



REPUBLIQUE DE CÔTE
D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail



Ministère de l'Enseignement supérieur

Laboratoire de
Pharmacodynamie-Biochimique

Année Universitaire
2012-2013

THÈSE

Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de
l'Université Félix HOUPHOUËT- BOIGNY
Spécialité : Biochimie- Pharmacologie des substances
Naturelles

Option : Biochimie – Microbiologie

KOFFI Allali Eugène

Numéro d'ordre
832/2013

Étude de l'activité antibactérienne d'extraits de
Morinda morindoides (Baker) Milne-Redhead
(Rubiaceae), sur la croissance *in vitro* de souches
cliniques et de souches environnementales de
Vibrio cholerae O : 1

Commission du jury

Soutenue publiquement,
le 30 Novembre 2013

M. KOUASSI Philippe	Professeur Titulaire	Université F. H. BOIGNY	Président
M. DJAMAN Allico Joseph	Professeur Titulaire	Université F. H. BOIGNY	Directeur
M. YAPI Houphouët Félix	Maître de Conférences	Université F. H. BOIGNY	Co-Directeur
M. ZIRIHI Guédé Noël	Professeur Titulaire	Université F. H. BOIGNY	Rapporteur
M. KANKO Coffi	Maître de Conférences	Université F. H. BOIGNY	Rapporteur
M. KOUADIO N'guessan E. J. P.	Maître de Conférences	Université N. ABROGOUA	Examineur

DEDICACES

Je dédie ce travail,

1. À notre Seigneur Dieu Tout Puissant.

Toi qui es mon rocher, ton œuvre est parfaite car toutes tes voies sont équitables. Tu es un Dieu fidèle et sans injustice ; c'est toi qui es juste et droit. **(Deutéronome 32 : 4).**

Reçois mes actions de grâce, pour avoir guidé mes pas et disposé mon cœur à l'instruction.

Proverbes 23 : 12.

Toute ma vie, je te demande de m'instruire et de me montrer la voie que je dois suivre. **Psaume 32 : 8.**

2. À mon père, KOFFI Konan. *In mémorium*

Tu nous as éduqués dans la modestie, dans l'amour du travail (travaux champêtres), le respect pour autrui, la considération pour l'autre. Tu nous as nourris quotidiennement de courage et d'espoirs dans la vie. Et puis, tu nous parlais de justice, gage d'une société paisible. Ce sont ces vertus que tu nous as inculquées qui m'ont permis d'arriver là.

La maladie t'a emporté trop tôt. Mais, sache qu'il n'y a pas pire épreuve pour un homme dans le désert, qui, à la traversée se sent seul, sans père.

Que ton nom que je porte soit un souvenir et une tâche dans le monde de la Recherche que je vais embrasser par la grâce du Seigneur.

Repose en paix.

3. À ma mère.

Tu croyais déjà en cette seconde forme d'éducation que représente l'Ecole. Et tu as longtemps attendu, mais, tu n'as pas cédé au découragement. Accepte ce travail modeste, faible compensation des lourds sacrifices que tu as consentis pour me voir arriver un jour à la fin de mes études et de te rendre heureuse.

4. À mon frère aîné, "Feu" KONAN Kouamé,

Vingt (20) ans n'ont pas effacé notre douleur. Nous t'avons connu si peu à cause de ta vie si courte. Tu nous as laissé l'amour du prochain.

Je te dédie ce travail, modeste témoignage de mon amour fraternel.

Repose en paix.

5. À mon grand frère, KONAN Koffi Salomon, ma grande sœur KONAN Affoué Marie.

Vous vous êtes sacrifiés pour moi en vous investissant dans mes études ; vous avez longtemps attendu pour ce travail, dans la patience parce que vous saviez que je pouvais y arriver.

Trouvez en ce travail, la consolation à vos profondes angoisses.

6. À Madame KONAN, Femme de Monsieur KONAN, j'ai grandi avec toi comme ton fils.

Qu'hommage te soit rendu car tu m'as pris comme un exemple dans le travail et aujourd'hui, tes enfants m'ont emboîté le pas. Ce travail a connu un dénouement heureux grâce à tes prières et encouragements.

7. À ma petite sœur cadette KONAN Akissi Léa

Ce travail est aussi le tien et marque la fin de moments difficiles passés ensemble à l'école primaire au village voisin.

8. À mon épouse, YAO Ahou Edith, Epse KOFFI. Tu m'as apporté un réconfort à tous les

niveaux ; la prière que tu dirigeais pour me soutenir a fini par briser toutes « les chaînes du non accomplissement ».

9. À mon fils KOFFI Yao Ange Fortuné Magloire.

Ce travail est ta première fortune qui constitue le socle pour ton épanouissement.

10. À mes neveux et nièces.

Ce travail est la fin de ma « course » : appuyez- vous y comme un exemple de parcours pour qu'il soit bénéfique dans votre vie.

11. À mes oncles :

- KOUASSI Yao (*in memorium*) : petit - frère de ma maman ; j'ai commencé ce travail devant toi. Malheureusement, la maladie a eu raison de toi et t'a emporté. Je te dédie ce travail auquel tu tenais tant.

Repose en paix.

- Oncle KOUADIO, voici le résultat de toutes ces années de souffrances. Ton apport n'a pas été vain.

- AMANI Koffi Raymond (Tonton Raymond) et Frères :

Voici enfin ce travail tant attendu qui est dédié à tous.

12. À mes cousins, cousines :

Tout mon attachement ; ce travail vient sceller nos liens fraternels.

13. À toi, Frère, cousin et compagnon de longue lutte, Journaliste émérite. Merci pour tes

Soutiens matériel et moral.

14. À toute la famille « YA KOUASSI » :

Toutes mes reconnaissances.

15. À tous mes parents paternels.

Toute ma gratitude.

16. À mes amis :

- À toi AKA Brou Christophe, Professeur de Lycée Professionnel après des années de « galère ». Tu m'as donné un sens à l'amitié, à la fidélité et à la persévérance. Ce travail est aussi le tien.

- Aux autres amis :

Tous mes remerciements pour vos nombreux soutiens tant matériels que moral.

17. Au peuple de « **Christ est la solution** ».

Vous m'avez soutenu dans la prière, à travers les moments de jeun ; voici ce que Dieu nous a annoncé un jour au cours d'une veillée avec le Prophète **JETHEME** ; je suis vraiment ému. Qui l'eut cru. Le **Roi de gloire** seul m'a poussé à la victoire.

18. À toi Maman AKISSI Suzanne **Prophétesse** de « **CHRIST EST LA SOLUTION** » : ton

Dieu m'a exaucé. J'ai parlé dans le secret à Dieu et je suis persuadé que cela se traduira en actes dans ton Eglise. Car Dieu saura m'insérer socialement. Merci et que Dieu se souvienne toujours de ta famille.

19. À toi, Apôtre KOFFI Sylvain et toute ton équipe, ce travail est le vôtre.

AVANT PROPOS

Ce présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la pharmacopée traditionnelle ivoirienne. C'est un vaste et ambitieux projet, initié par Feu F. G. GUINA, qui devrait aboutir à la mise au point de médicaments traditionnels améliorés (MTA), bon marché et efficaces dont l'activité serait dirigée contre l'agent pathogène du choléra.

Nous avons été guidés dans un premier temps par l'usage traditionnel de cette plante, utilisée pour traiter les diarrhées de tout genre.

Ce manuscrit est l'aboutissement d'un long processus à cause du climat social tendu qui prévalait et qui rendait difficiles les manipulations au Laboratoire de Microbiologie de L'Institut National de santé Publique d'Adjamé (INSP).

Ce travail constitue une base qui conduira d'autres Doctorants, l'équipe des substances anti diarrhéiques du laboratoire de Pharmacodynamie biochimique de l'Université Félix H. Boigny, à œuvrer sans grandes difficultés pour isoler des phytomolécules anti vibrio cholériques. Aussi, avons-nous introduit dans ces travaux, d'autres approches, permettant de contourner les difficultés rencontrées lors des manipulations des extraits de plantes, difficultés liées à la couleur très sombre des extraits, empêchant l'appréciation d'un trouble, synonyme d'une croissance bactérienne.

Ce manuscrit devrait contribuer au processus de recherches de nouvelles molécules anti-infectieuses en Côte d'Ivoire à l'instar des autres pays du monde entier.

*

*

*

J'adresse mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réussite de ce travail, plus particulièrement :

- Au Professeur Frédéric GUEDE - GUINA[†]

Professeur titulaire de Biochimie à l'UFR Biosciences de l'Université Félix HOUPHOUËT BOIGNY, Fondateur du Laboratoire de Pharmacodynamie biochimique et ex. Directeur dudit Laboratoire.

Mon cher Maître, reposez en paix et que la terre vous soit légère.

C'est vous-même qui aviez défini les contours et les directives de ce travail. Aussi disiez-vous, combien de fois cette thèse vous tenait à cœur, compte tenu de l'importance du sujet qui est d'actualité : le **Choléra**. Malheureusement, Dieu a décidé que vous ne puissiez juger ce travail. N'oubliez pas : ceux à qui vous avez remis le flambeau, sont à mes côtés. Et je suis sûr qu'ils me jugeront avec la même rigueur afin que nous puissions perpétuer l'héritage que vous avez laissé. Reposez en paix, cher Maître.

Aux honorables membres du jury

- Au Professeur DJAMAN Allico Joseph.

Professeur Titulaire de Biochimie-Parasitologie, Directeur du Laboratoire de pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences, de l'Université Félix HOUPHOUËT BOIGNY ; Chef de service de Biochimie médicale et fondamentale à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et Directeur de cette thèse. Cher Maître, je suis en joie de savoir que vous demeurez à nos côtés et que vous êtes Juge pour ce travail. Professeur, votre disponibilité, vos conseils et votre rigueur m'ont permis d'atteindre mes objectifs.

- Au Professeur KOUASSI Philippe.

Professeur Titulaire de Biologie Animale, Président du Conseil scientifique de l'UFR Biosciences, à l'Université Félix HOUPHOUËT BOIGNY. Cher Maître, je vous remercie d'avoir accepté de présider cette thèse.

- Au Professeur YAPI Houphouët Félix.

Maître de conférences de Biochimie à l'UFR Biosciences, à l'Université Félix H. BOIGNY et Co-Directeur de ce travail. Je tiens à vous dire merci. Cher Maître, j'apprécie que vous siégez à côté des membres du jury. Je ne peux pas parler de disponibilité à votre endroit parce que j'étais en permanence avec vous, dans le cadre de ce travail.

- Au Professeur ZIRIHI Guédé Noel.

Professeur Titulaire de Botanique, à l'Université Félix H. BOIGNY.

Cher Maître, je suis profondément touché par vos nombreuses critiques constructives pour les réaménagements opérés dans ce manuscrit. Merci pour votre disponibilité.

- Au Professeur KANKO Coffi,

Maître de Conférences de Chimie organique, à l'UFR SSMT, à l'Université FELIX H. BOIGNY. Vos conseils et critiques m'ont servi à porter des réaménagements dans ce travail. Qu'hommage vous soit rendu.

- . Au Professeur KOUADIO N'guessan Eugène Jean Parfait.

Maître de conférences à l'UFR Sciences et Technologies des Aliments, à l'Université NANGUI ABROGOUA d'Abidjan ; cher Maître, je tiens à vous remercier pour avoir accepté de porter vos jugements sur ce travail.

*

*

*

- Au Professeur J. D. N'GUESSAN

Maître de conférences de Biochimie à l'UFR Biosciences, à l'Université FELIX H. BOIGNY. Cher Maître, recevez mes remerciements, pour votre disponibilité et pour votre discrétion, gage d'ardeur dans le travail bien fait. Vous êtes un exemple pour tous les étudiants et j'admire votre abnégation dans le travail.

- Au Professeur COULIBALY A.

Maître de conférences de Microbiologie, à l'UFR Biosciences, à l'Université Félix H. Boigny. J'ai bénéficié de vos conseils en Microbiologie. Ce travail est aussi le vôtre.

- Au Professeur YAPO Adou Francis.

Maître de conférences de Biochimie à l'UFR Biosciences, à l'Université Félix H. BOIGNY. Vous avez été d'un apport appréciable pour ce travail et vous vous êtes manifesté au moment opportun. Vos empreintes sont dans ce travail.

- Au Professeur BIDIE Alain dit Philippe.

Maître de conférences de Biochimie à l'UFR Biosciences, à l'Université Félix H. BOIGNY. Cher Maître, j'ai beaucoup apprécié vos conseils durant ces années. Merci pour tout.

- Mme GUESSEND Kouadio N., Maître de Recherche à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Chère Maître, j'ai fait un tour à l'IPCI, dans le cadre d'un stage pour le D.E.A, dans vos services. Recevez toute ma reconnaissance et mon attachement à vous, car j'ai débuté ce travail

avec vous pour la première partie. Veuillez Partager avec moi ce moment d'intenses émotions. J'ai beaucoup appris avec vous et je vous remercie

- Au Docteur BAHI Calixte.

Tu n'as jamais accepté le vouvoiement de ma part parce que tu penses qu'il serait plus facile de pouvoir t'exposer mes difficultés et même mes problèmes privés qui constitueraient un obstacle pour le bon déroulement de ces travaux qui ont mis du temps. Tu as été plus qu'un encadreur : tu es un guide spirituel et un grand- frère et même un conseiller. Tu as rendu possible ce travail parce qu'à maintes reprises tu m'as rappelé à l'ordre, au travail auquel tenait tant Professeur GUEDE G[†]. Trouve en ces mots mon attachement à toi et ma profonde gratitude pour m'avoir suivi avec mes caprices jusqu'à l'aboutissement de ce travail.

- Au Docteur COULIBALY F.

Vos conseils n'ont pas été vains. Soyez-en remercié.

- Au Docteur KRA A.,

Vous êtes plus tôt strict et rigoureux : ce sont les vertus des grands chercheurs ; donc vous en êtes un. Ce travail s'est inspiré de votre rigueur et je voudrais que vous trouviez en cette thèse une partie de vous.

- Au Docteur TREBISSOU.

C'est avec admiration que je vous voyais, chaque jour à l'INSP d'Adjamé, dans le Laboratoire voisin que nous appelions affectueusement « Labo des Chinois ». Je m'en suis inspiré et je forçais quand même, c'était difficile pour moi de faire les déplacements jusqu'au Labo. Merci pour tout.

- Au Docteur BLA K. B.

Fruit immédiat du Professeur DJAMAN A J, vous avez un morceau dans ce travail. Soyez remercié par le bon Dieu.

- Au Docteur ALLALI de l'Institut Pasteur d'ADIPODOUME

Je vous suis reconnaissant pour tous les services rendus.

- Au Docteur THES P.,

Vous avez une partie dans ce travail. Recevez ma reconnaissance.

- Aux Docteurs OUATTARA K., GUY B., BAGRE I., OUATTARA Bazoumana.,

BABATOUNDE, OKOU C., KIPRE., LASSINA., tous les autres,...etc, du Laboratoire de Pharmacodynamie biochimique de l'Univ. F. H., qu'hommage vous sois rendu car vous êtes pour moi un exemple que je copie.

- À tous les doctorants et à toute l'équipe du Laboratoire de Pharmacodynamie biochimique, j'ai tenu compte de vos critiques pour élaborer ce travail. Ce travail est le vôtre. Qu'hommage vous soit rendu pour les encouragements que vous m'avez apportés.

- Au Responsable du Laboratoire de Microbiologie de l'Institut National de Santé Publique d'Adjamé : INSP- Abidjan, Côte d'Ivoire) : Madame KOUASSI Marie – Thérèse, Médecin Biologiste, C.E.S Bactériologie – Virologie ; vous m'avez soutenu moralement et matériellement. Je vous suis reconnaissant.

- Au Major du Laboratoire de Microbiologie de l'Institut National de Santé Publique d'Adjamé : INSP- Abidjan, Côte d'Ivoire) : Monsieur KOUASSI K. Sylvain. Que Dieu soit avec toi pour tous les services indénombrables que tu m'as rendus.

- À Monsieur TRAORE Mamadou, Technicien biologiste : tu m'as trop soutenu dans ce travail. Que ALLAH soit ton guide.

- À tous les autres Techniciens biologistes dudit Laboratoire : Madame YAO N'da Claudine, Messieurs KONAN Kouassi Marcellin, NANGA Noël Dominique, AMANI Roland. L'ambiance qui règne entre vous et qui prévaut au sein du Laboratoire m'a permis de finir ce travail. Qu'hommage vous soit rendu.

	Pages
DÉDICACES.....	i
AVANT PROPOS.....	iv

TABLE DES MATIERES.....ix

LISTE DES ABREVIATIONS.....	xiv
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES FIGURES.....	xvi
LISTE DES PHOTOGRAPHIES.....	xviii

PLAN DE LA THESE

INTRODUCTION.....	1
1. Justification de l'étude.....	2
2. Position du sujet.....	3
I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
I.1. LE CHOLÉRA.....	5
I.1.1. Définition.....	5
I.1.2. Historique.....	5
I.1.2.1. Bref rappel sur les origines et la diffusion des pandémies de choléra.....	5
I.1.3. Epidémiologie.....	7
I.1.3.1. Les sept pandémies de choléra.....	7
I.1.3.2. Le vibrion du choléra.....	10
I.1.3.3. Facteurs antigéniques.....	10
I.1.3.4. Sources de contamination.....	10
I.1.3.4.1. L'Homme.....	10
I.1.3.4.2. L'eau et les aliments.....	11
I.1.3.4.3. Facteurs favorisants.....	11

I.1.3.5. Pathogénie.....	12
I.1.4. Autres espèces de vibrions rencontrées en pathologie humaine.....	13
I.1.4.1. <i>Vibrio cholerae non O : 1</i>	15
I.1.4.2. <i>Vibrio alginolyticus</i>	15
I.1.4.3. <i>Vibrio cholerae O : 139</i>	15
I.1.4.4. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	15
I.1.4.5. <i>Vibrio vulnificus</i>	16
I.1.4.6. <i>Vibrio damsela</i>	17
I.1.4.7. <i>Vibrio fluvialis</i>	17
I.1.4.8. <i>Vibrio mimicus</i>	17
I.1.4.9. <i>Vibrio hollisae</i>	17
I.1.4.10. <i>Vibrio furnisii</i>	17
I.1.4.11. <i>Vibrio metschnikovii</i>	17
I.1.5. Diagnostic de <i>Vibrio cholerae O : 1</i>	17
I.1.5.1. Diagnostic clinique.....	17
I.1.5.2. Diagnostique bactériologique.....	18
I.1.5.2.1. Enrichissement de la culture et isolement du vibron cholérique.....	18
I.1.5.2.2. Ensemencement.....	20
I.1.5.2.3. Examen microscopique	20
I.1.5.3. Tests immunologiques	35
I.1.6. Traitements du choléra.....	35
I.1.6.1. Traitement par réhydratation par voie orale.....	36
I.1.6.2. Antimicrobiens utilisés pour le traitement du choléra	38
I.1.7. Physiopathologie de la diarrhée cholérique	40
I.1.7.1. Mécanisme biochimique	40
I.1.8. Toxine cholérique.....	41
I.1.8.1. Site d'action <i>in vivo</i> de la toxine sur le tissu intestinal	41
I.1.8.2. Effets biologiques de la toxine sur d'autres organes ou cellules.....	41
I.1.8.3. Mécanisme moléculaire d'action	42
I.1.8.4. Rapports entre la structure de la toxine et son mécanisme d'action.....	44
I.2. DES PLANTES MÉDICINALES ANTI INFECTIEUSES À LA MEDECINE	

MODERNE.....	46
I.2.1. Historique.....	46
I.2.2. Domaines d'application des plantes médicinales.....	47
I.2.3. Quelques composés d'intérêts issus des plantes.....	50
I.2.3.1. Huiles essentielles.....	50
I.2.3.1.1. Composition chimique des huiles essentielles.....	50
I.2.3.1.2. Activités biologiques.....	52
I.2.3.2. Les composés phénoliques.....	54
I.2.3.2.1. Généralités.....	54
I.2.3.2.2. Les flavonoïdes.....	57
I.2.3.2.2.1. Structure des flavonoïdes.....	57
I.2.3.2.3. Intérêts biologiques des flavonoïdes et des composés phénoliques.....	57
I.3. DESCRIPTION DE LA PLANTE ETUDIEE.....	60
I.3.1. La famille des Rubiaceae.....	60
I.3.1.1. Présentation.....	60
I.3.1.2. Intérêts nutritionnels et pharmacologiques.....	60
I.3.1.3. Quelques composés chimiques isolés des Rubiaceae.....	61
I.3.2. Genre <i>Morinda</i>	63
I.3.2.1. Présentation.....	63
I.3.2.2. Propriétés pharmacologiques du genre <i>Morinda</i>	63
I.3.3. <i>Morinda morindoides</i>	63
I.3.3.1. Description botanique.....	63
I.3.3.2. Classification systématique.....	67
I.3.3.3. Utilisation dans la médecine traditionnelle.....	67
I.3.3.4. Travaux antérieurs sur <i>Morinda morindoides</i>	68
I.3.3.4.1. Propriétés antimalariales.....	68
I.3.3.4.2. Propriétés antimicrobiennes.....	68
I.3.3.4.3. Autres propriétés.....	68
I.3.3.5. Quelques métabolites secondaires d'intérêt isolés de <i>Morinda morindoides</i>	69
I.3.3.5.1. Quelques composés chimiques isolés de <i>Morinda morindoides</i>	69
II. MATERIEL ET METHODES.....	72

II.1 MATERIEL	72
II.1.1. Matériel végétal.....	72
II.1.1.1. Récolte de la plante.....	72
II.1.1.2. Séchage de la plante.....	72
II.1.2. Souches bactériennes.....	72
II.1.3. Milieux de culture.....	72
II.2. METHODES.....	74
II.2.1. Extraction des principes actifs.....	74
II.2.1.1. Préparation de l'extrait total aqueux (E.Taq.).....	74
II.2.1.2. Préparation de l'extrait éthanolique70 %1 (E.ETH70%) et l'extrait résiduel (E.Rés.).....	74
II.2.1.3. Préparation de l'extrait éthanolique70 %2 (E.ETH70 % vég).....	75
II.2.1.4. Préparation de l'extrait chromatographique aqueux (BGGF ₅).....	75
II.2.2. Culture <i>in vitro</i> de <i>Vibrio cholerae</i> O : 1.....	80
II.2.2.1. Evaluation de l'activité antibactérienne d'extraits de <i>Morinda morindoides</i> sur la croissance <i>in vitro</i> d'une souche clinique de <i>Vibrio cholerae</i> O : 1(BE : 2932).....	80
II.2.2.1.1. Préparation de la gélose Mueller Hinton	80
II.2.2.1.2. Préparation de la gélose TCBS.....	80
II.2.2.1.3. Préparation du bouillon Mueller Hinton.....	81
II.2.2.1.4. Incorporation des extraits à la gélose Mueller Hinton	81
II.2.2.1.5. Préparation de l'inoculum.....	84
II.2.2.1.6. Essai microbien.....	84
II.2.2.2. Étude comparative de la sensibilité <i>in vitro</i> des souches cliniques et des souches environnementales de <i>Vibrio cholerae</i> O : 1 aux extraits éthanoliques 70 % (E.ETH70 %1, E.ETH70 %vég.) de <i>Morinda morindoides</i>	85
II.2.2.2.1. Préparation de l'inoculum.....	85
II.2.2.2.2. Essai microbien.....	85
II.2.2.2.2.1. Tests préliminaire	85
II.2.2.2.2.2. Détermination de la Concentrations Minimale Inhibitrice (CMI) et de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).....	86
II.2.3. Mise en évidence de groupes chimiques.....	88

