

**Activité Antibactérienne de l'Écorce de *Pilostigma reticulatum*
(caesalpiniaceae) Sur des Enterrobacteriaceae et
Staphylococcaceae**

Ramatou Morou Hima

Alfa Keita Djibo

Université Abdou Moumouni de Niamey,
Faculté des sciences et techniques, Niger

Ali El Hadji Saley

Souley Gambo

Laboratoire national de santé publique et d'expertise
(LANSPEX) Niamey, Niger

Idrissa Moussa

Khalid Ikhiri

Université Abdou Moumouni de Niamey,
Faculté des sciences et techniques, Niger

[Doi: 10.19044/esipreprint.5.2023.p81](https://doi.org/10.19044/esipreprint.5.2023.p81)

Approved: 05 May 2023

Posted: 08 May 2023

Copyright 2023 Author(s)

Under Creative Commons BY-NC-ND
4.0 OPEN ACCESS

Cite As:

Morou Hima R., Djibo A.E.H., Gambo S., Moussa I. & Ikhiri K.(2023). *Activité Antibactérienne de l'Écorce de Pilostigma reticulatum (caesalpiniaceae) Sur des Enterrobacteriaceae et Staphylococcaceae*. ESI Preprints.

<https://doi.org/10.19044/esipreprint.5.2023.p81>

Résumé

Les extraits aqueux et méthanoïque de l'écorce de *Pilostigma reticulatum* ont été testés sur quatre différentes souches bactériennes cliniques et quatre souches de référence. L'analyse des résultats obtenus montrent que les extraits bruts aqueux et méthanolique présentent une activité antibactérienne moyenne avec des diamètres de zones d'inhibition variant de 9 à 12 mm. Les extraits de cette plante n'ont aucune activité sur *E. coli* et E20081AEEQ. Par ailleurs, la fraction acétate obtenue par fractionnement de l'extrait méthanolique a montré une bonne activité antibactérienne sur *S. aureus* (18,7 mm), *S. flexneri* (16,7 mm), S2005BAEEQ (15,3 mm) et *S. ATCC29213* (20,7 mm). La fraction dichlorométhane issue du fractionnement de l'extrait méthanolique présente

les mêmes caractéristiques que l'extrait brut méthanolique. Les extraits aqueux bruts montrent une activité antimicrobienne faible par rapport à l'extrait alcoolique. Le quotient CMI/CMB montrent que cette plante présente une activité bactéricide.

Mots-clés: *Pilostigma reticulatum*, Activité antibactérienne, staphylococcus, entérobactéries, souches cliniques

Antibacterial Activity of the Bark of *Pilostigma reticulatum* (caesalpiniaceae) on Enterobacteriaceae and Staphylococcaceae

Ramatou Morou Hima

Alfa Keita Djibo

Université Abdou Moumouni de Niamey,

Faculté des sciences et techniques, Niger

Ali El Hadji Saley

Souley Gambo

Laboratoire national de santé publique et d'expertise

(LANSPEX) Niamey, Niger

Idrissa Moussa

Khalid Ikhiri

Université Abdou Moumouni de Niamey,

Faculté des sciences et techniques, Niger

Abstract

The aqueous and methanoic extracts of the bark of *Pilostigma reticulatum* were tested on different clinical bacterial strains and reference strains. Analysis of the results obtained show that the crude aqueous and methanolic extracts have an average antibacterial activity with diameters of inhibition zones varying from 9 to 12 mm. The extracts of this plant have no activity on *E. coli* and E20081AEEQ. Furthermore, the acetate fraction obtained by fractionating the methanolic extract showed good antibacterial activity on *S. aureus* (18.7 mm), *S. flexneri* (16.7 mm), S2005BAEEQ (15.3 mm) and S ATCC29213 (20.7mm). The dichloromethane fraction resulting from the fractionation of the methanolic extract has the same characteristics as the crude methanolic extract. The crude aqueous extracts show weak antimicrobial activity compared to the alcoholic extract. The CMI/CMB quotient show that this plant has bactericidal activity.

