



Article Original

Activité Antibactérienne d'une Recette à Base D'écorces de *Petersianthus Macrocarpus*, *Vernonia Conferta* et *Carica Papaya*, Traditionnellement Utilisée pour Traiter les Plaies Chroniques

*Evaluation of the antibacterial activity of a recipe based on the bark of *Petersianthus macrocarpus*, *Vernonia conferta* and *Carica papaya*, traditionally used to treat chronic wounds.*

Ngono Mballa R^{1,4}, Wokam MN², NguidjoeEvrard M³, Gonsu Kamga H⁵, Wouessidjewe D⁶

RÉSUMÉ

- Département de Pharmacologie et de Médecine Traditionnelle, Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Université de Yaoundé I, Yaoundé, Cameroun
- Institut des Sciences de la Santé, Faculté de Pharmacie, Université des Montagnes, Bangangté, Cameroun.
- Département de Pharmacotoxicologie, Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Université de Yaoundé I, Cameroun
- Laboratoire National de Contrôle de Qualité des Médicaments et d'Expertise, Yaoundé, Cameroun
- Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier et Universitaire, Yaoundé-Cameroun
- Département de Pharmacochimie Moléculaire, Université de Grenoble Alpes, France

Auteur correspondant :

Wokam Michèle Noël

Mail : michelewokam@gmail.com ;

Tél : (+33) 6 05 71 00 53

Mots-clés : Médecine traditionnelle – plaies incurables – activité antibactérienne

Keywords: Traditional medicine - incurable wounds - antibacterial activity

Introduction. Les plaies chroniques sont des affections sévères qui peuvent évoluer en cancers. Leur prise en charge est difficile à cause de la multitude des facteurs à l'origine de leur constitution. Les thérapeutiques disponibles sont nombreuses mais pour la plupart coûteuses et de moins en moins efficaces. Notre travail a donc consisté à étudier une préparation à base de plantes utilisée localement dans le traitement des plaies chroniques. La recette a été obtenue à la suite d'une enquête ethnobotanique effectuée auprès d'une tradipraticienne. Elle est constituée des écorces de tronc de *Petersianthus macrocarpus* et *Vernonia conferta*, ainsi que des écorces de racines de *Carica papaya*. **Matériels et méthodes.** Nous avons réalisé une analyse botanique des plantes ainsi qu'un screening phytochimique des macérats aqueux et hydroalcooliques. Ensuite, la détermination de l'activité antibactérienne de ces extraits a consisté en l'évaluation de leur propreté microbiologique, la détermination de la sensibilité de trois espèces bactériennes fortement impliquées dans la surinfection des plaies et le calcul des Concentrations Minimales Inhibitrice (CMI) et Bactéricide (CMB). **Résultats.** Seuls deux germes se sont révélés sensibles à nos extraits. Aucune CMI n'a pu être définie avec précision, rendant difficile la détermination des valeurs de CMB, pour lesquelles nous avons eu des résultats supérieurs à 200 mg/ml. **Conclusion.** D'après les valeurs de CMB obtenues au cours de nos tests, l'activité antibactérienne de nos extraits ne peut être prouvée à ce stade. La propriété curative de cette recette ne serait donc pas essentiellement liée au pouvoir antimicrobien des plantes qui la constituent.

ABSTRACT

Introduction. Chronic wounds are severe affections that can evolve into cancers. Their care is difficult because of the multitude of factors behind their constitution. The available therapies are numerous but for the most part unaffordable and/or less and less effective. Our work therefore consisted in studying an herbal preparation used locally in the treatment of chronic wounds. The recipe was obtained following an ethnobotanical survey carried out with a traditional healer. It consists of the trunk bark of *Petersianthus macrocarpus* and *Vernonia conferta*, as well as *Carica papaya*'s root bark. **Materials and methods.** We carried out a botanical analysis of the plants as well as a phytochemical screening of aqueous and hydroalcoholic macerates. Then, the determination of the antibacterial activity of these extracts consisted of the evaluation of their microbiological cleanliness, the determination of the sensitivity of three specific germs strongly involved in the superinfection of wounds and the calculation of Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations (MIC and MBC). **Results.** As results, two germs out of three proved to be sensitive to our extracts. However, no MICs could be precisely defined, making it difficult to determine MBC values. In fact, we got results above 200 mg/ml for many samples. **Conclusion.** Based on the results obtained during our experiments, the antibacterial activity of our extracts cannot be proven at this stage. Therefore, the curative action in wounds healing of this recipe may not be only due to the antimicrobial effects of the plants which constitute it.