II.2.3.1. Triphytochimie.....	88
II.2.3.1.1. Recherche des alcaloïdes	88
II.2.3.1.2. Recherche des polyphénols.....	89
II.2.3.1.3. Recherche des flavonoïdes.....	90
II.2.3.1.4. Recherche des saponosides.....	90
II.2.3.1.5. Recherche des quinones.....	91
II.2.3.1.6. Recherche des stérols.....	91
III. RESULTATS	93
III.1. Rendement des extractions	93
III.2. Effets des concentrations des extraits de <i>Morinda morindoides</i> sur la croissance <i>in vitro</i> des vibrions cholériques (souche clinique : BE 2932).....	93
III.2.1. Activité antibactérienne de l'extrait total aqueux.....	94
III.2.2. Activité antibactérienne de l'extrait éthanolique 70 %1	95
III.2.3. Activité antibactérienne de l'extrait résiduel.....	96
III.2.4. Activité antibactérienne de l'extrait chromatographique aqueux (BGGF ₅).....	96
III.2.5. Activités comparatives des différents extraits sur la croissance <i>in vitro</i> des souches cliniques et des souches environnementales de vibrions cholériques à l' E.ETH70%1 et l'E.ETH70 %2 de <i>Morinda morindoides</i>	97
III.3. Comparaison de la sensibilité des souches de vibrions cholériques de source clinique et des souches de vibrions cholériques de source environnementale à deux types d'extraits éthanoliques (E.ETH70%1 , l' E.ETH70%1).....	112
III.3.1. Influence du solvant d'extraction	112
III.3.2. Sensibilités comparées des souches de vibrions cholériques aux extraits hydroalcooliques (l'E.ETH70 % et à l'E.ETH70 %vég.).....	112
III.4. Triphytochimie des extraits testés.....	112
IV. Discussion.....	116
V. conclusion.....	123
VI. Perspectives.....	124
VII.Références bibliographiques.....	125
Annexes	
Publications	

LISTE DES ABREVIATIONS

μL	: microlitre
BE :	: Bulletin Externe
BGG	: Code attribué à <i>Morinda morindoides</i>
Cipro	: Ciprofloxacine
CMA	: Médecine Complémentaire Alternative
E.ETH70 %	: Extrait Ethanolique 70 % obtenu à partir de l'Extrait total aqueux
E.ETH70 %vé ₁	: Extrait Ethanolique 70% obtenu à partir de la poudre végétale
E.Rés.	: Extrait Résiduel
E.Taq.	: Extrait Total aqueux
ERO	: Espèces Réactives à l'Oxygène
F ₅	: 5 ^e fraction chromatographique
mL	: millilitre
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
pH	: potentiel d'Hydrogène
TTC	: Triphenyl Tetrazolium Chlorure
VC	: <i>Vibrio cholerae</i>
WHO	: World Health Organization
EPSS	: Eau Peptonée sans Sel
GNA	: Gélose Nutritive Alcaline
TCBS:	: Gélose Thiosulfate Citrate Bile
MEVAG	: Milieu pour l'Étude de la Voie d'Attaque des
MH	: Gélose Mueller Hinton
BMH	: Bouillon Mueller Hinton
EPSA :	: Eau Peptonée hyper Salée Alcaline

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I : Syndromes cliniques associés aux autres espèces de vibrions en pathologies humaines.....	14
Tableau II : Composition de la solution de réhydratation orale	37
Tableau III : Antibiotiques utilisés lors des épidémies de choléra.....	39
Tableau IV : Bioactivités de quelques principales huiles essentielles.....	53
Tableau V : Activités biologiques des composés polyphénoliques.....	59
Tableau VI : Quelques exemples de métabolites isolés d'une Rubiaceae.....	62
Tableau VII : Rendement des extractions.....	98
Tableau VIII : Survivance (%) des vibrions cholériques dans les tubes – tests.....	99
Tableau IX : Taux d'inhibition des vibrions cholériques dans les tubes –tests.....	100
Tableau X : Valeurs des paramètres antibactériens des différents extraits.....	110
Tableau XI : Rapport d'efficacité des extraits sur la base des CMB et rapport CMB/CMI.....	111
Tableau XII : Influence du solvant d'extraction sur la croissance des <i>vibrions cholériques</i> (Souche : 2930) par la méthode des antibiogrammes.....	113
Tableau XIII : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) de l'E.Eth70% et de l'E.Eth70 %vég. de <i>Morinda morindoides</i> contre les souches cliniques et les souches environnementales de <i>Vibrio cholerae</i> O :1.....	114
Tableau XIV : Familles chimiques contenues dans l'E.Eth70%, l'E.Eth70 %vég, et l'E.Taq.....	115

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1 : Dates de propagation des sept pandémies du choléra dans le monde.....	8
Figure 2 : Schémas de propagation des sept pandémies du choléra dans le monde.....	9
Figure 3 : Schémas de la procédure d'enrichissement et d'isolement du vibron Cholérique.....	19
Figure 4 : Examen direct : coloration de Leifson	21
Figure 5 : Vibrions cholériques : coloration de Gram.....	22
Figure 6 : Vibrions cholériques, vus au microscope électronique.....	23
Figure 7 : Culture de 24 heures des vibrions cholériques en eau peptonée hypersalée alcaline.....	25
Figure 8 : Aspects des colonies de <i>Vibrio cholerae</i> O : 1 sur Gélose TCBS.....	27
Figure 9 : Aspects des colonies de <i>Vibrio cholerae</i> O : 1 sur GNA.....	28
Figure 10 : Agglutination des vibrions cholériques par le sérum anti O : 1.....	32
Figure 11 : Aspects des colonies des vibrions cholériques sur de la gélose Mueller-Hinton.....	34
Figure 12 : Mécanisme moléculaire d'action de la toxine cholérique.....	43
Figure 13 : Mécanisme d'action de la toxine par stimulation de l'adénylate cyclase.....	45
Figure 14 : Quelques structures de composés chimiques pharmacologiquement actives, isolés des plantes.....	49
Figure 15 : Structures de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles.....	51
Figure 16 : Structures de quelques composés phénoliques.....	56
Figure 17 : Squelette de base des flavonoïdes.....	57
Figure 18 : Structure chimique de la Lutéoline.....	70
Figure 19 : Structure chimique de la Lutéoline 7-O- Glucoside.....	70
Figure 20 : Méthode de préparation de l'extrait total aqueux	77
Figure 21 : Méthode de préparation de l'extrait éthanolique 70 % et l'extrait résiduel.....	78

Figure 22 : Méthode de préparation de l'extrait éthanolique 70 %vég.....	79
Figure 23 : Méthode d'incorporation des extraits à la gélose M.H.....	83
Figure 24 A : Courbe de sensibilité des vibrions cholériques à l'E.Taq.....	101
Figure 24 B : Courbe d'inhibition de la croissance des vibrions cholériques par l'E.Taq.....	102
Figure 25 A : Courbe de sensibilité des vibrions cholériques à l' E.ETH70 %	103
Figure 25 B : Courbe d'inhibition de la croissance des vibrions cholériques par l'E.ETH70 %.....	104
Figure 26 A : Courbe de sensibilité des vibrions cholériques à l'E.Rés.	105
Figure 26 B : Courbe d'inhibition de la croissance des vibrions cholériques par l'E.Rés.....	106
Figure 27A : Courbe de sensibilité des vibrions cholériques à BGGF ₅	107
Figure 27 B : Courbe d'inhibition de la croissance des vibrions cholériques par l'extrait chromatographique aqueux.....	108
Figure 28 : Courbes d'activités comparées des différents extraits de <i>Morinda morindoides</i>	109

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

	Pages
Photographie 1 : Rameaux feuillés de <i>Morinda morindoides</i>	64
Photographie 2 : Fleurs de <i>Morinda morindoides</i>	65
Photographie 3 : Fruit non mûr de <i>Morinda morindoides</i>	66

INTRODUCTION

Les maladies diarrhéiques constituent un fléau pour les nourrissons et les jeunes enfants. Elles représentent encore, de nos jours, l'une des principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (**O.M.S**), elles sont responsables de plus de 10.000 décès par jour, soit un décès toutes les dix (10) secondes (**WHO, 1996 ; 1997**). Cette situation est encore plus préoccupante dans les pays en voie de développement où les diarrhées causent par an trois (3) à cinq (5) millions de morts (**DUHAMEL et al., 2001**).

Singulièrement, la situation actuelle mondiale des épisodes diarrhéiques imputés au choléra est assez alarmante.

Chaque année, plus de 100 000 cas de choléra dont 2000 à 3000 décès sont officiellement rapportés par l'Organisation Mondiale de la Santé (**FOURNIER et al., 2007**). Ces épidémies de choléra sont plus meurtrières en Afrique du fait des situations de conflits avec déplacements massifs des populations (**GOMA GROUP, 1995**). Dans cette région africaine qui représente plus de 90 % de tous les cas de choléra notifiés à l'O.M.S, ces épidémies connaissent une nette recrudescence avec les pénuries d'eau potable et les mauvaises conditions d'assainissement (**STEFFEN et al., 2003**).

Ainsi, partout dans le monde entier, le choléra fait peser une menace permanente sur la santé des populations dans les pays en développement, (**O.M.S., 2009 ; 2010**).

Entre 2008 et 2009, il y a eu 190 130 et 221 226 cas de choléra qui ont été respectivement déclarés à l'O.M.S, avec respectivement 5 143 et 4 946 décès.

L'Afrique demeure toujours le continent le plus touché par les flambées dévastatrices de cette maladie, avec 179 323 cas en 2008, soit 94,3 % du total mondial avec 5 074 mortels et 217 333 cas en 2009 représentant 98 % du total mondial avec 4 883 mortels.

Au vu de toutes ces données, le choléra constitue un véritable problème de santé publique dans le monde entier, en Afrique et particulièrement en Côte d'Ivoire (**TANON, 2004 ; O.M.S., 2008, 2009, 2010**).

Pour lutter contre le choléra, l'O.M.S a préconisé à travers son programme de lutte contre les maladies diarrhéiques, une méthode thérapeutique basée sur la réhydratation par voie orale (**ANONYME, 1998 ; ALAM et al., 2006**).

Malgré le succès relatif de ce programme, les antibiotiques et les plantes médicinales antidiarrhéiques sont largement utilisés (**HARDMAN et al., 1992**).

L'antibiothérapie accompagne la réhydratation orale et permet de raccourcir la durée de la diarrhée et l'excrétion des vibrions dans les selles (**GEFFRAY et al., 2000**). Elle rencontre le problème majeur de résistance des vibrions cholériques aux antibiotiques (**FALBO et al., 1999 ; URASSA et al., 2000 ; DALSGAARD et al., 2001 ; HOCHHUT et al., 2001 ; RAKOTO et al., 2001**). À cause de l'émergence des souches résistantes, ces antibiotiques n'ont véritablement pas prouvé leur efficacité et leurs coûts onéreux les rendent inaccessibles aux populations démunies (**SCHNAUBELT, 1998**). À ces difficultés, s'ajoute le phénomène des effets secondaires de ces molécules pharmaceutiques (**HAMAD et al., 1998**).

Au vu de tout ce qui précède, la recherche d'une nouvelle source de potentiels agents antimicrobiens s'avère nécessaire (**RECIO et al., 1989 ; ESSAWI et al., 2000**). Aussi la recherche de phytomolé-molécules à activités anti vibrio cholériques s'avère-t-elle impérative (**BATISTA et al., 1994 ; MECKES et al., 1997 ; SAURABH et al., 2009**).

L'on s'est orienté ainsi, résolument vers les produits issus de plantes qui sont perçus comme sans "risque ni danger", contrairement aux produits de synthèse qui sont qualifiés de produits à « risques » pour l'Homme et pour l'environnement (**JOY et al., 1998**).

Ces plantes constituent à cet effet, une lueur d'espoirs et selon l'O.M.S, celles-ci sont la meilleure source pour obtenir de nouvelles variétés de médicaments. Cette même institution et d'autres Chercheurs révèlent qu'environ 60 % à 80 % de la population mondiale utilisent toujours la médecine traditionnelle pour le traitement des maladies diverses (**WHO, 2002 ; ZHANG, 2004**).

Dans les pays en développement, l'on estime qu'environ 80 % de la population dépend de la médecine par les plantes comme soins de base (**KIRBY, 1996 ; HOSTETTMAN et MARSTON 2002**).

Les pays développés ne sont pas en reste car environ 80 % de la population utilise la médecine traditionnelle pour leurs besoins en soins de santé primaire (**SANTOS et al., 1985 ; FARNSWORTH. et al., 1985**). Dans ces pays industrialisés, l'adaptation des médicaments traditionnels souvent appelés médicaments complémentaires ou alternatifs joue un rôle important dans le système de santé de ces populations (**WHO, 2003**).

Aux Etats-Unis d'Amérique (USA), 158 millions d'adultes utilisent la médecine complémentaire ou alternative (CMA) et selon la commission pour les CMA, environ 17 millions de dollars ont été dépensés dans les médicaments traditionnels au cours de l'année 2000.

Au Royaume Uni, les dépenses annuelles pour la CMA s'élèvent à 230 millions (**WHO, 2003**).

Il convient de rappeler qu'en dépit des importants progrès dans la chimie synthétique et organique du vingtième (20^{ème}) siècle, plus de 25 % des médicaments prescrits dans les pays industrialisés proviennent directement ou indirectement des plantes. Ce taux peut atteindre les 50 % quand on considère le marché noir (**NEWMAN et al., 2000**).

À cause de cette forte dépendance des plantes comme médicaments, car vendues au marché noir ou prescrites par les guérisseurs traditionnels dans les domiciles (**VON, 1996**), les études ethnopharmacologiques ont été menées pour déterminer leur sécurité et leur efficacité. Aussi, ces études sont-elles menées car ces drogues naturelles ne sont pas toujours exemptes d'effets adverses (**HARDMAN et al., 1992**). Enfin, ces études permettent également de trouver de nouveaux principes actifs issus des plantes, et la recherche phytochimique basée sur les informations ethnopharmacologiques est généralement considérée comme une approche effective dans la découverte de nouveaux agents anti-infectieux issus des plantes (**DURAI PANDIYAN et al., 2006**).

Cette approche a été adoptée par le Laboratoire de Pharmacodynamie biochimique de l'Université Félix HOUPHOUET BOIGNY, qui, depuis plus d'une décennie a initié plusieurs axes de recherches (**GUEDE-GUINA et al., 1991, 1992, 1997**; **DJAMAN et al., 1997**), parmi lesquels celui consacré à la recherche d'agents antimicrobiens contenus dans les plantes anti diarrhéiques (**BAHI, 1998**).

Cette étude, qui s'inscrit dans cette même lignée, permettra d'isoler à long terme, de nouvelles molécules ayant des propriétés anti vibrio cholériques, et dont les mécanismes d'actions pourraient être différents de ceux des antibiotiques connus. Elle présente la première grande étape du criblage des molécules anti vibrio cholériques et s'articulera autour des principes actifs. Son objectif général est d'établir le spectre antibactérien des extraits de *Morinda morindoides*, plante codifiée **BGG**, dans le but d'identifier les substances anti vibrio cholériques.

Les objectifs spécifiques sont :

- Evaluer l'activité antibactérienne des extraits suivants : l'extrait total aqueux (**E.Taq**), l'extrait éthanolique 70 % (**E.ETH70 %**), l'extrait résiduel (**E.Rés**), l'extrait chromatographique aqueux (**BGG F₃**) sur la croissance *in vitro* d'une souche clinique de *Vibrio cholerae* O : 1. (BE 2932).
- Mener une étude comparative de la sensibilité *in vitro* de deux souches cliniques de *Vibrio cholerae* O : 1 (*V.C*), isolées à partir des selles de malades du choléra (*VC* O : 1 2930 ; *VC* O : 1 3481/31), deux souches environnementales de *Vibrio cholerae* O : 1 isolées à partir de poissons de *Cyprinus carpio* (*VC* O : 1 : 121/B1 ; *VC* O : 1: 131/B2), à deux types d'extraits éthanoliques (**E.ETH70 % ; E.ETH70 %vég.**) de *Morinda morindoides*.
- Enfin, mettre en évidence par tri phytochimique, la nature des principes actifs qui seraient contenus dans les fractions les plus actives.

I.REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Le choléra

I.1.1. Définition

Le choléra est une maladie strictement humaine. Elle est caractérisée par une diarrhée massive de selles afécales, inodores aqueuses, profuses (« eau de riz »), parfois suivie de vomissements et d'une sensation de malaise dans un contexte non fébrile. La bactérie responsable de cette maladie appelée *Vibrio cholerae*, synthétise une toxine spécifique interférant avec l'homéostasie du sodium et de l'eau dans les cellules bordantes de l'intestin. Le résultat est une perte hydrique extracellulaire sévère avec choc hypovolémique, déplétion en potassium et troubles acido-basiques.

Deux biotypes, El Tor et Cholerae, tous deux de sérotypes O : 1 sont responsables de la maladie.

I.1.2. Historique

I.1.2.1. Bref rappel sur les origines et la diffusion des pandémies de choléra

Les pandémies de choléra ont, semble-t-il, débuté avec le dix-neuvième siècle (**POLLITZER, 1959**). Avant cette période, le choléra est évoqué dans des textes transcrits datant de 2500 ans, mais la maladie restait cantonnée en Asie et plus particulièrement autour du Golfe du Bengale. Ainsi, en 1503, une épidémie de diarrhée responsable de 2000 décès a été décrite par un des officiers de VASCO DE GAMA. Durant le dix-neuvième siècle, le monde va être frappé par une succession de vagues épidémies prenant leur départ dans des zones côtières d'Asie. C'est durant cette période qu'ont été décrites les épidémies responsables de milliers de décès touchant les grandes villes d'Europe, comme Londres et Paris en 1832. La survenue de ces pandémies successives semble être liée au progrès technique, et en particulier, à l'accélération des transports grâce aux bateaux à vapeur et l'on peut émettre l'hypothèse que, jusque-là, les transports étaient suffisamment lents pour constituer un obstacle à la diffusion de cette maladie dont le délai d'incubation est très court (quelques heures, au maximum quelques jours). C'est aussi durant le dix-neuvième siècle que **SNOW (1855)**, met en évidence le lien entre le choléra et les ressources en eau et que **KOCH (1884)**, découvre l'agent responsable de la maladie. Après une nouvelle pandémie au début du vingtième siècle, la situation semblait être définitivement sous contrôle, grâce notamment à l'amélioration de l'hygiène et des ressources en eau dans les grandes villes industrielles. Ainsi, en 1960, après des décennies d'acalmie, y compris pendant la deuxième

guerre mondiale, rien ne permettait d'imaginer que débiterait une pandémie encore plus importante et plus meurtrière que les six précédentes.

La septième pandémie a débuté en 1961 au niveau de l'archipel des Célèbes, en Indonésie. Cette région est caractérisée par la présence d'eau douce et d'eau salée et l'on peut imaginer que la souche responsable de cette pandémie, *Vibrio cholerae*, sérotype O : 1, biotype E1 Tor ait été initialement un habitant des eaux saumâtres (SANCHEZ et TAYLOR, 1997). À partir de ce point de départ, se sont succédé des épidémies, se déplaçant d'abord vers l'ouest, pour rejoindre l'Europe Occidentale au début des années 1970. C'est à cette époque que des cas de choléra avaient été décrits en Espagne. C'est aussi à cette époque que *Vibrio cholerae* E1 Tor est arrivé en Afrique, où il était absent depuis le début du vingtième siècle. Depuis son arrivée, en 1970 à Conakry, probablement par avion (GOODGAME et GREENOUGH, 1975), cet agent n'a plus quitté l'Afrique, causant des épidémies successives et sautant d'un pays à l'autre.

L'Amérique Latine est restée très longtemps épargnée, avant de subir une flambée épidémique au début des années 1990 (LEVINE, 1991). Depuis, le choléra a tendance à régresser en Asie et en Amérique, mais persiste et s'amplifie en Afrique, tandis que les îles de l'Océan Indien, et à un moindre degré, de l'Océan Pacifique, subissent actuellement de nouvelles flambées (OMS, 2001). Cette pandémie, qui n'est pas terminée, est donc la plus étendue et la plus meurtrière de toutes les pandémies décrites jusqu'ici. Il est intéressant de noter que *Vibrio cholerae* O : 1 biotype E1 Tor est plutôt moins agressif que *Vibrio cholerae* O : 1 biotype classique qui s'exprime par un pourcentage plus élevé de formes graves (KAPER et al., 1995). Ceci n'est pas contradictoire avec le plus grand développement de la septième pandémie : *Vibrio cholerae* O : 1 biotype E1 Tor donne plus de formes asymptomatiques ou peu symptomatiques qui ne sont pas détectées et favorisent la diffusion du vibron.

Toutes ces pandémies sont dues à des bactéries, *Vibrio cholerae*, vivant dans les eaux saumâtres en particulier à l'embouchure des fleuves d'Asie, où elles peuvent être retrouvées sur des petits crustacés composant le plancton. Ce biotope héberge un ensemble de souches de *Vibrio cholerae* appartenant à plus de 140 sérogroupes. Parmi toutes les souches de *Vibrio cholerae*, seules celles fabriquant une toxine, appelée toxine cholérique, peuvent donner le choléra (KAPER et al., 1995) : on les appelle les vibrions cholériques. Les autres sont, soit non pathogènes pour l'Homme, soit responsables uniquement de diarrhées banales.

Jusqu'en 1992, toutes les souches synthétisant la toxine cholérique appartenait au sérotype O : 1 (à l'exception d'une épidémie localisée au Soudan, en 1968, où la responsabilité de souche du sérotype O : 37 avait pu être établie **(BIK et al., 1996)**).

Depuis 1992, un nouvel agent responsable de choléra a été isolé autour du Golfe du Bengale **(ALBERT et al., 1993)**. Il s'agit d'un vibron cholérique appartenant au sérotype O : 139 et appelé souche "Bengale". Elle est sensible aux cyclines, aux pénicillines A, au chloramphénicol, mais résistante aux sulfamides. L'épidémie s'est étendue rapidement au Bangladesh, faisant en 1993, 107 000 victimes dont 1500 décès. Les caractéristiques épidémiologiques (fort taux d'attaque, propagation rapide, absence de protection croisée dans les zones d'hyper endémicité cholérique) ont amené certains auteurs à évoquer à cette occasion le risque de survenue d'une huitième pandémie, mais cela ne s'est pas vérifié jusqu'à présent.

Au total, sur les sept pandémies décrites jusqu'à présent, seuls les agents responsables des deux dernières ont été formellement identifiés et groupés. Dans les deux cas, il s'agissait de souches appartenant au sérotype O : 1. Cependant, les agents responsables de ces deux pandémies sont clairement distinguables par leur phénotype : le vibron cholérique de type "classique" était responsable de la sixième pandémie, et le vibron cholérique de type "El Tor", responsable de la septième.

I.1.3. Épidémiologie.

I.1.3.1. Les sept pandémies de choléra.

Depuis le début du XIX^{ème} siècle, sept pandémies se sont succédé jusqu'à nos jours **(Figure 1)**. À partir de 1817, les six premières pandémies parties du delta du Gange et du Bangladesh, sont dues à des souches de *V. cholerae* O : 1 biovar Cholerae (dit classique). En 1961, une souche O : 1 d'un nouveau biovar El Tor, provenant des îles Célèbes, a émergé et provoqué la 7^{ème} pandémie, qui atteignit en 1961 l'Afrique et l'Amérique Latine en 1991. Le choléra s'est installé à l'état endémique en Afrique, en Asie et en Amérique Latine **(Figure 2)**.