Keywords: *Pilostigma reticulatum*, antibacterial activity, staphylococcus, enterobacteriaceae

Introduction

Le développement et l'utilisation des antibiotiques constituent l'une des acquisitions les plus considérables de la thérapeutique contemporaine. Devant l'infection aigue ou chronique, le geste médicales de première intention comporte les antibiotiques. En Afrique, les plantes sont utilisées pour le traitement de plusieurs maladies courantes bien que la notion de microbes est comparativement nouvelle dans le domaine de la médecine traditionnelle. De nombreuses recettes, préparées à partir des plantes sont utilisées en antibiothérapie parce qu'elles présentent une certaine activité contre les maladies d'origine bactérienne. Une détermination scientifique du pouvoir antibactérien des plantes utilisées dans le traitement des troubles d'origine bactérienne est nécessaire à la valorisation de certaines plantes médicinales couramment utilisées. Le *Pilostigma reticulatum* appartient à la famille des Césalpiniacées ; c'est l'une des plantes les plus rependues dans la savane ouest africaine et est utilisée dans la médecine traditionnelle locale^[1]. Au Niger, la plante est utilisée dans le traitement des troubles gastro-intestinaux, gingivite et présente des propriétés anti-inflammatoire et hémostatique^[2,3]. Le présent travail vise à évaluer l'activité antimicrobienne de l'écorce de *P. reticulatum* sur les souches bactériennes du genre staphylococcus et des entérobactéries.

Matériel et méthodes

Le matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de l'écorce de *Pilostigma reticulatum*. Les échantillons de plante ont été récoltés en janvier 2017 à Kollo, région de Tillabéry. La plante a été identifiée au département de biologie de l'université de Niamey.

Le matériel biologique

Le support microbien est constitué de quatre souches bactériennes cliniques isolées à partir des liquides biologiques (selles, pus, prélèvement vaginal et urétral) prélevées chez des patients au laboratoire de bactériologie et mycologie de l'hôpital rive droite de Niamey. Les souches de référence ont été fournies par le centre de recherche médicale et sanitaire (CERMES) du Niger.

Tableau I. Souches bactériennes utilisées

Souches cliniques isolées		
Microorganismes	famille	gram
<i>Escherichia coli</i>	enterobacteriaceae	Gram -
<i>Shigella flexneri</i>	enterobacteriaceae	Gram -
<i>Salmonella typhi</i>	enterobacteriaceae	Gram -
<i>Staphylococcus aureus</i>	staphylococcaceae	Gram +
Souches de référence		
Microorganismes		
<i>Shigella flexneri</i> S2005BAEEQ	enterobacteriaceae	Gram -
<i>Salmonella</i> spp8250H1	enterobacteriaceae	Gram -
<i>Escherichia coli</i> E20081AEEQ	enterobacteriaceae	Gram -
<i>Staphylococcus aureus</i> SATCC29213	staphylococcaceae	Gram +

ATCC = American Type Culture Collect

EEQ = Evaluation Externe de Qualité

Préparation des extraits végétaux

Les écorces de *P. reticulatum* ont été séchées au laboratoire avant d'être broyées pour donner une poudre qui est conservée dans un bocal fermé. Cette poudre est utilisée pour préparer les extraits aqueux et alcooliques. Deux méthodes d'extraction en milieu aqueux ont été utilisées

- **Décoction aqueuse**

Dans un ballon de 2 L, on place 100 g de poudre végétale et on y ajoute 1L d'eau. Le tout est porté à reflux pendant 30 mn. Après refroidissement, la décoction est filtrée sur coton hydrophile. Le filtrat est séché pour donner l'extrait brut aqueux (EAD).

- **Macération aqueuse**

On procède de la même manière que la décoction ; après avoir ajouté l'eau à la poudre, on laisse agiter le mélange durant 24 h à température ambiante. Après séparation et élimination de l'eau, on obtient l'extrait brut issu de la macération (EAM).

- **Macération méthanolique**

Dans 1 L de méthanol, on ajoute 100 g de poudre végétale. Le mélange est laissé sous agitation, à température ambiante, durant 24 h. On filtre sur papier pour séparer la solution alcoolique et on élimine le solvant à l'évaporateur rotatif. L'extrait brut méthanolique (EMB) obtenu a servi à préparer les fractions à partir des solvants suivants : l'hexane, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle.

