



**HAL**  
open science

## Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*

Jean-Luc Aboya Moroh

► **To cite this version:**

Jean-Luc Aboya Moroh. Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*. Sciences agricoles. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2013. Français. NNT : 2013BRES0028 . tel-00935393

**HAL Id: tel-00935393**

**<https://theses.hal.science/tel-00935393>**

Submitted on 23 Jan 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UBO

université de bretagne  
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE  
(France)

*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*

UNIVERSITE FELIX HOUPHOUËT BOIGNY  
(Côte d'Ivoire)

pour obtenir le titre de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE  
ET DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ FELIX HOUPHOUËT-BOIGNY

*Mention : Microbiologie - Biochimie*  
École Doctorale SICMA

présentée par

**Jean-Luc Aboya MOROH**

Laboratoire Universitaire de Biodiversité et  
d'Ecologie Microbienne (France)

Laboratoire de Pharmacodynamie  
Biochimique (Côte d'Ivoire)

**Thèse soutenue le 25 Septembre 2013**

devant le jury composé de :

**M Ali AI-MOURABIT, Directeur de recherche**

CNRS GIF-SUR-YVETTE ; France : Rapporteur

**Mme Marina KOUSSÉMON-CAMARA, Maître de conférences**

Univ. Nangui Abrogoua.; Côte d'Ivoire : Rapporteur

**M Yannick Fleury, Maître de conférences**

Univ. de Bretagne Occidentale, France: Examineur

**M Joseph A. DJAMAN, Professeur**

Univ. Félix Houphouët-Boigny, Côte d'Ivoire: Examineur

**M Roger LABIA, Directeur de recherche**

CNRS, France: Invité

**M Ivan LEGUERINEL, Professeur**

Univ. de Bretagne Occidentale, France: Directeur de Thèse

**M Adama COULIBALY, Maître de conférences**

Univ. Félix Houphouët-Boigny, Côte d'Ivoire: Directeur de Thèse

## Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*

« Sur le torrent, sur ses bords, de chaque côté, pousseront toutes sortes d'arbres fruitiers. Leur feuillage ne se flétrira pas, et leurs fruits ne s'épuiseront pas, ils donneront des primeurs tous les mois, parce que ses eaux sortiront du sanctuaire. Leurs fruits serviront de nourriture et leurs feuilles de remède. »

A la mémoire de

Dame Yhéré Sagbosso & Dame N'Dri Akissi

Dame Sangbosso Odile & Assokoly François

*Kouakou René Assokoly*

Abbé Luc Assokoly

Je dédie cette thèse à

Dieu tout puissant le Père, Dieu le Fils et  
Dieu le Saint Esprit

Je la dédie également à mes trois Amours

Ma mère Yhéré Philomène ASSOKOLY

Mon épouse Schah Marcelle ACHI

Ma Fille Yhéré Claire-Eliel MOROH

## Remerciements

Au bout des travaux qui ont animés ces trois années de thèse, je ne serai ni la première ou ni la dernière personne à énumérer les valeurs acquises, à savoir, la connaissance, l'adaptation, la collaboration, la découverte etc. J'adresse donc ces remerciements à tous ceux qui y ont contribué.

### *Aux autorités...*

Je remercie tout d'abord les autorités qui ont œuvré pour la réalisation de ce travail en cotutelle. Il s'agit d'une part de l'état de Côte d'Ivoire par le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique pour l'octroi d'une bourse d'étude dans le cadre de cette thèse.

Mes remerciements au Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Écologie Microbienne (LUBEM) à travers son directeur le Professeur Georges BARBIER et le Professeur Ivan LEGUERINEL qui ont accepté de m'accueillir dans leur laboratoire.

Mes remerciements vont également au laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique (LPB) de l'Université Félix Houphouët-Boigny et tout particulièrement à son Directeur, le Professeur Joseph DJAMA, pour m'avoir permis de réaliser cette entreprise à priori délicate.

Mes remerciements au Laboratoire Central du CHU de Treichville et à son Directeur le Professeur Vincent EDOH qui a mis à ma disposition les données microbiologiques relatives aux ECBU pour la période 2000-2011.

### *Aux différents Maîtres...*

Un sage africain disait « la connaissance est la seule chose qu'on peut donner sans pouvoir la reprendre ». Je remercie donc toutes ces personnes qui ont bien voulu me donner la connaissance car donner sans pouvoir reprendre, nécessite une certaine confiance en celui à qui l'on donne.

Je remercie mes deux directeurs de thèse, le Professeur Ivan LEGUERINEL pour tous ses apports et soutient tant sur le plan administratif, académique, organisationnel et aussi relationnel ; le Professeur Adama COULIBALY pour toutes les motivations qu'il m'a apportées avant la thèse, ses

encouragements continus tout au long de la thèse, ses appuis et soutiens administratifs, académiques et ses attentions.

Mes remerciements distingués et toute ma gratitude au Professeur Roger LABIA, un Maître qui m'a accordé sa disponibilité, et qui m'a permis d'admirer son sens d'observation, d'écoute, son attention et sa paternité. Vous avez été une pierre angulaire dans la réalisation de ce travail. Chaque moment passé avec vous sur les paillasses du laboratoire, dans votre bureau, en réunion, au téléphone, lors des déplacements Quimper-Brest ou Quimper-Rennes pour les analyses de caractérisation, fut très instructif car vos conversations et vos conseils d'homme de science expérimenté me resteront à jamais instructif. Je repars content d'avoir été l'un de vos disciples.

Mes remerciements à Yannick FLEURY pour la disponibilité, l'énergie, les appuis techniques que tu m'as consacré tout au long de la thèse. Je te remercie d'avoir partagé cette aventure avec moi.

Au Docteur Calixte BAHl qui m'a initié à la recherche et qui continue à être un guide par ses conseils avisés, ses encouragements et aussi pour toute sa confiance à mon endroit. Je remercie tous les membres du laboratoire de pharmacodynamie biochimique, le Pr Jean-David N'GUESSAN, le Dr Mathieu KRA, le Dr Bernard DJYH ..., également pour leurs soutient et encouragements

Mes remerciements à tous les membres du LUBEM, de l'IUT Quimper, du CHU de Treichville, du CRMPO de l'université de Rennes 1, du service RMN de la plate-forme de l'UBO qui n'ont pas hésité à partager avec moi leur savoir-faire. Toute ma considération à Patrick LECHEVALIER, à Docteur Honoré TIA, Gaele SIMON, Lambert FABIAM ainsi qu'à Boris LINARD sans omettre les aides précieuses d'Anne LEVANT, d'Estelle BELLANGER et celles de Marie Hélène.

*A tous ceux qui ont facilité mon intégration et adaptation...*

Je me souviens aussi que le même sage africain disait que « [c'est la multicoloration du tapis qui fait sa beauté](#) », Il était certain que faire ma thèse en France m'amènerait à découvrir beaucoup de choses qui m'étaient étrangères, différentes. A travers ce proverbe, j'ai compris que les différences ne pouvaient que contribuer à la beauté de cette aventure si j'arrivais à

m'adapter. Je tiens donc à remercier tous ceux qui ont énormément contribué à mon intégration et adaptation en France, en Bretagne.

Remerciements tout d'abord à mon cousin Samuel BLIMOLI, qui m'a énormément guidé sur le vieux continent. Son soutien sans faille a été d'un grand secours pour moi. Des remerciements aussi à Karine LASNIER pour toute ta sollicitude à mon égard pendant ce séjour en France.

Je tiens à remercier mon premier voisin de bureau, Olivier Couver. Je dirai que mon intégration dans le laboratoire, à Quimper et en Bretagne, est passée par toi. Je te remercie pour toutes tes actions, éloigné mes solitudes et mes déprimés (le chauffage excessif du bureau, ton invitation aux cours de plongé, les concerts à Bénodet sans oublier toutes les activités du café des spores sous ton initiative).

Remerciements à Louis CORROLER pour les temps de partage et d'échange qu'il m'a accordé. Tes conseils m'ont toujours été d'une grande utilité. Remerciements à Patrick LECHEVALIER. En plus des techniques de biologie moléculaire que tu m'as inculquées, tu m'as également appris à respirer sous l'eau. J'ai beaucoup aimé avoir ce savoir-faire. Je remercie également BILLY pour toutes les réparations effectuées au laboratoire (HPLC, étuve, hotte, Beck...). Remerciements également à Benjamin BRILLER pour sa sympathie et les moments de convivialité.

J'aimerais être naturel lorsque j'improvise, être naturel comme Dr BARIL arrive à le faire. Je remercie chaleureusement mon amie Eugénie BARIL. J'ai beaucoup aimé tes talents pour mettre de la bonne humeur et de la convivialité. Je te remercie pour tous ces apéros que tu initiais chez toi après les journées de labo (ou bien dirai-je après tes journées de dénombrement, de matlab, de  $Z_t$  ou  $Z_{ph}$ ). Merci également pour ta disponibilité et tes conseils.

Je remercie mes deux collègues de thèse, Florie et Noémie DESRIAC. On retiendra ensemble qu'une thèse commence avec 400% de motivation, n'est-ce pas ? Actuellement je ne sais à combien j'en suis mais assez suffisante pour vous remercier pour ces temps qu'on a eu à partager au laboratoire et même pour certaines habitudes bretonne que j'ai reçu de vous !!! Je garderai en souvenir tous les quotidiens du labo avec vous.



J'adresse mes remerciements et encouragements à autres collègues de thèse notamment Narjess MTIMET, Clément T, Clément O et Philomène KOKORA. Des remerciements pour tout ce que nous avons pu partager déjà et des encouragements pour garder le cap. Je profite aussi de cette page pour remercier tous les stagiaires qui sont passés au laboratoire pendant ma thèse.

### *Tout soutien...*

Enfin je remercie toutes les personnes qui m'ont accordé leur soutien de près ou de loin tout au long de cette thèse. Je remercie mon père Maxim KASSI et ma mère Yhéré Philomène pour leurs prières, encouragements et conseils. Remerciements à tous mes frères et sœurs Arvers, Charlotte, Éliane, Laetitia, Isaac, Gèneviève et Luc pour leurs actions dans la famille pendant mon absence.

Je remercie la sœur Clémentine TOGOLA pour son aide précieuse, pour son écoute, ses conseils et ses prières.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de :

- M KONAN Kouassi Lambert, PCA du Conseil Café et Cacao de Côte d'Ivoire pour ses conseils et ses orientations très avisés
- M N'DRI Koffi Germain, M BLE Maurice, M ATTO Nangui Narcisse pour tous leurs soutiens reçus

A tous mes oncles François, Léon, Télesfor et mes tantes, Sœur Gèneviève, Sœur Véronique,

Aussi à tous mes amis, scouts de Côte d'Ivoire comme scouts de Quimper dont les messages d'encouragement ne m'ont pas laissé indifférents, Jean-Claude DAHOINDJI, Bernard AKA, Didier et toute la famille DIETLIN, Le Père Jean-Paul ANOH, Moïse ASSOMOU, Aya Clarisse KONAN, Joseph ONADJA, OYOUROU Arnaud la Famille MONOYEUR, la famille KEVRAN, LASNIER...

A Schah Marcelle ACHI, je te dis un grand merci pour l'énergie déployée en mon absence pour prendre soin de notre fille Claire-Eliel et aussi pour ta présence marquée auprès de mes parents. Merci pour ton soutien régulier, tes concessions et pour toutes les motivations que tu m'as apportées.

# Table des matières

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	<b>14</b>
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>18</b>
<b>I INTRODUCTION</b> .....	<b>18</b>
<b>II LUTTE CONTRE LES MICRO-ORGANISMES PATHOGÈNES PAR LES ANTIBIOTIQUES</b> .....	<b>19</b>
II.1 CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES .....	20
II.1.1 Les antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne .....	21
II.1.2 Les antibiotiques qui ciblent la membrane plasmique .....	23
II.1.3 les antibiotiques qui ciblent les ribosomes .....	24
II.1.4 Les antibiotiques qui ciblent l'ARN .....	26
II.1.5 Les antibiotiques qui ciblent l'ADN .....	26
II.2 LES RÉSTANCES AUX ANTIBIOTIQUES .....	29
II.2.1 La résistance bactérienne naturelle .....	30
II.2.2 La résistance acquise .....	30
II.2.2.1 Résistance par mutation chromosomique .....	30
II.2.2.2 La résistance par acquisition de gènes .....	31
II.2.3 Evolution des bactéries résistantes aux antibiotiques .....	31
II.2.4 Epidémiologie des résistances bactériennes .....	34
II.2.4.1 Variabilité géographique des résistances .....	35
II.2.4.2 Impact de la consommation des antibiotiques .....	36
II.2.4.3 Epuisement de l'arsenal thérapeutique .....	38
<b>III LUTTE CONTRE LES PATHOGÈNES AVEC LES PLANTES MÉDICINALES</b> .....	<b>41</b>
III.1 INTRODUCTION .....	41
III.2 LE POTENTIEL ANTIMICROBIEN DES PLANTES MÉDICINALES .....	44
III.2.1 Les composés phénoliques .....	44
III.2.2 Les terpènes et stéroïdes .....	47
III.2.3 Les alcaloïdes .....	48
III.3 LES PLANTES MÉDICINALES DU GENRE MORINDA .....	50
III.3.1 Introduction .....	50
III.3.2 Les phytomolécules issues du genre Morinda .....	54
III.3.2.1 Les iridoïdes du genre <i>Morinda</i> .....	54
III.3.2.2 Les flavonoïdes issus du genre Morinda .....	55
III.3.2.3 Les anthraquinones décrites du genre <i>Morinda</i> .....	57
<b>CHAPITRE II : RÉSISTANCE BACTÉRIENNE AUX ANTIBIOTIQUES : ÉTAT DES LIEUX AU CHU DE TREICHVILLE DE 2000 À 2011</b> .....	<b>60</b>

<b>I MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>61</b>
I.1 LES EXAMENS CYTOBACTÉRIOLOGIE DES URINES	61
I.2 TRAITEMENT DES DONNÉES ET ANALYSES STATISTIQUES	63
<b>II RÉSULTATS</b>	<b>64</b>
II.1 ÉPIDÉMIOLOGIE DES INFECTIONS URINAIRES	64
II.2 RÉSISTANCE AUX DIFFÉRENTS ANTIBIOTIQUES ÉTUDIÉS	64
-Résistance aux $\beta$ -lactamines	66
-Résistance aux quinolones	66
-Résistance aux aminoglycosides	67
-Tendance de la résistance	67
III.3 SOUCHES MULTI-RÉSISTANTES	69
<b>IV. DISCUSSION</b>	<b>72</b>
<b>V CONCLUSION</b>	<b>80</b>

### **CHAPITRE III : COMPOSÉS ANTIMICROBIENS DE *MORINDA MORINDOIDES*** ----- **82**

<b>I INTRODUCTION</b>	<b>82</b>
<b>II MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>83</b>
II.1 EXTRACTIONS	83
II.1.1 Matériels	83
II.1.2 Méthode d'extraction	84
II.2 PURIFICATION	85
II.2.1 Matériel	85
II.2.2 Méthode de purification	86
II.3 CARACTÉRISATION DE LA STRUCTURE CHIMIQUE DES COMPOSÉS PURIFIÉS	87
II.3.1 Caractérisation par spectrométrie de masse	87
II.3.2 Caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire	88
II.4 TEST D'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE	89
II.4.1 Matériel	89
II.4.2 Méthodes	91
II.4.2.1 Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé	91
II.4.2.2 Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode des spots	93
II.4.2.3 Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode en milieu liquide.	93
93	
II.4.2.4 Cinétique d'inactivation	94
II.5 CIBLE MOLÉCULAIRE DES COMPOSÉS ISOLÉS	95
II.5.1 Matériel	95
II.5.2 Méthodes	97
II.5.2.1 Méthode d'extraction du plasmide pBr 322	97
II.5.2.2 Méthode d'extraction d'ADN génomique de <i>Staphylococcus aureus</i>	98

II.5.2.3	Mise en évidence de l'activité intercalante par électrophorèse (migration sur gel d'agarose 1%) -----	98
II.5.2.4	Mise en évidence de l'activité intercalante par compétition avec le Sybr Gold -----	99
II.6	EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS -----	101
II.6.1	Matériel -----	101
II.6.2	Méthode expérimentale d'évaluation de l'activité antioxydante -----	102
II.7	TESTS DE TOXICITÉ -----	103
II.7.1	Activité cytotoxique de l'extrait d'intérêt -----	103
II.7.1.1	Matériel -----	103
II.7.1.2	Méthode expérimentale de l'activité cytotoxique -----	104
II.7.2	Test d'activité hémolytique (hématotoxicité) de l'extrait d'intérêt et des composés purifiés -----	105
II.7.2.1	Matériel -----	105
II.7.2.2	Méthode expérimentale de l'activité hémolytique -----	106
<b>III</b>	<b>RÉSULTATS -----</b>	<b>108</b>
III.1	EXTRACTIONS -----	108
III.2	TESTS D'ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNES PAR DIFFUSION EN MILIEU GÉLOSÉ -----	109
III.3	MISE EN ÉVIDENCE DES ACTIVITÉS ANTI-OXYDANTES DES DIFFÉRENTS EXTRAITS -----	111
III.4	CINÉTIQUE D'INACTIVATION DE L'EXTRAIT À L'ACÉTONITRILE SUR STAPHYLOCOCCUS AUREUS ET SUR CANDIDA ALBICANS -----	113
III.5	ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE DE L'EXTRAIT À L'ACÉTONITRILE DE LA RACINE DE MORINDA MORINDOIDES ---	118
III.6	PURIFICATION -----	119
III.6.1	Analyse chromatographique des extraits de racine de M morindoides -----	119
III.6.2	Purification des composés de l'extrait à l'acétonitrile -----	121
III.7	CARACTÉRISATION STRUCTURALE -----	122
	Fraction 1 -----	123
	Fraction 2 -----	125
	Fraction 3 -----	131
	Fraction 4 -----	133
	Fraction 6 -----	135
	Fraction 7 -----	137
	Fraction 8 -----	139
	Fraction 9 -----	146
	Fraction 10 -----	148
	Fraction 11 -----	150
	Fraction 12 -----	152
	Fraction 13 -----	154
	Récapitulatif des phytomolécules caractérisées -----	156
III.8	DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES ANTIMICROBIENS DES DIFFÉRENTS COMPOSÉS ISOLÉS -----	157
III.9	ACTIVITÉ HÉMOLYTIQUE SUR DES HÉMATIES HUMAINES DES DIFFÉRENTS COMPOSÉS ISOLÉS. -----	158
III.10	MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVE INTERCALANTE DE L'ADN. -----	161
III.10.1	Mise en évidence du pouvoir intercalant par migration électrophorétique -----	161

III.10.2	Mise en évidence du pouvoir intercalant par compétition-----	163
<b>IV</b>	<b>DISCUSSION-----</b>	<b>166</b>
<b>VI</b>	<b>CONCLUSION -----</b>	<b>178</b>
	<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES -----</b>	<b>180</b>
	<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----</b>	<b>183</b>
	<b>VALORISATION DES TRAVAUX DE LA THÈSE-----</b>	<b>199</b>
	<b>AUTRES PRODUCTIONS -----</b>	<b>200</b>

## Liste des figures

Figure 1: Chronologie de découverte des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006) .....	21
Figure 2: Structure de la polymyxine M (Kipnis et Guery, 2010) .....	23
Figure 3: Structure de la Gramicidine .....	24
Figure 4: Structure de la rifampicine .....	26
Figure 5: Structure de quelques quinolones de différentes générations .....	27
Figure 6: Régions fonctionnelles des quinolones .....	29
Figure 7: Croissance rapide de production de penicillinase par <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
Figure 8: Evolution de la résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méthiciline ....	33
Figure 9: représentation des multirésistants de type PDR, XDR et MDR (Magiorakos et al., 2011) .....	34
Figure 10: Prévalence des <i>Staphylococcus aureus</i> résistant .....	35
Figure 11: Pourcentage de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> résistant à la ceftazidime .....	37
Figure 12: Spirale de la résistance de Carlet (Carlet et al., 2004) .....	40
Figure 13: Coût de traitement du paludisme par divers .....	42
Figure 14: mise en évidence de l'efficacité de la médecine traditionnelle à partir de 50 ETR. 43	
Figure 15: Recours à la Médecine Complémentaire Parallèle (MCP) .....	43
Figure 16: Arbre phylogénétique de quelques espèces du genre <i>Morinda</i> (Razafimandimbison et al., 2009) .....	52
Figure 17: Distribution des espèces du genre <i>Morinda</i> exploitées comme plante médicinale	53
Figure 18 : Iridoïdes antimicrobiens isolés du genre <i>Morinda</i> .....	55
Figure 19: Flavonoides antimicrobiens issus du genre <i>Morinda</i> .....	56
Figure 20: Anthraquinones antimicrobiennes issues du genre <i>Morinda</i> .....	57
<b>Figure 21: Evolution de la résistance à certains antibiotiques avec le test de tendance de Cochram-Armitage .....</b>	<b>68</b>
Figure 22: Comparaison des pourcentages des multi-résistants des souches communautaires à celles issues des patients hospitalisés .....	71
Figure 23: Comparaison des fréquences de <i>E coli</i> uropathogène résistant à l'amoxicilline et à l'association amoxicilline/acide clavulanique. 1 :Sire et al.( 2007) ; 2 :Bouzenoune et al. (2009) ; 3 :Amine et al. (2009) ; 4 :Tanvir et al. (2012) ; 5 :Schito et al. (2009) ; 6 :Randrianirina et al.(2007) ; 7 :Smithson et al. (2012) .....	74

Figure 24: Comparaison des fréquences d'apparition de <i>E coli</i> uropathogène résistant à la ceftriaxone et à la cefotaxime. 1 :Sire et al.( 2007) ; 2 :Bouzenoune et al. (2009) ; 3 :Amine et al.( 2009) ; 5 :Schito et al.( 2009) ; 6 :Randrianirina et al. (2007) ; 9 :Ranjbar et al. (2009) ; 10 :Rahman et al. (2009) ; 11 :Hsueh et al. (2011) ; 12 :Uzunovic-Kamberovic (2006).....	75
Figure 25: Comparaison des fréquences de <i>E coli</i> uropathogène résistant à la gentamicine. 1 :(Sire et al., 2007); 4 :(Tanvir et al., 2012) ; 5 :(Schito et al., 2009) ; 6 :(Randrianirina et al., 2007) ; 7 :(Smithson et al., 2012) ; 8 : (Orrett et Davis, 2006) 9 :(Ranjbar et al., 2009) ; 10 :(Rahman et al., 2009) ; 11 :(Hsueh et al., 2011) ; 12 :(Uzunovic-Kamberovic, 2006) ; 13 :(Abubakar, 2009).....	76
Figure 26: Comparaison des fréquences d'apparition de <i>E coli</i> uropathogène résistant à l'acide nalidixique. 1 :Sire et al. (2007) ; 2 :Bouzenoune et al. (2009) ; 3 :Amine et al. (2009) ; 4 :Tanvir et al. (2012) ; 5 :Schito et al. (2009) ; 6 :Randrianirina et al. (2007) ; 9 :Ranjbar et al. (2009) ; 11 :Hsueh et al. (2011) ; 13 : Abubakar (2009).....	77
Figure 27: <i>Morinda morindoides</i> (racines, tiges, feuilles et fruit à maturité) .....	83
Figure 28: Schéma d'extraction des différents organes de <i>Morinda morindoides</i> .....	85
Figure 29: Chaîne HPLC Waters.....	86
Figure 30: Détermination de l'activité spécifique (UA/mg) d'un extrait .....	92
Figure 31: organisation de la microplaque pour le test de compétitivité .....	100
Figure 32: spectre d'absorption du DPPH radicalaire et recombiné dans l'UV-Visible (Cowie et Arrighi, 2008).....	101
Figure 33: Organisation de la microplaque pour test antioxydant .....	103
Figure 34: organisation de la plaque pour test d'activité hémolytique .....	106
Figure 35: Rendement d'extraction des feuilles, tiges et racines de <i>Morinda morindoides</i> en fonction des solvants d'extraction .....	108
Figure 36: Inhibition par diffusion en milieu gélosé de l'extrait à l'acétonitrile de la racine de <i>Morinda morindoides</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....	109
Figure 37: Activité spécifique (UA/mg) des différents extraits de <i>Morinda morindoides</i> sur différents micro-organismes .....	110
Figure 38: Réduction du DPPH par les extraits de Feuilles (A), de tige (B) et de racine (C) de <i>M. morindoides</i> .....	112

Figure 39: Cinétique d'inactivation de <i>S aureus</i> (A) et <i>C. albicans</i> (B) par différentes concentrations d'extrait à l'acétonitrile de la racine de <i>Morinda morindoides</i> . Les courbes en pointillé représentent la corrélation selon le model de Weibull .....	115
Figure 40: Evolution de la reduction décimale ( $\delta$ ) de <i>Staphylococcus aureus</i> (A) et de <i>Candida albicans</i> (B) en fonction de la concentration de l'extrait à l'acétonitrile des racines de <i>Morinda morindoides</i> .....	117
Figure 41: Viabilité de cellules 3T3 et Vero en fonction de la concentration d'extrait à l'acétonitrile.....	118
Figure 42: Profil chromatographique HPLC des extraits organique de la racine de <i>Morinda morindoides</i> : extrait à l'acétone (A), extrait au chloroforme(B), extrait à l'acétate d'éthyle(C), extrait à l'acétonitrile (D) .....	120
Figure 43: Chromatogramme 50 $\mu$ g de l'extrait à l'acétonitrile des racines de <i>Morinda morindoides</i> par HPLC sur colonne C <sub>18</sub> . Les numéros des fractions sont marqués au-dessus de chaque pic.....	121
Figure 44: Spectre d'absorption UV-visible de la F1.....	124
Figure 45: RMN <sup>1</sup> H de la F2 .....	126
Figure 46: RMN HMBC de la F2 .....	127
Figure 47: RMN HMQC de la F2.....	128
Figure 48: RMN COSY de la F2.....	129
Figure 49: Spectre d'absorption UV-visible de la F2.....	130
Figure 50: Spectre d'absorption UV-visible de la F3.....	132
Figure 51: Spectre d'absorption UV-visible de la F4.....	134
Figure 52: Spectre d'absorption UV-visible de la F6.....	136
Figure 53: Spectre d'absorption UV-Visible de la F7 .....	138
Figure 54: RMN <sup>1</sup> H de la F8 .....	140
Figure 55: RMN <sup>13</sup> C de la F8.....	141
Figure 56: RMN COSY de la F8.....	142
Figure 57: RMN HMBC de la F8.....	143
Figure 58: Spectre d'absorption UV-Visible de la F8 .....	145
Figure 59: Spectre d'absorption UV-Visible de la F9 .....	147
Figure 60: Spectre d'absorption UV-visible de la F10.....	149
Figure 61: Spectre d'absorbance UV-Visible de la F11 .....	151



<i>Figure 62: Spectre d'absorbance UV-Visible de F12</i> .....	153
<i>Figure 63: Spectre d'absorption UV-Visible de la F13</i> .....	155
<i>Figure 64: Récapitulatif des composés caractérisés</i> .....	156
<i>Figure 65: Activité antimicrobienne des différentes fractions chromatographiques sur S. aureus (a) et C. albicans (b) par la méthode des spots</i> .....	157
<i>Figure 66: Activité hémolytique des différents composés purifiés sur des hématies humaines</i> .....	159
<i>Figure 67: comparaison d'hémolyse obtenue par 50µg/ml de chaque composé</i> .....	160
<i>Figure 68: mise en évidence du pouvoir intercalant de l'extrait végétal à l'ADN plasmidique</i> .....	162
<i>Figure 69: Evolution de la fluorescence du Sybr gold intercalé à l'ADN en fonction de la concentration des composés isolés</i> .....	164
<i>Figure 70: Valeur des concentrations de chaque composé qui intercale 50% d'ADN <math>CI_{50}</math></i> .....	165
<i>Figure 71: Mise en évidence de la position (-OCH<sub>3</sub>) sur la structure des composés ayant une faible activité antimicrobienne</i> .....	172
<i>Figure 72: Position du groupement OCH<sub>3</sub> au niveau de la structure</i> .....	172
<i>Figure 73: Mise en évidence de la position du groupement OCH<sub>3</sub></i> .....	173
<i>Figure 74: Structure des composés actifs possédant un groupement méthyl (OCH<sub>3</sub>) en position 2 ou 3</i> .....	174
<i>Figure 75: hypothèse d'influence des groupements OCH<sub>3</sub> et CH<sub>3</sub> sur l'activité antimicrobienne des anthraquinones</i> .....	174
<i>Figure 76: Relation structure-activité des quinones (Yoshida et al., 1991)</i> .....	177

## Liste des tableaux

<i>Tableau 1: Classification des antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne(Bégué et Astruc, 1999; Perronne, 1999)</i> .....	22
<i>Tableau 2: Classification des antibiotiques qui ont pour cible les ribosomes (Le Minor et Véron, 1989; Houvenaeghel, 1992; Thévenot, 2003)</i> .....	25
<i>Tableau 3: Classification des composés phénoliques à activité antimicrobienne</i> .....	45
<i>Tableau 4: Classification des terpènes</i> .....	48
<i>Tableau 5: Tableau de classification des alcaloïdes</i> .....	49
<i>Tableau 6: Listes des micro-organismes uropathogènes isolés</i> .....	64
<i>Tableau 7: Comparaison des pourcentages de résistance des souches communautaires à celles issues des hospitalisés</i> .....	65
<i>Tableau 8: Proportion des multi-résistants au niveau de chaque espèce isolée</i> .....	70
<i>Tableau 9: Organisation de l'élution</i> .....	87
<i>Tableau 10: Caractères cultureux des micro-organismes utilisés</i> .....	89
<i>Tableau 11: Milieux de culture</i> .....	90
<i>Tableau 12: Différents tampons utilisés pour l'extraction du plasmide pBr 322</i> .....	96
<i>Tableau 13: Valeurs des EC<sub>50</sub> des différents extraits de Morinda morindoides</i> .....	113
<i>Tableau 14: Valeurs N<sub>0</sub>, δ et p issues de la modélisation selon le model de Weibull</i> .....	116
<i>Tableau 15: Spectre RMN de la F1</i> .....	123
<i>Tableau 16: Spectre RMN de la F2</i> .....	125
<i>Tableau 17: spectre RMN de la F3</i> .....	131
<i>Tableau 18: Spectre RMN de la F4</i> .....	133
<i>Tableau 19: spectre RMN de la F6</i> .....	135
<i>Tableau 20: Spectre RMN de la F7</i> .....	137
<i>Tableau 21: spectre RMN de la F8</i> .....	139
<i>Tableau 22: Spectre RMN de la F10</i> .....	148
<i>Tableau 23: Spectre RMN de la F11</i> .....	150
<i>Tableau 24: Spectre RMN de la F12</i> .....	152
<i>Tableau 25: Spectre RMN de la F13</i> .....	154
<i>Tableau 26: Concentration Minimale Inhibitrice des composés isolés sur quelques micro-organismes</i> .....	158

Tableau 27: comparaison de la CMI et l'IC50 des composés isolés de l'extrait à l'acétonitrile  
de la racine de *Morinda morindoides* ..... 175

## Liste des équations

Équation 1 ..... 94  
Équation 2 ..... 100  
Équation 3 ..... 102  
Équation 4 ..... 107

## **Abbréviation**

**3T3:** Lignée cellulaire fibroblastique de souris

**ADN:** Adenoside désoxy ribonucléique

**ARN:** Adénoside ribonucléique

**ATCC:** American Type Culture Collection

**CHU:** Centre hospitalier universitaire

**CI<sub>50</sub>:** Concentration inhibitrice à 50%

**CIP:** Collection Institut Pasteur

**CLED:** Cystine lactose electrolyte deficient

**CMB:** Concentration Minimale Bactéricide

**CMF:** Concentration Minimale Fongicide

**CMI:** Concentration Minimale Inhibitrice

**CRMPO:** Centre Régionale des Mésure Physique de l'Ouest

**DJ:** Dose journalière

**DO:** Densité optique

**DPPH:** 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

**ECBU:** Examen cyto bactériologique des urines

**ECDC:** European center for disease prevention and control

**EDTA:** Acide éthylène diamine tétraacétique

**HBSS:** Hank's Buffered Salt Solution

**IU:** infection urinaire

**KCl:** Chlorure de potassium

**LB:** Luria broth

**LPB:** Laboratoire de pharmacodynamie biochimique

**LUBEM:** Laboratoire universitaire de biodiversité et d'écologie microbienne

**MDR:** Multiple Drug-Resistant

**MeCN:** Acétonitrile

**mg:** milligramme

**ml:** millilitre

**mM:** milimolaire

**Na<sub>2</sub>HPO:** Hydrogénophosphate de sodium

**NAG:** N-acétylglucosamine

**NAM:** Acide N-acétylmuramique

**NaOH:** hydroxide de sodium

**NPV:** Valeur Net de Production

**OMS:** Organisation mondiale de la santé

**PDR:** Pandrug-Resistant

**pH:** Potentiel hydrogène

**RMN:** Résonance magnétique nucléaire

**SARM:** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline

**SDS:** Dodécylsulfate de sodium

**SM:** Spectrométrie de masse

**SVF:** Sérum de veau fœtal

**TFA:** Acide trifluoroacétique

**TSA** : Gélose Tryptone caséine soja

**TSB** : Bouillon Tryptone caséine soja

**UA**: Unité arbitraire

**UBO**: Université de Bretagne Occidentale

**UFC** : Unité formant colonie

**UFHB** : Université Félix Houphouët-Boigny

**UV** : ultraviolet

**VERO** : Lignée des cellules épithéliales de singe

**XDR** : Extensive drug-resistant

## Introduction générale

Les bactéries pathogènes sont responsables de plusieurs maladies épidémiques et pandémiques. Dès lors, la quête des substances anti-infectieuses est devenue un intérêt de santé publique. A partir d'une succession d'observations et de travaux de nombreux chercheurs dont Pasteur, Joubert, Duchesne puis Fleming, la quête a abouti à la découverte des antibiotiques (Pasteur et Joubert, 1877; Duchesne, 1897; Fleming, 1929; Rosset, 2003).

L'avènement de ces nouvelles molécules au lendemain de la seconde guerre mondiale fut un avantage important pour l'homme dans cette lutte contre les maladies infectieuses. Elles ont permis de sauver de nombreuses vies. Ainsi l'introduction des antibiotiques en thérapeutique a fait progresser l'espérance de vie de l'homme de plus de dix années, sans doute plus qu'aucun autre traitement médical (McDermott et Rogers, 1982).

Après moins d'un demi siècle d'existence, ce brillant tableau affiché par ces anti-infectieux s'assombri progressivement. Durant ces 30 dernières années, les infections microbiennes sont devenues récurrentes du fait de l'apparition progressive des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques. La surconsommation des antibiotiques a aidé ces bactéries dotées d'un incroyable pouvoir d'adaptation à prendre progressivement le dessus sur les antibiotiques.

Par ailleurs, cette situation pourrait aussi s'expliquer par la réduction de la recherche en antibiothérapie depuis les années 1980. La mise sur le marché de nouvelles molécules antimicrobiennes par les firmes pharmaceutiques s'est appauvrie progressivement depuis cette période (Bush, 2004). De 1983 à 1987, on a enregistré aux Etats Unis d'Amérique seize nouveaux antibiotiques mis sur le marché. Cette valeur est passée à quatorze sur la période de 1988 à 1992, puis à dix (de 1993 à 1997) pour atteindre sept de 1998 à 2002 (Andremont et Tibon-Cornillot, 2007). Les bactéries étant ainsi exposées par l'antibiothérapie aux mêmes molécules sur une longue période ne peuvent que s'adapter et générer des résistants puis évoluer vers des multi-résistants de type MDR (Multidrug Resistant), XDR (Extensively Drug-Resistant) et PDR (Pandrug Resistant).

Dès lors, en plus des mesures de surveillance des résistances bactériennes et des politiques sur la réglementation du bon usage des antibiotiques, le renouvellement de l'arsenal des

molécules anti-infectieux est devenu une des priorités pour faire face à ce problème de santé publique émergent. A l'instar de certains micro-organismes tel que *Penicillium* ou *Streptomyces* qui ont servi de source d'antimicrobiens, certaines plantes ont depuis plusieurs siècles été utilisées par la médecine traditionnelle pour lutter contre les infections. Encore aujourd'hui, dans certains pays d'Asie et d'Afrique, 80% des populations ont recours aux plantes médicinales pour traiter divers problèmes de santé (Farnsworth et Kaas, 1981; OMS, 2002). De ce fait, notre étude s'est orientée vers ces plantes pour contribuer ainsi à la quête de nouveaux antimicrobiens. Parmi, les nombreuses espèces des plantes recensées en Côte d'Ivoire, *Morinda morindoides* a retenu notre attention. Des décoctions aqueuses ou des macérations (aqueuses et alcooliques) des différents organes de cette *Rubiaceae* sont utilisées dans ce pays et d'autres en Afrique subsaharienne pour lutter contre les diarrhées, les infections cutanées, le paludisme, la fièvre et le prurit (Baker, 1947; Cimanga *et al.*, 2008; Moroh *et al.*, 2008; Bagre *et al.*, 2011).

La présente thèse a pour objectifs principaux de réaliser un état des lieux des résistances bactériennes en Côte d'Ivoire et de caractériser les phytomolécules antimicrobiennes de *Morinda morindoides*.

Cette étude s'est articulée en quatre grandes étapes méthodologiques dont la première a abrité une enquête épidémiologique sur l'évolution des résistances bactériennes aux antibiotiques de 2000 à 2011. L'étude consacrée aux phytomolécules antimicrobiennes s'est déroulée en trois étapes. La première a consisté à identifier l'organe de la plante qui présente la meilleure activité antimicrobienne. L'étape suivante a permis de purifier et de caractériser la structure chimique des phytomolécules d'intérêt contenu dans l'organe identifié. Enfin la dernière étape a consisté à étudier d'autres activités biologiques des composés telles que leur cytotoxicité, leur activité hémolytique et leur cible moléculaire.

Ce travail est réalisé dans le cadre d'une cotutelle entre l'Université Félix Houphouët Boigny de Cocody-Abidjan (Côte d'Ivoire) et l'Université de Bretagne Occidentale (France). Par conséquent, les travaux relatifs à l'enquête épidémiologique sur les résistances bactériennes, la récolte du matériel végétal (*Morinda morindoides*) et son conditionnement ont été effectués en Côte d'Ivoire (au Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique et au Centre Hospitalier et Universitaire de Treichville). Les autres étapes qui regroupent les travaux



d'extractions, de purifications, de caractérisations et de tests d'activités biologiques ont été menées en France (Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne).

## **Chapitre I :**

# **Introduction bibliographique**

## Chapitre I : Introduction Bibliographique

### I Introduction

La colonisation bactérienne chez l'homme débute dès sa naissance pour la mise en place d'une interaction durable entre la flore microbienne formée et l'organisme de l'homme. Cette interaction reste essentielle pour son bien-être et pour son équilibre métabolique (Raibaud et Ducluzeau, 1989; Doré et Corthier, 2010). Le corps d'un Homme adulte comporte environ  $10^{14}$  bactéries commensales (soit 10 fois le nombre de ses cellules) dont certaines lui fournissent des composés qui lui sont difficiles voire impossibles à synthétiser. Parmi les apports bactériens, on peut citer la synthèse de vitamines (thiamine, riboflavine, pyridoxine, vitamine B<sub>12</sub> et vitamine K), la production d'acides organiques (acide propionique et l'acide butyrique), l'apport d'enzymes ( $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -galactosidase) (Madigan et Martinko, 2006). Aussi, noterons-nous que cette interaction participe également à la mise en place du système immunitaire de l'homme et son apport s'étend jusqu'au niveau sensoriel de son organisme (Neumann *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2005).

Par ailleurs, la présence de bactéries non bénéfiques altère fonctionnement de l'organisme. Les bactéries pathogènes sont responsables de maladies infectieuses. On note par exemple qu'*Escherichia coli* pathogène est responsable d'infection urinaire, de septicémie, de méningite bactérienne (à côté du *Meningocoque*) et de gastro-entérite de par son pouvoir entéropathogène (ex : O111 B4), entérohémorragique (ex : O157 H7), entérotoxinogène (ex : O104 H4), entéroaggrégatif (Kaper *et al.*, 2004).

Bien que le corps humain dispose d'un système de défense sophistiqué, il peut être submergé par ces micro-organismes dont la fréquence de multiplication est élevée.

Pour faire face à ces infections bactériennes, l'homme a recours à des substances qui sont capables d'empêcher le développement et la progression de ces bactéries pathogènes sans toutefois présenter une toxicité pour son organisme.

## **II Lutte contre les micro-organismes pathogènes par les antibiotiques**

Au lendemain de la seconde guerre mondiale, la lutte contre les maladies infectieuses a connu un bond important par l'application des antibiotiques en milieu médical. Cette découverte fut le résultat d'une série d'observations de plusieurs auteurs par leurs travaux sur la microbiologie.

L'histoire des antibiotiques a commencé en 1877. Après leurs travaux sur la cristallographie, la fermentation, la soie et la bière (Rosset, 2003), Pasteur et Joubert (1877) observent qu'une bactérie se développe moins dans un bouillon envahi de moisissures. Cette remarque entraîne progressivement l'utilisation des moisissures pour lutter contre les infections microbiennes. Ces observations ont amené Ernest Duchesne en 1897 à rapporter dans sa thèse que les palefreniers enduisent les plaies des chevaux avec de la moisissure pour éviter qu'elles ne s'infectent. Il s'agit des moisissures qui recouvrent le cuir placé dans les endroits chauds, humides et sombres des écuries (Duchesne, 1897).

Après cette importante observation, il a fallu attendre jusqu'en 1929 pour que Fleming découvre de façon fortuite l'inhibition de Staphylocoque par un *Penicillium notatum* dans une boîte de Pétri. La substance sécrétée par cette moisissure qui empêche la croissance d'un autre microorganisme sera isolée et caractérisée. Il s'agit de la pénicilline. La forme stable de ce premier antibiotique et utilisable *in-vivo* sur des souris a été élaborée en 1940 par Chain et ses collaborateurs (Chain *et al.*, 1940).

En 1941, cette substance naturelle antimicrobienne eut son premier patient. Albert Alexander, un policier de 43 ans qui, à la suite d'une blessure accidentelle, eut la joue infectée par un Staphylocoque. Face à divers traitements inefficaces de l'infirmerie Radcliff, ce patient menaçait de succomber à sa blessure lorsqu'il reçut la première dose de pénicilline avec un succès thérapeutique au bout de 4 jours (Andremont et Tibon-Cornillot, 2007).

L'année 1942 marque le début de la production industrielle de la pénicilline avec les compagnies pharmaceutiques Merck, Lederle, Squibb et Pfizer (Lerner, 2004).

C'est le début de l'ère des antibiotiques. Cette découverte et son application ont inspiré de nombreuses recherches vers des molécules naturelles et synthétiques pour lutter efficacement contre les infections microbiennes.

## ***II.1 Classification des antibiotiques***

En 1941, Waksman, découvreur de la streptomycine, a proposé le mot antibiotique pour désigner toute substance produite par un micro-organisme et qui a le pouvoir d'inhiber la croissance d'autres micro-organismes et même de les détruire (Courvalin *et al.*, 2001). Aujourd'hui, cette notion s'étend aux substances semi-synthétiques ou même synthétiques ayant la même la fonction.

Qu'il soit naturel ou semi-synthétique, avant son exploitation en médecine thérapeutique, l'antibiotique doit répondre aux critères de la définition de Paul Ehrlich sur la chimiothérapie. Pour ce dernier, « une substance chimiothérapeutique utilisable par voie générale dans le traitement des maladies infectieuses doit être nuisible pour le micro-organisme pathogène mais inoffensive pour les cellules de l'organisme de l'hôte ». De ce fait, jusqu'aujourd'hui, sur les 10 000 antibiotiques découverts, seulement 150 sont utilisés en médecine thérapeutique (Walsh, 2003). Environ 80% de ces antibiotiques naturels sont produits par des bactéries et 20% par des moisissures.

De 1940 à 2005, on a donc assisté à la découverte et à la mise sur le marché de nouveaux antibiotiques dont la chronologie est présentée par la Figure 1.

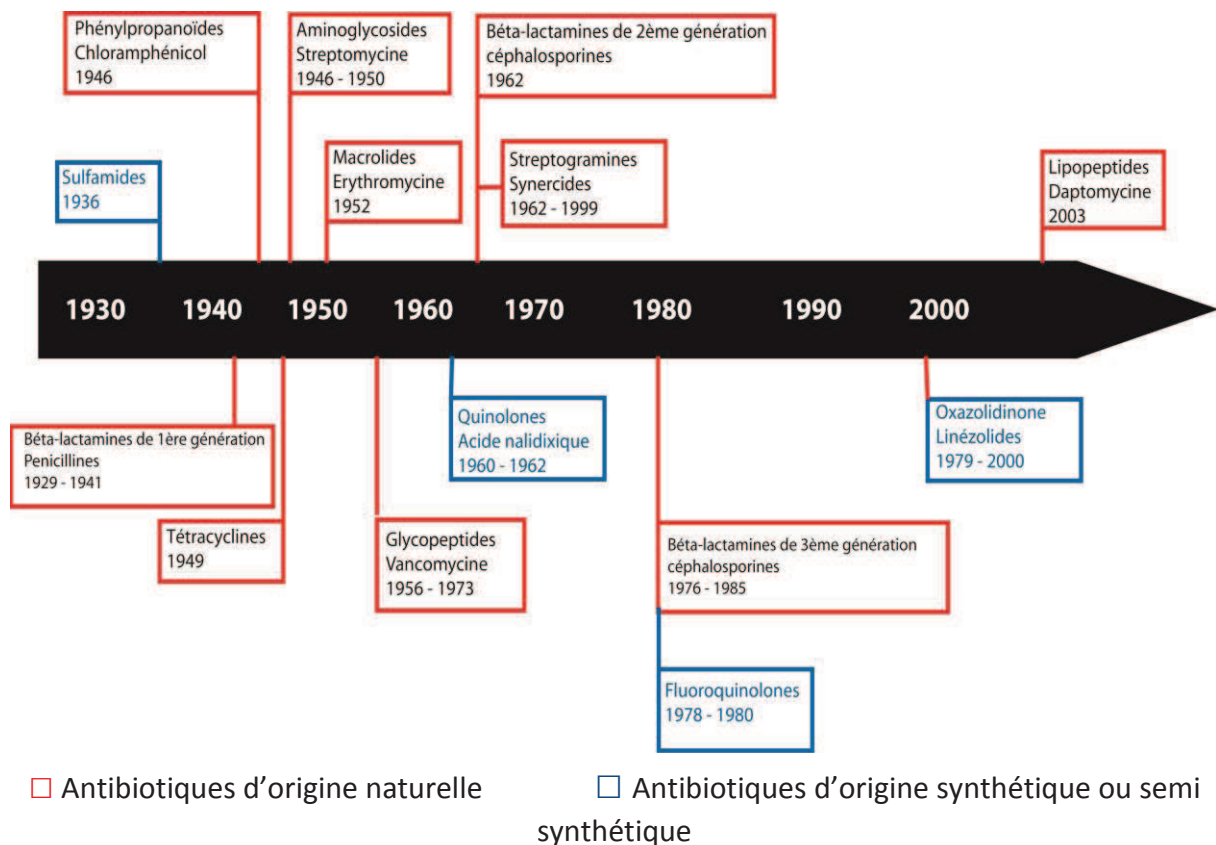


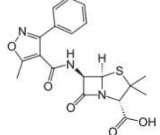
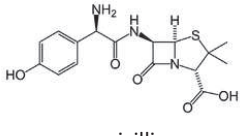
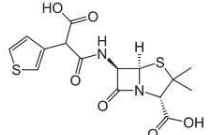
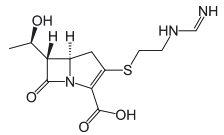
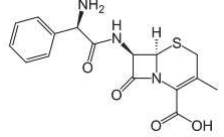
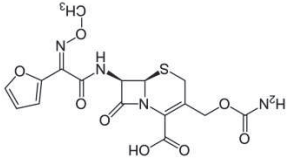
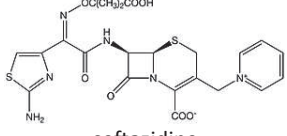
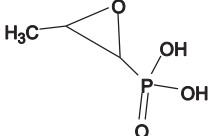
Figure 1: Chronologie de découverte des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006)

Les différents antibiotiques exploités en médecine thérapeutique peuvent être classés par famille chimique et par leurs modes d'action. Les cibles décrites jusqu'à présent sont la paroi, la membrane, l'acide nucléique et les ribosomes des micro-organismes.

### II.1.1 Les antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne

La paroi bactérienne est une structure rigide composée de peptidoglycane. Il s'agit d'un réseau tridimensionnel d'acides aminés et de chaînes polysaccharidiques, constituées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Trois modes d'action sont utilisés par les antibiotiques présentés par le Tableau 1.

**Tableau 1: Classification des antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne (Bégué et Astruc, 1999; Perronne, 1999)**

Mode d'action	Famille	Sous-famille	Exemple	Spectre d'action	
inhibiteurs de la transpeptidase	pénicillines	pénicilline G		Germe à Gram positif	
		pénicillines M	 oxacilline	Germes à Gram positif	
		pénicillines A	 amoxicilline	Germe à Gram positif et Gram négatif	
		Carboxypénicillines Uréidopénicilline amidopénicillines	 Ticarcilline	Germes à Gram positif et à Gram négatif y compris <i>Pseudomonas</i>	
		carbapénèmes	 imipénème	Germes à Gram positif et à Gram négatif y compris <i>Pseudomonas</i> , entérocoques et anaérobie	
	céphalosporines	Première génération	 cefalexine	Germes à Gram positif et à Gram négatif	
		Deuxième génération	 cefuroxime	Germes à Gram positif et à Gram négatif	
		Troisième génération	 ceftazidime	Germes à Gram positif et à Gram négatif y compris <i>Pseudomonas</i>	
	inhibiteurs de la polymérisation du peptidoglycane	glycopeptides		Vancomycine	Germes à <b>Gram</b> positif
	inhibiteurs de la formation d'acide N-Acétyle Muramique	Fosfomycine		 fosfomycine	Germes à Gram positif et négatif

### II.1.2 Les antibiotiques qui ciblent la membrane plasmique

Certains antibiotiques ont pour cible la membrane plasmique bactérienne avec une action bactéricide. Ces antibiotiques de type polypeptidique présentent une toxicité lors de leur administration. Ce sont des molécules naturelles produites par des bactéries du genre *Bacillus*. On peut les diviser en deux sous familles.

- Les polypeptides tensio-actifs

Il s'agit des polymyxines ou colistines qui sont des antibiotiques cycliques (Figure 2) isolés de *Bacillus polymyxa*. On dénombre les polymyxines A, B, C, D, E, F, K, M, P, S, et T, mais seulement les polymyxines B et E sont exploitées en thérapeutique.

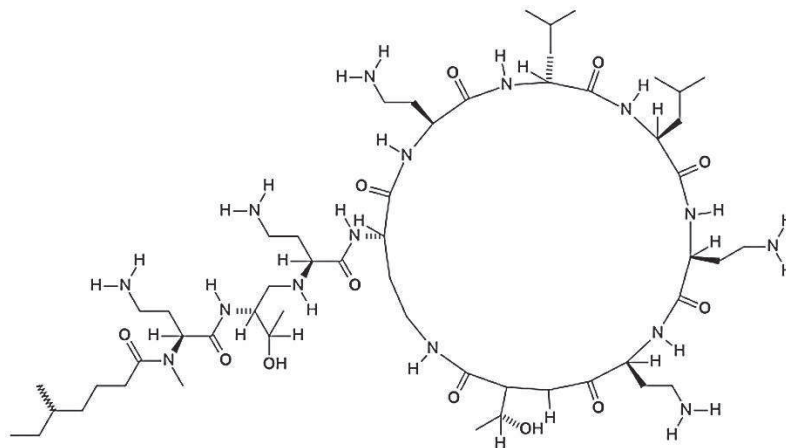


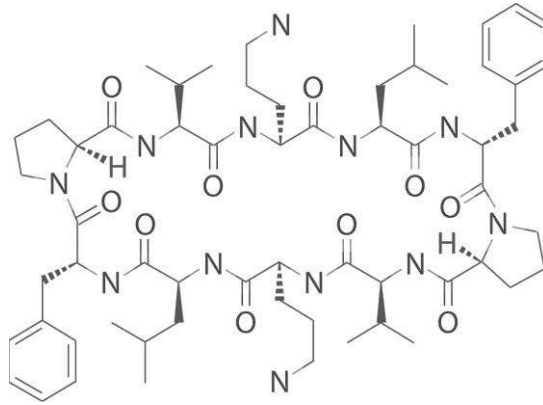
Figure 2: Structure de la polymyxine M (Kipnis et Guery, 2010)

Ces antibiotiques agissent comme des détergents de par leur caractère amphiphile et s'insèrent parmi les phospholipides membranaires. Cette insertion perturbe la perméabilité de la membrane bactérienne entraînant la mort cellulaire.



- Les polypeptides non tensio-actifs

Dans ce groupe, on note la tyrocidine, la bacitracine et la gramicidine (Figure 3). Ce dernier est un mélange d'antibiotiques composé de gramicidine A (environ 80%), de gramicidine B (6%) et gramicidine C (14%) qui sont produits par *Bacillus bevis*.



**Figure 3: Structure de la Gramicidine**

La structure primaire de la gramicidine est composée d'un ensemble d'acides aminés qui alternent les conformations L- et D- (Sarges et Witkop, 1965). Cette alternance va entraîner une variété de conformations pour sa structure secondaire en fonction de son environnement. Deux formes existent dont la forme double hélice (ou forme poreuse) et la forme simple hélice (ou forme canal) (Wallace, 1998).

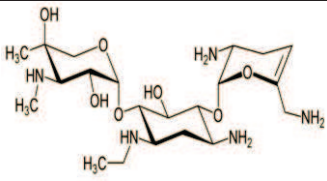
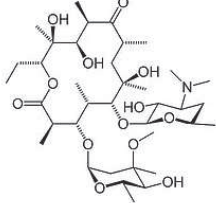
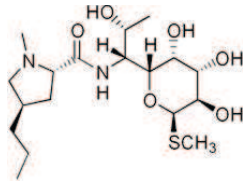
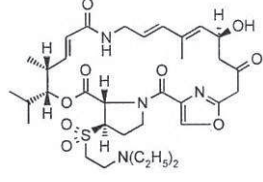
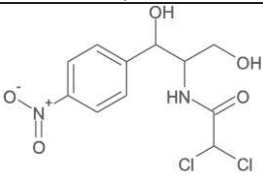
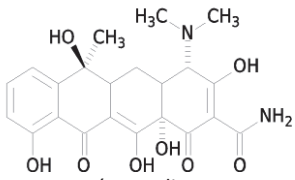
En s'insérant dans la membrane plasmique, la gramicidine forme des canaux et augmente la perméabilité de la membrane (Bourinbaiar et Coleman, 1997).

### **II.1.3 les antibiotiques qui ciblent les ribosomes**

Les ribosomes sont des organites présents dans les cellules eucaryotes et procaryotes (cellule bactérienne). Leur structure se compose de protéines et d'ARN. Ils synthétisent les protéines en décodant l'information contenue dans l'ARN messenger. Ces organites comportent une petite sous-unité (qui se charge de lire l'information portée par l'ARN messenger) et d'une grande sous-unité qui se charge d'intégrer les acides aminés.

La plupart des antibiotiques qui ont pour cible les ribosomes interfèrent avec la synthèse protéique en induisant des erreurs de synthèse ou en inhibant cette synthèse. La cellule bactérienne est ainsi dans une incapacité de synthétiser des protéines qui lui sont vitales. Les familles des antibiotiques concernées ainsi que leur mode d'actions sont présentées par le Tableau 2

**Tableau 2: Classification des antibiotiques qui ont pour cible les ribosomes (Le Minor et Véron, 1989; Houvenaeghel, 1992; Thévenot, 2003)**

Mode d'action	Famille	Sous famille	Exemple	Spectre d'activité
Inducteur d'erreurs de decodage	aminosides		 <p>Netilmicine</p>	Germes à Gram positif (sauf streptocoques) et à Gram négatif
Inhibition de l'élongation par le site P	Macrolides, Lincosamides Synergistines (MLS)	Macrolides	 <p>Erythromycine</p>	Germe à Gram positif et négatif sauf <i>Enterobacter</i> et <i>Pseudomonas</i>
		Lincosamides	 <p>Lincomycine</p>	
		Synergistines	 <p>Dalfapristine</p>	
Inhibition de l'activité de la peptidyl transferase	Phénicoles		 <p>Chloramphénicol</p>	Germe à Gram positif et négatif y compris <i>Neisseria</i> , streptocoque, <i>Haemophilus</i> et <i>Salmonelle</i>
Inhibition de la fixation de l'ARN de transfert	Cyclines		 <p>Tétracycline</p>	

### II.1.4 Les antibiotiques qui ciblent l'ARN

Pour ce mode d'action, on dénombre la famille des rifamycines, composée des rifamycines A, B, C, D, E, S et SV. Ces antibiotiques ont une structure chimique macrocyclique et sont isolés de *Streptomyces nordia mediterranei*. La rifampicine (Figure 4) et la rifabutine sont des molécules hémi synthétisées à partir de la rifamycine B.

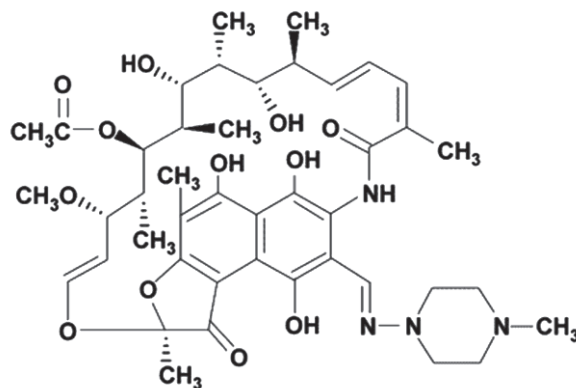


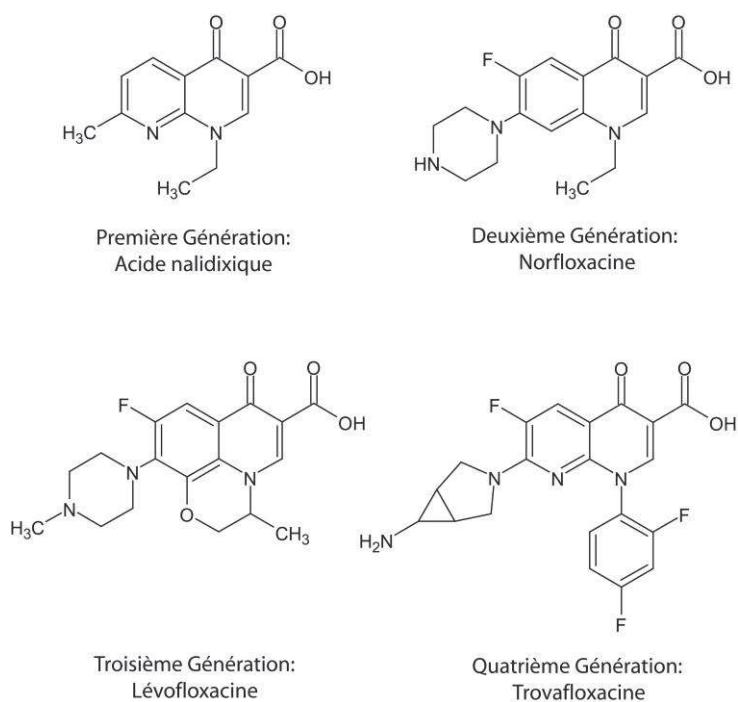
Figure 4: Structure de la rifampicine

En se liant à l'ARN polymérase, ces antibiotiques bloquent la formation de la chaîne d'ARN messager et par conséquent on assiste à un arrêt de la synthèse protéique.

Les rifamycines sont des antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram positif, sur *Mycobacterium*, quelques bactéries à Gram négatif et surtout les *Neisseria meningitidis* (Méningocoque) (Tenstet, 2010).

### II.1.5 Les antibiotiques qui ciblent l'ADN

L'ADN est la cible des quinolones, qui forment une large famille d'antibiotiques de synthèse et dérivent de l'acide nalidixique. Ils sont caractérisés par un large spectre d'activité, une bonne biodisponibilité orale, et une bonne diffusibilité dans les tissus. Les molécules de cette famille sont classées par génération (Figure 5) à l'instar des céphalosporines (Andriole, 2000; Hooper et Rubinstein, 2003).



**Figure 5: Structure de quelques quinolones de différentes générations**

Les quinolones de la première génération regroupent l'acide nalidixique, l'acide pipémidique et la fluméquine. Ils sont actifs sur les bactéries à Gram négatif et leurs utilisations se limitent principalement dans le traitement des infections urinaires du fait de leur mauvaise diffusion dans les tissus.

Dans le groupe de la seconde génération, la norfloxacin est caractérisée entre autres, par l'ajout d'un atome de fluor à l'acide nalidixique en position C<sub>6</sub> et de la pipérazine en position C<sub>7</sub>, renforçant l'activité antibactérienne. L'ajout du fluor caractérise les fluoroquinolones. La ciprofloxacine dérive de la norfloxacin avec l'apport d'un radical (cyclopropyl) sur l'azote N<sub>1</sub>. C'est un groupement qui améliore la biodisponibilité de la molécule. Toutes ces modifications chimiques à partir des quinolones de la première génération ont permis d'élargir leur spectre sur les bactéries à Gram négatif et avec une activité sur *Pseudomonas aeruginosa*. Leur spectre d'action s'étend sur les bactéries à Gram positif excluant *Streptococcus pneumoniae*. Certains antibiotiques de ce groupe comme la norfloxacin, la loméfloxacin et l'énoxacin, par leur biodisponibilité insuffisante, sont exploités

uniquement dans le traitement des infections urinaires. Les autres antibiotiques tels que la ciprofloxacine, l'ofloxacine sont utilisés pour le traitement d'une grande gamme d'infections.