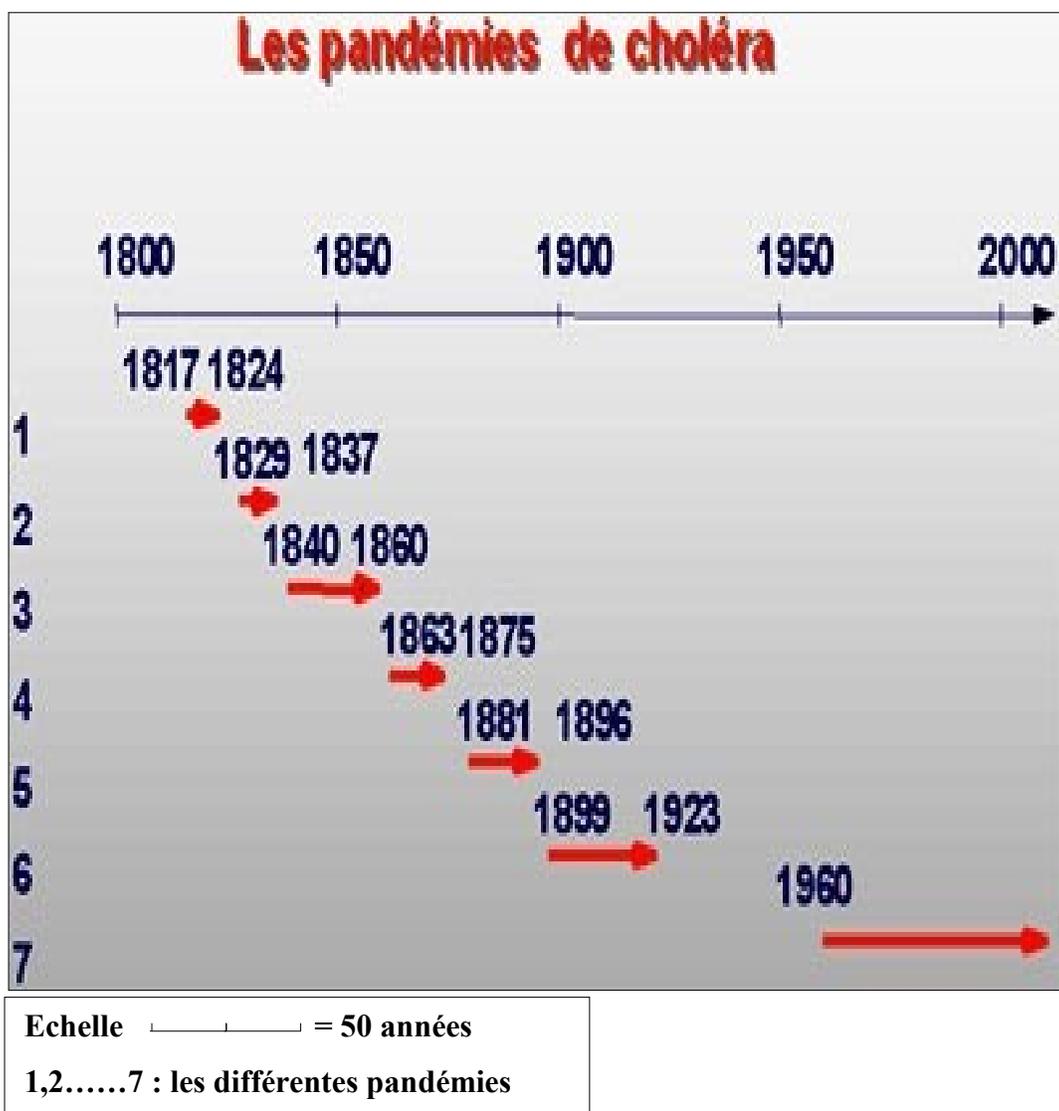


Figure 1 : Dates de propagation des sept pandémies du choléra dans le monde (BERECHE, 1998).

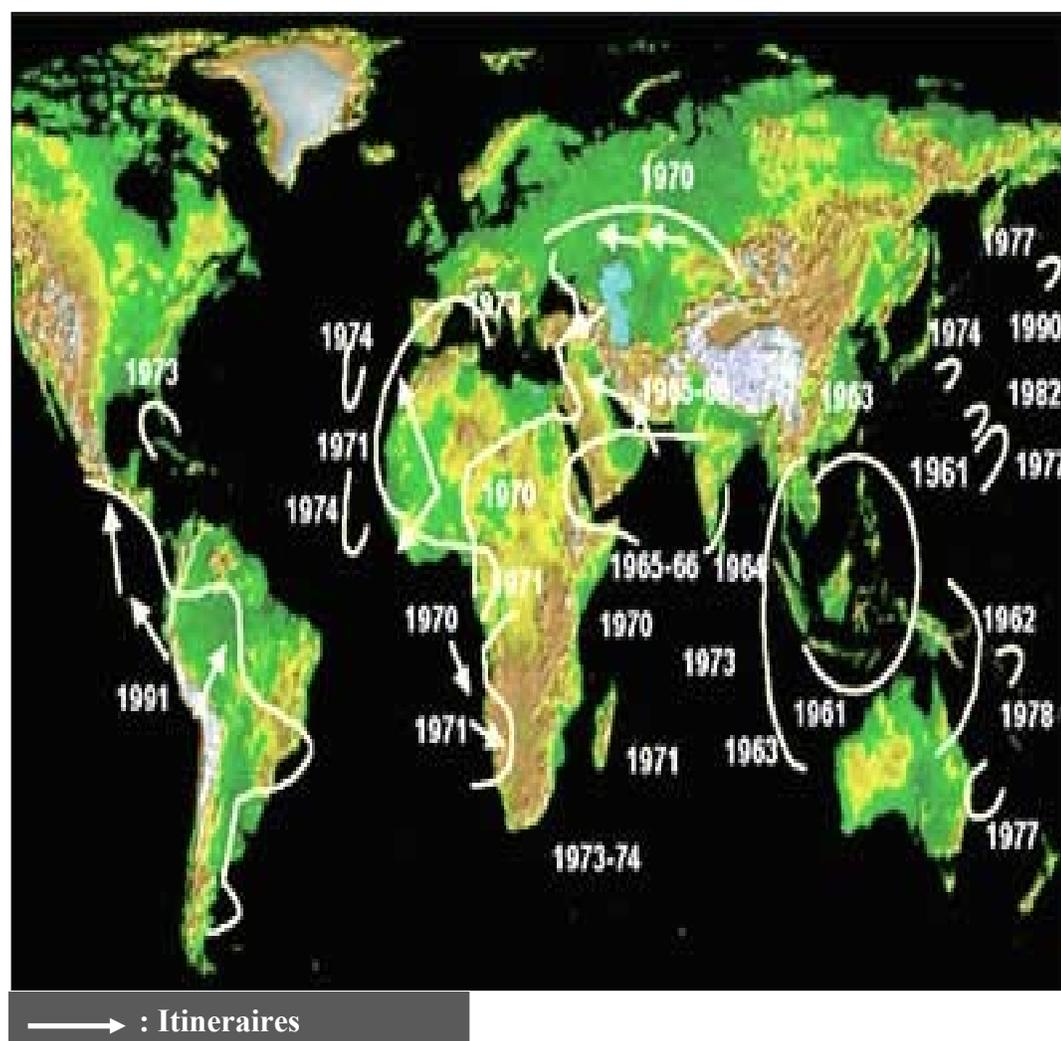


Figure 2 : Diffusion de la septième pandémie du choléra (**chronologie, itinéraires**), depuis les îles Célèbes en **1961**, atteignant l'Afrique en **1970** puis l'Amérique Latine en **1991** (**BERECHE, 1998**).

I.1.3.2. Le vibron cholérique

Le vibron cholérique (ou vibron de Koch, ou *Vibrio cholerae*) est une bactérie Gram-négatif, en virgule, très mobile, aux exigences nutritionnelles modestes. Aérobie et anaérobie facultatif, il croît bien à 37 °C en eau peptonée alcaline. Sa singulière tolérance aux alcalis lui permet un développement jusqu'à un pH de 9,2. Par contre, il ne résiste pas en milieu acide. Le vibron El Tor n'est qu'un biotype du vibron classique ; il hémolyse, en principe, les hématies de moutons, agglutine les hématies de poulet et résiste au choléra phage IV. Il s'est pratiquement substitué au vibron classique depuis 1972, même dans le foyer du Bengale. Le vibron cholérique sérovar O : 139 « Bengale » possède les principaux gènes de virulence de la souche El Tor O : 1. Mais il n'existe pas de réaction immunitaire croisée entre la souche O : 139 et la souche El Tor O : 1 ; de plus, les candidats vaccins préparés à partir d'une souche O : 1 n'entraînent pas de protection vis-à-vis de la souche O : 139.

I.1.3.3. Facteurs antigéniques

Au point de vue sérologique, le vibron est caractérisé par la présence d'un antigène thermostable dit « antigène O », qui comprend lui-même 3 antigènes principaux, A-B-C. La combinaison AB correspond au sérotype *Ogawa*, AC au sérotype *Inaba*, ABC au rare sérotype *Hikojima*. Les relations entre *Inaba* et *Ogawa* demeurent obscures, mais il semble qu'*Inaba* dérive d'*Hikojima* par perte d'antigène. Il est douteux qu'un sérotype soit spécifique d'une localisation géographique particulière et la coexistence de deux sérotypes dans un foyer ne prouve pas une rencontre de deux axes épidémiques. En pratique, retenons que l'antigène A (O1) est commun à tous les vibrions cholériques et permet de les distinguer des vibrions « non agglutinables » (ou NAG), en principe peu pathogènes.

I.1.3.4. Sources de contamination

Deux sources sont à considérer, l'Homme et le milieu extérieur (eau).

I.1.3.4.1. L'Homme.

L'Homme est le principal réservoir des vibrions cholériques : malades qui les éliminent en quantités considérables (1 mL de liquide cholérique contient 10^8 germes), par vomissements et les selles, les cadavres encore plus dangereux, sujets présentant des formes gastro-entéritiques mineures, en incubation ou convalescents, enfin porteurs asymptomatiques (porteurs sains).

Les vibrions peuvent survivre plusieurs jours dans les déjections humides, mais aussi dans la sueur humaine. La durée moyenne de survie du vibron chez le porteur est de 6 à 10 jours, parfois

davantage (porteurs chroniques). La contamination se fait avant tout par contact manuel direct avec un porteur et surtout un malade ou un cadavre.

I.1.3.4.2. L'eau et les aliments.

Ce sont des sources de contamination accessoires. La survie du vibron dans le milieu extérieur semble relativement longue : quelques jours dans l'eau, en particulier salée, sur des aliments et dans les excréta des malades et des porteurs, des années dans des eaux profondes, des vases, du plancton, des algues.

Le choléra a été longtemps considéré comme une maladie hydrique. Les épidémies observées dans les pays secs notamment en 1971 en Afrique sahélienne prouvent qu'il n'en va pas toujours ainsi. Cependant, quand une grande concentration humaine vit pratiquement sur et dans l'eau (deltas du sud-est asiatique, lagunes africaines), dans des conditions hygiéniques défectueuses, la contamination hydrique devient prépondérante. Mais la densité bactérienne dans l'eau est faible et l'on observe davantage une endémie cholérique que des flambées épidémiques. La contamination par les aliments est également limitée à la consommation de mets directement souillés par des sujets contacts ou porteurs, comme dans toute toxi-infection alimentaire.

Les mouches, les insectes n'interviennent qu'à de courtes distances en transportant passivement les vibrions. Par contre, les fruits de mer, les poissons sont un très bon réservoir.

I.1.3.4.3. Facteurs favorisants

Les principaux facteurs sont le niveau socio-économique qui conditionne les préoccupations hygiéniques (mais le choléra frappe parfois à l'aveugle) et surtout dans les conditions de peuplement. Les agglomérations, les quartiers, sont irrégulièrement touchés : marchés, relais de piroguier, rassemblements, fêtes sont les bases idéales de diffusion et le support des poussées. Le facteur concentration humaine est le dénominateur commun de toute apparition du choléra. Les facteurs climatiques ne paraissent pas jouer le rôle prépondérant qu'on leur attribuait. Quant à la diffusion épidémique, elle est liée aux moyens de transport allant du jet à la marche en brousse, tout axe de déplacement étant un axe épidémique. Ceci a pu accréditer la conception de maladie hydrique, alors que la navigation côtière, fluviale ou lagunaire n'est qu'une voie de transport habituelle. L'âge, la race, le sexe n'interviennent qu'indirectement en fonction du milieu social et des activités : seules varient les possibilités de subir une contamination.

Un facteur génétique dont le support paraît être l'équipement en gangliosides intestinaux intervient certainement. Il est également prouvé qu'un pH gastrique alcalin (gastrectomisés,

vagotomisés, hypo chlorhydriques, consommateurs habituels d'alcalinisant) multiplie par 40 le risque de survenue, d'incubation rapide et de gravité du choléra. Inversement, la consommation de fruits acides (citron...) diminue le risque d'acquisition du choléra. Le fait que les adultes de sexe masculin, soient atteints en priorité lors d'une nouvelle épidémie, que les enfants soient plus souvent frappés dans des zones d'endémie ancienne, pose le problème de l'acquisition de l'immunité. Un même individu peut contracter plusieurs fois le choléra, mais non lors d'une même épidémie. L'immunité à partir d'une infection apparente ou non est rapidement acquise en 3 à 7 jours, maximale entre le 8^e et le 20^e jour, mais disparaît en moins de 3 mois. Elle est donc suffisante pour limiter sur le plan collectif une vague épidémiologique, mais non pour éviter une nouvelle.

I.1.3.5. Pathogénie.

Le choléra est une toxi-infection intestinale entraînant une véritable vidange hydrique et à un degré moindre électrolytique avec déshydratation massive extracellulaire, puis globale. Les vibrions ingérés sont normalement détruits par le suc gastrique acide ; ceci explique la quasi impossibilité d'obtenir un choléra expérimental chez des volontaires, et l'inégalité des chances des sujets vis-à-vis de l'affection. Mais lorsque les germes sont ingérés dans une solution de bicarbonate de sodium, qui neutralise l'acidité gastrique, il est possible d'infecter des volontaires à l'aide d'une souche virulente. Ainsi, une diarrhée sévère était-elle provoquée chez 50 % des volontaires qui avaient reçu une dose de 10^8 à 10^{11} bactéries dans une solution sans bicarbonate, alors qu'une dose de 10^4 bactéries diluées dans une solution bicarbonatée produisait une diarrhée chez 70 % des volontaires (CASH et al., 1974a ; CASH et al., 1974b). Ceci explique la sensibilité plus grande des personnes dénutries, qui ont une faible acidité gastrique et une réponse immunitaire déficiente (SMYTHE et al., 1971). Une hypochlorhydrie, même transitoire, est donc un facteur favorisant. Toutefois, un apport massif de vibrions peut forcer cette barrière gastrique. Dans le grêle où le pH est alcalin, les vibrions se multiplient rapidement. Ils secrètent une exotoxine, protéique, appelée cholérigène, thermolabile et non dialysable.

En ce qui concerne le pouvoir pathogène expérimental, il n'est pas possible d'infecter des animaux adultes par voie buccale, quelle que soit la dose. Les animaux nouveau-nés (lapins, chiens, souris) présentent, après inoculation par voie orale, une maladie comparable au choléra humain (DE SN et CHATTERJEE, 1953).

I.1.4. Autres espèces de vibrions rencontrées en pathologie humaine.

Sur le plan épidémiologique, on peut distinguer deux populations de *Vibrio* pathogènes pour l'Homme :

- La première, correspond au vibron cholérique (*V. cholerae* O : 1 et O : 139) responsable des pandémies de choléra ; son réservoir est principalement humain.
- La seconde, comprend les vibrions non cholériques (*V. cholerae* non-O1/non-O139, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* ...), impliqués dans de nombreuses pathologies, gastro-entérites, septicémies et autres infections ; leur habitat est marin.

Ces espèces de vibrions sont présentées dans le **Tableau I**.

Tableau I : Syndromes cliniques associés aux espèces de vibrions les plus souvent rencontrées en pathologie humaine (PAVIA *et al.*,1989).

Espèces	Syndromes cliniques				
	Gastro-entérite	Infection de blessure	Infection d'oreille	Septicémie primaire	Septicémie secondaire
<i>Vibrio cholerae non O :1</i>	+++	++	+	+	+
<i>Vibrio mimicus</i>	++		+		
<i>Vibrio fluvialis</i>	++				
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+++	+	+		+
<i>Vibrio alginolyticus</i>	(+)	++	++	+	
<i>Vibrio hollisae</i>	++			+	
<i>Vibrio vulnificus</i>	+	++		++	++
<i>Vibrio furnisii</i>	(+)				
<i>Vibrio damsella</i>		++			
<i>Vibrio metschnikovii</i>	(+)			(+)	
<i>Vibrio carchariae</i>		+			

+++ : Fréquemment rapportées ; ++ occasionnelles ; + rares ; (+) association peu claire

I.1.4.1. *Vibrio cholerae non O : 1*

Vibrio cholerae non O : 1 est responsable de gastro-entérites. Les symptômes les plus fréquents sont des diarrhées, parfois sanglantes, accompagnées occasionnellement de vomissements et de crampes abdominales. La durée des symptômes est de un à deux jours. Des cas d'otites ou d'infections de blessures sont également signalés. Des septicémies ont été observées, mais surtout chez des individus immunodéprimés, atteints de cirrhoses, par exemple. Les facteurs de risque sont principalement l'exposition au milieu marin ou la consommation de produits de la mer, mais des phénomènes épidémiques associés à diverses sources alimentaires ont également été observés. **(WEST, 1989 ; LESNE et FOURNIER, 1998).**

I.1.4.2. *Vibrio alginolyticus*

Cette bactérie halophile, est associée le plus souvent à des infections cutanées. Il s'agit de blessures aux jambes ou aux pieds et également d'infections auriculaires. Dans certains cas, on observe une coinfection de ces blessures. Il est difficile, alors, de savoir si *V. alginolyticus* est responsable de l'infection ou s'il n'est qu'un opportuniste. La durée d'incubation est de 24 heures environ. La contamination intervient lors de baignades ou sur la plage. Ces infections sont observées lorsque la température de l'eau de mer est élevée **(BLAKE et al., 1980).**

I.1.4.3. *Vibrio cholerae O : 139*

Cette bactérie halotolérante a été à la base d'une importante épidémie de choléra survenue au Bangladesh en décembre 1992 et qui a atteint plus de 10.000 personnes. Nommée *Vibrio cholerae* « Bengale » en raison de son isolement pour la première fois de la baie du Bengale, ce nouveau sérotype non O : 1 est responsable d'une forme de choléra cliniquement indifférenciable du cholera dû à *Vibrio cholerae O : 1*.

Le vibron cholérique sérovar O : 139 « Bengale » possède les principaux gènes de virulence de la souche El Tor O1. Mais il n'existe pas de réaction immunitaire croisée entre la souche O : 139 et la souche El Tor O : 1 ; de plus les candidats vaccins préparés à partir d'une souche O : 1 n'entraînent pas de protection vis-à-vis de la souche O : 139 **(BHATTACHARYA et al., 1993 ; ALBERT et al., 1993).**

I.1.4.4. *Vibrio parahaemolyticus*

Halophile et vivant dans l'eau salée, cette bactérie a été isolée de toutes les mers du monde. La contamination est liée à un risque alimentaire par ingestion de poisson cru ou de coquillage. *Vibrio parahaemolyticus* provoque des gastro-entérites, caractérisées par des diarrhées, des douleurs

abdominales, des nausées, des vomissements, des maux de tête et une fièvre modérée. Les symptômes persistent de trois à quatre jours. Ce vibron peut être également responsable d'infections cutanées et de septicémies. Il a été identifié pour la première fois, en 1950, au Japon à la suite d'une Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC) liée à la consommation de sardines.

Des cas d'infection de plaies d'otites externes, des infections des yeux, du tractus urinaire et de la cavité péritonéale ont été également décrits. **(DANIELS *et al.*, 2000).**

I.1.4.5. *Vibrio vulnificus*

Cette bactérie halophile et lactose positif peut être responsable d'une forme septicémique grave survenant 24 h après l'ingestion de coquillages chez des patients présentant une immunodépression (essentiellement des patients atteints de cirrhose, mais aussi insuffisants rénaux chroniques, diabétiques, thalassémiques, patients atteints d'hémochromatose ou de cancer) et de formes cutanées (ulcères, cellulites). *Vibrio vulnificus* a été rarement isolé dans d'autres types d'infections (pneumopathie, diarrhée aiguë, endométrite). Des épidémies importantes ont été décrites en République de Corée et à Taiwan.

Trois types de symptômes cliniques peuvent être associés à cette espèce de vibrions :

- Des septicémies primaires, presque exclusivement enregistrées chez les immunodéprimés. La pathologie commence brutalement par des fièvres et des frissons. Des lésions typiques de la peau se développent, alors, chez les 3/4 des patients. Elles apparaissent 24 heures après le début de l'infection. La durée d'incubation (valeur médiane) est de 16 h.
- Des infections de blessures qui peuvent être bénignes et limitées comme progressant rapidement et développant des formes nécrotiques, voire gangreneuses. Ces infections interviennent à la fois chez les immunodéprimés et chez ceux qui ne le sont pas.
- Des gastro-entérites considérées comme rares, et, de ce fait, probablement sous répertoriées. Elles ne sont jamais associées à des mortalités. Il s'agit de diarrhées aqueuses et sanglantes, accompagnées de vomissements et de crampes.

Les personnes à risque sont celles souffrant de désordres hépatiques (alcoolisme ou surcharge en fer). Le taux de mortalité chez ces malades est de l'ordre de 50 %, mais il peut atteindre 90 % chez des patients souffrant d'hypotension dans les premières heures d'hospitalisation. Chez les immunocompétents, le taux de mortalité est nul ; on observe seulement des gastro-entérites sans septicémie. Une autre voie d'infection concerne les blessures préexistantes de la peau au contact de l'eau de mer. Chez les immunodéprimés présentant une pathologie hépatique, le taux de

mortalité peut atteindre 24 %. Ces infections sont observées en été et au début de l'automne (LEE *et al.*, 1997).

I.1.4.6. *Vibrio damsela*.

Vibrio damsela a été isolé de lésions diverses lors de baignades (des pieds et des jambes) ou de parties de pêche, en zones littorales tropicales ou semi-tropicales.

I.1.4.7. *Vibrio fluvialis*.

Vibrio fluvialis est impliqué dans des cas de diarrhées. L'incidence des gastroentérites à *V. fluvialis* est faible ; un cas de gastro-entérite après consommation d'huîtres crues a été observé.

I.1.4.8. *Vibrio mimicus*.

Vibrio mimicus a été mis en évidence dans un contexte de gastro-entérites associées à la consommation d'huîtres crues ; il a été également isolé lors d'infections de l'oreille à la suite d'une exposition à l'eau de mer.

I.1.4.9. *Vibrio hollisae*

Vibrio hollisae a été isolé dans des cas d'infections sanguines et de gastro-entérites. Les facteurs d'exposition les plus souvent cités sont la consommation de fruits de mer crus et de poissons frits.

I.1.4.10. *Vibrio furnisii*.

L'épidémiologie de *Vibrio furnisii* est mal connue. Il a été impliqué dans quelques cas d'intoxications alimentaires dues à des produits marins.

I.1.4.11. *Vibrio metschnikovii*

Vibrio metschnikovii est considéré comme un micro-organisme faiblement pathogène ; Peu de cas lui sont associés, ils ne sont pas liés à la consommation de produits de la mer ou à une exposition à l'eau de mer (WEST, 1989).

I.1.5. Diagnostic de *Vibrio cholerae* O : 1.

Le diagnostic est fondé sur l'examen clinique et est confirmé par la mise en évidence de *Vibrio cholerae* dans les selles (confirmation bactériologique).

I.1.5.1. Diagnostic clinique.

