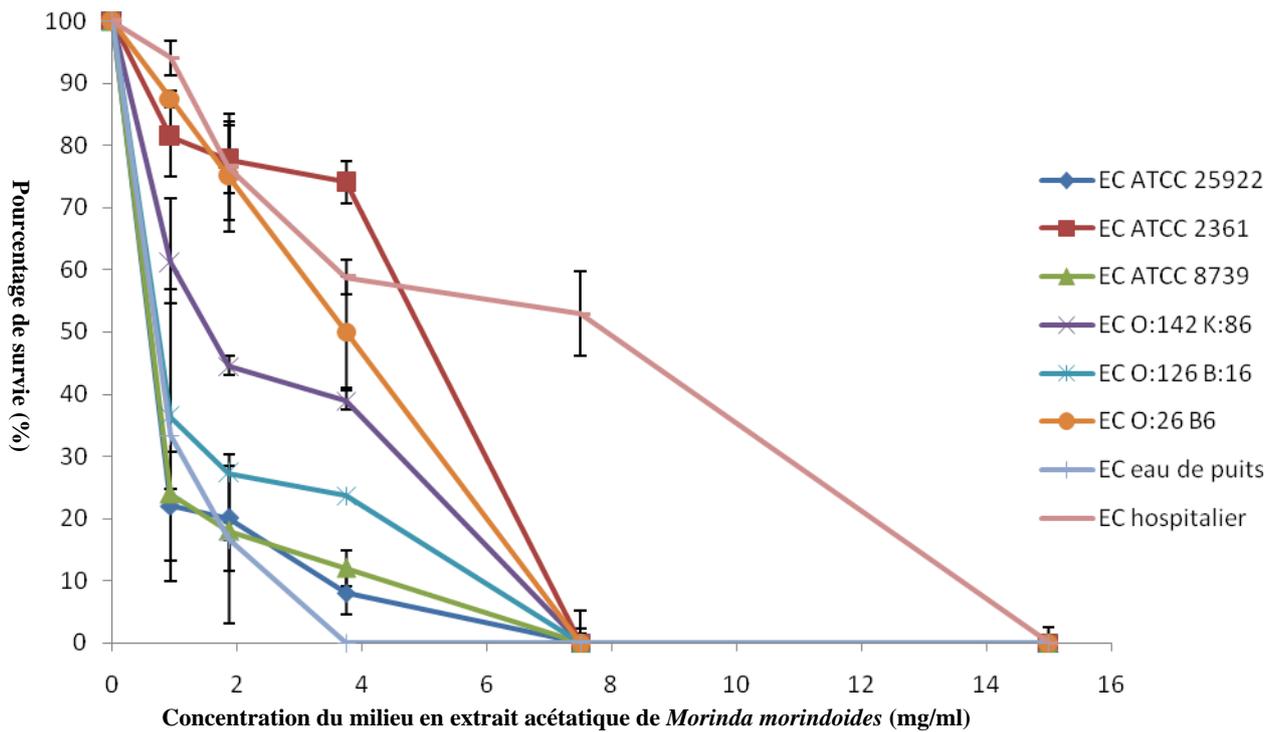


Figure B : Courbes récapitulatives des sensibilités des différentes souches d'*E. coli* à l'extrait acétatique de *Morinda morindoides*

IV DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons évalué l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique de *Morinda morindoides* (baker) milne-redheat (*rubiacae*) sur la croissance *in-vitro* de huit (8) souches *d'Escherichia coli* dont trois (3) souches de référence, trois (3) souches entéro-pathogènes sérotypées, une (1) souche isolée d'une eau de puits et une (1) de source hospitalière.

L'analyse des données expérimentales montre que comparativement aux témoins de contrôle de croissance, il y a une diminution du nombre de colonies de ces germes dans les tubes expérimentaux au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. Ainsi, nos résultats montrent que l'extrait acétatique est actif à divers degrés et manifeste une activité antibactérienne en inhibant la croissance *in-vitro* des germes bactériens selon une relation dose-réponse. Cela nous permet de déterminer les différents paramètres antibactériens à

savoir la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale bactéricide (CMB) et le rapport CMB/CMI.