- **Fractionnement de l'extrait méthanolique**

Dans un erlenmeyer de 500 ml, on dissout 5 g de EMB dans 250 ml de méthanol. La solution alcoolique ainsi obtenue subit une extraction liquide-liquide avec une succession de solvants organiques par ordre de polarité croissante (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle). Les extraits

de chaque solvant sont réunis et le solvant est évaporé pour donner la fraction correspondante. Ainsi EMF1 correspond à la fraction hexanique, la fraction dichlorométhane est EMF2 et EMF3 la fraction acétate. La fraction restante dans le méthanol est EMF4.

Activités biologiques

L'activité antibactérienne des extraits de l'écorce de *P. reticulatum* a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu solide et celle de dilution en milieu liquide. Les extraits bruts aqueux et méthanolique ainsi que les différentes fractions ont été testés sur les souches bactériennes cliniques et les souches de référence.

- **Tests de sensibilité**

Les tests de sensibilité ont été réalisés à l'aide de la méthode de diffusion en milieu solide en déterminant les diamètres des zones d'inhibition de chaque disque. La méthode standard de Kirby-Bauer a été utilisée (CLSI, 2009)^[4].

La suspension bactérienne est réalisée à partir d'une culture bactérienne et de l'eau physiologique pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0.5 McFarland. Des colonies de même morphologie ont été prélevées afin d'éviter la sélection d'un variant atypique.

Des disques de papier Whatman n° 1 ont été découpés, stérilisés et imprégnés d'extrait de plante à partir d'une concentration de 100 mg/ml. Chaque disque a été imprégné 15 μ l d'extrait de plante.

Des boîtes de pétri contenant de la gélose de Mueller-Hinton ont été ensemencées par écouvillonnage avec l'inoculum bactérienne préalablement préparé. Dix minutes après, les disques ont été délicatement déposés à la surface de la gélose inoculée. Des disques d'antibiotiques (contrôle positif) et, selon le cas, des disques imprégnés d'eau distillée, de méthanol, d'hexane, de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle (contrôle négatif) ont également été disposés sur le milieu en fonction de l'échantillon utilisé. Après 30 mn d'incubation à la température ambiante pour une prédiffusion, les boîtes ont été incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 heures. L'activité antimicrobienne a été estimée par mesure du diamètre d'inhibition autour des disques. L'appréciation de l'efficacité des extraits a été faite selon le critère de Ponce et al^[5]

- **Détermination des paramètres antibactériens**

Pour évaluer l'activité d'un antibiotique, on détermine la cinétique de croissance microbienne à une concentration donnée. Cette évaluation peut être réalisée en effectuant des dilutions du produit soit en milieu liquide soit en milieu solide. La détermination des paramètres antibactériens de nos extraits a été réalisée par la dilution en milieu liquide.

- **Détermination de la CMI**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus petite concentration inhibant toute croissance visible de la bactérie après 24 heures d'incubation.

Dans 10 tubes à hémolyse, 1 ml de chaque gamme de concentration extrait de plante a été mise en contact avec 1ml d'inoculum bactérien et 1 ml de BMH. Le tube témoin de croissance a reçu 1 ml d'eau distillée en plus de l'inoculum a lorsque le témoin de stérilité n'a reçu que du BMH stérile. Les tubes ont été incubés pendant 24 h à 37°C. Après ce temps d'incubation, une observation à l'œil nu est effectuée et la plus faible concentration pour laquelle aucune croissance bactérienne n'a été observée correspond à la concentration (CMI) [6].

- Détermination de la CMB

La concentration minimale bactéricide (CMB) est définie comme la plus faible concentration laissant après 24 heures d'incubation 0.01% de survivants.

Les tubes ayant une concentration supérieure ou égale à la CMB ont été ensemencés sur une nouvelle gélose de Mueller-Hinton pour déterminer la CMB. L'inoculum de départ a été dilué pour obtenir des dilutions de 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} correspondant respectivement à 100%, 10%, 1%, 0,1% et 0,01% de survivants, ensuite ensemencé sur une nouvelle gélose et incubé à 37°C pendant 24 h. la CMB a été déterminée en comparant les deux lots de boîte de pétri. Elle correspond à la plus petite concentration qui laisse survivre au plus 0.1% des germes de la suspension de départ en 24 heures. Par ailleurs, le rapport CMB /CMI de chaque extrait a été calculé afin d'apprécier son pouvoir antibactérien. Quand ce quotient est inférieur à 4, l'extrait est bactéricide et lorsque le quotient est supérieur ou égal à 4, il est bactériostatique.

