

Activité de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* du vibrion du choléra : expérimentation en Côte d'Ivoire

Koffi AE¹, Yapi HF³, Bahi C³, Guessend KN², Djaman JA^{1,4}, Guede-Guina F^{3†}

1. Laboratoire de Microbiologie, Institut National de Santé Publique (INSP).

2. Laboratoire de Bactériologie Virologie, Institut Pasteur.

3. Laboratoire de Pharmacodynamie biochimique, UFR Biosciences.

4. Laboratoire de Biochimie fondamentale et clinique, Institut Pasteur.

Abidjan, Côte d'Ivoire.

Med Trop 2010; **70** : 53-56

RÉSUMÉ • Le choléra constitue un problème majeur de santé publique dans les pays en développement. En Côte d'Ivoire, afin d'apporter notre contribution dans la prise en charge de cette maladie, nous avons évalué l'activité antibactérienne de quatre extraits. Il s'agit des extraits total aqueux, éthanologique 70 %, résiduel, et la fraction chromatographique F5 : BGG-F5) des feuilles de *Morinda morindoides*, plante de la pharmacopée ivoirienne, qui ont été testés sur une souche pathogène de *Vibrio cholerae* O:1. Les quatre extraits testés ont une efficacité antibactérienne *in vitro* considérable sur *Vibrio cholerae* O:1. L'extrait éthanologique 70 % est le plus actif sur la croissance *in vitro* de *Vibrio cholerae* O:1 avec une concentration minimale bactéricide de 5 mg/mL. Les propriétés antibactériennes de cette plante peuvent être bénéfiques pour la prise en charge du choléra.

MOTS-CLÉS • *Morinda morindoides*. Concentration minimale Bactéricide. *Vibrio cholerae*. Choléra. Côte d'Ivoire.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *MORINDA MORINDOIDES* ON *IN VITRO* GROWTH OF *VIBRIO CHOLERA*E IN CÔTE D'IVOIRE

ABSTRACT • Cholera is a major public health problem in developing countries. As a contribution to management of this disease, the study described herein was carried out in Côte d'Ivoire. The purpose was to evaluate the antibacterial activity of products obtained by various techniques from the leaves of *Morinda morindoides* on a pathogenic strain of *Vibrio cholerae* O:1. *Morinda morindoides* is a medicinal plant in the Ivorian pharmacopoeia. The products were obtained as aqueous extracts, 70% ethanolic extracts, residual extracts and a chromatographic fraction (BGG F5). All three extracts and the chromatographic fraction showed considerable *in vitro* antimicrobial efficacy against *Vibrio cholerae* O:1. The most active against *in vitro* growth of *Vibrio cholerae* O:1 was the 70% ethanolic extract with a minimal bactericidal concentration of 5 mg/ml. The antibacterial properties of this medicinal plant can be of great benefit for management of cholera.

KEY WORDS • *Morinda morindoides*. Minimal bactericidal concentration. *Vibrio cholerae*. Cholera. Cote d'Ivoire.

Le choléra constitue aujourd'hui un véritable problème de santé publique dans le monde entier, en Afrique et particulièrement en Côte d'Ivoire (1).

En 2006 et en 2007, 236 896 et 177 963 cas de choléra ont été respectivement déclarés à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) avec respectivement 6 311 et 4 031 décès dans plus de cinquante pays, en Afrique, en Asie et dans une moindre mesure en Amérique et en Océanie (1). L'Afrique seule notifie le plus grand nombre de cas de choléra et de décès : 234 349 cas en 2006, ce qui représente 99 % du total mondial dont 6 303 décès et 166 583 cas en 2007 avec 3 994 décès (1,2).

Le traitement actuel du choléra est basé essentiellement sur la réhydratation par voie orale (3). Quant aux autres moyens thérapeutiques (antibiothérapie), la Tétracycline est l'antibiotique de premier choix (même si quelques souches sont résistantes), mais d'autres molécules sont également efficaces notamment le cotrimoxazole, l'érythromycine, la doxycycline, le chloramphénicol, le furazolidone (4). Les fluoroquinolones aussi bien que la norfloxacine sont aussi indiquées mais des résistances ont été rapportées (5). Ces antibiotiques n'ont pas prouvé leur efficacité à cause de l'émergence des germes résistants (5, 6) et de leur coût très élevé (donc

inaccessibles aux populations démunies). Face à cette situation préoccupante, la mise au point d'un phytomédicament simple, peu coûteux et efficace semble être plus que jamais d'actualité. *Morinda morindoides* (*Rubiaceae*) constitue ainsi une espèce végétale de choix car elle est utilisée traditionnellement par les peuples du centre ouest de la Côte d'Ivoire pour guérir les diarrhées.