Concernant les quinolones de la troisième génération, on note une activité sur les bactéries à Gram positif y compris le genre *Streptococcus* et les espèces *Klebsiella pneumoniae* et *Moraxella catarrhalis* (anciennement *Branhanella catarrhalis*). Cette dernière activité les qualifie de « quinolones des infections respiratoires ». Ce groupe renferme la balofloxacine, la grépafloracine, la lévofloxacine, la pazufloxacine, la sparfloxacine et la tosufloxacine.

Les nouvelles quinolones dites « de quatrième génération », en complément du spectre d'activité des quinolones de troisième génération, ont une activité qui s'étend aux bactéries anaérobies.

Les quinolones sont des antibiotiques qui se présentent avec deux cibles moléculaires dont l'ADN et la topoisomérase. Ces antibiotiques possèdent une région qui se lie par liaison hydrogène à l'ADN bactérien. Il s'agit de la région de la molécule qui comporte le groupe carbonyle de la quinone. Cette molécule établit également une interaction spécifique avec les enzymes de type topoisomérase (Figure 6). Ce sont des enzymes qui permettent le déroulement de l'ADN pour sa transcription ou l'enroulement de l'ADN après sa transcription. Elles contrôlent donc plus loin la synthèse des protéines ou encore la division cellulaire de la bactérie. L'interaction des quinolones avec ces enzymes se fait par les radicaux qui jouxtent la quinone.

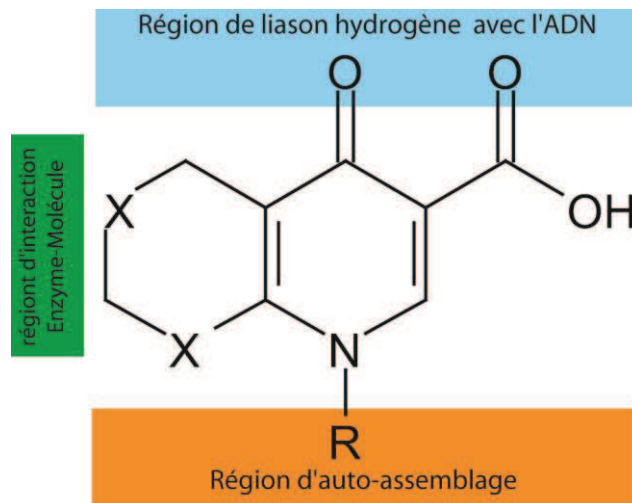


Figure 6: Régions fonctionnelles des quinolones

Selon plusieurs auteurs, les interactions entre ces antibiotiques avec l'ADN et les topoisomérases induisent la formation d'un complexe ternaire qui inhibe l'activité de l'enzyme impliquée dans cette réaction. Une cartographie de la structure chimique des quinolones qui met en évidence la relation structure-activité de ces antibiotiques a été donc établie (Figure 6) (Yoshida *et al.*, 1991; Mitscher *et al.*, 2003; Shen, 2003).

## II.2 Les résistances aux antibiotiques

Après une période de forte efficacité contre les maladies infectieuses, les antibiotiques se présentent de moins en moins efficaces face à certaines infections bactériennes. Dès 1940, juste après la découverte de la pénicilline, Abraham et Chain avaient mis en évidence l'existence de résistance à cet antibiotique chez *B coli* (*Escherichia coli*) (Abraham et Chain, 1940). Les bactéries s'adaptent aux antibiotiques et deviennent résistantes.

On distingue deux types de résistance bactérienne. La résistance naturelle et la résistance acquise.

### **II.2.1 La résistance bactérienne naturelle**

Si les antibiotiques, molécules naturelles, sont synthétisés par la plupart des micro-organismes pour supplanter d'autres micro-organismes dans un environnement donné, ces substances peuvent ne pas être actives sur tous les micro-organismes. On dira que ces micro-organismes ont une résistance naturelle vis-à-vis de cette molécule. La résistance naturelle à un antibiotique donné est un caractère présent chez toutes les souches de la même espèce (Courvalin *et al.*, 2001). C'est ainsi que, les bacilles à Gram négatif sont naturellement résistants aux antibiotiques hydrophobes car ces molécules ont des difficultés à passer la membrane externe de leur paroi. Les mycoplasmes, bactéries dépourvues de parois présentent une résistance naturelle aux  $\beta$ -lactames, puisque le mode d'action de cette famille d'antibiotique consiste à inhiber la synthèse du peptidoglycane (Normak et Normak, 2002).

### **II.2.2 La résistance acquise**

La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparaît au niveau des souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique. C'est l'acquisition d'un facteur génétique qui se traduit par une réduction de la sensibilité à la molécule qui lui était fatale. Elle peut donc se faire soit par mutation chromosomique soit par acquisition des gènes transférés d'un autre micro-organisme.

#### **II.2.2.1 Résistance par mutation chromosomique**

Les résistances bactériennes par mutation chromosomique sont induites par des modifications structurales pouvant se traduire soit par un problème de perméabilité à un ou plusieurs antibiotiques, soit en rendant les cibles spécifiques des antibiotiques indifférentes. La résistance chromosomique est un phénomène qui présente plusieurs caractères exceptionnels. Il s'agit premièrement de sa rareté puisqu'il intervient en moyenne tous les  $10^5$  à  $10^{10}$  divisions de la bactérie. Ensuite elle possède un caractère aléatoire car l'antibiotique n'est par une molécule mutagène donc n'induit pas de mutation chez la

bactérie. Cependant l'antibiotique participe à la sélection des bactéries mutantes. On note aussi son caractère spécifique (affecte un antibiotique ou une famille d'antibiotiques qui ont le même mécanisme d'action), son indépendance et son absence de transmissibilité (Courvalin *et al.*, 2001).

#### II.2.2.2 La résistance par acquisition de gènes

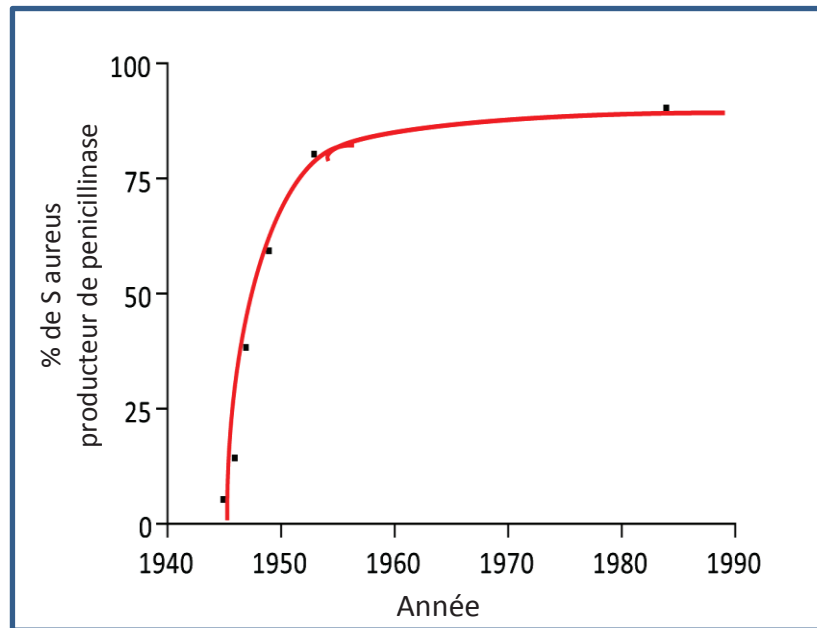
Il s'agit ici de la résistance par un gain d'ADN extra-chromosomique le plus souvent un plasmidique. Le plasmide est un fragment d'ADN extra-chromosomique (présent dans le cytoplasme) et qui peut porter un ou plusieurs gènes de résistance. Ces fragments d'ADN peuvent être transmis d'une bactérie donneuse à une autre bactérie dite receveuse ; cette transmission peut se faire entre deux espèces différentes de bactéries.

A travers ce mécanisme, on se trouve face à une facilité d'acquisition de résistance et même de multi-résistance contrairement à celle acquise par mutation d'ADN chromosomique. Ce mode d'acquisition de résistance peut se faire selon trois mécanismes différents dont la transduction (avec un bactériophage comme vecteur), la transformation (capture d'ADN par la bactérie) et la conjugaison (transfert de plasmide d'une bactérie à une autre qui peut être d'espèce différente) (Baudry et Brézellec, 2006).

#### **II.2.3 Evolution des bactéries résistantes aux antibiotiques**

Les différents modes d'acquisition des résistances donnent une idée de la fréquence de leurs apparitions ainsi que des activités qui les favorisent. L'acquisition de la résistance par le transfert des gènes est celle qui présente la fréquence la plus élevée. Les résistances bactériennes acquises par mutation chromosomique concernent 10 à 20% des souches isolées en clinique (Courvalin *et al.*, 2001). La combinaison de ces deux modes se traduit par une augmentation de la fréquence des résistances. Comme le présente la Figure 7, certains auteurs ont observé une augmentation rapide de la fréquence d'apparition des *Staphylococcus aureus* producteurs de la pénicillinase dès les années 1945 (Barber, 1947; Bush, 1997; Medeiros, 1997; Bush, 2004).





**Figure 7: Croissance rapide de production de pénicillinase par *Staphylococcus aureus* (Bush, 1997; Medeiros, 1997; Tankovic *et al.*, 1997; Bush, 2004)**

D'un pourcentage d'apparition de moins de 10% en 1945, cette valeur atteint environ 80% en 1955. Du fait de l'inefficacité des pénicillines sur les *Staphylococcus aureus*, d'autres familles d'antibiotiques ont dû être utilisées. Par conséquent, à côté de l'acquisition de cette résistance aux pénicillines, ces souches de *Staphylococcus aureus* ont acquis de nouvelles résistances aux antibiotiques, et sont devenues progressivement des souches multirésistantes. L'acquisition de ces résistances mixtes par ces souches déjà résistantes aux pénicillines a été mise en évidence par Tankovic (1997) dans leurs travaux à l'hôpital Henri Mondor sur la période de 1969 à 1995 (Figure 8). Toujours par le même principe, on observe des fréquences d'apparition de ces types de résistances de plus en plus élevées dans le temps. Le taux de résistance de cette bactérie (déjà résistante aux pénicillines) aux autres familles d'antibiotiques tel que les cyclines, les aminosides et les quinolones augmente également et atteint des valeurs proches de 100% sur cette période (Figure 8). On notera que ces résistances croisées sont apparues progressivement avec l'usage d'autres antibiotiques pour le traitement des infections aux *Staphylococcus aureus*. La bactérie n'a fait que s'adapter aux nouveaux types de traitement par l'addition des résistances.

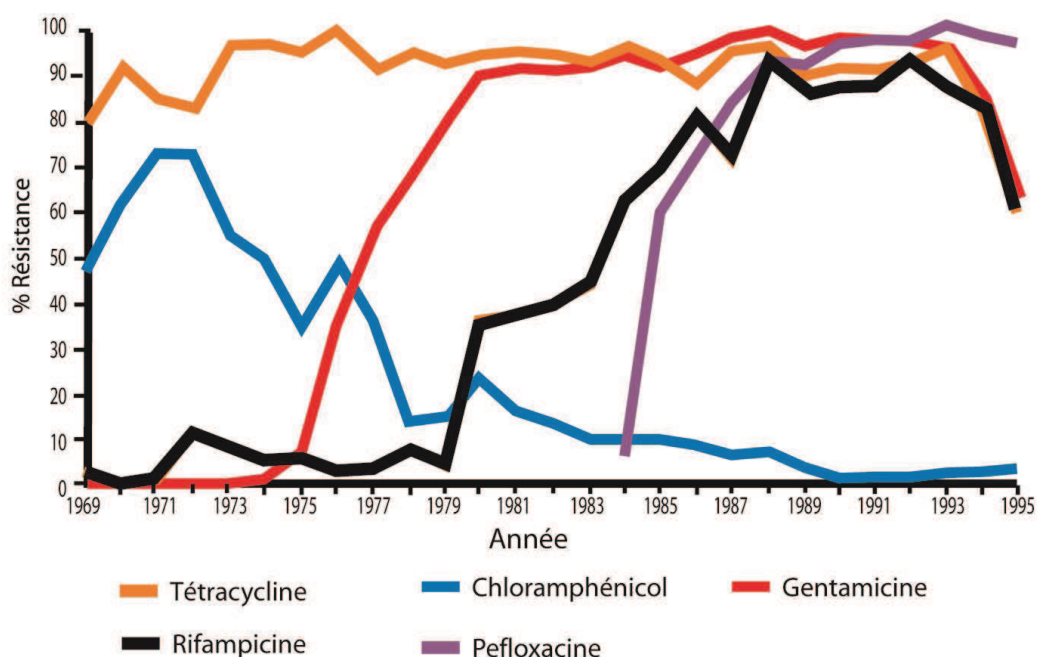


Figure 8: Evolution de la résistance de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthiciline à d'autres antibiotiques (Tankovic *et al.*, 1997)

L'addition des résistances des bactéries est de plus en plus observée et ce phénomène constitue une véritable inquiétude. Les bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques sont classées en fonction du nombre de famille d'antibiotiques n'ayant plus d'activité sur elles. Par ce mode de classification basé sur le phénotype des bactéries, on distingue les multirésistances de type MDR (MultiDrug resistant), XDR (Extensively Drug resistant) et PDR (Pandrug resistant).

Selon l'ECDC (European Center for Disease prevention and Control) (2011), les bactéries multirésistantes de type MDR se définissent comme résistantes à au moins trois familles différentes d'antibiotiques.

Les multirésistants de type XDR se caractérisent par leur sensibilité à une seule famille d'antibiotique préconisée pour leur traitement.

Enfin, les bactéries multirésistantes de type PDR sont résistantes à toutes familles d'antibiotiques disponibles (Magiorakos *et al.*, 2011). Toute bactérie multirésistante de type

PDR est aussi une bactérie qui remplit les critères des multirésistances de type XDR qui elles-mêmes font partie des MDR comme l'indique la Figure 9.

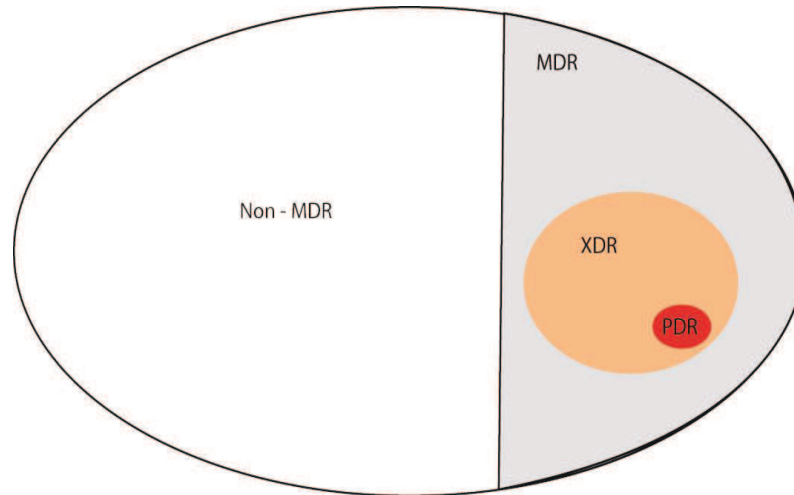


Figure 9: représentation des multirésistants de type PDR, XDR et MDR (Magiorakos *et al.*, 2011)

L'acquisition des gènes de multirésistance se fait majoritairement par transferts plasmidiques. Par ailleurs, il arrive que dans le cas d'une mutation chromosomique, la mutation affecte les porines et cela induit des résistances simultanées comme par exemple celles aux  $\beta$ -lactamines et aux aminosides chez des souches de *Pseudomonas aeruginosa*. On note aussi par ce même mécanisme des résistances simultanées aux  $\beta$ -lactamines, aux quinolones, au chloramphénicol et au triméthoprime au niveau des souches de *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp. et *Serratia* spp.

#### **II.2.4 Épidémiologie des résistances bactériennes**

Les fréquences d'apparition des résistances et multirésistances sont le plus souvent conditionnées par une utilisation accrue des antibiotiques. La pression de ces molécules exercée sur les flores bactériennes semble être à l'origine des émergences des résistances bactériennes (Shlaes *et al.*, 1997; Henriot et Guillemot, 2000; Jan *et al.*, 2000). De ce fait, sur la recommandation de l'OMS, des structures des surveillances des résistances aux antibiotiques ainsi que des comités sur le bon usage de ces molécules sont mis en places

dans la plupart des pays du monde. L'objectif de ces structures est de dresser périodiquement l'état des lieux des résistances bactériennes en vue de mieux adapter l'antibiothérapie.

#### II.2.4.1 Variabilité géographique des résistances

A partir de cet état des lieux, le premier constat est que les prévalences des résistances aux antibiotiques sont géographiquement variables et sont fonction des habitudes des populations locales telles que l'automédication, la consommation excessive des antibiotiques, les précautions contre les infections nosocomiales, la gestion des déchets hospitaliers, l'usage des antibiotiques dans l'élevage, etc. En Europe, la cartographie de l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) sur la résistance des *Staphylococcus aureus* à la méthicilline présente une prévalence dont les valeurs suivent un gradient du Nord vers le Sud selon la Figure 10 (Tiemersma et al., 2004).

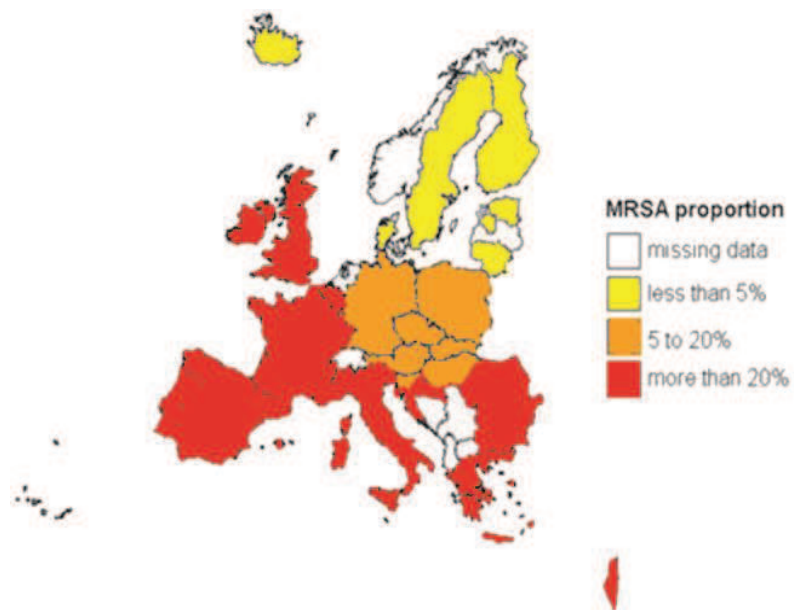


Figure 10: Prévalence des *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline en Europe (1990-1991)(Tiemersma et al., 2004)

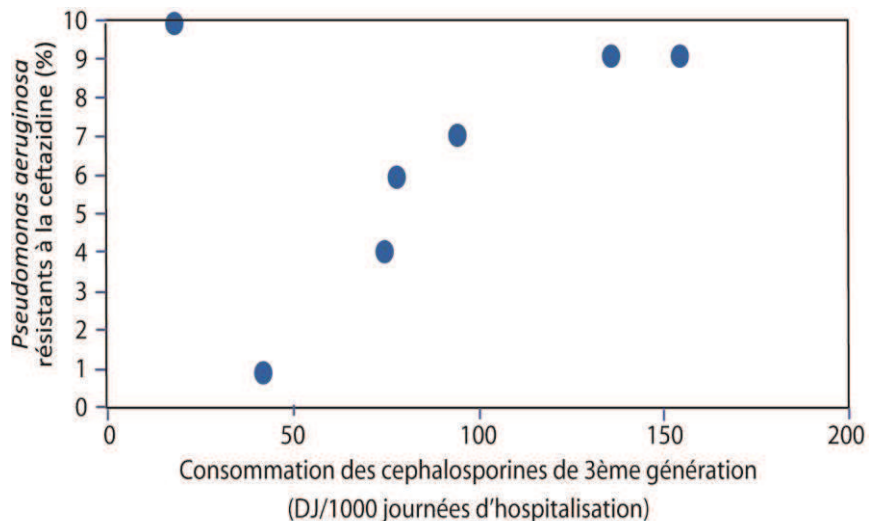
Cette variabilité des résistances bactériennes en fonction des régions impose une antibiothérapie géographiquement adaptée et raisonnée.

#### II.2.4.2 Impact de la consommation des antibiotiques

L'utilisation inadéquate des antibiotiques peut contribuer fortement à la mise en place des bactéries pathogènes résistantes dans un environnement donné. Ce constat a amené à identifier des gestes inappropriés qui favorisent ces événements. Ces gestes sont en général liés à l'emploi non approprié de ces molécules antimicrobiennes.

Le premier concerne la consommation accrue et inappropriée des antibiotiques. On note l'existence d'un paradoxe, plus les antibiotiques sont utilisés, plus ils perdent leur efficacité (Monnet, 2000). Leur utilisation excessive est identifiée comme contribuant à la mise en place des bactéries résistantes en particulier par utilisation non conforme. En France, on dénombre environ 80 millions de prescription d'antibiotiques en ville par année et on estime en même temps que 50% de ces prescriptions sont inappropriées (Choutet, 2003). Selon certains auteurs, la consommation d'antibiotiques par un patient suivant une posologie élevée sur une longue durée peut conduire à une probabilité élevée d'infection ou de colonisation de sa flore par des bactéries résistantes (McGowan, 1987). De même, une utilisation à dose insuffisante chez un patient induit également une probabilité élevée d'apparition de bactéries résistantes chez ce patient (Guillemot *et al.*, 1998).

La relation entre l'utilisation des antibiotiques et l'apparition des formes résistantes de bactéries a été mise en évidence à partir d'une étude du projet ICARE en collaboration avec huit hôpitaux aux Etats Unis d'Amérique. Cette étude a été effectuée sur l'évolution des *Pseudomonas* résistants à la ceftazidine en fonction de la consommation de cet antibiotique. La Figure 11 révèle une augmentation du pourcentage des *Pseudomonas aeruginosa* résistants à la ceftazidine (une céphalosporine de la troisième génération) avec les doses journalières pour mille journées d'hospitalisation dans les hôpitaux participants à ce projet (Monnet *et al.*, 1995).



**Figure 11: Pourcentage de *Pseudomonas aeruginosa* résistant à la ceftazidime dans huit hôpitaux américains participant au projet ICARE en fonction de la consommation de céphalosporines de troisième. DJ = dose journalière (Monnet *et al.*, 1995)**

La corrélation entre la consommation des antibiotiques et l'évolution des souches bactériennes résistantes a été également révélée lors d'une autre étude dans des hôpitaux des Etats-Unis. Il s'agit d'une étude qui met en évidence l'augmentation du taux des *Staphylococcus* initialement résistants à la méthicilline devenus résistants à la vancomycine après une consommation accrue de cet antibiotique (Schentag *et al.*, 1998). Ces observations ont également été faites sur l'évolution de la résistance à l'imipénème des *Klebsiella* initialement résistants aux céphalosporines en fonction de la quantité de cet antibiotique consommée (Rahal *et al.*, 1998).

D'autres formes d'utilisation des antibiotiques contribuent également à l'apparition des souches bactériennes résistantes. Il s'agit de l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire, en élevage agricole et en agriculture.

Leur utilisation en médecine vétérinaire présente des impacts aussi comparables à ceux rencontrés en médecine humaine. Cette utilisation chez les animaux est une pratique non négligeable car elle représente environ 40% de la consommation totale des antibiotiques. Ces molécules sont utilisées en élevage soit pour soigner les animaux infectés, soit pour prévenir ces infections. Ce dernier motif pousse les éleveurs à un usage systématique en absence d'infection microbienne puisque selon eux, les antibiotiques auraient des propriétés de « stimulateur de croissance » chez ces animaux (Guillot et Lafont, 1989).

Par ailleurs, l'utilisation de ces molécules en agriculture, bien qu'elle concerne très peu de familles d'antibiotiques, a un impact non négligeable sur l'environnement. Il s'agit d'une pratique qui représente 0,1% de la consommation totale des antibiotiques aux Etats Unis d'Amérique et concerne la streptomycine et un dérivé de la tétracycline. Malgré la faible quantité d'antibiotique utilisée, les micro-organismes du sol et de l'environnement y sont exposés (Andremont et Tibon-Cornillot, 2007). Par conséquent cette forme d'utilisation présente également un important risque de sélection de souches de plusieurs espèces bactériennes résistantes.

Quel que soit la forme d'utilisation des antibiotiques (médecine humaine, vétérinaire, en élevage ou en agriculture), une quantité de ces antimicrobiens se retrouve dans l'environnement (eaux usées, déversoirs et nappes souterraines). Aux Etats Unis d'Amérique, une étude effectuée sur des prélèvements d'eaux usées provenant de trente états a révélé la présence de vingt-deux antibiotiques différents à des concentrations de l'ordre du microgramme par litre (Kolpin *et al.*, 2002). En Côte d'Ivoire, une étude similaire a mis en évidence l'existence de 3 antibiotiques et d'autres produits pharmaceutiques dans des eaux usées et déversoirs d'Abidjan à des concentrations du même ordre de grandeur que celles de l'étude précédente (Kouadio *et al.*, 2009). Les quantités paraissent faibles mais selon certains auteurs seraient suffisantes pour sélectionner des formes résistantes de bactéries (Corpet *et al.*, 1989).

#### II.2.4.3 Epuisement de l'arsenal thérapeutique

Si les bactéries deviennent des multirésistants de type XDR ou PDR par rapport aux antibiotiques dont nous disposons, il est certain que de multiples cas d'impasses thérapeutiques s'imposeront à nous. Depuis quelques années, nous assistons à une diminution de la production de nouveaux antimicrobiens. Les firmes pharmaceutiques ont progressivement arrêté de mettre sur le marché de nouvelles molécules d'antibiotiques. Cette réduction a évolué régulièrement de 1980 à 2000 (Bush, 2004). La dernière apparition d'antibiotiques issus d'une nouvelle famille (différente de celles déjà décrites) est antérieure à l'année 1980 ; il s'agit de la « linézolide » (Leach *et al.*). La recherche en antibiothérapie n'est plus un investissement compétitif car, les cibles moléculaires au sein d'une bactérie deviennent de plus en plus difficiles à identifier (Andremont et Tibon-Cornillot, 2007).

D'autre part, la Valeur Net de Production (NPV) des antibiotiques est estimée à cent millions de dollars. Cette valeur est loin derrière celle des anticancéreux (trois cent millions de dollars), celle des médicaments du système nerveux central (sept cent vingt millions de dollars) et celle des médicaments du système musculo-squelettique estimé à 1 milliard cent cinquante millions de dollars (Wenzel, 2004).

De plus, la diminution de notre arsenal antimicrobien depuis les années 1980 conduit à une exposition des bactéries par l'antibiothérapie aux mêmes molécules sur une longue période.

La conséquence est que les bactéries, quel que soit l'antibiotique qui leur sera exposé pour les éliminer, finissent avec le temps par s'adapter soit par mutation chromosomique, ou soit par acquisition de gène de résistance contenu sur un matériel génétique extra-chromosomique. Pour toujours rester maître dans cette lutte contre les bactéries pathogènes et infectieuses, il faudrait avoir constamment une avance sur l'apparition des bactéries résistantes.

Selon la spirale de la résistance décrite par Carlet et collaborateurs (2004) (Figure 12), l'apparition de formes résistantes ou multirésistantes de bactéries suscite une certaine inquiétude chez les cliniciens et chercheurs. Cette inquiétude induit une réaction au niveau des industries pharmaceutiques pour développer de nouveaux antibiotiques efficaces sur la nouvelle forme bactérienne résistante. L'utilisation constante de cette nouvelle molécule induira systématiquement de nouvelles formes de résistance d'où une nouvelle inquiétude.



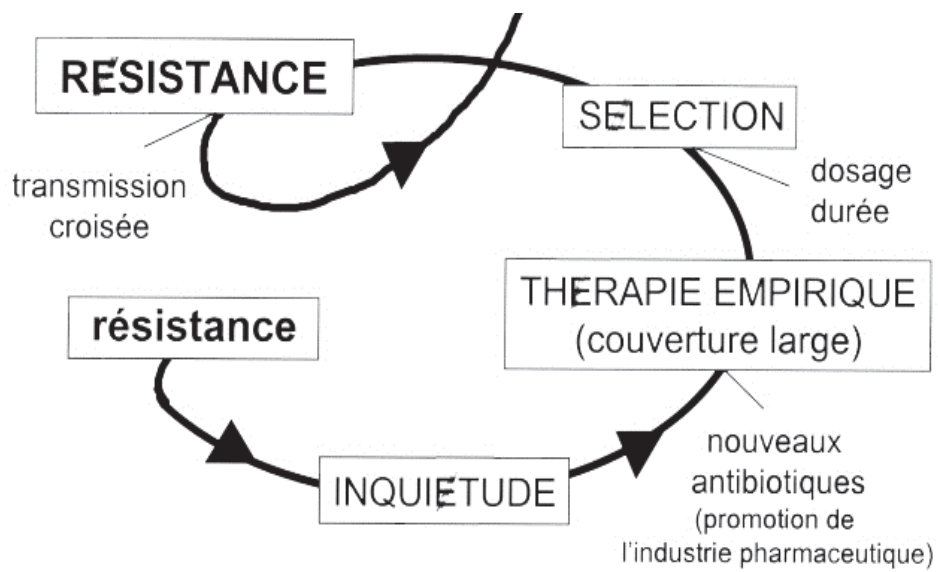


Figure 12: Spirale de la résistance de Carlet (Carlet *et al.*, 2004)

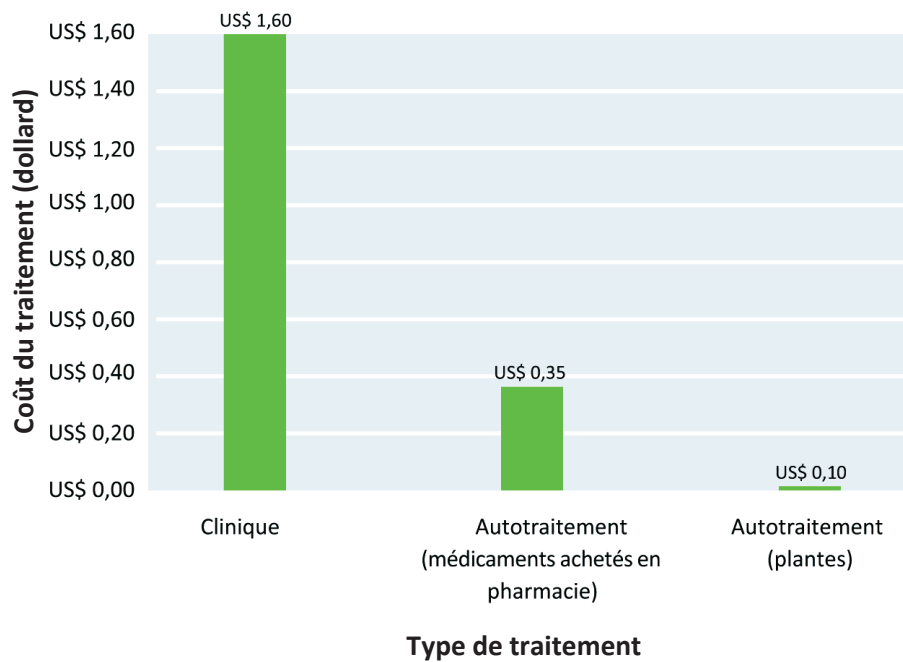
En attendant le développement et l'optimisation d'autres voies de lutte contre les pathogènes, il est clair qu'anticiper sur l'adaptation des bactéries ne peut se définir que par le renouvellement de l'arsenal thérapeutique des molécules antimicrobiennes. De ce fait, la recherche de ces molécules au niveau des plantes médicinales pourrait être une piste intéressante à développer.

### **III Lutte contre les pathogènes avec les plantes médicinales**

#### ***III.1 Introduction***

« La médecine traditionnelle est l'ensemble des connaissances, compétences et pratiques basées sur des théories, des croyances et des expériences auxquelles différentes cultures ont recours pour entretenir la santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, soulager ou soigner des maladies physiques et mentales » (WHO, 2002).

La médecine traditionnelle, aussi qualifiée de médecine complémentaire, alternative, non conventionnelle ou encore parallèle existe depuis des millénaires. Son apport dans la prise en charge des pathologies est reconnu. Aujourd'hui, cette médecine reste toujours très utilisée dans les pays en développement du fait de l'insuffisance et donc inaccessibilité des centres de santé modernes pour les populations des campagnes isolées mais également du fait du coût plus élevé de la prise en charge d'un patient par la médecine moderne comme indique la Figure 13. Selon une étude réalisée au Ghana (Afrique de l'Ouest) le traitement du paludisme par les plantes médicinales est trois fois moins onereux qu'une automédication par achat direct en pharmacie sans ordonnance et seize fois moins onereux qu'un traitement thérapeutique après consultation (Ahorlu, 1997).

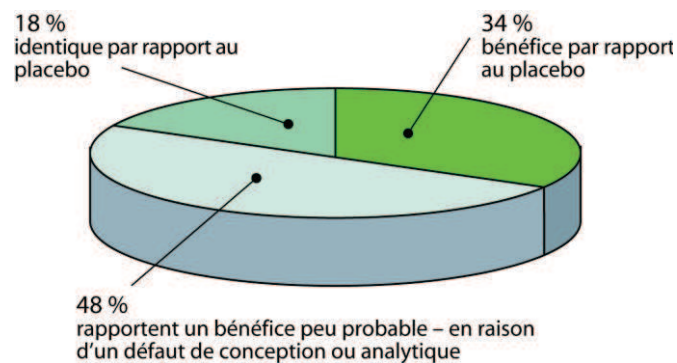


**Figure 13: Coût de traitement du paludisme par divers type de soins au Ghana (Ahorlu, 1997)**

On note également que, depuis les années 1990, cette médecine se développe à nouveau dans de nombreux pays « développés ».

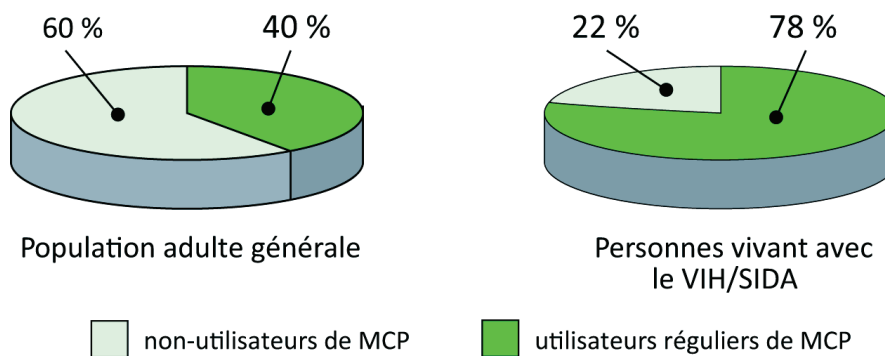
Les plantes représentent la matière première la plus exploitée dans la médecine traditionnelle. Elles sont utilisées entièrement ou en partie (un organe précis) pour leurs propriétés thérapeutiques en santé humaine ou animale.

Selon l'OMS, 80% des populations des pays en voie de développement ont recours aux plantes pour traiter divers problèmes de santé. Si ces « anciennes » pratiques ont continué d'exister jusqu'à aujourd'hui malgré la présence dominante de la médecine « moderne », c'est parce qu'elles enregistrent des succès thérapeutiques. C'est ainsi que l'OMS a mis en évidence leur efficacité à partir de 50 Essais Thérapeutiques Randomisés (ETR) issus des travaux de différents auteurs publiés par « Therapeutics\_letter ». (Therapeutics\_letter, 1998; WHO, 2002) (Figure 14).



**Figure 14: mise en évidence de l'efficacité de la médecine traditionnelle à partir de 50 ETR (WHO, 2002)**

Il arrive que certains patients aient recouru aux plantes médicinales (médecine traditionnelle) soit après une série d'échecs thérapeutiques avec la médecine moderne ou dans les cas où la médecine moderne se trouve dans une position d'impuissance (Figure 15). Selon cette étude présentée par l'OMS, 78% des personnes porteuses du VIH combinent médecine moderne et traditionnelle (Anderson *et al.*, 1993; Ostrow *et al.*, 1997; WHO, 2002).



**Figure 15: Recours à la Médecine Complémentaire Parallèle (MCP) par les patients vivant avec le VIH aux Etats Unis (Anderson *et al.*, 1993; Ostrow *et al.*, 1997; WHO, 2002)**

On note toujours dans la même étude que cette médecine complémentaire est exploitée par 40% de la population générale des adultes.

### ***III.2 Le potentiel antimicrobien des plantes médicinales***

Les plantes sont des êtres vivants qui utilisent la matière minérale et l'énergie du soleil pour produire de la matière organique. Ce processus permet à la plante de synthétiser dans une première étape des hydrates de carbones (les glucides) (Bruneton, 2009; Dewick, 2011). Ces glucides de faibles poids moléculaires (oses) sont utilisés pour la synthèse de métabolites primaires nécessaires pour la survie. Il s'agit de glucides complexes (l'amidon, la cellulose, les pectines ...), des acides aminés (pour la synthèse de protéines), et d'acides gras.

Ces métabolites primaires sont exploités par l'homme et les animaux pour leur alimentation et apports énergétiques. Par ailleurs, l'homme les utilise également dans le domaine médical pour la fabrication d'excipients tels les oses édulcorants, les polysaccharides dans la fabrication des comprimés ou encore pour l'obtention d'émulsions et autres... Certains de ces métabolites primaires servent aussi de molécules thérapeutiques.

A partir des oses et des métabolites primaires, la plante synthétise une grande variété de métabolites dits secondaires, plus complexes.

Aujourd'hui, plusieurs de ces phytomolécules ont déjà été décrites mais un grand nombre reste encore mal connu et non caractérisé. Ces composés constituent les principes actifs des plantes médicinales exploités dans la médecine traditionnelle.

En se basant sur leurs structures chimiques, ces phytomolécules issues des métabolites secondaires sont classées en quatre grands groupes chimiques : composés phénoliques, alcaloïdes, terpènes et autres constituants (dérivés simples des métabolites primaires).

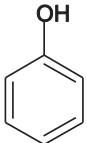
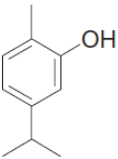
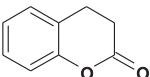
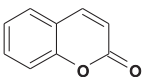
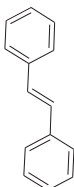
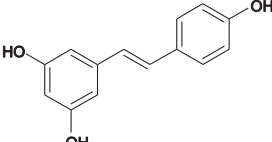
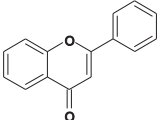
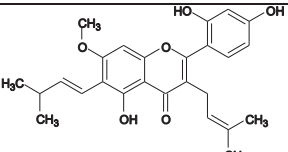
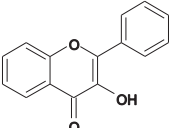
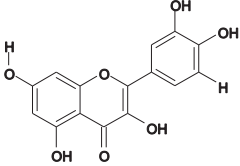
#### ***III.2.1 Les composés phénoliques***

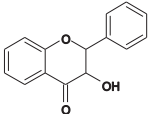
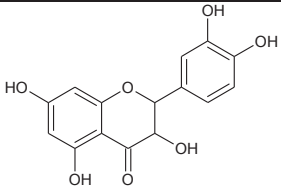
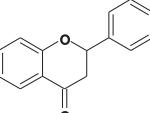
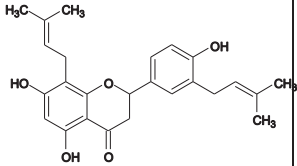
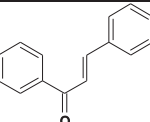
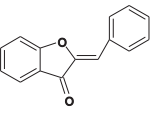
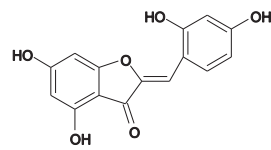
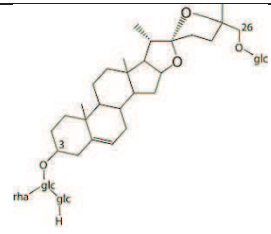
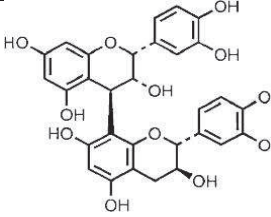
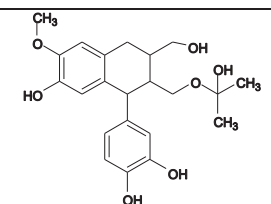
Les composés phénoliques regroupent un grand nombre de substances chimiques qui possèdent au moins un noyau aromatique. Ce noyau porte une ou plusieurs fonctions alcool (groupement hydroxyle). Les phytomolécules phénoliques ont des structures allant des plus simples (acide gallique) aux plus complexes (les tanins). Les composés phénoliques

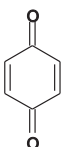
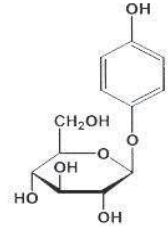
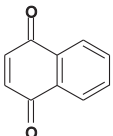
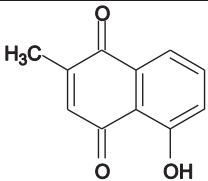
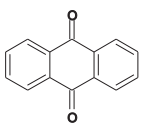
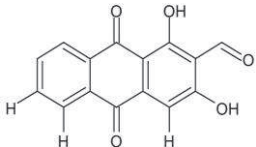
possèdent de nombreuses activités biologiques dont des activités antimicrobiennes (Rath *et al.*, 1995; Xiang *et al.*, 2008; Jankittivong *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2011; Basli *et al.*, 2012).

On peut classer les polyphénols en fonction de leur voie de biosynthèse. On distingue ainsi les phénols simples, les coumarines, les stilbènes, les flavonoïdes, les saponines, les lignanes, les quinones... Le Tableau 3 présente les différents groupes de composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne décrite.

**Tableau 3: Classification des composés phénoliques à activité antimicrobienne**

Groupe	Sous-groupe	Structure de base	Exemple d'antimicrobien	Origine et références
Phénol simple			 Carvacrol	antifongique, isolé de <i>Satureja hortensis</i> L. (Pauli, 2006)
Coumarine				Antiparasitaire et antibactérien, isolé de <i>Amburama cearensis</i> (Fleurentin, 2002; Hassan <i>et al.</i> , 2008)
stilbènes			 Resveratrol	Antifongique, isolé de <i>Polygonum cuspidatum</i> (Docherty <i>et al.</i> , 2001; Kukrić et Topalić-Trivunović, 2006)
flavonoïdes	Flavone		 Artocarpin	antibactérien isolé de <i>Artocarpus heterophyllus</i> (Sato <i>et al.</i> , 1996)
	Flavonone		 Quercetin	antiparasitaire, isolé de <i>Morinda morindoides</i> (Cimanga <i>et al.</i> , 2006)

	Flavonol			antibactérien isolé de <i>Mimusops elengi</i> L (Hazra <i>et al.</i> , 2007)
	Flavanone			antibactérien isolé de <i>Flemingia strobilifera</i> (Madan <i>et al.</i> , 2008)
	Chalcone			antiparasitaires
	Aurone			antibactérien isolé de <i>Dunalia spinosa</i> (Erazoa <i>et al.</i> , 2008)
			Dunaurone	
Saponines				antibactérien, isolé de <i>Avena sativa</i> L (Bahraminejad <i>et al.</i> , 2008)
			Avenacoside A	
Tanins				antibactérien, isolé de <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L (Ho <i>et al.</i> , 2001)
			Procyanidin B	
Lignanes				antibactérien, isolé de <i>Taxus baccata</i> (Erdemoglua <i>et al.</i> , 2004)
			3-dimethylisolariciresinol-9-hydroxyisopropylether	

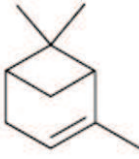
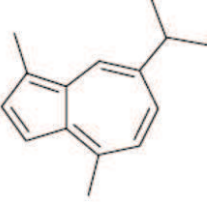
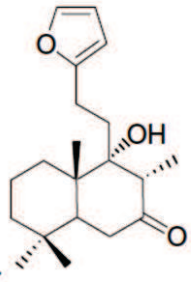
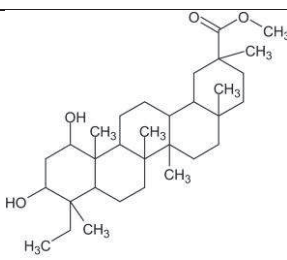
Quinones	Benzoquinone			antibactérien, isolé de <i>Pyrus</i> spp (Jin et Sato, 2003)
	Naphtoquinone			antibactérien, isolé de <i>Plumbago zeylanica</i> L. (Jeyachandran <i>et al.</i> , 2009)
	Anthraquinone			antifongique, isolé de <i>Morinda lucida</i> (Rath <i>et al.</i> , 1995)

### III.2.2 Les terpènes et stéroïdes

Les terpènes sont des huiles essentielles de nombreuses plantes.. Ils sont volatils et constituent la résine et les essences des plantes. C'est le cas de l'essence de térébenthine isolée à partir de la résine de pin. Sur le plan structural, les terpènes sont des dérivés de l'isoprène (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). Leur nomenclature et leur classification se font en fonction du nombre d'unités isopréniques qui constituent la molécule. Des activités antimicrobiennes des terpénoïdes ont été mises en évidence (Oussou *et al.*, 2004; Bourkhiss *et al.*, 2007; Goetz et Ghedira, 2012). On les classe en monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes et caroténoïdes dont des exemples de structures antimicrobiennes isolées chez certaines plantes sont présentées par le Tableau 4.



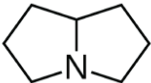
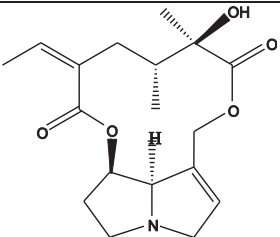
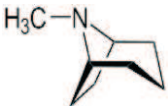
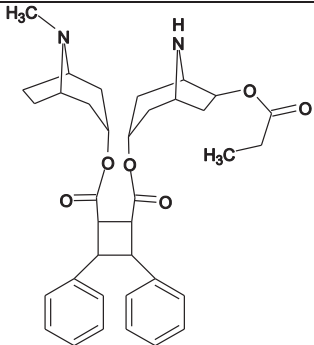
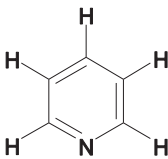
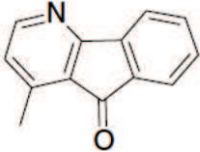
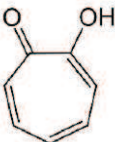
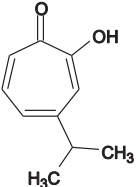
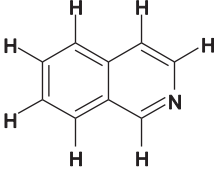
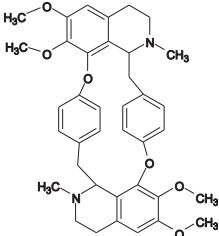
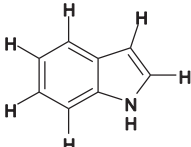
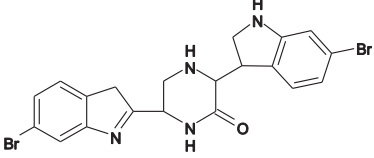
Tableau 4: Classification des terpènes

Sous-groupe	Structure de base	Exemple d'antimicrobien	Origine et références
Monoterpène	$C_{10}H_{16}$	 $\alpha$ pinène	antifongique isolé de <i>Pinus sylvestris</i> L. (Pauli, 2006; Amarti et al., 2010)
Sesquiterpènes	$C_{15}H_{24}$	 Guaiazulene	antifongique, isolé de <i>Callitris intratropica</i> (Pauli, 2006)
Diterpènes	$C_{20}H_{32}$	 Hispanolone	antifongique, isolé de <i>Ballota saxalitiss</i> (Citoglu et al., 1998)
Triterpènes	$C_{30}H_{48}$	 Hydroxyimberbic acid glycosides	antibactérien et antifongique, isolé de <i>Combretum imberbe</i> (Katerere et al., 2003)

### III.2.3 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent une vaste famille de composés chimiques dont la structure comporte au moins un hétérocycle azoté. Ce sont des composés qui présentent plusieurs activités pharmacologiques telles qu'analgésique (la morphine), antimicrobienne (imidazole, chloroquine, quinine), anticancéreux (vinblastine, vincristine). Ils sont des précurseurs de nombreux médicaments. On les divise en sous-groupes structuraux que sont les tropanes, les pyrrolizidines, les pyridines, les tropolones, les isoquinoléines, les indoles, les purines, les imidazoles et les alcalamines (Tableau 5).

Tableau 5: Tableau de classification des alcaloïdes

Classes	Structures de bases	Exemple	Origine et références
Les pyrrolizidines		 Senecionine	antibactérien, isolé du genre <i>Senecio</i> (Mandić <i>et al.</i> , 2009)
Les tropanes		 Mooniine A	antifongique, isolé d' <i>Erythroylum mooni</i> (O'Hagan, 2000)
les pyridines		 Onychine	antifongique, isolé de <i>Cleistopholispatens</i> (Hufford <i>et al.</i> , 1987)
Tropolone		 Hinokitiol	antibactérien, isolé de <i>T. dolabrata</i> SIEB. (Morita <i>et al.</i> , 2003)
Les isoquinoléines		 Cycleanine	antibactérien, isolé d' <i>Albertisia villosa</i> (Lohombo-Ekomba <i>et al.</i> , 2004)
Les indoles		 Hamacanthin B	antibactérien (Oh <i>et al.</i> , 2006)

### **III.3 les plantes médicinales du genre *Morinda***

#### **III.3.1 Introduction**

Appartenant à la famille des Rubiacées, le genre *Morinda* comporte environ 80 espèces décrites. Elles se présentent sous la forme d'arbres, d'arbustes et de lianes. Les caractéristiques botaniques communes à de ce genre d'espèces sont décrites par « l'encyclopédie méthodique ou par ordre de matière » selon la description morphologique qui suit :

Ces rubiacées ont des fleurs agrégées, sessiles et réunies en une tête globuleuse sur un réceptacle commun. Leur calice est composé d'une seule pièce robuste et petite. La corolle est monopétale, tubuleuse avec une forme presque en entonnoir. Les espèces de ce genre ont cinq étamines en filament très courts, insérées à l'orifice d'un tube. Les anthères sont linéaires, droites et à peine saillantes. Les ovaires adhèrent au tube du calice, le style est simple, filiforme et le stigmate est bifide (De Monet De Lamarck et Poiret, 1793).

Razafimandimbison et collaborateurs (2009) ont établi un arbre phylogénétique par la méthode bayésienne à partir de la combinaison des données des régions nrETS/nrITS/trnT-F de l'ADN. Cet arbre a mis en évidence des similitudes entre les espèces du genre *Morinda* avec celles des autres genres de la tribu des *Morindaea* (Figure 16). Son étude a permis de déterminer les limites phylogénétiques entre les genres de cette tribu.

Les espèces du genre *Morinda* se répartissent dans les zones tropicales du globe (Figure 17). Parmi les espèces que comporte ce genre, certaines sont connues pour les phytomolécules thérapeutiques qu'elles synthétisent. Par exemple, le jus du fruit de *Morinda citrifolia* connu aux Etats unis sous l'appellation de « Tahitian Noni » est approuvé comme complément alimentaire en diététique (Phakhodee, 2012).

Ayant connaissance de leurs vertus thérapeutiques, les populations locales utilisent ces espèces pour traiter plusieurs pathologies. La plupart des plantes médicinales du genre *Morinda* exploitées sont issues de l'Asie et de l'Afrique mises à part les espèces comme *Morinda royoc* et *Morinda muscosa* qu'on trouve sur le continent américain. La Figure 17 présente la distribution géographique mondiale de quelques espèces médicinales. Ces

plantes sont généralement utilisées comme des antifongiques, des antibactériens, des anti-inflammatoires, des anticancéreux, des antiparasitaires, des analgésiques (Lv *et al.*, 2001; Mian-Ying *et al.*, 2002; Jasril *et al.*, 2003; Pawlus *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2007; Ruksilp *et al.*, 2011). Selon Baker (1947), le botaniste Scott Eliot rapporte que *Morinda morindoides* est une plante connue en Sierra Leone pour son efficacité contre la fièvre. La décoction des feuilles permet de traiter les troubles gastriques.

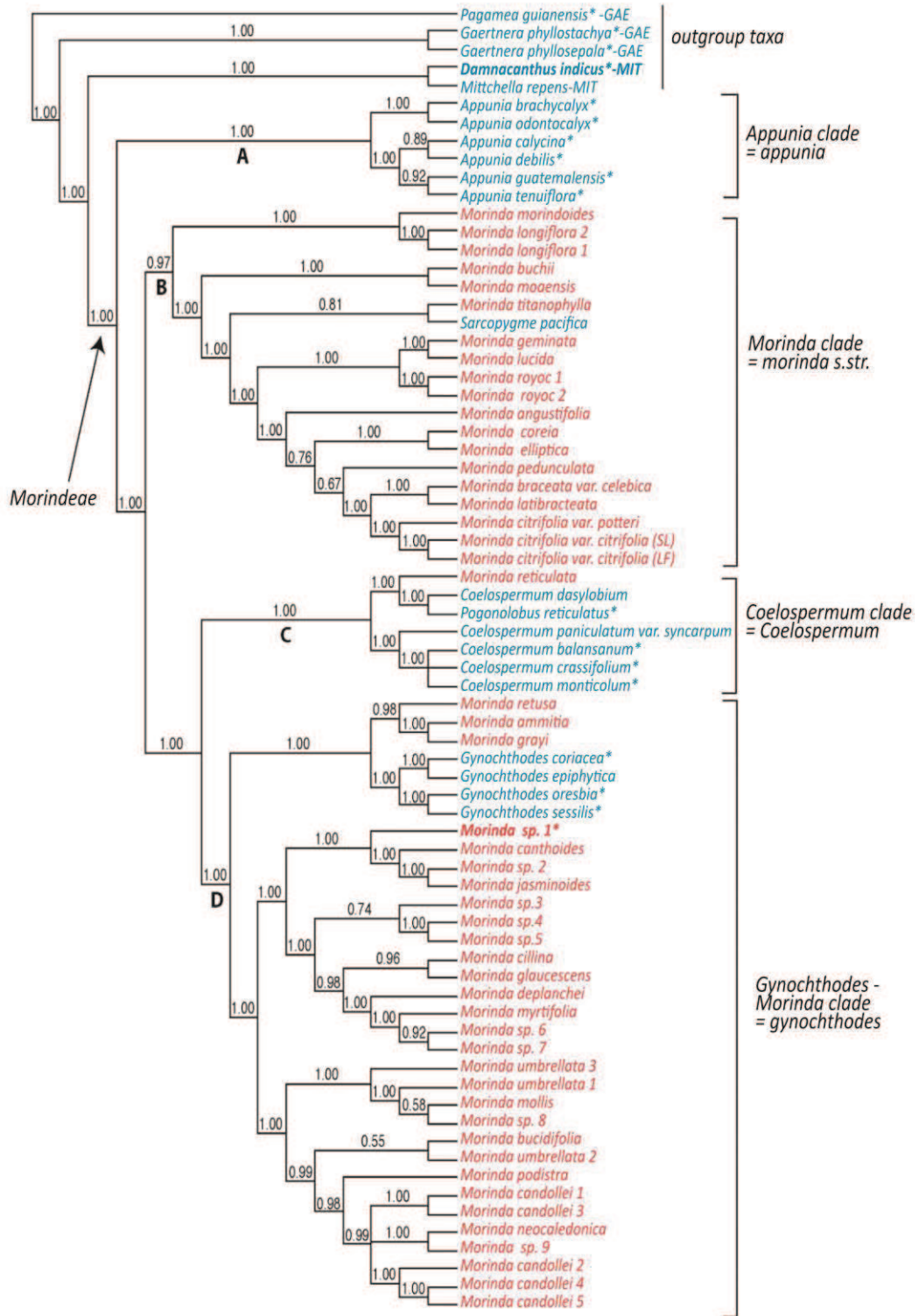
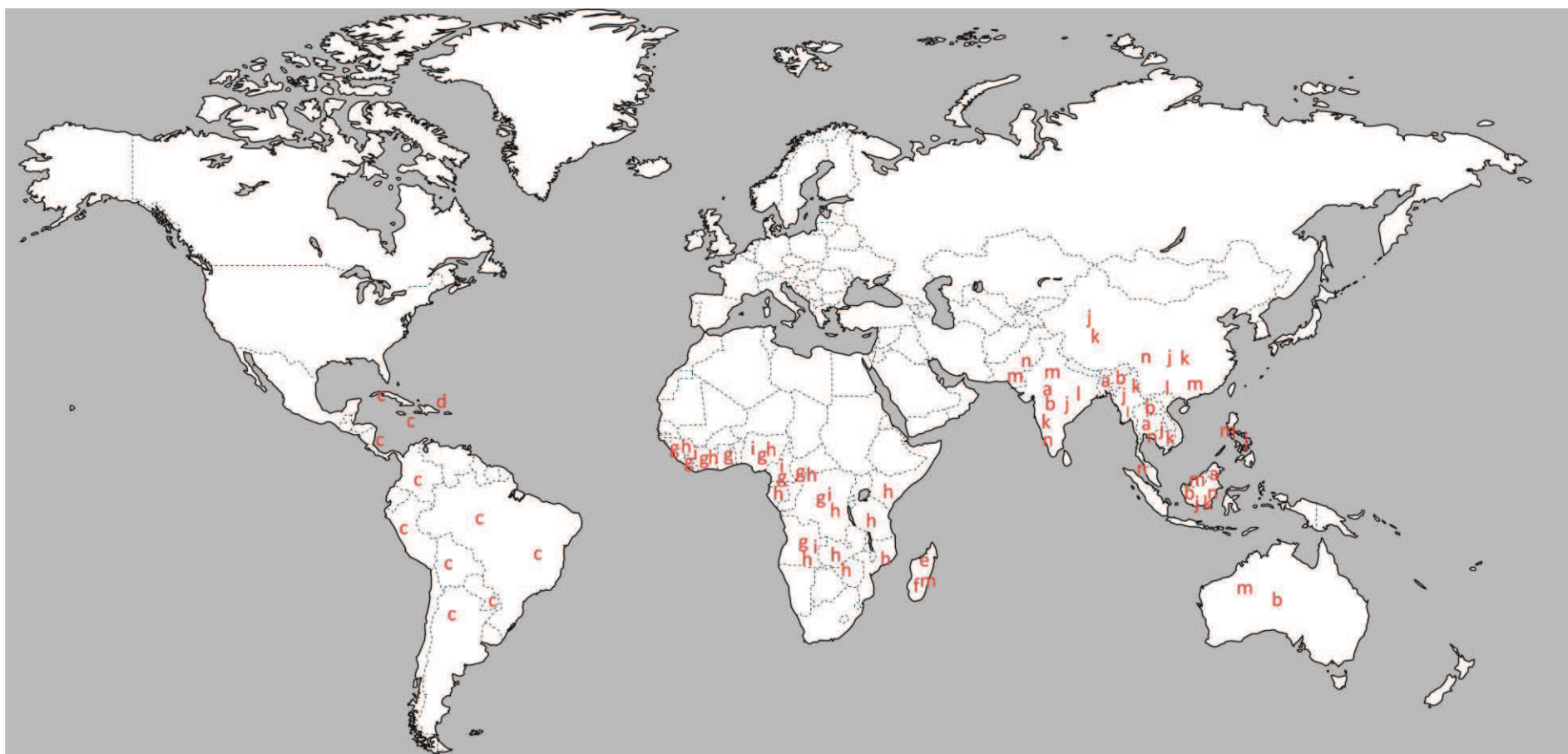


Figure 16: Arbre phylogénétique de quelques espèces du genre *Morinda* (Razafimandimbison *et al.*, 2009)



**Figure 17: Distribution des espèces du genre *Morinda* exploitées comme plante médicinale**

**a** : *Morinda umbellata* (De Monet De Lamarck et Poirer, 1793; Ban *et al.*, 2013)     
**b** : *Morinda citrifolia* (De Monet De Lamarck et Poirer, 1793; Peter et Richard, 2001)     
**c** : *Morinda royoc* (De Monet De Lamarck et Poirer, 1793; Borroto *et al.*, 2008)     
**d** : *Morinda muscosa* (De Monet De Lamarck et Poirer, 1793)     
**e** : *Morinda axillaris* (De Monet De Lamarck et Poirer, 1793)  
**f** : *Morinda retusa* (De Monet De Lamarck et Poirer, 1793) **g** : *Morinda morindoides* (Baker, 1947; Cimanga *et al.*, 1999)     
**h** : *Morinda lucida* (Peter et Richard, 2001)     
**i** : *Morinda longiflora* **j** : *Morinda officinalis* (Balch, 2002)     
**k** : *Morinda pandurifolia* (Merrill, 1936)     
**l** : *Morinda elliptica* (Ali *et al.*, 2000; Chong *et al.*, 2005)     
**m** : *Morinda sp* (Vercauteren *et al.*, 1998)     
**n** : *Morinda angustifolia* (Peter et Richard, 2001)

### **III.3.2 Les phytomolécules issues du genre *Morinda***

Les différentes espèces de *Morinda*, comme toutes plantes médicinales sont exploitées à partir des extraits des différents organes (feuilles, tige, racines et les fruits) de la plante en fonction de la pathologie à traiter.

