

Activités antimicrobiennes de *Parquetina nigrescens* (Afzel.) Bullock, une plante utilisée en médecine traditionnelle togolaise dans le traitement des infections microbiennes

Yao Patrick HOEKOU^{1,2*}, Tchadjobo TCHACONDO¹, Apeti Koffi GBOGBO², Amégninou AGBAN¹, Passimna PISSANG¹, Wouyo ATAKPAMA², Simplicite Damintoti KAROU¹, Komlan BATAWILA² et Koffi AKPAGANA²

¹ Ecole Supérieure des Techniques Biologiques et Alimentaires (ESTBA), BP 1515, Université de Lomé, Togo

² Laboratoire de Botanique et Ecologie Végétale, BP 1515, Université de Lomé, Togo

* Correspondance, courriel : yhoekou@gmail.com

Résumé

Parquetina nigrescens est utilisée en tradithérapie togolaise dans le traitement des infections microbiennes alors que les données concernant son pouvoir antimicrobien sont rares. Cette étude a été réalisée dans le but d'évaluer les propriétés antimicrobiennes des extraits de la plante. Les méthodes de diffusion en milieu gélosé et de microdilution en milieu liquide ont permis d'estimer le potentiel antimicrobien des extraits aqueux et hydroéthanoliques des feuilles et de racines de la plante sur trois souches de référence (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) et 15 souches cliniques de 3 espèces (*S. aureus*, *Salmonella typhi* et *Klebsiella pneumoniae*). Les tests antimicrobiens ont montré que ces extraits testés inhibent diversement la croissance des germes utilisés à l'exception des souches de *Staphylococcus*. Les extraits hydroéthanoliques ont été plus actifs que les extraits aqueux. Les concentrations minimales inhibitrices ont varié de 0,62 à 1,25 mg / mL et les activités totales de 68 à 183,90 mL / g. L'analyse phytochimique sommaire a détecté la présence de flavonoïdes et de tanins dans les extraits testés. Ces résultats confirment les activités antimicrobiennes des feuilles et racine de *P. nigrescens* et justifient leur usage traditionnel dans le traitement des infections microbiennes.

Mots-clés : *Parquetina nigrescens*, extraits aqueux et hydroéthanolique, antimicrobiens, Togo.

Abstract

Antimicrobial activities of *Parquetina nigrescens* (Afzel.) Bullock, a plant used in Togolese traditional medicine for microbial infections treatment

Parquetina nigrescens is used in Togo for microbial infections treatment while data on its antimicrobial power are scarce. This study was conducted to evaluate the antimicrobial properties of extracts of the plant. The agar diffusion and broth microdilution methods were used to estimate the inhibitory potential of aqueous and hydroethanolic extracts of leaves and roots of the plant on three reference strains (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *S. aureus* ATCC 29213) and 15 clinical strains of three species (*S. aureus*, *S. typhi* and *K. pneumoniae*). The results showed that tested extracts inhibit variously the growth of organisms used except *Staphylococcus* strains. The hydroethanolic extracts were more active than the aqueous one. The

minimum inhibitory concentrations ranged from 0.62 to 1.25 mg / mL and the total activities from 68 to 183.90 mL / g. The phytochemical analysis detected the presence of flavonoids and tanins in the tested extracts. These results confirm the antimicrobial activities of the leaves and roots of *P. nigrescens* and justify their traditional use for microbial infections treatment.

Keywords : *Parquetina nigrescens*, aqueous and hydroethanolic extracts, antimicrobials, Togo.