Résultats et discussions

Pour l'analyse statistique, les données ont été saisies à l'aide d'un tableur Excel. L'analyse des données a porté sur les méthodes de statistique descriptive. Les résultats obtenus ont été présentés sous forme de moyenne + écart-type.

Test de sensibilité

Les résultats des tests de sensibilité des bactéries vis-à-vis des extraits bruts aqueux et méthanolique et les fractions de l'extrait méthanolique de *P reticulatum* comparés à ceux des antibiotiques de référence sont consignés dans les tableaux II et III. Le résultat de l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits est consigné dans le tableau IV.

Tableau II. Diamètre des zones d'inhibition des extraits bruts aqueux et méthanolique

souche	CR	Diamètre d'inhibition en mm			
		AR	EAD	EAM	EMB
<i>S. aureus</i>	0	Tcc = 24	9.3±0.3	10.7±0.3	11.0±0.6
<i>E. coli</i>	0	Amx = 21	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>S. flexineri</i>	0	Te = 20	8.7±0.3	9.0±0.0	10.3±0.3
<i>S. typhi</i>	0	Cip = 26	7.3±0.3	8.3±0.3	10.0±0.0
S 2005BAEEQ	0	Te = 22	11.3±0.3	12.0±0.0	12.7±0.3
S typhi 8250HI	0	Cip = 27	8.7±0.3	9.7±0.3	10.3±0.3
S ATCC29213	0	Tcc = 26	8.7±0.3	9.7±0.3	10.3±0.3
E2008IAEEQ	0	Amx = 22	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

Tableau III. Diamètre des zones d'inhibition des fractions de l'extrait méthanolique

souche	CR	Diamètre d'inhibition en mm			
		EMF1	EMF2	EMF3	EMF4
<i>S. aureus</i>	0	0.0±0.0	12.3 ±0.3	18.7± 0.3	9.0 ±0.6
<i>E. coli</i>	0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>S. flexineri</i>	0	0.0±0.0	11.7 ±0.3	16.7± 0.3	9.0 ±0.0
<i>S. typhi</i>	0	0.0±0.0	8.3 ±0.3	12.3±0.3	8.0 0.6
S 2005BAEEQ	0	0.0±0.0	11.0±0.6	15.3±0.3	10.0±0.6
S typhi 8250HI	0	0.0±0.0	9.67±0.3	11.3± 03	8.7±0.9
S ATCC29213	0	0.0±0.0	11.3±0.3	20.7 ±03	9.3±0.3
E2008IAEEQ	0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

Ar : antibiotique référence Tcc : ticarcilline acide clavulanique, Te : tetracycline,
Cip : ciprofloxacine, Amx : amoxicilline

Tableau V. Paramètres antibactériens des extraits de *P. reticulatum*

Souches	Extraits (mg/ml)							
	EAq				EMet			
	CMI	CMB	CMB/ CMI	Pouvoir	CMI	CMB	CMB/ CMI	Pouvoir
<i>S. flexineri</i> 2005 BAEEQ	12.5	25	2	Bcid	6.25	12.5	2	Bcid
S typhi 8250HI	12.5	50	4	Bstat	12.5	50	4	Bstat
S ATCC29213	6.25	12.5	2	Bcid	3.12	6.25	2	Bcid

Bcid : bactéricide, Bstat bactériostatique

Les résultats obtenus montrent que, comparativement aux antibiotiques de références, les extraits de la plante ont induit des zones d'inhibition assez moyennes. Les extraits bruts aqueux et méthanolique et les fractions non hexaniques sont actifs sur la plupart des souches bactériennes à l'exception de *E. coli*.

Par ailleurs, on constate que le macéré aqueux EMA a une activité comparable à celui de l'extrait obtenu avec le méthanol EMB et présente des résultats meilleurs à celui du décocté EAD. L'extrait EMB a été le plus actif avec des diamètres d'inhibition compris entre 10 et 12 mm et en ce qui

concerne les fractions, la fraction acétate EMF3 est la plus efficace avec des diamètres d'inhibition compris entre 12 et 20 mm. Aucune activité n'a été observée avec la fraction hexanique. Ce solvant est généralement utilisé pour dégraisser les extraits en raison de sa faible polarité.