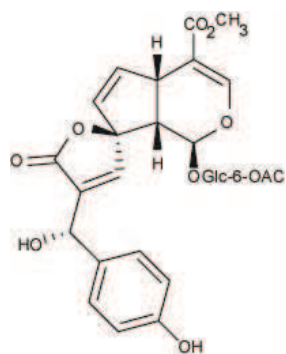
Les investigations phytochimiques faites sur les plantes du genre *Morinda* ont révélé des groupes chimiques caractéristiques pour chaque organe. A partir des différents extraits des organes de ces plantes, des sucres, des flavonoïdes, des iridoïdes, et des anthraquinones ont été isolés.

Les groupes qui se dégagent, sont soit des anthraquinones, en abondance au niveau des racines, soit des flavonoïdes et iridoïdes au niveau des feuilles, tiges et fruits (Phakhodee, 2012).

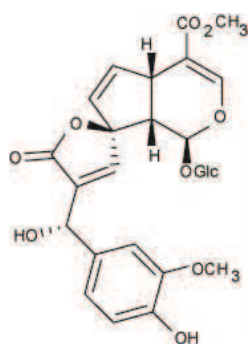
#### III.3.2.1 Les iridoïdes du genre *Morinda*

Les iridoïdes sont des métabolites secondaires synthétisés par un grand nombre de végétaux. Leur structure est monoterpénique. Ces molécules sont aussi des métabolites intermédiaires pour la biosynthèse des alcaloïdes. Sur le plan structural, ils sont composés d'une chaîne de cyclopentane qui est associée à un hétérocycle à oxygène à 6 chaînons. Une quarantaine d'iridoïdes ont été isolés des espèces du genre *Morinda*. Elles proviennent des espèces *M citrifolia*, *M morindoides*, *M elliptica* et *M coreia*. Ces composés sont isolés des fruits, feuilles et tiges de ces espèces. Les activités antimicrobiennes, antioxydantes et cytotoxiques ont été révélées au niveau de ces composés.

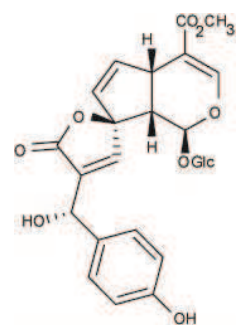
Parmi ces iridoïdes décrits, on note la Gaertneroside, la 6 Acetyl-Gaertneroside, la Methoxy-Gaertneroside, la 6-Acéthyl-methoxy-Gaertneroside et la Dehydro-methoxy-Gaertneroside (Figure 18) isolées des feuilles de *Morinda morindoides* dont les activités antimicrobiennes ont été évaluées sur *Plasmodium falciparum* (Cimanga *et al.*, 2002; Tamura *et al.*, 2010).



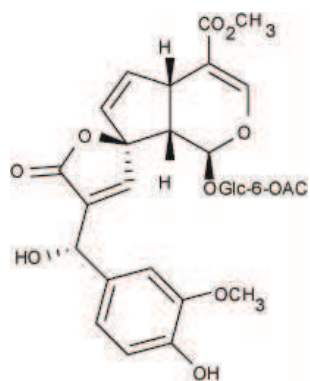
6 Acetyl-Gaertneroside



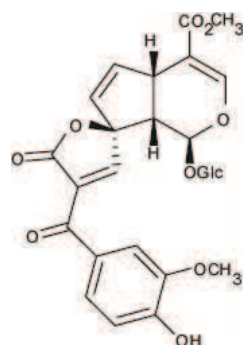
Methoxy-Gaertneroside



Gaertneroside



6 Acéthylmethoxy Gaertneroside



Dehydromethoxy-Gaertneroside

**Figure 18 : Iridoïdes antimicrobiens isolés du genre *Morinda***

### III.3.2.2 Les flavonoïdes issus du genre *Morinda*

Des flavonoïdes ont été isolés principalement des feuilles et fruits de *Morinda morindoides* et de *Morinda citrifolia*.

Parmi une quarantaine de flavonoïdes isolés de ces plantes, on dénombre 15 molécules pour lesquelles l'activité antimicrobienne (antiparasitaire) a été mise en évidence (Figure 19).

Ce sont des molécules anti *Plasmodium falciparum* isolées des feuilles de *Morinda morindoides* (Cimanga et al., 2006).



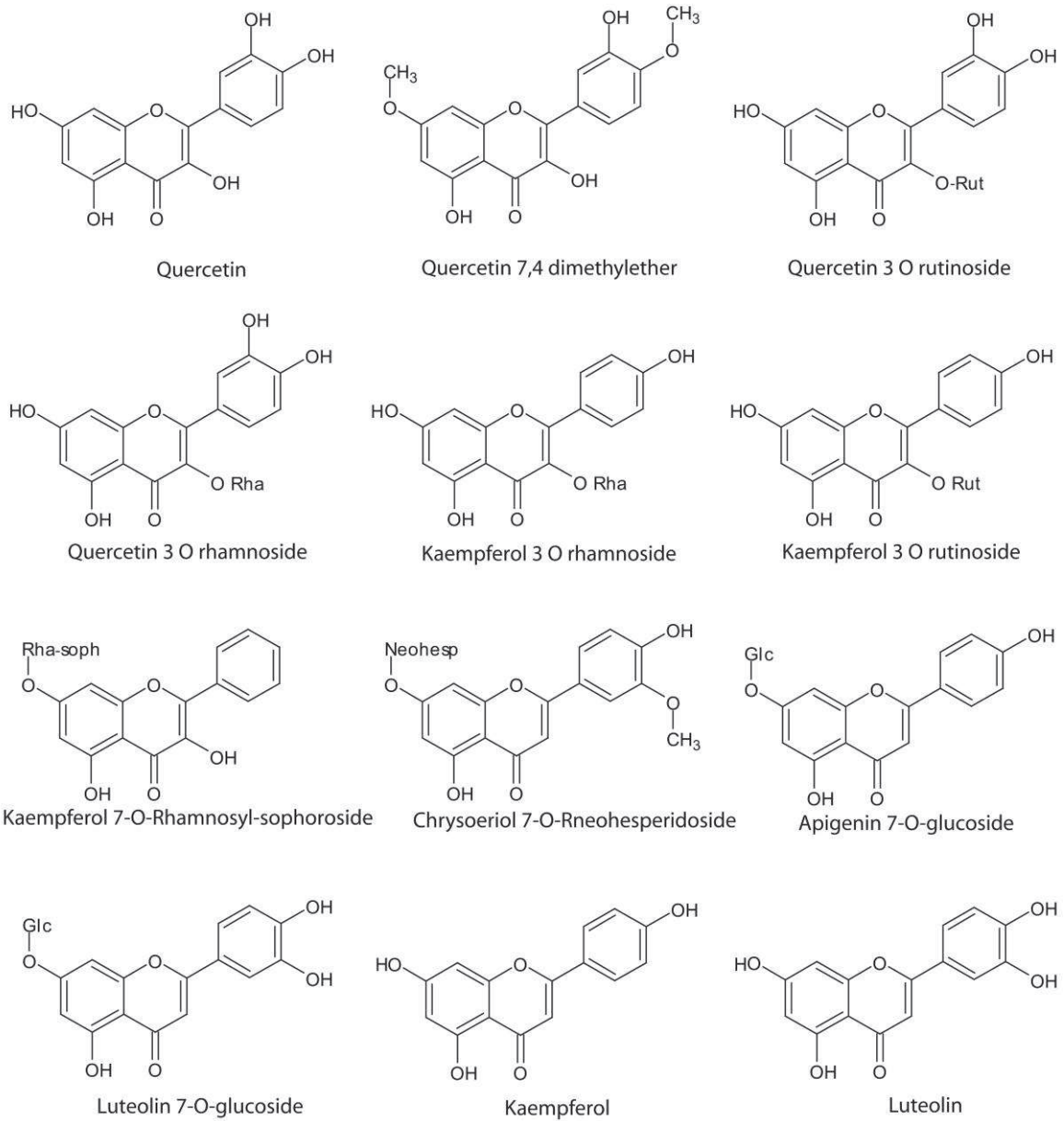
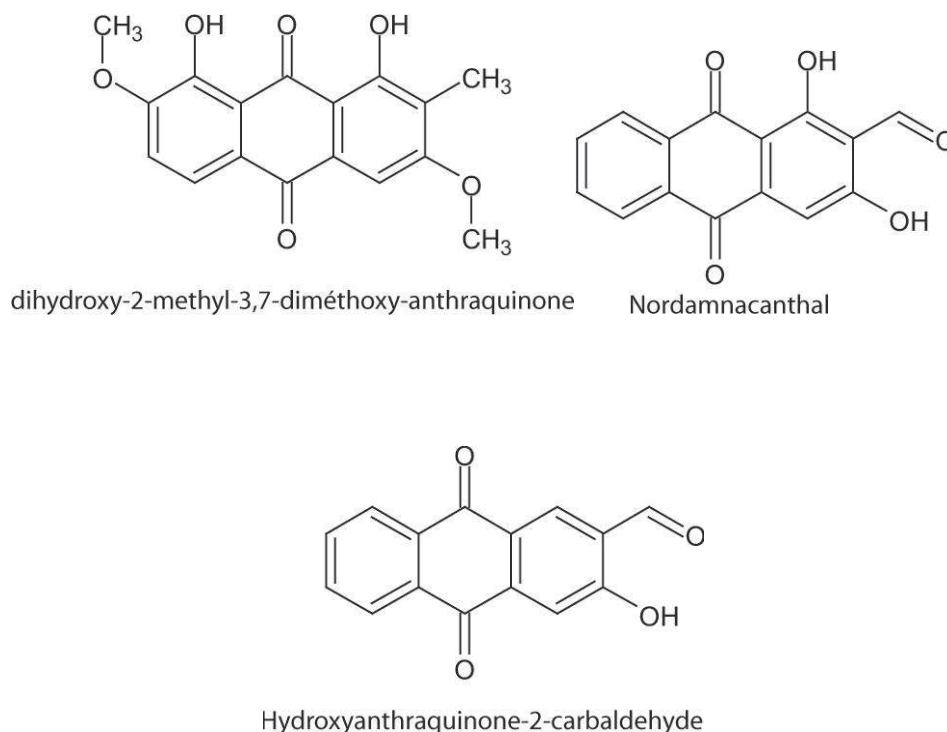


Figure 19: Flavonoides antimicrobiens issus du genre *Morinda*

### III.3.2.3 Les anthraquinones antimicrobiennes décrites du genre *Morinda*

Les anthraquinones sont des molécules issues de la famille chimique des composés aromatiques dérivés de l'antracène. Ces molécules constituent des métabolites secondaires de nombreux végétaux et ont des caractéristiques pigmentaires. Les anthraquinones synthétisées par les plantes sont très variées et possèdent une grande gamme d'activités biologiques. Certains de ces composés sont utilisés pour traiter des troubles gastriques, les infections bactériennes et présentent des activités anticancéreuses. Aujourd'hui, une centaine de ces composés aromatiques ont été isolés principalement des racines des espèces du genre *Morinda*. Certaines ont fait l'objet de test d'activités antimicrobiennes dont la dihydroxy-2-méthyl-3,7-diméthoxy-anthraquinone (Xiang *et al.*, 2008), la nordamnacanthal et l'hydroxy-anthraquinone-2-carbaaldehyde (Rath *et al.*, 1995) présentées par la Figure 20.



**Figure 20: Anthraquinones antimicrobiennes issues du genre *Morinda***

Selon Phakhodee (2012) on dénombre plus d'une centaine de phytomolécules isolées de quelques espèces du genre *Morinda*. Parmi tous ces composés décrits, on compte une vingtaine de molécules qui ont fait l'objet de test d'activités antimicrobiennes. Il s'agit des activités antibactériennes, antifongiques, antivirales et antiparasitaires. Pour les autres, bien qu'il n'y ait pas eu de description sur leurs potentiels antimicrobiens, on retient que quelques unes de ces phytomolécules seraient susceptibles de présenter des activités antimicrobiennes de par leur structure chimique.

La synthèse des différentes études effectuées sur ces rubiacées montre que certaines espèces restent encore non étudiées ou étudiées que partiellement. L'espèce qui a fait l'objet de plus d'étude est *Morinda citrifolia* dont plusieurs phytomolécules ont été isolées des feuilles, des tiges, des racines des fruits et des graines. En ce qui concerne les autres espèces, les études ont été faites soit uniquement sur les feuilles comme pour *Morinda morindoides*, ou uniquement sur les racines.

## **Chapitre II :**

# **Résistance bactérienne aux antibiotiques**

## **Chapitre II : Résistance bactérienne aux antibiotiques : état des lieux au CHU de Treichville de 2000 à 2011**

L'introduction des antibiotiques en thérapeutique a révolutionné le traitement des maladies infectieuses. Malheureusement, nous sommes aujourd'hui rattrapés par la résistance aux antibiotiques. Effectivement, depuis ces trente dernières années, l'antibiorésistance préoccupe bon nombre de cliniciens. Progressivement, les infections sont devenues difficiles à traiter et nous assistons de plus en plus à des impasses thérapeutiques.

Dans la plupart des pays, des outils tels que les conférences de consensus sur le bon usage des antibiotiques et les commissions du médicament dans les CHU utilisent sur les connaissances de l'écologie microbienne des services pour définir un usage raisonné des antibiotiques. Ainsi, le traitement par l'antibiothérapie s'appuie sur des données épidémiologiques actualisées et géographiquement adaptées (Bajaj *et al.*, 1999).

La présente étude s'inscrit dans le cadre d'une enquête épidémiologique consistant à faire un état des lieux des résistances bactériennes à Abidjan. Nous nous sommes intéressés aux Examens Cytobactériologiques des Urines (ECBU), analyses les plus effectuées dans les laboratoires de bactériologie médicale et les plus impliquées dans les prescriptions des antibiotiques (Asseray *et al.*, 2002). Effectuées au Centre Hospitalier et Universitaire de Treichville de mars 2000 à décembre 2011, ces analyses ont été exploitées pour suivre localement l'évolution des résistances bactériennes aux antibiotiques.

## **I Matériel et Méthodes**

De mars 2000 à décembre 2011, soit près de 12 années de recueils, le Laboratoire central du Centre Hospitalier et Universitaire de Treichville (Abidjan-Côte d'Ivoire) a analysé 12 175 échantillons d'urine. Ils proviennent des patients en consultation ou hospitalisés dans les différents services de cet hôpital. Les résultats de ces examens de routines consignés dans les archives du laboratoire ont été exploités pour cette étude.

### ***I.1 Les examens Cytobacteriologie des urines***

Les ECBU de routine dans ce centre hospitalier ont été effectués d'abord par un examen cytologique. Il s'agit d'une analyse directe sur 100 $\mu$ l d'urine qui consiste à énumérer au microscope à faible grossissement des leucocytes, des hématies, des cellules du revêtement urothélial et des cristaux. Les résultats obtenus sont ramenés à 1ml d'urine et permettent de réaliser le premier diagnostic d'une possible infection urinaire. Un aspect qualitatif des éléments contenus dans l'urine est par la suite effectué. Après une centrifugation de 5 ml d'urine, une coloration de Gram est réalisée sur les culots des urines qui présentent plus de 10<sup>4</sup> leucocytes par ml. Ce test a pour but de différencier les bactéries ou encore d'identifier d'éventuelles levures. Ces observations orientent le choix des milieux d'isolement pour les examens bactériologiques.

L'examen se poursuit ensuite par une analyse bactériologique qui à l'aide d'un inoculateur (anse calibrée), 10 $\mu$ l de l'échantillon d'urine sont ensemencés en stries d'épuisement sur une gélose CLED (Cystine-Lactose-Electrolyte-Déficient) qui permet la croissance de la plupart des germes uropathogènes dont les bacilles à Gram négatif, les entérocoques et les staphylocoques. Des milieux d'isolement plus sélectifs sont aussi utilisés en fonction des résultats du test direct qualitatif. La sélection des entérobactéries est faite sur les géloses Drigalski, MacConkey ou EMB (Eosine Bleu de Méthylène). Les cocci à Gram positif sont sélectionnés sur une gélose au sang supplémentée avec de la colistine. En cas de présence de levures, une gélose Sabouraud est utilisée pour leur isolement.

Les isolats bactériens sont par la suite identifiés par leurs caractères biochimiques à partir de la réalisation d'une galerie (API 20).

Une fois les micro-organismes uropathogènes identifiés, ces tests de sensibilité aux différents antibiotiques est effectuée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (Soussy *et al.*, 2000).

A partir d'une culture de 18-24 h sur une gélose nutritive, une suspension bactérienne en bouillon Mueller-Hinton est préparée avec une densité ajustée au standard McFarland 0,5 (soit  $10^8$  UFC/ml). Cette suspension est diluée au centième puis est ensemencée par inondation sur une gélose Mueller Hinton. La gélose inoculée est séchée pour éliminer toute trace d'eau puis les disques d'antibiotiques sont délicatement déposés sur cette gélose. La boîte est incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Les antibiotiques sont issus des diverses familles dont les céphalosporines (céfuroxime, céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone); les penicillines (amoxicilline, piperacilline); monobactame (aztréonam); bêtalactamine + inhibiteur (amoxicilline/acide clavulanique); les quinolones (norfloxacine, ofloxacine, pefloxacine, acide nalidixique), les aminosides (gentamicine, netilmicine, tobramycine), les tétracyclines (minocycline, tétracycline); inhibiteurs du cycle de l'acide folique (triméthoprime/sulfaméthoxazole); la fosfomycine; les lipopeptides (polymyxine b); et le chloramphénicol. Des tests de contrôle des disques d'antibiotiques sont faits avec des souches de référence *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pour vérification de la conformité du test.

Après incubation, le diamètre de la zone d'inhibition formée autour des disques est mesuré puis comparé aux valeurs critiques « d » et « D » de chaque disque d'antibiotique. Cette comparaison permet de considérer la bactérie uropathogène comme résistante à l'antibiotique si le diamètre mesuré est inférieur à la valeur critique « d », ou sensible lorsqu'il est supérieur ou égal à la valeur critique « D ». Si le diamètre est compris entre les deux valeurs critique « d » et « D », la bactérie sera considérée comme de sensibilité intermédiaire (CA-SFM, 2012) et un autre antibiotique sera préféré dans la mesure du possible.

## ***1.2 Traitement des données et analyses statistiques***

Les informations concernant chaque échantillon d'urine ainsi que les résultats des analyses de routine ont été traités par un logiciel de surveillances épidémiologiques et des résistances aux antibiotiques fourni par l'OMS (WHONET 5.6) (Cullen *et al.*, 2011; O'Brien et Stelling, 2011).

La comparaison des fréquences de résistance aux différents antibiotiques entre les souches communautaires isolées et celles des souches issues des patients hospitalisés a été effectuée par le test du Khi deux ( $\chi^2$ ) (Tagajdid *et al.*, 2008). Classiquement, une différence avec un p inférieur à 0,05 est retenue comme significative. Le test de Cochran-Armitage a été utilisé pour l'étude du suivi de l'évolution des pourcentages de résistance aux antibiotiques dans le temps avec aussi un niveau de significativité inférieur à 5%.



## II Résultats

### II.1 Epidémiologie des infections urinaires

L'ECBU des 12.175 échantillons d'urine a relevé la présence d'infections bactériennes pour 3.058 échantillons soit 25,11% des échantillons analysés. A partir de ces derniers, 3.064 germes bactériens ont été isolés et identifiés. La liste de ces agents infectieux et leur proportion sont présentées dans le Tableau 6.

On note que 59,59% des germes isolés proviennent des patients ambulatoires. *Escherichia coli* constitue la bactérie dominante. Cette bactérie est responsable de 39,7% des infections issues des patients hospitalisés et de 60,8% des infections communautaires.

**Tableau 6: Listes des micro-organismes uropathogènes isolés**

Micro-organisme	Nombre de souches	Isolats issus des patients hospitalisés	Isolats communautaires
<i>Escherichia coli</i>	879 (28,69%)	345 (39,25%)	534 (60,75%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	534 (17,43%)	150 (28,09%)	384 (71,91%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	456 (14,88%)	221 (48,46%)	235 (51,54%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	307 (10,02%)	136 (44,30%)	171 (55,70%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	248 (8,09%)	87 (35,08%)	161 (64,92%)
<i>Acinetobacter sp.</i>	176 (5,74%)	80 (45,45%)	96 (54,55%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	163 (5,32%)	75 (46,01%)	88 (53,99%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	124 (4,05%)	47 (37,90%)	77 (62,10%)
<i>Enterobacter sp.</i>	83 (2,71%)	37 (44,58%)	46 (55,42%)
<i>Proteus mirabilis</i>	80 (2,61%)	50 (62,50%)	30 (37,50%)
<i>Salmonella sp.</i>	12 (0,39%)	6 (50,00%)	6 (50,00%)
<i>Salmonella Typhi</i>	2 (0,07%)	(0,00%)	2 (100,00%)
<b>Total</b>	<b>3064 (100,00%)</b>	<b>1234 (40,27%)</b>	<b>1830 (59,73%)</b>

### II.2 Résistance aux différents antibiotiques étudiés

La moyenne des pourcentages de résistance aux différents antibiotiques entre les souches communautaires et hospitalières est présentée dans le Tableau 7. Cette comparaison des

pourcentages de résistance est effectuée sur toutes souches confondues d'une part et sur l'espèce *Escherichia coli* d'autre part.

**Tableau 7: Comparaison des pourcentages de résistance des souches communautaires à celles issues des hospitalisés**

			Toutes les souches confondues					<i>Escherichia coli</i>				
Antibiotique classe	Antibiotique surclasse	antibiotique	Nosocomiales		Communautaires		p (test $\chi^2$ )	Nosocomiales		Communautaires		p (test $\chi^2$ )
			Nbre	%R	Nbre	%R		Nbre	%R	Nbre	%R	
Cephems	Céphalosporine II	Céfuroxime	715	37,90%	918	29,19%	< 0,001	222	22,07%	320	18,13%	0,256
		Céfotaxime	410	13,90%	567	14,81%	0,688	135	6,67%	222	12,16%	0,095
	Céphalosporine III	Ceftazidime	694	15,56%	889	13,50%	0,246	240	8,75%	350	10,86%	0,402
		Ceftriaxone	100	21,00%	187	11,76%	0,037	43	16,28%	91	8,79%	0,199
Pénicillines	Aminopenicillines	Amoxicilline	328	78,96%	574	75,78%	0,276	92	84,78%	164	85,37%	0,810
	Ureidopenicillines	Piperacilline	178	38,76%	247	26,72%	0,009	53	47,17%	80	26,25%	0,013
Beta-lactam+Inhibiteur		Amoxicilline/ Acide clavulanique	480	48,75%	541	43,44%	0,089	151	41,72%	161	34,16%	0,169
Quinolones	Fluoroquinolones	Norfloxacine	156	28,21%	164	26,22%	0,690	45	24,44%	37	27,03%	0,790
	Fluoroquinolones	Ofloxacine	137	27,74%	260	20,00%	0,080	37	24,32%	65	21,54%	0,746
	Fluoroquinolones	Pefloxacine	165	25,45%	251	16,33%	0,023	44	36,36%	58	15,52%	0,015
	Quinolones	Acide nalidixique	199	48,74%	210	35,71%	0,008	64	42,19%	65	33,85%	0,329
Aminoglycosides		Gentamicine	227	17,18%	422	9,00%	0,002	69	17,39%	153	7,19%	0,021
		Netilmicine	811	3,08%	1121	4,19%	0,203	248	1,21%	327	2,14%	0,398
		Tobramycine	99	15,15%	117	10,26%	0,278	28	17,86%	24	12,50%	0,593
Tétracyclines		Minocycline	188	56,38%	280	47,86%	0,070	59	52,54%	78	50,00%	0,768
		Tétracycline	82	73,17%	85	76,47%	0,623	26	73,17%	24	75,00%	0,095
Inhibiteurs du cycle de l'acide folique		Trimethoprime/ Sulfamethoxazole	314	81,85%	395	77,97%	0,203	93	84,95%	114	78,95%	0,268
Fosfomycine		Fosfomycine	75	10,67%	166	18,07%	0,144	24	4,17%	48	6,25%	0,716
Lipopeptides	Polymyxines	Polymyxine B	216	12,04%	207	12,56%	0,870	76	6,58%	101	8,91%	0,569
Monobactams		Aztréonam	186	12,90%	191	14,14%	0,726	65	7,69%	62	8,06%	0,938
Phénicolé		Chloramphénicol	276	55,80%	488	44,67%	0,003	85	49,41%	150	41,33%	0,231

Nbre = nombre ; %R = pourcentage de résistance

### **-Résistance aux $\beta$ -lactamines**

Parmi les céphalosporines étudiées, la céfuroxime, une céphalosporine de deuxième génération, présente moins d'efficacité que celles de la troisième génération avec des taux de résistance évalués à 37,9% et 29,2% pour respectivement les isolats issus des patients hospitalisés et en consultation. Ce constat est le même pour les souches d'*Escherichia coli* puisqu'on remarque qu'elles sont plus résistantes à la céfuroxime qu'aux autres céphalosporines étudiées (la céfotaxime, la ceftazidime et la ceftriaxone).

Au niveau des pénicillines, parmi celles étudiées (l'amoxicilline et la pipéracilline) on note un fort taux de résistance à l'amoxicilline, soit 79% pour les souches nosocomiales et 75,8% pour les communautaires. Ces valeurs sont un peu plus élevées pour cet antibiotique avec *Escherichia coli* dont 85%.

Bien que les taux de résistance à la pipéracilline des isolats nosocomiaux soient également plus élevés, cet antibiotique est plus efficace que l'amoxicilline.

Par ailleurs, l'association Amoxicilline / Acide clavulanique présente aussi des taux de résistance supérieurs à ceux de la piperacilline aussi bien chez *Escherichia coli* que pour toutes les souches confondues.

### **-Résistance aux quinolones**

Parmi les quinolones présentes dans cette étude, l'acide nalidique (quinolone de première génération) présente un taux de résistance supérieur à ceux des autres fluoroquinolones étudiés que sont la norfloxacin, l'ofloxacin et la pefloxacin (des quinolones de seconde génération). Ces taux pour les souches issues des patients hospitalisés et externes sont respectivement de 48,7% et 35,7% avec une différence significative par le test du khi deux. La même tendance est observée chez *Escherichia coli* avec des valeurs de 42,19% et 33,5%.

### **-Résistance aux aminoglycosides**

Pour toutes les souches confondues, le pourcentage de résistance aux aminoglycosides étudiés (la gentamicine, la netilmicine et la tobramycine) est inférieur à 20%. L'antibiotique le plus efficace parmi de cette classe est la netilmicine avec 3,0% de résistance pour les souches nosocomiales et 4,2% au niveau des souches communautaires. Mais cette différence reste non significative. Par contre, la gentamicine présente un taux de résistance des souches nosocomiales supérieur à celui des communautaires.

Ces observations sont semblables pour l'étude ciblant les souches d'*Escherichia coli*, qui sont encore plus sensibles à la netilmicine avec des pourcentages de résistance de 1,21% (souches nosocomiales) et 2,14% (souches communautaires).

### **-Tendance de la résistance**

Au cours des années 2000 à 2011, le suivi de l'évolution des résistances a été réalisé pour certains antibiotiques (l'amoxicilline, la céfuroxime, la ceftazidime, la céfotaxime, la gentamicine, la netilmicine et le chloramphénicol). Les résultats de cette étude effectuée sur toutes souches confondues d'une part et sur *Escherichia coli* d'autre part sont présentés par la Figure 21.

A partir du test de tendance de Cochran-Armitage, l'évaluation de la tendance des pourcentages de résistance dans le temps informe d'une diminution de la résistance au chloramphénicol de façon globale sur toutes les souches confondues avec une valeur de p de 0,049. Le gain d'efficacité de cet antibiotique s'observe aussi sur les souches d'*Escherichia coli* (p =0,026). Il en est de même pour la gentamicine sur les souches d'*Escherichia coli* (p = 0,0014).

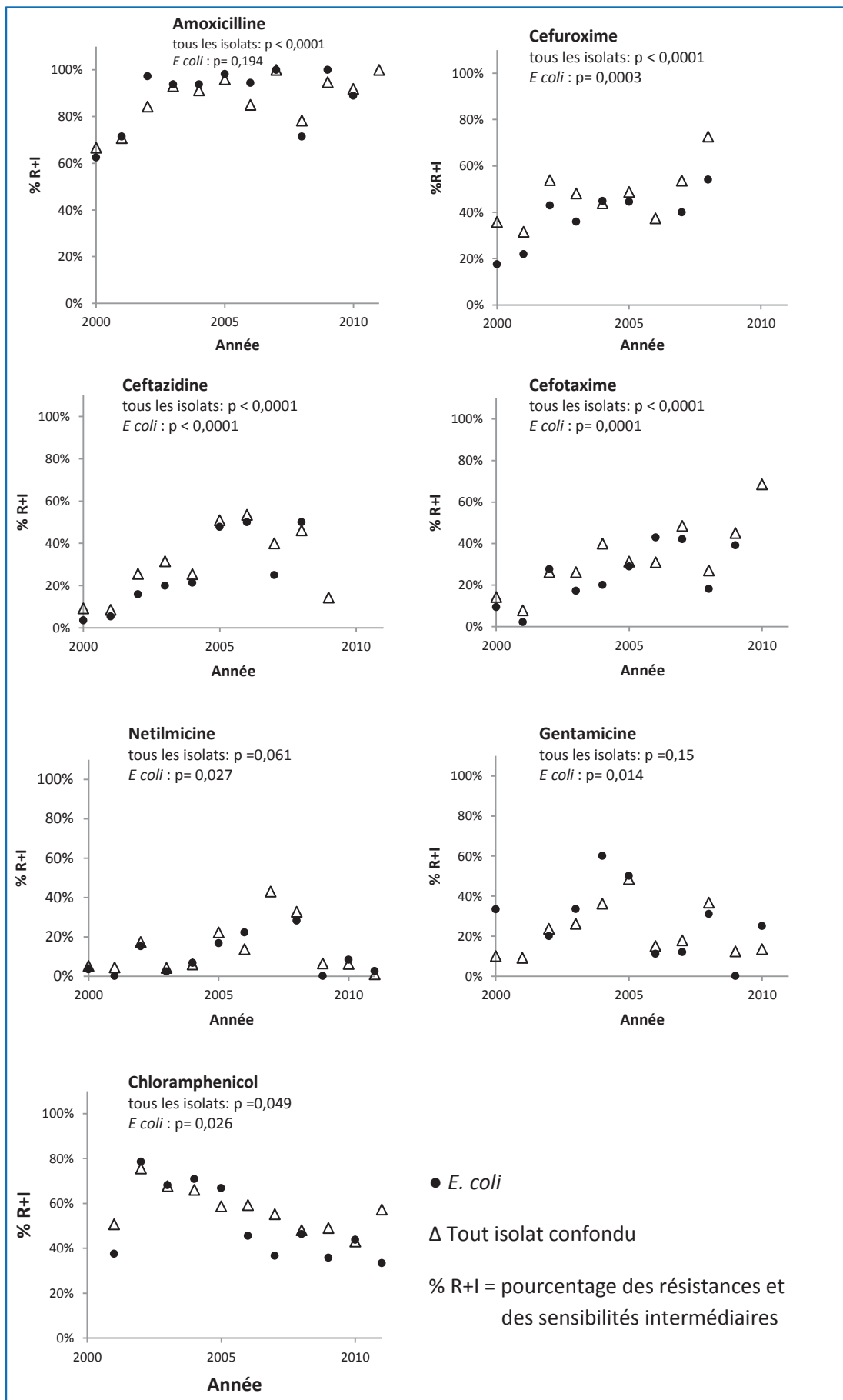


Figure 21: Evolution de la résistance à certains antibiotiques avec le test de tendance de Cochram-Armitage

On note toutefois que certains antibiotiques perdent de leur efficacité dans le temps. Il s'agit en outre de la totalité des céphalosporines (céfotaxime, céftazidine, céfuroxime) et l'amoxicilline dont le pourcentage de résistance, tout isolat confondu, croit au fil des années.

L'étude effectuée sur *Escherichia coli* montre qu'en plus des céphalosporines, on note avec la nétilmicine un taux de résistance qui augmente significativement dans le temps

### ***III.3 Souches multi-résistantes***

L'analyse des profils de résistance des différents isolats par le logiciel WHONET 5.6 a permis d'identifier la présence de souches multi-résistantes. En fonction de leur phénotype, ces différentes souches sont classées comme des multirésistants MDR (multiple Drug-Resistant) ou XDR (Extensively Drug-Resistant) ou encore PDR (Pandrug-Resistant) selon les critères décrits par European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Magiorakos *et al.*, 2011).

Parmi les 3 064 souches uropathogènes isolées, on dénombre 596 souches multi-résistantes de type MDR soit 19,41%. Il s'agit des souches résistantes à au moins trois classes d'antibiotiques habituellement utilisées pour leur traitement. A partir des souches MDR identifiées, on note 420 souches à potentiel XDR correspondant à 13,68% des isolats totaux. Ces souches multi-résistantes XDR sont caractérisées par leur résistance à toutes les classes d'antibiotiques exceptée. Parmi les XDR, on dénombre 78 souches à potentiel PDR soit 2,54% de la totalité des isolats.

En ce qui concerne les souches d'*Escherichia coli* isolées, sur un effectif total de 883, on a identifié 127 souches (14,38%) MDR dont 80 à potentiel XDR (9,06%) qui contiennent 11 à potentiel PDR soit 1,25%.

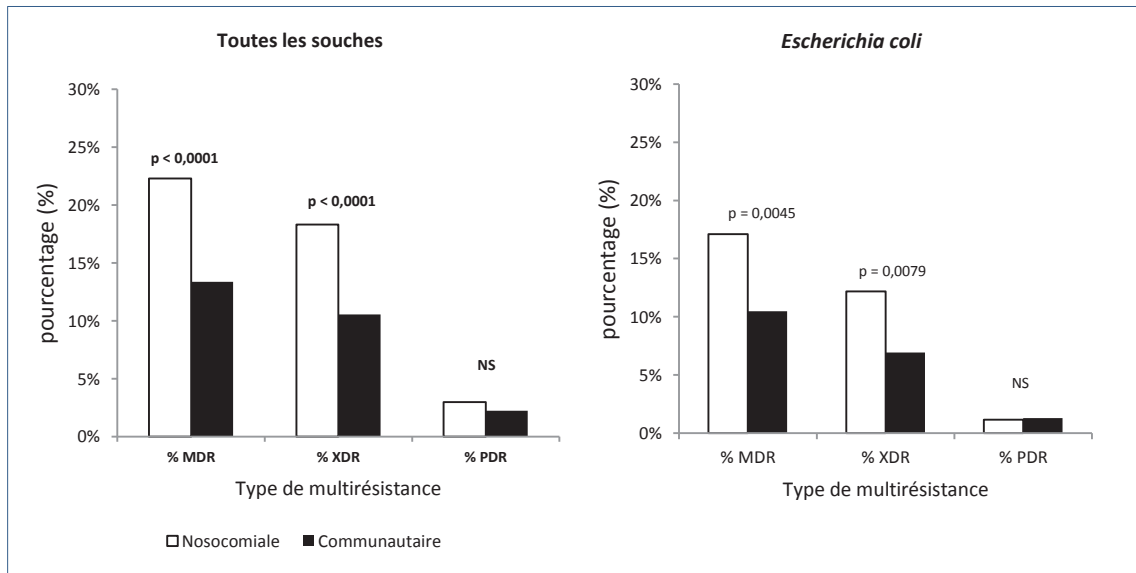
Le Tableau 8 présente les proportions des types de multi-résistants isolés au niveau de chaque espèce de microorganisme isolé

**Tableau 8: Proportion des multi-résistants au niveau de chaque espèce isolée**

Isolats	Nombre total	MDR	XDR	PDR
<i>Escherichia coli</i>	879	127 (14,38%)	80 (9,06%)	11 (1,25%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	534	32 (5,98%)	21 (3,93%)	8 (1,50%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	456	106 (23,14%)	71 (15,50%)	14 (3,06%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	307	62 (20,20%)	45 (14,66%)	9 (2,93%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	248	61 (24,60%)	41 (16,53%)	11 (4,44%)
<i>Acinetobacter sp.</i>	176	59 (33,52%)	40 (22,73%)	15 (8,52%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	163	59 (36,20%)	48 (29,45%)	5 (3,07%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	124	44 (35,48%)	33 (26,61%)	4 (3,23%)
<i>Enterobacter sp.</i>	83	30 (36,14%)	28 (33,73%)	0 (0,00%)
<i>Proteus mirabilis</i>	80	16 (20,00%)	10 (12,50%)	1 (1,25%)
<i>Salmonella sp.</i>	12	3 (25,00%)	3 (25,00%)	0 (0,00%)
<i>Salmonella Typhi</i>	2	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>TOTAL</b>	<b>3064</b>	<b>599 (19,51%)</b>	<b>420 (13,68%)</b>	<b>78 (2,54%)</b>

Ce tableau révèle que les souches d'*Acinetobacter sp.* uropathogènes présentent la fréquence la plus importante d'apparition de multirésistants de type PDR avec une valeur d'environ 9%. Au niveau des multirésistants de type MDR, les isolats issus de *Enterobacter sp.*, de *Enterobacter cloacae*, de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Acinetobacter sp* affichent des fréquences d'apparition supérieures à 30%.

La comparaison à partir du test de khi deux des pourcentages des différents types de multi-résistant entre les souches nosocomiales et les souches communautaires est présentée par la Figure 22.



**Figure 22: Comparaison des pourcentages des multi-résistants des souches communautaires à celles issues des patients hospitalisés**

Ces résultats indiquent que les isolats uropathogènes multirésistants de type MDR et XDR issus des patients hospitalisés présentent une fréquence d'apparition significativement supérieure à celle des isolats issus des patients en consultation.



## IV. Discussion

Durant les 12 années de cette étude, sur les 12 775 ECBU réalisés au laboratoire central du CHU de Treichville, seulement près de 25% ont donné un résultat positif. Sachant que cette analyse bactériologique est la plus couramment pratiquée en laboratoire d'analyse médicale (Lecomte *et al.*, 1986; Alvarez *et al.*, 1992), un dépistage par l'usage de la bandelette urinaire pour sa valeur prédictive pourrait considérablement réduire le nombre d'analyses.

Les infections urinaires sont caractérisées par une grande diversité de germes impliqués parmi lesquels tous les auteurs s'accordent pour noter la prédominance de l'espèce bactérienne *Escherichia coli*. Cette dominance du profil bactérien des infections urinaires par *Escherichia coli* pourrait s'expliquer par le fait que l'infection urinaire étant une infection ascendante, les germes du tube digestif cheminent le long de l'urètre jusqu'à la vessie. La présence d'adhésine bactérienne (adh.P1S, adh. Afa M) chez certaines souches d'*Escherichia coli*, leur confère une virulence particulière par leur possibilité à se fixer spécifiquement sur un polysaccharide de la muqueuse uro-épithéliale, empêchant ainsi leur élimination par les vidanges vésicales (Alvarez *et al.*, 1992).

Dans cette étude, l'analyse épidémiologique des infections urinaires met en évidence une fréquence d'*Escherichia coli* observée à Abidjan (29%) très inférieure à celles observées dans les autres pays du monde tels que ceux de l'Europe de 60 à 80% (Karlowsky *et al.*, 2002; Schito *et al.*, 2009; Karlowsky *et al.*, 2011), excepté pour la Turquie 32.4% (Leblebicioglu *et al.*, 2003). Néanmoins cette valeur est similaire à celles observées dans des pays d'Afrique subsaharienne (Nigéria, Cameroun, Ethiopie et Soudan) (Kolawole *et al.*, 2009; Beyene et Tsegaye, 2011; Hamdan *et al.*, 2011; Oladeinde *et al.*, 2011; Akoachere *et al.*, 2012). Ces fréquences proches de 30% sont liées à la présence d'autres espèces pathogènes telle que les isolats appartenant à l'espèce *Staphylococcus aureus* représentent 17% du total des isollements. Cette espèce est rarement citée dans les études épidémiologiques des infections urinaires et quand sa présence est détectée en Europe ou en Asie, le taux de prévalence ne dépasse pas 3,2 % (Leblebicioglu *et al.*, 2003). La forte prévalence de cette espèce au CHU de Treichville (Abidjan, Côte d'Ivoire) est aussi observée dans plusieurs pays d'Afrique

subsaharienne comme au Nigéria 32% (Oladeinde *et al.*, 2011) et 15% (Kolawole *et al.*, 2009), au Cameroun (22% et 26%) (Akoachere *et al.*, 2012) et au Soudan 39% (Hamdan *et al.*, 2011).

La fréquence de *Klebsiella pneumoniae* est également importante dans cette étude (15%). Cette espèce a été retrouvée à de faibles fréquences dans les pays européens 1 à 6% (Schito *et al.*, 2009) ou à des fréquences importantes en Turquie (17%) (Leblebicioglu *et al.*, 2003), Maroc 10% (Amine *et al.*, 2009) en Asie 9% (Hsueh *et al.*, 2011) en Ethiopie 17.3% (Beyene et Tsegaye, 2011) et au Nigeria 19% (Abubakar, 2009).

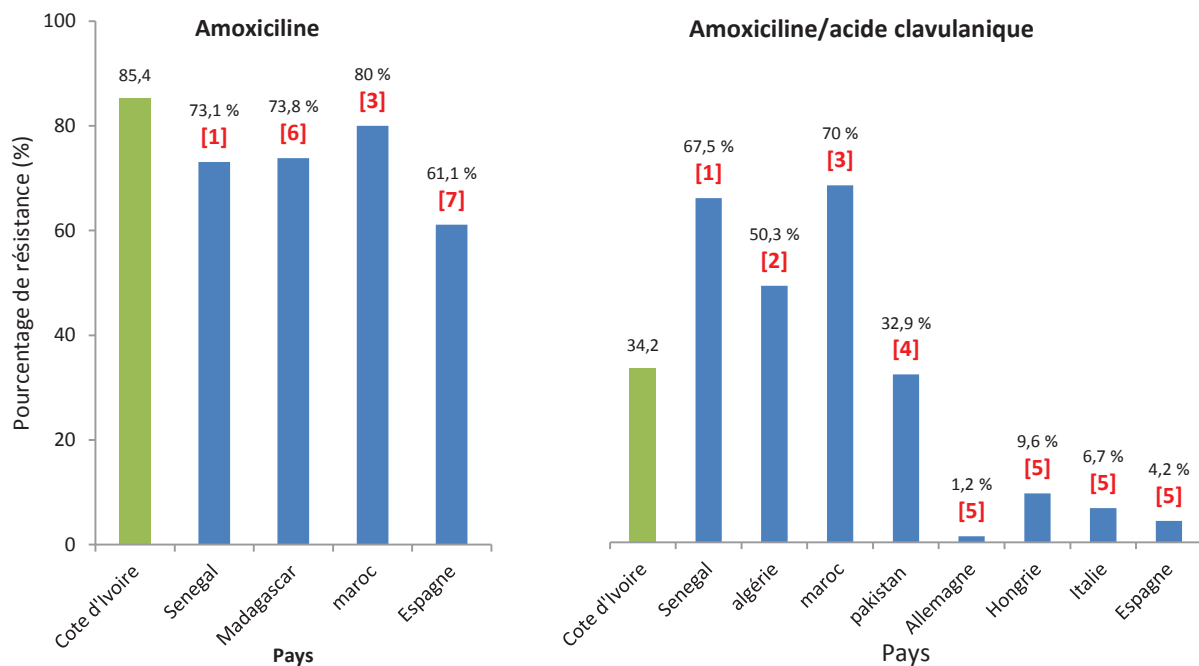
La variabilité de la fréquence des bactéries uropathogènes est probablement liée aux facteurs environnementaux des régions (climat) et aux activités usuelles des populations locales (hygiène).

Concernant les résistances aux antibiotiques, les résultats de notre enquête apportent un profil général de la résistance aux antibiotiques (toutes souches confondues). D'autre part, ils permettent d'avoir le niveau de sensibilité de l'espèce *Escherichia coli* aux mêmes antibiotiques. Les données de résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées des patients en consultation ont été comparées à celles des résistances issues de la bibliographie obtenue dans différents pays des différents continents

Dans la famille des  $\beta$ -lactamines, les pénicillines étudiées affichent un taux d'efficacité inférieur à celui des céphalosporines surtout celles de la troisième génération.

L'amoxicilline est l'antibiotique pour lequel la résistance des souches d'*Escherichia coli* uropathogènes est la plus forte (85%). De très fortes résistances ont été observées au Maroc 80% (Amine *et al.*, 2009), au Sénégal 73% (Sire *et al.*, 2007) à Madagascar 74% (Randrianirina *et al.*, 2007) et également en Espagne 61% (Smithson *et al.*, 2012) (Figure 23).

Par ailleurs, la tendance de la résistance de tous isolats confondus à cet antibiotique présente une croissance significative d'année en année ( $p < 0,0001$ ). Ce taux passe de 67% en 2000 à 91% en 2010 (Figure 21).



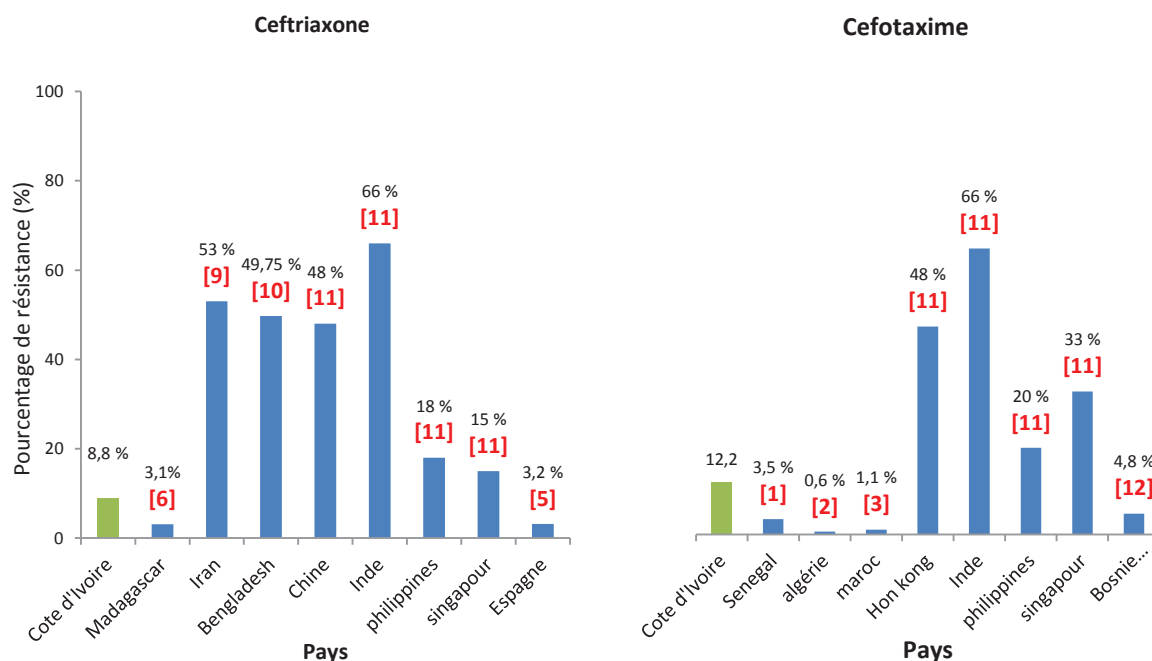
**Figure 23: Comparaison des fréquences de *E coli* uropathogène résistant à l'amoxicilline et à l'association amoxicilline/acide clavulanique. 1 :Sire *et al.*( 2007) ; 2 :Bouzenoune *et al.* (2009) ; 3 :Amine *et al.* (2009) ; 4 :Tanvir *et al.* (2012) ; 5 :Schito *et al.* (2009) ; 6 :Randrianirina *et al.*(2007) ; 7 :Smithson *et al.* (2012)**

L'association de l'amoxicilline et l'acide clavulanique n'est pas efficace sur 34% des souches d'*Escherichia coli* isolées sur cette période (2000 à 2011). Cette valeur est bien moins importante que celle observée dans certains pays d'Afrique comme le Sénégal (67%) (Sire *et al.*, 2007), l'Algérie 50% (Bouzenoune *et al.*, 2009) ou le Maroc 70% (Amine *et al.*, 2009). En Europe pour les années 2003-2006 la résistance à l'association amoxicilline/acide clavulanique est nettement plus faible. On observe une résistance de 1,2% en Allemagne, ou de 9,8% en Hongrie (Schito *et al.*, 2009).

Les céphalosporines de troisième génération gardent relativement leur efficacité puisque plus de 80% des isolats leur sont sensibles. Cela pourrait résulter du fait que ces molécules sont utilisées comme remède de seconde intention dans l'antibiothérapie, donc moins utilisées que les pénicillines présentes dans cette étude.

Par exemple, le taux de résistance des *Escherichia coli* à la ceftriaxone est de 8%. Cet antibiotique est plus utilisé en Asie où les résistances sont plus élevées et varient de 9% à 66% (Hsueh *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2012; Tanvir *et al.*, 2012). Il en est de même pour la

ceftazidime avec de faibles taux de résistance dans certains pays d'Afrique dont 3,8% de résistance au Sénégal (Sire *et al.*, 2007) et 3,1% à Madagascar (Randrianirina *et al.*, 2007). Par contre en Asie, sont observés des taux de résistance plus élevés ; on note jusqu'à 73% de résistance au Bangladesh (Rahman *et al.*, 2009) et au Pakistan (Tanvir *et al.*, 2012) et 64% en Inde (Patel *et al.*, 2012) (Figure 24).



**Figure 24: Comparaison des fréquences d'apparition de *E coli* uropathogène résistant à la ceftriaxone et à la cefotaxime. 1 :Sire *et al.*( 2007) ; 2 :Bouzenoune *et al.* (2009) ; 3 :Amine *et al.*( 2009) ; 5 :Schito *et al.*( 2009) ; 6 :Randrianirina *et al.* (2007) ; 9 :Ranjbar *et al.* (2009) ; 10 :Rahman *et al.* (2009) ; 11 :Hsueh *et al.* (2011) ; 12 :Uzunovic-Kamberovic (2006)**

Des observations similaires pour la cefotaxime, avec de faibles taux de résistance en Afrique dont 0,6% en Algérie (Bouzenoune *et al.*, 2009), 1,1% au Maroc (Amine *et al.*, 2009) et 3,5% au Sénégal (Sire *et al.*, 2007). Par contre en Asie de fortes résistances de 20% aux philippines à 66% en Inde (Patel *et al.*, 2012) sont enregistrées.

On remarque que ces céphalosporines gardent relativement leur activité sur les germes uropathogènes en Côte d'Ivoire et les pays d'Afrique mais il apparait que leur efficacité se réduit progressivement dans le temps comme mis en évidence par les tests de tendance. Les taux de résistance à la ceftazidine par exemple passent significativement de 3% en 2000 à 50% en 2008 ( $p < 0,0001$ ). Celui de la résistance à la cefotaxime évolue également de façon significative de 9% en 2000 à 39% en 2009 ( $p < 0,0001$ ). On note une tendance positive du

taux de résistance des *Escherichia coli* sur la cefuroxime, une céphalosporine de seconde génération. Cette valeur évolue donc de 17% en 2000 à 54% en 2008 ( $p = 0,0004$ ). Cette tendance de la résistance des *Escherichia coli* est aussi observée sur tous les isolats confondus.

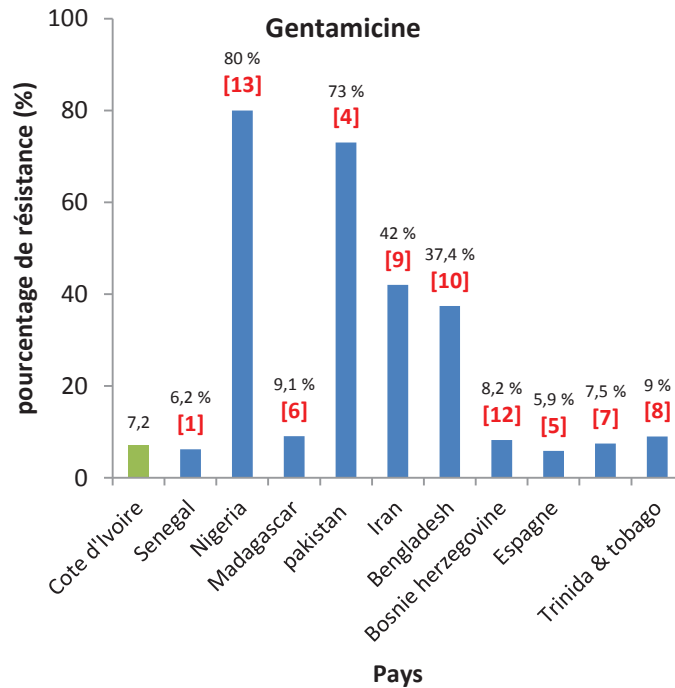


Figure 25: Comparaison des fréquences de *E coli* uropathogène résistant à la gentamicine. 1 : (Sire *et al.*, 2007); 4 : (Tanvir *et al.*, 2012) ; 5 : (Schito *et al.*, 2009) ; 6 : (Randrianirina *et al.*, 2007) ; 7 : (Smithson *et al.*, 2012) ; 8 : (Orrett et Davis, 2006) 9 : (Ranjbar *et al.*, 2009) ; 10 : (Rahman *et al.*, 2009) ; 11 : (Hsueh *et al.*, 2011) ; 12 : (Uzunovic-Kamberovic, 2006) ; 13 : (Abubakar, 2009)

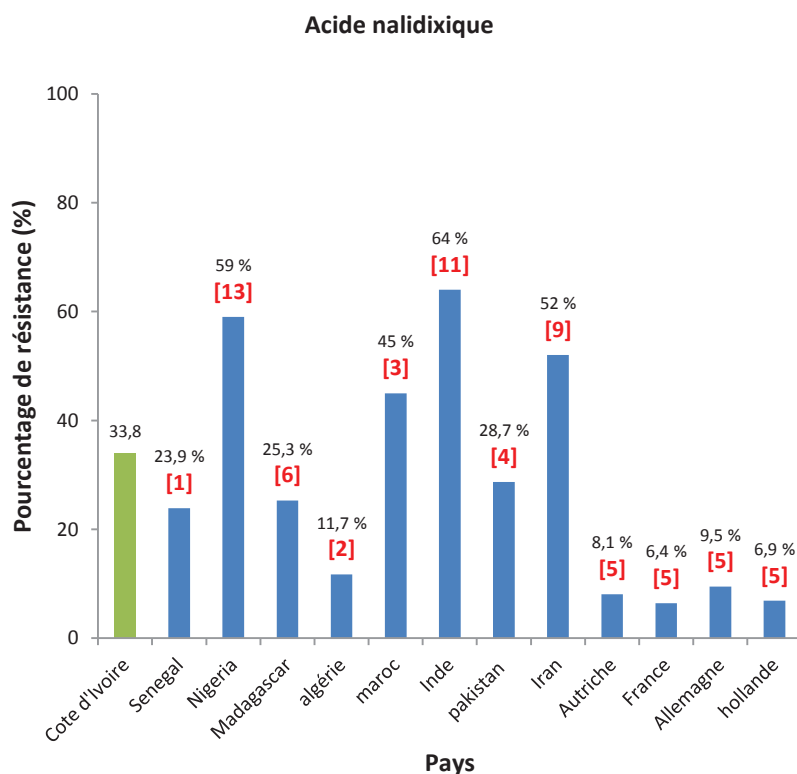
La famille des Aminoglycosides se présente comme des molécules encore efficaces. On note un faible de taux de résistance des souches d'*Escherichia coli* issues des patients en consultation sur la gentamicine (7,1%).

Cette valeur, comme l'indique la Figure 25, est proche de celles obtenues par certains auteurs au Sénégal, en Espagne, et à Trinidad Tobago (Orrett et Davis, 2006; Sire *et al.*, 2007; Karlowsky *et al.*, 2011; Smithson *et al.*, 2012) De fortes résistances de cette espèce bactérienne à cet antibiotique ont été observées au Nigéria (80 à 94%) (Abubakar, 2009; Kolawole *et al.*, 2009) et au Pakistan (73%) (Tanvir *et al.*, 2012). Parmi les aminoglycosides étudiés (la gentamicine, la tobramicine et netilmicine), la plus récente d'entre elle (la netilmicine) apparaît comme la plus efficace avec un taux de résistance de 3,08% (souches

issu des patients hospitalisés) et de 4,19% (souches communautaires). Ce taux de résistance est encore plus bas chez *Escherichia coli* qui enregistre dans le même ordre 1,21% et 2,14%. Aussi, cet antibiotique affiche une efficacité en décroissance en fonction des années sur l'espèce *Escherichia coli* ( $p= 0,027$ ) selon le test de tendance effectué.

Au niveau des quinolones, les *Escherichia coli* isolées sur la période de 2000 à 2011 présentent un taux de résistance de 34% à l'acide nalidixique.

Selon la Figure 26, bien que cette valeur soit inférieure à celles observées au Nigéria (59%) (Abubakar, 2009), en Inde (64%) (Patel *et al.*, 2012), on note toutefois qu'elle reste supérieure aux taux de résistance enregistrés en Europe (inférieure à 18%) (Uzunovic-Kamberovic, 2006; Schito *et al.*, 2009), en Algérie (11,7%) (Bouzenoune *et al.*, 2009) et au Bangladesh (8,3%) (Rahman *et al.*, 2009).



**Figure 26: Comparaison des fréquences d'apparition de *E coli* uropathogène résistant à l'acide nalidixique. 1 :Sire *et al.* (2007) ; 2 :Bouzenoune *et al.* (2009) ; 3 :Amine *et al.* (2009) ; 4 :Tanvir *et al.* (2012) ; 5 :Schito *et al.* (2009) ; 6 :Randrianirina *et al.* (2007) ; 9 :Ranjbar *et al.* (2009) ; 11 :Hsueh *et al.* (2011) ; 13 : Abubakar (2009)**

La même observation est faite pour la norfloxacine dont la résistance des souches d'*Escherichia coli* s'élève à 27%, valeur supérieure à celles observées en Suisse (Kronenberg *et al.*, 2011).

On note aussi d'autres antibiotiques qui présentent de faibles taux d'efficacité. Il s'agit de l'association triméthoprime / sulfaméthoxazole avec un taux de résistance de 81,85% pour les souches isolées des hospitalisés et de 77,97% pour les isolats communautaires, de la tétracycline (73,17% - 76,47%) et du chloramphénicol (55,80% - 44,67%). Au niveau de ce dernier antibiotique, le test de tendance indique une diminution progressive et significative du taux de la résistance des isolats dans le temps (Figure 21). Le retrait progressif de cette molécule dans l'antibiothérapie entraîne ainsi une réduction de la pression de cet antibiotique sur les germes et pourrait en partie expliquer cette tendance.

Notons-nous aussi qu'à côté des céphalosporines de troisième génération et des aminoglycosides qui gardent encore une efficacité relative, d'autres antibiotiques sont toujours efficaces tels que les monobactams, les lipopeptides et la fosfomycine.

Les antibiotiques, qu'ils soient relativement efficaces ou pas, montrent une augmentation progressive du taux de résistance des isolats dans le temps. Ces observations sont confirmées par d'autres études (Monnet *et al.*, 2000; Tagajdid *et al.*, 2008; Mayoral *et al.*, 2010). La pression exercée par ces molécules sur les microorganismes liée à leur utilisation excessive ou à tort explique l'augmentation des taux de résistance dans le temps. L'utilisation des antibiotiques qui découlent de l'automédication, est une pratique récurrente dans les pays en développement notamment en Côte d'Ivoire. Selon une étude d'investigation, 24,3% d'adultes et 15,2% d'enfants d'Abidjan ont recouru à l'automédication en cas d'infection (Hounsa *et al.*, 2010). Les pénicillines sont utilisées à 26,1% dans des cas d'automédication toujours selon le même auteur.

A côté de cette pratique, se trouve une autre qui corrobore et entretient cette dernière. Il s'agit de la vente illégitime des antibiotiques. Elle est pratiquée par des vendeurs itinérants et par la pharmacie parallèle communément appelée « pharmacie par terre » dont le mode de conservation des médicaments est incertain (Legris, 2005). En Côte d'Ivoire, cette vente

atteint des proportions importantes : par exemple elle est pratiquée dans les transports en commun reliant Abidjan aux villes de l'intérieur du pays.

Hamel rapporte qu'en 2005, ce sont 65% des ménages de Cotonou (Benin) qui sont visités au moins trois fois par mois par des vendeurs itinérants de médicaments (Hamel, 2006).

Par ailleurs, concernant la qualité des ces médicaments vendus illicitement, une étude au Nigéria révèle que 48% de 581 échantillons de médicaments constitués d'antibiotiques, d'antiparasitaires et d'antifongiques prélevés sur le secteur pharmaceutique privé ne répondent pas aux critères de qualité pharmacologique. Ils sont en dehors des normes de la pharmacopée britannique (Taylor *et al.*, 2001).

Le traitement des flacons et emballage des antibiotiques après leur usage est également un facteur aggravant. Ceux-ci, en cas de mauvaise gestion peuvent se retrouver dans l'environnement et induire l'apparition des germes résistants et multi résistants. Selon les travaux réalisés par Kouadio (2009), les eaux usées des CHU d'Abidjan renferment des produits pharmaceutiques dont de la norfloxacine, de la ciprofloxacine et de la sulfaméthoxazole à des concentrations respectives de 23,01 µg/l, 3,67 µg/l et 7,19 µg/l. Leur présence également est observée au niveau des eaux usées à la sortie des déversoirs, des eaux de la lagune zones de maraîchage. La présence des produits pharmaceutiques surtout des antibiotiques de tout genre dans ces lieux pourrait être sans doute une source considérable de sélection de bactéries multi-résistantes.