Les plus faibles valeurs des paramètres antibactériens ont été obtenues avec la souche d'*Escherichia coli* isolée d'une eau de puits (CMI = 3,75mg/ml; CMB = 7,5mg/ml). Les plus fortes valeurs avec celle de source hospitalière (CMI = 15mg/ml; CMB = 30mg/ml). Entre ces deux (2) valeurs, nous avons obtenus des valeurs intermédiaires avec les souches de référence et les souches entéro-pathogènes sérotypées d'*Escherichia coli* (CMI = CMB = 7,5mg/ml). Ainsi, pour cet extrait, la souche d'*Escherichia coli* isolée d'une eau de puits se présente comme la souche la plus sensible et la souche de source hospitalière comme la plus résistante. Une analyse des valeurs de CMI montre que comparativement à celles obtenues par BAHU (1993) avec l'extrait total aqueux de *Morinda morindoides* à savoir CMI = 30,00mg/ml, *Escherichia coli* est plus sensible à l'extrait acétatique de *Morinda morindoides* qu'à l'extrait total aqueux. L'extrait acétatique améliore deux (2) voire trois (3) fois l'activité antibactérienne de l'extrait total aqueux. Il faut rappeler que l'activité d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principe actif (WAGNER, 1993 ; THANGARA *et al.*, 2000). Pour nos tests microbiologiques, nous avons utilisé l'extrait acétatique. Cet extrait a été préparé à partir du recoupage de l'extrait total aqueux de *morinda morindoides* par l'éthanol 70 puis par de l'acétate d'éthyle.

BAGRE, par une étude triphytochimique confirmée par une chromatographie sur couche mince (CCM) a montré que, lorsqu'on passe de l'extrait total aqueux de *Morinda morindoides* à l'extrait acétatique de la même plante, certains groupes chimiques sont éliminés et d'autres sont concentrés. Ainsi, selon cet auteur, les alcaloïdes qui étaient moins concentrés dans l'extrait total aqueux sont fortement présents dans l'extrait acétatique. Il en est de même des stérols. La concentration des flavonoïdes est la même quelque soit l'extrait utilisé (BAGRE, 2007).

Les alcaloïdes, de façon générale, jouent un rôle important dans les structures biologiques ; ils sont aussi de puissants anti cholinergiques (GNALEI, 2005) et sont reconnus pour leur pouvoir antibactérien élevé (SCAZZOCCHIO *et al.*, 2001 ; MUSTER, 2004). Ces alcaloïdes très concentrés dans notre extrait acétatique pourraient être en partie responsables de l'activité antibactérienne obtenue.

CIMANGA (2006) a purifié et isolé de *Morinda morindoides* des flavonoïdes qui sont responsables du pouvoir anti allergique, anti parasitaire et inhibent également l'activation des compléments (CIMANGA, 2002; MAKELE *et al.*, 2006).

L'activité antibactérienne mise en évidence pourrait être attribuée aux alcaloïdes qui non seulement ont été concentré dans notre extrait mais également possèdent selon la littérature une forte activité antibactérienne.

Le rapport d'activité CMB/CMI pour toutes les souches *d'E. coli* étudiées varient entre un (1) et deux (2). Selon MARMONIER (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. L'extrait acétatique dont le rapport d'activité CMB/ CMI varie de un (1) à deux (2) peut être qualifié de substance bactéricide.

Cet extrait a donc une activité bactéricide contre toutes les souches *d'E. coli* étudiées.

CONCLUSIONS

Dans cette étude analytique qui consistait à évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique de *Morinda morindoides* nous a permis de conclure que :

- Toutes les souches *d'E coli* étudiées sont sensibles à notre extrait.
- Cette sensibilité est différente selon les souches. Il y a des souches très sensibles, des souches moyennement sensibles et des souches moins sensibles.
- L'extrait acétatique de *Morinda morindoides* est bactéricide car le rapport CMB/CMI est inférieur à 4 pour toutes les souches.
- L'extrait acétatique de *Morinda morindoides* est plus actif sur *E coli* que l'extrait total aqueux. Il concentre mieux le principe actif et pourrait être retenu pour les études ultérieures.

Dans nos futurs travaux, nous nous intéresserons à la purification des phytomolécules de *Morinda morindoides* et les testerons à nouveau sur *E coli*.

RÉFÉRENCES

BAGRE I., BAHİ C., GNAHOUE., DJAMAN A. J., GUEDE-GUINA F. (2007)

Composition phytochimique et évaluation *in vitro* de l'activité antifongique des feuilles de *Morinda morindoides* (BAKER) Milne-redh (*rubiacae*) sur *Aspergillus fumigatus* et *Candidat albicans*. J.sci. pharm. Biol., **8** (1), 2007, 15-23. EDUCI 2007.

BAGRE I., BAHİ C., MEITE S., DJAMAN A. J., GUEDE-GUINA F. (2006)

Évaluation et amélioration *in vitro* de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh (*rubiacae*) sur cryptococcus néoformans, un champignon responsable de mycose humaine. J.sci. pharm. Biol., **7** (1), 2006, 37-46. EDUCI 2006.

BAHİ C. (1993)

Évaluation de l'action anti diarrhéique de *Morinda morindoides*, un concentré de source végétale DEA de Biotechnologie et amélioration de la production végétale option Pharmacologie des Substances Naturelles, Université de Cocody-Abidjan 30p.