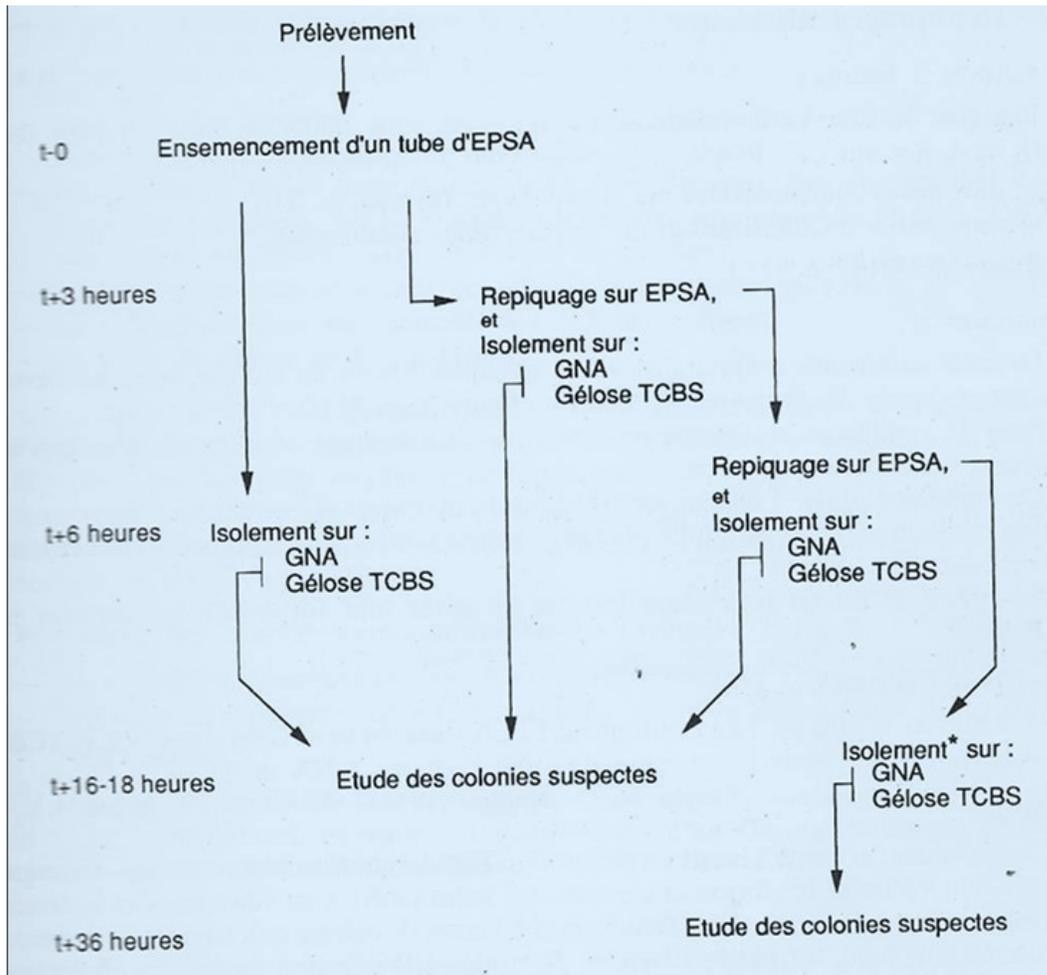
Les manifestations cliniques résultent de la stimulation de l'adénosine mono phosphate cyclique (AMP_c) entérocytaire par la toxine cholérique. Il s'en suit des pertes digestives hydro électrolytiques, un début brutal de la maladie par une diarrhée aqueuse indolore, parfois suivie de

vomissements. Le malade est habituellement déshydraté et en état de choc. Il existe des formes avec des manifestations nerveuses centrales chez l'enfant, des formes mineures très fréquentes, même des formes sèches suraiguës où la diarrhée n'a pas eu le temps de s'extérioriser.

I.1.5.2. Diagnostic bactériologique.

I.1.5.2.1. Enrichissement de la culture et isolement du vibrion cholérique.

La procédure d'enrichissement et d'isolement du vibrion cholérique est présentée de façon schématique par **la figure 3**.



Echelle 1/1

Figure 3 : Schémas de la procédure d'enrichissement et d'isolement du vibriion cholérique (QUILICI, 2011).

EPSA : Eau Peptonée hyperSalée Alcaline ; **GNA :** Gélose Nutritive Alcaline

TCBS : Thiosulfate Citrate Bile Saccharose

I.1.5.2.2. Ensemencement

L'ensemencement doit être abondant, environ 0,5 ml de selles dans un tube d'EPSA. On peut aussi plonger l'écouvillon ou le papier buvard imprégné de selles dans ce milieu. Ce tube initial d'EPSA (**t- 0**) est placé à l'étuve à 37° C.

I.1.5.2.3. Examen microscopique

L'examen microscopique de l'état frais des selles montre un aspect monomorphe avec du mucus et des cellules desquamées et nombreux germes mobiles qui se déplacent en vols de moucheron. Cette mobilité est due au flagelle polaire (**Figure 4**).

Après coloration de Gram, on observe une flore monomorphe faite de bacilles fins, incurvés ou non, à Gram négatif, isolés présentée par **la Figure 5**.

L'aspect des vibrions peut être apprécié à partir d'une observation faite au microscope électronique, présenté par **la Figure 6**.



Figure 4 : Examen direct des selles à partir de la coloration deLeifson $\times 1000$.

Source : [http : //www.microbe-edu.org/etudiant/vibrio.html/](http://www.microbe-edu.org/etudiant/vibrio.html/)

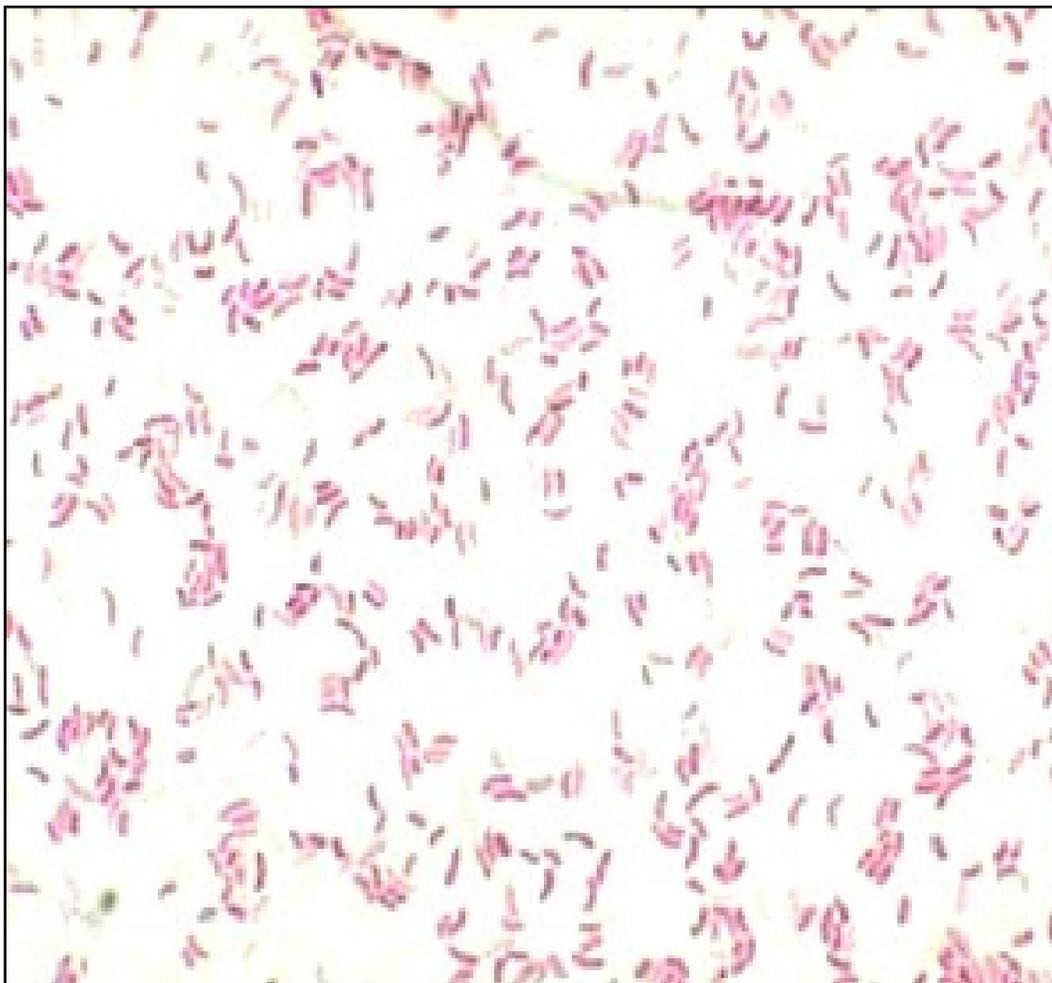


Figure 5 : Examen direct des selles avec coloration Gram $\times 1000$

Source : [http : //www.microbe-edu.org/etudiant/vibrio.html/](http://www.microbe-edu.org/etudiant/vibrio.html/)

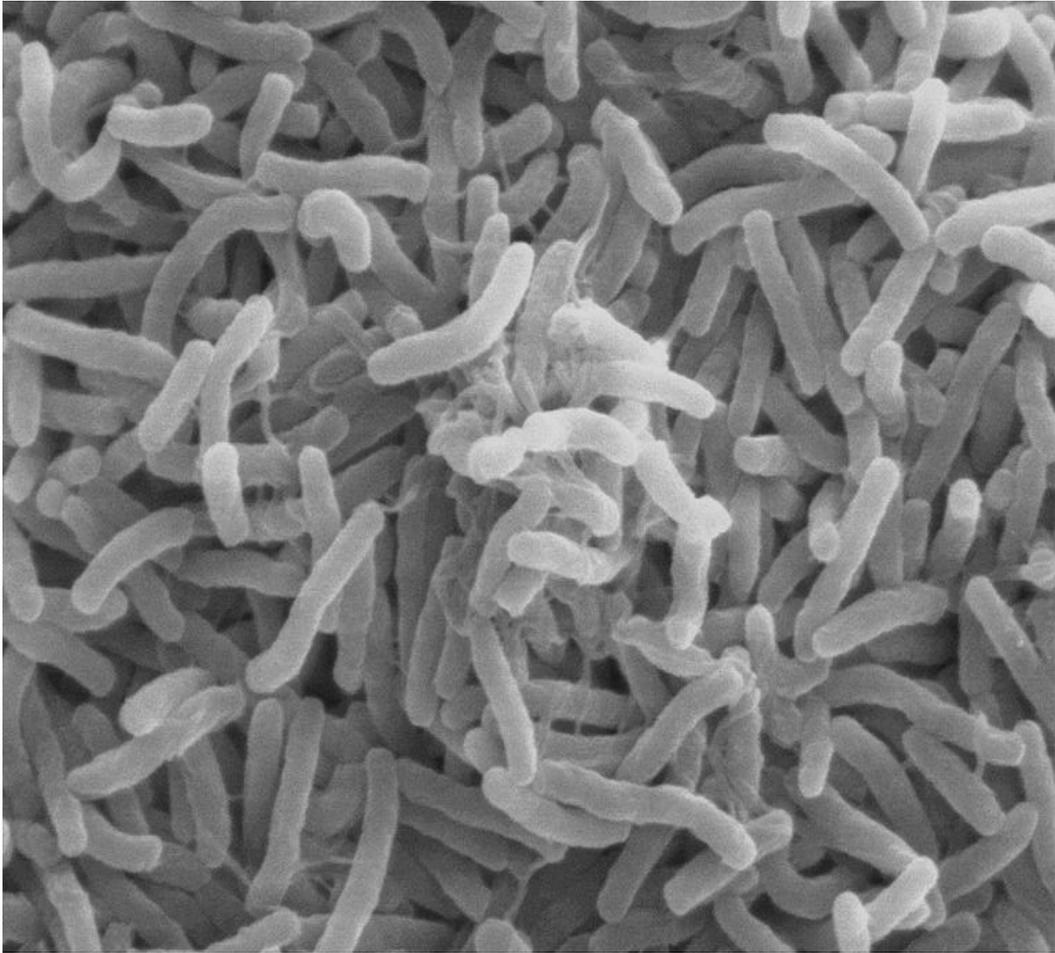


Figure 6 : Aspect des vibrions cholériques au microscope électronique à balayage $\times 12\ 000$. <http://remf.dartmouth.edu/images/bacteriaSEM/source/1.html>.

Des repiquages ultérieurs sont effectués :

Après 3 heures, on repique le tube (**t-0**) même en l'absence de voile, dans un tube d'EPSA : c'est le tube (**t+3**). On effectue également un isolement de ce tube (**t-0**) sur une gélose nutritive alcaline (GNA) et sur une gélose TCBS (Thiosulfate, Citrate, Bile, Saccharose). Les tubes et boîtes sont ensuite placés à l'étuve à 37° C.

Le voile commence à apparaître après quelques heures de culture, mais ne devient très net qu'après 18-24 heures de culture (**Figure 7**).

Pour le repiquage et l'isolement, on prélève délicatement sous la surface de l'eau peptonée sans remuer le tube.



Echelle 1/1

Figure 7 : Culture de 24 heures des vibrions cholériques en eau peptonée hypersalée alcaline (EPSA), **(DODIN, 1987)**.

Ce repiquage après **3 heures** est très important puisqu'il permet de sélectionner le vibron cholérique qui se multiplie plus rapidement que les autres germes habituellement présents dans les selles.

Le milieu TCBS est intéressant lorsque les selles sont fortement contaminées par du *Proteus*.

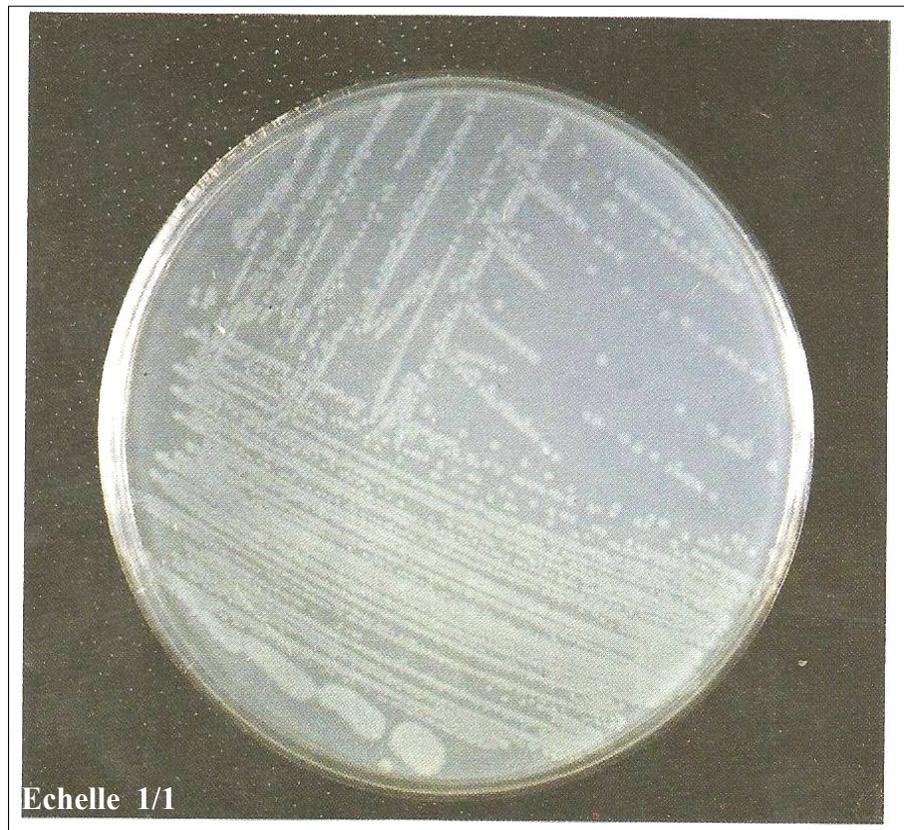
Après 6 heures, on repique le tube (**t + 3**) dans un tube d'EPSA (**tube t + 6**) et on isole également ce tube sur une gélose nutritive alcaline (GNA) et sur une gélose TCBS (Thiosulfate, Citrate, Bile, Saccharose). On effectue un nouvel isolement du tube (**t-0**) sur GNA et TCBS.

L'aspect des colonies des vibrions cholériques sur la gélose nutritive alcaline et sur la gélose TCBS est présenté par la **figure 8A**, la **figure 8 B** et la **figure 9**.



Figures 8 : Aspect des colonies de *Vibrio cholerae* O : 1 sur gélose TCBS, à 24 h d'incubation, à 37° C. (**B** : colonies saccharoses+)

Source : //http : www.microbe-edu.org/professionel/diag/vibiro.html //



Figures 9 : Aspect des colonies de *Vibrio cholerae* O : 1 sur GNA.

Source : [http : //www.microbe-edu.org/professionel/diag/vibiro.html/](http://www.microbe-edu.org/professionel/diag/vibiro.html/)

Cet isolement, effectué à partir du tube **t-0** d'EPSA cultivé pendant 6 heures, augmente la probabilité d'isoler le vibrion cholérique des selles pauvres en vibrions. Cet isolement ne remplace cependant pas celui effectué après 3 heures de cultures qui, comme nous l'avons mentionné plus haut, est particulièrement favorable à la sélection du vibrion cholérique.

Après 16-18 heures, si les isolements effectués à **t + 3** et **t + 6** ne présentent pas de colonies suspectes, on refait des isolements sur GNA et TCBS à partir du tube d'EPSAensemencé à **t + 6**.

Si les isolements effectués à **t + 3** et / ou **t + 6** présentent des colonies suspectes, on étudie ces colonies.

Les colonies de vibrion cholérique sont rondes, de taille moyenne, environ 2 mm de diamètre après 18 heures de culture, translucides bleutées, à bord régulier sur GNA. Elles sont arrondies, bombées et habituellement jaunes (saccharose+) sur TCBS. Il faut cependant noter l'existence de rares souches de vibrion cholérique qui donnent des colonies vertes (saccharose négatif ou saccharose⁻) sur TCBS. L'attitude qui consiste à rejeter d'emblée les colonies vertes sur TCBS mérite donc d'être révisée. En pratique, les résultats obtenus sur GNA sont plus fiables et moins sujets à erreur de diagnostic. En outre, l'agglutination avec le sérum anti-O :1 peut souvent être pratiquée à ce stade de l'isolement avec les colonies isolées sur GNA, ce qui permet de gagner 16-18 heures pour l'identification du vibrion cholérique.

Si ce n'est déjà fait, on isole sur GNA les colonies suspectes sur TCBS.

À partir des colonies suspectes sur GNA, on ensemence des GNA qui serviront pour la réaction d'agglutination si celle-ci n'a pas pu déjà être réalisée (on ensemence au moins cinq (5) colonies) ; deux tubes de Milieu pour L'Étude de la Voie d'Attaque des Glucides ou MEVAG (un des deux tubes est bouché avec de l'huile de vaseline) ; un tube d'eau peptonée sans sel (EPSS) ; un tube d'eau peptonée glucosée à 0,5 % avec cloche et un tube de milieu de Kligler- Hajna.

Les cultures en MEVAG permettront de faire la distinction entre les *Pseudomonaceae* qui dégradent le glucose uniquement par voie oxydative, et les *Vibriomonaceae* qui le dégradent par les voies oxydative et fermentative.

Les cultures en EPSS, eau peptonée glucosée et Kligler Hajna, permettront, si l'agglutination avec le sérum anti-O :1 est négative, d'orienter l'identification vers des vibrions, autres que le vibrion cholérique.

À partir des colonies suspectes sur GNA, on effectue un examen microscopique (état frais et coloration de Gram) ; une réaction d'oxydase (cette réaction ne doit pas être faite à partir d'une

culture sur TCBS).

Si le germe est un bacille mobile, incurvé, Gram négatif, saccharose+ (avec cependant de rares exceptions), oxydase+, l'identification d'un vibriion cholérique doit être poursuivie par la réaction d'agglutination.

L'agglutination avec le sérum Anti-O :1, doit être faite de préférence à partir d'une culture sur GNA. Il est déconseillé d'utiliser des cultures sur milieu de Kligler Hajna, ou sur TCBS qui peuvent donner des phénomènes d'auto agglutination en eau physiologique empêchant l'interprétation de la réaction. L'agglutination doit aussi être pratiquée avec une culture de 18-24 heures. Elle se fait avec un matériel qui comprend des lames propres dégraissées ; du bain d'eau de javel à 2 % ; des sérums agglutinants anti-vibriion cholériques (sérum anti O1 : sérum polyvalent), (sérum anti- Ogawa et anti- Inaba : sérums monospécifiques) ; eau physiologique stérile.

La méthode d'agglutination consiste à déposer sur une première lame, une goutte d'eau physiologique stérile et à côté, une goutte de sérum anti-O : 1. Sur une deuxième lame, on dépose également une goutte de sérum anti-Ogawa et une goutte de sérum anti-Inaba.

On prélève ensuite, à l'anse de platine, quelques colonies et on les dépose sur les lames à côté de chacune des gouttes d'eau physiologique, de sérum anti-O :1, sérum anti-Ogawa et de sérum anti-Inaba.

Enfin, avec l'anse de platine, on mélange doucement et progressivement les bactéries dans chacune des gouttes. On commence par la goutte d'eau physiologique, puis on continue par le sérum anti-O :1, et on termine par les sérums anti-Ogawa et anti-Inaba, sans oublier de flamber l'anse de platine entre chaque goutte. La suspension doit être homogène et on agite doucement par un mouvement tournant.

La lecture se fait à l'œil nu, ou mieux avec une loupe d'horloger, au dessus d'une surface sombre.

Il ne doit pas y avoir d'agglutination avec l'eau physiologique. S'il y a agglutination, il s'agit d'une souche auto agglutinable, et il est en conséquence inutile de poursuivre la réaction avec le sérum anti-O :1 et les sérums anti-Ogawa et anti-Inaba.

Une souche de vibriion cholérique (*V.cholerae* O : 1) doit obligatoirement agglutiner avec le sérum anti-O :1. L'agglutination doit apparaître rapidement, en moins de deux minutes et être fine et régulière (**Figure 10**).

La souche doit aussi agglutiner avec au moins l'un des deux sérums anti-Ogawa ou anti-Inaba. Cela permettra de déterminer le sous-type de la souche :

Si l'agglutination est faite avec le sérum anti-Inaba, le sous-type de la souche est Inaba ; avec le sérum anti-Ogawa, le sous-type est Ogawa et lorsque l'agglutination est faite avec avec les deux sérums, le sous-type de la souche est Hikojima.

Dans le cas où il y aurait agglutination avec l'un ou les deux sérums anti-Inaba et anti-Ogawa, mais pas d'agglutination avec le sérum anti-O :1, il faut alors suspecter la valeur du lot de sérum anti-O :1, utilisé et refaire l'agglutination avec un autre lot.

Cette sérotypie indique seulement la plus ou moins grande abondance de certains déterminants antigéniques et n'a que peu de valeur épidémiologique.

Les lames utilisées doivent être immédiatement jetées dans un bain d'eau de javel. Le manipulateur doit se laver soigneusement les mains à l'eau de javel après cette série d'agglutinations.

L'agglutination des vibrions cholériques est présentée par la **Figure 10**.



Figure 10 : Agglutination des vibrions cholériques par le sérum anti O : 1 (DODIN, 1987)

Droite : témoin négatif avec l'eau physiologique.

Gauche : réaction d'agglutination avec le sérum anti O : 1

Parallèlement aux mesures qui doivent être prises d'urgence (déclaration aux autorités sanitaires et envoi de la souche au centre national de référence), l'identification précise de l'espèce à laquelle appartient la souche, c'est-à-dire l'espèce de *V. cholerae*, sera poursuivie. Les caractères morphologiques, culturels et biochimiques de l'espèce de *V. cholerae* est ensuite exécutée. L'on utilise à cet effet, des cultures de 18-24 heures, sur une gélose Mueller-Hinton (**Figure 11**).



Echelle 1/1

Figure 11 : Aspect des colonies de vibrions cholériques sur de la gélose Mueller-Hinton.