La conférence de consensus co-organisée par la société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF) et l'Association française d'urologie (AFU) informent qu'au niveau des infections urinaires, les taux des bactéries multirésistantes est plus élevé au niveau des souches nosocomiales que les communautaires (consensus, 2003). En accord avec ces auteurs, les observations indiquent que les pourcentages des souches multi résistantes de type MDR et XDR des patients hospitalisés sont significativement supérieurs à ceux des patients en consultation.



## V Conclusion

Cette étude qui rentre dans le cadre d'une enquête sur l'état des résistances bactériennes aux antibiotiques a permis de mettre en évidence certains caractères épidémiologiques.

La spécificité géographique de la fréquence des bactéries infectieuses et la variation géographique de la prévalence des résistances de ces bactéries aux antibiotiques ont été montrées par une étude comparative avec celles des autres pays d'Afrique et d'Europe. Ces spécificités sont liées sans doute à des facteurs environnementaux et aux habitudes des populations locales.

Des pratiques inappropriées des populations locales favorisent l'apparition des résistances bactériennes aux antibiotiques, comme l'automédication soutenue par la vente illicite des antibiotiques et la mauvaise gestion des déchets hospitaliers.

L'étude a également révélé que la fréquence d'apparition des bactéries résistantes aux antibiotiques non seulement évolue avec le temps, mais aussi évolue vers des résistances multiples de type MDR, XDR et PDR. Cette dernière observation constitue un réel problème de santé publique, ces types de résistance conduisant à des impasses thérapeutiques.

En plus des mesures de surveillance qui permettent de mieux adapter l'antibiothérapie pour freiner la progression des souches résistantes, il faut renouveler régulièrement les molécules de notre arsenal antimicrobien. Cette démarche est présente dans la deuxième partie de notre travail où la recherche de molécules antimicrobiennes a été réalisée chez *Morinda morindoides*, plante médicinale utilisée en Afrique pour lutter contre les infections de tout genre.

## **Chapitre III :**

### **Composés antimicrobiens de *Morinda morindoides***

## **Chapitre III : Composés antimicrobiens de *Morinda morindoides***

### **I Introduction**

La première partie de notre étude a permis de mettre en évidence l'adaptation progressive des bactéries aux antibiotiques, qui entraîne inévitablement des cas d'infections difficiles à traiter. Selon la spirale de Carlet, le renforcement périodique des composés antimicrobiens par de nouvelles molécules permet d'avoir une avance sur les risques d'impasses thérapeutiques.

La médecine traditionnelle par les plantes jusqu'à aujourd'hui continue d'être utilisée par une grande partie de la population dans la plupart des pays en développement. Si ces utilisations sont justifiées par des effets validés, les plantes pourraient être des sources de biomolécules actives exploitables.

Dans cette seconde partie, nous recherchons, des composés antimicrobiens synthétisés par *Morinda morindoides*, plante médicinale connue pour ses propriétés antimicrobiennes en Côte d'Ivoire et autres pays d'Afrique subsaharienne.

Les objectifs de cette partie consistent tout d'abord à identifier l'organe de cette plante qui présente plus d'activités antimicrobiennes, puis à purifier et à caractériser les composés antimicrobiens présents, identifier le mécanisme d'action de cette activité antimicrobienne et enfin à évaluer quelques activités biologiques antioxydante et toxicité des composés isolés.

## II Matériel et Méthodes

### II.1 Extractions

#### II.1.1 Matériels

Le matériel végétal utilisé est composé de feuilles, de tiges et de racines de *Morinda morindoides* (Figure 27). Ces différents organes de cette rubiacée ont été récoltés pendant les mois d'avril et mai des années 2009 et 2010 en Côte d'Ivoire, Ils ont été ensuite triés, lavés, découpés en de petits morceaux et séchés à l'abri des rayons du soleil pendant 8 jours puis pulvérisés en poudre fine.



**Figure 27: *Morinda morindoides* (racines, tiges, feuilles et fruit à maturité)**

Dans l'optique d'extraire de cette plante une grande variété de phytomolécules, une gamme de 6 solvants d'extraction de polarité variable a été utilisée. Il s'agit de l'eau, du méthanol, de l'acétonitrile, de l'acétone, de l'acétate d'éthyle et du chloroforme fourni par SIGMA.

Le matériel technique est composé d'une table d'agitation, d'un rotavapor de marque Büchi R-114 et d'un lyophilisateur ainsi que toute la verrerie classique de laboratoire de chimie

### ***II.1.2 Méthode d'extraction***

Pour chaque extraction vingt cinq grammes de poudre de chaque organe ont été homogénéisés séparément dans 300 millilitres des 6 différents solvants (eau, méthanol, acétonitrile, acétone, acétate d'éthyle et du chloroforme) avec une agitation de 100 rpm pendant 24 heures à température ambiante. Chaque mélange a ensuite été filtré sur du papier wattman. Les différents filtrats sont centrifugés à 11000G pendant 15 minutes à 5°C. Les solvants contenus dans chaque surnagent sont ensuite éliminés au rotavapor (méthanol, acétonitrile, acétate d'éthyle, acétone et chloroforme) ou par lyophilisation (eau). Les 18 extraits obtenus sont conservés à 4°C à l'abri de la lumière et serviront par la suite à effectuer des tests d'activités biologiques (Figure 28).

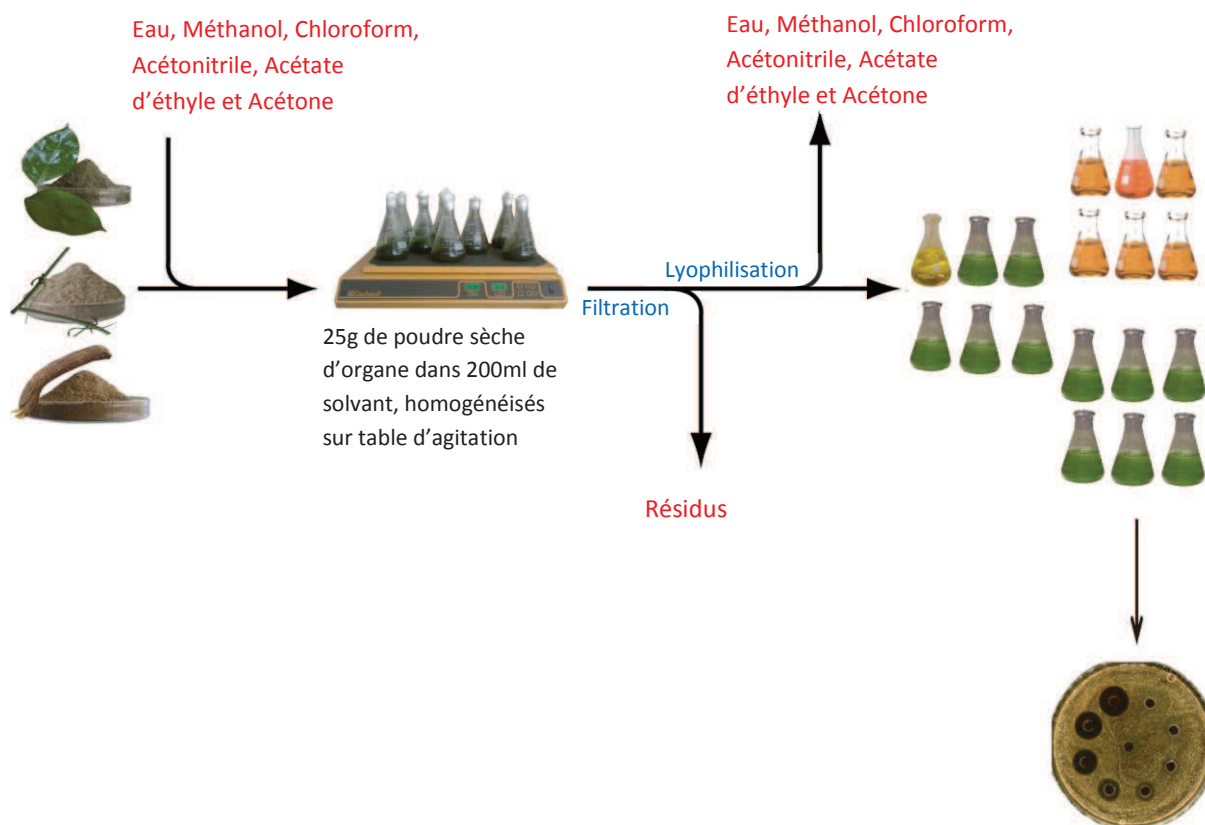


Figure 28: Schéma d'extraction des différents organes de *Morinda morindoides*

## II.2 Purification

### II.2.1 Matériel

L'extract qui présente l'activité antimicrobienne la plus intéressante est fractionné par HPLC. Cette étape a été supportée par une chaîne HPLC « Waters » avec une pompe Waters 600 et un détecteur Waters 996 (Figure 29). La phase stationnaire utilisée est une colonne C<sub>18</sub> de marque HTec. Nous avons utilisé cette colonne analytique, longue de 250 mm avec un diamètre interne de 4,5mm comportant des particules de 5µm (granométrie) fournie par Macherey-Nagel.

Les solvants de la phase mobile sont composés d'eau et d'acétonitrile et du trifluoro acide acétique (TFA) fourni par SIGMA.



Figure 29: Chaine HPLC Waters

### ***II.2.2 Méthode de purification***

On solubilise 1 mg d'extrait végétal dans 2 ml d'un mélange d'eau/acétonitrile dans les proportions 8/2. Ensuite, 100 $\mu$ l de ce mélange (soit 50 $\mu$ g d'extrait végétal) sont injectés sur la colonne C<sub>18</sub> puis élué avec une phase mobile (l'éluant) composée d'un mélange d'eau additionnée avec de l'acide trifluoro acétique (TFA) à 1% et d'acétonitrile aussi additionné du TFA à 0,7%. Avec un débit de 1 ml/min, cette élution se fait avec des proportions variables de ces deux solvants (mode gradient) selon le Tableau 9

**Tableau 9: Organisation de l'élution**

<b>Temps (min)</b>	<b>Pourcentage MeCN (%)</b>	<b>Pourcentage H<sub>2</sub>O (%)</b>
0	20	80
5	20	80
7	50	50
47	50	50
48	75	25
50	75	25
55	20	80

Après une optimisation de la séparation des composés de cet extrait, le temps de séparation s'étend sur 55 minutes auxquelles s'ajoutent 15 minutes de rééquilibrage de la colonne pour parer à une autre séparation.

Les fractions obtenues par cette séparation sont collectées manuellement puis lyophilisées.

### ***II.3 Caractérisation de la structure chimique des composés purifiés***

Les différentes fractions collectées obtenues après lyophilisation ont fait l'objet d'une caractérisation par spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire.

#### ***II.3.1 Caractérisation par spectrométrie de masse***

La spectrométrie de masse à haute résolution du Centre régional des Mesures physiques de l'Ouest (CRMPO sis université Rennes 1) a été sollicitée. Cette première partie de la caractérisation a été supportée par un spectromètre de masse Waters Q-TOF 2 possédant une géométrie QqoaTOF (quadripôles en ligne suivi d'un temps de vol orthogonal). Les spectres de masse ont été réalisés en électrobulbation (ESI) en mode positif avec un mélange CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (90/10) comme solvant pour les fractions 1 et 7 et CH<sub>3</sub>OH pour les



fractions 2, 3, 4, 8, 9, 10, 12 et 13. La tension d'accélération des ions est de 2-3 kV. La détermination des masses précises est réalisée par calibration du TOF en utilisant les ions du polyéthylène glycol (PEG) comme référence externe et par l'application d'une lockmass sur un ion connu (phtalate ou autre) comme référence interne si nécessaire. La précision obtenue est inférieure à 5 ppm. Les fractions 6 et 11 ont été analysées par un spectromètre de masse Bruker MicrOTOF-Q II possédant une géométrie QqoaTOF. Les spectres de masse ont été réalisés avec une source APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) en mode positif par introduction directe (ASAP – Atmospheric Solids Analysis Probe), à une température de 400°C.

### ***II.3.2 Caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire***

La détermination de la structure chimique des différents composés a été effectuée par la Résonance Magnétique Nucléaire de la plate-forme de l'Université de Bretagne Occidentale à Brest. Les spectres 1D <sup>1</sup>H NMR ont été enregistrés à 25°C sur un spectromètre BRUKER AVANCE 500 équipé d'une cryosonde triple résonance 5mm TCI <sup>1</sup>H/ <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N. Les analyses RMN ont été enregistrées sur les fractions solubilisées dans 700uL d'acétone-d<sub>6</sub>, selon les programmes d'acquisitions standards de Bruker. Les spectres ont été réalisés sur 32 scans avec un délai de 2 secondes entre chaque scan et un angle d'impulsion de 30°.

Des études en deux dimensions COSY DQF (Double-quantum filtered <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H correlated spectroscopy), HMQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (Heteronuclear multiple quantum coherence <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (HMQC) et HMBC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (Heteronuclear multiple bond coherence <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C) ont été réalisées afin d'attribuer les résonances <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C des signaux observés. Du fait de la faible quantité de produit dans certaines fractions, une pré-saturation du signal de l'acétone a été réalisée afin d'améliorer l'observation.

## II.4 Test d'activité antimicrobienne

### II.4.1 Matériel

Les tests d'évaluation des activités antimicrobiennes ont été réalisés contre 11 microorganismes pathogènes (Tableau 10) dont 7 bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* CIP 6086, *Citrobacter freundii* NRRL B 2643, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella oxytoca* CIP 7932, *Salmonella enterica* CIP 8297 et *Pasteurella multocida* ATCC 43137), 2 bactéries à Gram positif (*Enterococcus faecalis* CIP A186 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et 2 levures (*Candida albicans* ATCC 2091 et *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045).

**Tableau 10: Caractères cultureux des micro-organismes utilisés**

	Espèce	Collection	T° d'incubation	UFC.ml (pour 1 DO <sub>600</sub> )	Milieu de culture
Bactéries	<i>Citrobacter freundii</i>	NRRL B-2643	30 °C	1,3. 10 <sup>9</sup>	Tryptone Caséine Soja (TSB)
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CIP 6086	30 °C	1,2. 10 <sup>9</sup>	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP A186	37 °C	1,2. 10 <sup>9</sup>	
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	37 °C	1,1. 10 <sup>9</sup>	
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	CIP 7932	30 °C	7,6. 10 <sup>8</sup>	
	<i>Salmonella enterica</i>	CIP 8297	30 °C	1,4. 10 <sup>9</sup>	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	37 °C	4,6. 10 <sup>8</sup>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	37 °C	1,2. 10 <sup>9</sup>	
	<i>Pasteurella multocida</i>	ATCC 43 137	37 °C	1,2. 10 <sup>9</sup>	
Levures	<i>Candida albicans</i>	ATCC 2091	30 °C	3,0. 10 <sup>7</sup>	Sabouraud
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 32045	30 °C	3,0. 10 <sup>7</sup>	

Les milieux de culture bactérienne utilisés sont la gelose tryptone caséine soja (TSA), du bouillon tryptone caséine soja (TSB) et de la gélose nutritive (GN). Au niveau des levures, la gelose sabouraud et le yeast medium. Les compositions des ces différents milieux de culture sont présentées dans le Tableau 11.

**Tableau 11: Milieux de culture**

	<b>Milieux de culture</b>	<b>Composition</b>
<b>Bactérie</b>	TSB	17 g d'hydrolysate enzymatique de caséine 3 g de peptone de soja 2,5 g de D-Glucose 5 g de chlorure de sodium 2,5 g d'hydrogenophosphate dipotassique 1 l d'eau distillée
	TSA	17 g d'hydrolysate enzymatique de caséine 3 g de peptone de soja 2,5 g de D-Glucose 5 g de chlorure de sodium 2,5 g d'hydrogenophosphate dipotassique 15 g d'agar 1 l d'eau distillée
	GN	1 g d'extrait de viande 2,5 g d'extrait de levure 5 g de peptone 5 g de chlorure de sodium 15 g d'agar 1 l d'eau distillée
<b>Levures</b>	Yeast medium	20 g de Peptone 20 g de glucose 10 g d'extrait de levure 1 l d'eau distillée
	Gélose sabouraud	10 g de peptone pepsique de viande 20g de glucose 0,5 g de chloramphénicol 15 g d'agar 1 l d'eau distillée

Le matériel technique requis est composé du classique matériel classique de laboratoire de microbiologie (verrerie, étuve 37°C et 30°C, hotte à flux laminaire...) et d'encemenceur en spiral.

## **II.4.2 Méthodes**

### **II.4.2.1 Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé**

La méthode de diffusion en milieu gélosé a été utilisée pour évaluer les activités antimicrobiennes des différents extraits (Wiegand *et al.*, 2007). Elle consiste à déposer à l'intérieur d'un puits creusé dans une gélose inoculée dans la masse par une souche bactérienne cible, une quantité de substance antimicrobienne à évaluer. Après dépôt dans le puits, le composé diffuse dans la gélose et inhibe la formation d'un tapis bactérien selon le gradient de concentration qui se met en place. Cette diffusion est dépendante de la diffusibilité du composé dans la gélose, de la durée de migration, de la distance de migration et de la concentration du composé (Cooper, 1955)

En fonction du gradient de concentration établi par le composé dans la gélose, une inhibition de croissance microbienne est induite. Cette inhibition a pour conséquence la formation d'un halo autour du puits. Le diamètre de cette zone d'inhibition quantifie l'activité antimicrobienne de l'extrait ou du composé.

Des gammes de concentrations des différents extraits de la plante *Morinda morindoides* ont été effectuées selon une série de dilutions au demi allant de 30 mg/ml à 0,25 mg/ml. Le mélange DMSO-Eau (7:3) a été utilisé comme diluant pour les extraits obtenus avec les solvants organiques.

L'ensemble des micro-organismes cibles est composé de 11 souches de micro-organismes pathogènes (Tableau 10) comportant 7 bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* CIP 6086, *Citrobacter freundii* NRRL B 2643, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella oxytoca* CIP 7932, *Salmonella enterica* CIP 8297 et *Pasteurella multocida* ATCC 43137), 2 bactéries à Gram positif (*Enterococcus faecalis* CIP A186 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et 2 levures (*Candida albicans* ATCC 2091 et *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045). A partir d'une culture de 24 heures ou 48 heures d'incubation des différentes souches microbiennes cibles, on réalise pour chaque souche une pré-culture d'une durée nécessaire pour atteindre la phase de croissance exponentielle. La valeur des DO à 600nm de cette pré culture permet de prélever une quantité

correspondante à environ  $2.10^7$  UFC en fonction du rapport DO/UFC.m $l^{-1}$  de chaque souche cible (Tableau 10).

Cette quantité de culture microbienne prélevée est homogénéisée dans une boîte de Pétri avec 20 ml de TSA maintenu liquide à 50°C. Une fois la gélose inoculée et solidifiée, 9 puits de 6 mm de diamètre y sont creusés. Ensuite, 70  $\mu$ l de chaque concentration d'extrait de plante sont déposés dans les différents puits. Les boîtes sont ensuite mises à incuber pendant 24 ou 48 heures à la température de croissance optimale spécifique de chaque microorganisme (Tableau 10).

Après 24 ou 48 heures d'incubation, le rayon d'inhibition à partir du bord du puits est mesuré. Les valeurs pour les différentes concentrations de chaque extrait permettent de tracer la droite de régression entre la dilution de la concentration initiale et le rayon d'inhibition. De cette droite, on détermine la dilution de la concentration initiale qui entraîne 1 mm de rayon d'inhibition qui est une unité arbitraire (UA). Cette valeur permet de calculer l'activité spécifique de l'extrait qui est exprimée en UA/mg. Elle représente l'inverse de la quantité d'extrait (en mg) dans un puits qui induit 1 millimètre de rayon d'inhibition à partir du bord du puits (Figure 30) (Zouhir *et al.*, 2011).

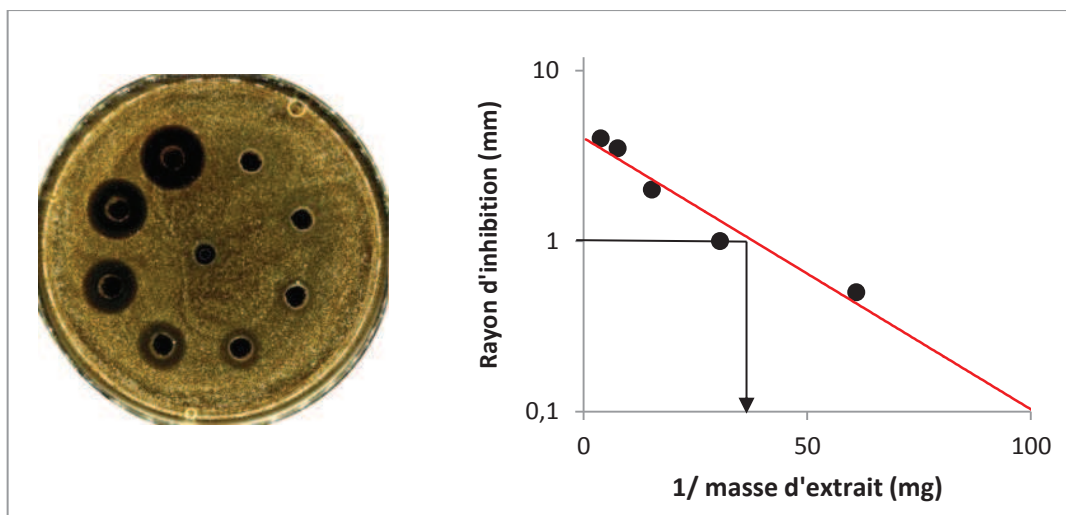


Figure 30: Détermination de l'activité spécifique (UA/mg) d'un extrait

La comparaison des différentes valeurs d'activité spécifique de chaque extrait permet d'identifier l'organe qui concentre le plus le principe actif et aussi de connaître le solvant qui sélectionne mieux ce principe actif.

#### ***II.4.2.2 Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode des spots***

Ce test non quantitatif a pour objectif d'identifier rapidement les fractions d'intérêt issues de la séparation par chromatographie à de faibles concentrations. A partir d'une pré-culture de 3 heures d'une culture microbienne en bouillon de 24 heures d'incubation, un inoculum de  $10^6$  UFC/ml est préparé. Cet inoculum (1 ml) est étalé sur la surface d'une gélose tryptone-soja (TSA) puis séché à la température ambiante pendant 15 à 20 minutes sous une hotte à flux laminaire. Au bout de ce temps, 5 $\mu$ l de chaque fraction lyophilisée et solubilisée dans du DMSO 70% sont déposés délicatement sur cette gélose inoculée pour former un spot, les géloses sont incubées à 30 ou 37°C pendant 24 ou 48 heures.

#### ***II.4.2.3 Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode en milieu liquide.***

Ce test en milieu liquide a pour objectif de déterminer pour les différents composés isolés, les valeurs des paramètres antimicrobiens dont la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) ou Fongicide (CMF).

Dans une microplaque de 96 puits, une gamme de concentrations de 100  $\mu$ l de chaque composé est effectuée par des dilutions au demi dans une solution de DMSO 5%.

A partir d'une culture microbienne de 24 heures d'incubation, une pré-culture pour atteindre la phase exponentielle de croissance microbienne est préparée. Une fois sa densité optique à 600nm obtenue, cette pré-culture est utilisée pour préparer un *inoculum* de  $2.10^6$  UFC/ml dans un bouillon tryptone-soja (TSB) concentré 2 fois. Ensuite 100  $\mu$ l de cet *inoculum* sont homogénéisés dans chaque puits de la gamme de concentrations préalablement préparée puis incubée à 30 ou 37°C pendant 24 ou 48 heures.

Au bout de cette période, la turbidité de chaque puits est appréciée à l'œil nu à la lumière du jour et la plus petite concentration dans laquelle une absence de turbidité est observée représente la Concentration Minimale inhibitrice (CMI) du composé en question sur la souche de *Inoculum* utilisé.

#### **II.4.2.4 Cinétique d'inactivation**

Les cinétiques d'inactivation des populations microbiennes de *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* ont été effectués en présence de l'extrait affichant la plus forte activité antimicrobienne. Le test a consisté à dénombrer dans le temps l'évolution des Unités Formant Colonie (UFC) des micro-organismes en présence de différente concentration d'extrait végétal.

A partir d'un bouillon de *Staphylococcus aureus* et de *Candida albicans*, différents *inoculum* de  $10^5$  UFC/ml sont préparés et mis à incuber en présence de 800µg/ml, 400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml et 0 µg/ml d'extrait végétal. A intervalles réguliers de temps, 50µl de chaque bouillon en incubation sont prélevés etensemencés par un ensemenceur spiral sur gélose nutritive. Au bout de 24 ou 48 heures d'incubation, les colonies sont dénombrées. Ces données permettent de représenter des cinétiques d'inactivations de chaque concentration d'extrait.

La modélisation de la cinétique d'inactivation des micro-organismes a été effectuée par le model Weibull selon l'Équation 1

Équation 1

$$\text{Log} (N) = \text{Log} (N_0) - \left( \frac{t}{\delta} \right)^p$$

**N** : Nombre d'unités formant colonie

**N<sub>0</sub>** : Nombre d'unités formant colonie à T<sub>0</sub>

**t** : temps (heures)

**δ** : Temps nécessaire pour une réduction décimale du nombre d'unités formant colonies

**p** : Paramètre d'ajustement du modèle

La représentation graphique par cette équation de  $\text{Log}(N)$  en fonction du temps permet de déterminer la valeur de  $\delta$  pour chaque concentration d'extrait. Les différentes valeurs de  $\delta$  (temps nécessaire pour une réduction décimale de l'*inoculum* de départ) déterminées sont représentées en fonction de la concentration de l'extrait. Le graphique obtenu permet d'apprécier et de quantifier l'effet de la concentration de l'extrait sur la réduction des micro-organismes cibles.

## **II.5 Cible moléculaire des composés isolés**

Certaines anthraquinones possèdent une affinité pour les acides nucléiques de par leur pouvoir intercalant comme la plupart des inhibiteurs de la topo-isomérase. A partir de ce constat, afin d'identifier la cible moléculaire des phytomolécules antimicrobiennes, l'intensité de cette activité intercalante pour chaque composé isolé a été évaluée.

### **II.5.1 Matériel**

Le matériel biologique exploité dans ce test est constitué de la souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et de la souche d'*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  porteuse du plasmide pBr 322. Le milieu de culture est le Luria Broth (LB) composé de 10 g de tryptone, de 6 grammes d'extrait de levure, de 10 grammes de NaCl, le tout solubilisé dans 1 litre d'eau distillée.

Les différents tampons disponibles dans le kit d'extraction de plasmide fourni par NucleoBond® selon la méthode décrite par Birnboim (Birnboim et Doly, 1979) sont listés dans le Tableau 12.

La colonne utilisée pour la purification de l'ADN plasmidique est une colonne de polypropylène contenant de la Résine de silice AX insérée entre deux filtres inertes.



**Tableau 12: Différents tampons utilisés pour l'extraction du plasmide pBr 322**

Tampons	Compositions
<b>Tampon S1</b> Solution pour la ré-suspension du culot bactérien	50 mM Tris-HCl, 10mM EDTA 100µg/ml de RNase A pH 8,0
<b>Tampon S2 :</b> Représente la solution de lyse	200mM de NaOH 1% SDS
<b>Tampon S3</b> Solution de neutralisation	2,8M de KAc pH 5,1
<b>Tampon N2</b> Solution pour équilibrer la colonne de purification du plasmide	100 mM Tris 15% éthanol 900mM KCl 0,15% Triton X-100 Ajuster le pH à 6,3 avec du H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Tampon N3 : lavage de la colonne</b>	100mM Tris 15% éthanol 1,15 M KCl Ajuster le pH à 6,3 avec du H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Tampon N5 : Elution</b>	100 mM Tris 15% éthanol 1 M KCl Ajuster le pH à 8,5 avec du H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

Le matériel nécessaire pour l'extraction de l'ADN génomique de *Staphylococcus aureus* est composé d'une solution de phénol-chloroforme- alcool isoamylique (25/24/1) (Sigma), d'un tampon TE 10X a été utilisé. Ce dernier est composé de 48,5g Trisma base (tris), de 7,5g d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) et d'une quantité suffisante d'eau distillée pour atteindre 1 litre. La solution est ensuite ajustée à 8 puis le tampon obtenu est stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

La solution mère de lyse bactérienne a été préalablement préparée avec 0,6 g de trisma base et avec 3g de sodium dodecyl sulfate (SDS), homogénéisé dans 100 ml d'eau distillée (qsp). La solution de lyse bactérienne prête à l'emploi est préparée juste avant son utilisation. Elle se compose de 10 ml de la solution mère de lyse bactérienne à laquelle sont ajoutées 200µl d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH). Le pH final est de 12,6.

## **II.5.2 Méthodes**

### **II.5.2.1 Méthode d'extraction du plasmide pBr 322**

Une culture de 250 ml de la souche *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  est incubée 18 heures dans du milieu LB en présence d'ampicilline. La suspension bactérienne est centrifugée à 6 000g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est récupéré et homogénéisé dans 8ml du tampon S1. Ensuite sont ajoutés à ce homogénat 8 ml de tampon S2 et mélangés délicatement par inversions répétées du tube puis incubés à la température ambiante du laboratoire (20-25°C) pendant 5 minutes au plus.

Au bout de ce temps, 8 ml du tampon S3 préalablement conservé à 4°C sont ajoutés à la suspension obtenue. Ce mélange est automatiquement homogénéisé délicatement par 8 inversions répétées du tube jusqu'à l'obtention de flocons blancs. L'homogénat est ensuite incubé dans un bain de glace pendant 5 minutes

Après incubation, le mélange est centrifugé à 12 000g pendant 25 minutes et le surnageant est versé sur la colonne préalablement équilibrée avec 2,5 ml du tampon N2. Un lavage est effectué ensuite avec 12 ml du tampon N3 suivi d'une élution de l'ADN plasmidique avec 5 ml du tampon N5. L'ADN plasmidique contenu dans cette fraction est précipité avec 3,5 ml d'isopropanol préalablement conservé à la température ambiante du laboratoire (20 -25°C). Le mélange obtenu est centrifugé à 15 000g pendant 30 minutes à 4°C.

Le culot est délicatement récupéré, lavé par l'ajout d'éthanol 70% avec un bref passage au vortex puis centrifugé à nouveau à 15 000g pendant 10 minutes à la température ambiante (20 – 25°C). Le culot qui représente le plasmide pBr 322 est séché à 25°C puis solubilisé dans de l'eau déionisée stérile.

Le spectre d'absorption UV-visible du plasmide est mesuré puis sa concentration est déterminée par sa densité optique lue à 260 nm

### ***II.5.2.2 Méthode d'extraction d'ADN génomique de *Staphylococcus aureus****

Après une culture de 18 heures de *Staphylococcus aureus* dans un bouillon de LB (Luria-Bertani), 200 ml de la suspension bactérienne obtenue est centrifugé à 5000g pendant 5 minutes. Au culot récupéré, sont ajoutés 8ml de Tampon TE 1X supplémenté avec 1ml de lysozyme (10mg/ml), homogénéisé par vortex puis incubé à 37°C pendant 30 minutes. Au bout de ce temps, 10 ml de solution de lyse sont ajoutés et le tout est homogénéisé délicatement par inversion répétée du tube puis incubé à 55°C pendant 30 minutes.

A ce mélange, sont ajoutés 10 ml de solution phénol-chloroforme et le mélange est agité vigoureusement jusqu'à l'obtention d'une suspension laiteuse stable. Cette suspension est centrifugée à 10 000g pendant 15 minutes. A la phase aqueuse supérieure délicatement prélevée, sont ajoutés 8 ml de solution d'acétate de sodium 3M (pH 5,2), puis 10 ml d'alcool isopropylique. Le tube est homogénéisé par inversion répétée puis incubé à -20°C pendant 30 minutes.

Après centrifugation de ce tube à 10 000g pendant 10 minutes, le culot est récupéré et lavé par 10 ml d'éthanol 70% et centrifugé à nouveau à 10 000g pendant 5 minutes. Le culot obtenu qui représente l'ADN génomique bactérien est séché à 25°C puis repris dans de l'eau. Le spectre UV (de 200 à 400nm) de ce dernier est effectué pour déterminer sa concentration.

### ***II.5.2.3 Mise en évidence de l'activité intercalante par électrophorèse (migration sur gel d'agarose 1%)***

Dans une série de 7 tubes eppendorf de 100µl sont préparés 5 µl de chaque point d'une gamme de concentration d'extrait végétal dans du DMSO 40%.

On ajoute au contenu de chaque tube 10µl de plasmide pBr 322 de concentration 0,0425µg/µl. Le tout est homogénéisé puis incubé à température ambiante pendant 15 minutes. Au bout de cette période, 3µl de « Blue/Orange loading dye 6X » et 2µl de « sybr gold 1X » sont ajoutés.

Le contenu de chaque tube après homogénéisation est déposé dans le puits d'un gel d'agarose 1% pour une migration de 4 heures sous une tension de 40 volts. Le profil de la migration électrophorétique est observé sous une lampe UV.

#### ***II.5.2.4 Mise en évidence de l'activité intercalante par compétition avec le Sybr Gold***

Ce test a pour but d'évaluer de façon quantitative l'activité intercalante à l'ADN des différents composés isolés. Sachant que le Sybr Gold est une molécule qui émet une fluorescence lorsqu'elle s'intègre à l'ADN, l'intensité de cette fluorescence est donc proportionnelle à la quantité de cette molécule intégrée à l'ADN.

Le principe ici consiste à mettre en contact l'ADN avec une quantité connue d'extrait végétal pendant un temps d'incubation défini, puis d'ajouter du Sybr Gold afin que ce dernier s'intercale au niveau des parties de l'ADN non occupées par l'extrait. La proportion d'ADN non intercalée par l'extrait est révélée par l'intensité de la fluorescence induite par le Sybr Gold intégré.

Pour ce faire, dans des puits de 3 colonnes d'une microplaque à 96 puits sont déposés 50µl des phytomolécules isolées de façon à former une gamme de concentration selon une série de dilution au demi par colonne (Figure 33). Le DMSO 20% est utilisé comme diluant pour la réalisation de cette gamme de concentration. Ensuite 20µl de DNA génomique de *Staphylococcus aureus* à 0,02 µg/µl sont ajoutés dans chaque puits de cette gamme de concentration. Après homogénéisation, le mélange est incubé à la température ambiante du laboratoire (20 – 25°C) pendant 15 minutes, puis sont ajoutés 5µl de Sybr Gold dans les mêmes puits (Figure 31). La fluorescence du contenu de chaque puits est lue à 535nm après une excitation à 485 nm. Les valeurs de la fluorescence obtenues permettent de représenter le pourcentage d'ADN non intercalé par les composés en fonction de la concentration de ces composés. Le pourcentage de l'ADN non intercalé est calculé par l'Équation 2.

### Équation 2

$$\text{Pourcentage d'ADN non - intercalé} = \frac{F_i - F_{i.nc}}{F_t - F_{t.nc}} \times 100$$

$F_i$  : Fluorescence de chaque concentration de composé +ADN+ Sybr Gold

$F_{i.nc}$ : Fluorescence de chaque concentration de composé + Sybr Gold sans DNA (blanc)

$F_t$ : Fluorescence du Sybr Gold + DNA

$F_{t.nc}$ : Fluorescence du Sybr Gold seul

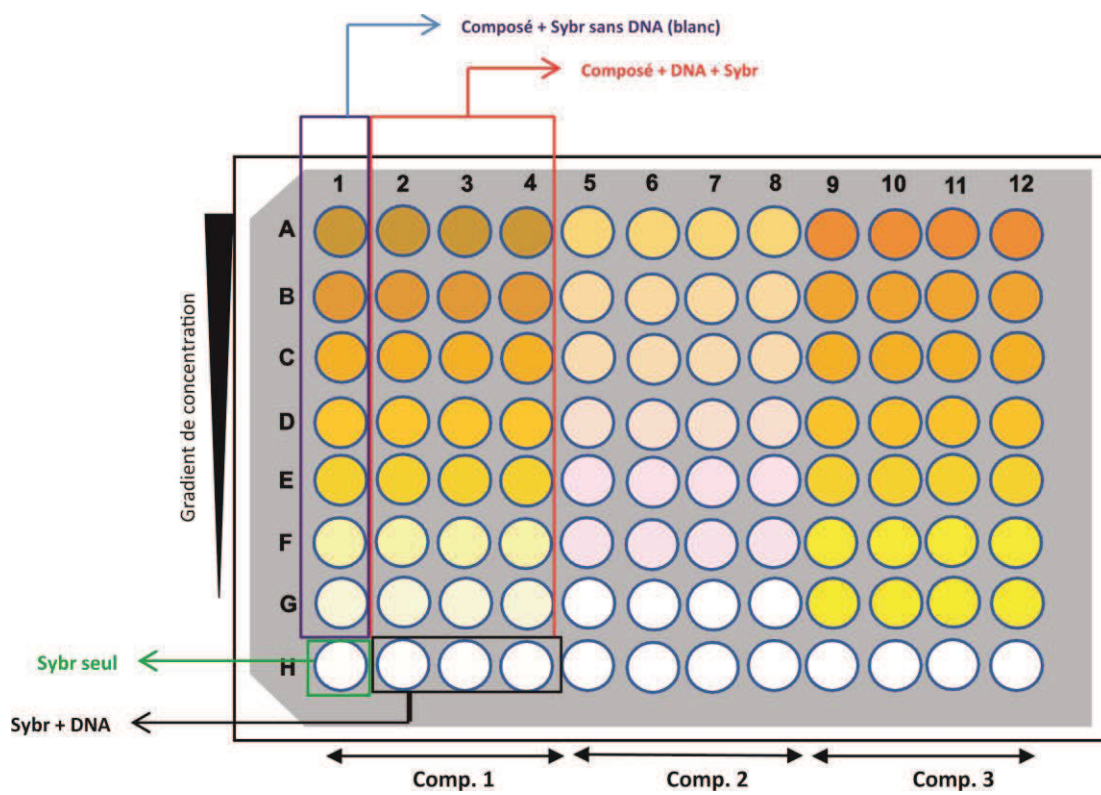


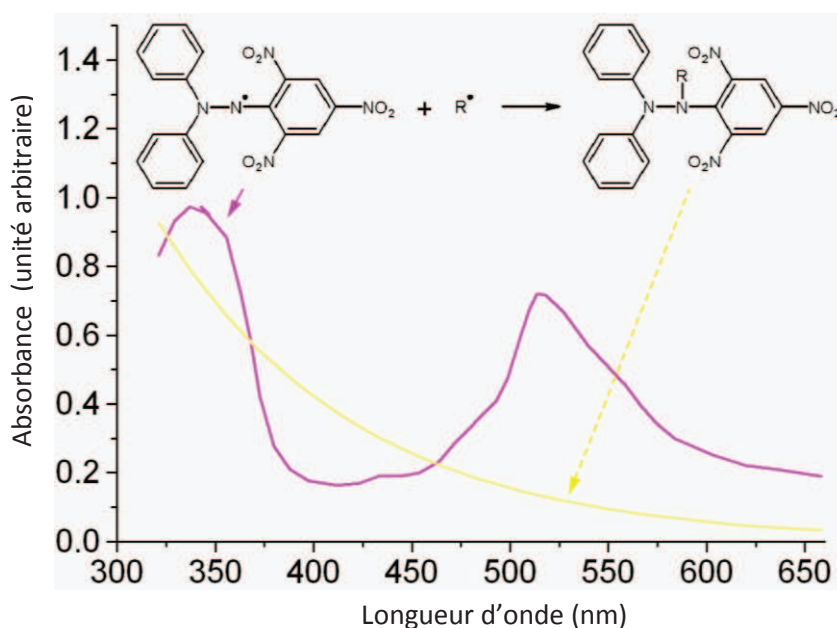
Figure 31: organisation de la microplaque pour le test de compétitivité

Cette représentation permet de déterminer la concentration du composé qui induit une intercalation de l'ADN à 50% ( $IC_{50}$ ).

## II.6 Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

L'effet antioxydant des extraits a également été étudié. Le pouvoir anti-oxydant d'un composé définit sa capacité à empêcher l'oxydation d'un autre.

L'activité antioxydante des extraits de chaque organe de *Morinda morindoides* a été mesurée par le test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Cette molécule possède un électron non apparié au niveau de son atome d'azote et reste stable sans former de dimère. Ce composé se caractérise par sa coloration bleue et absorbe à 517nm. La recombinaison de ce radical entraîne une décoloration du bleu donc une absence d'absorption à 517nm (Figure 32).



**Figure 32: spectre d'absorption du DPPH radicalaire et recombinaison dans l'UV-Visible (Cowie et Arrighi, 2008)**

### II.6.1 Matériel

Ce test consiste donc à mesurer cette décoloration induite par la réduction du DPPH radicalaire (forme recombinaison) par les extraits végétaux. Le matériel chimique est composé

du 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et de l'éthanol fourni par SIGMA. Le matériel technique utilisé se compose de microplaque à 96 puits et d'un lecteur de microplaque de marque PERKINELMER

### **II.6.2 Méthode expérimentale d'évaluation de l'activité antioxydante**

Une gamme de concentrations des extraits de chaque organe de la plante est effectuée avec de l'éthanol comme diluant dans des puits d'une microplaque. A 100µl de chaque concentration d'extrait sont ajoutés 100µl de DPPH radicalaire d'une concentration de 0,04µg/ml (0,1 mM). Un témoin négatif est réalisé pour chaque concentration d'extrait (sans DPPH). L'organisation de la microplaque est présentée par Figure 33. La microplaque est ensuite incubée à température ambiante dans l'obscurité pendant 1 heure. Au bout de ce temps, la densité optique à 517 nm de chaque puits est enregistrée. Les valeurs obtenues permettent de représenter le pourcentage de DPPH non réduit par l'extrait végétal en fonction du rapport concentration de l'extrait/ concentration DPPH radicalaire selon la formule suivante (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998).

#### **Équation 3**

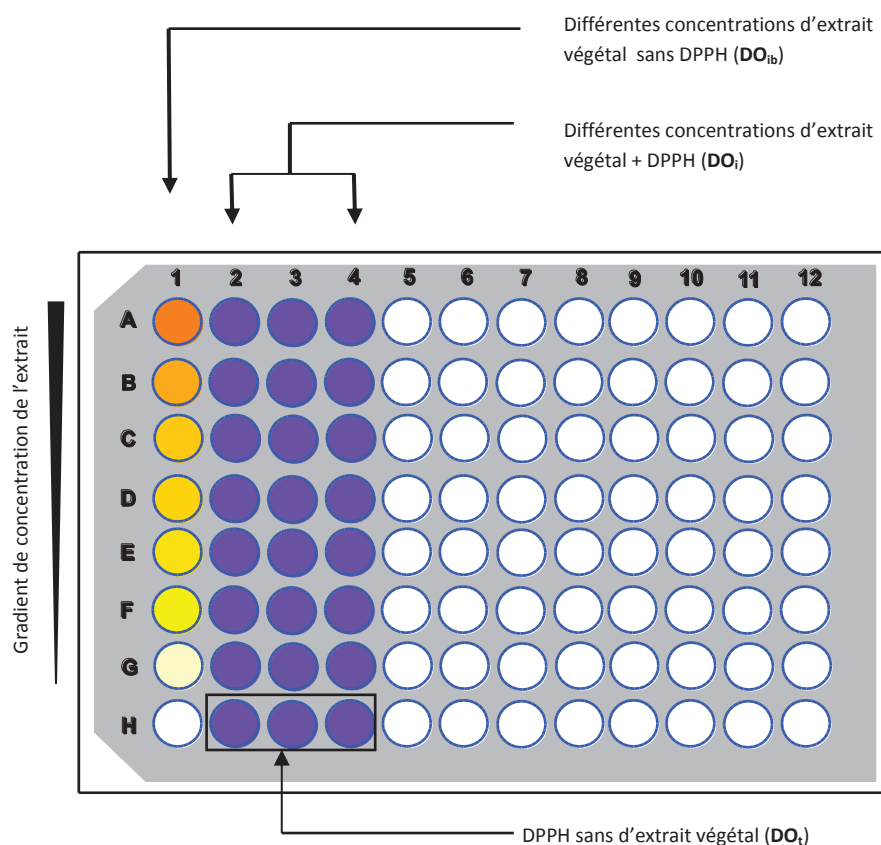
$$\%DPPH = \frac{DO_i - DO_{ib}}{DO_t} \times 100$$

%DPPH° : pourcentage de DPPH radicalaire (non réduit par l'extrait végétal)

DO<sub>i</sub> : Densité optique à 517 nm pour chaque concentration de l'extrait végétal + DPPH

DO<sub>ib</sub> : Densité optique à 517 nm pour chaque concentration de l'extrait végétal sans DPPH

DO<sub>t</sub> : Densité optique à 517 nm du DPPH sans extrait végétal



**Figure 33: Organisation de la microplaque pour test antioxydant**

Cette représentation permet ainsi de déterminer le rapport des concentrations d'extrait végétal/DPPH radicalaire réduisant à 50% le DPPH radicalaire ( $EC_{50}$ ). La comparaison des  $EC_{50}$  de chaque extrait permet de déterminer et de comparer leur pouvoir antioxydant.

## ***II.7 Tests de toxicité***

### ***II.7.1 Activité cytotoxique de l'extrait d'intérêt***

#### ***II.7.1.1 Matériel***

Le matériel biologique utilisé pour évaluer l'activité cytotoxique de l'extrait à l'acétonitrile des racines de *Morinda morindoides* est composé d'une lignée cellulaire NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™), d'une lignée cellulaire VERO (ATCC® Number: CCL-81). Les milieux utilisés se



composent du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institut) 1640 w/o L-Glutamine stocké à 4°C et du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) high Glucose w/o L-Glutamine, w/o Na pyruvate stocké à 4°C.

Comme solutions utilisées, on note la Trypsine EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétracétique) stockée à -20°C, le HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) sans calcium ni magnésium et une solution de MTT dont 1g a été dilué dans 200 ml de PBS puis stocké à 4°C.

La solution de lyse est composée de 400 ml de SDS 15%, de 100 ml de N,N-diméthylformamide, de 7,5 ml de HCl 0 (1 Normal), de 7,5 ml d'acide acétique 80% et de 115 ml H<sub>2</sub>O. Cette solution une fois préparée est stockée à la température ambiante.

### ***II.7.1.2 Méthode expérimentale de l'activité cytotoxique***

L'évaluation de cette activité a été faite selon la méthode décrite par certains auteurs (Ali *et al.*, 1996; Tajudin *et al.*, 2012). Des cellules 3T3 fibroblastiques de souris et des cellules VERO épithéliales de singe sont mises respectivement en culture dans du milieu RPMI et du DMEM dans des flasks de culture cellulaire à 37°C en incubateur à CO<sub>2</sub> (5%) en conditions stériles et sous atmosphère saturée en eau.

Avant leur confluence, lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance, le tapis cellulaire obtenu est dissocié par la trypsine. Le milieu est soustrait, le tapis est lavé avec 10 ml d'une solution saline HBSS dépourvue de cations bivalents puis recouvert de 1 ml de trypsine EDTA ajouté de 2 ml de HBSS sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>. Les cellules sont incubées 5 min à 37°C et la complète dissociation du tapis est suivie au microscope. La suspension cellulaire est mélangée à du milieu de culture contenant du SVF (sérum de veau fœtal) pour arrêter la trypsination puis centrifugée 5 min à 200 g. Le culot cellulaire est repris par du milieu de culture et la concentration cellulaire est estimée par numération sur cellule de Malassez.

Les cellules ont étéensemencées à J<sub>0</sub> à raison de 4500 par puits dans des plaques de culture cellulaire à 96 puits dans un volume de 100 µL par puits.

L'extrait à l'acétonitrile de *Morinda morindoides* est ajouté le lendemain de la distribution des cellules, dans un volume de 100 µl par puits.

Pour ce faire, une gamme de concentrations de cet extrait est préalablement réalisée dans du milieu de culture cellulaire. Cet extrait étant relativement hydrophobe, il a été préparé dans du DMSO avant d'être ajouté à du RPMI ou du DMEM de manière à ne pas dépasser une concentration finale de 10% en DMSO. Chaque point de la gamme est réalisé en triplicata.

A J+2, 20  $\mu$ L de solution de MTT sont ajoutés aux 200 $\mu$ L déjà présents dans les puits et les plaques sont encore incubées pendant 4H à 37°C. Ensuite les plaques sont bien vidées en les inversant brutalement, puis 80  $\mu$ L de tampon de lyse sont ajoutés pour dissoudre les cristaux de formazan formés par les cellules viables. Après homogénéisation du contenu de chaque puits, leur densité optique est lue à 540 nm (Mosmann, 1983).

Le pourcentage de viabilité des cellules exposées à chaque concentration d'extrait est estimé par rapport aux cellules témoins sans extrait.

En cas de toxicité cellulaire, la concentration qui induit 50% de viabilité (CI<sub>50</sub>) est déterminée.

## ***II.7.2 Test d'activité hémolytique (hématotoxicité) de l'extrait d'intérêt et des composés purifiés***

### ***II.7.2.1 Matériel***

Ce test a pour but d'évaluer sur des hématies humaines, l'hématotoxicité des composés isolés. Il a été effectué selon la méthode décrite par (Laurencin *et al.*, 2012) avec quelques modifications adaptées à la nature des composés.

Le matériel est constitué d'hématies humaines fournies par l'hôpital de Quimper, du DMSO, et du tampon PBS. Ce tampon PBS est composé de 137mM de NaCl, de 2,7 mM de KCl, de 1,5 mM de KH<sub>2</sub>PO et de 1mM de Na<sub>2</sub>HPO

### II.7.2.2 Méthode expérimentale de l'activité hémolytique

Pour ce faire, 5 ml de sang humain sont collectés dans de l'EDTA (50mM) et conservés dans un bain de glace. Le sang est ensuite lavé avec du tampon PBS à pH 7,4 puis centrifugé à 800g à 4°C pendant 15 min. Après élimination du surnageant, l'opération est répétée deux fois de suite sur le culot obtenu.

Après ces 3 lavages, le culot est complété avec du tampon PBS 0,02% Azide de Na à une quantité suffisante pour atteindre 25 ml.

Dans les puits d'une microplaque contenant 100µl de chaque point d'une gamme de concentration des différents composés préparé avec du DMSO 5% dans du tampon PBS, sont ajoutés 100µl d'hématies préalablement préparées dont la densité optique a été ajustée à 1,5 à 540nm. Un blanc de chaque concentration des composés est réalisé sans ajout d'hématies. Un témoin positif d'hémolyse totale est aussi réalisé avec du triton 1% à la place des composés (Figure 34).

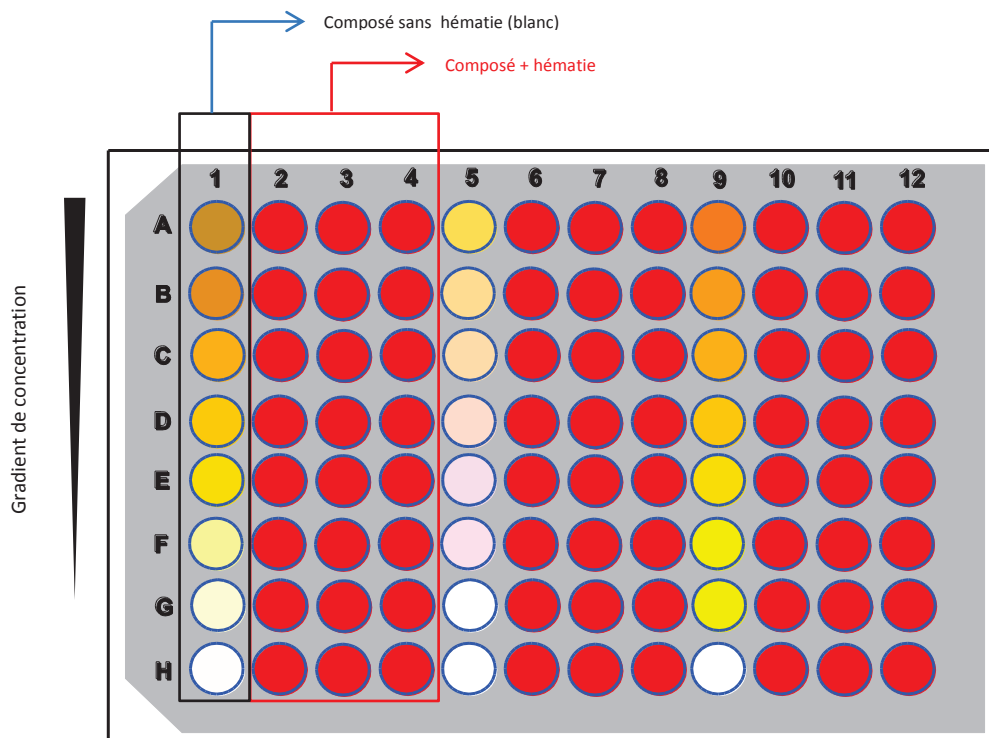


Figure 34: organisation de la plaque pour test d'activité hémolytique

Les microplaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 15 minutes puis centrifugées à 800g pendant 15 minutes à 4°C.

Après centrifugation, 175 µl des surnageants de chaque puits sont prélevés et déposés dans les puits d'une nouvelle microplaque tout en respectant leur position initiale. La DO à 540nm de ces différents surnageants est lue. Les valeurs obtenues permettent de calculer les pourcentages d'hémolyse pour chaque concentration des différents composés testés selon la formule suivante :

**Équation 4**

$$\% \text{ hématie hémolysée} = \frac{DO_i - DO_{comp}}{DO_{tp}} \times 100$$

DO<sub>i</sub> : densité optique du surnageant de chaque concentration de composé + hématie

DO<sub>comp</sub> : Densité optique du blanc de chaque concentration de composé

DO<sub>tp</sub> : Densité optique du surnageant de l'hémolyse totale par le triton

La courbe du pourcentage d'hématie hémolysée en fonction de la concentration de chaque composé est représentée. Dans cette étude, nous avons comparé le pourcentage d'hématie hémolysée induit par 50µg/ml des différents composés isolés dans l'optique d'identifier ceux qui sont mieux tolérés par les hématies humaines.

### III Résultats

#### III.1 Extractions

Après filtration et lyophilisation, tous les extraits issus de la racine de *Morinda morindoides* se présentent sous forme de poudre d'aspect amorphe et de couleur jaune ou jaune orangée. Au niveau des feuilles, les extraits organiques d'une part sont de couleur verte avec un aspect plus ou moins visqueux et d'autre part l'extrait aqueux donne une poudre marron d'aspect amorphe. Tous les extraits obtenus de la tige de cette plante sont des poudres de couleur marron. Les rendements d'extraction ont été déterminés à partir du rapport de la masse de l'extrait sur la masse de poudre sèche utilisée. Ces différents rendements sont présentés par la Figure 35.

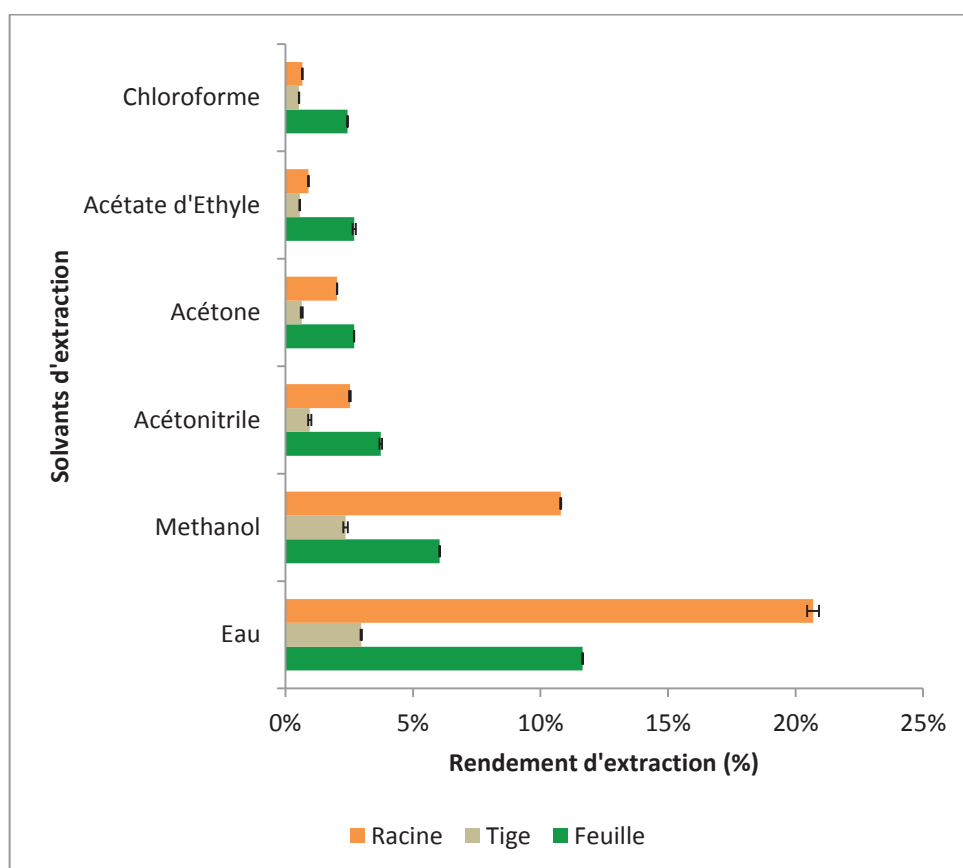
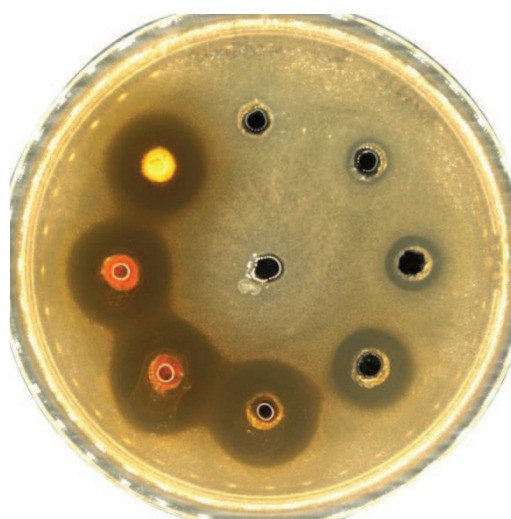


Figure 35: Rendement d'extraction des feuilles, tiges et racines de *Morinda morindoides* en fonction des solvants d'extraction

Les rendements d'extraction observés dépendent à la fois de l'organe de la plante et aussi du solvant utilisé. Ils évoluent avec la polarité du solvant. Quelque soit l'organe utilisé, les extraits issus des solvants polaires présentent des rendements supérieurs à ceux des solvants apolaires.

### ***III.2 Tests d'activités antibactériennes par diffusion en milieu gélosé***

L'activité antimicrobienne des différents extraits est détectée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Figure 36).



**Figure 36: Inhibition par diffusion en milieu gélosé de l'extrait à l'acétonitrile de la racine de *Morinda morindoides* sur *Staphylococcus aureus***

Les rayons d'inhibition à partir du bord du puits de chaque concentration d'extrait sont mesurés puis représentés en fonction de l'inverse de la quantité (en milligramme) d'extrait déposée dans le puits. La valeur qui induit 1 millimètre d'inhibition par mg, ou encore l'activité spécifique exprimé en unité arbitraire par milligramme (UA/mg) d'extrait est représentée par la Figure 37 pour différents micro-organismes.

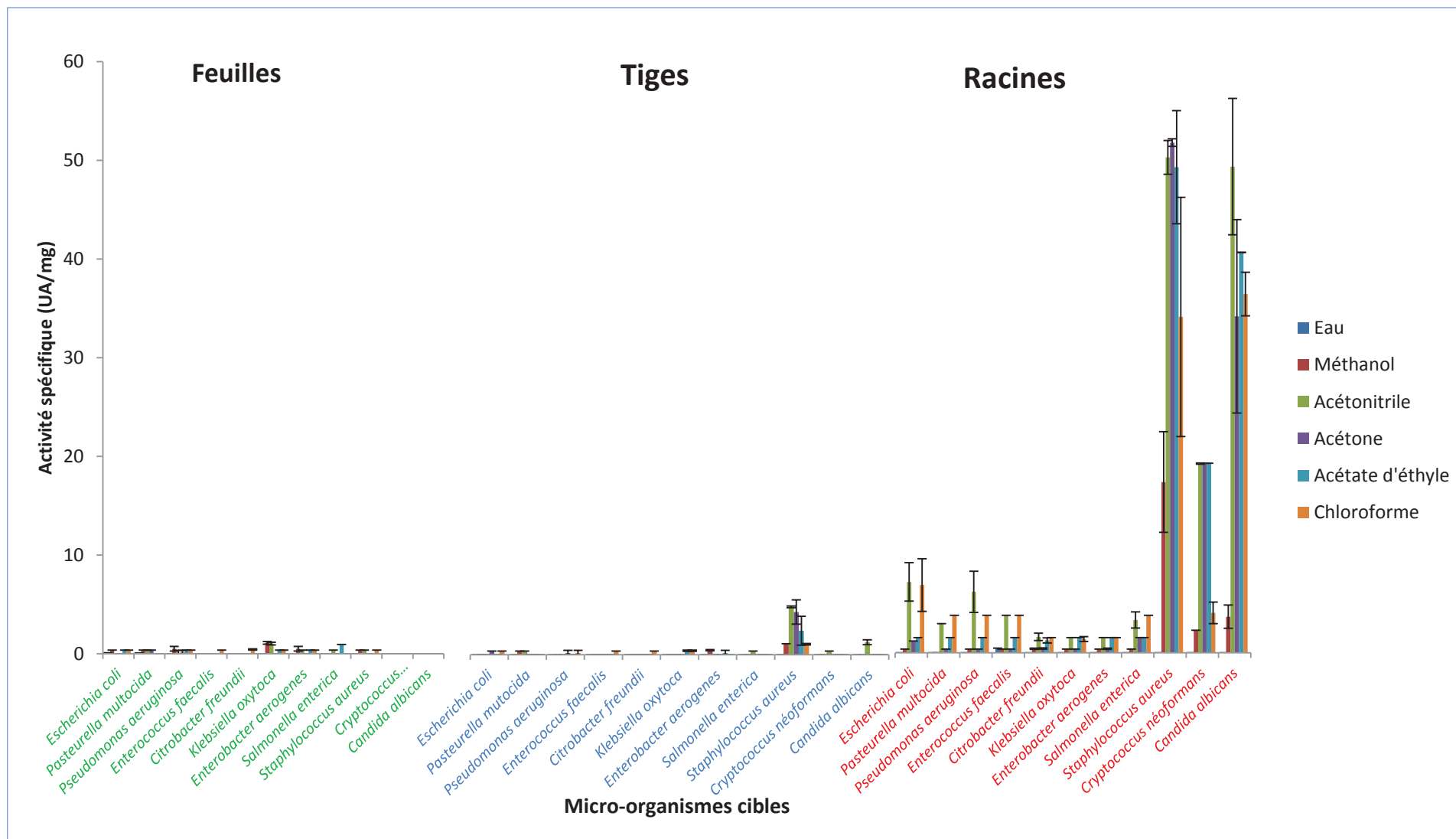


Figure 37: Activité spécifique (UA/mg) des différents extraits de *Morinda morindoides* sur différents micro-organismes

Cette figure laisse apparaître des activités spécifiques antimicrobiennes très variables en fonction de l'organe de la plante et de la souche cible. *Staphylococcus aureus* est le plus sensible avec les extraits de tige et de racines.