BAHİ C., N'GUESSAN D., GUEDE-GUINA F. (2000)

Mise en évidence d'une action myorelaxante et cholinolytique de BITTER GG (*Morinda morindoides*), un anti diarrhéique de source végétale. Afrique biomédical, **5** (1), 2000, 11-18.

BERCHE (2002)

Cours de bactériologie systématique 2002/2003 PCEM 2 .Faculté de Médecine Necker Enfants malades 94p

CIMANGA K., KAMBU K., TONA L., HERMANS N., et al. (2006)

Cytotoxicity and *in vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents. Journal of Ethnopharmacology, **107**, 2006, 83-90.

FARNSWORTH NR, KASS C. J. (1986)

An approach utilizing information from traditional medicine to identify tumor inhibiting plants. Bulletin de l'OMS, **66**, 159p.

GERMANI Y. (1995)

Méthode de laboratoire ; Pouvoirs entéropathogènes des bactéries (*Escherichia coli* agent

entérites), 120 pages.

GUILLEMOT D., MAUGENDRE P., CHAUVIN C., SERME T.C. (2004)

Consommation des antibiotiques en France. BEH n°3233, 2004, 141-147.

KOFFI A. (2003)

Activité antimicrobienne de Bitter GG (*Morinda morindoides*), une substance anti-diarrhéique de source naturelle sur le vibron du cholera (Extrait totaux, alcoolique, résiduel et la fraction FS). DEA de Biotechnologie et Amélioration de la production végétale option Pharmacologie des Substances Naturelles, UFR Biosciences, université de Cocody Abidjan, 49p

KOUAME (2004)

Action antibactérienne de *Morinda morindoides*, une substance de source naturelle sur Salmonelle OMA DEA de Biotechnologie et Amélioration de la production végétale option Pharmacologie des Substances Naturelles, UFR Biosciences, université de Cocody Abidjan, 34p

KRA A. K. M., (2001)

Évaluation et amélioration par séquençage chromatographique d'une action antifongique de MISCA contre *Aspergillus fumigatus*. Thèse de doctorat 3^{ème} cycle UFR Biosciences Université Abidjan Cocody 116 pages.

MANKELE R. , OUAMBA J.-M. , ABENA A. A., YALAF (2006)

Étude des effets de *Morinda morindoides* (Back) sur le système immunitaire de l'homme. Phytothérapie, 4 (2), 2006, 68-73.

MARMONIER A. A. (1990)

Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. Bactériologie Médicale, technique usuelles, 227-236.

MUSTER D., LOTFI BEN SLAMA (2004)

Thérapeutique médicale buccodentaire: moyens et méthodes

Publié par Elsevier Masson, 2004 ISBN 2842995651, 9782842995652, 290 pages

N'GUESSAN J. D., BAH C., GUEDE-GUINA F. (1998)

Évaluation de l'action anti-diarrhéique et de la tolérance cardiovasculaire de *Morinda*

morindoides un extrait végétal. JBNA-1 Abidjan, 30 nov 04 déc 1998.

SCAZZOCCHIO F. COMETA M. F., TOMASSINI L., PALMERY M. (2001)

Antibacterial activity of *Hydrastis canadensis* extract and its major isolated alkaloids
Planta medica , **67** (6), 2001, 561-564.

THAGARA J. H. S., ADJEI O., ALLEN B. W., PORTAELS F. et al. (2000)

In vitro activity of ciprofloxacin, Sparfloxacin, Ofloxacin, Amikacin and Rifampicin against
Ghanian isolates of *Mycobacterium ulcerans* ; J. Antimicrob. Agents Chemother, **45** (2),
2000, 231-233.

**TONA L., MESIA K., NGIMBI N. P., CHRIMWAMI B. CIMANGA K., BRUYNE T.,
APERS S., HERMAN N., TOTTE J., PIETERS L., VLIETINCK A. J. (2001)**

In vivo antimalarial activity of *Cassia occidentalis*, *Morinda morindoides* and *Phyllanthus
niruri*. Ann. Trop. Méd. Parasitol. **95** (1), 2001,47-49.

WAGNER H. (1993)

Pharmazeutische Biologie. Drogen und irhe inhaltsstoffe, Gustav Fisher Verlag.
Stuttgart-New-York, 522p.

ZIHIRI G., KRA A. (2003)

Évaluation de l'activité antifongique *Microglossa Pirifilia* (LARMARCK) O. KUNTZE
(*Asteraceae*) « PYMI » sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. Rev. Med. Pharm. Afr,
17, 2003, 11-19.

ZRIHI G. N., KRA A. K. M., ETIEN D. T. (2007)

Étude botanique et évaluation des activités antifongiques de *Mitracarpus villosus* (MV)
(*Rubiaceae*) et *spermacoce verticillata* (SV) (*Rubiaceae*) sur la croissance *in vitro* de
Aspergillus fumigatus. Revue Méd. Pharm. Afr., **20**, 2007, 9-17.