Source : [http : // www.microbe-edu.org/professionel/diag/vibiro.html/](http://www.microbe-edu.org/professionel/diag/vibiro.html/)

Les principaux caractères l'espèce de *V. cholerae* est sont :

- Mobilité (grâce à une ciliature mono triche)
- Gram négatif.
- Saccharose + (avec de rares exceptions).
- Oxydase + (le test à l'oxydase est à proscrire à partir d'une culture sur TCBS. La gélose Mueller- Hinton est appropriée pour ce test.)
- Croissance aéro-anaérobies (culture en milieu viande foie semi solide, à 0,6 % d'agar).
- Croissance en eau peptonée sans sel (EPSS) et en eau peptonée hypersalée alcaline (EPSA) contenant jusqu'à 5 % de NaCl.
- Acidification du glucose sans production de gaz. L'eau peptonée avec cloche permet de détecter avec une grande sensibilité la production de gaz. Signalons aussi l'intérêt du milieu de Kligler Hajna pour l'étude de ces caractères ainsi que pour la recherche de la production d'acide à partir du lactose.
- Lactose⁻, mais ONPG⁺.
- Arabinose-.
- Pas de production d'H₂S.
- Indole⁺.
- ADH⁻ (pas de production d'Arginine- dihydrolase)
- LDC⁺ (production de Lysine- décarboxylase)
- ODC⁺ (production d'Ornithine- décarboxylase)

Les galeries API System 20E sont utilisées comme un appoint important au diagnostic rapide des *Vibrio cholerae* O : 1 (**Annexe 1**).

I.1.5.3. Tests immunologiques

**Le test d'immobilisation des anticorps par les anticorps spécifiques permet un diagnostic spécifique et rapide.

**Des tests permettant une détection directe dans les selles ont été proposés, mais n'ont jamais été évalués à grande échelle.

I.1.6. Traitement du choléra

Il repose essentiellement sur la rééquilibration hydro électrolytique et sur le traitement antibiotique dont l'intérêt est double.

- Thérapeutique : en éliminant les germes, l'antibiothérapie permet de réduire la fuite hydro électrolytique de façon significative (plus de 60% de réduction de la durée et du volume de la diarrhée).
- Epidémiologique : elle accélère l'élimination des germes et raccourcit la durée du portage (donc des possibilités de contamination) qui devient inférieur à 48 heures.

I.1.6.1. Traitement par réhydratation orale (SRO)

En ce qui concerne la thérapie par voie orale, depuis plus de 25 ans, l'O.M.S et le Fonds des Nations Unies pour l'Enfance (UNICEF) ont recommandé l'utilisation d'une formule unique de solution de Sels de Réhydratation par voie Orale (SRO), à base de glucose pour traiter ou prévenir la déshydratation due à la diarrhée, quelle qu'en soit l'étiologie (y compris le choléra), et pour tous les malades quel que soit leur âge (**AVERY ET SNYDER, 1990**).

Avant 1985, l'O.M.S et l'UNICEF recommandaient une formule de SRO contenant 30 mmol/L de bicarbonate au lieu de 10 mmol / L de citrate. L'inclusion du citrate à la place du bicarbonate a permis d'améliorer la stabilité de la solution et d'en prolonger la conservation (**Tableau II**).

TABLEAU II : Composition de la solution de SRO standard recommandée par l’OMS et l’UNICEF depuis 1985 (**VICTORA et al., 2001**) et de la solution de SRO à osmolarité réduite maintenant recommandée par l’OMS et l’UNICEF.

	SRO standard (g/L)	SRO à osmolarité réduite (g/L)		SRO standard (mmol/L)	SRO à osmolarité réduite (mmol/L)
Chlorure de sodium	3,5	2	Sodium	90	75
Glucose anhydre	20,0	13,5	Chlorure	80	65
Chlorure de potassium	1,5	1,5	Glucose anhydre	111	75
Citrate trisodique	2,9	2,9	Potassium	20	20
			Citrate	10	10
Total	27,9	20,5	Osmolarité totale	31	24

I.1.6.2. Antimicrobiens utilisés pour le traitement du choléra.

Un antibiotique par voie orale réduit le volume et la durée d'une diarrhée. Un traitement aux antibiotiques est recommandé pour les patients modérément et gravement malades, notamment pour ceux qui continuent de passer des volumes importants de selles pendant le traitement de réhydratation, et y compris tous les patients qui sont hospitalisés (**Tableau III**).

Tableau III : Antibiotiques utilisés lors des épidémies de choléra.

Source : http://www.cdc.gov/haiticholera/clinicalmanagement/pdf/clinicalmanagement_brochure_fr.pdf

Patients	Première intention	Deuxième intention
Adultes (sauf femmes enceintes)	Doxycycline : 300 mg en une fois	Azithromycine : 1 gramme en une fois. Tétracycline : 500 mg 4 fois par jour pendant 3 jours Erythromycine : 500 mg 4 fois par jour pendant 3 jours
Femmes enceintes	Azithromycine : 1 gramme en une fois	Erythromycine : 500 mg 4 fois par jour pendant 3 jours
Enfants ≥12 mois et capables d'avaler des pilules ou des comprimés	Azithromycine : 20 mg/kg en une fois. Erythromycine : 12,5 mg/kg 4 fois par jour pendant 3 jours Doxycycline : 2-4 mg/kg en une fois	Tétracycline : 12,5 mg/kg 4 fois par jour pendant 3 jours
Enfants <12 mois et autres patients incapables d'avaler des pilules ou des comprimés	Azithromycine en suspension orale : 20 mg/kg en une fois Erythromycine en suspension orale : 12,5 mg/kg 4 fois par jour pendant 3 jours Doxycycline en suspension orale : 2-4 mg/kg en une fois	Tétracycline en suspension orale : 12,5 mg/kg 4 fois par jour pendant 3 jours

I.1.7. Physiopathologie de la diarrhée cholérique.

La spoliation digestive hydrique est due à une entérotoxine élaborée par toutes les souches de vibrions pathogènes. Cette exotoxine unique de nature protéique, de poids moléculaire 84.000 daltons, particulièrement fragile à la chaleur et à l'acidité est hautement antigénique.

Introduite dans la lumière intestinale, elle se fixe rapidement et irréversiblement au niveau des sites récepteurs de l'épithélium, puis après une latence d'une trentaine de minutes, survient une fuite hydro électrolytique intestinale siégeant uniquement dans l'intestin grêle, surtout au niveau du jéjunum, alors que le côlon absorbe normalement. (HOLMGREN *et al.*, 1975 ; GRIFFITHS, *et al.*, 1986).

I.1.7.1. Mécanisme biochimique.

Le mécanisme biochimique de cette sécrétion intestinale est la stimulation de l'activité adénylcyclasique intestinale par l'entérotoxine cholérique. Ceci augmente la concentration tissulaire d'AMP_c, et commande directement la sécrétion intestinale d'eau et d'électrolytes.

En effet, l'ion moteur de la sécrétion intestinale est le chlore, l'eau suit ses mouvements. Le sodium et le chlore pénètrent dans l'entérocyte par un mécanisme de couplage grâce au transporteur spécifique situé sur la membrane baso latérale. C'est le gradient de concentration de l'ion sodium entre le milieu extra cellulaire et le milieu intra entérocytaire qui fournit l'Énergie du transfert.

Le sodium est alors rejeté vers le milieu extra cellulaire par la pompe à sodium. Le chlore qui se trouve alors dans l'entérocyte à une concentration élevée, diffuse passivement à travers la bordure en brosse intestinale vers la lumière intestinale.

La résultante est une sécrétion dite «active», dans laquelle le seul mécanisme actif est le couplage avec le sodium pour l'entrée dans la cellule. Mais cette sécrétion active de chlore semble être réglée essentiellement par la perméabilité plus ou moins grande des pores de la bordure en brosse permettant le passage du chlore vers la lumière intestinale.

Ainsi, l'élévation du taux entérocytaire d'AMP_c (adénosine monophosphate cyclique) réalise à la fois une inhibition des processus d'absorption et une stimulation des processus sécrétoires : l'AMP_c inhibe l'absorption couplée des Sodium et du Chlore par l'entérocyte (cryptique). Cette inhibition des processus d'absorption et la stimulation des processus de sécrétion par l'AMP_c aboutissent, selon les cas, soit à une diminution de l'absorption nette, soit à l'apparition d'une sécrétion nette.

L'AMP_C n'agit pas directement sur la bordure en brosse entérocytaire. C'est le premier élément d'une chaîne de réactions qui passe par la phosphorylation (et donc l'activation) (HOLMGREN *et al.*, 1975 ; GRIFFITHS, *et al.*, 1986).

I.1.8. Toxine cholérique.

Également appelée choléragène, cette toxine est le prototype des entérotoxines dont l'effet diarrhéigène résulte de l'activation de l'adénylate cyclase des cellules épithéliales de l'intestin grêle.

Découverte en 1961, la toxine cholérique a été purifiée par FINKELSTEIN (1976). Elle est l'agent du choléra, maladie caractérisée par une diarrhée profuse due à une fuite massive d'eau et d'électrolytes qui passent de la circulation vers la lumière intestinale en raison de la perturbation du flux normal des ions, de l'eau et du glucose.

I.1.8.1. Site d'action *in vivo* de la toxine sur le tissu intestinal.

La toxine est produite et excrétée par le vibron cholérique dans l'intestin grêle. La bactérie adhère par des mécanismes encore mal connus à l'épithélium intestinal. Cette colonisation n'entraîne pas, contrairement à celle produite par d'autres bactéries productrices d'entérotoxine (exemple : *shigella dysenteriae*), une pénétration intracellulaire du germe et ne provoque pas de lésions de la muqueuse détectables histologiquement. La toxine agit directement en se fixant sur les cellules de la bordure en brosse entraînant l'inhibition de l'absorption active des ions Na⁺ et Cl⁻ et favorisant, au contraire, une excrétion ionique active (Cl⁻) et une fuite hydrique. L'effecteur moléculaire de ces problèmes est l'AMP-cyclique dont la toxine augmente la concentration dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle par stimulation de l'activité de l'adénylate cyclase dans les cellules.

I.1.8.2. Effets biologiques de la toxine sur d'autres organes ou cellules.

Les effets de la toxine cholérique se limitent dans la maladie naturelle à l'intestin, car la toxine n'est pas absorbée au niveau de cet organe et ne passe pas dans la circulation générale. Toutefois, la toxine mise en contact avec d'autres organes, tissus ou cellules, est capable (à des concentrations similaires à celles actives sur les cellules intestinales) de stimuler l'activité de l'adénylate cyclase des cellules cibles et de provoquer divers types de réponses physiologiques ou biochimiques caractéristiques de l'action de l'AMP cyclique dans ces systèmes.

I.1.8.3. Mécanisme moléculaire d'action.

L'adénylate cyclase présente dans le feuillet interne de la membrane cytoplasmique est activée par la toxine par un mécanisme impliquant la synthèse d'AMP cyclique à partir de l'ATP (**figure 12**).

Le mécanisme d'action implique la participation du NAD (Nicotinamide, Adénosine diphosphate), de Guanosine Triphosphate (GTP) et de protéines acceptrices présentes dans le cytosol. La pénétration de la toxine à travers la membrane sera donc nécessaire pour déclencher l'activation de l'adénylate cyclase.

Il a été établi que la toxine cholérique agit par le passage d'un fragment **A** qui possède une activité NADasique. Après hydrolyse du NAD, la toxine catalyse une réaction d'ADP-Ribosylation de diverses protéines de la cellule cible, notamment de la protéine membranaire fixatrice de GTP en transférant l'ADP-ribose sur les protéines acceptrices. Celles-ci seraient impliquées dans la régulation de l'activité de l'adénylate cyclase et leur modification catalysée par la toxine perturbe leurs fonctions régulatrices (**HOLMGREN et al., 1975 ; GRIFFTHS et al., 1986**).

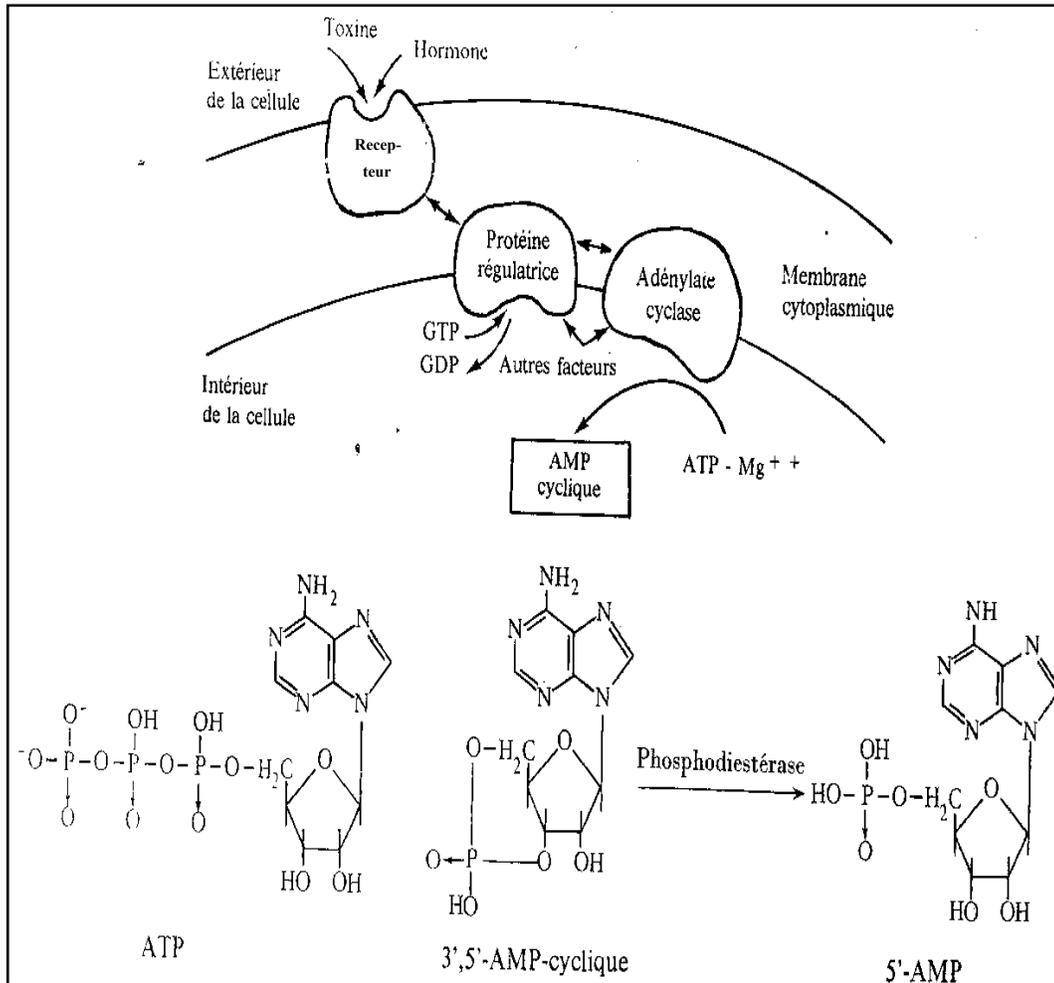


Figure 12 : Mécanisme moléculaire d'action par stimulation de l'adénylate cyclase
HOLMGREN et al., 1975 ; GRIFFTHS et al., 1986).

I.1.8.4. Rapports entre la structure de la toxine et son mécanisme d'action.

Cette molécule de 84 KDa est constituée de 2 entités séparément non toxiques : l'une d'elles, le composant B, est constituée de 5 sous-unités de 11,5 KDa et porte le site de fixation de la toxine sur le récepteur membranaire. L'autre, le composant A, comporte 2 sous-unités de 24 KDa et 5,4 KDa (A_1 et A_2) reliées par un pont disulfure. Le composant A est responsable de l'activité toxique de la molécule.

La toxine cholérique exerce une activité toxique en se fixant, par l'intermédiaire de ses sous-unités B, sur un récepteur membranaire spécifique (le ganglioside GM1), à la surface de l'enterocyte (**HOLMGREN et al., 1975 ; GRIFFITHS et al., 1986**). Cette fixation induit la translocation rapide de la sous-unité enzymatique A de la de la toxine, à travers la membrane. La sous-unité A_1 catalyse l'hydrolyse du **NAD** et le transfert d'une partie de cette molécule (ADP-Ribose) sur la sous-unité régulatrice G_s de l'adénylate cyclase qui est située à la face interne de la membrane plasmique.

L'ADP-Ribosylation de cette protéine régulatrice conduit à l'activation permanente de l'adénylate cyclase, et à la conversion non contrôlée de l'**ATP** en **AMP_C**. L'augmentation du taux intracellulaire d'**AMP_C** provoque une sécrétion active de chlore et inhibe la réabsorption conjointe de cet ion et du Sodium par l'enterocyte. Ce mécanisme, non létal pour la cellule, conduit à une sortie passive d'eau, origine de la diarrhée (**figure 13**).

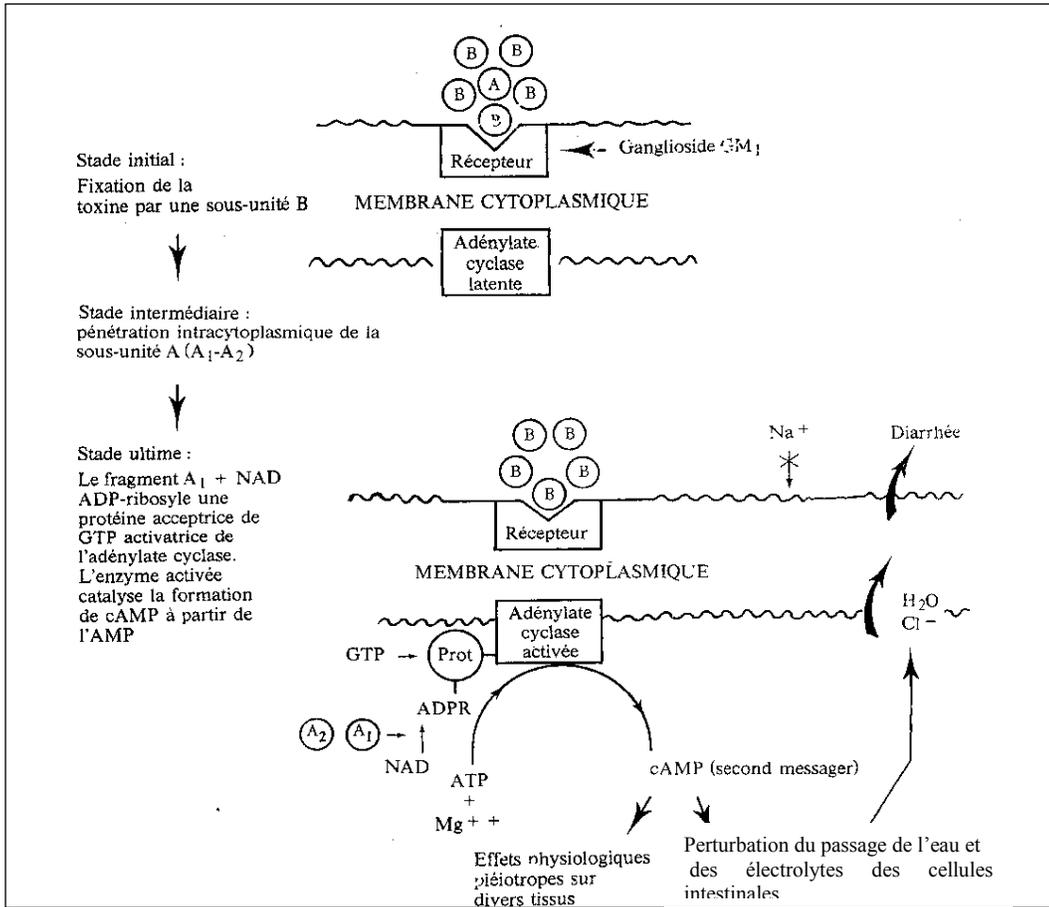


Figure 13 : Mécanisme d'action de la toxine cholérique par stimulation de l'adénylate cyclase (HOLMGREN et *al.*, 1975 ; GRIFFTHS et *al.*, 1986).

I.2. DES PLANTES MÉDICINALES ANTI INFECTIEUSES À LA MÉDECINE MODERNE.

I.2.1. Historique

Des plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique. Récemment, l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles a amené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales (**NOSTRO et al., 2000**). Aussi, en raison d'une conscience croissante des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, de nombreux Chercheurs sont-ils en quête de remèdes "normaux", sans effets secondaires et bien sûr, en raison du coût élevé de la médecine conventionnelle (**SCHNAUBELT, 1998**).

Aussi, faut-il rappeler que depuis toujours, les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle, le métabolisme secondaire. Cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux, en particulier à partir du néolithique (8000 av. J-C). L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations glanées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement de guérir le malade (**FOUCHE et al., 2000**).

Dans les civilisations chinoise, indienne (médecine ayurvédique) ou aztèque, on trouve la trace d'utilisations médicales très anciennes. Le premier livre de matières médicales, le Shen Nung Ben Cao Jing (Traité des plantes médicinales de l'Empereur Shen Nung), fut rédigé vers 2900 avant J-C.. 4000 ans avant J-C., les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient les plantes pour se soigner : 600 tablettes d'argile mentionnent 1000 plantes pour leurs vertus curatives et plus de 800 remèdes sont décrits par les Egyptiens (**FOUCHE et al., 2000**). Le soin de la peau a commencé 3000 ans avant J-C, quand les Egyptiens ont enregistré en forme hiéroglyphe le soin de la peau sur des peintures de mur de temple (**DWECK, 2002**).

Les grands médecins grecs, dont le plus célèbre est Hippocrate (5^e siècle avant J.-C.), utilisaient couramment les narcotiques, les laxatifs ou des émétiques (vomitifs). Théophraste (370-285 av. J.- C.), classe les plantes dans son ouvrage *Historia plantarum* (**FOUCHE et al., 2000**).

À l'apogée de l'empire arabe (dont les frontières allaient de l'Inde à l'Espagne), tous les documents écrits furent réunis à Bagdad dans la plus grande bibliothèque de l'époque (entre le 8^e et le 9^e siècle). Les Arabes avaient eux aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie : Abu Bakr al- Razi ou Rhazès (865-925), fut l'un des grands Médecins de son temps et aussi le précurseur de la Psychothérapie. Il fut suivi par Ibn Sina ou Avicenne (980- 1037) qui écrivit le « canon de la médecine ». Ce livre servira de base à l'enseignement de la médecine dans les Universités de Louvain et de Montpellier jusqu'aux environs de 1650. Ibn al Baytar (1197- 1248) rédigea un livre célèbre contenant une liste de 1400 préparations et de plantes médicinales dont un millier était connu des auteurs grecs (FOUCHE et al., 2000).

En Afrique, le pouvoir thérapeutique des plantes était aussi connu par nos ancêtres et nos parents de façon empirique (NACOUUMA, 1996).

I.2.2. Domaines d'application des plantes médicinales

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie.

Parmi ces composés, on retrouve, dans une grande mesure, les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve, chez les plantes, des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi- synthèse (BAHORUN, 1997).

Il y a eu donc un réveil vers un intérêt progressif dans l'utilisation des plantes médicinales dans les pays développés comme dans les pays en développement, parce que les herbes fines guérissent sans effet secondaire défavorable. Ainsi, une recherche de nouvelles drogues est un choix normal (SCIENTIFIC CORRESPONDANCE, 2003).

Les plantes médicinales sont utilisées dans plusieurs domaines :

- Elles sont utilisées en médecine, en tant que médicaments pour l'Homme : ces plantes sont utilisées, contre les maladies du stress, en tant qu'antioxydants tels que : *Mitragyna ciliata*, *Chrysophyllum perpulchrum*, *Disthemonanthus benthamianus*. Ces plantes sont riches en composés polyphénoliques, en flavonoides, ayant des rôles d'agents chémopréventifs, basés sur leurs capacités antioxydantes (BIDIÉ et al., 2011). C'est aussi le cas de *Cola nitida*, également utilisée pour ses propriétés antioxydantes (AYEBE et al. 2012).
- Contre le diabète, exemple de *Chromolaena odorata* (L.) King et H. Robins (Asteraceae) (N'GUESSAN et al., 2009).