1. Introduction

Au Togo, comme dans l'ensemble des pays en développement, près de 80 % de la population a recours à la médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies dont les infections microbiennes [1]. Cette médecine traditionnelle repose essentiellement sur l'utilisation de plantes dites médicinales. Parmi la multitude de plantes utilisées figure *Parquetina nigrescens*. *P. nigrescens* est une plante semi-ligneuse volubile à latex blanc, appartenant à la famille des Asclepiadaceae. La décoction ou l'infusion des feuilles, parfois en association avec des parties d'autres plantes, est utilisée pour traiter la rougeole, les vers intestinaux, la diarrhée, la dysenterie, le diabète, les problèmes menstruels et les maladies vénériennes. La décoction de feuilles avec du miel se boit pour traiter la fatigue, la jaunisse, les ulcères d'estomac, l'anémie, et comme tonique [2, 3]. Au Togo, la décoction des feuilles ou la racine macérée est utilisée dans le traitement des infections microbiennes [4]. Malgré, ces diverses utilisations en médecine traditionnelle, peu de données existent pour leur validation scientifique. Des études antérieures ont démontré les propriétés hypoglycémiantes, antiulcéreuses, antioxydantes, anti-inflammatoires et antipyrétiques des extraits de la plante [5 - 9]. L'activité antimicrobienne des extraits de feuilles a également été prouvée par [10] au Nigéria. Mais au Togo, aucune étude pharmacologique n'a encore porté sur les extraits de cette plante. Aussi, la composition chimique des échantillons végétaux peut varier en fonction de la zone géographique, des saisons, des temps de récolte et de conservation [11, 12] ; et en conséquence son activité biologique peut également varier. Ainsi, ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes à latex de la flore togolaise et vise à évaluer les potentialités antimicrobiennes des extraits de feuilles et de racine de *P. nigrescens* sur des germes souvent impliqués en pathologie humaine.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des feuilles et racine de *Parquetina nigrescens*. Le matériel végétal a été prélevé à Tsévié dans la préfecture de Zio en Octobre 2014. Un échantillon d'herbier a été déposé à l'Herbarium de l'Université de Lomé sous le numéro TG02305.

2-2. Souches bactériennes

Les souches utilisées sont souvent impliquées en pathologie humaine. Il s'agit de trois souches de référence et de quinze souches cliniques de trois espèces. Les souches de référence : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ont été obtenues d'American Type Culture Collection, via le laboratoire de Bactériologie médicale de l'Institut National d'Hygiène de Lomé (Togo). Les souches cliniques : *Staphylococcus aureus* (n = 6), *Salmonella typhi* (n = 4) et *Klebsiella pneumoniae* (n = 5), ont été obtenues au Laboratoire de Navrongo Health Research Centre au Ghana. Les souches de *Salmonella typhi* ont été isolées des selles diarrhéiques. Les souches cliniques de *S. aureus* et de *K. pneumoniae* ont été isolées des urines.

2-3. Méthodes

2-3-1. Extractions

Les extractions ont été effectuées suivant les travaux antérieurs de [13, 14]. Pour la préparation de l'extrait aqueux, 100 g de poudre de feuilles ou de racine de *P. nigrescens* sont bouillis dans 1000 mL d'eau distillée à 100°C pendant 20 mn. Le décocté obtenu est laissé refroidir à la température ambiante (25 - 30°C), filtré sur du coton hydrophile avant d'être filtré avec du papier Whatman N°1, et évaporé au rotavapor sous vide à 50°C, puis séché à l'étuve à 60°C. L'extrait hydroéthanolique est obtenu par macération sous agitation continue à l'aide de barreau aimanté et d'agitateur de 100 g de poudre de matière végétale dans 1000 mL de mélange éthanol-eau (70 / 30) à la température ambiante (25 - 30°C) pendant 48 heures. Le macéré est filtré sur du coton hydrophile puis avec du papier Whatman N°1. Le filtrat est évaporé au rotavapor sous vide à 40°C, puis séché à l'étuve à 60°C. Les extraits secs obtenus sont conservés au réfrigérateur pour les tests.

2-3-2. Tests de sensibilité

Les tests de sensibilité ont été réalisés sur gélose Mueller Hinton suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [15]. Les microorganismes issus d'une culture de 18 à 24 heures incubés à 37°C ont été suspendus dans de l'eau physiologique à une turbidité correspondante au Mac Farland 0.5 (approximativement 10^8 cellules / mL). Cette suspension a été utilisée pour ensemercer des boîtes de Pétri par écouvillonnage. Les extraits hydroéthanoliques ont été dissouts dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et dilués avec de l'eau distillée stérile à une concentration finale de 1 % de DMSO. Les extraits aqueux ont été dissouts dans de l'eau distillée stérile. Des puits de 6 mm de diamètre ont été faits dans la gélose et ces puits ont été ensuite inoculés avec 50 µL d'extraits à la concentration de 20 mg / mL. La ciprofloxacine (5 µg / mL) et le DMSO à 1 % dans de l'eau distillée stérile ont été utilisés respectivement comme contrôles positif et négatif. Les boîtes ont été ensuite laissées à la température ambiante pendant 1 heure pour la prédiffusion puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. L'activité antibactérienne a été estimée par la mesure à la règle graduée, du diamètre de la zone d'inhibition autour des puits.