Les extraits de la racine obtenus à l'aide des solvants organiques (acétonitrile, chloroforme, et acétate d'éthyle) présentent les meilleures activités spécifiques. L'extrait à l'acétonitrile de la racine a été retenu. Ce dernier a donc été utilisé pour la suite du criblage des composés antimicrobiens.

### ***III.3 Mise en évidence des activités anti-oxydantes des différents extraits***

La détermination du pouvoir antioxydant des différents extraits a été évaluée par le pourcentage du DPPH non réduit en fonction des concentrations des différents extraits. Les résultats sont présentés par la Figure 38.



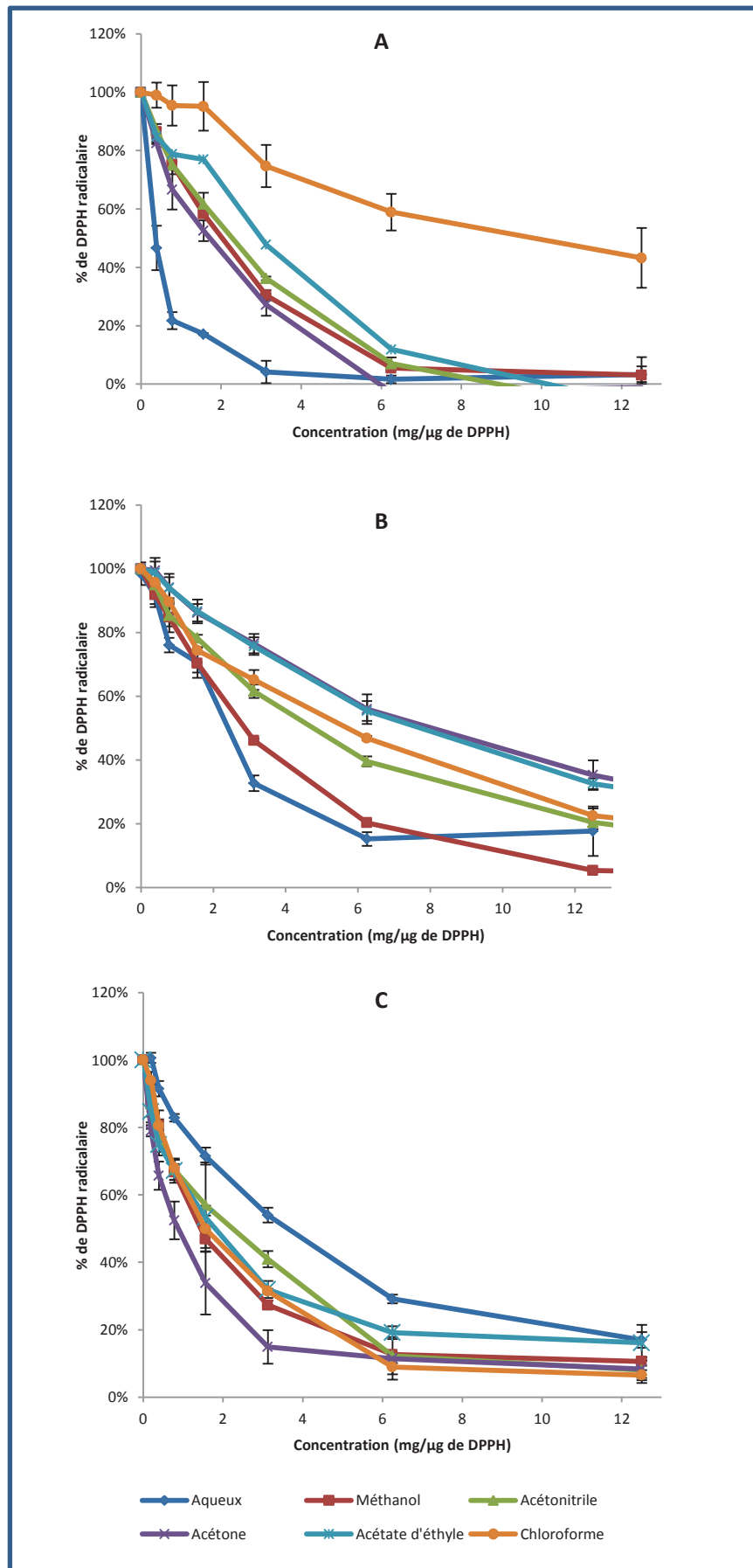


Figure 38: Réduction du DPPH par les extraits de Feuilles (A), de tige (B) et de racine (C) de *M. morindoides*

Ces résultats obtenus montrent une diminution dose-dépendante du DPPH radicalaire (non réduit) au niveau de tous les extraits démontrant ainsi qu'ils possèdent tous une activité antioxydante.

La concentration de chaque extrait qui réduit 50% de DPPH notée EC<sub>50</sub> a été déterminée (Tableau 13)

**Tableau 13: Valeurs des EC<sub>50</sub> des différents extraits de *Morinda morindoides***

Solvant d'extraction	EC <sub>50</sub> des différents extraits (mg/μg de DPPH)		
	Feuille	Tiges	Racines
Eau	0,74	2,41	3,63
Méthanol	2,03	2,87	1,45
Acétonitrile	2,28	4,77	2,24
Acétone	1,72	8,04	0,88
Acétate d'éthyle	3,05	7,73	1,80
Chloroforme	4,90	5,72	1,56

L'extrait aqueux des feuilles présente la meilleure activité antioxydante. Au niveau de la racine c'est l'extrait à l'acétone qui a la meilleure activité.

#### ***III.4 Cinétique d'inactivation de l'extrait à l'acétonitrile sur *Staphylococcus aureus* et sur *Candida albicans****

La cinétique d'inactivation de l'extrait à l'acétonitrile des racines de *Morinda morindoides* a été effectuée sur trois *inocula* différents de *Staphylococcus aureus* et sur deux *inocula* différents de *Candida albicans*. La viabilité des microorganismes en présence de quatre

différentes concentrations de l'extrait à l'acétonitrile des racines (800µg/ml, 400µg/ml, 200µg/ml et 100µg/ml) a été mesurée en fonction du temps (Figure 39).

Les résultats montrent une perte de cultivabilité au cours du temps.

Les cinétiques d'inactivation obtenues ne montrent pas de relation Log linéaire entre les populations et le temps de contact. Ces cinétiques de forme concave peuvent être décrites et modélisées par la fonction cummulative de la loi de probabilité de fréquence de Weibull (Mafart *et al.*, 2002). Cette fonction paramétrée par Mafart est présentée par l'Équation 1. Le modèle selon l'équation de Weibul est représenté en pointillé sur chaque graphique.

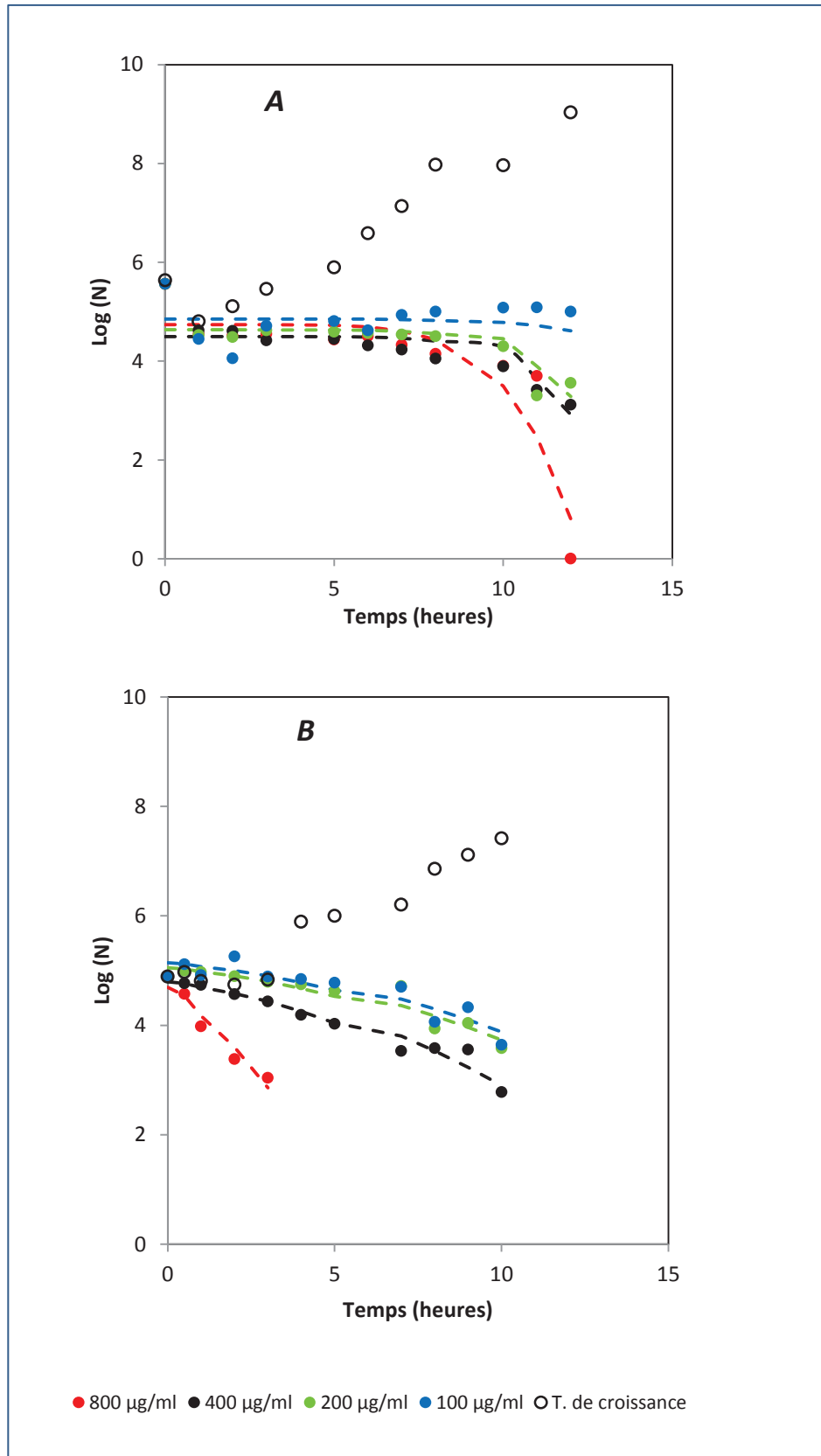


Figure 39: Cinétique d'inactivation de *S. aureus* (A) et *C. albicans* (B) par différentes concentrations d'extrait à l'acétonitrile de la racine de *Morinda morindoides*. Les courbes en pointillé représentent la corrélation selon le model de Weibull

La modélisation des différentes cinétiques d'inactivation a permis de déterminer les valeurs  $N_0$  (nombre d'unité formant colonie initial),  $\delta$  (le temps nécessaire pour une réduction décimale) et  $p$  (paramètre d'ajustement). Ces valeurs sont présentées par Tableau 14

**Tableau 14: Valeurs  $N_0$ ,  $\delta$  et  $p$  issues de la modélisation selon le model de Weibull**

Concentration	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Candida albicans</i>		
	$N_0$	$\delta$	$p$	$N_0$	$\delta$	$p$
800 $\mu\text{g/ml}$	4,66	9,46	6,323	4,89	2,86	1,809
	5,56	9,66	6,323	4,87	2,63	1,809
	5,61	10,31	6,323			
400 $\mu\text{g/ml}$	4,66	9,44	6,323	4,89	7,03	1,809
	5,56	10,23	6,323	4,87	7,18	1,809
	5,61	10,34	6,323			
200 $\mu\text{g/ml}$	4,66	10,29	6,323	4,89	8,58	1,809
	5,56	10,49	6,323	4,87	8,08	1,809
	5,61	10,91	6,323			
100 $\mu\text{g/ml}$	4,66	18,57	6,323	4,89	8,79	1,809
	5,56	13,77	6,323	4,87	9,35	1,809
	5,61	11,83	6,323			

L'évolution de la valeur  $\delta$  (temps nécessaire à une réduction décimale de l'inoculum de départ) en fonction de la concentration de l'extrait pour chaque souche microbienne est présentée par la Figure 40.

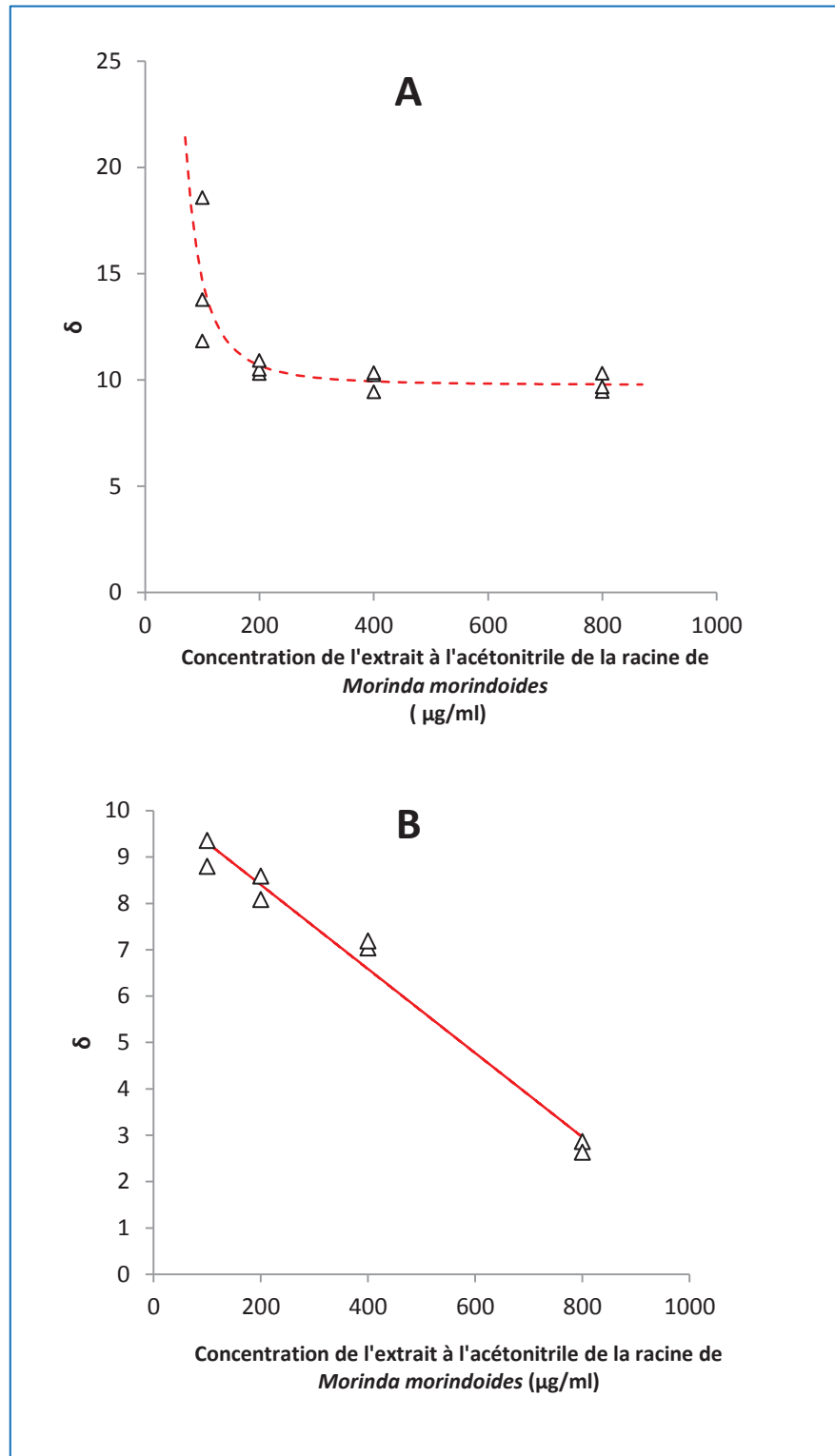


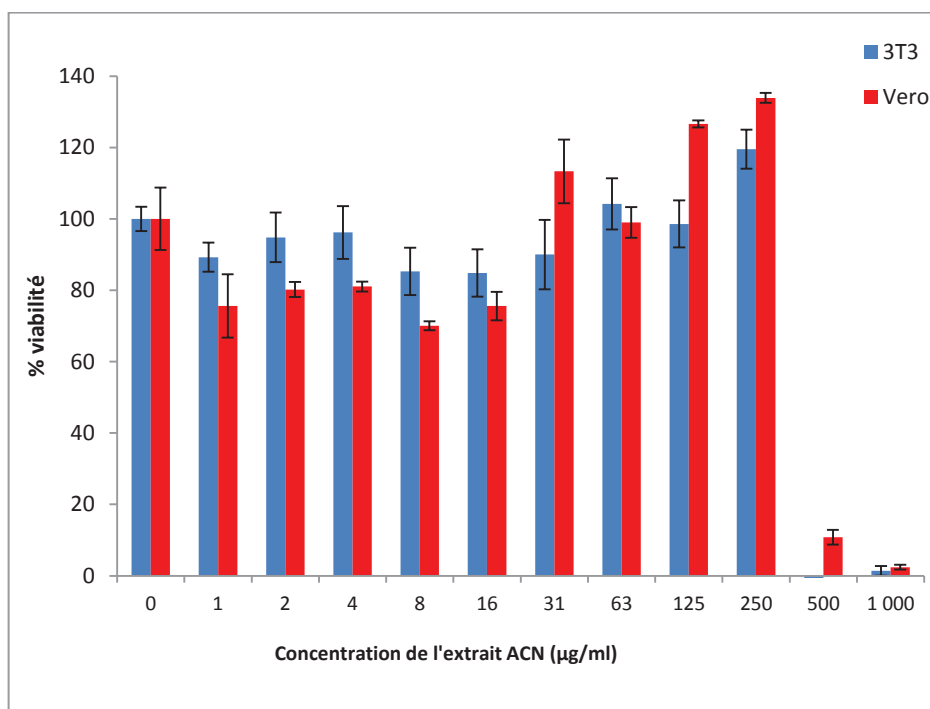
Figure 40: Evolution de la réduction décimale ( $\delta$ ) de *Staphylococcus aureus* (A) et de *Candida albicans* (B) en fonction de la concentration de l'extrait à l'acétonitrile des racines de *Morinda morindoides*

La variation du  $\delta$  permet d'apprécier l'impact de l'extrait sur le micro-organisme cible. Avec *Staphylococcus aureus*, on observe une décroissance du  $\delta$  jusqu'à une concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$  d'extrait. Au-delà de cette concentration les valeurs du  $\delta$  n'évoluent plus.

Au niveau de la levure (*Candida albicans*), on observe une diminution de la valeur de  $\delta$  avec l'augmentation de la concentration de l'extrait.

### III.5 Activité cytotoxique de l'extrait à l'acétonitrile de la racine de *Morinda morindoides*

Les tests d'activité cytotoxique de l'extrait à l'acétonitrile de la racine de *Morinda morindoides* ont été effectués sur les cellules 3T3 et VERO. Ils ont révélé une absence de cytotoxicité jusqu'à 250 $\mu\text{g/ml}$  (Figure 41). A 500 $\mu\text{g/ml}$ , on assiste à un effet cytotoxique brutal qui affecte la totalité des cellules 3T3 et environ 90% des cellules VERO (Figure 41),.



**Figure 41: Viabilité de cellules 3T3 et Vero en fonction de la concentration d'extrait à l'acétonitrile de la racine de *Morinda morindoides***

A partir de la représentation du pourcentage de viabilité des cellules en fonction de la concentration de l'extrait des  $CI_{50}$  de 420,32 $\mu$ g/ml pour les VERO et 388,33 $\mu$ g/ml pour les cellules 3T3 ont été déterminées.

## **III.6 purification**

### **III.6.1 Analyse chromatographique des extraits de racine de *M morindoides***

Les extraits organiques (extrait à l'acétone, extrait à l'acétate d'éthyle et l'extrait au chloroforme) de la racine de *Morinda morindoides* ont révélé des activités spécifiques similaires. Les profils chromatographiques de 200 $\mu$ g de ces derniers ont été comparés (Figure 42).

La Figure 42 montre que les différents extraits organiques de la racine présentent les mêmes pics mais en proportions différentes. L'extrait à l'acétonitrile de la racine présente la meilleure résolution chromatographique. Il a donc été sélectionné pour la suite de l'étude.



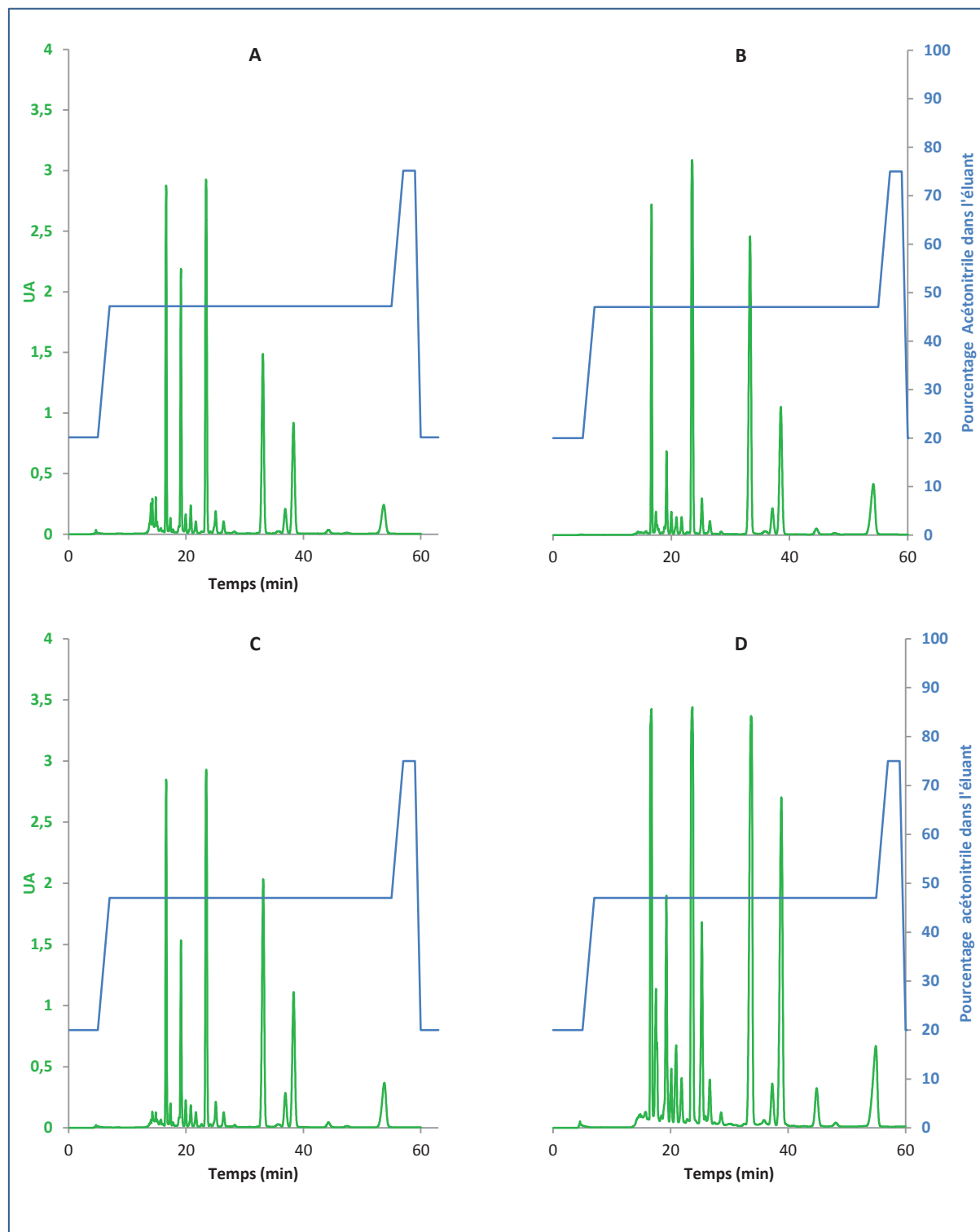
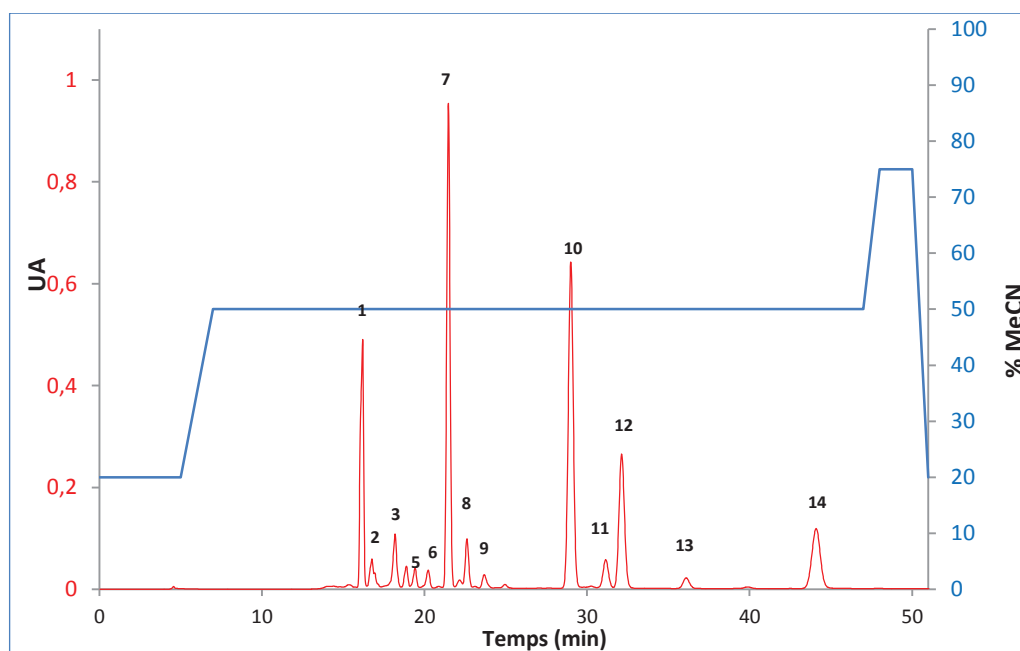


Figure 42: Profil chromatographique HPLC des extraits organique de la racine de *Morinda morindoides* : extrait à l'acétone (A), extrait au chloroforme(B), extrait à l'acétate d'éthyle(C), extrait à l'acétonitrile (D)

### III.6.2 Purification des composés de l'extrait à l'acétonitrile

Le fractionnement de l'extrait à l'acétonitrile de la racine de *Morinda morindoides* est réalisé par HPLC sur une colonne C<sub>18</sub>. L'élution est effectuée par un mélange d'eau et d'acétonitrile à un débit de 1 ml par minute. Le chromatogramme obtenu après optimisation est présenté par la Figure 43.



**Figure 43: Chromatogramme 50µg de l'extrait à l'acétonitrile des racines de *Morinda morindoides* par HPLC sur colonne C<sub>18</sub>. Les numéros des fractions sont marqués au-dessus de chaque pic**

Ces fractions ont été collectées, lyophilisées puis conservées pour diverses analyses (résonance magnétique nucléaire, spectrométrie de masse à haute résolution et les tests d'activités biologiques).

### **III.7 Caractérisation structurale**

La caractérisation structurale des composés présents dans l'extrait à l'acétonitrile de la racine de *Morinda morindoides* a été menée par la combinaison de la spectrométrie de masse (SM) à haute résolution et par la résonance magnétique nucléaire (RMN).

Le spectre de masse à haute résolution de chaque composé isolé a révélé leur formule brute à partir de la masse exacte et de leur spectre d'abondance isotopique.

La RMN a fourni le spectre 1D du  $H^1$ , et les spectres à deux dimensions dont la COSY DQF, la HMQC  $H^1$ -  $C^{13}$ , et la HMBC  $H^1$  –  $C^{13}$ . L'analyse de ces spectres ont permis de déterminer la structure de chaque phytomolécule isolée.

Le spectre d'absorption UV-Visible de chaque composé a également été mesuré et a permis de déterminer les différentes longueurs d'onde d'absorption maximale ( $\lambda_{max}$ ) pour chacun des composés isolés.

Les données spectrales de chaque phytomolécule purifiée à partir de l'extrait à l'acétonitrile de la racine de *Morinda morindoides* sont présentées de façon suivante :

**Fraction 1**Le spectre de masse en ESI

Le spectre de masse a été réalisé par Waters Q-TOF 2, en électrobulbation (ESI) mode positif avec un mélange de CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (90/10). L'ion [M+Na]<sup>+</sup> de m/z 307 a été mesuré. La formule brute déduite est C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>Na dont la masse théorique m/z donne 307,0582 et la masse exacte m/z a donné 307,0580

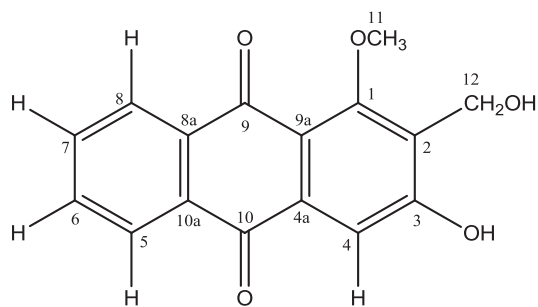
Résonance Magnétique Nucléaire 500MHz

Le spectre RMN de <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C de la fraction sont présentés par le tableau qui ci-dessous

**Tableau 15: Spectre RMN de la F1**

Position	Dans l'acétone d6		Dans du DMSO d6 (Li <i>et al.</i> , 2006)
	δ <sub>c</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>c</sub>
1	162,8		161,67
2	128,4		128,82
3	163,7		162,12
4	111,3	7,54 (s, 1H)	109,79
4a	119,6		135,37
5	126,9	8,17 (d, 1H, 3J <sub>HH</sub> =7,5)	126,11
6	133,9	7,82 (t, 1H, 3j <sub>HH</sub> =7,5)	133,38
7	135,0	7,88 (t, 1H, 3J <sub>HH</sub> =7,6)	134,61
8	127,6	8,22 (d, 1H, 3J <sub>HH</sub> =8,0)	126,68
8a	127,6		134,56
10	183,5		182,56
11	62,4	3,92( s 3H, CH <sub>3</sub> )	62,41
12	56,9	4,99 (s, 2H, CH <sub>2</sub> )	52,8

Formule développée :



Damnacanthol (Rath *et al.*, 1995; Xiang *et al.*, 2008)

Spectre d'absorbance UV/visible

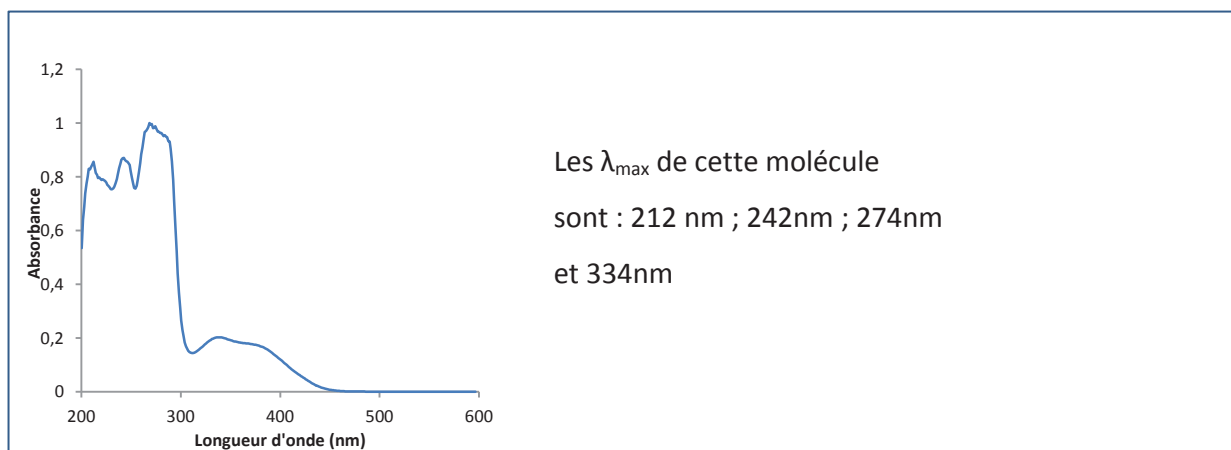


Figure 44: Spectre d'absorption UV-visible de la F1

**Fraction 2**Le spectre de masse en ESI

Le spectre de masse a été réalisé par Waters Q-TOF 2, en électrobulbation (ESI) mode positif avec un mélange de CH<sub>3</sub>OH. L'ion [M+Na]<sup>+</sup> de m/z 277 a été mesuré.

La formule brute déduite est C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>Na dont la masse théorique m/z donne 277,0477 et la masse exacte m/z a donné 277,0477.

Résonance Magnétique Nucléaire 500MHz

Le spectre RMN de <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C de la fraction sont présentés par le Tableau 16 et les figures ci-dessous

**Tableau 16: Spectre RMN de la F2**

Position	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>
1	106,0	7,00 (d - 1H - <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =2,5 - H <sub>1</sub> )
2		
3	107,0	7,36 (d - 1H - <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =2,5 - H <sub>3</sub> )
3a	115,7	
4	126,9	8,15 (d - 1H - <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =8,0 - H <sub>4</sub> )
5	133,5	7,78 (t - 1H - <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =8,0 - H <sub>5</sub> )
6	135,0	7,85 (t - 1H - <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =8,0 - H <sub>6</sub> )
7	127,5	8,19 (d - 1H - <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =8,0 - H <sub>7</sub> )
7a	136,3	
8	180,5	
8a	115,3	
9	183,8	
9a	133,0	
10	164,3	
11		3,96 (s - 3H - CH <sub>3</sub> )

fraction 2 dans acetone-d6

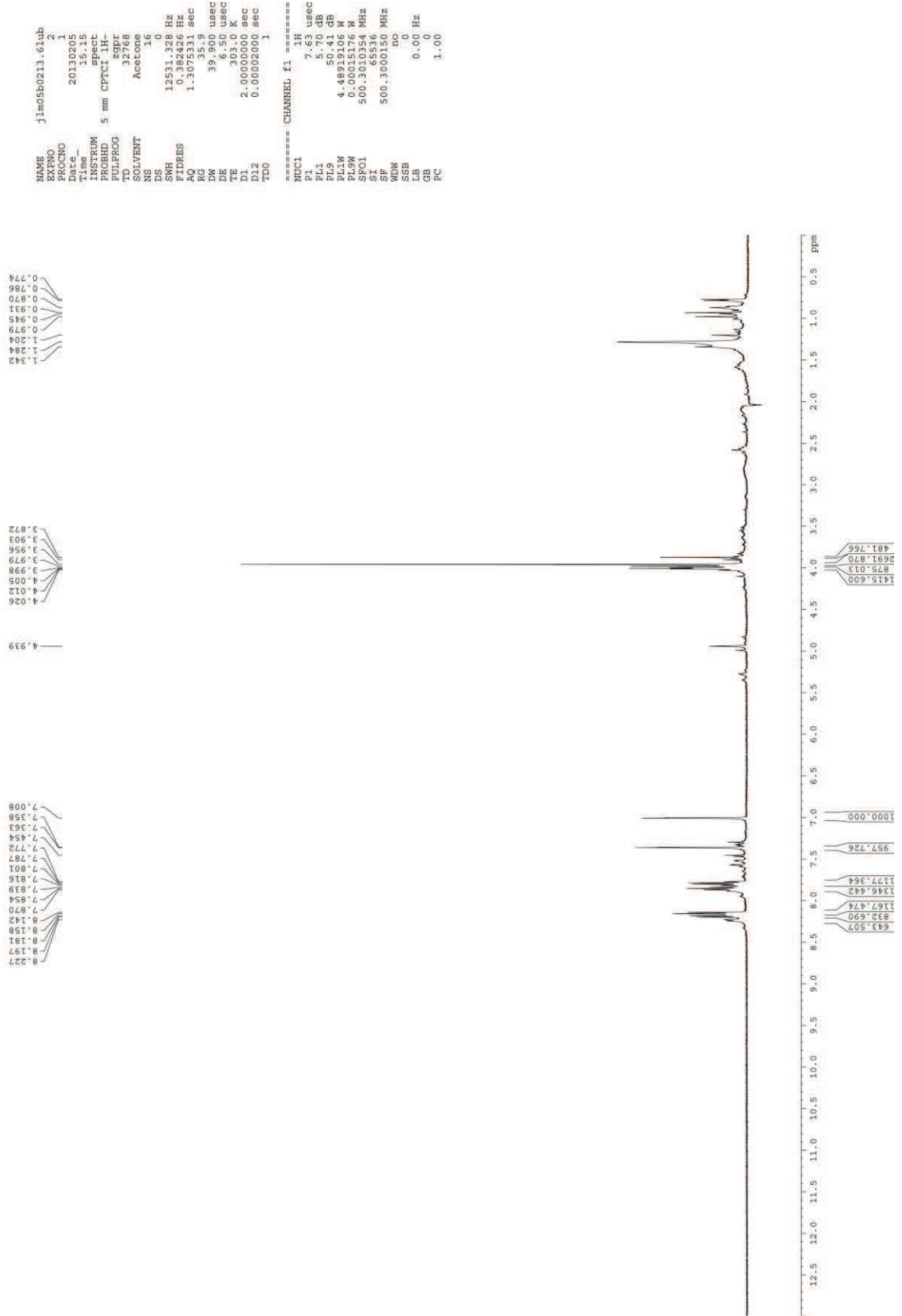


Figure 45: RMN  $^1\text{H}$  de la F2





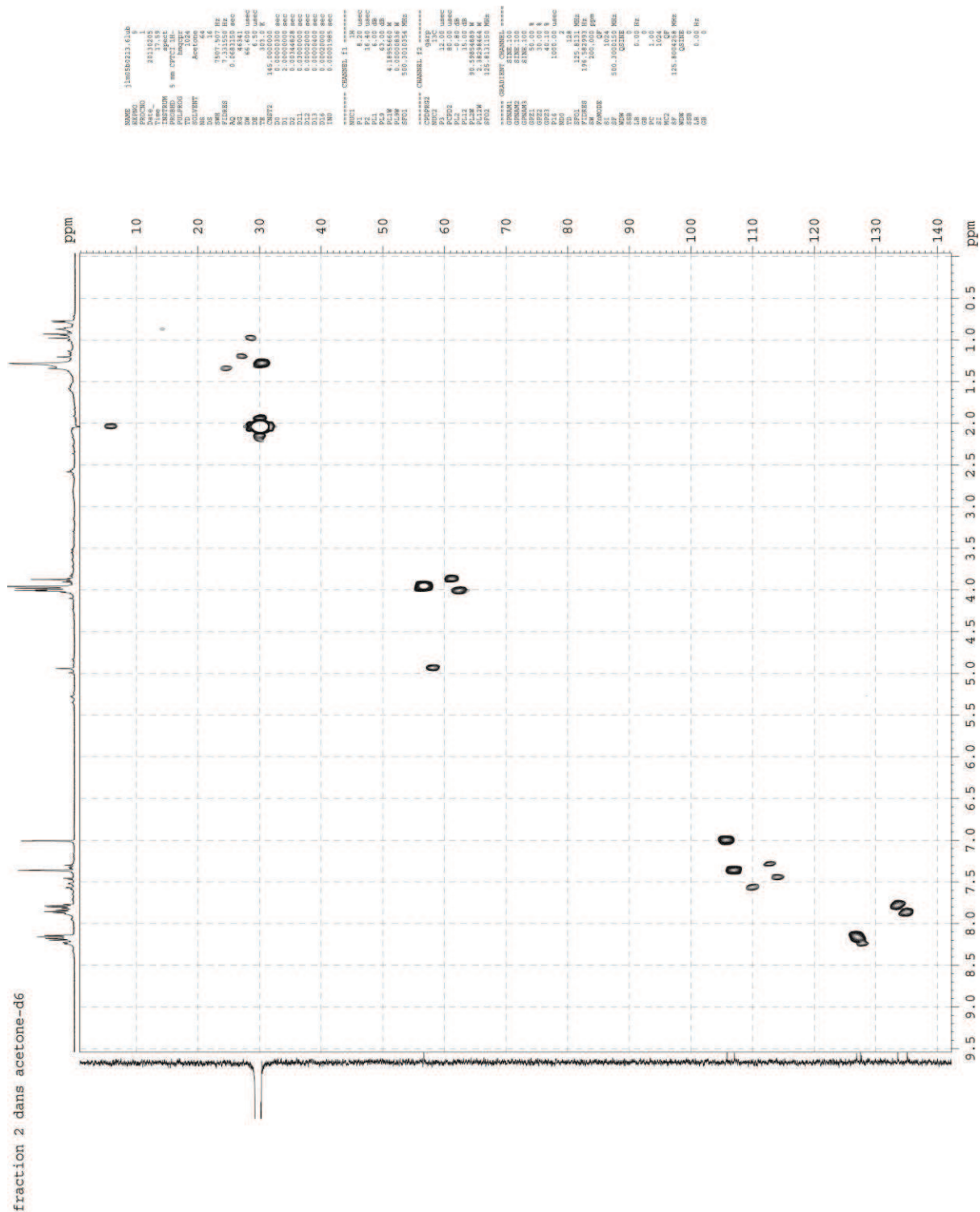


Figure 47: RMN HMQC de la F2

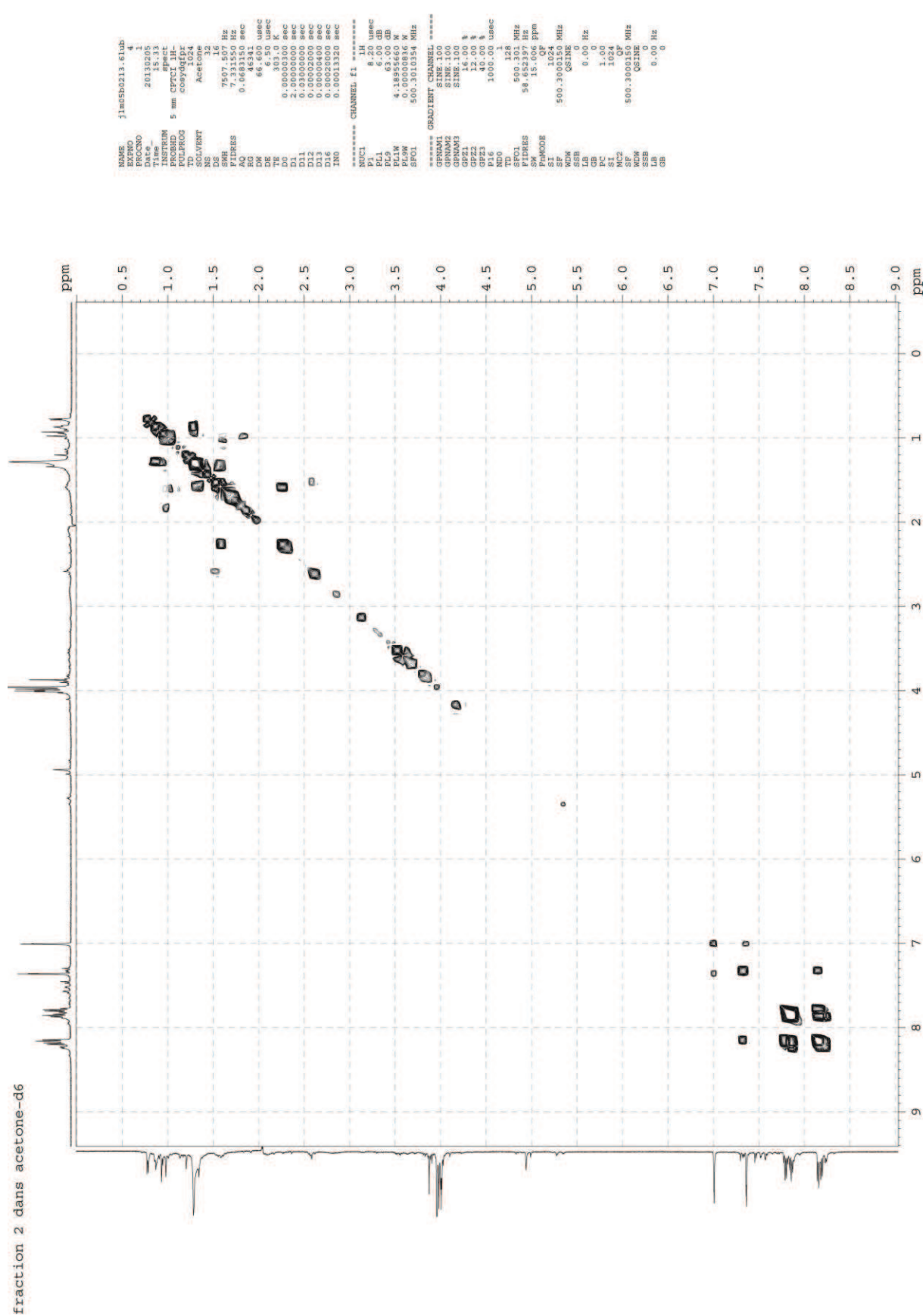
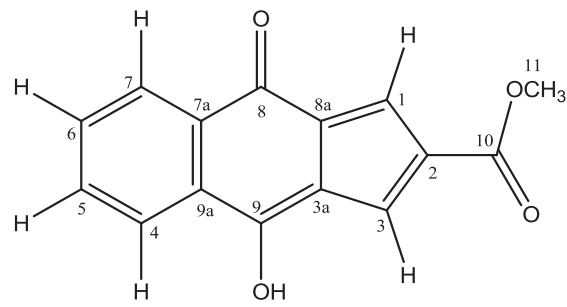


Figure 48: RMN COSY de la F2

Formule développée :



La morindoïdine

Spectre d'absorbance UV/visible

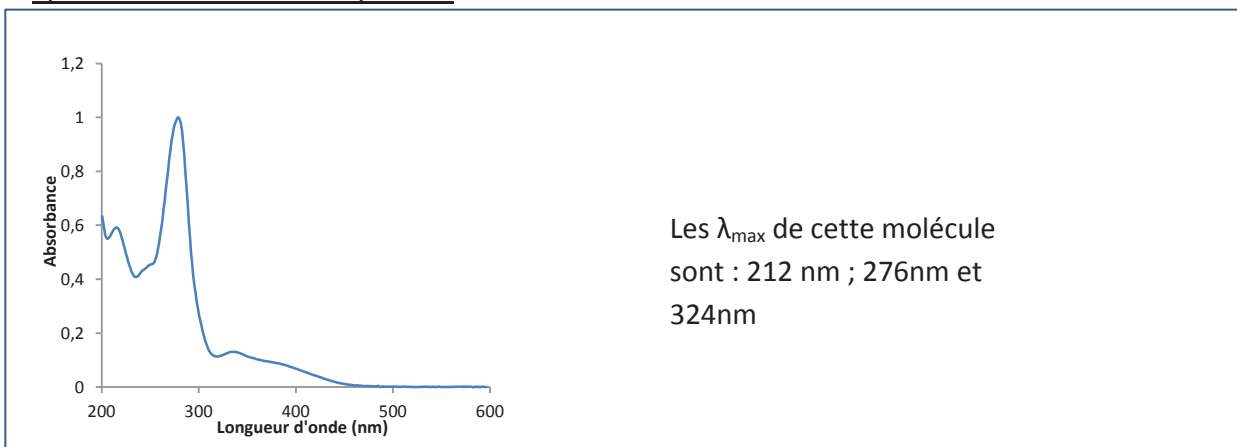


Figure 49: Spectre d'absorption UV-visible de la F2

**Fraction 3**Le spectre de masse en ESI

Le spectre de masse a été réalisé par Waters Q-TOF 2, en électrospray (ESI) mode positif avec de CH<sub>3</sub>OH. L'ion [M+Na]<sup>+</sup> de m/z 293 a été mesuré.

La formule brute déduite est C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>Na dont la masse théorique m/z donne 293,0426 et la masse exacte m/z a donné 293,0421.

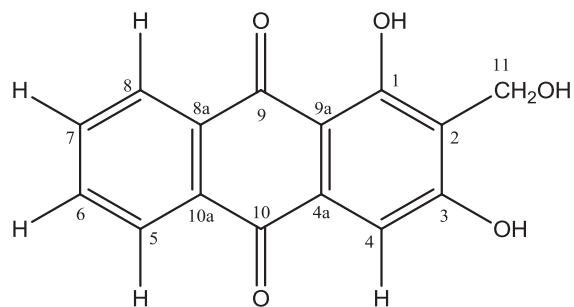
Résonance Magnétique Nucléaire 500MHz

Le spectre RMN de <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C de la fraction sont présentés par le tableau qui ci-dessous

**Tableau 17: spectre RMN de la F3**

Position	Dans de l'acétone d6		Dans du chloroforme (Boroto <i>et al.</i> , 2008)
	δ <sub>c</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>H</sub>
1	163,0		
2	119,3		
3	164,9		
4	109,1	7,26 – (s ; 1H ; H <sub>4</sub> )	7,31 (s )
4a	110,5		
5	127,4	8,22 (dd ; 1H ; <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =7,5 ; <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> =1,5 ; H <sub>5</sub> )	8,24 (dd ; J= 7,1 ; J= 1,6)
6	135,0	7,91 (m ; 2H ; H <sub>6</sub> )	7,72 (td ; J= 7,5 ; J=1,6 )
7	135,0	7,91 (m ; 2H ; H <sub>7</sub> )	7,70 (td ; J=7,5 ; J = 1,6)
8	126,7	8,28 (dd ; 1H ; <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =7,5 ; <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> =1,5 ; H <sub>8</sub> )	8,19 (dd ; 3J <sub>HH</sub> = 7,1 ; 4J <sub>HH</sub> = 1,6)
9	188,0		
10	182,5		
11	56,8	4,99 (s – 2H – CH <sub>2</sub> )	5,08 (s)

Formule développée :



Lucidin (Borroto *et al.*, 2008)

Spectre d'absorbance UV/visible

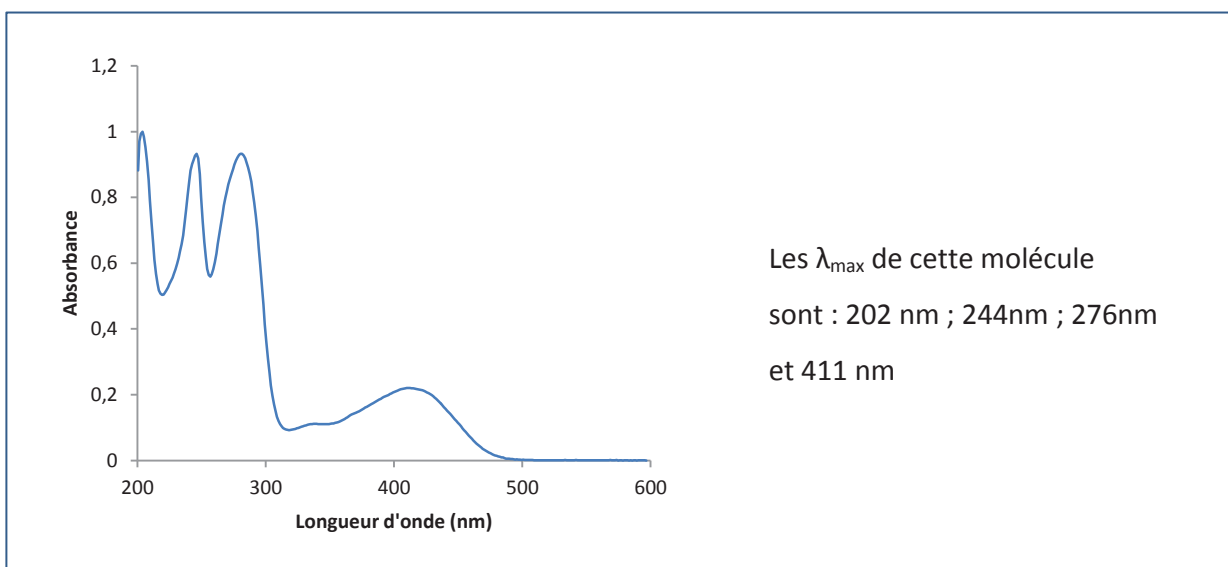


Figure 50: Spectre d'absorption UV-visible de la F3

**Fraction 4**Le spectre de masse en ESI

Le spectre de masse a été réalisé par Waters Q-TOF 2, en électronébulisation (ESI) mode positif avec de CH<sub>3</sub>OH. L'ion [M+Na]<sup>+</sup> de m/z 277 a été mesuré.

La formule brute déduite est C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>Na dont la masse théorique m/z 277,0477 et la masse exacte m/z a donné 277,0478.

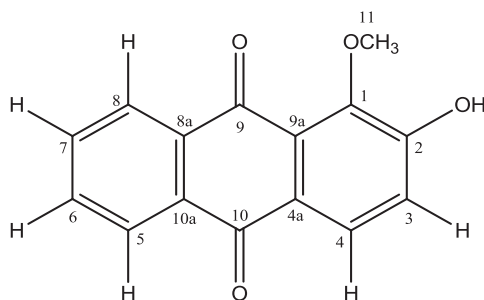
Résonance Magnétique Nucléaire 500MHz

Le spectre RMN de <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C de la fraction sont présentés par le tableau qui ci-dessous

**Tableau 18: Spectre RMN de la F4**

Position	Dans de l'acétone		Dans du chloroforme (Zhu <i>et al.</i> , 2009)
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>H</sub>
1	148,5		
2	158,2		
3	121,7	7,39 (d ; 1H ; <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =8,5 ; H <sub>3</sub> )	7,36 (d ; 1H ; J=8,4 ; H <sub>3</sub> )
4	125,8	8,03 (d ; 1H ; <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =8,5 ; H <sub>4</sub> )	8,14 (d ; 1H ; J=8,4 ; H <sub>4</sub> )
4a	127,3		
5	134,5	8,21 (m ; 2H ; H <sub>5</sub> )	8,25 (m ; 2H, H <sub>5</sub> )
6	127,1	7,86 (m ; 2H ; H <sub>6</sub> )	7,77 (m , 2H ; H <sub>6</sub> )
7	127,1	7,86 (m ; 2H ; H <sub>7</sub> )	7,77 (m , 2H ; H <sub>7</sub> )
8	134,5	8,21 (m ; 2H ; H <sub>8</sub> )	8,25 (m ; 2H, H <sub>8</sub> )
8a	125,8		
9a	126,0		
10	182,8		
10a	125,8		
11	61,7	3,94 (s ; 3H ; CH <sub>3</sub> )	4,04 (s ; 3H ; OCH <sub>3</sub> )

Formule développée :



F4 : Alizarin-1 méthyl éther (Jasril *et al.*, 2003; Fraga *et al.*, 2009)

Spectre d'absorbance UV/visible

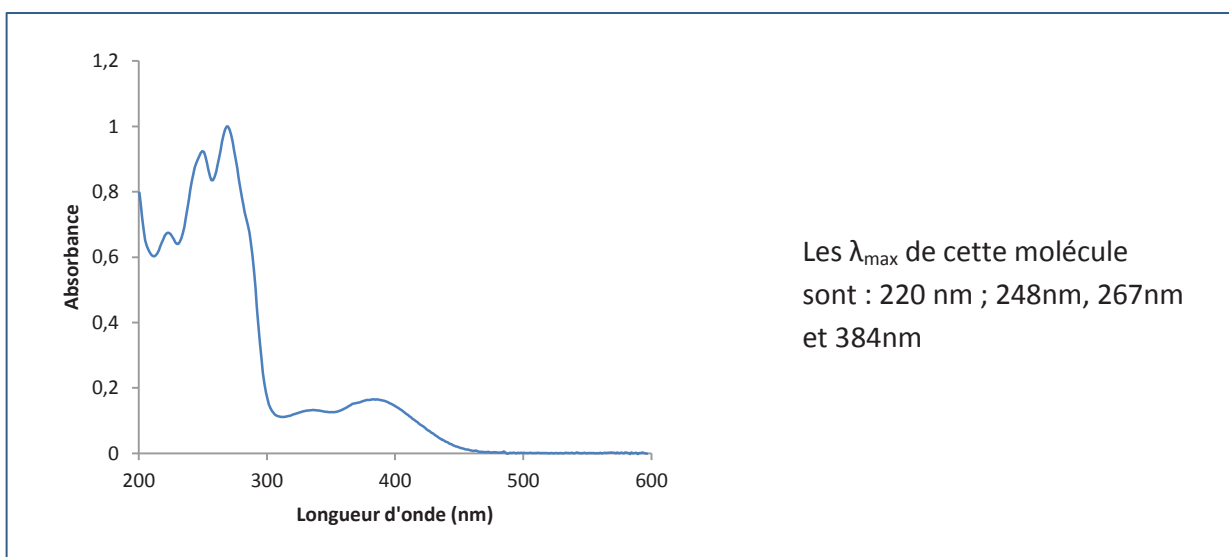


Figure 51: Spectre d'absorption UV-visible de la F4

**Fraction 6**Le spectre de masse

Le spectre de masse a été réalisé par Bruker MicroTOF-Q II, par introduction direct (ASAP) mode positif à 400°C. L'ion  $[M+H]^+$  de  $m/z$  255 a été mesuré.

La formule brute déduite est  $C_{15}H_{11}O_4$  dont la masse théorique  $m/z$  255,0657 et la masse exacte  $m/z$  a donné 255,0652.

Résonance Magnétique Nucléaire 500MHz

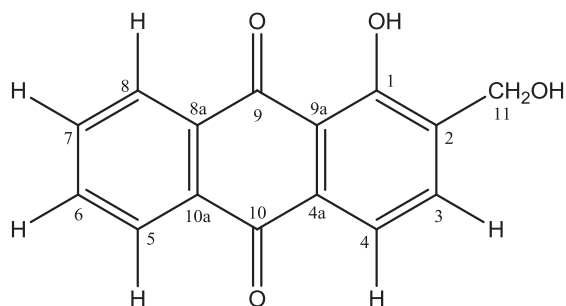
Le spectre RMN de  $^1H$  et du  $^{13}C$  de la fraction sont présentés par le tableau qui ci-dessous

**Tableau 19: spectre RMN de la F6**

	Dans de l'acétone D6	
Position	$\delta_c$	$\delta_H$
1	159,7	
2	139,2	
3	134,5	8,00 (d ; 1H ; $^3J_{HH}=7,5$ ; H <sub>3</sub> )
4	119,2	7,84 (d ; 1H ; $^3J_{HH}=7,5$ ; H <sub>4</sub> )
4a	133,0	
5	127,8	8,26 (d ; 1H ; $^3J_{HH}=7,6$ ; H <sub>5</sub> )
6	135,8	7,94 (m ; 1H ; H <sub>6</sub> )
7	135,2	7,96 (m ; 1H ; H <sub>7</sub> )
8	127,5	8,32 (d ; 1H ; $^3J_{HH}=7,2$ ; H <sub>8</sub> )
9	190,0	
9a	116,0	
10	182,8	
11	58,9	4,82 (s ; 2H ; CH <sub>2</sub> ) 12,91 (brs ; OH)



Formule développée :



F6 : Digiferruginol (Arrebola *et al.*, 1999; Fraga *et al.*, 2009)

Spectre d'absorbance UV/visible

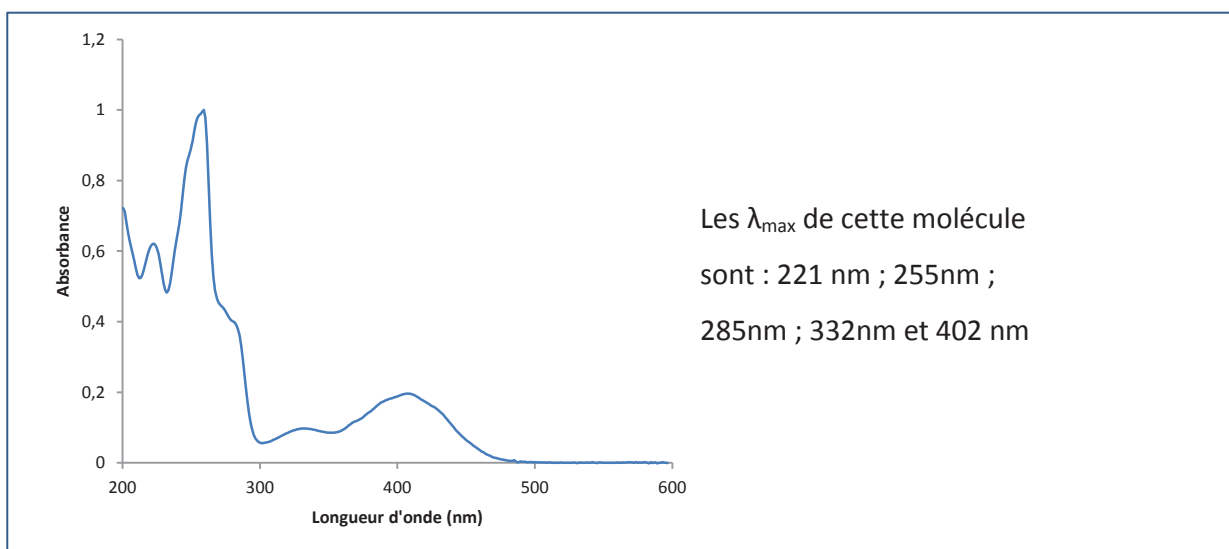


Figure 52: Spectre d'absorption UV-visible de la F6

**Fraction 7**Le spectre de masse en ESI

Le spectre de masse a été réalisé par Waters Q-TOF 2, en électrobulbation (ESI) mode positif avec de CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (90:10). L'ion [M+Na]<sup>+</sup> de m/z 291 a été mesuré.