INTRODUCTION

L'activité antibactérienne est la capacité à tuer ou inhiber la croissance des bactéries. L'antibiogramme standard est l'une des plus anciennes approches de

détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine. Le paramètre le plus souvent utilisé pour évaluer l'effet d'un antibiotique est la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). Elle

correspond à la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe en 24 heures. La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) quant à elle désigne la concentration d'une substance permettant d'obtenir, après 24h d'incubation à 37°C, 0.01% de bactéries viables ou moins [1].

Près de 70% des plaies chroniques sont dues à des escarres ou des ulcères variés, d'autres facteurs peuvent également être à l'origine de leur constitution : un processus inflammatoire prolongé, des agents physiques, des cancers [2]. Leur diagnostic est surtout clinique (persistance de la plaie et échec des traitements), mais également microbiologique (biopsie) [3]. Ces blessures préoccupent la communauté médicale depuis des siècles. Malgré la large gamme de thérapeutiques disponibles (antibiotiques, antiseptiques, pansements, agents actifs sur les biofilms bactériens, thérapie par pression négative, oxygénothérapie hyperbare), celles-ci peuvent s'avérer inefficaces ou inabordable. A cause des taux de mortalité non négligeables (7 à 8% dans le cas des escarres) liés aux septicémies qui peuvent en résulter, une gestion optimale des plaies chroniques est donc essentielle [3].

Dans un contexte de faible pouvoir d'achat limitant l'accès à des soins onéreux, conjugué aux phénomènes de résistance des microorganismes aux anti-infectieux insuffisamment utilisés ou mal adaptés, il convient d'initier des approches thérapeutiques accessibles et efficaces pour la prise en charge de patients indigents. Aussi, nous référant sur les travaux antérieurs de l'Equipe Abondo Ngono et al. (2015) sur la cartographie des tradipraticiens de la région du Centre, nous avons sélectionné opportunément une recette traditionnelle destinée au traitement des plaies chroniques. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle ses propriétés curatives pourraient être liées à un pouvoir antimicrobien. Nous nous sommes donc proposés d'étudier l'efficacité de la préparation par le biais de tests d'activité adéquats, notamment l'évaluation de l'activité antibactérienne.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel végétal

Le matériel a été récolté en Février 2017 dans la région du Centre à Mbankomo, dans le département de la Mefou-et-Akono. L'identification s'est faite à l'Herbier National du Cameroun. Les écorces de tronc de *Petersianthus macrocarpus* ont été identifiées par comparaison avec l'échantillon de Endengle Elias N° 187 (19089/HNC), collecté le 07/03/1996. Les écorces de tronc de *Vernonia conferta* ont été identifiées par comparaison avec l'échantillon de Duncan W. Thomas N° 6847 (55447/HNC), collecté le 25/03/1987. Les écorces de racines de *Carica papaya* ont été identifiées par comparaison avec l'échantillon de ECOFAC N° 999 (66220/HNC), collecté le 08/09/1995.

Les écorces ont été séchées à l'ombre pendant une semaine puis réduites en poudre à l'aide d'un moulin à écraser électrique. L'analyse macroscopique et microscopique, de même que le screening phytochimique, ne seront pas développés dans cette étude.

Matériel biologique

Souches bactériennes

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25922,
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,
- *Escherichia coli* ATCC 25922,

Les souches nous ont été fournies par le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments et d'Expertise (LANACOME).

Milieux de culture

- Trypticase Soy Agar (TSA)
- Trypticase Soy Broth (TSB)
- Baird Parker Agar (BPA)
- Mac Conkey Agar (MCA)
- Cétrimide Agar
- Mueller Hinton Agar (MHA)

Solvants

- Eau distillée,
- Eau salée 85%,
- Eau peptonée.

Préparation des extraits

Les poudres ont été extraites à l'aide de deux solvants : l'eau distillée et un mélange hydro-alcoolique 70/30, v/v avec de l'éthanol à 95°. 100g de poudre ont été mélangés dans 0.5L de solvant. Pendant trois jours, trois extractions successives ont été réalisées par macération, avec renouvellement du solvant toutes les 24h. Les trois extraits ont été réunis et filtrés à l'aide du papier Whatman® N°3. Les macérats hydro-alcooliques ont été passés à l'évaporateur rotatif (BÜCHI R-200®) puis tous les extraits ont été portés à l'étuve (GNP-9080®).