Les travaux récents entrepris sur cette espèce végétale ont montré que, outre ses propriétés « antidiarrhéiques », elle possède des propriétés antifongiques (7, 8), antiplasmodiales, (9) et anti-protozoaires (10).

L'objectif du présent travail a été de tester les différents extraits (total aqueux, éthanologique 70 %, résiduel, fraction chromatographique), de cette espèce végétale sur la croissance *in vitro* de *Vibrio cholerae* O:1.

Matériel et méthodes

Matériel

• Matériel d'origine végétale

Le matériel végétal est constitué de feuilles de *Morinda morindoides* (BGG) préalablement lavées puis séchées lentement à l'abri du soleil, à la température ambiante.

• Correspondance : koffiallali@yahoo.fr

• Article reçu le 11/09/2008, définitivement accepté le 2/11/2009.

• Matériel microbien

Le support microbien est une souche de *Vibrio cholerae* O:1 fournie par le Laboratoire de Bactériologie Virologie de l'Institut Pasteur d'Abidjan (Côte d'Ivoire : IPCI), isolée à partir des selles d'un malade (souche hospitalière : BE 2942).

Méthodes

• Préparation des extraits végétaux

- Extrait total aqueux (E.T.aq)

Les feuilles séchées de la plante ont été pulvérisées par un broyeur mécanique de type IKA® Labortechnik Staufen; Germany : Janke & Kunkel). La poudre obtenue a servi à préparer les différents extraits. Ainsi E.T.aq a été obtenu selon la méthode suivante ((7) : Cent grammes de poudre végétale sont extraits par macération dans un litre d'eau distillée sous agitation magnétique pendant vingt quatre heures sur un agitateur de type RTC B, IKA® Labortechnik Staufen; Germany : Janke & Kunkel). L'homogénat obtenu est filtré successivement deux fois sur du coton hydrophile et ensuite sur du papier Wattman®, (diamètre =150 mm, Nr. 0859, Marke Selecta, Germany : Carl Schleicher & Schüll). Le filtrat est évaporé à pression réduite à 60 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif du type RVO5-ST, IKA® Labortechnik; Germany). Ce concentré de produit obtenu de couleur noirâtre est ensuite lyophilisé et on obtient ainsi une poudre noirâtre, l'extrait total aqueux : (E.T.aq).

- Extrait éthanolique 70 % (E.Eth70 %) et extrait résiduel (E.Rés.)

E.Eth70 % et E.Rés. proviennent de l'extrait total aqueux, selon la méthode suivante (7,11) : cinq grammes d'extrait total aqueux sont dissous dans cent millilitres d'une solution éthanol absolu-eau (70 : 30; V/V). La phase supérieure contenant les éléments alcool hydro solubles constitue E.Eth70 % et la phase inférieure constitue E.Rés. Toutes ces phases sont aussi concentrées, puis lyophilisées pour obtenir des poudres.

- Fraction chromatographique (BGG-F5)

BGG-F5 a été obtenu selon la méthode suivante : trois cent milligrammes d'E.T.aq, sont dissous dans 5 mL d'eau distillée. Le tout est passé à travers une colonne (1,8 x 50 cm) de gel de sephadex G50. Le 5^e éluat de couleur orangée est collecté, concentré puis lyophilisé (12).

• Préparation des milieux de culture

L'incorporation des différents extraits végétaux préparés précédemment à la gélose Mueller-Hinton® (BIO-RAD, Marnes-la coquette, France) a été inspirée de la méthode des doubles dilutions. A cet effet, nous avons utilisé quatre séries de 10 tubes numérotés de 1 à 10. Pour chaque série d'expérimentation avec un extrait, le tube n°1 sert de témoin de culture (sans extrait) et un tube T sert de témoin de stérilité de la gélose (sans inoculum, sans extrait).

Pour les différents tests, les concentrations des différents extraits varient de 60 mg/mL à 0,23 mg/mL pour E.T.aq ; 40 mg /mL à 1,156 mg/mL pour E.Eth.70 % ; 200 mg/mL à 0,78 mg/mL pour E.Rés. et 100 mg /mL à 0,390 mg/mL pour BGG-F5 selon une suite géométrique de raison 1/2.