2-3-3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et de l'activité totale des extraits

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) ont été déterminées en utilisant la technique de microdilution avec du bouillon Mueller Hinton [16]. Les suspensions bactériennes ont été diluées au 1 / 100 avec du bouillon et distribuées dans les microplaques de 96 puits contenant une gamme de concentrations d'extraits hydroéthanoliques allant de 20 à 0,039 mg / mL pour chaque extrait. Les inocula déterminés par le comptage des colonies à partir des puits témoins sans extraits ont été approximativement de 10^5 UFC / mL. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. La CMI, déterminée à l'œil nu, a été définie comme la concentration minimale d'extrait pour laquelle on n'observe pas de croissance visible à l'œil nu. En plus de la CMI, l'activité totale (AT) de l'extrait a été calculée suivant les travaux de [17]. L'activité totale est obtenue en divisant la masse totale en mg, extraite d'un gramme de poudre d'organes de plante, par la concentration minimale inhibitrice (en mg / mL). L'activité totale s'exprime en mL / g et indique le volume auquel l'extrait de 1 g de poudre d'organes de plante peut être dissout tout en gardant son activité inhibitrice.

2-4. Etude phytochimique

Les grands groupes chimiques ont été recherchés dans les extraits par une analyse phytochimique qualitative sommaire à partir des tests de coloration suivant [18]. Cette analyse a permis de rechercher les composés tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les saponines et les tanins.

3. Résultats et discussion

3-1. Rendements d'extractions

Les rendements (**Tableau 1**), varient en fonction de l'organe et du solvant utilisés. Les rendements obtenus pour les feuilles sont de 8,5 % pour l'extrait hydroéthanolique et 14,8 % pour l'extrait aqueux, alors que l'extraction à partir de la racine a donné des rendements de 11,4 % pour l'extrait hydroéthanolique et 17,2 % pour le décocté aqueux. Les extraits hydroéthanoliques ont un rendement moins faible par rapport aux extraits aqueux.

Tableau 1 : Rendement des extraits aqueux et hydroéthanoliques de *P. nigrescens*

Organes utilisés	Rendement (%)	
	Extraits aqueux	Extraits hydroéthanoliques
Feuilles	14,8	8,5
Racine	17,2	11,4

Ces observations sont proches de celles obtenues par [13, 14], qui ont trouvé des rendements élevés pour les extraits aqueux comparativement aux extraits hydroéthanoliques. Le calcul des rendements permet d'apprécier les extraits totaux qu'on peut tirer de chaque espèce. Ces rendements permettent également d'envisager la quantité d'organes à prélever en cas de besoin pour une éventuelle étude similaire ; ce qui, rendrait l'utilisation rationnelle et donc durable des espèces visées.

3-2. Etude phytochimique

Les extraits de feuilles et de racine de *P. nigrescens* renferment de flavonoïdes et de tanins, alors que les alcaloïdes et les saponosides y sont absents (**Tableau 2**). La présence de flavonoïdes et de tanins est en accord avec les résultats de [9], qui ont trouvé que les extraits de feuilles et d'écorce de tige de *P. nigrescens* contiennent de flavonoïdes, de glycosides cardiaques, de tanins, d'antraquinones, de phlobatanins et d'huiles essentielles. Par contre ces auteurs ont trouvé de saponines dans les extraits de la plante. [10], ont également démontré la présence de ces composés dans le décocté aqueux et l'extrait éthanolique des feuilles de *P. nigrescens*. Contrairement à nos résultats, [10], ont prouvé que ces extraits contiennent aussi d'alcaloïdes.

Tableau 2 : Groupes chimiques mis en évidence des extraits

Composés	Feuilles		Racine	
	Aqueux	Hydroéthanolique	Aqueux	Hydroéthanolique
Alcaloïdes	-	-	-	-
Flavonoïdes	+	+	+	+
Tanins	+	+	+	+
Saponosides	-	-	-	-

+ = présence, - = absence

3-3. Activités antimicrobiennes

Les diamètres des zones d'inhibition des extraits testés et les concentrations minimales inhibitrices sont présentés respectivement aux **Tableaux 3 et 4**. Les extraits aqueux et hydroéthanoliques des feuilles et

de racine de *P. nigrescens* ont inhibé la croissance des bacilles à Gram négatif testés à l'exception de l'extrait aqueux des feuilles qui a été inactif sur les souches cliniques de *K. pneumoniae*. Pour les feuilles, les diamètres des zones d'inhibition ont varié de 9,5 à 11 mm pour l'extrait aqueux et de 13,5 à 18 mm pour l'extrait hydroéthanolique. Quant à la racine, les diamètres des zones d'inhibition ont évolué de 8 à 12,5 mm pour l'extrait aqueux et de 14 à 16 mm pour l'extrait hydroéthanolique. Ces extraits testés ont été inactifs sur les souches de *S. aureus* étudiées.

