

ETUDE PHARMACO-CHIMIQUE DE NAUCLEA LATIFOLIA Sm. (RUBIACEAE) :

Relation "Principes chimiques et Activité antimicrobienne"

KABORE, Z.I. ; GUISSOU, I.P.* ; SOURABIE. S.***

* Institut de Recherche sur les Substances Naturelles
(I.R.S.N.) 03 B.P. 7192 OUAGADOUGOU 03 – BURKINA FASO

** Service de Santé des Forces Armées Burkinabé
4è région Militaire – BOBO-DIOULASSO – BURKINA FASO.

RESUME

Nauclea latifolia Sm. est une plante de la Pharmacopée burkinabé couramment utilisée dans le traitement des affections digestives sévères, notamment dans le traitement des troubles digestifs que l'on peut assimiler aux gastro-entérites couramment identifiés en milieu hospitalier burkinabé.

Notre étude se situe dans le cadre de :

* l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits, par la mesure des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides (CMI et CMB) ;

* la comparaison de l'activité antimicrobienne entre extraits de plante et les antibiotiques usuels utilisés en milieu hospitalier ;

* l'appréciation de l'activité antimicrobienne en rapport avec les principes chimiques présents dans les extraits de plante ;

* la détermination de la Dose Léthale 50% (DL 50) dans le but de fixer une marge de sécurité d'emploi de la drogue.

MOTS CLES

Nauclea latifolia Sm. (Rubiaceae). Pharmacopées Africaines –Gastro-entérites. Activité antimicrobienne. Alcaloïdes –Tanins polyphénols – Saponosides.

INTRODUCTION

Suite à un environnement socio-économique caractérisé de plus en plus par une conjoncture difficile, les spécialités pharmaceutiques, voire les médicaments essentiels génériques, sont hors de portée de nos populations africaines les plus démunies.

Ce constat laisse entrevoir des solutions à court terme. Une des solutions, c'est l'étude qui porte sur nos plantes médicinales. En effet, l'utilisation rationnelle des données de la Pharmacopée et de la Médecine Traditionnelles de notre sous-région, peut apporter des satisfactions dans la résolution des problèmes de couverture sanitaire de nos populations.

Dans ce contexte général, le Burkina Faso a choisi comme axe prioritaire de recherche appliquée en santé publique, la valorisation de la pharmacopée africaine.

Les activités de recherche de l'Institut de Recherche sur les Substances Naturelles (I.R.N.S.) de Ouagadougou se situent dans ce contexte ; les priorités sont hiérarchisées en fonction des pathologies, lesquelles sont définies par le Ministère chargé de la Santé.

Dans cette approche, le choix de *Nauclea latifolia* Sm. s'est justifié pour les raisons essentielles suivantes :

1*) La plante n'est pas inconnue de la littérature.

2*) Il s'agit en outre d'une plante réputée dans le traitement de pathologies jugées préoccupantes au Burkina Faso ; parmi celles-ci on peut retenir les diarrhées dysentériques, les gastro-entérites diverses, les affections hépato-biliaires, urogénitales et broncho-pulmonaires, les maladies métaboliques.

Les principaux usages de la drogue, relevés dans la littérature, justifient ce choix. En outre, l'approche physico-chimique, en relation avec l'étude microbiologique et toxicologique, peut être d'un support appréciable quant à l'utilisation efficiente de cette drogue.

L'étude comparative de l'activité des extraits de feuilles et des écorces de racines a été entreprise dans le but de démontrer que les feuilles pourraient valablement remplacer les racines.

I - MATERIEL ET METHODE

1. Matériel de l'Etude

1.1. Le matériel végétal

Il est constitué de feuilles et d'écorces de *Nauclea latifolia* Sm., récoltées après la saison des pluies en Octobre 1990 dans la localité de Boromo (Zone Ouest du Burkina), à 180 Km de Ouagadougou.

Les échantillons sont lavés abondamment à l'eau courante du robinet, puis séchés sur des claies sous ventilation à l'abri de la lumière, à la température ambiante comprise entre 20 et 25°C.

Après séchage, les échantillons sont finement broyés, conservés dans des flacons stériles hermétiquement fermés avant d'être transformés en extraits hydro-alcoolique et alcaloïdique.

1.2. Les microorganismes

Ce matériel est constitué de trois (3) entérobactéries à Gram (-) et d'une cocci à Gram (+), prélevées de selles pathologiques d'enfants hospitalisés au Centre Hospitalier National Yalgado Ouedraogo de Ouagadougou.

ce sont : - *Escherichia coli* - *Salmonella typhi* - *Shigella flexneri* - *Staphylococcus aureus*

Ce matériel a été complété par *Escherichia coli* sérotype 0127, prélevé des selles d'un enfant hospitalisé chez les Saints Camilliens de Ouagadougou.