La formule brute déduite est C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>Na dont la masse théorique m/z 291,0633 et la masse exacte m/z a donné 291,0629.

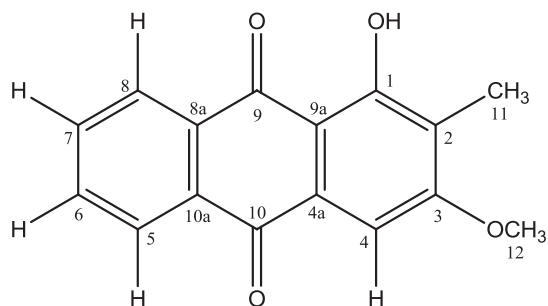
Résonance Magnétique Nucléaire 500MHz

Le spectre RMN de <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C de la fraction sont présentés par le tableau qui ci-dessous

**Tableau 20: Spectre RMN de la F7**

	Acetone d6	
Position	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>
1		
2	127,2	
3		
4	109,7	7,63 (s ; 1H ; H <sub>4</sub> )
4a		
5	127,0	8,15 (d, 1H ; <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =8,0 ; H <sub>5</sub> )
6	133,7	7,82 (td ; 1H ; <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =7,5 ; <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> =1,0 ; H <sub>6</sub> )
7	134,8	7,88 (td ; 1H ; <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =7,5 ; <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> =1,0 ; H <sub>7</sub> )
8	127,4	8,22 (d ; 1H ; <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =7,5 ; H <sub>8</sub> )
8a		
9	181,5	
10	183,5	
9a	119,5	
11	9,0	2,25 (s ; 3H ; CH <sub>3</sub> )
12	61,3	3,88 (s ; 3H ; OCH <sub>3</sub> )

Formule développée :



F7 : 1 hydroxy-2 méthyl- 3 methoxyanthraquinone (Fraga *et al.*, 2009)

Spectre d'absorbance UV/visible

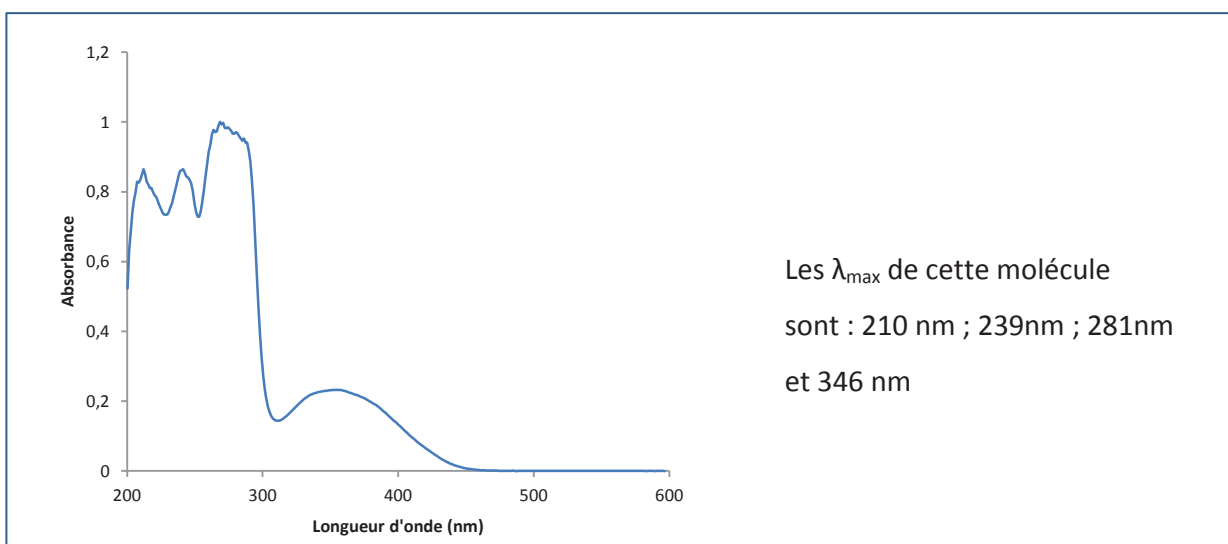


Figure 53: Spectre d'absorption UV-Visible de la F7

**Fraction 8**Le spectre de masse en ESI

Le spectre de masse a été réalisé par Waters Q-TOF 2, en électrobulbation (ESI) mode positif avec de CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (90:10). L'ion [M+Na]<sup>+</sup> de m/z 321 a été mesuré.

La formule brute déduite est C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>Na dont la masse théorique m/z 321,0739 et la masse exacte m/z a donné 321,0740.

Résonnance Magnétique Nucléaire 500MHz

Le spectre RMN de <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C de la F8 sont présentés par le Tableau 21 les figures ci-dessous

**Tableau 21: spectre RMN de la F8**

	Dans de l'acétone d6	
Position	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>
1	164,7	
2	161,7	
3	127,2	
4	109,8	
4a	114,3	7,61 (s ; 1H ; H <sub>4</sub> )
5	109,8	7,58 (d ; 1H ; <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> =1,3 ; H <sub>5</sub> )
6	161,8	
7	121,4	7,37 (dd ; 1H ; <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =9,0 ; <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> =1,3 ; H <sub>7</sub> )
8	130,0	8,16 (d ; 1H ; <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> =9,0 ; H <sub>8</sub> )
8a	135,5	
9	180,5	
9a	134,7	
10	183,0	
10a	19,3	
11	56,7	3,99 (s ; 3H ; OCH <sub>3</sub> )
12	9,0	2,24 (s ; 3H, CH <sub>3</sub> )
13	61,4	3,86 (s ; 3H ; OCH <sub>3</sub> )

Fraction 8 dans acetone-d6

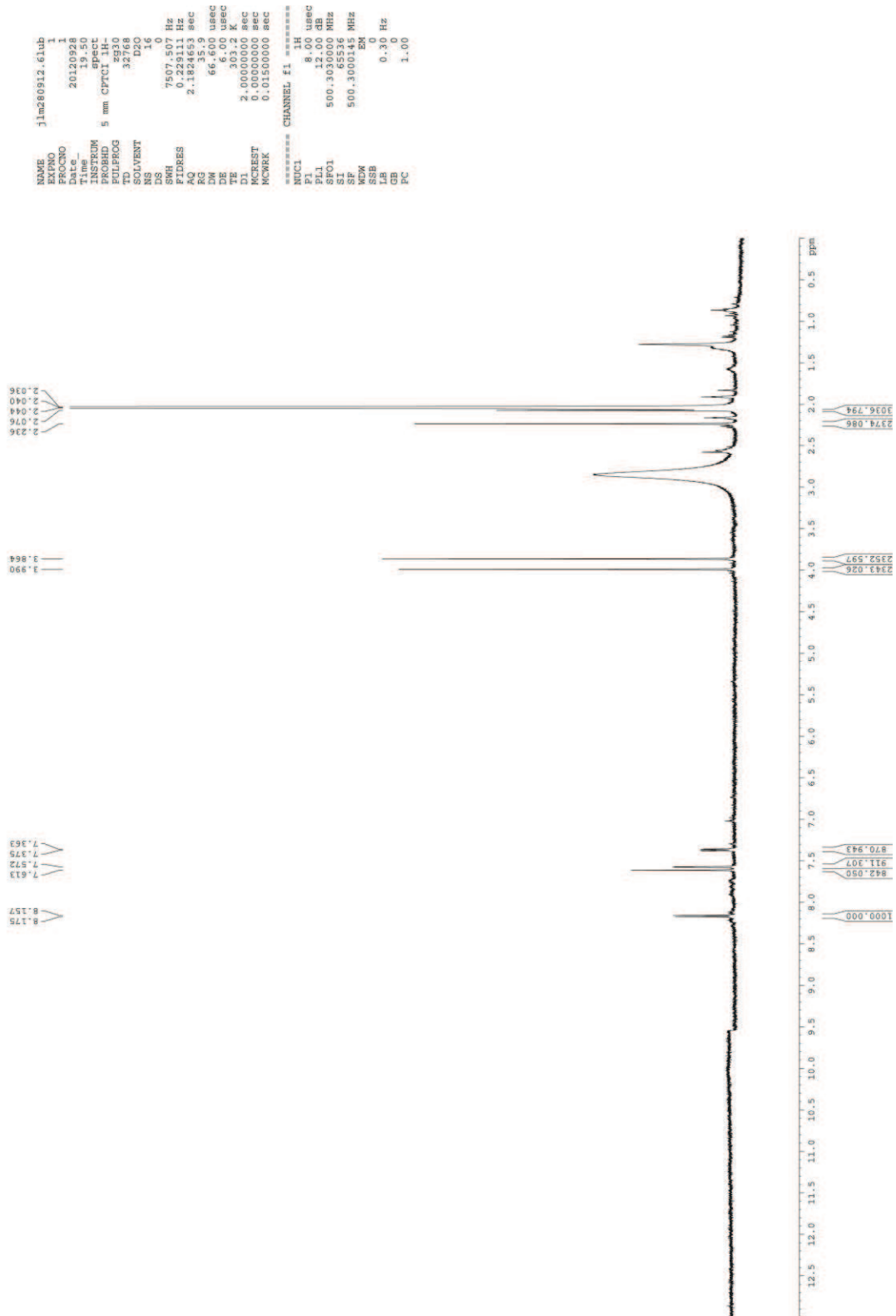


Figure 54: RMN <sup>1</sup>H de la F8

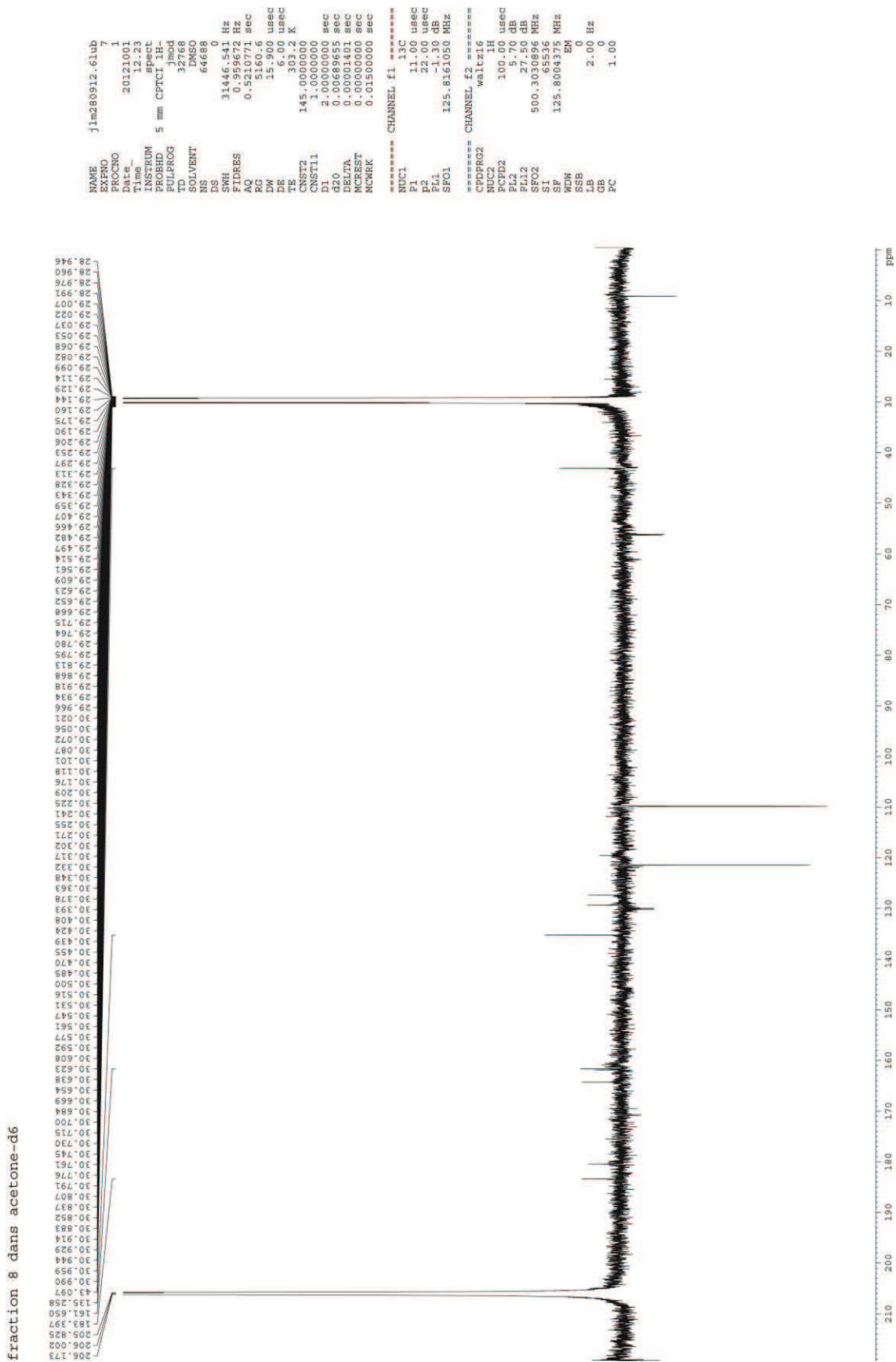


Figure 55: RMN 13C de la F8



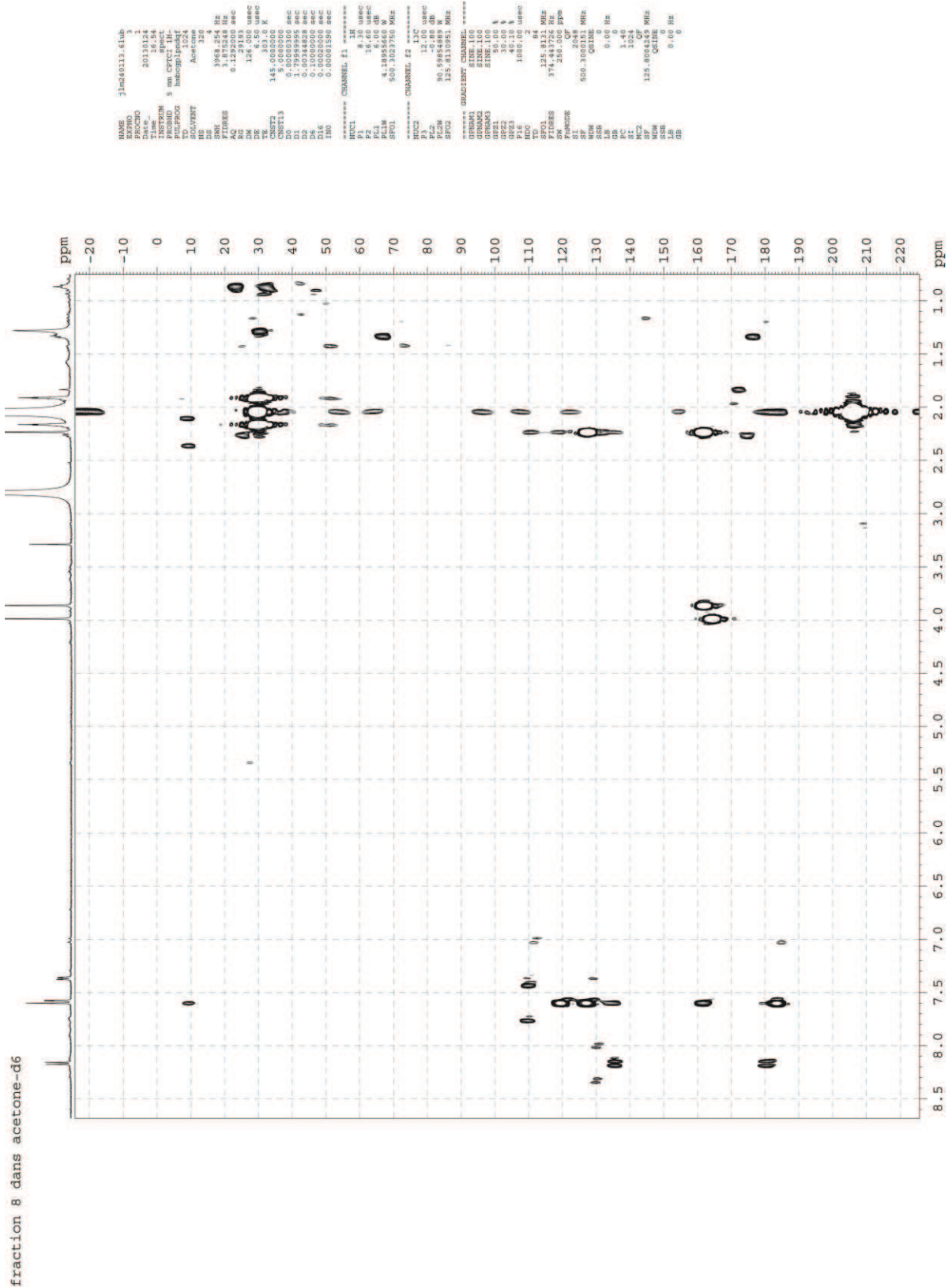
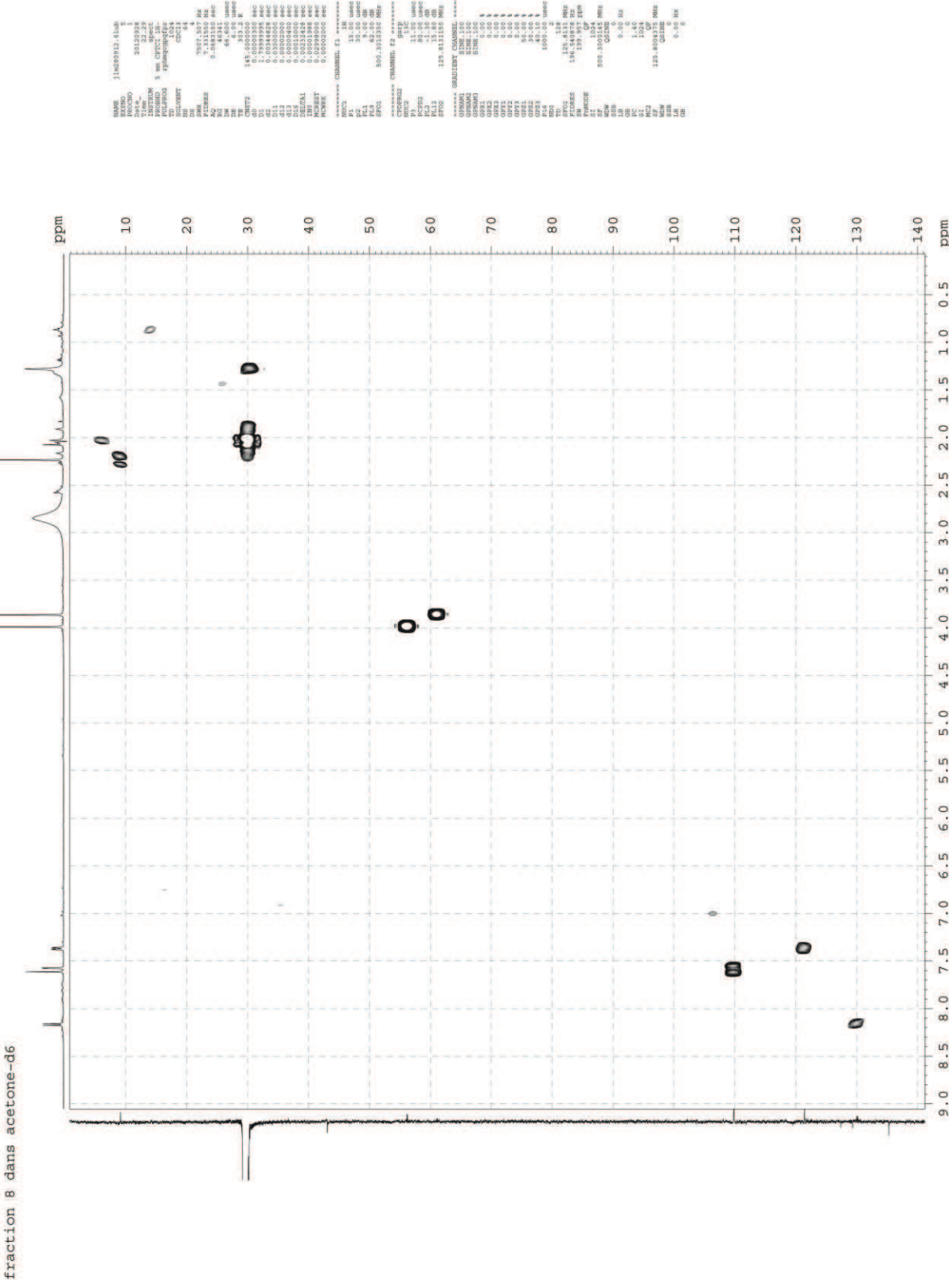
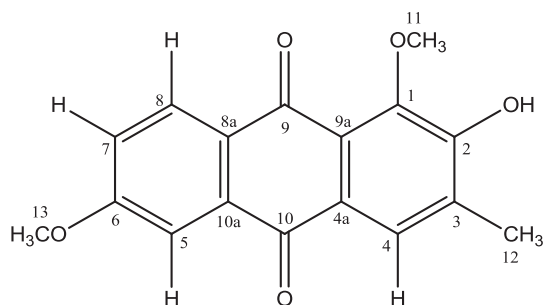


Figure 57: RMN HMBC de la F8





Formule développée :



F8 : 1,6-diméthoxy 2 hydroxy 3 méthyle anthraquinone

Spectre d'absorbance UV/visible

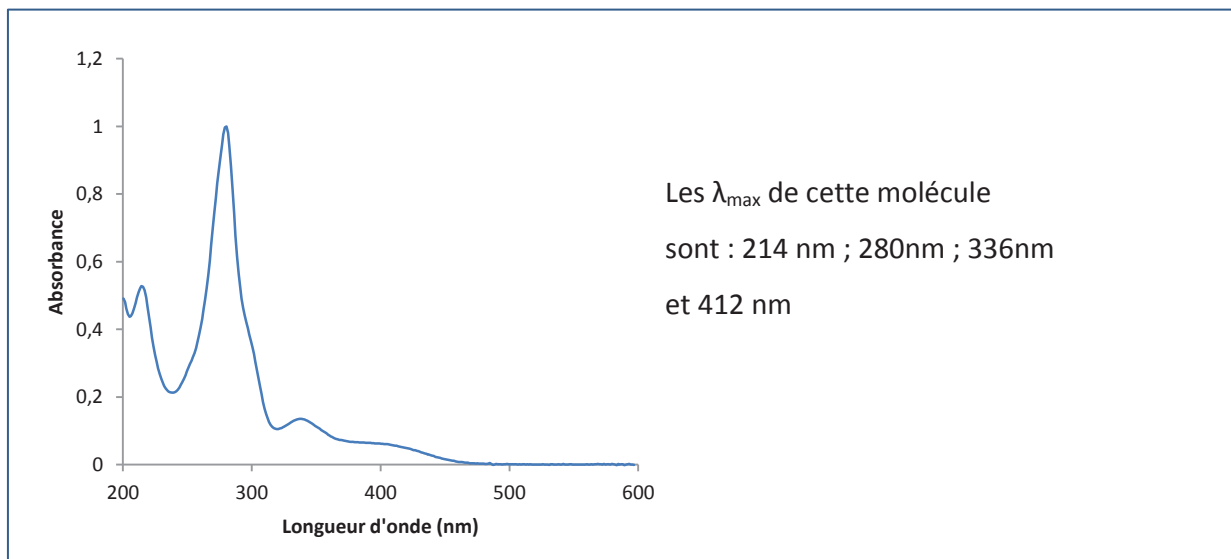


Figure 58: Spectre d'absorption UV-Visible de la F8

### ***Fraction 9***

#### Le spectre de masse en ESI

Le spectre de masse a été réalisé par Waters Q-TOF 2, en électronébulisation (ESI) mode positif avec de CH<sub>3</sub>OH. L'ion [M+Na]<sup>+</sup> de m/z 261 a été mesuré.

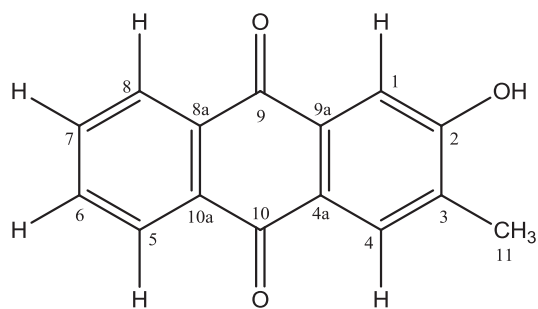
La formule brute déduite est C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>Na dont la masse théorique m/z 261,0528 et la masse exacte m/z a donné 261,0529.

#### Resonance Magnétique Nucléaire 500MHz

Le spectre RMN de <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C de la fraction sont présentés par le tableau qui ci-dessous

	Acétone D6	
Position	δ <sub>c</sub>	δ <sub>H</sub>
1	112,3	7,96 (s ; 1H ; H1)
2	162,0	
3	133,2	
4	130,9	8,03 (s ; 1H ; H4)
5	127,4 / 127,5	8,22 (m ; 2H ; H8)
6	134,4 / 134,9	7,86 (m ; 2H ; H6)
7	134,4 / 134,9	7,86 (m ; 2H ; H7)
8	127,4 / 127,5	8,22 (m ; 2H ; H8)
8a	135,0	
9	183,3	
10	182,3	
11	16,5	2,27 (s ; 3H ; CH3)

Formule développée :



F9 : 1 hydroxy- 2 methylantraquinone

Spectre d'absorbance UV/visible

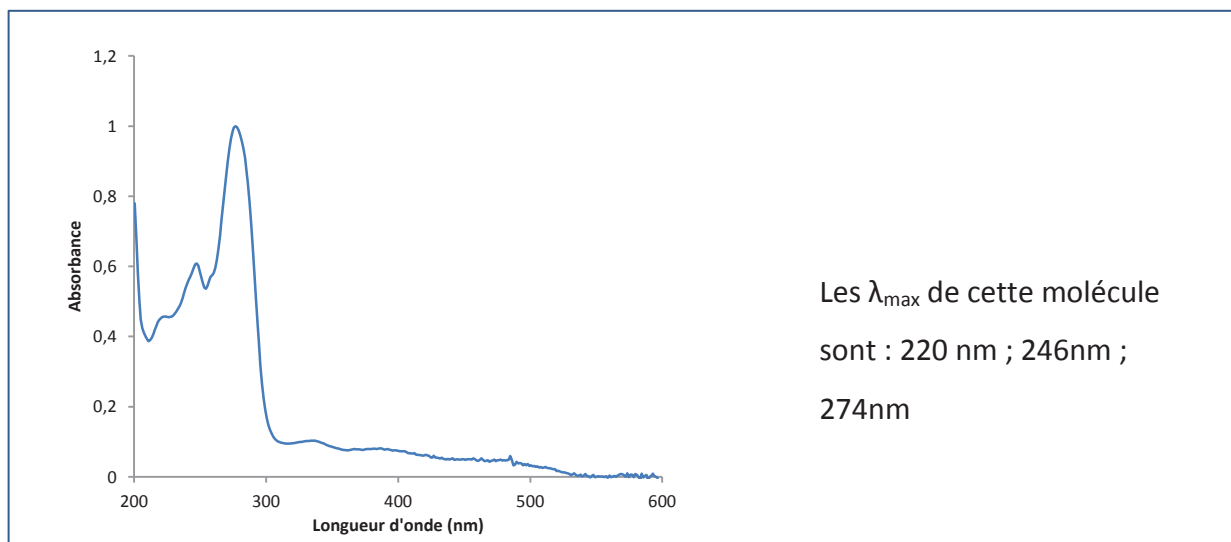


Figure 59: Spectre d'absorption UV-Visible de la F9

**Fraction 10**Le spectre de masse en ESI

Le spectre de masse a été réalisé par Waters Q-TOF 2, en électrobulbation (ESI) mode positif avec de CH<sub>3</sub>OH. L'ion [M+Na]<sup>+</sup> de m/z 327 a été mesuré.

La formule brute déduite est C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub>Na<sub>2</sub> dont la masse théorique m/z 327,0245 et la masse exacte m/z a donné 327,0245.

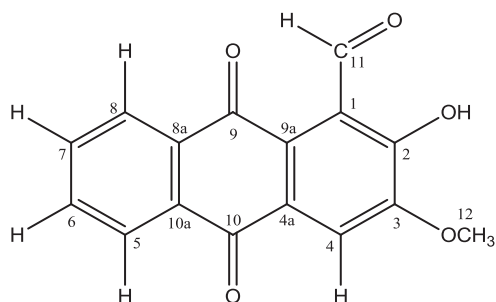
Résonance Magnétique Nucléaire 500MHz

Le spectre RMN de <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C de la fraction sont présentés par le tableau qui ci-dessous

**Tableau 22: Spectre RMN de la F10**

Position	Dans de l'acétone d6		Dans du chloroforme d6 (Boubertea <i>et al.</i> , 2006)	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>
1			117,7	
2	166,6	12,33 (brs ; OH)	166,6	12,30 (s ; 1H ; OH)
3	167,6		166,7	
4	112,4	7,53 (s ; 1H ; H4)	113,1	7,71 (s ; 1H ; H4)
4a			141,7	
5	127,2	8,21 (dd ; 1H ; 3JHH= 8,0 ; H5)	127,1	8,28 (dd, 1H ; J=7,5 ; J= 1,5 ; H <sub>5</sub> )
6	134,4	7,88 (td ; 1H ; 3JHH=7,5 ; H6)	134,8	7,86 (td ; 1H ; J=7,5 ; J= 1,5 ; H <sub>6</sub> )
7	135,5	7,94 (td ; 1H ; 3JHH=7,5 ; H7)	133,6	7,80 (td ; J=1,5 ; J= 7,5 : H <sub>7</sub> )
8	127,6	8,27 (dd ; 1H ; 3JHH= 7,0 ; H8)	127,4	8,33 (dd ; 1H ; J=7,5 : J=1,5 ; H <sub>8</sub> )
8a			134,9	
9	181,0		180,1	
9a	119,0		118,0	
10	182,5		181,9	
11	196,9	10,5 (s ; 1H ; H11)	195,4	10,5 (s ; 1H ; CHO)
12	64,8	4,15 (s ; 3H ; CH3)	64,7	4,16 (s ; 3H, OMe)

Formule développée :



Tithoniaquinone A (Boubertea *et al.*, 2006; Chagas-Paula *et al.*, 2012)

Spectre d'absorbance UV/visible

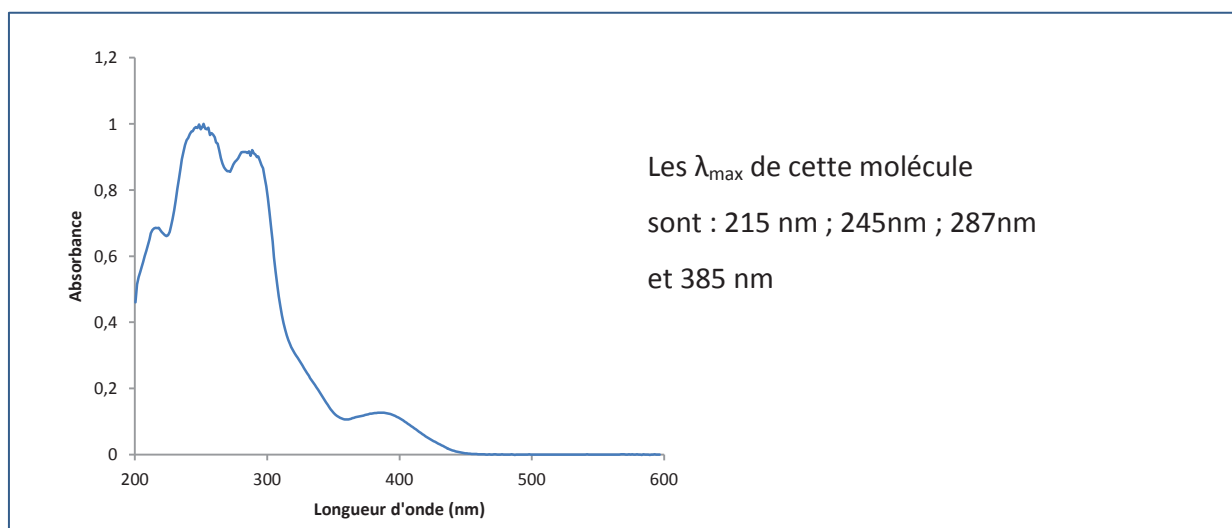


Figure 60: Spectre d'absorption UV-visible de la F10

**Fraction 11**Le spectre de masse en ESI

Le spectre de masse a été réalisé par Bruker MicroTOF-Q II, par introduction direct (ASAP) mode positif à 350°C. L'ion  $[M+H]^+$  de  $m/z$  255 a été mesuré.

La formule brute déduite est  $C_{15}H_{11}O_4$  dont la masse théorique  $m/z$  255,0657 et la masse exacte  $m/z$  a donné 255,0655.

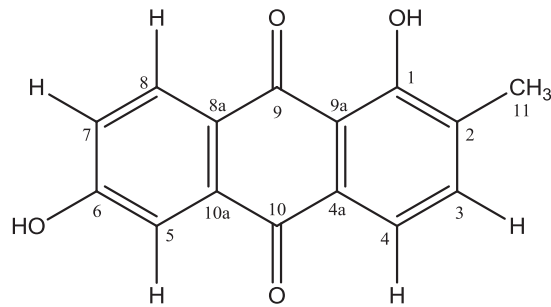
Résonnance Magnétique Nucléaire 500MHz

Le spectre RMN de  $^1H$  et du  $^{13}C$  de la fraction sont présentés par le tableau qui ci-dessous

**Tableau 23: Spectre RMN de la F11**

Position	Dans de l'acétone d6		Dans du chloroforme (Borroto <i>et al.</i> , 2008)
	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$
1	161,3		
2			
3	137,6	7,62 (d ; 1H ; 3JHH= 8,5 ; H3)	7,42 (d ; J= 7,7)
4	119,5	7,67 (d ; 1H ; 3JHH= 8,5 ; H4)	7,64 (d ; J=7,5)
4a	116,0		
5	113,5	7,63 (d ; 1H ; 4JHH= 1,5 ; H5)	7,65 (d ; J= 2,5)
6	161,5		
7	122,1	7,35 (dd ; 1H ; 3JHH=7,5 ; 4JHH= 1,5 ; H7)	7,18 (dd, J = 8,6 ; J= 2,6)
8	130,6		
8a	126,5		
9	189,0		
9a	135,2		
10	182,5		
10a	137,0		
11	16,0	2,34 (s ; 3H ; CH3)	2,32 (s)

Formule développée :



F11 : Soranjidiol (Borroto *et al.*, 2008)

Spectre d'absorbance UV/visible

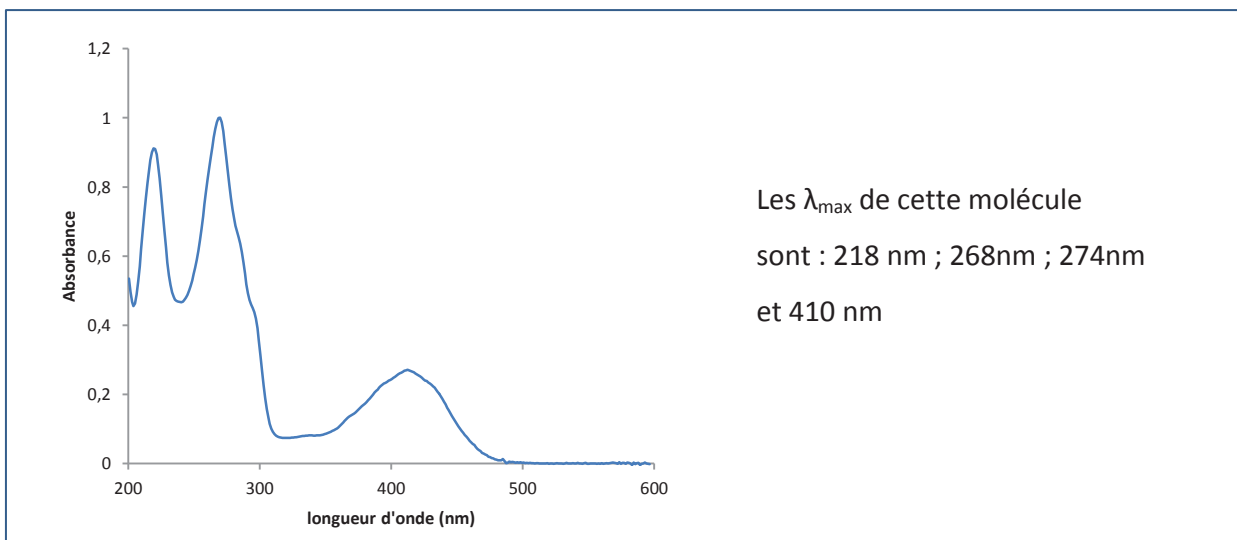


Figure 61: Spectre d'absorbance UV-Visible de la F11



**Fraction 12**Le spectre de masse en ESI

Le spectre de masse a été réalisé par Waters Q-TOF 2, en électronébulisation (ESI) mode positif avec de CH<sub>3</sub>OH. L'ion [M+Na]<sup>+</sup> de m/z 277 a été mesuré.

La formule brute déduite est C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>Na dont la masse théorique m/z 277,0477 et la masse exacte m/z a donné 277,0475.

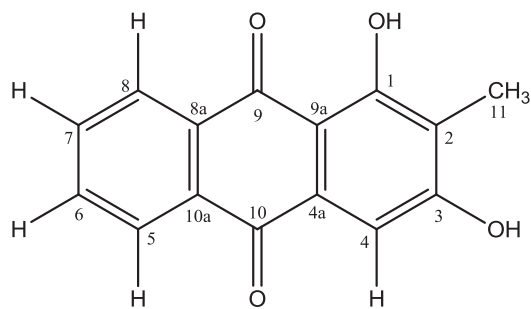
Résonnance Magnétique Nucléaire 500MHz

Le spectre RMN de <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C de la fraction sont présentés par le tableau qui ci-dessous

**Tableau 24: Spectre RMN de la F12**

	Dans de l'acétone d6		Dans du chloroforme (Borroto <i>et al.</i> , 2008)
Position	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>H</sub>
1		13,3 (brs, OH)	13,2 (OH)
62	118,2		
3	164,8		
4	108,3	7,46 (s ; 1H ; H <sub>4</sub> )	7,29 (s)
5	127,7	8,3 (dd ; 1H ; <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 7,5 ; <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> = 1,5 ; H <sub>5</sub> )	8,31 (dd ; J=7,0 ; J= 1,8)
6	135,0	7,92 (m ; 2H ; H <sub>6</sub> )	7,79 (td ; J= 7,3 ; J= 1,5)
7	135,0	7,92 (m ; 2H ; H <sub>7</sub> )	7,78 (td ; J=7,0 ; J= 1,5)
8	127,4	8,31 (dd ; <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 7,5 ; <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> = 1,5 ; H <sub>8</sub> )	8,26 (dd ; J= 7,1 ; J= 1,6)
9	187,4		
9a	110,5		
10	182,8		
11	9,0	2,2 (s ; 3H ; CH <sub>3</sub> )	2,25 (s)

Formule développée :



F12 : la Rubiadine (Tao *et al.*, 2003; Takano *et al.*, 2006)

Spectre d'absorbance UV/visible

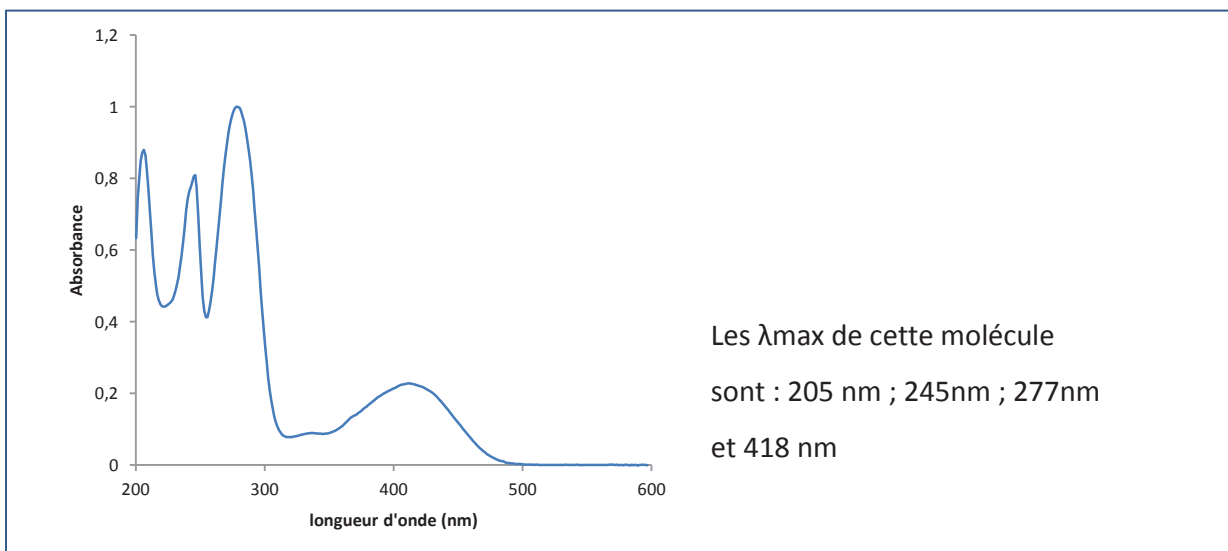


Figure 62: Spectre d'absorbance UV-Visible de F12

**Fraction 13**Le spectre de masse en ESI

Le spectre de masse a été réalisé par Waters Q-TOF 2, en électrospray (ESI) mode positif avec de CH<sub>3</sub>OH. L'ion [M+Na]<sup>+</sup> de m/z 307 a été mesuré.

La formule brute déduite est C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>Na dont la masse théorique m/z 307,0582 et la masse exacte m/z a donné 307,0580.

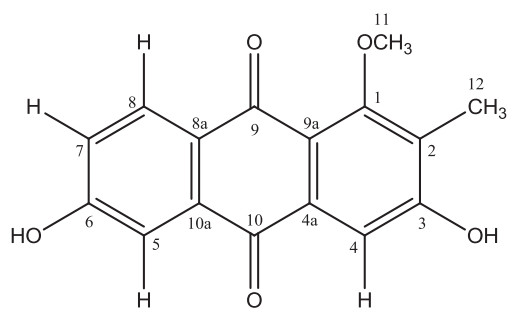
Résonance Magnétique Nucléaire 500MHz

Le spectre RMN de <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C de la fraction sont présentés par le tableau qui ci-dessous

**Tableau 25: Spectre RMN de la F13**

Position	Dans de l'acétone d6		Dans du chloroforme (Tao <i>et al.</i> , 2003)
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>
1	165,2		161,4
2	118,5		127,2
3	163,5	13, 36 (brs ; OH)	162,3
4	108,0		109,8
4a	110,5	7,43 ( m ; 2H ; H <sub>4</sub> )	
5	111,4	7,67 (d ; 1H ; 4J <sub>HH</sub> =2,5 ; H <sub>5</sub> )	112,4
6	165,6	13, 36 (brs ; OH)	163,2
7	121,1	7,43 (m ; 2H ; H <sub>7</sub> )	122,2
8	130,0	8,26 (d ; 1H ; <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 9,0 ; H <sub>8</sub> )	130,3
8a	128,0		127,8
9	187,0		180,3
9a	127,5		
10	182,8		183,5
10a	136,1		135,2
11	56,5	4,05 (s ; 3H ; OCH <sub>3</sub> )	
12	8,6	2,59 (s ; 3H ; CH <sub>3</sub> )	9,7

Formule développée :



F13 : Rubianthraquinone(Tao *et al.*, 2003)

Spectre d'absorbance UV/visible

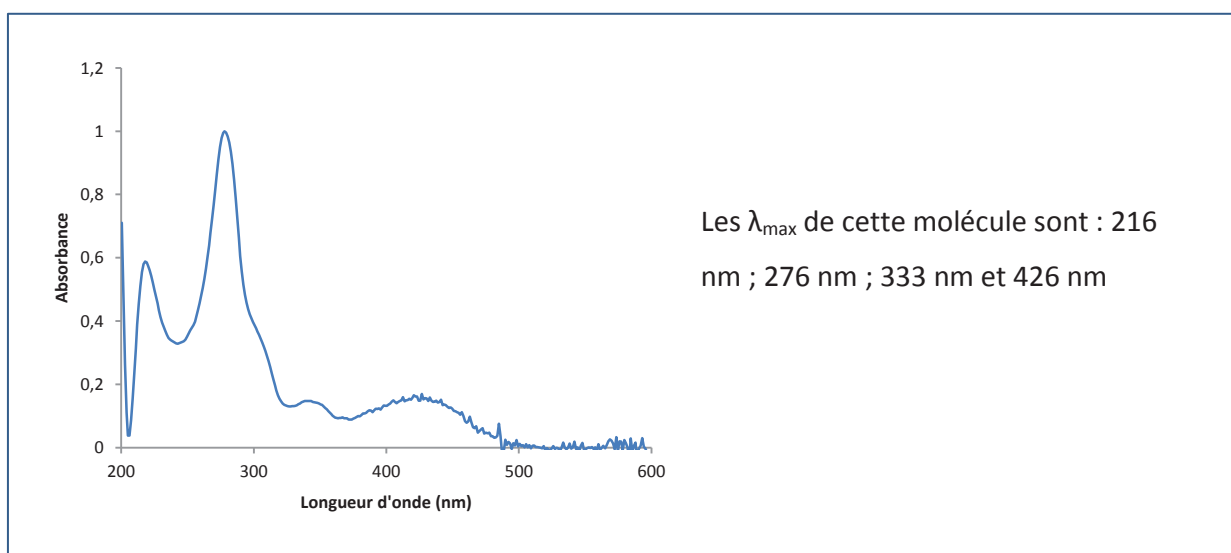


Figure 63: Spectre d'absorption UV-Visible de la F13

### Récapitulatif des phytomolécules caractérisées

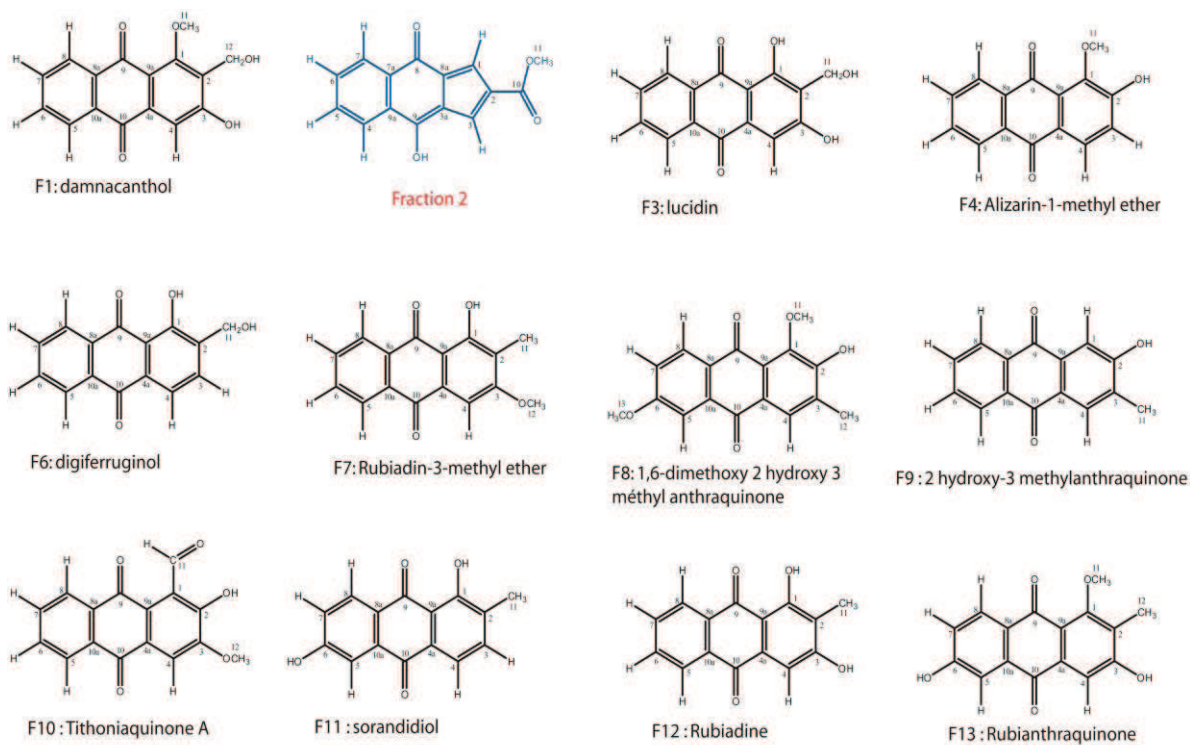


Figure 64: Récapitulatif des composés caractérisés

Les structures chimiques de ces phytomolécules isolées des racines de *Morinda morindoides* sont en totalité de la famille des anthraquinones excepté celle de la fraction 2 qui en est proche (Figure 64). Les spectres RMN de ces différents composés sont joints en annexe à ce document.

### III.8 Détermination des paramètres antimicrobiens des différents composés isolés

Un test d'activité antimicrobienne a été effectué sur toutes les fractions collectées. Il s'agit d'un test non quantitatif qui permet d'identifier les fractions qui présentent une activité antimicrobienne.

Les résultats de ce test effectués sur *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* montrent la présence d'une zone d'inhibition au niveau des spots de toutes les fractions comme l'indique la Figure 65. Par conséquent, chaque composé purifié possède une activité antimicrobienne.

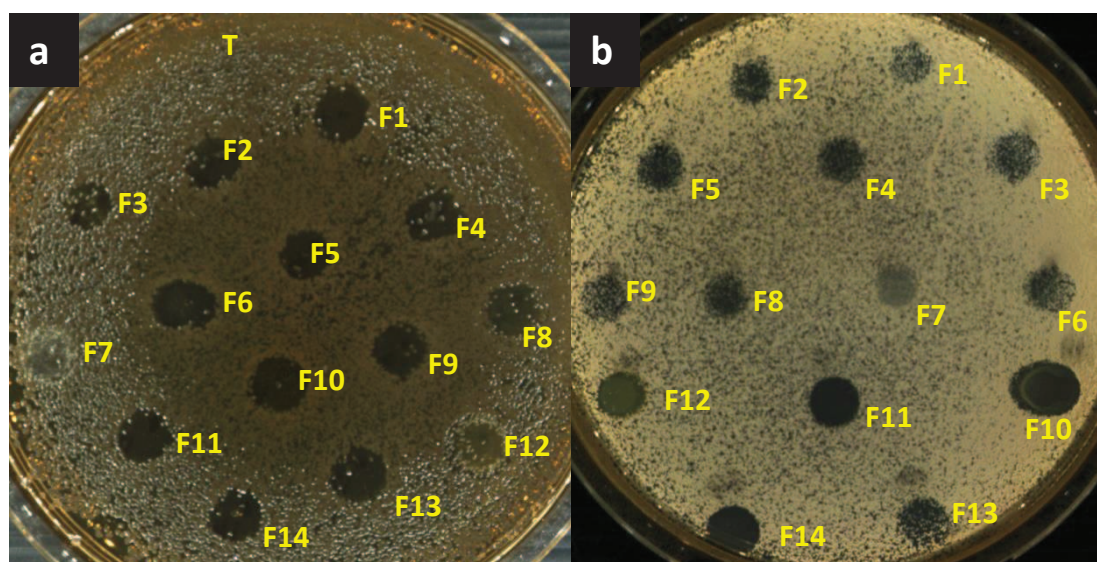


Figure 65: Activité antimicrobienne des différentes fractions chromatographiques sur *S. aureus* (a) et *C. albicans* (b) par la méthode des spots

La détermination de la concentration minimale inhibitrice de chaque composé sur différents micro-organismes a été faite par la méthode en milieu liquide. Ce test a été effectué sur deux bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), sur deux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*) et sur deux levures (*Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*). Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices sont consignées dans le Tableau 26. Elles évoluent de 7,81µg/ml à 100µg/ml.

**Tableau 26: Concentration Minimale Inhibitrice des composés isolés sur quelques micro-organismes**

	Concentration minimale inhibitrice ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>E. faecalis</i>
<b>F1</b> :Damnacanthal	> 100	62,5	>100	>100	>100	>100
<b>F2</b> : Morindoïdine	> 100	31,25	>100	>100	>100	>100
<b>F3</b> :Lucidin	> 100	100	> 100	>100	> 100	> 100
<b>F4</b> :Alizarin 1 methyle ether	> 100	> 100	> 100	>100	> 100	> 100
<b>F5</b> :Non déterminé	> 100	100	> 100	>100	> 100	> 100
<b>F6</b> :Digiferruginol	> 100	15,75	100	>100	62.5	> 100
<b>F7</b> :1 hydroxy 2 methyl 3 methoxy anthraquinone	> 100	15.75	31,25	62,5	62,5	62,5
<b>F8</b> : 1,6-dimethoxy 2 hydroxy 3 méthyle anthraquinone	> 100	62,5	100	62,5	nd	> 100
<b>F9</b> : 1 hydroxy 2 methyl anthraquinone	> 100	31,25	nd	62,5	nd	> 100
<b>F10</b> :Tithoniaquinone A	> 100	7,81	31,25	31,25	62,5	31,25
<b>F11</b> : Soranjidiol	> 100	31.25	nd	62,5	nd	nd
<b>F12</b> :Rubiadin	> 100	7,81	62,5	62,5	62,5	31,25
<b>F13</b> :Rubianthraquinone	> 100	100	> 100	62,5	nd	> 100
<b>F14</b> :Non déterminé	> 100	62,5	100	> 100	100	> 100
Ofloxacin (Témoin)	0,93	6,255	nd	3,75	nd	3,75

**nd : non déterminé**

### ***III.9 Activité hémolytique sur des hématies humaines des différents composés isolés.***

L'activité hémolytique des différents composés purifiés à partir de l'extrait à l'acétonitrile de la racine de *Morinda morindoides* a été évaluée sur des hématies humaines. Les densités optiques du contenu cytoplasmique des hématies humaines libéré après hémolyse induite par les différentes concentrations de chaque composé ont été représentées (Figure 66). Ces valeurs sont ramenées en pourcentage d'hémolyse.

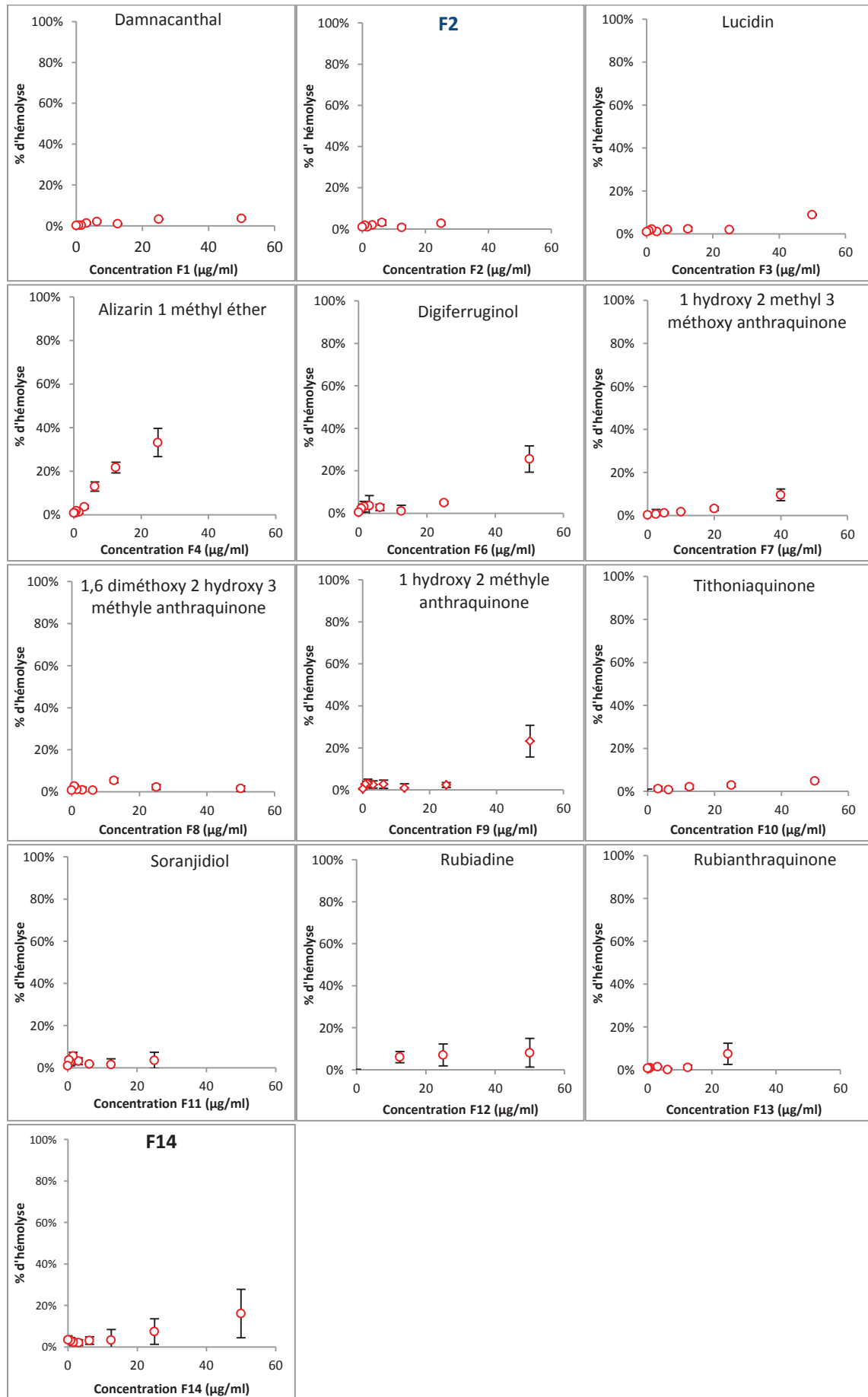
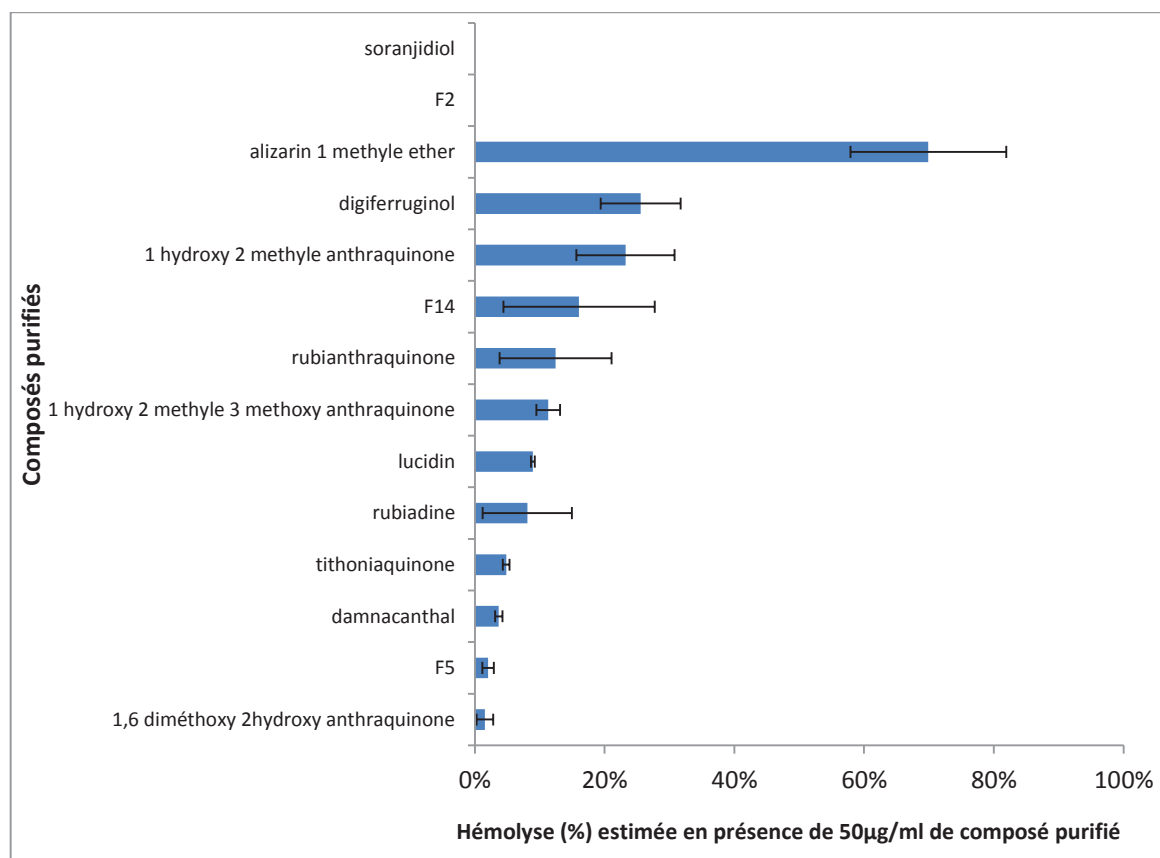


Figure 66: Activité hémolytique des différents composés purifiés sur des hématies humaines



Le pouvoir hémolytique de chaque composé isolé de la racine de *Morinda morindoides* a été estimé par une concentration de 50µg/ml (Figure 67).