Test de sensibilité des extraits

Propriété microbiologique des extraits [4]

L'analyse du risque microbiologique dépend de plusieurs paramètres tels que : l'altération potentielle du produit, le site d'application, la catégorie d'utilisateurs et le caractère pathogène des microorganismes. Ce contrôle microbiologique concerne donc le dénombrement de la Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT), le dénombrement des levures/moisissures et la détection des pathogènes. Pour un produit à usage topique par exemple, les microorganismes recherchés seront essentiellement les pathogènes de la peau, à savoir *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. On pourra également rechercher un indicateur de contamination fécale tel qu'*Escherichia coli*, pour détecter une défaillance de l'hygiène au cours du processus de fabrication de ce produit.

Préparation des suspensions bactériennes

Les souches ont été cultivées sur TSA et 18 à 24 heures après, une colonie de chaque germe a été prélevée et mise en suspension dans de l'eau salée à 85% [5]. Le mélange a été standardisé au spectrophotomètre afin d'avoir la même turbidité qu'un McFarland 0.5, soit une densité optique comprise entre 0.08 et 0.1 [6]. L'ajustement s'est fait par ajout de solution salée ou de bactéries selon le cas.

Dépôt des extraits

Les extraits ont été préparés avec de l'eau distillée stérile, à une concentration de 100 mg/ml. Chaque suspension bactérienne a été écouvillonnée sur la totalité d'une gélose TSA. Dix minutes plus tard, des disques de 8 mm de diamètre, imprégnés soit d'un extrait soit d'un témoin antibiotique (gentamicine, 40 mg/ml), ont été déposés à la surface. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 35±1°C en aérobiose pendant 16 à 20h, puis les diamètres d'inhibition ont été mesurés.

Détermination des CMI et CMB[5]

Préparation de la gamme de concentration

Des solutions d'extraits de concentration 200 mg/ml ont été préparées puis des séries de dilutions au demi ont été réalisées, afin d'obtenir des gammes de concentrations allant de 200 à 0,39 mg/ml.

Préparation de l'inoculum bactérien

Deux colonies de chaque espèce bactérienne ont été émulsionnées dans un tube à essai contenant 10 ml de TSB stérile et le mélange a été incubé à 37°C pendant 3 heures. 6 ml ont ensuite été prélevés et dilués dans 200 ml de bouillon stérile. Le mélange a été standardisé au spectrophotomètre afin d'avoir la même turbidité qu'un McFarland 0.5.

Détermination des paramètres antibactériens

Les CMI ont été déterminées par macrométhode (dilution en milieu liquide). Pour chaque extrait, une série de tubes à essais a été remplie suivant le tableau I ci-après puis ils ont été incubés à 37°C pendant 24h.



Tableau I : Dilution en milieu liquide

Tubes à essais	Gammes de concentration	Inoculum	Eau distillée stérile	TSB stérile
T1	1ml	1ml	-	-
T2	1ml	1ml	-	-
T3	1ml	1ml	-	-
T4	1ml	1ml	-	-
T5	1ml	1ml	-	-
T6	1ml	1ml	-	-
T7	1ml	1ml	-	-
T8	1ml	1ml	-	-
T9	1ml	1ml	-	-
T10	1ml	1ml	-	-
Témoin de croissance	-	1ml	1ml	-
Témoin de stérilité	-	-	1ml	1ml

Les CMI correspondent aux plus petites concentrations des tubes pour lesquels on n'a pas observé de croissance bactérienne (trouble) à l'œil nu.

Le lendemain, des plaques de gélose Mueller Hinton stériles ont été inoculées séparément avec un échantillon de chacun des tubes à essai ne présentant aucune preuve de croissance. Elles ont été incubées à 37°C pendant 24h. La dilution la plus élevée qui n'a donnée aucune croissance bactérienne a été considérée comme bactéricide[7].

RÉSULTATS

Rendements d'extraction

Ils sont répertoriés dans le tableau II ci-après.

Tableau II : Rendements d'extraction

Extraits	Rendements (%)		
	<i>Vernonia conferta</i>	<i>Petersianthus macrocarpus</i>	<i>Carica papaya</i>
Eau	5	9.3	6
Eau-Ethanol	4.5	11.4	4.7

Ces rendements sont assez satisfaisants. Ils peuvent largement permettre une exploitation industrielle de la recette.