Tous ces tubes ainsi préparés sont stérilisés à 121 °C pendant quinze minutes à l'autoclave et inclinés à la température de la salle pour permettre à la gélose de se solidifier (7, 8, 12, 13).

• Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture stock de notre souche de *Vibrio cholerae* O:1 repiquée par la méthode des stries sur gélose Mueller-

Hinton et incubée pendant 18 à 24 heures, l'inoculum est obtenu à partir d'une colonie parfaitement isolée et émulsionnée dans 10 mL de bouillon Mueller-Hinton® (Bio-Rad, Marnes la coquette, France) permettant d'obtenir 106 germes.

• Essai microbien

Dix microlitres de l'inoculum (préalablement préparé) dilués 100 fois ont été ensemencés à la surface de la gélose contenue dans les tubes contenant les extraits. Après 18 à 24 h d'incubation à 37°C, les colonies de *V. cholerae* O:1 ont été comptées à partir d'un compteur de colonies de type pbi Digicont® (Pool Bioanalysis. Italiana) et la croissance dans chaque série de tubes expérimentaux a été évaluée en pourcentage de survie, calculé par rapport à 100 % de survie de colonies dans le tube n°1, témoin de contrôle de croissance (7, 8, 12, 13).

Résultats

Après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C, on a observé (dans toutes les séries d'expérimentations) comparativement aux tubes témoins, une diminution progressive du nombre de colonies au fur et à mesure que les concentrations des différents extraits augmentent.

Les données expérimentales traduites sous forme de courbes antibiogrammes sont résumées à la figure 1. Les valeurs des paramètres antibactériens des quatre extraits à savoir la CI₅₀ (concentration pour 50 % d'inhibition) déterminée graphiquement, la CMB (concentration minimale bactéricide) et les rapports d'efficacité des extraits sur la base des CMB sont respectivement présentés dans le tableau 1 et le tableau 2.

D'une façon générale, chaque extrait testé a une courbe qui présente une allure décroissante.

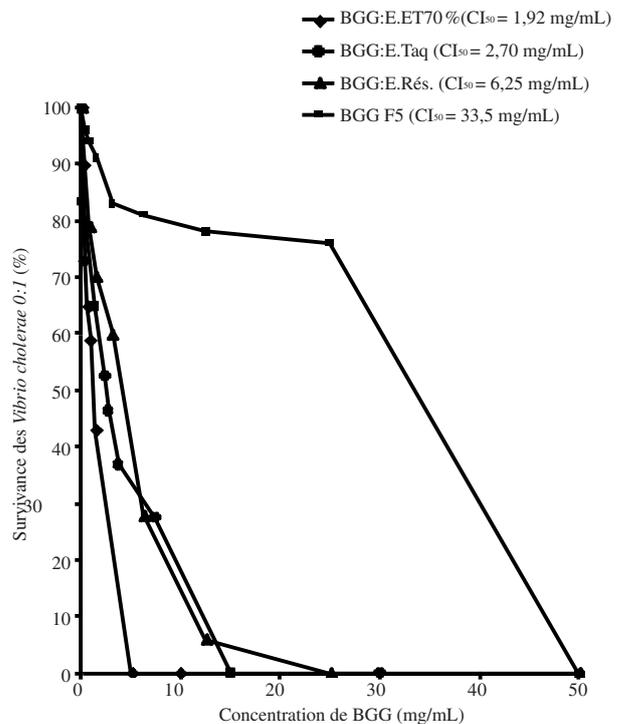


Figure 1. Sensibilité de *Vibrio cholerae* O:1 aux extraits de BGG (E.Taq; E.Rés; E.Eth70%, BGGF5).

Tableau 1. Valeurs des paramètres antibactériens des différents extraits.

Extraits de BGG	Paramètres antibactériens	
	CI ₅₀ (mg/mL)	CMB (mg/mL)
E.T.aq	2,7	15
E.Eth70 %	1,92	5
E.Rés.	6,25	25
BGG F5	33,5	50

Tableau 2. Rapport d'efficacité des extraits sur la base des CMB.