Les paramètres antibactériens indiquent que les extraits de *p reticulatum* inhibe la croissance des germes testé à des degrés divers avec des concentrations variant de 3 à 50 mg./ml.

L'extrait méthodique a présenté des CMI comprises entre 3 et 12.5 mg/ml et des CMB variant de 6 à 50 mg/ml pour cette plante (tableau IV). Pour l'extrait aqueux, ces concentrations sont plus élevées, entre 6 et 50 mg/ml. Le rapport CMB/CMI, pour la majorité des souches étudiées, est inférieur ou égal à 4. Tous les extraits de la plante ont montré une activité bactéricide contre *S aureus* ATCC292213 par conséquent la meilleure activité antibactérienne est obtenue avec la souche *S flexineri* 2005BAEEQ

Discutions

L'analyse chimique des feuilles de *p reticulatum* a montré que la plante renferme des Flavonoïdes, acide L tartrique, quercitroside, saponosides et des tanins ^[7,8]. Ainsi, Le piliostigmol et différents flavonoïdes isolés des feuilles ont montré une activité anti-inflammatoire et antimicrobienne ^[9].

Les flavonoïdes sont plus extractibles par les alcools car ils sont moins solubles dans l'eau froide. Lorsqu'on effectue une extraction à l'eau chaude, ces composés se précipitent avec le refroidissement, ce qui peut expliquer la faible activité des extraits aqueux par rapport à l'extrait méthanolique.

La différence d'activité entre l'extrait méthanolique et ses fractions peut être également liée à la solubilité du principe actif dans l'acétate. C'est pour cette raison qu'aucun diamètre d'inhibition n'a été observé pour les extraits hexaniques. La souche *E coli* qui est un des agents importants de la diarrhée au Niger a présenté une grande résistance aux extraits de l'écorce de *P reticulatum*. C'est une bactérie qui résiste aux antibiotiques standards couramment utilisés bien que sensible aux flavonols extraits des feuilles de cette plante ^[8].

Conclusion

L'écorce de *P réticulum* est très riche en tanin mais au vu des résultats obtenus sur les extraits, on peut penser que l'activité antibactérienne ne provient pas de cette famille de composés. L'acétate d'éthyle est un solvant peu polaire, il peut solubiliser les flavonoïdes et les saponosides ainsi que les dérivés terpéniques. Il nous semble donc nécessaire d'évaluer la composition chimique de l'extrait acétate afin de déterminer le principe actif.

References:

1. Assi, L.A and Guinko, S. (1991). Plant used in traditional medicine in West Africa. Swiss center for scientific research in Ivory Coast and Roche Africa research foundation, Adiopodoume-Abidjan, pp: 17-18.
2. er WEZEL (2002), plantes médicinales et leur utilisation traditionnelle chez les paysans au Niger, Etudes flor. Veg. Burkina Faso 6, 9-18
3. IKHIRI, K., SAADOU, M. and GARBA, M. (1984). Recherche sur la Pharmacopée traditionnelle au Niger, O.U.A. C.E.L.H.T.O., Niamey.
4. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard: M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS (2003), Wayne, PA, USA.
5. Ponce AG, Fritz R, Del Alle C, Roura SI. (2003). Antimicrobial activity of essential oil on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **36**: 679-684.
6. N. J. Kouadio, N. K. Guessennd, M. W. Kone, B. Moussa, Y. M. Koffi, K. B. uede, K. Yao, A. Bakayoko, H. F. Trabi et M. Dosso, (2015). International Journal of biological and chemical sciences 9(3) 1252-1262
7. NACOLMA OUEDRAOGO O.G, (1996). Plantes médicinales et pratiques traditionnelles au BF.cas du plateau central. Thèse d'Etat Université de Ouagadougou
8. Babajide, O.J., Babajide, O.O., Daramola, A.O. & Mabusela, W.T., (2008). Flavonols and an oxychromonol from *Piliostigma reticulatum*. *Phytochemistry* 69(11): 2245–2250.
9. Aderogba, M.A., Okoh, E.K., Okeke, I.N., Olajide, A.O. & Ogundaini, A.O., 2006. Antimicrobial and anti-inflammatory effects of *Piliostigma reticulatum* leaf extract. *International Journal of Pharmacology* 2(1): 70–74.