Test de sensibilité

Les valeurs en millimètre des diamètres moyens des zones d'inhibition relevées sur les géloses sont présentées dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III : Diamètres moyens d'inhibition des souches étudiées par les extraits

Concentrations (mg/ml)	Diamètres (mm)	Extraits aqueux				Extraits hydro-alcooliques				Témoin Gentam
		V.c	P.m	C.p	M	V.c	P.m	C.p	M	
100		100	100	100	100	100	100	100	40	
	S. a	24	13	12	12	11	12	< 8	< 8	43
	P. a	14	< 8	18	12	16	< 8	18	12	51
	E. c	< 8	13	< 8	11	< 8	< 8	< 8	< 8	38

V.c : *Vernonia conferta*
P.m : *Petersianthus macrocarpus*
C.p : *Carica papaya*
S.a : *Staphylococcus aureus*
P.a : *Pseudomonas aeruginosa*
E.c : *Escherichia coli*
M : MélangeGentam : Gentamicine

D'après Kouadio et al.[5], un extrait n'est dit efficace sur un germe que lorsqu'il inhibe sa croissance sur au moins 9 mm de diamètre. En prenant en compte le diamètre des disques (8 mm), nous n'avons donc considéré comme intéressants que ceux supérieurs ou égaux à 17 mm. Ainsi, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 s'est révélée sensible à l'extrait aqueux de *Vernonia conferta*, et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 aux extraits aqueux et hydro-alcooliques de *Carica papaya*. *Escherichia coli* ATCC 25922 ne s'est pas révélé particulièrement sensible. Le diamètre moyen d'inhibition le plus important a été noté sur l'extrait aqueux de *Petersianthus macrocarpus*.

Détermination des paramètres antibactériens

Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau IV.

Tableau IV : Paramètres antibactériens

	Extraits aqueux (mg/ml)							
	V.c.		P.m.		C.p.		M	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>S. aureus</i>	nd	100	nd	>200	nd	>200	nd	>200
<i>P. aeruginosa</i>	nd	>200	nd	>200	nd	>200	nd	>200
<i>E. coli</i>	nd	>200	nd	>200	nd	>200	nd	>200
	Extraits hydro-alcooliques (mg/ml)							
	V.c.		P.m.		C.p.		M	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>S. aureus</i>	nd	>200	nd	>200	nd	>200	nd	>200
<i>P. aeruginosa</i>	nd	>200	nd	>200	nd	>200	nd	>200
<i>E. coli</i>	nd	>200	nd	>200	nd	>200	nd	>200

V.c : *Vernonia conferta*
 P.m : *Petersianthus macrocarpus*
 C.p : *Carica papaya*
 M : Mélange nd : non déterminé

Aucune CMI n'a pu être définie avec précision (observation d'un trouble) à cause de la couleur sombre et opaque des solutions d'extraits. La CMB la plus basse (100 mg/mL) correspondait à celle de l'extrait aqueux de *Vernonia conferta* sur *Staphylococcus aureus*.

DISCUSSION

Le préalable à la mise en œuvre des tests d'activités sur des extraits est l'évaluation de leur qualité microbiologique. Le dénombrement de la Flore Mésophile Aérobie Totale et des moisissures et levures totales (données non représentées) a donné des valeurs toutes comprises dans les limites préconisées par la Pharmacopée Européenne. En effet, elle tolère un degré de contamination des drogues végétales de 10^2 à 10^8 germes/g de plante, sous réserve d'une décontamination ultérieure. Cependant, les germes pathogènes doivent être absents. A l'exception de l'extrait aqueux de *Carica papaya* pour lequel nous avons observé une pousse de *Staphylococcus aureus*, les autres extraits se sont révélés exempts de pathogènes. De ce fait, l'extrait de *Carica papaya* a été décontaminé à l'autoclave avant utilisation. Les tests d'activité antibactérienne ont ensuite été effectués sur trois microorganismes. Ces germes ont été choisis à cause de leur implication dans la phase de chronicité des ulcères phagédéniques ou ulcères tropicaux, complications liées à la surinfection des plaies.

La souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 s'est révélée sensible à l'extrait aqueux de *Vernonia conferta* (24 mm de diamètre d'inhibition). Ati et al. et Aliyu et

al. ont également testé à la même concentration la sensibilité de souches de *Staphylococcus aureus* aux extraits alcooliques de *Vernonia calvoana* et *Vernonia blumeoides* respectivement, et ont obtenu des diamètres d'inhibition proches (22 mm)[8, 9].

La souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 s'est révélée sensible aux extraits aqueux et hydro-alcooliques de *Carica papaya* avec des diamètres moyens d'inhibition de 18 mm. Alabi et al. ont également testé la sensibilité de cette même souche à 100 mg/ml d'extrait éthanolique de feuilles sèches de *Carica papaya* et ont obtenu un diamètre inférieur, soit 12 mm[10]. Cette différence pourrait s'expliquer par la nature de l'organe de la plante étudié. En effet, la nature et la quantité des métabolites secondaires peuvent varier selon les parties d'une plante et influencer de façon variable l'activité de celles-ci.