1.3. Les animaux de laboratoire

Ils sont constitués de souris femelles de souches NMRI, élevées dans les conditions de stabulation suivantes : température maintenue entre 20 et 25°C ; humidité 75% ; éclairage naturel du jour de 06 h à 18 h et obscurité de 18H à 06 H.

Quatre (4) lots homogènes d'animaux de 6 souris ont été constitués avec un lot témoin. Les poids des animaux sont compris entre 30 et 35 g.

2. Méthode

2.1. Obtention des extraits végétaux

Les extraits bruts alcaloïdiques sont obtenus par extraction continue au soxhlet après alcalinisation de la drogue par l'ammoniaque à 10%. Après évaporation du solvant (CHCl_3), le résidu brut est pesé à poids constant.

Les extraits hydroalcooliques sont obtenus par macération de la drogue dans le solvant d'extraction composé d'éthanol et d'eau dans le rapport 7 : 3, V/V. Une partie, la phase aqueuse résiduelle est éliminée par cryodessiccation. Le résidu est pesé à poids constant.

2.2. Essais antimicrobiens

La méthode utilisée est celle de dilution liquide couplée à l'étalement sur milieu solide gélosé telle que pratiquée couramment en bactériologie médicale (CHABERT, 1985).

Les tubes et les boîtes de pétri ont été incubés dans les mêmes conditions (37°C, pendant 24 H). La croissance des germes a été appréciée par un dénombrement des colonies sur milieux gélosés.

2.3. Réalisation d'un antibiogramme et essais comparatifs avec les extraits végétaux

L'antibiogramme a été effectué selon le protocole classique pratiqué en bactériologie médicale. Il consiste à rechercher l'inhibition du développement microbien sur un milieu gélosé.

Les extraits végétaux de concentration connue sont déposés à raison de 10 ml sur les disques de papier Wattmann de 09 mm de diamètre ; ces disques imprégnés d'extraits sont déposés à la surface de la gélose ensémençée par le germe de l'étude.

L'incubation est effectuée en étuve à 37°C pendant 24 h. Les essais sont répétés cinq (5) fois afin :

- 1*) de comparer les effets des antibiotiques avec ceux des extraits ;
- 2*) de comparer les effets des extraits entre eux.

2.4. Etude chimique qualitative et quantitative des principaux constituants de la drogue

La poudre de drogue est épuisée successivement par extraction continue dans un soxhlet par des solvants de polarité croissante (CHCl_3 ; $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$; H_2O).

Les réactifs de caractérisation classique sont utilisés pour la mise en évidence des principaux principes chimiques. La chromatographie analytique sur plaque de silice est utilisée pour l'isolement des alcaloïdes.

La teneur de l'échantillon en flavonoïdes totaux est estimée globalement par la formation d'un complexe flavonoïdes -zirconium (HORHAMMER, 1951 ; PARIS, 1977 : cités par BAILLEUL, 1980). Le complexe coloré, stable en milieu tamponné, permet d'évaluer par spectrophotométrie la teneur en flavonoïdes de l'échantillon par rapport à une solution témoin de rutoside.

Le dosage global des composés phénoliques est effectué par oxydation en utilisant soit le réactif de Folin-Denis, soit le permanganate de potassium (Ribereau - Gayon, 1968).

La teneur de l'échantillon en strictosamide (gluco-alcaloïde obtenu pur par C.C.M) est estimée par spectrophoto-densitométrie.

L'indice hémolitique des saponosides est déterminé selon la technique décrite par PARIS (PARIS, 1965).

III - RESULTATS

1. Teneurs en principes chimiques des échantillons

* Extraits hydroalcooliques (résidus brut) :

- Feuilles 11,9% ; Racines 10,17%

* Totum alcaloïdique : Feuilles 0,53% ; Racines 0,40%

2. Teneurs en flavonoïdes totaux des racines

(à partir d'une gamme étalon de rutosides).

Conc. (mg.ml)	0,204	0,102	0,068	0,051	0,040	0,034	Extrait
D.O. à 400nm.	0,717	0,371	0,254	0,192	0,155	0,125	t

$r = 0,9996$: Coefficient de corrélation

A 400 nm, on a une D.O. = 0,326 pour l'extrait ; ce qui correspond sur la courbe à 0,3628 mg/ml en équivalent de rutoside.