Extraits de BGG	CMB extrait
	CMB. E. ETH 70 %
E.T.aq	15/5 = 3
E.Rés.	25/5 = 5
BGG F5	50/5 = 10

Discussion

Le choix de *Morinda morindoides* pour cette étude résulte de son utilisation traditionnelle pour soigner les diarrhées. L'utilisation de l'eau comme solvant d'extraction constitue le premier mode d'utilisation de cette plante. L'association d'alcool absolu à l'eau permet d'accroître le potentiel thérapeutique des extraits (11-13). Afin d'optimiser ce pouvoir thérapeutique, nous avons aussi procédé à une chromatographie de filtration sur gel (12). Enfin, le choix d'un germe bactérien hospitalier par rapport à une souche sauvage de référence se justifie par le fait que ce germe a été plus en contact avec des agents thérapeutiques ; l'une de nos priorités étant dans un premier temps de nous préoccuper de l'activité antibactérienne des extraits de notre plante aux germes bactériens pathogènes, en particulier *V. cholerae O:1*. En effet, la sélection de Vibrions résistants a été démontrée par l'utilisation extensive des antibiotiques (6). C'est ce qui justifie la non recherche du profil de sensibilité de ce germe aux antibiotiques usuels. Ainsi, l'analyse de nos résultats montre que *Vibrio cholerae O:1* est sensible aux quatre extraits de BGG testés. La diminution progressive du nombre de colonies de *V. cholerae O:1* observées dans les tubes expérimentaux, inversement aux concentrations des différents extraits montre cette sensibilité de *V. cholerae O:1* aux différents extraits et est attribuée à la relation dose effet des extraits. A partir de ces résultats, la comparaison de ces quatre extraits laisse apparaître que l'E.Eth.70 % présente une meilleure activité vibriocide car il détient les plus petites valeurs de CMB (CMB= 5 mg/mL) et de CI₅₀ (CI₅₀ = 1,92 mg/mL). D'autre part, les rapports d'efficacité de ces extraits sur la base des CMB montrent que l'E.Eth70 % est trois fois plus actif que l'E.T.aq, cinq fois plus actif que l'E.Rés. et dix fois plus actif que BGG F5. Ainsi, les résultats de cette étude *in vitro* sur la croissance de *Vibrio cholerae O:1* suggèrent que notre plante a effectivement des propriétés antibactériennes bactéricides et crédibilisent l'usage traditionnelle de cette plante. Au regard des résultats de travaux d'autres auteurs, sur cette même plante, nos résultats sont en accord avec ceux de Moroh *et al.* sur les pouvoirs antibactériens de cette plante (11), mais les nôtres sont nettement améliorés car la plus petite valeur des CMBs rapportée par cet auteur est de 7,5 mg/mL contre 5 mg/mL pour ce présent travail ; les résultats de nos travaux présentent également une meilleure activité inhibitrice des extraits testés par rapport aux résultats de travaux antérieurs d'autres auteurs sur l'activité antibactérienne d'autres espèces de plantes (14). Les résultats de leurs travaux ont rapporté comme valeur de la plus la petite CMB, (CMB= 90 mg/mL) contre 15 mg/mL pour nos travaux.

Dans cette vaste investigation sur cette même plante, une étude tri-phytochimique réalisée par Bagré *et al.* a révélé une abondance en alcaloïdes, en saponosides et flavonoïdes dans ces extraits de plantes (8). Les alcaloïdes, de façon générale sont aussi reconnus pour leurs pouvoirs antibactériens élevés (15). Nous pourrions donc penser que l'activité antibactérienne de notre « drogue » reposerait sur la présence de ces composés. Ces résultats sont corroborés par ceux de Mohamed, qui a travaillé séparément sur les flavonoïdes (16), comme l'ont aussi rapporté Sanogo, Riffel *et al.*, (17, 18). Les résultats de cette étude montrent que parmi les solvants utilisés, l'Ethanol 70 % constitue le solvant qui permet de concentrer le mieux les principes actifs de nos extraits et donc, améliore l'activité inhibitrice.

Conclusion

Notre étude, axée sur les propriétés antibactériennes de *Morinda morindoides* a permis de montrer que les différents extraits de cette plante possèdent effectivement une activité antibactérienne bactéricide sur la croissance *in vitro* de *Vibrio cholerae O*.

Des études plus poussées notamment grâce aux techniques de chromatographie en phase gazeuse couplées à la résonance magnétique nucléaire, permettront à l'avenir de séparer les molécules à activité antibactérienne de celles possédant des propriétés antifongiques.

Ces travaux mériteraient d'être complétés par des tests *in vivo* pour l'étude de l'efficacité de ces molécules et de leurs propriétés pharmacocinétiques.