La souche *Escherichia coli* ATCC 25922 ne s'est pas révélée particulièrement sensible. Le diamètre moyen d'inhibition le plus important a été noté sur l'extrait aqueux de *Petersianthus macrocarpus* (13 mm). Mabeku et al. n'ont d'ailleurs obtenu qu'un diamètre égal à 6 mm pour le même extrait [11].

En définitive, nos extraits se sont révélés efficaces sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, avec toutefois des valeurs de CMB assez élevées

(centaines de mg). Celles-ci sont difficilement interprétables du fait que nous ne disposons pas de valeurs de CMI. Les extraits de *Vernonia conferta* semblent avoir un potentiel antibactérien plus intéressant, même si au final, le mélange des trois extraits donne des résultats peu satisfaisants. La propriété curative de cette recette ne serait donc pas essentiellement liée à son pouvoir antibactérien. Par conséquent, des travaux supplémentaires de recherche devront se poursuivre afin de tester et évaluer l'activité cicatrisante, activité ayant déjà été démontrée par Nayak et al. pour les feuilles de *Carica papaya* sur des plaies induites chez des rats diabétiques[12].

CONCLUSION

L'activité antibactérienne des extraits a été testée sur trois germes très souvent isolés des plaies : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Les deux premiers seulement se sont révélés sensibles à certains de nos extraits pris individuellement. Le mélange n'a quant à lui, montré aucune activité synergique. L'efficacité de cette recette traditionnelle ne dépend donc pas de son activité antibactérienne. Comme perspectives, nous envisageons d'évaluer son pouvoir cicatrisant *in vitro* voire *in vivo*, et réaliser ensuite des études pharmacotoxicologiques et de stabilité plus poussées, afin de produire un Médicament Traditionnel Amélioré de catégorie III, voire IV.

Contributions des auteurs

Ngono Mballa R et Wokam MN: conception, réalisation, rédaction et révision

Denis Wouessidjewe et Hortense Gonsu : supervision et révision du document.

Marcel Nguidjoe : contribution technique et rédaction.

Remerciements

Nos remerciements vont au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments et d'Expertise (LANACOME) et son personnel, pour le plateau et l'assistance technique dans les analyses.

RÉFÉRENCES

1. Burnichon N, Texier A. L'antibiogramme : la détermination des sensibilités aux antibiotiques. *DES Bactériologie*. Paris, 2003.
2. Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *American journal of surgery*. 1998;176(2A Suppl):26S-38S.
3. Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2004;17(2):91-6.
4. Pharmacopée Européenne. 9^e Edition. 2016.
5. Kouadio NJ, Guessennnd NK, Kone NW, Moussa B, Koffi YM, Guédé KB, et al. Evaluation de l'activité des feuilles de *Mallotus oppositifolius* (Geisel.) Müll.-Arg (Euphorbiaceae) sur des bactéries multirésistantes et criblage phytochimique. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2015;9(3):1252-62.
6. Dickinson B. Standard de turbidité préparé *BBL*. Becton Dickinson and Company, 2005.
7. Yusha'u M, Onuorah F, Murtala Y. In vitro sensitivity pattern of some urinary tract isolates to *Carica papaya* extracts. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*. 2009;2(2):75-8.
8. Ati B, Iwara I, Bassey A, Igile G, Duke E, Ebong P. Antimicrobial Activity of Leaf Extract-Fractions of *Vernonia calvoana* against Selected Stock Cultures in Microbiology Laboratory, Cross River University of Technology, Calabar. *Int J Curr Microbiol App Sci*.2016;5(5):512-20.
9. Aliyu AB, Musa AM, Abdullahi MS, Ibrahim H, Oyewale AO. Phytochemical screening and antibacterial activities of *Vernonia ambigua*, *Vernonia blumeoides* and *Vernonia ocephala* (Asteraceae). *world*. 2011;10:11.
10. Alabi OA, Haruna MT, Anokwuru CP, Jegede T, Abia H, Okegbe VU, et al. Comparative studies on antimicrobial properties of extracts of fresh and dried leaves of *Carica papaya* (L) on clinical bacterial and fungal isolates. *Advances in Applied Science Research*.2012;3(5):3107-14.
11. Mabeku LBK, Roger KJ, Louis OEJ. Screening of some plants used in the cameroonian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *International Journal of Biology*. 2011;3(4):13.
12. Nayak BS, Pereira LP, Maharaj D. Wound healing activity of *Carica papaya* L. in experimentally induced diabetic rats. *Indian Journal of Experimental Biology Vol 45, August 2007*, pp. 739-743.