3. Teneur globale en composés phénoliques

* Oxydation par $KMnO_4$

Volumes de $KMnO_4$ $10^{-2}N$ versés de la burette :

$n_1 = 3,2$ ml (tube témoin)

$n_2 = 3,76$ ml (tube d'essai)

$$I_{KMnO_4} = 5 (n_2 - n_1) = 2,8.$$

* Oxydation par le réactif de Folin-Denis
(gamme étalon d'acide tannique)

TUBES	Blanc	1	2	3	4	5	Prise d'essai
Conc. (mcg/ml)	0	5,5	11	16,5	22	27,7	15,6
D.O. à 286	0	0,154	0,374	0,512	0,650	0,767	0,463

$r = 0,98$: coefficient de corrélation

A 286 nm, l'extrait donne une D.O. = 0,463 ; ce qui correspond sur la courbe à 1,56 mcg/ml en équivalent d'acide tannique.

4. Dosage du strictosamide

- Par spectrophotométrie U.V.
(gamme étalon de strictosamide)

Conc.(mg/ml)	0,008	0,0563	0,004	0,0032	0,0026	Prise d'essai
D.O. à 288nm	0,452	0,312	0,235	0,189	0,156	0,174

$r = 0,9995$: Coefficient de Corrélation

La D.O. de 0,174 correspond sur la courbe étalon à 3 mcg/ml de rutoside.

5. Indice Hemolytiques des saponosides

$$I_h = S. \frac{a}{b} \text{ avec } S = 30.000 ; a = 0,100 \text{ g} ; b = 0,200 \text{ g.}$$

$$\text{d'où } S. \frac{a}{b} = 30.000 \frac{0,100}{0,200} = 15.000$$

6. CMI et CMB extraits vis à vis des germes testés

Ces valeurs sont indiquées dans les tableaux II et III de synthèse.

7. AntibioGramme par la méthode des disques

Les valeurs des diamètres moyens d'inhibition de croissance des germes testés sont consignées dans le tableau IV de synthèse.

8. Détermination de la DL 50

(chaque lot est constitué de 6 souris)

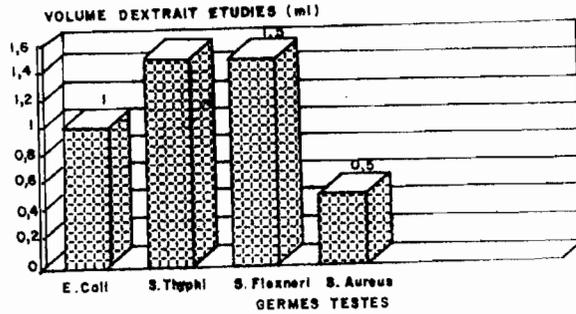
N° des lots	Poids moyens par lots (g ± s)	Dose administrée (mg/kg/Pc en IP)	% de morts	
			< 24 H	> 24 H
1	33 ± 3,01	1000	0	0
2	29 ± 1,97	1500	23	46
3	27 ± 2,52	2000	93	93
4	31 ± 1,18	2500	100	100

La DL calculée sur la courbe log-Probit est égale à 1600 mg/kg/PC

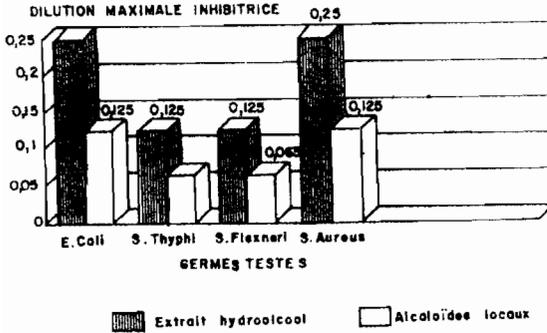
Tableau I : Principes chimiques mis en évidence par l'analyse qualitative des extraits des racines de *Nauclea Latifolia*.

EXTRAITS	GROUPES DES PRINCIPES CHIMIQUES	RESULTATS	
CHLOROFORMIQUE	MATIERES GRASSES :		
	- Stérols-Triterpènes	X X X	
	- Caroténoïdes		
	- Acides gras	X	
	ALCALOIDES BASES :		
- Dragendorff	réactifs de	X X X	
- Mayer	caractérisation	X X X	
	AGLYCONES FLAVONIQUES		
	EMODOLS		
	COUMARINES (Fluorescence à 375 nm)	X	
ETHANOLIQUE	TANNINS (Polyphénols)	X X X	
Non hydrolysé	COMPOSES REDUCTEURS	X X X	
	ALCALOIDES SELS		
	- Dragendorff	réactifs de	X X X
	- Mayer	caractérisation	
Hydrolysé	STEROLS-TRITERPENES	X X	
	CAROTENOIDES		
	EMODOLS		
AQUEUX	GLUCIDES	X X	
	SAPONIDES	X	
	TANNINS (Polyphénols)	X X X	

Tableau II : Histogramme I : Action antibactérienne de l'extrait hydroalcoolique des écorces de racines de *Nauclea latifolia* sm. des germes testés.