**Figure 67: comparaison d'hémolyse obtenue par 50µg/ml de chaque composé**

Le pourcentage d'hémolyse induite par une concentration de 50µg/ml de chaque composé purifié de l'extrait à l'acétonitrile de la racine de *Morinda morindoides* révèle que l'alizarin-1-méthyle éther (la fraction 4) est le composé le plus hémolytique en induisant 70% d'hémolyse. Par contre, la 1,6-dimethoxy-2-hydroxy-3-méthyl anthraquinone (la fraction 8) présente l'activité hémolytique la plus faible sur des hématies humaines avec 1,55% d'hémolyse induite à cette même concentration.

Toutefois, avec une concentration de 25µg/ml, la fraction 2 (composé de structure originale) n'induit que 2,7% d'hémolyse.

### **III.10 Mise en évidence de l'active intercalante de l'ADN.**

Le pouvoir intercalant des composés isolés des racines de *Morinda morindoides* a été étudié selon une approche qualitative (migration électrophorétique sur gel d'agarose des plasmides pBr 322 d'*Escherichia coli* préalablement incubé en présence de différentes concentration d'extrait végétal) et une approche quantitative par une méthode de compétition d'intercalation à l'ADN génomique des composés avec le Sybr Gold.

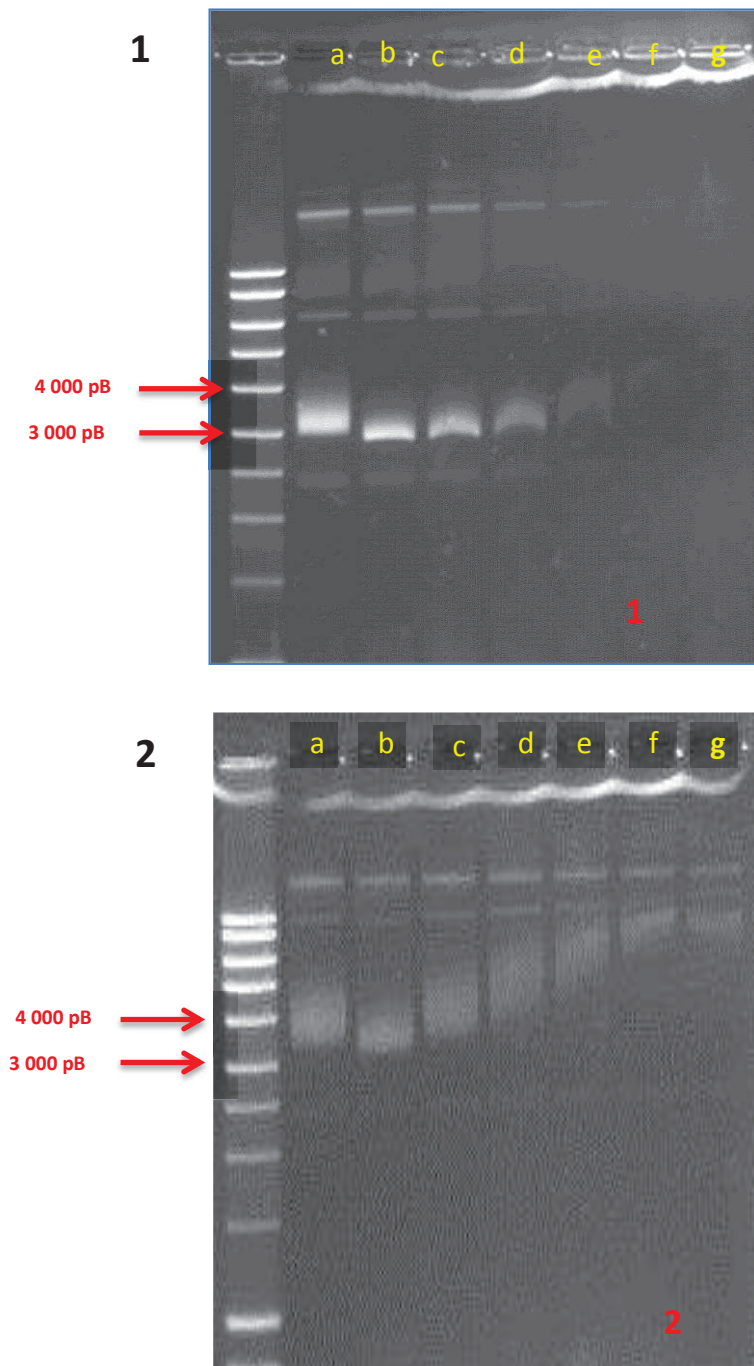
#### **III.10.1 Mise en évidence du pouvoir intercalant par migration électrophorétique**

La mise en évidence du pouvoir intercalant de l'extrait à l'acétonitrile de la racine de *Morinda morindoides* et d'un des composés anthraquinoniques isolé (la fraction 14) a été effectuée par l'approche qualitative.

Le plasmide pBr 322 a été incubé en présence de différentes concentrations d'extrait à l'acétonitrile de la racine ou de la fraction 14 puis analysé par électrophorèse (Figure 68).

La révélation aux ultraviolets des gels après migration électrophorétique a permis d'observer des effets doses-dépendants de ces composés sur le plasmide pBr 322.

En effet, l'augmentation de la concentration en composé de *Morinda morindoides* se traduit par une diminution de la migration et une diminution de la détection du plasmide aux ultraviolets.



**Figure 68: mise en évidence du pouvoir intercalant de l'extrait végétal à l'ADN plasmidique**

**1** : Extrait à l'acétonitrile des racines ; **2** Fraction 14

Piste a : 0,425µg d'ADN plasmidique

Piste b : 0,425µg d'ADN plasmidique + 1,875µg d'extrait végétal ou F14

Piste c : 0,425µg d'ADN plasmidique + 3,75µg d'extrait végétal ou F14

Piste d : 0,425µg d'ADN plasmidique + 7,5µg d'extrait végétal ou F14

Piste e : 0,425µg d'ADN plasmidique + 15µg d'extrait végétal ou F14

Piste f : 0,425µg d'ADN plasmidique + 30µg d'extrait végétal ou F14

Piste g : 0,425µg d'ADN plasmidique + 60µg d'extrait végétal ou F14

### **III.10.2      Mise en évidence du pouvoir intercalant par compétition**

Nous avons tenté de comparer le pouvoir intercalant des composés purifiés de l'extrait à l'acétonitrile de la racine de *Morinda morindoides*. Pour ce faire, l'ADN génomique de *Staphylococcus aureus* a été incubé avec chacun des composés isolés pendant 15 minutes avant l'addition du Sybr gold. La fluorescence a été ensuite mesurée. Les résultats sont présentés par la Figure 69.

Le pourcentage de la fluorescence représenté est proportionnel à l'intercalation du Sybr gold à l'ADN chromosomique. La Figure 69 révèle une diminution dose-dépendante du pourcentage de cette fluorescence au niveau de tous les composés isolés.

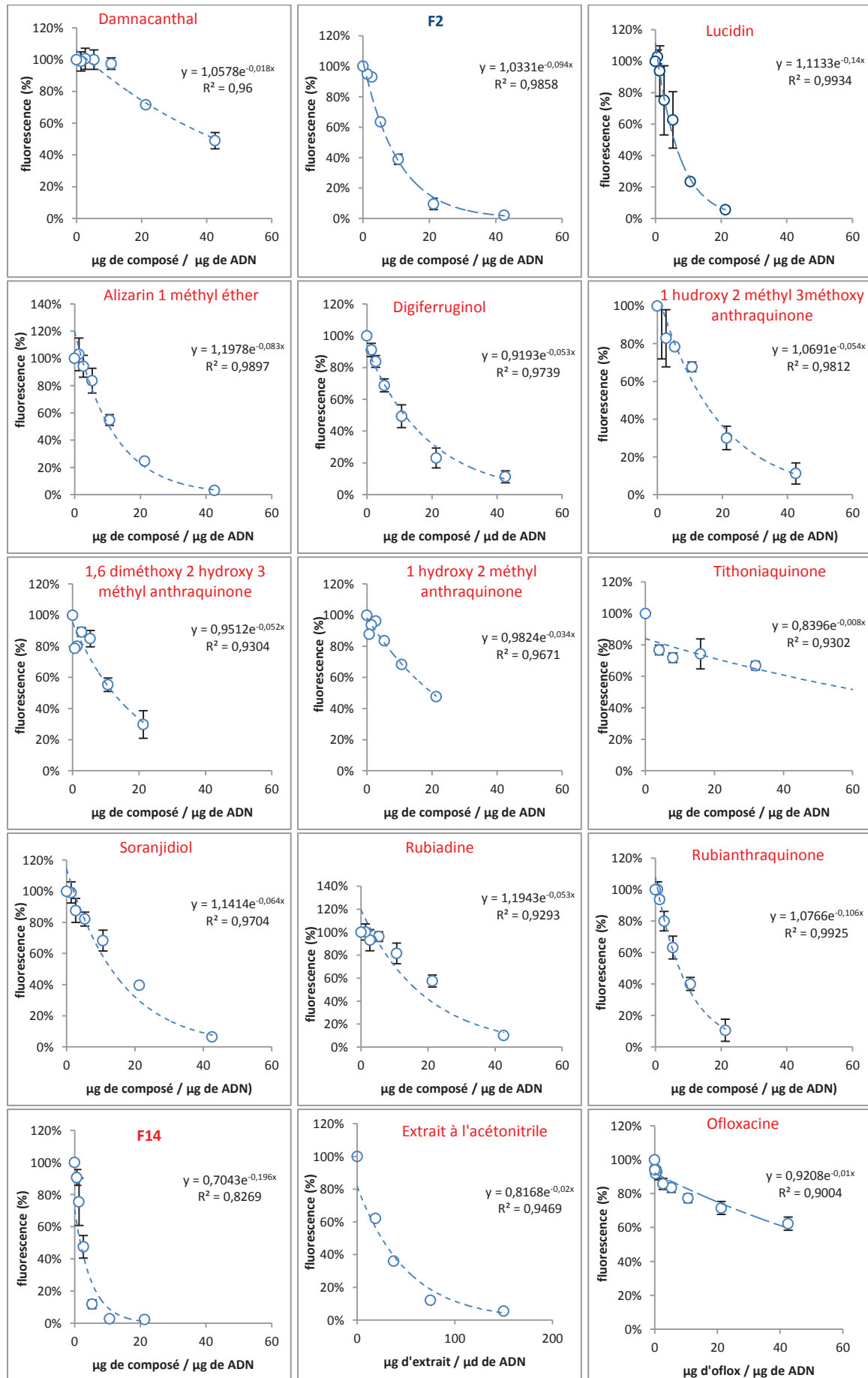


Figure 69: Evolution de la fluorescence du Sybr gold intercalé à l'ADN en fonction de la concentration des composés isolés

Nous avons déterminé les concentrations de chaque phytomolécule qui provoque une réduction de la fluorescence de 50% ( $CI_{50}$ ). Cette valeur a été déterminée à partir d'une courbe de tendance (régression exponentielle). Les valeurs des  $CI_{50}$  déterminées sont présentées par la Figure 70.

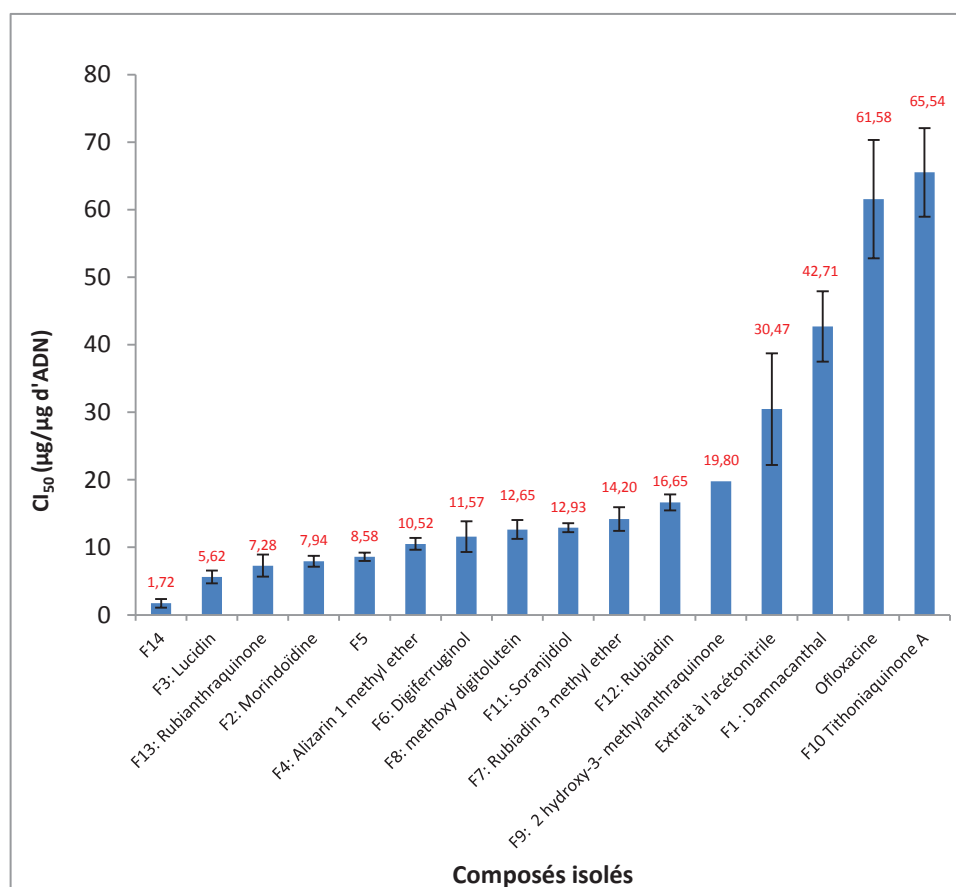


Figure 70: Valeur des concentrations de chaque composé qui intercale 50% d'ADN  $CI_{50}$

Cette figure révèle que la fraction 14 présente la plus forte activité intercalante avec une  $CI_{50}$  de 1,72  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  d'ADN. La tithoniaquinone A (la fraction 10) présente le pouvoir intercalant le plus faible ( $CI_{50} = 65,54\mu\text{g}/\mu\text{g}$  d'ADN). La  $CI_{50}$  de la fraction 2 (composé de structure originale) est évaluée à 7,94  $\mu\text{g} / \mu\text{g}$  d'ADN.

## IV Discussion

Nous avons étudié les propriétés antimicrobiennes de *Morinda morindoides*. Des extractions à l'aide de différents solvants ont été réalisées à partir des feuilles, tiges et racines de cette plante.

Les différents rendements d'extraction révèlent que les organes de cette plante sont plus riches en composés polaires qu'apolaires puisqu'ils augmentent avec la polarité du solvant utilisé. Par ailleurs, la racine est plus riche en substances polaires que les autres organes étudiés. Les feuilles par contre contiennent plus de substances apolaires que la racine et la tige.

L'évaluation des activités antimicrobiennes par la méthode de diffusion en milieu gélosé a permis de déterminer les activités spécifiques de chaque extrait et de les comparer. On constate que les activités spécifiques des feuilles varient de 0 à 1,11 UA/mg. La meilleure activité a été enregistrée avec l'extrait méthanolique sur *Klebsiella oxytoca*. Les extraits des tiges possèdent une activité spécifique évoluant de 0 à 4,83 UA/mg. L'extrait de cet organe qui présente la meilleure activité spécifique est l'extrait à l'acétonitrile avec *Staphylococcus aureus*. La racine de *Morinda morindoides* enregistre des activités allant de 0 à 51,64 UA/mg. Les meilleures activités se situent au niveau des extraits effectués avec des solvants moins polaires que le méthanol. Leur activité antimicrobienne est plus prononcée sur *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*. La racine de *Morinda morindoides* est donc l'organe qui présente la plus forte concentration de principes actifs antimicrobiens.

Les études antérieures des activités antimicrobiennes de *Morinda morindoides* n'ont été menées que sur les extraits des feuilles. A partir de celles-ci, des quercétines, stéroïdes et iridoïdes antiparasitaires ont été isolés (Cimanga *et al.*, 2006; Cimanga *et al.*, 2008). Malgré des activités antibactériennes et antifongiques mises en évidence (Moroh *et al.*, 2008; Bagre *et al.*, 2011), aucun composé (antibactérien et antifongique) n'a été caractérisé à partir des feuilles du genre *Morinda*.

Par ailleurs, à l'instar des autres espèces de ce genre, cette étude indique la présence d'une activité plus importante au niveau des extraits de racines. Les activités spécifiques sont

élevées pour les extraits effectués à l'acétonitrile, l'acétone, l'acétate d'éthyle et au chloroforme.

Des extraits à l'éthanol et au chloroforme de racines de quelques espèces du genre *Morinda* ont conduit à la mise en évidence et à la caractérisation de composés antimicrobiens. Il s'agit de phytomolécules anthraquinoniques (Ali *et al.*, 2000; Xiang *et al.*, 2008) telles que la rubiadine, l'alizarin 1 méthyl éther...

Par ailleurs, les travaux de certains auteurs ont montré la présence de flavonoïdes et iridoïdes au niveau des feuilles et tiges de *Morinda morindoides* (Cimanga *et al.*, 1995; Cimanga *et al.*, 1999; S Sang *et al.*, 2001; Kanchanapoom *et al.*, 2002; Cimanga *et al.*, 2006; Noiarsa *et al.*, 2006; Schripsema *et al.*, 2006).

Si les meilleurs rendements d'extraction sont obtenus avec les extraits aqueux, la meilleure activité antimicrobienne spécifique est détectée avec les extraits organiques de racines. L'analyse chromatographique des extraits à l'acétonitrile, au chloroforme, à l'acétate d'éthyle et à l'acétone a révélé la présence de plusieurs composés bio-actifs. La meilleure résolution étant obtenue avec l'extrait à l'acétonitrile de racines, ce dernier a été sélectionné pour la suite des investigations.

La cinétique d'inactivation microbienne a été effectuée sur *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Les effets de la concentration de l'extrait à l'acétonitrile des racines sur la viabilité des deux microorganismes ont été comparés. La représentation du temps nécessaire pour une réduction décimale ( $\delta$ ) en fonction des concentrations d'extrait montre deux tendances différentes.

Sur *Staphylococcus aureus*, au-delà d'une concentration de 200 $\mu$ g/ml, le temps nécessaire pour une réduction décimale du nombre de bactérie reste quasi-constant. Une saturation de la cible moléculaire par les composés actifs pourrait expliquer cet effet.

Par ailleurs, l'augmentation de la concentration d'extrait à l'acétonitrile de la racine de *Morinda morindoides* se traduit par une diminution du temps de réduction décimale du nombre de *Candida albicans*. En effet, aucune saturation n'est observée pour des concentrations allant jusqu'à 800 $\mu$ g/ml.



L'étude de la cytotoxicité de l'extrait à l'acétonitrile sur les lignées cellulaires 3T3 et VERO indique une présence d'activité dont les  $Cl_{50}$  sont évaluées respectivement à 420 $\mu$ g/ml et 388,33 $\mu$ g/ml. Il s'agit d'une activité cytotoxique moins prononcée comparée à celle obtenue à partir de l'extrait éthanolique des feuilles de *Morinda elliptica*, une plante du même genre avec une  $Cl_{50}$  de 30 $\mu$ g/ml (Ali *et al.*, 1996).

Avec l'extrait extrait à l'acétonitrile des racines, on enregistre une activité hémolytique sur les hématies humaines. Une concentration de 50 $\mu$ g/ml entraîne une hémolyse de 15 % des hématies.

Au vu des précédents résultats, l'utilisation traditionnelle de *Morinda morindoides* contre les infections microbiennes semble donc justifiée. Pour définir la structure des composés d'intérêt de cette plante, nous les avons purifiés puis caractérisés et identifiés par la combinaison de la résonance magnétique nucléaire et de la spectrométrie de masse. Des activités biologiques (la concentration minimale inhibitrice, la cytotoxicité et la cible moléculaire) de ces composés purs ont été évaluées.

La séparation par RP-HPLC des composés contenus dans l'extrait à l'acétonitrile des racines de *Morinda morindoides* a révélé 14 composés distincts. La caractérisation de tous ces composés par la spectrométrie de masse et par la résonance magnétique nucléaire a révélé la présence de deux types de structure. Il s'agit d'une part de composés anthraquinoniques et d'autre part d'une structure aromatique originale proche des anthraquinones.

On note ainsi la présence de 11 anthraquinones dont 10 ont en général été décrites dans des extraits de racines des rubiacées.

Il s'agit de la damnacanthol (Fraction 1), décrite au niveau des racines de *Morinda lucida* et de *Morinda angustifolia* (Rath *et al.*, 1995; Xiang *et al.*, 2008). La lucidine (Fraction 3) a déjà fait l'objet d'une caractérisation issue des racines de *Morinda officinalis* et de *Morinda pandurifolia* (Zhang *et al.*, 2010; Ruksilp *et al.*, 2011). On note également l'alizarin-1-méthyle-éther (Fraction 4) également synthétisée par *Morinda lucida* (racine), *Morinda officinalis* (racine), *Morinda lucida* (culture cellulaire), et *Morinda citrifolia* (fruit) (Ali *et al.*, 2000; Jasil *et al.*, 2003; Fraga *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2009). Le digiferruginol (Fraction 6) a

été isolé non seulement des racines de *Morinda officinalis* (Zhang *et al.*, 2010) mais également au niveau d'autres genres comme *Isoplexis isabelliane* (Arrebola *et al.*, 1999) et *Placama pendula* (Fraga *et al.*, 2009). La 1-hydroxy-2-méthyl-3-methoxy anthraquinone (Fraction 7) n'avait jamais été décrite chez *Morinda* sp. Elle est synthétisée par *Plama pendula*, une autre rubiacée (Fraga *et al.*, 2009). C'est le même cas pour, la tithoniaquinone (Fraction 10) isolée de *Tithonia diversifolia*, une plante de la famille des Astenacées (Boubertea *et al.*, 2006).

La 1-hydroxy-2-methyl anthraquinone (Fraction 9), isolée par d'autres auteurs à partir des racines de *Morinda Lucida* (Rath *et al.*, 1995) est la 2-hydroxy-3-methyl anthraquinone. L'activité antifongique de cette phytomolécule également isolée de *Morinda officinalis* a été mise en évidence (Zhang *et al.*, 2010)

la soranjidiol (Fraction 11), a été isolée des racines de *Morinda pandurifolia* (Ruksilp *et al.*, 2011). Elle fait également partir des composés isolés de la culture cellulaire *in-vitro* de *Morinda elliptica* (Jasril *et al.*, 2003). Ruksilp (2011) a mis en évidence l'activité cytotoxique de cette substance sur la lignée cellulaire KB.

La rubiadine (Fraction 12), est une substance anthraquinonique bien connue. Son spectre RMN du proton décrit par Takano et collaborateurs (2006) conforme à celui obtenu par la fraction 12, confirme sa caractérisation. Cette substance se retrouve également au niveau des racines de *Morinda officinalis* (Lv *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2010), *Morinda citrifolia* (Deng *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010), *Morinda elliptica* (Ali *et al.*, 2000; Jasril *et al.*, 2003) et *Morinda angustifolia* (Xiang *et al.*, 2008).

La fraction 13, la 3,6-dihydroxy-1-methoxy-2-methyl anthraquinone ou encore la rubianthraquinone a également été décrite par Tao et collaborateurs (2003), isolée des racines de *Rubia yunnanesis*, une autre rubiacée.

Parmi les anthraquinones issues de l'extrait à l'acétonitrile des racines de *Morinda morindoides*, une structure (Fraction 8) dont la caractérisation a révélé la 1,6-diméthoxy-2-hydroxy-3-méthyl anthraquinone.

Les composés isolés de cette plante renferment également une phytomolécule aromatique dont la structure chimique est proche des celles des anthraquinones. La différence de sa structure chimique avec celles des anthraquinones se situe à 2 niveaux.

Il s'agit tout d'abord du cycle central dont une fonction carbonyle (C=O) est remplacée par une fonction alcool (O-H). Par ailleurs, l'un des cycles qui jouxte la quinone constituée de 6 atomes de carbones est remplacé par un cycle à 5 atomes de carbones. Cette structure originale résulte de la caractérisation de la fraction 2. Dans la mesure où cette structure est originale et provient de *Morinda morindoides*, nous avons décidé de la nommer « Morindoïdine »

La comparaison de l'activité hémolytique induite par 50µg/ml de chaque composé purifié et caractérisé permet d'identifier les plus hémolytiques. La Figure 67 classe les phytomolécules issues de l'extrait en fonctions de leur pouvoir hémolytique. Elle révèle que la fraction 4 (Alizarin-1méthyl éther) est la molécule qui exerce la plus grande activité hémolytique. Avec une concentration de 50µg/ml, elle provoque 70% d'hémolyse. Il faut noter que cette substance fait partie des composés minoritaires présents dans l'extrait à l'acétonitrile de la plante, son activité hémolytique est assez prononcée par rapport aux autres. Ce composé est suivi par la digiferruginol et la 2-hydroxy-3-methylantraquinone. Elles induisent respectivement 26% et 23% d'hémolyse à 50µg/ml. Cinq des composés induisent moins de 10% d'hémolyse. Le tithoniaquinone A et la rubiadine induisent moins de 10% d'hémolyse à des concentrations allant jusqu'à plus de 10 fois leur CMI sur *Staphylococcus aureus*.

Tous ces composés par la méthode des spots, possèdent une activité antimicrobienne sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Pour comparer leur activité antimicrobienne, leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées. Aucun composé ne présente de CMI inférieure à 100µg/ml sur *Escherichia coli*. En revanche, certains composés sont actifs sur *Pseudomonas aeruginosa*. Cette souche est plus sensible à la tithoniaquinone A (CMI de 31,25 µg/ml). Le micro-organisme le plus sensible est *Staphylococcus aureus*. Les tests ont révélé que la tithoniaquinone A (Fraction 10) et la rubiadine (Fraction 12) ont une CMI de 7,81 µg/ml sur cette bactérie, suivies de la

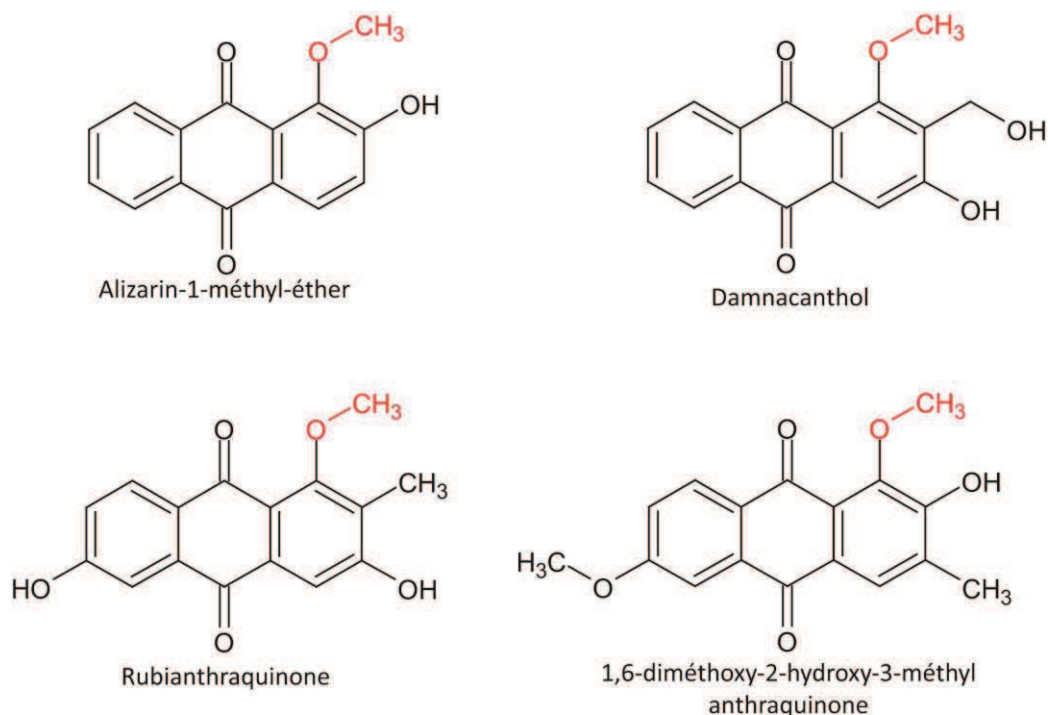
digiferruginol (Fractions 6) et de la 1-hydroxy-2-méthyl-3-méthoxy anthraquinone (Fraction 7) avec une CMI de 15,75 µg/ml. Au niveau des levures, les activités les plus importantes sont détectées avec la tithoniaquinone A (Fractions 10) et la 1-hydroxy-2-méthyl-3-méthoxy anthraquinone (Fraction 7) sur *Candida albicans* pour une CMI de 31,25 µg/ml.

En somme, nous notons les meilleures activités pour la tithoniaquinone A (Fraction 10) suivie de la 1-hydroxy-2-méthyl-3-méthoxy anthraquinone (Fraction 7) puis de la rubiadine (Fraction 12). Par contre l'alizarin 1-méthyl éther (Fraction 4) se présente comme le composé le moins actif sur notre ensemble de micro-organismes avec des CMI toutes supérieures à 100µg/ml, suivi de la rubianthraquinone (Fraction 13) avec une CMI de 100µg/ml sur *Staphylococcus aureus* et de 62,5µg/ml sur *Pseudomonas aeruginosa*.

L'analyse des relations entre la structure chimique et l'activité antimicrobienne n'a été effectuée que sur les anthraquinones.

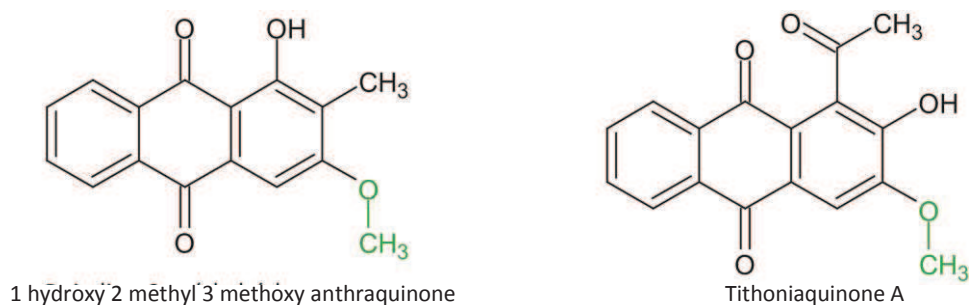
L'Alizarin-1-méthyl-éther (La Fraction 4) présente la plus faible activité antimicrobienne (CMI > 100µg/ml). Il est suivi par le damnacanthol (la Fraction 1) qui a une concentration minimale inhibitrice de 62,5µg/ml sur seulement *Staphylococcus aureus*. Sa CMI sur les autres souches microbiennes est supérieure à 100µg/ml.

La 1,6-diméthoxy-2-hydroxy-3-méthyl anthraquinone (la Fraction 8) et la rubianthraquinone (la Fraction 13) présentent des concentrations minimales inhibitrices inférieures à 100 µg/ml sur *Staphylococcus aureus* et sur *Pseudomonas aeruginosa*. Ces quatre composés décrits ont une faible activité antimicrobienne par rapport aux sept autres anthraquinones. Ils ont en commun dans leur structure chimique un groupement méthoxy (-OCH<sub>3</sub>) en position 1 sur le squelette anthraquinonique (Figure 71).



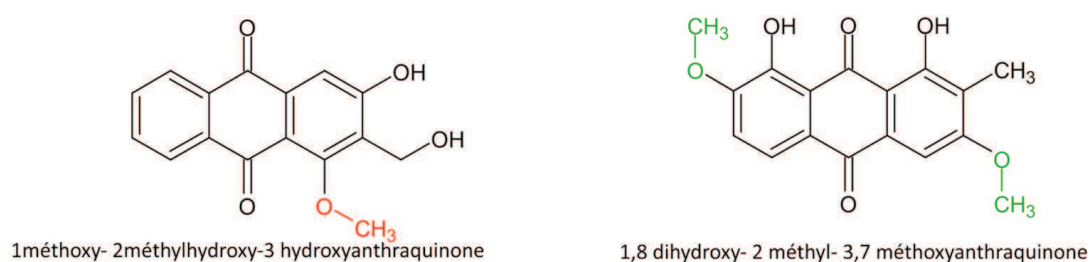
**Figure 71: Mise en évidence de la position (-OCH<sub>3</sub>) sur la structure des composés ayant une faible activité antimicrobienne**

Par conséquent, ce groupement en position 1 ou 4 pourrait réduire l'activité antimicrobienne des composés anthraquinoniques. La position de ce groupement semble importante. En effet il est au niveau de deux fractions actives (1 hydroxy 2 méthyl 3 méthoxy anthraquinone et la tithoniaquinone A) en position 2 (Figure 72).



**Figure 72: Position du groupement OCH<sub>3</sub> au niveau de la structure de la Fraction 7 et de la fraction 10**

Parmi les anthraquinones isolées de *Morinda angustifolia* par Xiang et collaborateurs (2008), la comparaison des activités antimicrobiennes par diffusion en milieu gélosé a révélé une très faible activité de la 1-méthoxy-2-méthylhydroxy-3-hydroxy anthraquinone. Par contre une activité bien importante a été observée au niveau de la 1,8-dihydroxy-2-méthyl-3,7-méthoxy anthraquinone (Figure 73). Les résultats de cette étude renforcent l'hypothèse du rôle du groupement dans l'activité.



**Figure 73: Mise en évidence de la position du groupement OCH<sub>3</sub> sur des structures antimicrobiennes décrite par Xiang et collaborateurs (2008)**

Le groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>) en position 2 du squelette anthraquinonique est présent dans la structure de la rubianthraquinone et la 1,6-diméthoxy-2-hydroxy-3-méthyl anthraquinone. Ce groupement est également retrouvé au niveau de la rubiadine (Fraction 12), de la 1 hydroxy 2 methyl 3 methoxy anthraquinone (Fraction 7), de la soranjidiol (Fraction 11) et du 2-hydroxy-3-methylantraquinone (Fraction 9), des composés dont la CMI varie entre 7,81 et 31,25µg/ml sur *Staphylococcus aureus* (Figure 74).

Cette position de ce groupement pourrait favoriser l'activité antimicrobienne de ces composés anthraquinoniques.

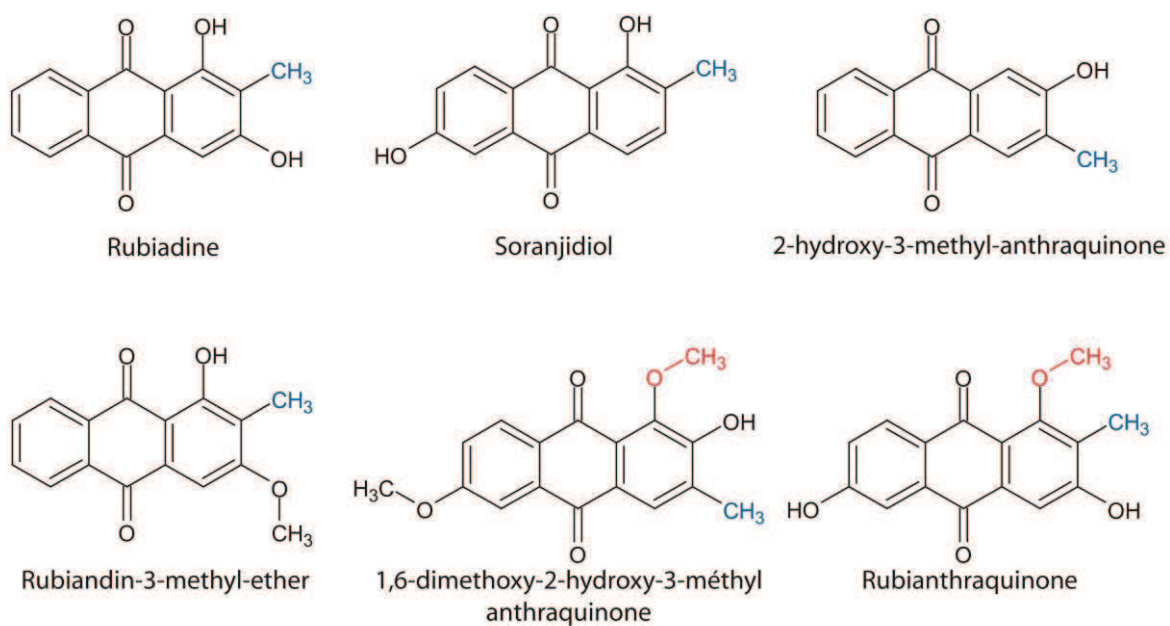


Figure 74: Structure des composés actifs possédant un groupement méthyl (OCH<sub>3</sub>) en position 2 ou 3

A partir de ces observations, une cartographie de l'influence des groupements CH<sub>3</sub> et OCH<sub>3</sub> sur la relation structure-activité des anthraquinones est présentée Figure 75

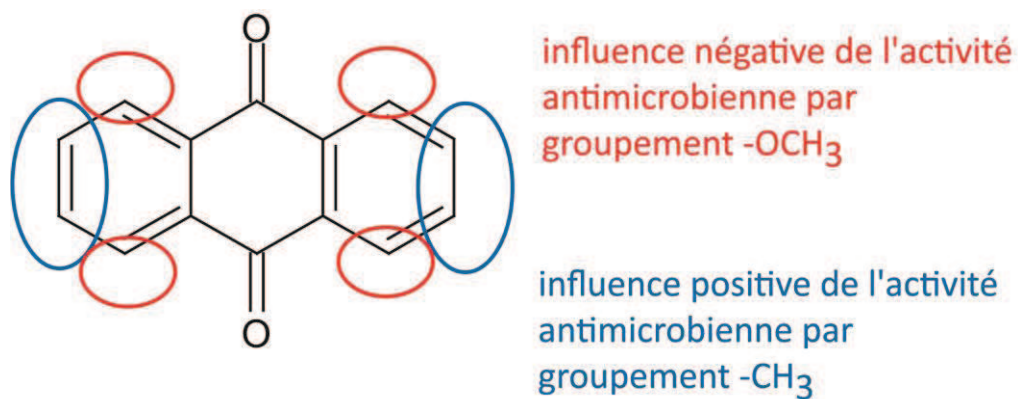


Figure 75: hypothèse d'influence des groupements OCH<sub>3</sub> et CH<sub>3</sub> sur l'activité antimicrobienne des anthraquinones

L'affinité des phytomolécules isolées pour l'ADN a été mise en évidence par les tests de compétition d'intercalation de l'ADN avec le Sybr Gold, un intercalant de référence. La représentation du pourcentage d'ADN non-intercalé en fonction de la concentration des composés a permis de mettre en évidence une intercalation dose-dépendante. Ce constat permet de conclure que toutes les phytomolécules isolées sont des intercalants d'ADN. Cette propriété déjà observée (Bhakta et Siva, 2012) est commune aux anthraquinones.

La concentration de chaque composé provoquant l'intercalation de 50% d'ADN a été estimée et nommée IC<sub>50</sub>. Ces valeurs représentent le pouvoir intercalant des composés à l'ADN. En se basant sur ces valeurs, les composés isolés ont été classés en fonction de l'intensité de ce pouvoir.

Nous avons tenté de comparer la valeur de l'IC<sub>50</sub> de chaque composé à celle de leur CMI sur *Staphylococcus aureus* (Tableau 27).

Aucune corrélation n'a été estimée entre les IC<sub>50</sub> et leur activité antimicrobienne.

**Tableau 27: comparaison de la CMI et l'IC50 des composés isolés de l'extrait à l'acétonitrile de la racine de *Morinda morindoides***

	IC <sub>50</sub> (µg/µg)	CMI <i>S. aureus</i>
Moyenne F14	1,72	62,5
F3: Lucidin	5,62	100
F13: Rubianthraquinone	7,28	100
F2: Morindoïdine	7,94	31,25
Moyenne F5	8,58	100
F4: Alizarin 1 methyl ether	10,52	>100
F6: Digiferruginol	11,57	15,75
F8: 1,6 dimethoxy-2-hydroxy-3-méthyl anthraquinone	12,65	62,5
F11: Soranjidiol	12,93	31,25
F7: Rubiadin 3 methyl ether	14,20	15,75
F12: Rubiadin	16,65	7,81
F9: 2 hydroxy-3- methylanthraquinone	19,80	31,25
Moyenne ACN	30,47	100
F1 : Damnacanthal	42,71	62,5
Ofloxacin	61,58	6,25
F10 Tithoniaquinone A	65,54	7,81



Si le mécanisme d'action de l'activité antimicrobienne des composés étudiés implique une interaction avec l'ADN, leur pouvoir intercalant à lui tout seul ne le met pas en évidence.

Par ailleurs, les structures des composés isolés de l'extrait à l'acétonitrile de la racine de *Morinda morindoides* ont été comparées à celles des quinolones, des antibiotiques de structures proches.

La relation structure-activité de ces antibiotiques a été cartographiée et met en évidence deux cibles moléculaires. Il s'agit de l'ADN et de la topoisomérase.

L'activité antibactérienne des quinolones est liée à la combinaison de leur intercalation à l'ADN microbien et à l'interaction avec les topoisomérases. Ce mécanisme est également décrit au niveau des anthracyclines qui sont des antibiotiques de structure anthraquinonique (Booser et Hortobagyi, 1994). Le mécanisme d'action des anthracyclines a été mis en évidence par la formation d'un complexe ternaire ADN-Anthracycline-Topoisomérase2 (Tewey *et al.*, 1984). En s'intercalant, l'anthracycline stabilise le complexe transitoire ADN-Enzyme et empêche de façon réversible la ligation des brins d'ADN (Isaacs *et al.*, 1995). C'est cette inhibition de l'enzyme qui induit l'effet antimicrobien de ces structures.

Comme l'indique la Figure 76 ci-dessous, l'intercalation de la quinolone à l'ADN se fait par les liaisons hydrogènes avec le groupement carbonyle de la fonction quinone. L'interaction avec l'enzyme quant à elle se fait par les groupements jouxtant la fonction quinone (Yoshida *et al.*, 1991; Hooper et Rubinstein, 2003; Shen, 2003).

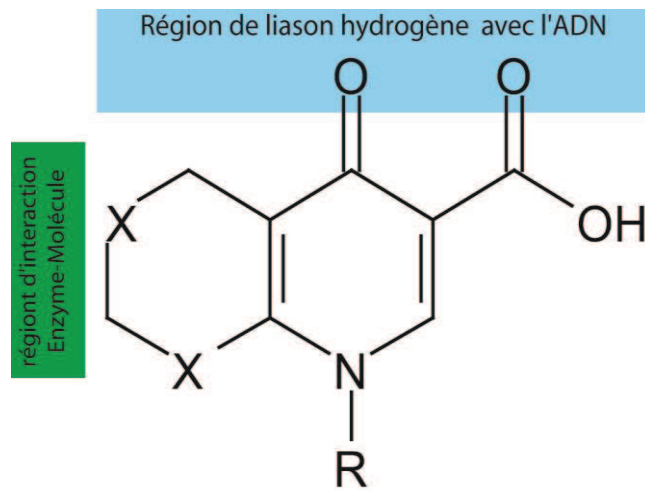


Figure 76: Relation structure-activité des quinones (Yoshida *et al.*, 1991)

A travers ceci, nous retenons que l'affinité du composé à l'ADN est certes une propriété importante mais son interaction avec l'enzyme jouerait un rôle primordial.

## VI Conclusion

Le renforcement de l'arsenal des antimicrobiens a motivé cette étude qui a permis une exploration au niveau des molécules synthétisées par les plantes dite médicinales. Cette exploration s'est particulièrement portée sur *Morinda morindoides*, une plante médicinale exploitée en Côte d'Ivoire et dans les autres pays d'Afrique subsaharienne.

Dans une première étape, l'étude comparative de l'activité antimicrobienne des différents organes de cette plante a permis de révéler sa racine comme une source de phytomolécules antimicrobiennes et antioxydantes.

le criblage des composés contenus dans cette racine, marquant ainsi la première étude effectuée sur cet organe de cette plante, a permis à partir d'une extraction à l'acétonitrile, de purifier 14 composés dont 11 anthraquinones antimicrobiennes ont été identifiées.

En dehors de ces composés anthraquinoniques isolés, une phytomolécule de structure chimique originale a été caractérisé. Il s'agit de la morindoïdine qui affichant une activité antimicrobienne sur *Staphylococcus aureus* d'une concentration minimale inhibitrice de 31 µg/ml.

L'affinité de ces composés pour l'ADN nous laisse suggérer que leur mécanisme d'action serait semblable à celui des quinolones avec l'ofloxacine prise comme référence.

## **Conclusion générale et perspectives**

## Conclusion Générale et perspectives

Au terme des travaux qui ont articulé cette présente thèse, le constat est que les résistances bactériennes aux antibiotiques sont géo-spécifiques. Cette spécificité serait probablement liée aux habitudes locales telles que l'alimentation, le climat, l'automédication entretenue par la vente illicite des médicaments et la gestion des déchets hospitaliers.

Nous avons également constaté, comme d'autres auteurs, que l'efficacité des antibiotiques décroît au fil du temps. Les bactéries additionnent les résistances à diverses familles d'antibiotiques et deviennent ainsi des multirésistants (MDR, XDR et PDR). Cette évolution conduit à des impasses thérapeutiques.

S'orienter vers les phytomolécules issues des plantes médicinales pour corroborer cette quête fût notre choix. Le criblage des composés antimicrobiens synthétisés par *Morinda morindoides* a permis dans un premier temps de justifier l'utilisation traditionnelle de cette plante par les populations locales pour traiter divers types d'infections microbiennes. *Morinda morindoides* est une plante qui renferme des composés antimicrobiens.

La caractérisation de quelques uns de ces composés à partir d'un extrait de racines a révélé la présence d'une phytomolécule antimicrobienne de structure originale avec une dizaine d'antraquinones également antimicrobiennes. Certainement, cette plante pourrait encore contenir d'autres molécules d'intérêt non décrites. Par conséquent, une étude explorative des extraits de cette plante qui présentent une activité antimicrobienne pourrait révéler la présence d'autres structures intéressantes.

Bien que l'extrait d'intérêt des racines présente une activité cytotoxique assez modérée, cet extrait est moins toléré par les hématies humaines. Toutefois, les composés responsables de cette hématotoxicité ont été identifiés. Par ailleurs, il serait aussi important de déterminer la cytotoxicité de chaque composé contenu dans cet extrait y compris évidemment celle des deux composés de structure originale.

Tous les composés isolés, comme certains antibiotiques, présentent plus ou moins une affinité avec l'ADN. Ils s'intercalent tous à l'ADN. Le mécanisme d'action de leur activité antimicrobienne pourrait être semblable à ceux des quinolones. Des tests complémentaires devraient être menés pour confirmer cette hypothèse. La mise en évidence de leur activité

inhibitrice de la topoisomerase de façon quantitative serait un apport considérable tant sur l'identification du mécanisme d'action, que sur des données complémentaires au niveau de la relation structure-activité.

Enfin, la synthèse d'analogues pourrait conduire à des composés plus intéressants.

## **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

Abraham, E. P. and E. Chain (1940). "An enzyme from bacteria able to destroy penicillin." *Nature* **146**: 837.

Abubakar, E.-M. M. (2009). "Antimicrobial susceptibility pattern of pathogenic bacteria causing urinary tract infections at the Specialist Hospital, Yola, Adamawa state, Nigeria " *Journal of Clinical Medecine Research* **1**: 1-8.

Ahorlu, C. (1997). "Malaria-related beliefs and behaviour in southern Ghana: implications for treatment, prevention and control." *Tropical Medicine and International Health* **2**: 488–499.

Akoachere, J.-F. T. K., S. Yvonne, N. H. Akum and E. N. Seraphine (2012). "Etiologic profile and antimicrobial susceptibility of community-acquired urinary tract infection in two Cameroonian towns." *BMC Research Notes* **5**: 212.

Ali, A. M., N. H. Ismail and M. M. Mackeen (2000). "Antiviral, cytotoxic and antimicrobial activities of anthraquinones isolated from the root of *Morinda elliptica*." *Pharmaceutical Biology* **38**: 298–301.

Ali, A. M., N. H. Ismail, M. M. Mackeen, L. S. Yazan, S. M. Mohamed, A. S. H. Ho and N. H. Lajis (2000). "Antiviral, cytotoxic and antimicrobial activities of anthraquinones isolated from The roots of *Morinda Elliptica*." *Pharmaceutical Biology* **38**: 298-301.

Ali, A. M., M. M. Mackeen, S. H. Ei-Sharkawy, J. A. Hamid, N. H. Ismail, F. B. H. Ahmad and N. H. Lajis (1996). "Antiviral and cytotoxic activities of some plants used in Malaysian indigenous medicine." *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Sciences* **19**: 129-136.

Ali, A. M., M. M. Mackeen, L. S. Yazan, S. M. Mohamed, A. S. H. Ho, N. H. Ismail and N. H. Lajis (2000). "Antiviral, cytotoxic and antimicrobial activities of anthraquinones isolated from the roots of *Morinda Elliptica*." *Pharmaceutical Biology* **38**: 298–301.

Alvarez, C., B. Pangon, P. Y. Allouch and J. C. Ghassia (1992). "Infections urinaires : principaux aspects épidémiologiques bactériologiques et cliniques." *Feuillets de Biologie* **33**: 15-24.

Amarti, F., B. Satrani, M. Ghanmi, A. Farah, A. Aafi, L. Aarab, M. E. Ajjouri and A. Chaouch (2010). "Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc." *Biotechnol Agronomy Society and Environnement* **14**: 141-148.

Amine, L., M. Chegri and H. L. Kassmi (2009). "Epidémiologie et résistance aux antibiotiques des enterobacteries isolées d'infections urinaires à l'hôpital militaire Moulay-Ismaïl de Meknes." *Antibiotiques* **11**: 90-96.

Anderson, W., B. B. O'Connor, R. R. MacGregor and J. S. Schwartz (1993). "Patient use and assessment of conventional and alternative therapies for HIV infection and AIDS." *AIDS* **7**: 561-566.



Andremont, A. T. and M. Tibon-Cornillot (2007). *Le triomphe des bactéries: La fin des antibiotiques ?*, Max Milo Editions 256 pages.

Andriole, V. T. (2000). *The Quinolones*, Elsevier Science 517 pages.

Arrebola, M. L., T. Ringbom and R. Verpoorte (1999). "Anthraquinones from *Isoplexis isabelliana* cell suspension cultures." *Phytochemistry* **52**: 1283-1286.

Asseray, N., M. R. Mallaret, M. Sousbie, B. Liberelle, L. Schaerer, E. Borrel, M. O. Rieussec, B. Walter, C. Guimier, X. Buffet, H. Soule, J. Croizé and J. P. Stahl (2002). "Antibiothérapie à l'hôpital : évaluation des pratiques de prescription dans le cadre d'un réseau interhospitalier." *Médecine et Maladies Infectieuses* **32**: 468-476.

Bagre, I., C. Bahi, K. Ouattara, N. Z. Guede, A. J. Djaman, A. Coulibaly and J. D. N'Guessan (2011). "Étude botanique et exploration de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh. sur la croissance in vitro de *Cryptococcus neoformans*." *Phytothérapie* **9**: 136-141.

Bahraminejad, S., R. E. Asenstorfer, I. T. Riley and C. J. Schultz (2008). "Analysis of the antimicrobial activity of flavonoids and saponins isolated from the Shoots of oats (*Avena sativa* L.)." *Journal of Phytopathology* **156**: 1-7.

Bajaj, J. K., R. P. Karyakarte, J. D. Kulkarni and A. B. Deshmukh (1999). "Changing a etiology of urinary tract infections and emergence of drug resistance as a major problem." *Journals on Communicable Diseases* **31**: 181-184.

Baker (1947). "*Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh." *Kew Bull.* **2**: 31.

Balch (2002). *Prescription for Herbal Healing: An Easy-to-Use A-Z Reference to Hundreds of Common Disorders and Their Herbal Remedies*. Avery Pub. Group 545 pages.

Ban, N. K., V. H. Giang, T. M. Linh, L. Q. Lien, N. T. Ngoc, D. T. Thao, N. H. Nam, N. X. Cuong, P. Van Kiem and C. Van Minh (2013). "Two new 11-noriridoids from the aerial parts of *Morinda umbellata*." *phytochemistry letters* **6**: 267-269.

Barber, M. (1947). "Coagulase-positive Staphylococci resistant to penicillin." *The Journal of Pathology.* **59**: 373-384.

Basli, A., M. Chibane, K. Madani and N. Oukil (2012). "Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf." *Phytothérapie* **10**: 2-9.

Baudry, C. and H. Brézellec (2006). *Microbiologie, immunologie*, Groupe Liaisons 126 pages.

Bégué, P. and J. Astruc (1999). *Pathologie infectieuse de l'enfant*, Masson 612 pages.

Beyene, G. and W. Tsegaye (2011). "Bacterial uropathogens in urinary tract infection and antibiotic susceptibility pattern in Jimma University specialized hospital, southwest Ethiopia." *Ethiopian Journal of Health Sciences* **21**: 141-146.

- Bhakta, D. and R. Siva (2012). "Morindone, an Anthraquinone, Intercalates DNA Sans Toxicity: a Spectroscopic and Molecular Modeling Perspective." *Applied Biochemistry and Biotechnology* **167**: 885-896.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Research* **7**: 1513-1523.
- Booser, D. and G. Hortobagyi (1994). "Anthracycline Antibiotics in Cancer Therapy." *Drugs* **47**: 223-258.
- Borroto, J., J. Coll, M. Rivas, M. Blanco, O. Concepción, Y. A. Tandrón, M. Hernández and R. Trujillo (2008). "Anthraquinones from *in-vitro* root culture of *Morinda royoc L.*" *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **94**: 181-187.
- Boubertea, M. Y., K. Krohnb, H. Hussainb, E. Dongoa, B. Schulzc and Q. Huc (2006). "Tithoniaquinone A and Tithoniamide B: A new anthraquinone and a new ceramide from leaves of *Tithonia diversifolia*." *Z. Naturforsch.* **61b**: 78 - 82.
- Bourinbaiar, A. S. and C. F. Coleman (1997). "The effect of gramicidin, a topical contraceptive and antimicrobial agent with anti-HIV activity, against herpes simplex viruses type 1 and 2 *in vitro*." *Archives of Virology* **142**: 2225-2235.
- Bourkhiss, M., M. Hnach, B. Bourkhiss, M. Ouhssine and A. Chaouch (2007). "Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc." *Afrique Sciences* **3**: 232 - 242.
- Bouzenoune, F., F. Boudersa, A. Bensaad, F. Harkat and N. Siad (2009). "Les infections urinaires à Ain M'lila (Algérie). Résistance aux antibiotiques des 239 souches isolées entre 2006 et 2007." *Médecine et maladies infectieuses* **39**: 142-143.
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales*, Tec & Doc Lavoisier 1269 pages.
- Bush, K. (1997). The evolution of  $\beta$ -lactamases. in *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection, and spread*, John Wiley and son, chichester. **207**: 152–166.
- Bush, K. (2004). "Antibacterial drug discovery in the 21st century." *Clinical Microbiology and Infection* **10**: 10-17.
- Bush, K. (2004). "Why it is important to continue antibacterial drug discovery." *ASM News* **70**: 282–287.
- CA-SFM. (2012). "Comite de l'antibiogramme de la société française de microbiologie recommandations 2012." 2012. Retrieved 25 mai, 2013, from [/www.sfm-microbiologie.org/](http://www.sfm-microbiologie.org/).
- Carlet, J., A. Ben Ali and A. Chalfine (2004). "Epidemiology and control of antibiotic resistance in the intensive care unit." *Current Opinion in Infectious Diseases* **17**: 309-316.
- Chagas-Paula, D. A., R. B. Oliveira, B. A. Rocha and F. B. Da Costa (2012). "Ethnobotany, Chemistry, and Biological Activities of the Genus *Tithonia* (Asteraceae)." *Chemistry & Biodiversity* **9**: 210-235.

- Chain, E., H. W. Florey, A. D. Hardner, N. G. Heatley, M. A. Jennings, J. Orr-Ewing and A. G. Sanders (1940). "Penicillin as a Chemotherapeutic Agent." *Lancet* **239**: 226-228.
- Chong, T. M., M. A. Abdullah, O. M. Lai, F. M. Nor' Aini and N. H. Lajis (2005). "Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture." *Process Biochemistry* **40**: 3397-3405.
- Choutet, P. (2003). "Antibiotic use: excesses and consequences." *La Revue du Praticien* **53**: 1527-1532.
- Cimanga, K., T. De Bruyne, J. P. Hu, P. Cos, S. Apers, L. Pieters, L. Tona, K. Kambu, D. V. Berghe and A. J. Vlietinck (1999). "Constituents from *Morinda morindoides* leaves as inhibitors of xanthine oxidase and scavengers of superoxide anions." *Pharmacy and Pharmacology Communications* **5**: 419-424.
- Cimanga, K., T. De Bruyne, A. Lasure, Q. Li, L. Pieters, M. Claeys, D. V. Berghe, K. Kambu, L. Tona and A. Vlietinck (1995). "Flavonoid O-Glycosides from the leaves of *Morinda morindoides*." *Phytochemistry* **38**: 1301-1303.
- Cimanga, K., N. Hermans, S. Apers, S. Van Miert, H. Van den Heuvel, M. Claeys, L. Pieters and A. Vlietinck (2002). "Complement-Inhibiting Iridoids from *Morinda morindoides*." *Journal of Natural Products* **66**: 97-102.
- Cimanga, R. K., K. Kambu, L. Tona, N. Hermans, S. Apers, J. Totté, L. Pieters and A. J. Vlietinck (2006). "Cytotoxicity and in vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents." *Journal of Ethnopharmacology* **107**: 83-90.
- Cimanga, R. K., K. Kambu, L. Tonab, N. Hermans, S. Apers, J. Totte, L. Pieters and A. J. Vlietinck (2006). "Cytotoxicity and in vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents." *Journal of Ethnopharmacology* **107**: 83-90.
- Cimanga, R. K., G. L. Tona, O. K. Kambu, G. K. Mesia, J. J. T. Muyembe, S. Apers, L. Pieters and A. J. Vlietinck (2008). "Antimalarial activity of some extracts and isolated constituents from *Morinda morindoides* leaves." *Journal of Natural Remedies* **8**: 191 - 202.
- Citoglu, G., M. Tanker, B. Sever, J. Englert, R. Anton and N. Altanlar (1998). "Antibacterial activities of diterpenoids isolated from *Ballota saxatilissub sp. saxatilis*." *Planta Medica* **64**: 484-485.
- consensus, C. d. (2003). "Conférence de consensus co-organisée par la société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF) et l'Association française d'urologie (AFU) – Infections urinaires nosocomiales de l'adulte." *Médecine et maladies infectieuses* **33**: 193s-215s.
- Cooper, K. E. (1955). "Theory of antibiotic inhibition zones in agar media." *Nature* **176**: 510-511.

Corpet, D. E., S. Lumeau and F. Corpet (1989). "Minimum antibiotic levels for selecting a resistance plasmid in a gnotobiotic animal model." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**: 535-540.

Courvalin, P., F. Denis, M.-C. Ploy, M. P. d. garilhe, P. Trieu-Culot and Universalis. (2001). "Antibiotiques." Retrieved 24 mai, 2013, from <http://www.universalis-edu.com/encyclopedie/antibiotiques/>.

Cowie, J. M. K. G. and V. Arrighi (2008). *Polymers: chemistry and physics of modern materials*. l'Université de Californie, CRC Press 499 pages.

Cullen, I. M., R. P. Manecksha, E. McCullagh, S. Ahmad, F. O. Kelly, R. J. Flynn, T. McDermott, P. Murphy, R. Grainger, J. P. Fennell and J. A. Thornhill (2011). "The changing pattern of antimicrobial resistance within 42 033 *Escherichia coli* isolates from nosocomial, community and urology patient-specific urinary tract infections, Dublin, 1999-2009." *British Journal of Urology International* **109**: 1198-206.

De Monet De Lamarck, J. B. P. A. and J. L. M. Poirer (1793). *Encyclopédie méthodique ou par ordre de matières: botanique*, Panckoucke 571 pages.

Deng, Y., Y.-W. Chin, H. Chai, W. J. Keller and A. D. Kinghorn (2007). "Anthraquinones with quinone reductase-inducing activity and benzophenones from *Morinda citrifolia* (Noni) Roots." *Journal of Natural Products* **70**: 2049–2052.

Dewick, P. M. (2011). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, Wiley 550 pages.

Docherty, J. J., M. M. Fu and M. Tsai (2001). "Resveratrol selectively inhibits *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **47**: 243-244.

Doré, J. and G. Corthier (2010). "Le microbiote intestinal humain." *Gastroentérologie Clinique et Biologique* **34**: 7-16.