Références

1. Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Choléra 2007. *REH* 2008 ; 83 : 269-84.
2. Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Choléra 2006 *REH*. 2007 ; 82 : 273-84.
3. Alam NH, Yunus M, Faruque ASG, Gyr N, Sattar S, Parvin S *et al.* Symptomatic hyponatremia during treatment of dehydrating diarrheal disease with reduced osmolarity Oral Rehydration Solution. *JAMA* 2006; 296: 567-73.
4. «Cholera treatment». Molson Medical Informatics. 2007. Available from: <http://sprojects.mmi.mcgill.ca/tropmed/disease/chol/treatment.htm>. Retrieved on 2008-01-03.
5. Krishna BVS, Patil AB, Chandrasekhar MR. Fluoroquino-lone-resistant *Vibrio cholerae* isolated during a cholera outbreak in India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006 ; 100 : 224-26.
6. Ndour CT, Manga NM, Kâ R, Dia/Badiane NM, Fortez L, Seydi M. *et al.* L'épidémie de cholera de 2004 à Dakar: Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques. *Med Trop* 2006 ; 66 : 33-38.
7. Bagré I, Bahi C, Méité S, Djaman A J, Guédé GF. Evaluation et Amélioration *in vitro* de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh (Rubiaceae) sur *Cryptococcus neoformans*, un champignon responsable de mycose humaine. *J Sci Pharm Biol* 2006 ; 7 : 37-46.
8. Bagré I, Bahi C, Gnahoué G, Djaman A J, Guédé GF. Composition phytochimique et Evaluation *in vitro* de l'activité antifongique des extraits des feuilles de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh (Rubiaceae) sur *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*. *J Sci Pharm Biol* 2007 ; 8 : 15-23.
9. Tona L, Cimanga RK, Mesia K, Musumba CT, De Bruyne T, Apers S. *et al.* *in vitro* antiparasitic activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 2004 ; 93 : 27-32.
10. Cimanga RK, Kambu K, Tona L, Hermans N, Apers S, Totté J, *et al.* Cytotoxicity and *in vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents. *J Ethnopharmacol* 2006 ; 107 : 83-90.
11. Moroh JLA, Bahi C, Djé K, Loukou YG, Guédé Guina F. Etude de l'activité antibactérienne de l'Extrait Acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh (Rubiaceae) sur la croissance *in vitro* des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 2008 ; 77 : 44-61.

12. Akah Jacques Auguste AB, Kra Adou KM, Zirihi Guédé N, Guédé Guina F. Evaluation et essais d'optimisations de l'activité anticandidosique de *Terminalia catappa* LINN (TEKAM3), un extrait de Combretaceae de la Pharmacopée ivoirienne. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 2008; 77 : 120-36.
13. Zirihi Guédé N, Kra Adou KM, Ettien DT. Etude botanique et évaluation des activités antifongiques de *Mitracarpus villosus* (MV) (*Rubiaceae*) et *Spermacoce verticillata* (SV) (*Rubiaceae*) sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*. *Rev Med Pharm Afr* 2007; 20 : 9-17.
14. Ayoade Abdulfatai Adesokan, Musbau Adewu Akanji and Musa Toyin Yakubu. Antibacterial potentials of aqueous extract of *Enantia chlorantha* stem bark. *Afr J Biotechnol* 2007; 6 : 2502-5.
15. Muster D, Lotfi Ben Slama. Thérapeutique médicale buccodentaire : moyens et Méthodes. Elsevier. Masson ed, Paris, 2004, 290 p.
16. Mohamed Zohra. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la Région de Tlemcen. Thèse de Diplôme de Magistère de Biologie, opt. Produits naturels, Activités biologiques et Synthèse. Fac. Sc. Univ. Abou Bakr Belkaïd. Tlemcen (Rép. Algérienne Démocratique et Populaire). 2004-2005. 155 p.
17. Sanogo R, Diallo D, Diarra S, Ekoumou C, Bougoudogo F. Activité antibactérienne et antalgique de deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. *Mali Medical* 2006; Tome XXI : 18-24.
18. Riffel A, Medina LF, Stefani V, Santos RC, Bizani D, Brandelli A. *in vitro* antimicrobial activity of a new series of 1, 4 naphthoquinones. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35 : 811-8.



Récolte d'arachides, Sénégal © Michel R.