- En tant que drogues immunostimulantes, exemple : *Parkia biglobosa* (ZIRIHI, 2006B ; YAPO et al., 2012).
- En tant que drogues antiinflammatoires et analgésiques (KOUADIO et al., 2000a).
- Contre les maladies cardiovasculaires. Exemple, *Mansonia altissima*, d'où est extraite la Mansonine, principe actif (ADEOTI et al., 2010).
- Contre les parasites du paludisme. En effet, l'activité antiplasmodiale de *Funtumia elastica*, riche en alcaloïdes, parmi lesquels l'holarrhesine qui est l'un des composés qui confèrent cette propriété antiplasmodiale (ZIRIHI et al., 2005). Par ailleurs, la rauvomitine, un alcaloïde de *Rauvolfia vomitoria*, est un composé qui est à la base de l'activité antiplasmodiale de cette plante (ZIRIHI, 2006B). À travers des travaux à caractère phytochimique, ZIRIHI et al. (2009) ont indiqué que *Zanthoxylum gillettii* exerce son activité antipaludique grâce à un alcaloïde, la dihydronitidine.
- Contre les infections cutanées, en dermatologie. C'est le cas de *Terminalia catappa* et *Terminalia mantaly* (Combretaceae) (ZIRIHI et al., 2012).
- Les plantes, dans le domaine agricole sont utilisées pour lutter contre certains vers parasites tels que les nématodes ; c'est le cas de *Azadirachta indica*, une des plantes médicinales les plus importantes au Bangladesh et qui se développe dans tout le subcontinent indien (AMJAD, 2005).
- En alimentation : Assaisonnements, boissons, colorants (SVOBODA et HAMPSON, 1999 ; PORTER, 2001) et composés aromatiques (SMALLFIELD, 2001). Les épices et les herbes aromatiques utilisées dans l'alimentation, sont pour une bonne part, responsables des plaisirs de la table (DELAVEAU, 1987), considérées comme condiments et aromates (BIEGO et al., 2012).
- En cosmétique : Produits de beauté, parfums et articles de toilette, (PORTER, 2001 ; THES et al., 2006).
- Suppléments diététiques d'hygiène (SMALLFIELD, 2001).

La **figure 14** présente quelques composés chimiques isolés à partir des plantes.

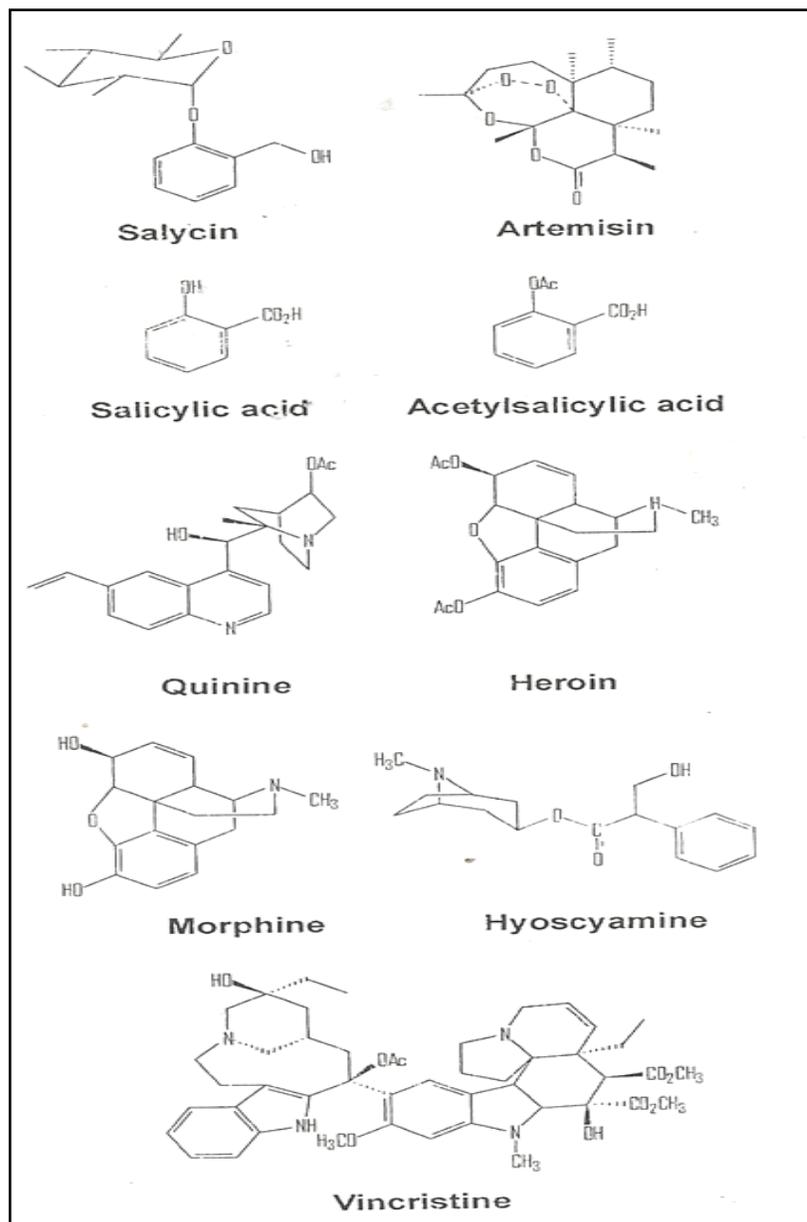


Figure 14 : Quelques structures de composés chimiques pharmacologiquement actives, isolés des plantes (KAROU *et al.*, 2007).

I.2.3. Quelques composés d'intérêt issus de plantes médicinales

I.2.3.1. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés aromatiques des plantes, qui sont extraites par distillation par la vapeur (hydrodistillation) ou des solvants organiques (SMALLFIELD, 2001).

Pour la 8^e édition de la pharmacopée française (1965), les huiles essentielles (ou essences qui signifient huiles volatiles) sont : « des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation. (BRUNETON, 1993).

I.2.3.1.1. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles volatiles sont les mélanges très complexes ; les constituants sont principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes de formule générale $(C_5H_8)_n$. Les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes. On estime qu'il y a plus de 1000 monoterpènes et 3000 de structures sesquiterpènes. D'autres composés incluent des phenylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote (SVOBODA et HAMPSON, 1999).

La **figure 15**, présente les structures de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles.

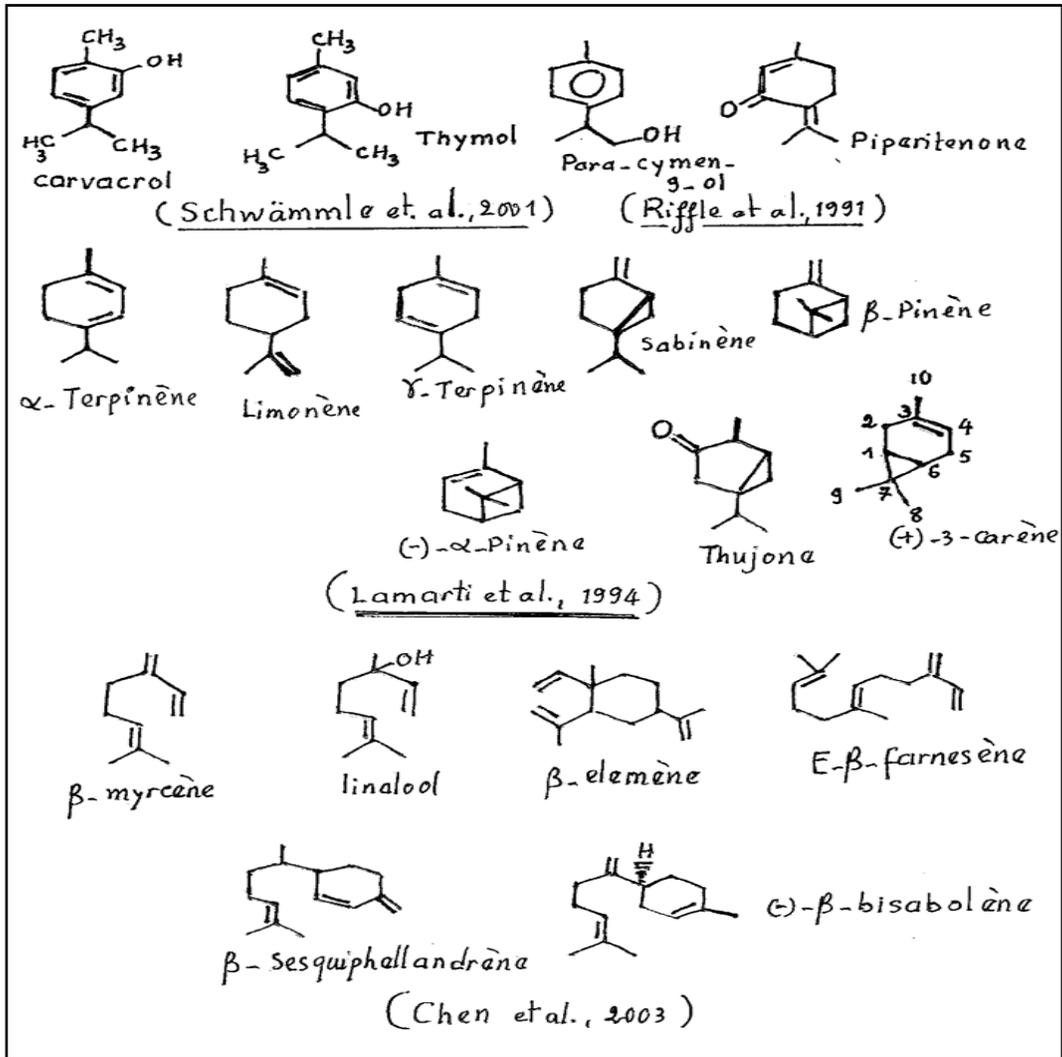


Figure 15 : Structures de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles.

(LAMARTI et al., 1994 ; SCHWAMMLE et al., 2001 ; CHEN et al., 2003)

I.2.3.1.2. Activités biologiques

Les huiles sont employées pour leur saveur et odeur en industrie des produits naturels et en industrie des parfums (SMALLFIELD, 2001).

Elles ont des propriétés antiseptiques pour les poumons (*Eucalyptus*), dépuratives ou cicatrisantes (Lavande) (CAILLARD, 2003), des activités analgésiques (Origan, Thym) (SCHWÄMMLE et al., 2001).

Elles ont des activités antimicrobiennes et antiparasitaires : terpènes ou terpénoïdes ont des effets contre les bactéries, les mycètes, les virus et les protozoaires.

Le mécanisme de l'action des terpènes sur les micro organismes n'est pas entièrement compris, mais on pense qu'il s'agit de la rupture de leur membrane, par les composés lipophiles (COWAN, 1999).

Le carvacrol, le thymol possèdent une activité antibactérienne et une activité antifongique contre les mycètes phytopathogènes (SCHWÄMMLE et al., 2001). Également, l'huile essentielle de la Menthe pouliot dont le composé majoritaire est la R (+) Pulégone (82%), est dotée d'un fort pouvoir antifongique contre *Penicillium* et *Mucor* (BELGHAZI et al., 2002).

Chez *Inula helenium*, l'alantolactone et son isomère sont les constituants majeurs de l'huile essentielle et ont des propriétés antibactériennes, notamment contre *Mycobacterium tuberculosis*, anti-protozoaires contre *Entamoeba histolytica* (qui cause des amibiases), et antifongiques contre des pathogènes opportunistes comme certains dermatophytes.

Les huiles ont des activités antioxydantes : la capacité antioxydante de l'huile volatile est étroitement liée à tout le contenu phénol (STEFANOVITS-BÁNYAI et al., 2003). Le carvacrol est un des composants principaux des huiles essentielles de certaines Labiaceae (Lamiaceae), comme l'origan, le thym dont la teneur peut atteindre jusqu'à 86 %. L'activité antioxydante de ces herbes est due au carvacrol, au thymol et à un autre phénol (SCHWÄMMLE et al., 2001). Ceci a été confirmé par un certain nombre de travaux. JUKI et MILOŠ (2005) ont montré dans une étude portant sur l'huile essentielle de *Thymus* (*Thymus vulgaris* L.), que les chemotypes phénoliques (thymol et carvacrol) et non phénoliques (linalool) sont capables de réduire le radical 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl, avec un effet plus élevé enregistré pour les chemotypes phénoliques.

Les activités de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles sont résumées, dans le **Tableau IV**.

Tableau IV : Bioactivités de quelques principales huiles essentielles (**TEIXEIRIA, 2004** ; **SVOBODA et HAMPSON 1999**).

Composés	Bio activités	Références
Acétate de bornyle	Antibactérien, antispasmodique, antivirale expectorant, saveur, insectifuge, myorelaxant, pesticide, sédatif	(TEIXEIRIA, 2004)
Camphre	Allélopathique, analgésique, anesthésique, anti acné, antidiarrhétic, anti dysentérique, antioxydant, antiseptique, antispasmodique, stimulant-CNS, cancer-préventif, carminatif, produit de beauté, expectorant, fongicide, herbicide, insectifuge, nématocide, pesticide, Stimule la respiration, vibriocid	
Carvone	antiacetylcholinestérase, antiseptique, CNS- stimulant, cancer-préventif, carminatif, saveur, insecticide, insectifuge, nématocide, parfumerie, pesticide, sédatif, trichomonocid, vermicide	
Sabrinène	parfumerie	
Alpha- Thujone	antibactérien, insecticide, larvicid, pesticide	
1,8- Cinéole	antimicrobien	(SVOBODA et HAMPSON 1999)
Linalool	antimicrobien, hypnotique, hypothermique	
Bêta-asarone	sédatif, hypnotique	
Anethol/estragole	antispasmodique	

I.2.3.2. Les composés phénoliques

I.2.3.2.1. Généralités

Les polyphénols constituent un des groupes les plus nombreux et largement distribués des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues. Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux et présents dans tous les organes de la plante. Ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate (**LUGASI et al., 2003**). Les polyphénols possèdent plusieurs groupement phénoliques, avec ou non d'autres fonctions (OH alcoolique, carboxyle,...). Dans cette catégorie, on trouve de nombreuses substances : les noyaux simples en C₆-C₁ et C₆-C₃, les noyaux dérivant de l'extension du phényle propane, en C₆-C₃-C₆ (**DUBOIS et al., 1977**).

Selon **HARBORNE (1989)**, les polyphénols peuvent être divisés en au moins 10 classes différentes selon leur structure chimique de base. Ils peuvent s'étendre de molécules simples, telles que les acides phénoliques, aux composés fortement polymérisés, tels que des tannins (**LUGASI et al., 2003**).

Les composés phénoliques (Acides phénoliques, flavonoïdes simples et proanthocyanidins) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (**BETA et al., 2005**) car ils ont des rôles d'agents chémopréventifs, basés sur leurs capacités antioxydantes (**BIDIÉ et al., 2011**).

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (**PSOTOVÁ et al., 2003**). Comme exemple d'acide phénolique, on peut citer : l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide protocatechique, l'acide vanillique, l'acide férulique, l'acide sinapique et l'acide gallique (**HALE, 2003**). Ils sont considérés comme des substances phytochimiques avec des effets prebiotiques, antioxydants, de chélation et anti-inflammatoires. Leur toxicité est faible et ils sont considérés non toxiques. Pharmacologiquement, le mieux caractérisé est l'acide caféique (RA) (**PSOTOVÁ et al., 2003**) . Cet acide et l'acide férulique empêchent la formation du cancer des poumons chez les souris tandis que l'acide gallique inhibe la formation du cancer oesophagien chez les rats (**HALE, 2003**).

Les anthocyanidines sont des dérivés du flavylum ou 2-phényl- benzopyrylium. Ils portent des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (**HADI, 2004**).

Les tannins sont des polyphénols polaires d'origines végétales (**BERTHOD et al., 1999**), qui existent dans presque chaque partie de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines. Leurs poids moléculaires varient entre 500 et 3 000 (**COWAN, 1999**). Il est difficile de les séparer dans un extrait végétal, parce que de nombreux isomères avec une base moléculaire très semblable coexistent (**BERTHOD et al., 1999**). Ils sont divisés en deux groupes : tannins hydrolysables et condensés. Ils peuvent être constitués par la condensation des dérivés flavane qui ont été transportés aux tissus du bois des plantes. Alternativement, des tannins peuvent être constitués par polymérisation des unités de quinone (**COWAN, 1999**).

Les 4 OXO – Flavonoïdes sont les flavonoïdes vrais appelés dérivés flavoniques ou flavonoïdes. Ce sont des dérivés du noyau Flavone ou 2-Phenyl Chromone, portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides.

L'intérêt nutritionnel des flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C. Le scorbut expérimental cède à l'ingestion de jus d'agrumes, mais résiste à la seule administration d'acide ascorbique. Plus pratiquement, les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de *Paprika* et du jus de citron alors que l'acide ascorbique seul est inefficace. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonoïque (**HADI, 2004**).

La **figure 16** présente les structures de quelques composés phénoliques (**WANG et MAZZA, 2002**).

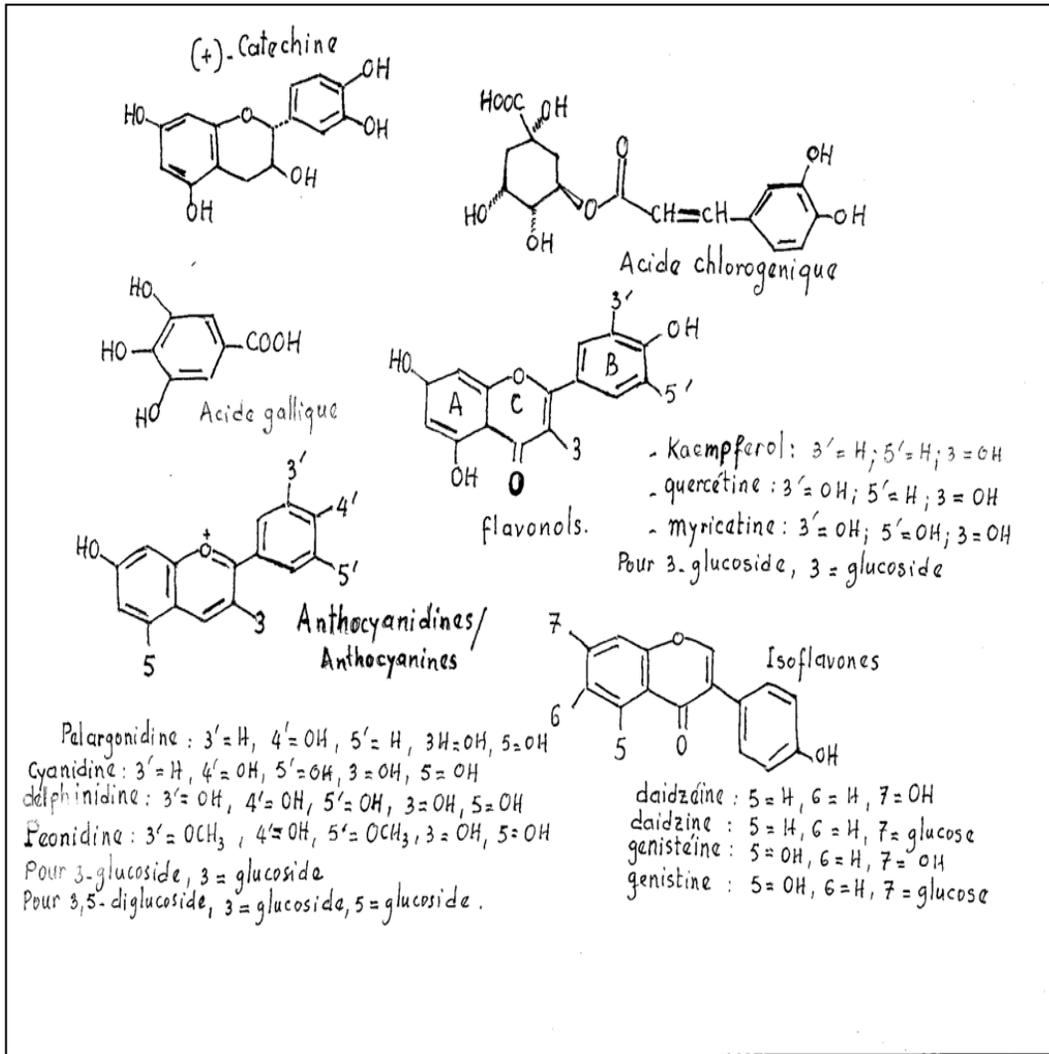


Figure 16 : Structures de quelques composés phénoliques (WANG et MAZZA, 2002).

I.2.3.2.2. Les flavonoïdes.

I.2.3.2.2.1. Structure des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 (**figure 17**).

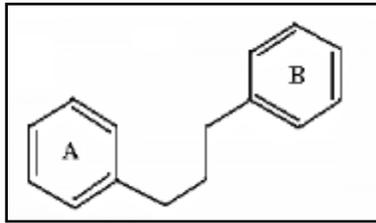


Figure 17 : Squelette de base des flavonoïdes

Il y a six classes des flavonoïdes, qui diffèrent par leur structure chimique : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (**MEDIĆ et al., 2004**).

I.2.3.2.3. Intérêts biologiques des flavonoïdes et des composés phénoliques.

Les composés phénoliques sont largement distribués dans les tissus des plantes parmi lesquels se retrouvent de nombreuses molécules anti radicalaires et anti oxydantes (**HSU et al. (2007)**).

Certains auteurs, notamment **HATANO et al. (1989)**, **DUH et al. (1999)** et **N'GUESSAN et al. (2007)**, ont montré l'existence d'une corrélation entre les teneurs en phénols totaux et l'activité antiradicalaire.

Selon **CHEN et HO (1995)**, les groupements fonctionnels présents dans les composés phénoliques en général peuvent céder facilement un électron ou un proton pour neutraliser les radicaux libres.

Ainsi, les fortes activités antioxydantes de *Mitragyna ciliata* (Rubiaceae), *Trichilia prieuriana* (Meliaceae), *Desmodium gangeticum* (Leguminosae), *Chrysophyllum perpulchrum* (Sapotaceae), *Sherbournia bignoniifolia* (Rubiaceae), *Parquetina nigrescens* (Periplocaceae), *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) et *Millettia zechiana* (Leguminosae) seraient donc liées à leur forte teneur en phénols totaux (**BIDIÉ et al., 2011**).

Ces activités antioxydantes dépendant de fortes teneurs en groupement phénoliques sont en accord avec les travaux **d'AYEBÉ *et al.* (2012)**, qui ont travaillé sur *Cola nitida*, plante riche en composés phénoliques, en flavonoïdes.

Les flavonoïdes ont montré plusieurs effets biologiques tels que les effets anti-inflammatoires (**KOUADIO *et al.*, 2000a**) et les propriétés antimicrobiennes (**HARIKRISHNA *et al.*, 2004**).

Le **Tableau V** présente quelques activités biologiques des composés phénoliques (**FRANKEL *et al.*, 1995**).

Tableau V : Activités biologiques des composés polyphénoliques (FRANKEL *et al.*, 1995).

Polyphénols	Activités	Auteurs
Acides phénols (cinnamique et benzoïque)	Antibactériens Antifongiques Antioxydants	[DIDRY <i>et al.</i> , 1982] [RAVN <i>et al.</i> , 1984] [HAYASE et KATO, 1984]
Coumarines	Vasoprotectrices et antioedémateuses	[MABRY et ULUBELEN, 1980]
Flavonoides	Anti tumorales Anti carcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydants	[STAVRIC et MATULA, 1992] [DAS <i>et al.</i> , 1994] [BIDET <i>et al.</i> , 1987] [BRUNETON, 1993] [ARUOMA <i>et al.</i> , 1995]
Anthocyanes	Protection des veines et capillaires	[BRUNETON, 1993]
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydants Anti tumorales Antifongiques Anti-inflammatoires	[MASQUELIER <i>et al.</i> , 1979] [BAHORUN <i>et al.</i> , 1996] [De OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1972] [BROWNLEE <i>et al.</i> , 1992] [KREOFISKY <i>et al.</i> , 1992]
Tanins galliques et catéchiqes	Antioxydants	[OKUDA <i>et al.</i> , 1983] [OKAMURA <i>et al.</i> , 1993]

I.3. DESCRIPTION DE LA PLANTE ETUDIÉE.