Histogramme 2 : Dilution maximale inhibitrice (DMI) des différents extraits des écorces de *Nauclea latifolia*.



Histogramme 3 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) des différents extraits des écorces de *Nauclea latifolia*.

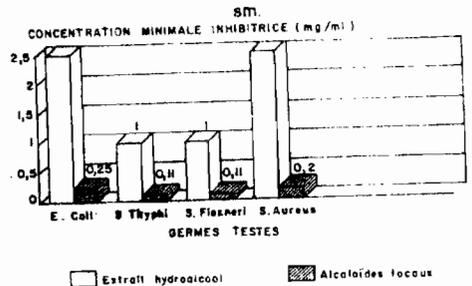


Tableau III : Determination des concentrations minimales inhibitrices, Bactéricides (CMI et CMB) des extraits vis à vis d' *E COLI* O₁₂₇ (essais avec *Nauclea Latifolia*)

Organes	Extraits	Solutions hydro-alcooliques de macération	
Ecorces de racines de <i>N. latifolia</i>		CMI = CMB = 9mg/ml Inoculum = 9.10 ⁸ germes /ml	CMI = CMB = 3,mg/ml Inoculum = 1,67.10 ⁸ germes /ml
Feuilles de <i>N. latifolia</i>		CMI = 3,8mg/ml CMB = 7,8mg/ml Inoculum = 9,6.10 ⁸ germes /ml	CMI = CMB = 4,5mg/ml Inoculum = 1,45.10 ⁸ germes /ml

Tableau IV : Diametres moyens d'inhibition de développement d'E. coli 027 sur disques d'antibiotiques et sur disques impregnes d'extraits d'ecorces de racines de *Nauclea Latifolia Sm.*

1. DISQUES D'ANTIBIOTIQUES STANDARD	
Néomycline (Néomycine)	18,00
Kanamycine (Kanamycine)	15,00
Acide pipémidiques (Pipram)	12,00
Acide nalidixique (Négram)	10,00
Streptomycine (Streptomycine)	11,00
Colistine (Colimycine)	16,00
Polymyxine (Polymyxine B)	9,50
2. DISQUES DE PAPIER WATHMAN IMBIBES D'EXTRAIT HYDROALCOOLIQUE	13,50
3. DISQUES DE PAPIER WATHMAN IMBIBES D'EXTRAIT ALCALOÏDIQUE	15,50

Les chiffres dans la colonne de droite représentent les diamètres moyens d'inhibition en mm.

IV - DISCUSSIONS ET CONCLUSION

Les extraits hydroalcooliques, de même que les extraits d'alcaloïdes totaux, testés in-vitro, témoignent d'une action inhibitrice de croissance vis-à-vis des germes de l'étude. ces germes présentent une sensibilité inégale aux effets des extraits ; celle-ci se présente comme suit : staphylococcus aureus > E. coli > Shigella flexneri = Salmonella typhi.

Les antibiogrammes réalisés ont montré la possibilité d'une étude simple au laboratoire : la recherche de l'inhibition du développement microbien sur un milieu gélosé. Il est apparu au cours de cette étude que le pouvoir antibiotique induit par l'extrait alcaloïdique est plus fort que celui obtenu avec l'extrait hydro-alcoolique.

L'évaluation de la toxicité générale aigüe par la mesure de la DL 50 a permis de situer la marge de sécurité d'emploi de la drogue.