Tableau 3 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des extraits testés

Souches	Feuilles		Racines		Ciprofloxacine	DMSO
	Aq	Eth	Aq	Eth		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10,5	18	12,5	16	29,5	0
<i>S. typhi</i>	9,5	17,5	11,5	15,5	29	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	13,5	8	14	24	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11	15,5	8,5	15,5	25	0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0	0	0	0	32,5	0
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	28	0

Aq : aqueux, Eth : hydroéthanolique, DMSO : diméthylsulfoxyde

Les concentrations minimales inhibitrices ont été de 0,62 à 1,25 mg / mL pour les extraits hydroéthanoliques des feuilles et de racine. Les activités totales calculées les plus élevées sont de 183,90 mL / g obtenue avec l'extrait de la racine pour *K. pneumoniae* et *S. typhi* et de 137,10 mL / g pour l'extrait des feuilles contre *E. coli* et *S. typhi* (**Tableau 4**). Ces valeurs indiquent que l'extrait de 1 g de poudre de feuilles ou de racine de *P. nigrescens* peut être dissout respectivement à 137,10 mL ou à 183,90 mL tout en ayant les mêmes effets antimicrobiens.

Tableau 4 : Concentrations minimales inhibitrices (en mg / mL) et activités totales des extraits hydroéthanoliques (en mL / g)

Souches	Feuilles		Racines	
	CMI	AT	CMI	AT
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,62	137,10	1,25	91,20
<i>S. typhi</i>	0,62	137,10	0,62	183,90
<i>K. pneumoniae</i>	1,25	68	0,62	183,90
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,25	68	1,25	91,20
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	nd	-	nd	-
<i>S. aureus</i>	nd	-	nd	-

CMI : Concentrations minimales inhibitrices ; AT : activité totale de l'extrait

[10, 19], ont prouvé que les extraits aqueux et éthanoliques des feuilles de *P. nigrescens* inhibent la croissance de *S. typhi*. Ce que confirment nos résultats. D'autres études ont indiqué que l'extrait aqueux des feuilles de *P. nigrescens* est actif sur *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *Klebsiella spp*, *S. typhi*, *B. subtilis*, avec des CMI allant de 3 à 10,5 mg / mL ; et inactif sur *E. coli* [20]. Cependant, nos résultats sont en désaccord avec ceux de [20], obtenus pour *S. aureus* et *E. coli*. L'activité antibactérienne de la racine est étudiée ici pour la première fois. D'une façon générale, les bactéries Gram positives sont souvent les plus sensibles aux extraits végétaux [21, 22] mais c'est plus tôt le contraire qui a été observé pour les extraits de *P. nigrescens*. Ceci

pourrait signifier que le mécanisme d'action du composé actif des extraits testés ne dépend pas de l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire [23]. Nos tests phytochimiques ont montré que les extraits de feuilles et de racines de *P. nigrescens* renferment de flavonoïdes et de tanins. Ces phytomolécules sont des composés phénoliques reconnus pour leurs propriétés pharmacologiques, et seraient donc à l'origine des activités antibactériennes observées [9, 10].

4. Conclusion

Les extraits aqueux et hydroéthanoliques des feuilles et racine de *P. nigrescens* inhibent la croissance des bactéries à Gram négatif et sont inactifs sur les souches de *Staphylococcus* testées. Ces résultats démontrent le potentiel antimicrobien de la plante *P. nigrescens* et supportent ainsi son utilisation dans le traitement traditionnel des infections microbiennes. Toutefois, des études phytochimique et toxicologique sont nécessaires afin de déterminer la nature des principes actifs et la toxicité de la plante.