I.3.1. Famille des Rubiaceae.

I.3.1.1. Présentation.

La famille des Rubiaceae représente une des plus importantes familles en genres et en espèces dans le règne végétal, avec 86 genres et 313 espèces en Côte d'Ivoire, dont seulement deux grands arbres.

Les feuilles sont opposées, stipulées, simples et entières. Les fleurs sont hermaphrodites, les fruits sont en boules de «faux fruits» (fruits soudés en un ensemble), ou parfois des baies ligneuses ou des drupes. Les fruits et les écorces de cette famille sont souvent utilisés : les graines des caféiers, la quinine dans l'écorce des *Quinquina*, l'écorce des *Mytragyna* produit de la mitrinermine aux propriétés febrifuges (AKÉ-ASSI, 2000).

I.3.1.2. Intérêts nutritionnels et pharmacologiques.

Des organes des Rubiaceae sont consommés par certains groupes ethniques :

- Au Togo, chez les Nawdm, ce sont les graines de *Gardenia erubescens* Stapf et Hutch (nom local : Bena) ; chez les Kabyè, ce sont les feuilles de *Mitracarpus villosus* (SW) DC (nom local : Agnasow) ; chez les Agnagan, les Bassar, les Yaka, ce sont les écorces, les racines et les feuilles de *Nauclea latifolia*, appelées respectivement en langue locale : Pompsi, Kouvougnon, Ktilengnissa, qui sont consommées.
- Chez les populations Batéké de la République Démocratique du Congo (RDC), les fruits d'espèces de plantes à produits forestiers non ligneux (PFNL) de la famille des Rubiaceae telles que *Psychotria kimuenzae*, *Colletocema dewevrei* sont consommés. Pour ces populations (certains groupes ethniques), pour voiler le goût sucré du vin de palme d'*Elaeis guineensis* ou du *Raphia sese*, elles y ajoutent les feuilles de certaines espèces de Rubiaceae, notamment *Coffea canephora*, *Colletocema dewevrei*, afin de donner respectivement un goût amer (accentuant le degré d'alcool) et activer la fermentation. D'autres plantes à PFNL (Rubiaceae) sont utilisées à des fins de thérapie traditionnelle chez ces populations : ce sont : *Mitracarpus villosus*, *Psychotria kimuenzae*, *Sarcocephalus Latifolus* (BILOSO, 2008)

Les Rubiaceae, dans la pharmacopée africaine, ont une grande réputation et sont utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement de nombreuses affections telles que les pathologies gastro-intestinales infantiles, les douleurs abdominales (coliques), certaines affections parasitaires et hépatobiliaires (KERHARO, 1974 ; KABORE et SAWADOGO, 1986 ; GUINKO, 1989),

pour la tradithérapeutique infantile (**KABORE et al., 1998**). On les utilise également contre les oedèmes, l'ictère, les toux, les fièvres, le paludisme...etc (**AGASSOUNON et al., 2001**).

De nombreux travaux ont confirmé l'intérêt pharmacologique d'un grand nombre d'espèces de la famille des Rubiaceae parmi lesquelles :

- *Nauclea latifolia*
- *Pavetta corymbosa*
- *Rytiginia canthioides*

Le support de leurs activités antimicrobiennes a été démontré respectivement par **KABORE et al. (1998)** et **AGASSOUNON et al. (2001)**.

I.3.1.3. Quelques composés chimiques isolés des Rubiaceae.

Diverses familles de composés ont été mises en évidence ou même isolées des Rubiaceae. On peut citer :

- les alcaloïdes (**KABORE et al, 1998**).
- les tannins (**KABORE et al., 1998**).
- les stérols (**KABORE et al., 1998**).
- les triterpènes (**KABORE et al., 1998 ; KOUAME et al., 2010**).
- les iridoides (**SAINTY et al., 1981**).

Quelques métabolites isolés d'une Rubiaceae sont présentés par le **Tableau VI**.

Tableau VI : Quelques exemples de métabolites isolés d'une Rubiaceae.

Plantes	Composés	Références
<i>Borreria verticillata</i>	Daphylloside 1	(SAINTY et al., 1981)
	Aspéruloside 2	
	Férotoside 3	
	Désacétylaspérulosidate de méthyle 4	
	Désacétylaspéruloside 5	
	Acide aspérulosidique 6	
	Acide désacétylaspérulosidique 7	

I.3.2. Le genre *Morinda*

I.3.2.1. Présentation

Morinda est un genre de plantes à fleurs de la famille des Rubiaceae. Il en existe environ 80 espèces réparties dans toutes les régions tropicales du monde. Elles se présentent sous forme d'arbres, de lianes et d'arbustes (**Annexe 2**).

I.3.2.2. Propriétés pharmacologiques

Certaines espèces de ce genre ont une réputation en médecine traditionnelle, notamment *Morinda lucida benth*, utilisée pour ses propriétés anti drépanocytaires (**JOPPA et al., 2008**).

I.3.3. *Morinda morindoides*

I.3.3.1. Description botanique

Morinda morindoides, est une liane à pédoncule terminale ou à petites branches latérales terminales, appartenant au genre *Morinda*. Ses feuilles sont opposées, elliptiques ou oblongues elliptiques, cunéiformes à la base. Ses feuilles longuement acuminées, glabres, mesurent 6 – 15 cm de longueur sur 3 – 8 cm de largeur (**photographie 1**) : le limbe porte, environ 6 paires de nervures latérales. Les fleurs, blanches, groupées et capitules (**photographie 2**), ont le tube de la corolle court et robuste. Les fruits, bosselés, verts, et jaunes à maturité (**photographie 3**), mesurent 4 cm de diamètre (**ZIRIHI, 1991**).



Photographie 1: *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redhead (Rubiaceae). Rameaux feuillés, avec fruits mûrs. Source originale : (1772 x 1329), tirée de <http://www.flickr.com/photos/36517976@N06/5170157194/in/photostream/lightbox/>



Echelle 1/1

Photographie 2 : Fleurs de *Morinda morindoides* (KOFFI et al., 2010).



Photographie 3 : Fruit non mûr de *Morinda morindoides* (KOFFI et *al.*, 2010).

I.3.3.2. Classification systématique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redhead.

(Rubiaceae)

Règne	: Végétal
Sous-règne	: Eucaryotes
Embranchement	: Spermaphytes
Sous-embranchement	: Angiospermes
Classe	: Dicotylédons
Sous-classe	: Dialypétales
Ordre	: Gentianales
Famille	: Rubiaceae
Sous-famille	: Rubiales
Tribu	: Morindeae
Genre	: <i>Morinda</i>
Espèce	: <i>morindoides</i>

I.3.3.3. Utilisation dans la médecine traditionnelle

Morinda morindoides est une espèce végétale utilisée dans la pharmacopée ivoirienne pour ses vertus thérapeutiques.

En effet, les feuilles sont utilisées par les populations des zones forestières du centre-ouest de la Côte d'Ivoire, par le groupe ethnique Bété. Elles sont également utilisées par les populations des régions du Haut-Sassandra et de Scio. Ces régions sont situées respectivement entre 6°51' et 7°24' latitude Nord - 6°59' et 7°10' longitude Ouest et entre 6°35' et 6°53' latitude Nord - 7°57' et 7°32' longitude Ouest.

Ces feuilles sont utilisées pour traiter le paludisme (**ZIRIHI, 1991 ; TRA BI, 1997**) et aussi les diarrhées (**BAHI et al., 2003 ; MEITE et al., 2009**).

En République Démocratique du Congo (RDC), *Morinda morindoides* a longtemps été utilisée dans les villages et dans les villes à des fins thérapeutiques (**BILOSO, 2008**). Cette espèce végétale est utilisée pour le traitement des maladies parasitaires : les extraits des feuilles ont montré qu'elle possède des effets antiprotozoaires, (particulièrement contre *Entamoeba histolytica*) ; elles sont également utilisées contre les douleurs rhumatismales (**CIMANGA et al.,**

2006a). Les décoctions des feuilles sont utilisées pour traiter la malaria, les vers intestinaux et les amibiases (KAMBU *et al.*, 1990 ; TONA *et al.*, 1999a).

I.3.3.4. Travaux antérieurs sur *Morinda morindoides*

Plusieurs études, basées sur l'activité biologique des extraits organiques et aqueux des feuilles de *Morinda morindoides* ont été décrites, particulièrement les propriétés antimalariales et antimicrobiennes de cette plante.

I.3.3.4.1. propriétés antimalariales.

En Côte d'Ivoire, les travaux de ZIRIHI *et al.* (2005), ont montré que l'extrait éthanolique de cette espèce végétale, avait une bonne activité antiplasmodiale *in vitro* sur les souches chloroquinorésistantes F_CB₁ / Colombia de *Plasmodium falciparum*.

Également, en République Démocratique du Congo (RDC), les travaux de TONA *et al.* (1999b), ont aussi montré que les extraits éthanoliques et au méthylène chlorure de cette plante utilisée en RDC pour le traitement de la malaria, ont une activité inhibitrice *in vitro* sur la croissance de *Plasmodium falciparum*. TONA *et al.* (2001) ont également montré que les extraits lyophilisés aqueux, éthanoliques et les extraits au dichlorométhane ont une efficacité *in vivo* sur *Plasmodium berghei* ANKA, chez les souris. Plus tard, ces mêmes auteurs, ont montré que les extraits à l'éther de pétrole avaient une activité inhibitrice antiplasmodiale significative *in vitro*, comparée à celle des extraits éthanoliques (TONA *et al.*, 2004).

I.3.3.4.2. Propriétés antimicrobiennes.

Tout récemment, certains auteurs ont fait la lumière sur l'activité antimicrobienne de cette espèce végétale. Les travaux de BAGRE *et al.* (2006, 2007), ont démontré l'activité antifongique de *Morinda morindoides*. Les huiles saponifiées de cette plante, ont également des propriétés antifongiques (TOURE *et al.*, 2010).

Les travaux effectués sur les extraits acétatiques et éthanoliques 70 %, ont montré que cette espèce végétale a des activités antibactériennes sur la croissance *in vitro* des germes bactériens responsables des gastroenterites infantiles (*Escherichia coli*) (MOROH *et al.*, 2008). Ces extraits éthanoliques 70 % inhibent également la croissance *in vitro* des *Salmonelles O.M.A* (KOUAMÉ, 2006).

I.3.3.4.3. Autres propriétés

TONA *et al.* (1998), avaient déjà montré que les extraits de *Morinda morindoides* avaient une forte activité antiamoébique. Cette équipe fut rejointe par CIMANGA. *et al.* (2006b), dont les

travaux sur l'extrait méthanolique 80 % obtenu des décoctions aqueuses des feuilles de *Morinda morindoides*, ont révélé une activité anti-amœbique prometteuse.

Les travaux réalisés *in vivo* par **TRA-BI et al. (2010, 2011)**, sur certains organes nobles tels que le foie et les reins ont rassuré, à travers les extraits acétatiques que les extraits de cette plante sont tolérés par ceux-ci.

I.3.3.5. Quelques métabolites secondaires d'intérêt isolés de *Morinda morindoides*

Du point de vue phytochimique, diverses familles de composés ont été mises en évidence ou même isolées chez *Morinda morindoides*.

En effet, les feuilles *Morinda morindoides* sont riches en flavonoïdes dont le plus important est la quercétine (**CIMANGA et al., 1997 ; 1999**).

Cette plante contient aussi les stéroïdes, les terpènes, les saponines, les anthraquinones (**TONA et al., 1998 ; KOUAMÉ et al., 2010**).

I.3.3.5.1. Quelques composés chimiques isolés de *Morinda morindoides*

Selon **CIMANGA et al. (1997, 1999)**, les constituants chimiques isolés à partir des fractions butanoliques et acétatiques sont :

- Quercétine
- Quercétine-7, 4- diméthylether
- Quercétine-3, O- rutinoside
- Quercétine-3, O- rhamnoside
- Kaempferol-3, O- rhamnoside
- Kaempferol-3, O- rutinoside
- Kaempferol-7, O- rhamnosylsophoroside
- Chrysoeriol-7, O- neohespéridoside
- Apigénine-7, O- glucoside
- Lutéoline-7, O- glucoside
- Lutéoline

Ces auteurs ont également isolé des mêmes fractions, des iridoïdes glycosides parmi lesquels : les gaertnerosides et les acides gaertneriques, les méthoxygaertnerosides et les époxygaertnerosides (**CIMANGA et al., 2003**). **CIMANGA et al. (2006a)**, ont isolé la lutéoline et la lutéoline 7-O-glucoside (**figure 18, figure 19**).

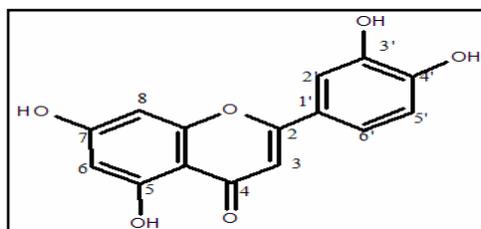


Figure 18 : Lutéoline

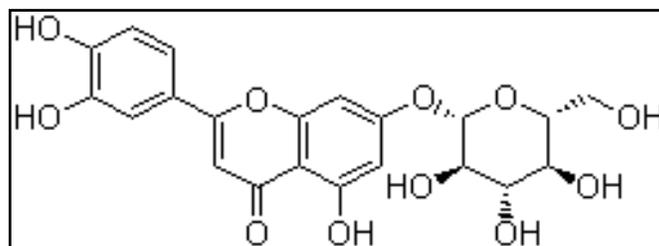


Figure 19 : Lutéoline 7-O- Glucoside (CYNAROSINE)

Des feuilles de cette même espèce végétale, **HARISOLO et al. (2009)** ont extrait et isolé à partir de l'éther de pétrole un kétostéroïde : [(22E)- 2 β - hydroxy- 24- ethylcholesta- 4, 2,2- dièn- 3- one-1].

Des travaux recents de **KOUAMÉ et al. (2010)**, ont permis de mettre en évidence et d'identifier, à partir des huiles essentielles de cette même espèce végétale, cinquante composés terpéniques (**Annexe 3**).

II.MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIEL

II.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de feuilles fraîches de *Morinda morindoides*.

II.1.1.1. Récolte des plantes

Morinda morindoides a été sélectionnée et collectée dans son habitat naturel, c'est-à-dire dans une forêt primaire, en Côte d'Ivoire et plus précisément dans la région du Haut-Sassandra, à Daloa.

La récolte du matériel végétal a été faite en 2006. La détermination botanique de cette plante et son authentification a été réalisée par un Spécialiste Botaniste taxonomiste de l'Herbier National de l'Université F. HOUPHOUET BOIGNY. Des échantillons justificatifs et numéros voucher (17710) ont été déposés au sein du même Herbier.

II.1.1.2. Séchage des plantes

Les parties récoltées (feuilles fraîches) ont été soigneusement lavées, séchées lentement à l'ombre, à la température ambiante, dans un endroit sec et aéré. La durée du séchage a été de six semaines. Ces feuilles ont été ensuite stockées dans des sachets propres pour broyage.

II.1.2. Souches bactériennes.

Le support microbien est constitué de souches bactériennes de vibrions cholériques : *Vibrio cholerae* O : 1 (**V.C O1**), fournies par le Laboratoire de Bactériologie et Virologie de l'Institut Pasteur d'Abidjan (Côte d'Ivoire : IPCI). Ces souches ont été isolées à partir de selles d'un malade du choléra (Souche clinique ou hospitalière : **BE 2932**). Deux souches ont été fournies par le Laboratoire de Microbiologie de l'Institut National de Santé Publique d'Abidjan (Côte d'Ivoire : INSP). Elles ont été aussi isolées à partir des selles de malades du choléra (souches cliniques). (**V.C O1 : 2930 ; V.C O1 : 3481/31**)

Deux souches environnementales, isolées à partir de poissons (*Cyprinus carcio*) de la Lagune Ebrié, communiquant avec l'Océan Atlantique. (**V.C O1 : 121/B1 ; V.C O1 : 131/B2**).

Ces bactéries ont été constituées en culture stock en vue de leur utilisation pour les tests bactériologiques : elles ont été cultivées sur de la gélose Mueller- Hinton® (Bio Rad®, Marnes la coquette, France) en pente dans des tubes Mac carteney (**JIGNA et al., 2005**).

II.1.3. Milieux de culture.

Des géloses et bouillons ont servi soit, à des tests microbiologiques, soit à des subcultures, soit à des tests de sélection des vibrions cholériques ou leur conservation (**Annexe 4 ; Annexe 5 ; Annexe 6 ; Annexe 7 ; Annexe 8**).

Ces milieux de culture sont : la gélose Thiosulfate Citrate Bile Saccharose (T.C.B.S), la gélose Mueller Hinton (M.H), le Bouillon Mueller Hinton (B.M.H), la Gélose Nutritive Alcaline (G.N.A), l'Eau Peptonée Alcaline (E.P.A).

Des produits chimiques (**Annexe 9**), d'autres matériels de laboratoire (**Annexe 10**) et de la verrerie ont été également utilisés (**Annexe 11**).

II.2. METHODES

II.2.1. Extraction des principes actifs

La voie de la macération a été choisie pour extraire les principes actifs de cette espèce végétale, afin de préserver l'intégrité de la nature de la molécule anti vibrio cholérique à déterminer à long terme.

- **La macération**

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante.

Afin d'accélérer le processus, l'extraction des principes actifs de *Morinda morindoides* a nécessité une augmentation et fixation de la température à 80 °C, à partir d'une plaque magnétique chauffante, sous agitation magnétique.

II.2.1.1. Préparation de l'extrait total aqueux

Les feuilles de *Morinda morindoides*, plante codifiée, (**BGG**), préalablement séchées ont été pulvérisées par un broyeur mécanique de type IKA[®] Labortechnik STAUFEN ; Germany : JANKE & KUNKEL). La poudre fine obtenue a servi à préparer les différents principes actifs.

Ainsi, L'Extrait total aqueux a été obtenu selon la méthode de **BAGRE et al. (2006) (Figure 20)** : cent grammes de poudre végétale ont été macérés dans un litre d'eau distillée, puis homogénéisés sous agitation magnétique pendant vingt quatre heures à une température de 80 °C, (à l'aide d'un agitateur magnétique de type RTC B, IKA[®] (Labortechnik STAUFEN ; Germany : JANKE & KUNKEL). L'homogénat obtenu est filtré successivement deux fois sur du coton hydrophile et ensuite sur du papier Wattman[®], (diamètre =150 mm, Nr. 0859, Marke SELECTA, Germany : CARL SCHLEICHER & SCHÜLL). Le filtrat est évaporé à pression réduite à 45 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif du type RVO5-ST, IKA[®] (Labortechnik ; Germany). Ce concentré de produit obtenu de couleur noirâtre est ensuite lyophilisé pour devenir une poudre noirâtre, constituant l'extrait total aqueux qui est codifié : (**E.Taq.**).

II.2.1.2. Préparation de l'extrait éthanolique 70 %1 et l'extrait résiduel

L'extrait éthanolique 70 % et l'extrait résiduel proviennent de l'extrait total aqueux selon la méthode suivante (**BAGRE et al., 2006, 2007 ; MOROH et al., 2008**) : cinq (5) grammes d'extrait total aqueux sont dissouts dans cent millilitres d'une solution éthanol absolu - eau (70 : 30 ; V/V), homogénéisés à partir d'un agitateur magnétique pendant 24 H. Le mélange obtenu est

laissé au repos dans une ampoule à décantation jusqu'à obtention de deux phases : la phase supérieure ou surnageant, contenant les éléments alcoolo- hydro solubles est séparée de la phase inférieure ou résidu. Ces phases (surnageant et résidu) sont concentrées séparément par évaporation à pression réduite à 45°C à partir d'un évaporateur rotatif, du type RVO5-ST IKA®. Les concentrés de produits issus du surnageant et du résidu sont lyophilisés et rendus en poudres, constituant respectivement l'extrait hydroéthanolique ou l'extrait éthanolique 70 %1 (E.ETH70 %) et l'extrait résiduel (**E.Rés.**) de *Morinda morindoides* (**Figure 21**).

II.2.1.3. Préparation de l'extrait éthanolique 70 % 2 (E.ETH 70 % vég.)

L'extrait éthanolique 70 %2 été obtenu à partir d'une légère modification de la méthode décrite par **BAGRE et al. (2006, 2007)** et **MOROH et al. (2008)** : cent grammes de poudre végétale ont été macérés dans un litre d'une solution éthanol absolu-eau (70 : 30 ; V/V), puis homogénéisés sous agitation magnétique pendant vingt quatre heures à une température de 80 °C, (à l'aide d'un agitateur magnétique de type RTC B, IKA® (Labortechnik STAUFEN ; Germany : JANKE & KUNKEL). L'homogénat obtenu est filtré successivement deux fois sur du coton hydrophile et ensuite sur du papier Wattman®, (diamètre =150 mm, Nr. 0859, Marke SELECTA, Germany : CARL SCHLEICHER & SCHÜLL). Le filtrat est évaporé à pression réduite à 45 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif du type RVO5-ST, IKA® (Labortechnik ; Germany). Ce concentré de produit obtenu est ensuite lyophilisé constituant l'extrait éthanolique 70 % 2 ou l'extrait éthanolique 70 % végétal, codifié : (**E.TH70 % vég**) de *Morinda morindoides* (**Figure 22**).

II.2.1.4. Préparation de l'Extrait chromatographique aqueux (BGG-F₅)

Le fractionnement de l'extrait total aqueux de *Morinda morindoides* a été inspiré de la technique décrite par **GUEDE-GUINA et al. (1993)** et reprise par **ACKAH et al. (2008)** et **KOFFI et al. (2010)**. Selon cette technique, l'extrait chromatographique aqueux (BGG-F₅) a été obtenu selon la méthode suivante : Trois cent milligrammes de l'extrait total aqueux sont dissous dans cinq mL d'eau distillée (soit 60 mg / mL). Le tout est passé à travers une colonne (1,8 x 50 cm) de gel de sephadex G₅₀, avec de l'eau distillée comme phase mobile. Le débit moyen est de 2 millilitres (mL) par minute. Cinq (5) fractions de dix (10) mL chacune, ont été séquentiellement collectées séparément, et notées respectivement F1, F2, F3, F4, F5. La cinquième fraction ou **BGG F₅**, qui réduit l'activité duodénale (**BAHI, 1998**), a été retenue. Cette fraction de couleur orangée est collectée, concentrée à pression réduite à 45 °C à l'aide d'un

évaporateur rotatif du type RVO5-ST, IKA[®] (Labortechnik ; Germany), par évaporation à pression réduite et lyophilisée pour donner de la poudre.