Duarte, R., A. Silva, L. Vieira, L. Afonso and J. Nicoli (2004). "Influence of normal microbiota on some aspects of the immune response during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in mice." *Journal of Medical Microbiology* **53**: 741-748.

Duchesne, E. (1897). *Contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les microorganismes ; antagonisme entre les moisissures et les microbes*. Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon. France. **thèse de doctorat**: 64 pages.

Eraza, S., G. Rocca, M. Zaldivara, C. Delportea, N. Backhousea, C. Castroa, E. Belmonteb, F. D. Monachec and R. Garcia (2008). "Active Metabolites from *Dunalia spinosa* Resinous Exudates." *Zeitschrift für Naturforschung* **63**: 492-496.

Erdemoglu, N., B. Sennera and M. I. Choudhary (2004). "Bioactivity of Lignans from *Taxus baccata*." *Zeitschrift für Naturforschung* **59**: 498-498.

Farnsworth, N. R. and C. J. Kaas (1981). "An approach utilizing information from traditional medicine to identify tumor-inhibiting plants." *Journal of Ethnopharmacology* **3**: 85-99.

Fleming, A. (1929). "on the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*." *British Journal of Experimental Pathology* **10**: 229-236.

Fleurentin, J. (2002). *Des sources du savoir aux médicaments du futur: actes*, IRD éditions 468 pages.

Fraga, B. M., N. Quintana and C. E. Díaz (2009). "Anthraquinones from Natural and Transformed Roots of *Plocama pendula*." *Chemistry & Biodiversity* **6**: 182-192.

Goetz, P. and K. Ghedira (2012). *Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles*. in *Phytothérapie anti-infectieuse*, Springer Paris: 193-208.

Guillemot, D., C. Carbon and B. Balkau (1998). "Low dosage and long treatment duration of  $\beta$ -lactam: Risk factors for carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*." *Journal of the American Medical Association* **279**: 365-370.

Guillot, J. F. and J. P. Lafont (1989). "Antibiotiques et microflore intestinale." *Revue Scientifique et Technique (international Office of Epizootics)* **8**: 439-452.

Hamdan, H. Z., A. H. M. Ziad, S. K. Ali and I. Adam (2011). "Epidemiology of urinary tract infections and antibiotics sensitivity among pregnant women at Khartoum North Hospital." *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **10**: 2.

Hamel, V. (2006). *La vente illicite de médicaments dans les pays en développement : analyse de l'émergence d'un itinéraire thérapeutique à part entière, situé en parallèle du recours classique aux structures officielles de santé*. Faculté de pharmacie, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques. Lyon - France, Université Claude Bernard - Lyon I: 91 pages.

Hassan, G. S., N. A. Farag, G. H. Hegazy and R. K. Arafa (2008). "Design and Synthesis of Novel Benzopyran-2-one Derivatives of Expected Antimicrobial Activity through DNA Gyrase-B Inhibition." *Archiv der Pharmazie* **341**: 725-733.

Hazra, K. M., R. N. Roy, S. K. Sen and S. Laskar (2007). "Isolation of antibacterial pentahydroxy flavones from the seeds of *Mimosa elengi* L." *African Journal of Biotechnology* **6**: 1446-1449.

Henriet, L. and D. Guillemot (2000). "Pharmaco-épidémiologie des résistances, consommation des antibiotiques." *Médecine et Maladies Infectieuses* **30**: s160-s163.

Ho, K. Y., C. C. Tsai, J. S. Huang, C. P. Chen, T. C. Lin and C. C. Lin (2001). "Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **53**: 187-191.

Hooper, D. C. and E. Rubinstein (2003). *Quinolone antimicrobial agents*, American Society for Microbiology 485 pages.

Hounsa, A., L. Kouadio and P. D. Mol (2010). "Automédication par les antibiotiques provenant des pharmacies privées de la ville d'Abidjan en Côte d'Ivoire." *Médecine et maladies infectieuses* **40**: 333 - 340.

Houvenaeghel, M. (1992). Les aminosides. in *Antibiothérapie en réanimation et chirurgie*, Arnette Blackwell: 15-25.

Hsueh, P.-R., D. J. Hoban, Y. Carmeli, S.-Y. Chen, S. Desikan, M. Alejandria, W.-C. Ko and T. Q. Binh (2011). "Consensus review of the epidemiology and appropriate antimicrobial therapy of complicated urinary tract infections in Asia-Pacific region." *Journal of Infection* **63**: 114-123.

Hufford, C., S. Liu and A. Clark (1987). "Anticandidal activity of eupolauridine and onychine, alkaloids from *Cleistopholis patens*." *Journal of Natural Products* **50**: 961-964.

Isaacs, R. J., S. Davies, N. J. Wells and A. Harris (1995). "Topoisomerase H $\alpha$  and  $\beta$  as therapy targets in breast cancer." *Anti-Cancer Drugs* **6**: 195-211.

Jainkittivong, A., T. Butsarakamruha and R. P. Langlais (2009). "Antifungal activity of *Morinda citrifolia* fruit extract against *Candida albicans*." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **108**: 394-398.

Jan, E. P. M. D., T. C. P. Hardin, C. A. M. T. Kelly, R. C. R. Garcia and J. H. P. Jorgensen (2000). "Association of antibiotic utilization measures and control of multiple-drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*." *Infection Control and Hospital Epidemiology* **21**: 455-458.

Jasril, N. H. Lajis, L. Y. Mooi, M. A. Abdullah, M. A. Sukari and A. M. Ali (2003). "Antitumor promoting and actioxidant activities of anthraquinones isolated from the cell suspension culture of *Morinda elliptica*." *Asia pacific journal of molecular biology and biotechnology* **11**: 3-7.

Jeyachandran, R., A. Mahesh, L. Cindrella, S. Sudhakar and K. Pazhanichamy (2009). "Antibacterial activity of *Plumbagin* and root extracts of *Plumbago zeylanica* L." *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **51**: 17-22.

Jin, S. and N. Sato (2003). "Benzoquinone, the substance essential for antibacterial activity in aqueous extracts from succulent young shoots of the pear *Pyrus* spp." *Phytochemistry* **62**: 101-107.

Kanchanapoom, T., R. Kasai and K. Yamasaki (2002). "Iridoid and phenolic glycosides from *Morinda coreia*." *Phytochemistry* **59**: 551-556.

Kaper, J. B., J. P. Nataro and H. L. T. Mobley (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." *Nature Reviews Microbiology* **2**: 123-144.

Karlowisky, J. A., L. J. Kelly, C. Thornsberry, M. E. Jones and D. F. Sahn (2002). "Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 2540-2545.

Karlowisky, J. A., P. R. S. Lagacé-Wiens, P. J. Simner, M. R. DeCorby, H. J. Adam, A. Walkty, D. J. Hoban and G. G. Zhanel (2011). "Antimicrobial Resistance in Urinary Tract Pathogens in Canada from 2007 to 2009: CANWARD Surveillance Study " *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**: 3169-3175.

Katerere, D. R., A. I. Gray, R. J. Nash and R. D. Waigh (2003). "Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae." *Phytochemistry* **63**: 81-88.

Kipnis, É. and B. P. Guery (2010). "Réévaluation de la colistine." *Antibiotiques* **12**: 205-227.

Kolawole, A. S., O. M. Kolawole, Y. T. Kandaki-Olukemi, S. K. Babatunde, K. A. Durowade and C. F. Kolawole (2009). "Prevalence of urinary tract infections (UTI) among patients attending Dalhatu Araf Specialist Hospital, Lafia, Nasarawa State, Nigeria." *International Journal of Medicine and Medical Sciences* **1**: 163-167.

Kolpin, D. W., E. T. Furlong, M. T. Meyer, E. M. Thurman, S. D. Zaugg, L. B. Barber and H. T. Buxton (2002). "Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance." *Environmental Science & Technology* **36**: 1202-1211.

Kouadio, L. D., S. K. Traore, Y.-A. Bekro, M. Véronique, A. Dembele, K. Mamadou, P. Mazellier, B. Legube and P. Houenou (2009). "Contamination des Eaux de Surface par les Produits Pharmaceutiques en Zones Urbaines de Côte D'ivoire: Cas du District D'abidjan." *European Journal of Scientific Research* **27**: 140 - 151.

Kronenberg, A., S. Koenig, S. Droz and K. Mu"hleemann (2011). "Active surveillance of antibiotic resistance prevalence in urinary tract and skin infections in the outpatient setting." *Clinical Microbiology and Infection* **17**: 1845-1851.

Kukrić, Z. Z. and L. N. Topalić-Trivunović (2006). "Antibacterial activity of cis and trans resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* rhizome." *Acta periodica technologica* 2006 Issue 37, Pages: 131-136 **2006**: 131-136.

Laurencin, M., M. Amor, Y. Fleury and M. I. Baudy-Floc'h (2012). "De Novo Cyclic Pseudopeptides Containing Aza -  $\beta$  - amino Acids Exhibiting Antimicrobial Activities." *Journal of Medicinal Chemistry* **55**: 10885-10895.

Le Minor, L. and M. Véron (1989). *Bactériologie médicale*, Médecine Sciences Publications 1107 pages.

Leach, K. L., S. J. Brickner, M. C. Noe and P. F. Miller "Linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent." *Annals of the New York Academy of Sciences* **1222**: 49-54.

Leblebicioglu, H., S. Esen and T. N. U. T. I. S. Group (2003). "Hospital-acquired urinary tract infections in Turkey: a nationwide multicenter point prevalence study." *Journal of Hospital Infection* **53**: 207-210.

Lecomte, F., G. Grise, A. Morel and F. F. Lemeland (1986). "Infection des voies urinaires en pratique médicale de ville. Etude des données cliniques, de la répartition des espèces microbiennes responsables et de leur sensibilité à seize antibiotiques." *Pathologie Biologie* **34**: 483-489.

Legris, C. (2005). *La détection des médicaments contrefaits par investigation de leur authenticité. Étude pilote sur le marché pharmaceutique illicite de Côte d'Ivoire*. Faculté de Pharmacie. Nancy- France, Université Henri Poincaré - Nancy I: 165 pages.

Lerner, P. I. (2004). "Producing Penicillin." *New England Journal of Medicine* **351**: 524-524.

Li, B., D.-M. Zhang, Y.-M. Luo and X.-G. Chen (2006). "Three New and Antitumor Anthraquinone Glycosides from *Lasianthus acuminatissimus* Merr." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **54**: 297-300.

Lohombo-Ekomba, M. L., P. N. Okusa, O. Penge, C. Kabongo, M. I. Choudhary and O. E. Kasende (2004). "Antibacterial, antifungal, antiplasmodial, and cytotoxic activities of *Albertisia villosa*." *Journal of Ethnopharmacology* **93**: 331-335.

Lv, L., H. Chen, C.-T. Ho and S. Sang. (2001). "Chemical components of the roots of noni (*Morinda citrifolia*) and their cytotoxic effects." *Fitoterapia* **82**: 704-708.

Madan, S., G. Singh, Y. Kumar, K. Kohli, R. M. Singh, S. Mir and S. Ahmad (2008). "A New Flavanone from *Flemingia strobilifera* (Linn) R. Br. and its Antimicrobial Activity." *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **7**: 921-927.

Madigan, M. and J. Martinko (2006). *Biologie des micro-organismes*, Pearson 1088 pages.

Mafart, P., O. Couvert, S. Gaillard and I. Leguerinel (2002). "On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model." *International Journal of Food Microbiology* **72**: 107 - 113.

Magiorakos, A., A. Srinivasan, R. Carey, Carmeli, M. Falagas, C. Giske, S. Harbarth, J. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. Paterson, L. Rice, J. Stelling, M. Struelens, A. Vatopoulos, J. Weber and D. Monnet (2011). "Multidrug-Resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance." *European Journal of Clinical Microbiology* **18**: 268-281.

Mandić, B. M., D. N. Gođevac, V. P. Beškoski, M. R. Simić, S. S. Trifunović, V. V. Tešević, V. V. Vajs and S. M. Milosavljević (2009). "Pyrrolizidine alkaloids from seven wild-growing *Senecio* species in Serbia and Montenegro." *Journal of the Serbian Chemical Society* **74**: 27-34.

Mayoral, G., M.Ferreira, A. Eden, P. Gueudet, C. Miquel and E. Lecaillon (2010). "Evolution de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération de 2000 à 2008 au centre hospitalier de Perpignan." *Pathologie Biologie* **58**: 7-10.

McDermott, W. and D. E. Rogers (1982). "Social ramifications of control of microbial disease." *The Johns Hopkins Medical Journal* **151**: 302-312.

McGowan, J. J. (1987). "Is antimicrobial resistance in hospital microorganisms related to antibiotic use?" *Bulletin of the New York Academy of Medicine* **63**: 253-268.

Medeiros, A. A. (1997). "Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics." *Clinical Infectious Diseases* **24**: S19-S45.

Merrill, E. D. (1936). "Otto Kuntze's new genera and new species of Indo-China plants." *Brittonia* **2**: 189-200.



- Mian-Ying, W., B. West, C. Jensen, D. Nowicki, S. Chen, A. Palu and G. Anderson. (2002). "*Morinda citrifolia* (noni): A literature review and recent advances in noni research." *Pharmacol. Sin.* **12**: 1127-1141.
- Mitscher, L. A., P. Devasthale and R. Zavod (2003). Structure-Activity Relationships. in *Quinolone antimicrobial agents*. 2. Washington D. C., American Society for Microbiology Press: 3-51.
- Monnet, D., H. Emborg, S. Andersen, C. Schöller, T. Sørensen and F. Bager (2000). "Surveillance of antimicrobial resistance in Denmark." *Eurosurveillance* **5**: 1-5.
- Monnet, D., R. Gaynes, F. Tenover and J. McGowan (1995). "The ICARE pilot hospitals. Ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (PA) and ceftazidime (CFZ) usage in NNIS hospitals: preliminary results of Project ICARE Phase One." *Infect Control and Hospital Epidemiology* **16**: 19.
- Monnet, D. L. (2000). "Consommation d'antibiotiques et résistance bactérienne." *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* **19**: 409-417.
- Morita, Y., E. Matsumura, T. Okabe, M. Shibata, M. Sugiura, T. Ohe, H. Tsujibo, N. Ishida and Y. Inamori (2003). "Biological Activity of Tropolone." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **26**: 1487-1490.
- Moroh, J., C. Bahi, K. Dje, Y. Loukou and F. Guede-Guina (2008). "Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance in-vitro des souches d'*Escherichia coli*." *Bulletin de la société royale des sciences de Liège* **77**: 44 - 61.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of Immunological Methods* **65**: 55-63.
- Neumann, E., M. Oliveira, C. Cabral, L. Moura, J. Nicoli and E. Vieira (1998). "Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice." *Brazilian Journal of Medical Biological Research* **31**: 1565-1573.
- Noiarsa, P., S. Ruchirawat, H. Otsuka and T. Kanchanapoom. (2006). "A new iridoid glucoside from the Thai medicinal plant, *Morinda elliptica* Ridl." *Journal Natural Medicine* **60**: 322-324.
- Normak, H. B. and S. Normak (2002). "Evolution and spread of antibiotic resistance." *Journal of Internal Medicine* **252**: 91-106.
- O'Brien, T. F. and J. Stelling (2011). "Integrated Multilevel Surveillance of the World's Infecting Microbes and Their Resistance to Antimicrobial Agents." *Clinical Microbiology Reviews* **24**: 281-95.
- O'Hagan, D. (2000). "Pyrrole, pyrrolidine, pyridine, piperidine and tropane alkaloids." *Natural Product Reports* **17**: 435-446.

- Oh, K.-B., W. Mar, S. Kim, J.-Y. Kim, T.-H. Lee, J.-G. Kim, D. Shin, C. J. Sim and J. Shin (2006). "Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Bis(indole) Alkaloids from the *Sponge Spongosorites sp.*" *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **29**: 570-573.
- Oladeinde, B. H., R. Omoregie, M. Olley and J. A. Anunibe (2011). "Urinary tract infection in a rural community of Nigeria " *North American Journal Medical Sciences* **3**: 75-77.
- Oliveira, M., W. Tafuri, L. Afonso, M. Oliveira, J. Nicoli and E. Vieira (2005). "Germ-free mice produce high levels of interferongamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions." *Parasitology* **131**: 477-488.
- OMS (2002) "Stratégie de l'OMS pour la Médecine Traditionnelle pour 2002–2005." OMS, 74.
- Orrett, F. and G. Davis (2006). "A comparison of antimicrobial susceptibility profile of urinary pathogens for the years, 1999 and 2003." *West Indian Medical Journal* **55**: 95-99.
- Ostrow, M. J., P. G. Cornelisse, K. V. Heath, K. J. Craib, M. T. Schechter, M. O'Shaughnessy, J. S. Montaner and R. S. Hogg (1997). "Determinants of complementary therapy use in HIV-infected individuals receiving antiretroviral or anti-opportunistic agents." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* **15**: 115-120.
- Oussou, K. R., C. Kanko, N. Guessend, S. Yolou, M. Dosso, Y. T. N'Guessan, G. Figueredo, J.-C. Chalchat and G. Koukoua (2004). "Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire." *Comptes Rendus Chimie* **7**: 1081-1086.
- Pasteur, L. and J. Joubert (1877). "Charbon et septicémie." *Les Comptes Rendus de Académie des Sciences* **85**: 101-105.
- Patel, S., P. P. Taviad, M. Sinha, T. B. Javadekar and V. P. Chaudhari (2012). "Urinary Tract Infections among Patients at G.G.Hospital & Medical College, Jamnagar." *National Journal of Community Medicine* **3**: 138-141.
- Pauli, A. (2006). "Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils." *Medicinal Research Reviews* **26**: 223-268.
- Pawlus, A., B. Su, W. Keller and A. Kinghorn (2005). "An anthraquinone with potent quinone reductase-inducing activity and other constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (noni)." *Journal of Natural Products* **68**: 1720-1722.
- Perronne, C. (1999). *Les maladies infectieuses*, Doin Editions 406 pages.
- Peter, H. and B. Richard (2001). *Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops: (except Ornamentals)*, Springer 3700 pages.
- Phakhodee, W. (2012). "Distribution of Naturally Occurring Anthraquinones, Iridoids and Flavonoids from *Morinda* Genus: Chemistry and Biological Activity." *Walailak Journal of Science and Technology* **9**: 173-188.
- Rahal, J., C. Urban and D. Horn (1998). "Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *klebsiella*." *Journal of the American Medical Academy* **280**: 1233-1237.

Rahman, F., S. Chowdhury, M. M. Rahman, D. Ahmed and A. Hossain (2009). "Antimicrobial Resistance Pattern of Gram-negative Bacteria Causing Urinary Tract Infection." *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences* **2**: 44-50.

Raibaud, P. and R. Ducluzeau (1989). "Etude de la colonisation bactérienne du tractus gastro-intestinal à l'aide de modèles expérimentaux." *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* **8**: 361-363.

Randrianirina, F., J.-L. Soares, J.-F. Carod, E. Ratsima, V. Thonnier, P. Combe, P. Grosjean and A. Talarmin (2007). "Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community-acquired urinary tract infections in Antananarivo, Madagascar." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**: 309-312.

Ranjbar, R., M. Haghi-Ashtiani, N. J. Jafari and M. Abedini (2009). "The Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Bacterial Uropathogens Isolated from Pediatric Patients." *Iranian Journal of Public Health* **38**: 134-138.

Rath, G., M. Ndonzao and K. Hostettmann (1995). "Antifungal anthraquinones from *Morinda lucida*." *International journal of pharmacognosy*. **33**: 107-114.

Razafimandimbison, S. G., T. D. McDowell, D. A. Halford and B. Bremer (2009). "Molecular phylogenetics and generic assessment in the tribe *Morindeae* (*Rubiaceae Rubioideae*): How to circumscribe *Morinda L.* to be monophyletic?" *Molecular Phylogenetics and Evolution* **52**: 879-886.

Rivera, A., S. Giono, M. Gonzalez, N. Rodríguez and L. Cedillo (2011). "Antibacterial effect of *Morinda citrifolia* fruit juice against mycoplasmas." *Annals of Biological Research* **2**: 491-497.

Rosset, R. (2003). "Pasteur et les vétérinaires." *Bulletin de la société Française d'histoire de la Médecine et des Sciences Vétérinaires* **2**: 1-25.

Ruksilp, T., J. Sichaem, S. Khumkratok, P. Siripong and S. Tip-pyang (2011). "Anthraquinones and an iridoid glycoside from the roots of *Morinda pandurifolia*." *Biochemical Systematics and Ecology* **39**: 888-892.

S Sang, X. C., N. Zhu, R. Stark, V. Badmaev, G. Ghai, R. Rosen and C. Ho (2001). "Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia*." *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4478-4481.

Sánchez-Moreno, C., J. A. Larrauri and F. Saura-Calixto (1998). "A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **76**: 270-276.

Sarges, R. and B. Witkop (1965). "Gramicidin A. V. The structure of valine- and isoleucine-gramicidin A." *Journal of the American Chemical Society* **87**: 2011-2020.

Sato, M., S. Fujiwara, H. Tsuchiya, T. Fujii, M. Iinuma, H. Tosa and Y. Ohkawa (1996). "Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria." *Journal of Ethnopharmacology* **54**: 171-176.

Schentag, J. J., J. M. Hyatt, J. R. Carr, J. A. Paladino, M. C. Birmingham, G. S. Zimmer and T. J. Cumbo (1998). "Genesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), how treatment of MRSA infections has selected for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, and the importance of antibiotic management and infection control." *Clinical Infectious Diseases* **26**: 1204-1214.

Schito, G. C., K. G. Naber, H. Botto, J. Palou, T. Mazzei, L. Gualco and A. Marchese (2009). "The ARES study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections." *International Journal of Antimicrobial Agents* **34**: 407-413.

Schripsema, J., G. Caprini and D. Dagnino (2006). "Revision of the structures of citrifolinin A, citrifolinolide, yopaaoside A, yopaaoside B, and morindacin, iridoids from *Morinda citrifolia* L. and *Morinda coreia* Ham." *Organic Letters* **8**: 5337-5340.

Shen, L. I. (2003). Quinolone-DNA interaction. in *Quinolone antimicrobial agents*. 2, ASM Press: 77-95.

Shlaes, D. M., D. N. Gerding, W. A. Craig, D. L. Bornstein, R. A. Duncan, M. R. Eckman, W. E. Farrer, W. H. Greene, V. Lorian, S. Levy, S. M. Paul, J. Ruskin, F. C. Tenover and C. Watanakunakorn (1997). "Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: Guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals." *Clinical Infectious Diseases* **25**: 584-599.

Singh, S. B. and J. F. Barrett (2006). "Empirical antibacterial drug discovery- foundation in natural products." *Biochemical Pharmacology* **71**: 1006-1015.

Sire, J.-M., P. Nabeth, J.-D. Perrier-Gros-Claude, I. Bahsoun, T. Siby, E. A. Macondo, A. Gaye-Diallo, S. Guyomard, A. Seck, S. Breurec and B. Garin (2007). "Antimicrobial resistance in outpatient *Escherichia coli* urinary isolates in Dakar, Senegal." *J Infect Developing Countries* **1**: 263-268.

Smithson, A., C. Chico, J. Ramos, C. Netto, M. Sanchez, J. Ruiz, R. Porrón and M. T. Bastida (2012). "Prevalence and risk factors for quinolone resistance among *Escherichia coli* strains isolated from males with community febrile urinary tract infection." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **31**: 423-430.

Soussy, C. J., G. Carret, J. D. Cavallo, H. Chardon, C. Chidiac, P. Choutet, Courvalin, H. Dabernat, H. Drugeon, L. Dubreuil, F. Goldstein, V. Jarlier, R. Leclercq, M. H. Nicolas-Chanoine, A. Philippon, C. Quentin, B. Rouveix and J. Sirot (2000). "Comité Française de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2000 - 2001." *Pathologie biologique* **48**: 799-831.

Souza, D., A. Vieira, A. Soares, V. Pinho, J. Nicoli and L. Vieira (2004). "The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses." *The Journal of Immunology* **173**: 4137-4146.

Tagajdid, M. R., L. Boumhil, M. Iken, M. Adnaoui and A. Benouda (2008). "Étude de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées dans les urines aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération." *Médecine et maladies infectieuses* **40**: 70-73.

Tajudin, T.-J. S. A., N. Mat, A. B. Siti-Aishah, A. A. M. Yusran, A. Alwi and A. M. Ali (2012). "Cytotoxicity, antiproliferative effects, and apoptosis induction of methanolic extract of *Cynometra cauliflora* Linn. Whole fruit on human promyelocytic leukemia HL-60 Cells." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**: 1-6.

Takano, T., T. Kondo and F. Nakatsubo (2006). "Facile synthesis of rubiadin by microwave heating." *The Japan Wood Research Society* **52**: 90-92.

Tamura, S., B. K. Kubata, Syamsurizal, S. Itagaki, T. Horii, M. K. Taba and N. Murakami (2010). "New anti-malarial phenylpropanoid conjugated iridoids from *Morinda morindoides*." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **20**: 1520-1523.

Tankovic, J., H. Aubry-Damon and R. Leclercq (1997). "Résistance aux antibiotiques autres que les bêta-lactamines chez *Staphylococcus aureus*." *Médecine et Maladies Infectieuses* **27**: 207-216.

Tanvir, R., R. Hafeez and S. Hasnai (2012). "Prevalence of multiple drug resistant *Escherichia coli* in Patients of urinary tract infection registering at a diagnostic laboratory in Lahore, Pakistan." *Pakistan Journal of Zoology* **44**: 707-712.

Tao, J., T. Morikawa, S. Ando, H. Matsuda and M. Yoshikawa (2003). "Bioactive Constituents from Chinese Natural Medicines. XI. Inhibitors on NO Production and Degranulation in RBL-2H3 from *Rubia yunnanensis*: Structures of Rubianosides II, III, and IV, Rubianol-g, and Rubianthraquinone." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **51**: 654-662.

Taylor, R. B., O. Shakoore, R. H. Behrens, M. Everard, A. S. Low, J. Wangboonskul, R. G. Reid and J. A. Kolawole (2001). "Pharmacopoeial quality of drugs supplied by Nigerian pharmacies." *The Lancet* **357**: 1933-1936.

Tenstedt, D. (2010). Quiz: "Dermato-allergologie et toxiderme". in *Progrès en Dermato-Allergologie Tome XVI: Strasbourg 2010*, John Libbey Eurotext. **16**: 133-162.

Tewey, K. M., G. L. Chen, E. M. Nelson and L. F. Liu (1984). "Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II." *Journal of Biological Chemistry* **259**: 9182-9187.

Therapeutics\_letter. (1998). "Herbal Medicines – An Evidence Based Look." issue 25 /Juin - Aug. Retrieved 13 avril, 2013, from <http://ti.ubc.ca/newsletter/herbal-medicines-%E2%80%93-evidence-based-look>.

Thévenot, P. (2003). *De l'antibiogramme à la prescription*, Editions BioMérieux 136 pages.

Tiemersma, E. W., S. L. Bronzwaer, O. Lyytikäinen, J. E. Degener, P. Schrijnemakers, N. Bruinsma, J. Monen, W. Witte and H. Grundman (2004). "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002." *Emerging infectious diseases* **10**: 1627-1634.

Uzunovic-Kamberovic, S. (2006). "Antibiotic resistance of coliform organisms from community-acquired urinary tract infections in Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58**: 344-48.

Vercauteren, J., C. Chèze and J. Triaud (1998). Polyphenols 96: 18th International Conference on Polyphenols, Bordeaux (France), July 15-18, 1996, Institut National de la Recherche Agronomique 289 pages.

Wallace, B. A. (1998). "Recent Advances in the High Resolution Structures of Bacterial Channels: Gramicidin A." *Journal of Structural Biology* **121**: 123-141.

Walsh, C. (2003). *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, Amer Society for Microbiology 335 pages.

Wenzel, R. P. (2004). "The Antibiotic Pipeline Challenges, Costs, and Values." *New England Journal of Medicine* **351**: 523-526.

WHO (2002) "Stratégie de l'OMS pour la Médecine Traditionnelle pour 2002–2005." OMS, 74 pages.

Wiegand, I., K. Hilpert and R. E. W. Hancock (2007). "Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances." *Nature protocols* **3**: 163-175.

Xiang, W., Q.-S. Song, H.-J. Zhang and S.-P. Guo (2008). "Antimicrobial anthraquinones from *Morinda angustifolia*." *Fitoterapia* **79**: 501-504.

Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, L. M. Yamanaka and S. Nakamura (1991). "Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**: 1647-1650.

Zhang, H., Q. Zhang, X. Zhang, W. Ye and Y. Wang. (2010). "Chemical constituents from the root of *Morinda officinalis*." *Chin. J. Nat.* **8**: 192-195.

Zhu, L., H. Li, Y. Liang, X. Wang, H. Xie, T. Zhang and Y. Ito (2009). "Application of high-speed counter-current chromatography and preparative high-performance liquid chromatography mode for rapid isolation of anthraquinones from *Morinda officinalis* How." *Separation and Purification Technology* **70**: 147-152.

Zouhir, A., E. Kheadr, I. Fliss and J. B. Hamida (2011). "Partial purification and characterization of two bacteriocin-like inhibitory substances produced by bifidobacteria." *African Journal of Microbiology Research* **5**: 411-418.

## **Valorisation des travaux de la thèse**

## Valorisation des travaux de la thèse

### Publication avec comité de lecture

Jean-Luc Aboya Moroh, Yannick Fleury, Honoré Tia Calixte Bahi, Claire Lietard, Vincent Etoh, Adama Coulibaly, Roger Labia and Ivan Leguerinel. Diversity and antibiotic resistance of uropathogenic bacteria from Abidjan (Côte d'Ivoire) over twelve-year period. accepté dans African journal of urology; DOI: 10.1016/j.afju.2013.11.005

### Communications sans actes dans un congrès international ou national

Moroh J.-L., 13<sup>ème</sup> édition des Doctoriales de Bretagne du 05 au 09 décembre 2011 à Landerneau. « *Morinda morindoides* et la résistance thérapeutique des *Escherichia coli* »

### Communications par affiche dans un congrès international ou national

Jean-Luc Moroh, Roger Labia, Adama Coulibaly, Ivan Leguerinel and Yannick Fleury. Colloque international « ingrédients cosmétiques et biotechnologiques » (COSM'ING 2013) du 26 au 28 juin 2013 à Saint Malo. Poster: "Antimicrobial phytomolecules from the African medicinal plant *Morinda morindoides* "

Moroh Jean-Luc, Fleury Yannick, Bahi Calixte, Labia Roger, Coulibaly Adama, Leguerinel Ivan. 2<sup>ème</sup> Journée des doctorants de l'ED SICMA le septembre 2012 à Lorient. Poster: "Composés antibactériens isolés de *Morinda morindoides*".

Moroh Jean-Luc, Fleury Yannick, Labia Roger, Coulibaly Adama, Leguerinel Ivan 4<sup>ème</sup> Colloque international « Molécules, ingrédient Santé 2011 » (MIS 2011) du 25 au 26 mai 2011 à Quimper. Poster: "Antibacterial activity of *Morinda morindoides* on stains of *Escherichia coli*"

Moroh J.-L., Fleury Y., Labia R., Coulibaly A., Leguerinel I. Journée des doctorants et Post-doctorants en Biologie santé en Bretagne 2011 du 20 juin 2011 à Brest. Poster: "Antibacterial activity of *Morinda morindoides* on stains of *Escherichia coli*"



Moroh J.-L., Bahi C., Edoh V., Labia R., Leguerinel I. Coulibaly A. Journée des doctorants et Post-doctorants en Biologie santé en Bretagne 2010 du 14 juin 2010 à Rennes. Poster intitulé "résistance thérapeutique des souches d'*Escherichia coli* uropathogènes isolées au Centre Hospitalier Universitaire de Treichville (Abidjan, Côte d'Ivoire)

### **Autres productions**

Jean Luc Moroh Interview « Une plante antibactérienne ». Sciences Ouest Janvier 2012. N°294 p 4  
: <http://www.espace-sciences.org/sciences-ouest/294/actualite/une-plante-antibacterienne>.

### **Prix et distinctions obtenues**

Moroh J-L , Fleury Y, Labia R, Coulibaly A et Leguerinel I, 2012, Composés antibactériens isolés de *Morinda morindoides*. Prix de la meilleure communication par affiche lors de la 2<sup>ème</sup> édition de la journée des doctorants de l'ED-SICNA du, 13 Septembre 2012, Lorient

Moroh J-L , Fleury Y, Labia R, Coulibaly A et Leguerinel I, 2011, Antibacterial Activity of *Morinda morindoides* on Strains of *Escherichia coli*, Prix du meilleur poster lors de la 13e édition des Doctoriales® Bretagne, 5 au 9 décembre 2011, Landerneau



## Résistance thérapeutique des souches d'*Escherichia coli* uropathogènes isolées du Centre Hospitalier Universitaire de Treichville (Côte d'Ivoire)



Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique

MOROH J.-L.<sup>1,2</sup>, BAH C.<sup>2</sup>, YEDOH V.<sup>3</sup>, LABIA R.<sup>1</sup>, LEGUERINEL I.<sup>1</sup>, COULIBALY A.<sup>2</sup>

1 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (UBO-France) . 6 Rue de l'université 29000 Quimper cedex France Tel 02 98 64 19 37  
2 Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique (UCA – Côte d'Ivoire). 22 bp 582 Abidjan 22 Côte d'Ivoire  
3 Centre Hospitalier Universitaire de Treichville (Abidjan – Côte d'Ivoire)

### Introduction

les infections deviennent progressivement récurrentes avec l'apparition des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques. Parmi ces infections microbiennes rencontrées en santé publique et vétérinaire, celles causées par *Escherichia coli* occupent une place particulière de par leurs diversités. Ces germes qui constituent naturellement une flore commensale, sont devenus pathogènes par des échanges génétiques. Ils sont responsables des infections urinaires, de septicémie, de méningite, de diarrhée et autres infections.

Pour lutter contre ces infections, le traitement par l'antibiothérapie s'appuie sur des données épidémiologiques actualisées et géographiquement adaptées (BAJAJ JK et al, 1999).

Dans ce cadre, cette étude épidémiologique s'appuie sur les Examens Cytobactériologiques des Urines (ECBU) effectués au Centre hospitalier Universitaire de Treichville (Abidjan, Côte d'Ivoire).

### Méthode

De mars 2000 à octobre 2008, le laboratoire central du CHU de Treichville (Abidjan-Côte d'Ivoire) a réceptionné 9 656 échantillons d'urine en provenance de patients en consultation ou hospitalisés des différents services. Ces échantillons ont été enregistrés et traités selon le protocole de routine des ECBU. La sensibilité aux différents antibiotiques a été effectuée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

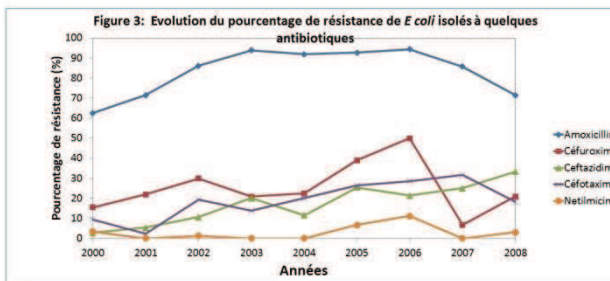
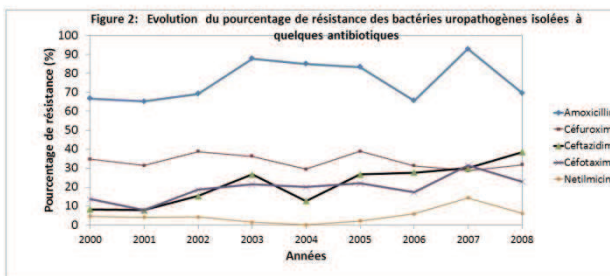
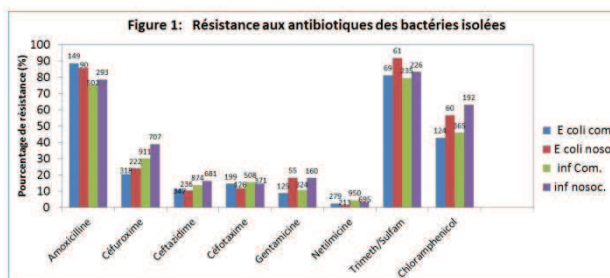
Les résultats des analyses ont été traités par WHONET, un logiciel de surveillances épidémiologiques et des résistances aux antibiotiques fourni par OMS.

### Résultats

Les infections urinaires nosocomiales et communautaires sont causées principalement par l'espèce *Escherichia coli* (Tableau 1). Le pourcentage de résistance élevé des bactéries uropathogènes isolées pour certains antibiotiques constitue un problème de santé publique (Figure 1, 2 et 3).

Tableau 1: distribution des espèces uropathogènes isolées

Micro-organisme	consultations	hospitalisé	TOTAL
<i>Citrobacter sp.</i>	29 (2,04%)	17 (2%)	46 (1,94%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	158 (11,11%)	124 (13%)	282 (11,90%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	69 (4,85%)	43 (5%)	112 (4,73%)
<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b>444 (31,22%)</b>	<b>287 (30%)</b>	<b>731 (30,84%)</b>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	139 (9,77%)	75 (8%)	214 (9,03%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	170 (11,95%)	179 (19%)	349 (14,73%)
<i>Prateus mirabilis</i>	24 (1,69%)	41 (4%)	65 (2,74%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61 (4,29%)	63 (7%)	124 (5,23%)
<i>Salmonella sp.</i>	5 (0,35%)	5 (1%)	10 (0,42%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	323 (22,71%)	114 (12%)	437 (18,44%)
	1422 (60%)	948 (40%)	2370



### Discussion

Dans cette étude, nous avons observé que l'espèce *Escherichia coli* représente l'espèce principale responsable d'infections urinaires. Bien que le tube digestif soit son milieu naturel, sa capacité à se lier à l'épithélium urinaire à travers les adhésines qu'elle possède pourrait justifier cette prédominance (Labari et al., 2003). La forte résistance des souches d'*Escherichia coli* et des germes uropathogènes isolés à l'amoxicilline pourrait être due à l'utilisation de contrefaçons d'antibiotiques vendues par des commerçants ambulants et dont l'usage excessif n'est pas contrôlé (Pouillot et al., 2008; Hamel et al., 2006). Cette résistance des bactéries commence à concerner l'usage d'autres antibiotiques comme la ceftazidime, la cefotaxime, la netilmicine et sans doute d'autres molécules.


### Perspectives

Pour aider à renouveler l'arsenal thérapeutique, la piste des phyto-molécules antimicrobiennes est explorée. La recherche de molécules actives antibactériennes isolées de *Morinda morindoides*, plante utilisée traditionnellement en Côte d'Ivoire, a été initiée au LUBEM.

### Références Bibliographiques

- ALVAREZ C., PANGON B., ALLOUCH P. Y., GHNASSIA J. C. 1992. Infections urinaires: Principaux aspects épidémiologiques, bactériologiques et cliniques. Feuille. Biol., 23,15-24.  
BAJAJ J. K., KARYAKARTE R. P., KULKARNI J. D., DESHMUKH A. B. 1999. Changing a etiology of urinary tract infections and emergence of drug resistance as a major problem. J. Commun. Dis., 31, 181-184.  
KASS E.H. 1957. Bacteriuria and diagnosis of infection of the urinary tract. Arch. Inter. Med., 100, 709-715.  
POUILLOT R., BILONG C., BOISIER P., CISS M., MOUMOUNI A., AMANI I., NABETH P. 2008. Le circuit informel des médicaments à Yaoundé et à Niamey : étude de la population des vendeurs et de la qualité des médicaments distribués. Bull Soc Pathol. Exot., 101, 2, 113-118.  
LARABI K., MASMOUDI A., FENDRI C. 2003. Etude bactériologique et phénotypes de résistance des germes responsables d'infections urinaires dans un centre hospitalo-universitaire de Tunis: à propos de 1930 cas. Med. Mal. Infect., 33, 348-352.






**LUBEM**  
Laboratoire Universitaire  
de Biodiversité et Ecologie  
Microbienne

## Antibacterial Activity of *Morinda morindoides* on Strains of *Escherichia coli*

Moroh Jean-Luc<sup>1,2,3</sup>, Fleury Yannick<sup>1,2</sup>, Labia Roger<sup>1,2</sup>, Coulibaly Adama<sup>3</sup>, Leguerinel Ivan<sup>1,2</sup>

1 Université Européenne de Bretagne, France  
2 Université de Bretagne Occidentale, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, 6 rue de l'université, 29334 Quimper cedex. moroh\_abya@yahoo.fr  
3 Université de Cocody-Abidjan, Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, 22 bp 582 Abidjan 22 Côte d'Ivoire

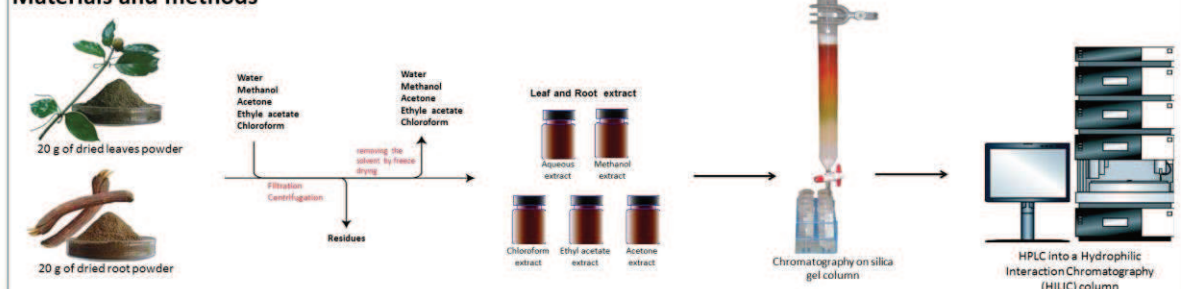


Laboratoire de  
Pharmacodynamie  
Biochimique

### Introduction

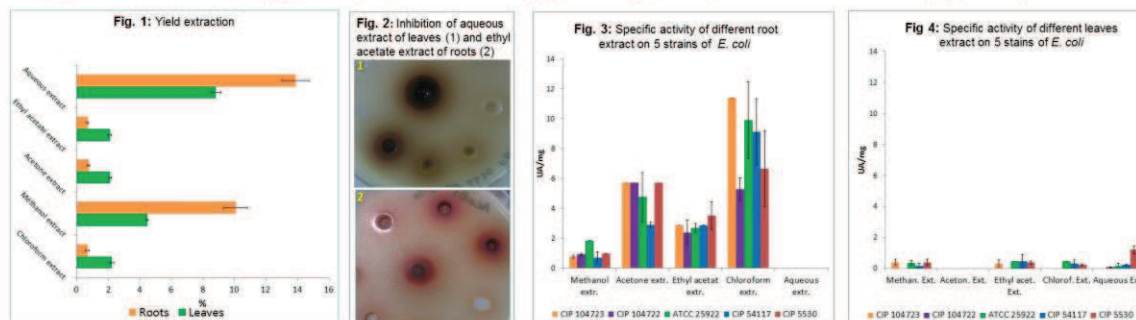
The emergence of pathogenic bacteria becoming more and more resistant to antibiotics and their distribution in human populations are a major concern for human health. Among the recurrent infections, those caused by *Escherichia coli* are particularly known to imply a wide range of pathologies. Moreover, since traditional medicine is currently used to treat the infections by the plant, new active substances from such plants must be investigated to reduce the frequency of infections caused by antibiotic resistant bacteria.

### Materials and methods

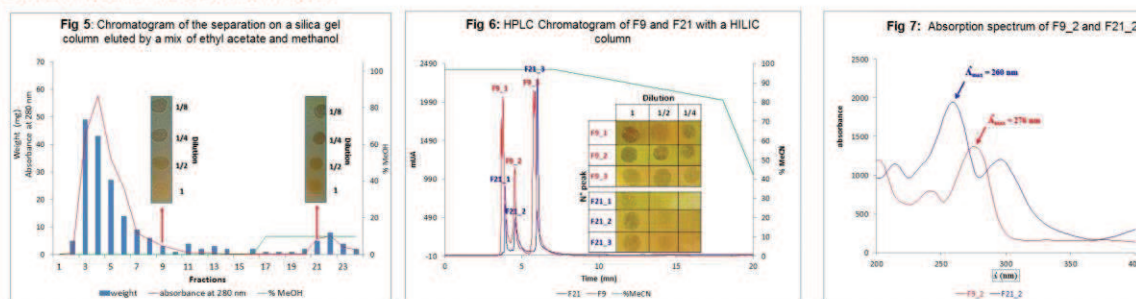


### Results and Discussion

Our goal is to purify and characterize the active(s) compound(s) produced by *Morinda morindoides*. Antibacterial compound(s) extraction using aqueous and organic solvent was assayed (Fig. 1 and 2). Specific activities highlights a stronger activity in root than leaves extract.(Fig. 3 and 4).



The root chloroform extract exhibiting the higher specific activity was loaded on silica gel chromatography. Anti *E. coli* activity was mainly recovered in fraction 9 and 21 (Fig. 5). They were fractionated onto HPLC - HILIC column leading to 3 main components. The stronger antibacterial activity was detected in peak 2 for both of them (Fig. 6).



Although these two peaks exhibit the same retention time, their UV spectrum are different (Fig. 7) indicating a different chemical structure.

### Conclusion

The roots of *Morinda morindoides* contain antimicrobial substances. In this study, we developed a protocol for extraction and purification of antimicrobial substances from this plant. With the current NMR of the various active factions, the antibacterial substances contained in the roots of this plant will be characterized.





**LUBEM**  
Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne

## Composés antibactériens isolés de *Morinda morindoides*

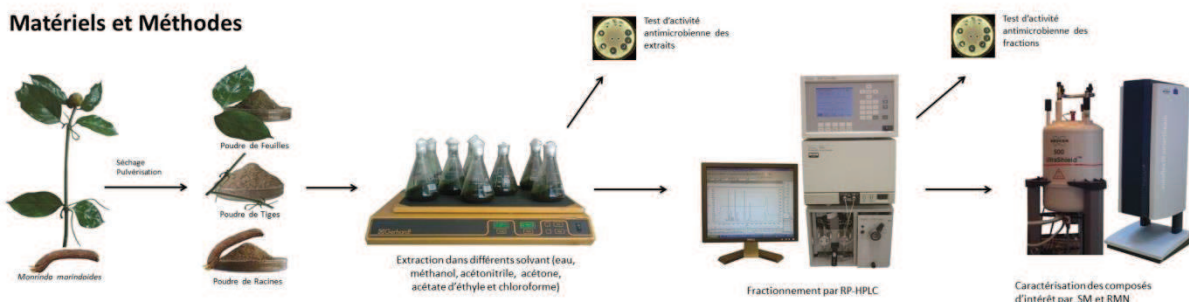
Moroh Jean-Luc<sup>1,2</sup>, Fleury Yannick<sup>1</sup>, Bahi Calixte<sup>2</sup>, Labia Roger<sup>1</sup>, Coulibaly Adama<sup>2</sup>, Leguériel Ivan<sup>1</sup>

1 Université de Bretagne Occidentale, UEB, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, 6 rue de l'université, 29334 Quimper cedex. moroh\_abya@yahoo.fr  
2 Université Félix Houphouët Boigny de Cocody-Abidjan, Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, 22 bp 582 Abidjan 22 Côte d'Ivoire

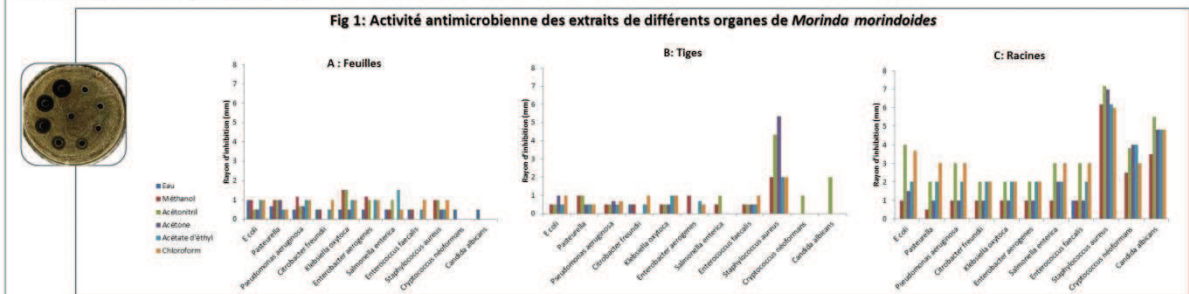


Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique

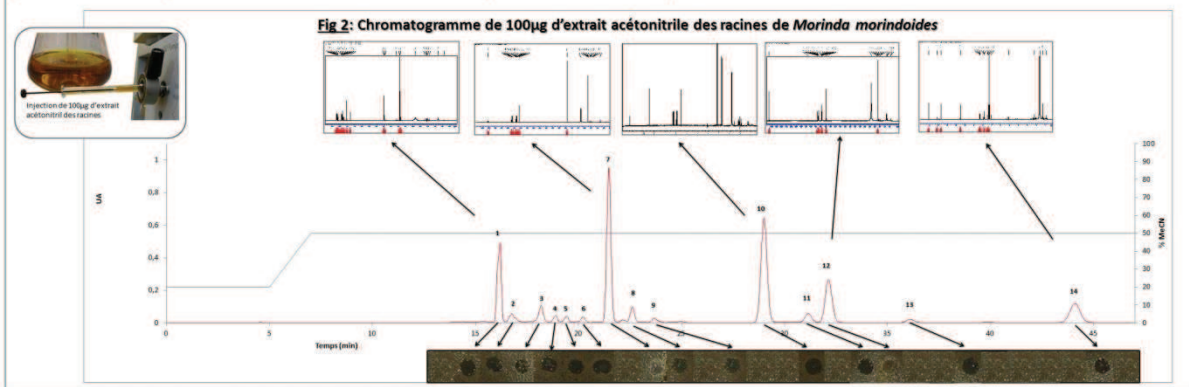
**Introduction**  
Les infections récurrentes causées par des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques conduisant à des impasses thérapeutiques constituent aujourd'hui un réel problème de santé publique. Pour y faire face, en complément des mesures de surveillance et de régularisation de l'antibiothérapie, l'arsenal des composés antimicrobiens doit être renouvelé. Les extraits de plantes utilisés de manière empirique par près de 70% de la population mondiale pour traiter diverses infections. Dans ce cadre, des molécules à propriétés anti-bactériennes ont été recherchés, purifiés et identifiés chez *Morinda morindoides*, plante médicinale fréquemment utilisée en Côte d'Ivoire.



**Résultats et Discussion**  
Des tests d'activités antimicrobiennes ont été réalisés sur les différents extraits. La racine de *Morinda morindoides* est l'organe qui concentre plus ces principes actifs. L'acétonitrile est le solvant qui extrait le mieux ces composés (Fig 1). Par ailleurs nous avons noté la présence de composés antioxydants dont la plus grande activité est observée dans l'extrait aqueux des feuilles.





Le fractionnement de l'extrait "acétonitrile" des racines par RP-HPLC (Fig 2) nous a permis d'isoler 5 phytomolécules aromatiques de la famille des anthraquinones (Fraction 1, 7, 10, 12 et 14) dont les spectres RMN sont présentés sur la figure 5. Les composés F14 et F12 ont une CMI de 32 µg/ml vis-à-vis d'une souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (SARM) tandis que celle du composé F10 est de 16 µg/ml. Pour ces composés, les tests d'activités hémolytiques présentent une hémolyse de moins de 17% des hématies humaines pour des concentrations équivalentes à 6 fois leur CMI.



**Conclusion**

Des composés antimicrobiens de *Morinda morindoides* ont été purifiés et caractérisés. Il s'agit d'anthraquinones présentant des structures originales. La quantification de leur effets antibactériens (CMI et CMB) sur une gamme de microorganismes est en cours. Ces tests seront complétés par l'évaluation de différentes activités biologiques (effet antioxydant, cyto-toxicité et cibles moléculaires). Ces résultats orienteront les applications et les utilisations possibles de ces composés dans les domaines de la médecine humaine, vétérinaire ou en cosmétologie.



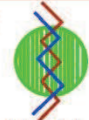
## Antimicrobial phytomolecules from the African medicinal plant *Morinda morindoides*

Jean-Luc MOROH <sup>1,2</sup>, Roger LABIA <sup>1</sup>, Adama COULIBALY <sup>2</sup>, Ivan LEGUERINEL <sup>1</sup> and Yannick FLEURY <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Bretagne Occidentale, UEB, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, 6 rue de l'université, 29334 Quimper cedex.

moroh\_aboya@yahoo.fr

<sup>2</sup> Université Félix Houphouët Boigny de Cocody-Abidjan, Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, 22 bp 582 Abidjan 22 Côte d'Ivoire

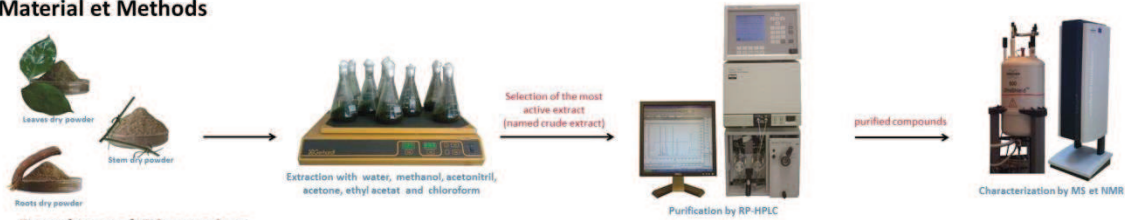


Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique

### Introduction

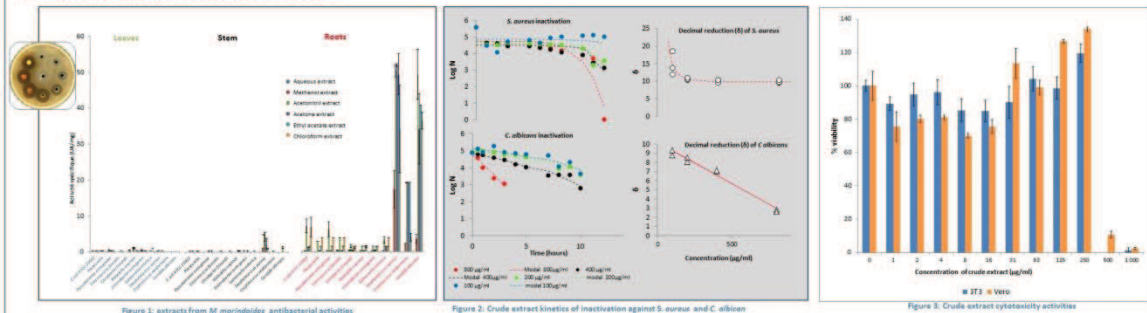
The renewal of the anti-infective arsenal has become over the last 10 years a public health priority. To this end, an ethno-pharmacological approach has been developed. Within the framework of cooperation between the laboratory of biochemical pharmacodynamics (University of Cocody, Côte d'Ivoire) and the laboratory of microbial biodiversity and ecology (LUBEM EA 3882, University of Brest, France), traditional self-medication habits affecting more than 70% of the population of Cote d'Ivoire were analyzed to identify new sources of antimicrobial compounds. *Morinda morindoides* was shown to be used throughout sub-Saharan Africa for its effects against diarrhea, malaria, skin infections, itching and fevers. Given the breadth of its scope, this *Rubiaceae* was investigated for antimicrobial activities and bioactive compounds.

### Material et Methods

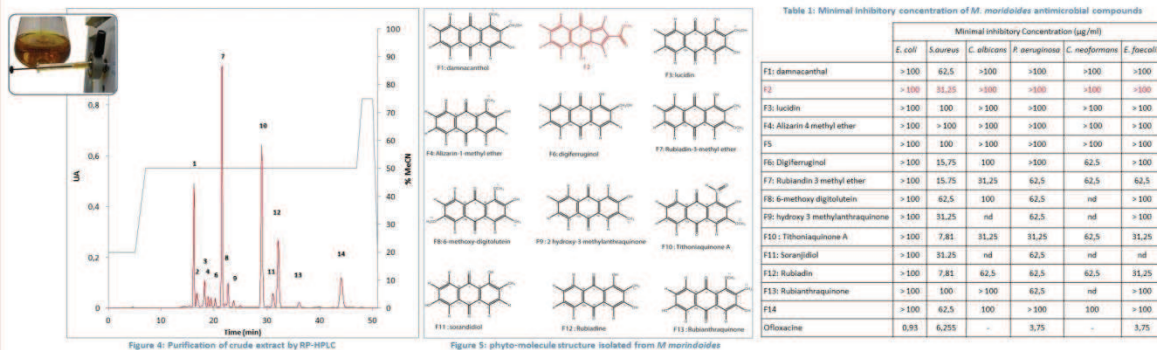


### Results and Discussion

After harvesting and packaging (drying and grinding to a fine powder) of leaves, stems and roots, extractions in water, methanol, acetonitril, acetone, ethyl acetate or chloroform were performed. The antimicrobial activities of the extracts obtained were evaluated against microbial strains (Fig 1). Extraction of *Morinda* roots using acetonitril resulted in the higher antimicrobial activity against *staphylococcus aureus*.



beyond 200µg/ml, the kinetics of inactivation of *Staphylococcus aureus* was not affected by concentrations increase. It would be a saturation of the molecular target starting from this concentration. By cons with *Candida albicans*, this saturation is not reached until 800µg/ml (Fig2). The cytotoxicity test of this crude extract exhibited an IC<sub>50</sub> of 420.32 µg/ml on Vero cell line and 388.33 µg/ml on 3T3 cell line (Fig 3).



Purification of antimicrobial compounds has been carried out by RP-HPLC from acetonitril extract of root and has led to 14 phyto-molecules (Fig 4). Among them, twelve were characterized by a combination of high-resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (NMR). Eleven phyto-molecules from *Morinda morindoides* roots belong to anthraquinones family and one of these phyto-molecules exhibit original aromatic structures (Fig 5). The minimal inhibitory concentration of this original phyto-molecule is 31,25 µg/ml against *S. aureus* (Table 1).

### Conclusion

The results of future work including their cytotoxic activities could inform us of fields of application of these natural substances in human medicine, veterinary and cosmetology...



## Résumé

Nous assistons durant ces trente dernières années à une croissance de la fréquence d'apparition des bactéries résistantes aux antibiotiques. Face à la récurrence des infections difficiles à traiter dues à ces bactéries pathogènes multi-résistantes, le renforcement de l'arsenal des antimicrobiens fait partir des préoccupations majeures de santé publique. À ce titre, une approche ethno-pharmacologique a été initiée dans le cadre d'une coopération entre le laboratoire de pharmacodynamie biochimique (Université Félix Houphouët-Boigny, Côte d'Ivoire) et le laboratoire universitaire de biodiversité et d'écologie microbienne (Université de Bretagne Occidentale, France). Dans cette approche, les habitudes traditionnelles d'automédication par les plantes médicinales ont été exploitées pour identifier de nouvelles sources de composés antimicrobiens.

Dans une première partie de cette présente étude, une investigation sur les résistances bactériennes en Côte d'Ivoire a montré non seulement une évolution de la fréquence d'apparition des bactéries résistantes aux antibiotiques dans le temps, mais aussi une évolution de ces souches résistantes vers des différents types de multi-résistances.

Dans la seconde partie, *Morinda morindoides*, une plante médicinale ivoirienne, a suscité notre attention pour la recherche de substances antimicrobiennes. À partir de 18 extraits des différents organes de cette plante, des tests d'activité antimicrobienne ont permis de justifier son utilisation en médecine traditionnelle. L'extrait à l'acétonitrile de la racine qui affiche l'activité la plus intéressante a servi pour isoler et caractériser 12 phytomolécules antimicrobiennes dont une se distingue par sa structure chimique originale, la morindoïdine. En plus de leurs paramètres antimicrobiens, d'autres propriétés biologiques de ces substances ont été évaluées telles que, leur pouvoir antioxydant, leur cytotoxicité, leur activité hémolytique et leur cible moléculaire. Cette évaluation a révélé un mode d'action sans doute proche de celui des quinolones.

**Mots clés :** Antibiotiques, résistance bactérienne, *Morinda morindoides*, anthraquinones

## Abstract

We are witnessing over these last thirty years a growing frequency of occurrence of antibiotic-resistant bacteria. This observation is coupled with a reduction in discovery of new antimicrobials. Given the recurrence of difficult to treat infections caused by these pathogens become multidrug resistant, strengthening the antimicrobial arsenal is one of the main public health concerns. To this end, an ethno-pharmacological approach has been developed. Within the framework of cooperation between the laboratory of Biochemical pharmacodynamics (University of Cocody, Côte d'Ivoire) and the laboratory of microbial biodiversity and ecology (LUBEM EA 3882, University of Brest, France), traditional self-medication habits affecting more than 70% of the population of Cote d'Ivoire were analyzed to identify new sources of antimicrobial compounds.

In the first part of this study, an investigation of bacterial resistance in Côte d'Ivoire has revealed not just an increase in the frequency of occurrence of antibiotic-resistant bacteria in time, but also an evolution of resistant strains toward different types of antibiotics.

In the second part, *Morinda morindoides*, an Ivorian medicinal plant aroused our attention for the research of antimicrobial substances. From 18 extracts from different organs of this plant the antimicrobial activity tests were performed. The acetonitrile extract of the root which exhibit the most interesting activity was used to isolate and characterize 12 antimicrobial phytomolecules. One of these compounds exhibits an original chemical structure named morindoidine. In addition to their antimicrobial activity, other biological properties of these substances have been evaluated such as their antioxidant potency, their cytotoxicity, their hemolytic activity and their molecular target. This assessment revealed a mode of action probably close to that of quinolones

**Key-words:** Antibiotics, bacterial resistance, *Morinda morindoides*, anthraquinones