Références

- [1] - OMS, *Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014 - 2023*, (2013). Available from http://www.who.int/publications/list/traditional_medicine_strategy/fr/, consulté le 25 juin 2015.
- [2] - N. S. ALVAREZ CRUZ, *Parquetina nigrescens* (Afzel.) Bullock. In : Schmelzer, G. H. & Gurib-Fakim, A. (Editors). *Medicinal plants / Plantes médicinales 2*, Wageningen, Netherlands, (2012).
- [3] - J. Y. DATTIE and A. ZIEGLER, *J. Pharm. Pharmacol.*, 536 (2001) 859 - 866.
- [4] - Y. P. HOEKOU, T. TCHACONDO, S. D. KAROU, K. KOUDOUVO, W. ATAKPAMA, P. PISSANG, A.K. GBOGBO, A.Y. WOEGAN, K. BATAWILA, K. AKPAGANA and M. GBEASSOR, *Pharmacogn. Res.*, 8 (2016) 128 - 134.
- [5] - A. A. A. KAYODE, O. T. KAYODE and A. A. ODETOLA, *Res. J. Med. Plant*, 3(3) (2009) 102 - 108
- [6] - B. V. OWOYELE, A. B. NAFIU, I. A. OYEWOLE, L. A. OYEWOLE, and A. O. SOLADOYE, *J Ethnopharmacol*, 122 (1) (2009) 86 - 90.
- [7] - F. O. AWOBAJO, and I. I. OLATUNJI-BELLO, *J. Phytol.*, 2(2) (2010) 1 - 9.
- [8] - O. R. ADERIBIGBE, A. A. ODETOLA, F. S. OLUWOLE, E. O. FAROMBI, O. O. ONABANJO and O. A. JIBOKU, *Int. J. Trop. Med.*, 6(2) (2011) 25 - 29.
- [9] - A. O. AYOOLA, O. AKINLOYE, O. O. OGUNTIBEJU, J. M. OKE, and A. A. ODETOLA, *Afri. J. Biotechnol.*, 10 (24) (2011) 4920 - 4925.
- [10] - O. I. AKINYEMI and E. O. DADA, *ARPN J. Agric. Biol. Sci.*, 8(11) (2013) 732 - 739.
- [11] - G. BALANSARD, P. CORNILLOT, P. ANTOINE, P. BELAICHE, J. FLEURENTIN, L. GIRRE, G. GUILLAUME, and G. MAZARS, *Encyclopédie des Médecines Naturelles éditée sur fascicules mobiles sous la direction de P. Cornillot*, Tome 2 : *Phytothérapie - Aromathérapie*, Paris, Editions Techniques, (1993).
- [12] - OMS, *Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales*. Genève, (2003).
- [13] - M. MOUSSAID, A. A. ELAMRANI, N. BOURHIM et M. BENAÏSSA, *Bul. Soc. Roy. Sci. de Liège*, 81 (2012) 90 - 100.
- [14] - Y. TRAORE, K. OUATTARA, D. YEO, I. DOUMBIA et A. COULIBALY, *J. Appl. Biosci.*, 58 (2012) 4234 - 4242.
- [15] - CASFM, *Recommandations 2014*, SFM, France, (2014).
- [16] - NCCLS, *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. Sixth edition. Wayne, PA : NCCLS. NCCLS document no. M07-A6*, (2003).
- [17] - J. N. ELOFF, *South Afr. J. Sci.*, 96(3) (2000) 116 - 18.
- [18] - J. B. HARBORNE, *Phytochemical methods : a guide to modern techniques of plant analysis*. 3rd ed. London : Chapman & Hall, (1998).

- [19] - F. OLUWAFEMI and F. DEBIRI, *Afr. J. Biomed. Res.*, 11(2) (2008) 215 - 219.
- [20] - A. A. ODETOLA, F. S. OLUWOLE, B. A. ADENIYI, A. M. OLATIREGUN, O. R. IKUPOLOWO, O. LABODE, K. O. BUSARI and J. A. SHORINOLA, *J. Biol. Sci.*, 6(4) (2006) 701 - 705.
- [21] - P. J. MASIKA and A. J. AFOLAYANE, *J. Ethnopharmacol.*, 83 (2002) 129 - 134.
- [22] - C. W. FENNELL, K. L. LINDSEY, L. J. MCGAW, S. G. SPRAG, G. I. STAFFORT, E. E. ELGORASHI, O. M. GRACE and J. VAN STADEN, *J. Ethnopharmacol.*, 94 (2004) 205 - 217.
- [23] - S. B. SINGH and J. F. BARRETT, *Biochem. Pharmacol.*, 71 (2006) 1006 - 1015.