Les profils bactériostatique et bactéricide des extraits militent en faveur de l'utilisation des feuilles comme succédané des racines, ce qui constitue une contribution à la sauvegarde de *Nauclea latifolia* sauvagement exploitée. Les méthodes d'analyse chimique utilisées ont permis d'avoir une idée de la relation entre constituants et activité antimicrobienne des extraits. Ces méthodes peuvent participer à la standardisation chimique des produits de plantes médicinales pour la formulation médicamenteuse moderne.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - **ALMEIDA, S. et Coll.** (1963) *Primeirus ensaios químicos executados com a raiz de Sarcocephalus esculentus* Afz. Gardia de Orta, 11, N°1 PP. 88-95.
- 2 - **BAILLEUR, F.** (1980) - *Le Feretia apodanthera* DEL (Rubiaceés). Recherches chimiques et Pharmacologiques. Thèse de Doctorat es Sciences Pharmaceutiques, Diplôme d'Etat. Université René Descartes de Paris, Série E N° 39.
- 3 - **BOCHEFONTAINE et Coll.** (1883) - *Propriétés physiologiques de l'écorce de Doundaké et de la Doundakine* C. R. Ac., 97, p. 271.
- 4 - **CHABERT, Y.A. et DAGUET, G.L.,** (1985) - *Technique en bactériologie*, Flammarion, Méd. Sc., Sérologie bact. Antibiotique en bact. Méd.
- 5 - **DAVID PHILLIPSON, J.** (1974) - *Angustine and related alkaloids from species of mitragyna, Nauclea, Uncaria and Strychnos*. Pergamon Press - Printed in England.
- 6 - **DEENI, Y.Y. and H.S.N. HUSSAIN** (1991) - *Journal of ethnopharmacology* 35, pp. 91-96 Screening for antimicrobial activity and alkaloids of *Nauclea latifolia* Elsevier Scientific Publishers - Irland LTD.

- 7 - **GUINKO, S. et Coll.**(1986) - *APITHERAPIE* : Quelques usages médicaux du miel dans l'Ouest du Burkina Faso. Bull. Méd. Trad. Pharm., Vol. 3, N°2, pp. 111-115.
- 8 - **HOTELLIER, F. ; DELAVEAU, P. POUSSET, J. L.** (1975) - *Nauclefine et Naclétine*. Deux nouveaux alcaloïdes de type indoloquinolizidine isolés du *Nauclea latifolia*. Phytochemistry, bol. 14, pp. 1407-1409 Pergamon. Press, Printed in England.
- 9 - **HOTELLIER, F. et Coll.**, (1976) - *Naufoline et descarbométhoxy-nauléchine*, deux alcaloïdes isolés du *Nauclea latifolia* Sm. (Rubiaceae) C.R. Acad. Sc. Paris, t. 282 (29 Mars 1976).
- 10 - **HOTELLIER, F. et Coll.** (1977) - *Isolement de l'isovincolide lactame (Strictosamide) des écorces de racines de Nauclea latifolia Sm.* Plantes médicinales et Phytothérapie Tome XI, n°2, pp. 106-108.
- 11 - **HOTELLIER, F. et Coll.**, (1979) - *Alcaloïdes et Glucoalcaloïdes de Nauclea latifolia Sm* ; Planta médica, Journal of medicinal Plants Research, vol. 35, pp. 242-246 Hippocrate Verlag GmbH.
- 12 - **HOTELLIER, F. et Coll.**(1980) - *Naucleidinal et épinauléidinal, alcaloïdes de Nauclea latifolia Sm.* Phytochemistry, vol. 19, pp. 1884-1885. Pergamon Press, Printed in England LTD.
- 13 - **HOTELLIER, F. et Coll.**, (1981) - *Nauclefoline, nouvel alcaloïde isolé du Nauclea latifolia Sm.* Phytochemistry, vol. 19, pp. 1884-1885. Pergamon Press, Printed in England LTD.
- 14 - **KABORE, I.Z.** (1986) - *Nauclea latifolia* : une plante médicinale intéressante mais toxique pour le nourrisson. Bulletin bimestriel de liaison n°2 Centre National de la Recherche Scientifique et technologique (CNRST) Ouagadougou, P. 14.
- 15 - **KERHARO, J.** (1974) - *La Pharmacopée sénégalaise traditionnelle Plante médicinales et toxiques.* Ed. Vigot Frères, Paris, 1963.
- 16 - **PARIS, R. R. ; MOYSE, H.** (1965) - *Matière médicale.* Tome I, 2° Ed. p. 258.
- 17 - **RIBEREAU - GAYON, P.** (1968) - *Les composés phénoliques des végétaux.* Ed. Dunod, Paris.

18 - SAWADOGO, A. et I. Z. KABORE (1986) - *Pharmacopée traditionnelle et santé de l'enfant : effets toxiques de Nauclea latifolia.*

19 - SOURABIE, S. (1990) - *Contribution à l'étude chimique et pharmacologique de Nauclea latifolia Sm. et Holarrhena floribunda (G. DON) Dur. Schinz : Plantes de la Pharmacopée Burkinabé préconisées infantiles.*

Mémoire de DEA Université de Ouagadougou.

20 - SOURABIE, S. ; GUISSOU, I.P. et I.Z. KABORE (1992) - *Mise en évidence d'une activité antibactérienne de Nauclea latifolia Sm. (Rubiaceae) vis à vis d'entérobactéries responsables de gastro-entérites infantiles au Burkina Faso.* Publications Médicales Africaines, n° 120. pp. 18-23.