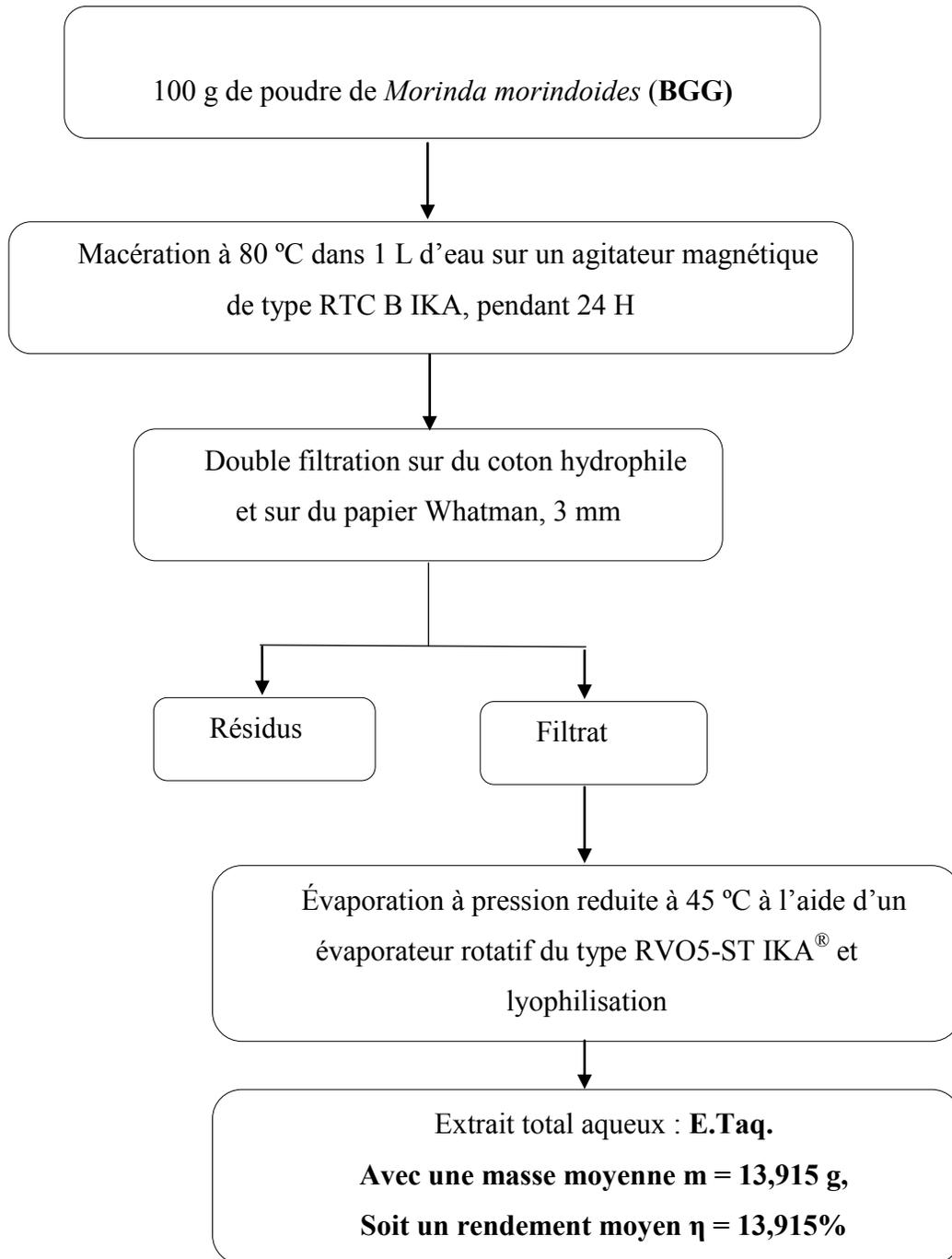


Figure 20 : Méthode de préparation de l'extrait total aqueux (**E.Taq.**) de *Morinda morindoides* (BAGRE et al., 2006).

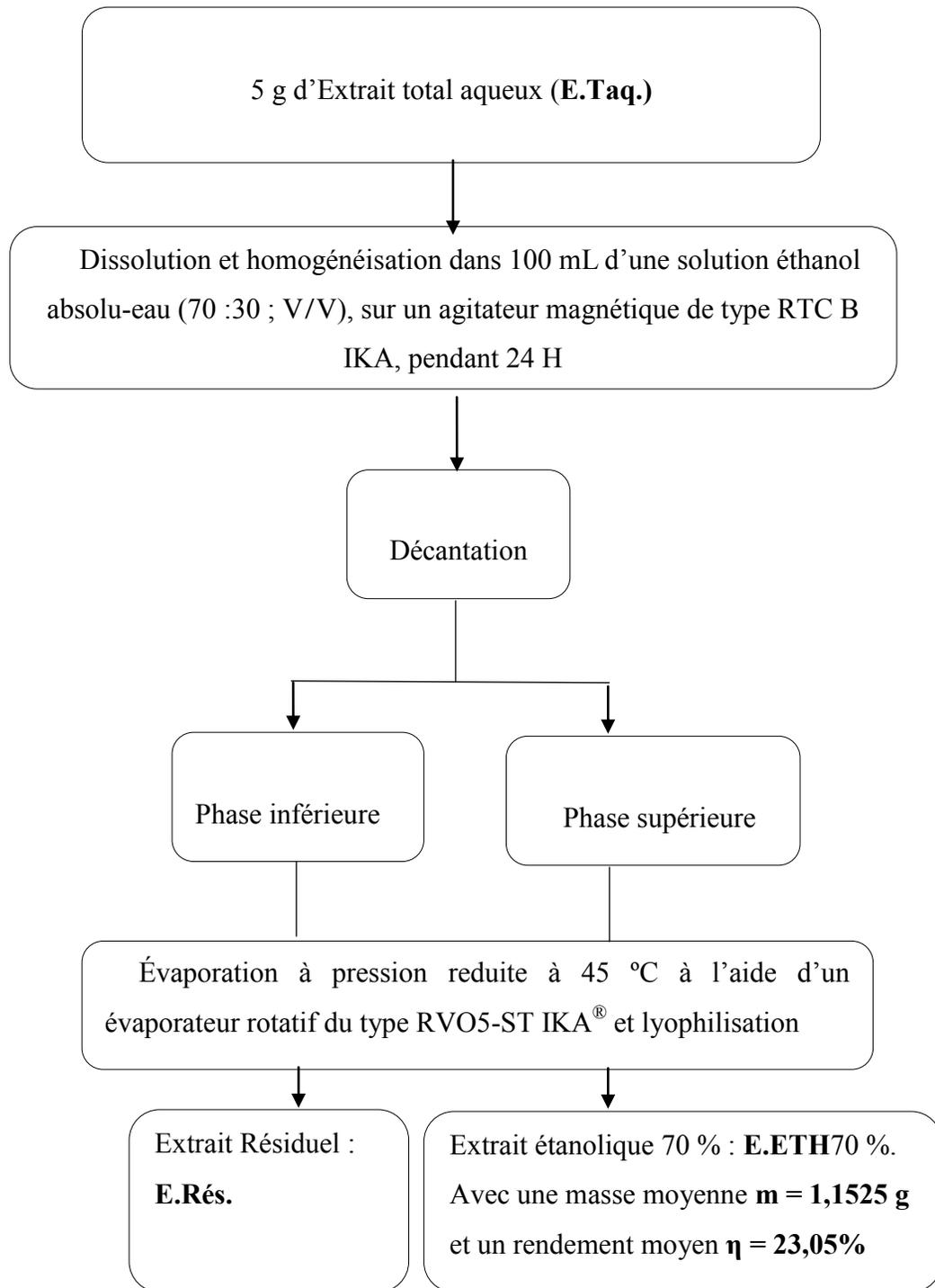


Figure 21 : Méthode de préparation de l'extrait éthanolique 70 % (**E.ETH70 %**) et de l'extrait résiduel (**E.Rés.**) de *Morinda morindoides*.

(ZIRIHI *et al.*, 2003 ; BAGRE *et al.*, 2006 , 2007 ; MOROH *et al.*, 2008).

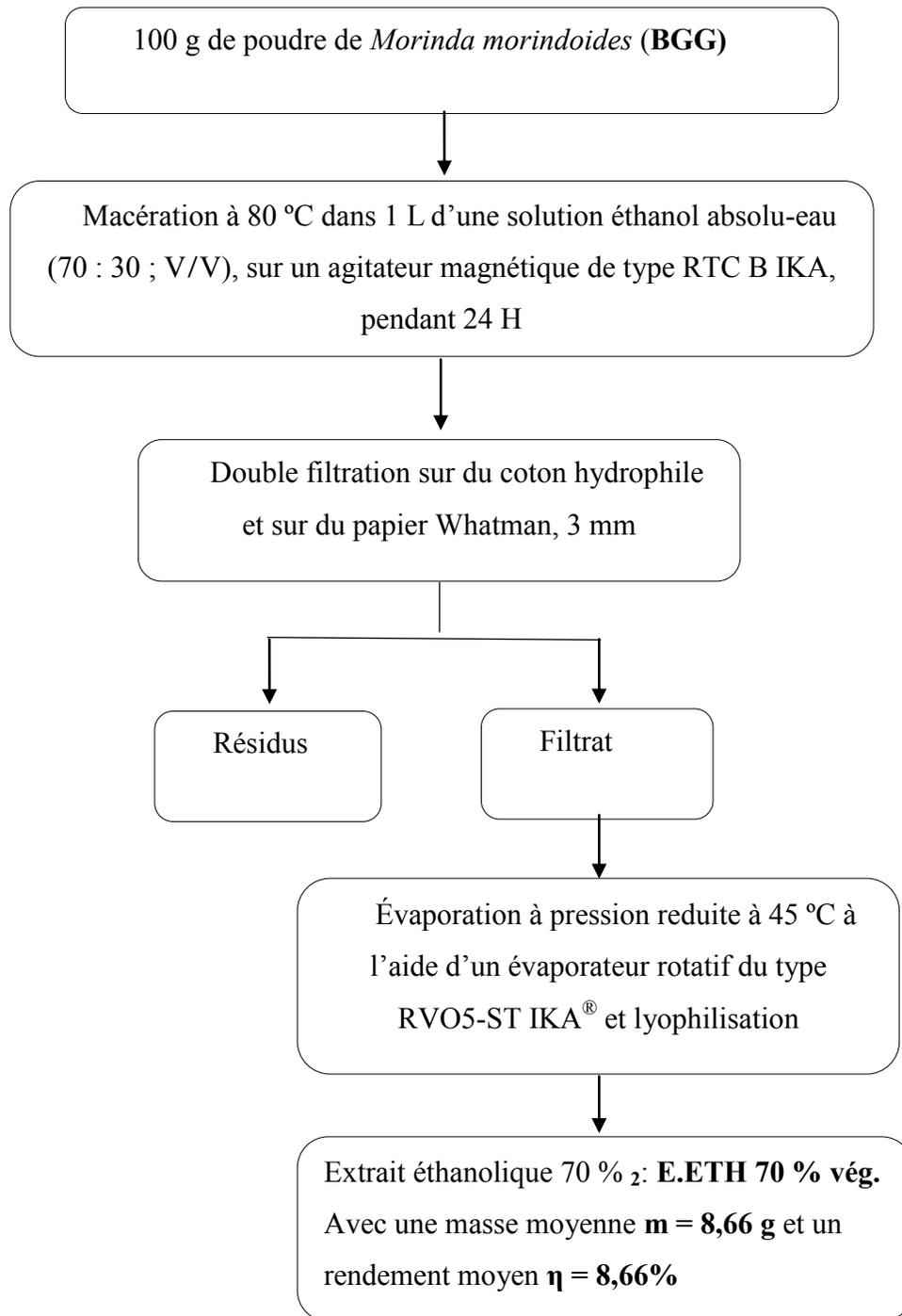


Figure 22 : Méthode de préparation de l'extrait éthanologique 70 %₂ (E.ETH70 % vég) de *Morinda morindoides* (BAGRE et al., 2006, 2007 ; MOROH et al., 2008).

Ces cinq extraits (**E.Taq.**, **E.ETH70 %**, **E.ETH70 %vég.**, **E.Rés.**, **BGGF₅**), sont conservés dans des tubes à essai en verre, à 4 °C, à l'abri de la lumière pour les tests bactériologiques ultérieurs.

II.2.2. Culture *in vitro* de *Vibrio cholerae* O : 1.

La méthode de mise en culture des vibrions cholériques en présence des différents extraits de *Morinda morindoides* est ici présentée.

II.2.2.1. Évaluation de l'activité antibactérienne d'extraits de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* d'une souche clinique de *Vibrio cholerae* O : 1 (BE 2932).

II.2.2.1.1. Préparation de la gélose Mueller Hinton (M.H).

Selon le fabricant, 35 g de poudre deshydratée sont dissouts dans 1000 mL d'eau distillée. Après homogénéisation, le tout est porté en ébullition jusqu'à dissolution complète (pendant 1 à 2 minutes). Le mélange est stérilisé à l'autoclave pendant 15 minutes à 121° C. Une moitié de la gélose est coulée dans des boîtes de pétri, tout en respectant l'épaisseur de la couche qui est de quatre (4) millimètres, et l'autre moitié est conservée à 4 °C pour un usage ultérieur.

Mode d'action :

La composition de ce milieu permet des conditions de croissance favorables. C'est le milieu de référence le plus satisfaisant pour tester la sensibilité ou la résistance des germes pathogènes envers les antibiotiques et les sulfamides (**MUELLER et HINTON, 1941**). Il sert pour les tests de diffusion et il est exempt d'antagonistes aux sulfamides.

Ce milieu a servi à faire une identification des caractères biochimiques et antigéniques des vibrions cholériques. Il a aussi servi à faire des antibiogrammes sur la souche bactérienne de *Vibrio cholerae* O : 1 (**BE 2932**) (**généralement entre deux tests bactériologiques**), dans le but de rassurer que sa sensibilité ne varie pas entre ces deux essais.

II.2.2.1.2. Préparation de la gélose Thiosulfate Citrate Bile Saccharose (TCBS).

Mode d'action :

Les fortes concentrations en thiosulfate et en citrate ainsi que la forte alcalinité du milieu inhibent largement les enterobactériacées. La bile de bœuf et le Cholate ralentissent le développement des entérocoques.

Les coliformes susceptibles de se développer ne dégradant pas le saccharose, seules quelques souches de *Proteus*, saccharoses- positives, peuvent former des colonies jaunes analogues à celles

des vibrions. L'indicateur mélangé, bleu de thymol – bleu de bromothymol, donne par acidification, même en milieu fortement alcalin, un virage net au jaune.

Pour la préparation de ce milieu, 88 g de poudre déshydratée sont dissouts dans 1000 mL d'eau distillée (selon le fabricant). Après homogénéisation, le tout est mis à bouillir pendant environ 1 à 2 minutes, puis coulé (sans l'autoclaver) en boîte, après avoir réglé le pH à $8,6 \pm 0,2$.

Lorsqu'il y a un changement de culture stock, les cultures se font sur ce milieu, dans le but d'être rassuré qu'il n'y a pas eu de contamination et que nous ayons en face, une souche de *Vibrio cholerae* O : 1. Cette purification des bactéries se confirme avec l'observation de la culture et par l'identification des caractères biochimiques et antigéniques, réalisée à partir des colonies de 24 H sur gélose M.H.

II.2.2.1.3. Préparation du bouillon Mueller Hinton

Vingt cinq (25) g de poudre sont dissouts dans 1000 mL d'eau distillée (selon le fabricant) ; la stérilisation est faite à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes, avec un pH final de $7,4 \pm 0,2$. Ce bouillon est utilisé comme support pour les tests en milieu liquide et aussi pour préparer les inocula et les dilutions.

II.2.2.1.4. Incorporation des extraits à la gélose Mueller Hinton.

L'incorporation des différents extraits végétaux préparés précédemment à la gélose Mueller-Hinton® (BIO-RAD, Marnes la coquette, France) a été inspirée de la méthode des doubles dilutions. À cet effet, quatre séries de tubes numérotés de **1** à **10**, ont été utilisées. Pour chaque série d'expérimentation avec un extrait, le **Tube N°1** sert de témoin de culture (sans extrait) et un **Tube T** servant de témoin de stérilité de la gélose (sans inoculum, sans extrait), est associé à la série d'expérimentation. À chaque tube **N°10** de chaque série, sont ajoutés vingt (20) mL de gélose M.H en surfusion (maintenu à environ 45 °C-50 °C), tandis que l'on distribue dans les autres tubes, 10 mL de gélose. À ce tube **N°10**, l'on a ajouté et homogénéisé X (600, 800, 4000, 2000) mg, respectivement d'extrait total aqueux (**E.Taq.**), d'extrait éthanolique 70 % (**E.TH70 %**), d'extrait résiduel (**E.Rés**) ou d'extrait chromatographique aqueux (**BGG F₅**). La moitié du mélange homogène de ce tube **N°10** est transférée au tube **N° 9** (contenant 10 mL de gélose M.H). Cette même opération est répétée à partir de ce tube, pour le tube suivant et ce, jusqu'au tube **N°2**.

Les concentrations obtenues des différents extraits varient de 30 mg / mL à 0,125 mg / mL pour **l'E.T.aq** ; 40 mg / mL à 1,156 mg / mL pour **l'E.ETH70 %** ; 200 mg / mL à 0,78 mg / mL

pour **l'E.Rés.** et 100 mg / mL à 0,390 mg / mL pour **BGG-F₅**, selon une suite géométrique de raison $\frac{1}{2}$.

Tous ces tubes ainsi préparés, ont été stérilisés à 121 °C pendant quinze minutes à l'autoclave et inclinés à la température de la salle, pour permettre à la gélose de se solidifier (**ACKAH et al., 2008 ; KOFFI et al., 2010 ; 2011**) (**Figure 23**).

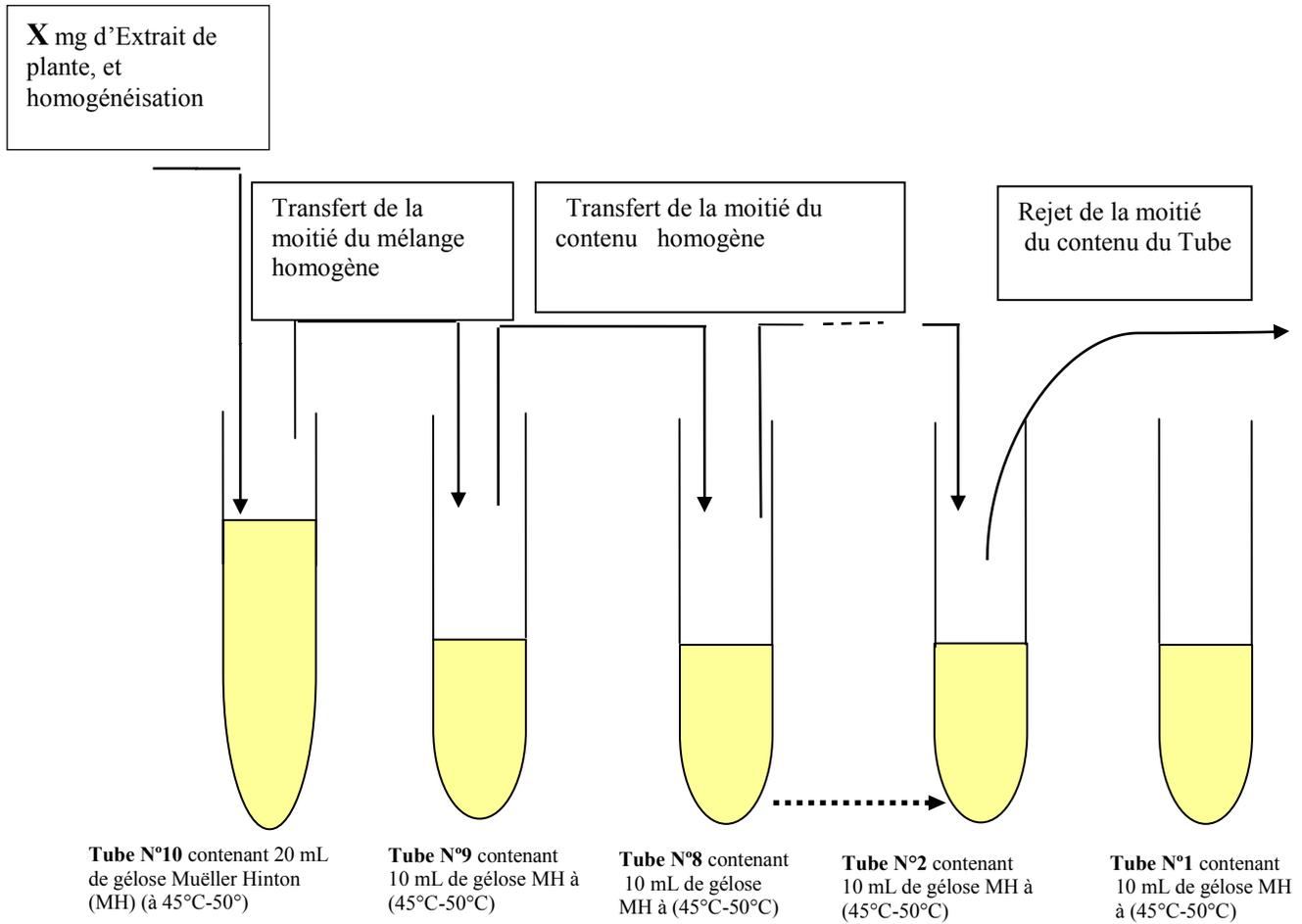


Figure 23 : Méthode d'incorporation des extraits à la gélose Mueller Hinton.

(ACKAH *et al.*, 2008 ; KOFFI *et al.*, 2010 , 2011).

X = 600 mg pour l'E.Taq
 = 800 mg pour l'E.ETH70%
 = 4000 mg pour l'E.Rés
 = 2000 mg pour BGG F5

II.2.2.1.5. Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture stock de la souche de *Vibrio cholerae* O : 1 (**BE : 2932**), repiquée par la méthode des stries sur de la gélose Mueller- Hinton (en boîte de pétri) et incubée pendant 18 à 24 heures, l'inoculum est obtenu à partir d'une colonie parfaitement isolée et émulsionnée dans 10 mL de bouillon Mueller-Hinton® (Bio-Rad, Marnes la coquette, France), permettant d'obtenir 10⁶ germes.

II.2.2.1.6. Essai microbien.

Dix microlitres de l'inoculum (préalablement préparé) dilués 100 fois, ont été ensemencés à la surface de la gélose contenue dans les tubes contenant les extraits.

Pour chaque série d'expérimentation avec un extrait, les essais ont été réalisés quatre fois (**OKOU et al., 2006**).

Après 18 à 24 h d'incubation à 37° C, les colonies de vibrions cholériques ont été comptées à partir d'un compteur de colonies de type pbi Digicont® (Pool Bioanalysis. Italiana), et la croissance dans chaque série de tubes expérimentaux a été évaluée en pourcentage de survivance, calculé par rapport à 100 % de survivance des colonies dans le **Tube N°1**, témoin de contrôle de la croissance, selon la relation suivante (**BAGRE et al., 2006 , 2007 ; ACKAH et al., 2008 ; ZIRIHI et al., 2007**):

$$S = \frac{n}{N} \times 100$$

S = Survivance des germes (exprimée en pourcentage)

N = Nombre de colonies dans le tube témoin

n = Nombre de colonies dans les tubes expérimentaux.

De cette relation a été déduit le taux d'inhibition **H (%)**, dans les tubes expérimentaux.

(**MOHAMMEDI, 2005**)

$$H (\%) = 100 - S$$

Les résultats expérimentaux ont permis de tracer les courbes de sensibilité des vibriens cholériques aux extraits et aussi de tracer les courbes d'inhibition de ces mêmes germes bactériens par les extraits.

Ces essais microbiens ont permis de prévoir les paramètres antibactériens que sont : la CMI, la CMB respectivement, la Concentration Minimale Inhibitrice, la Concentration Minimale Bactéricide. La CMI correspond à la plus petite concentration d'extrait, ne permettant pas d'obtenir une croissance macroscopiquement visible.

Après détermination de la CMI, une subculture a été réalisée à partir du tube n'ayant pas présenté de croissance visible sur de la gélose Mueller Hinton.

La CMB, a été déduite de ce tube, après 24 h d'incubation à 37° C. Elle est la plus petite concentration d'extrait qui ne permet pas d'obtenir une croissance visible (HOLT, 1975).

II.2.2.2. Étude comparative de la sensibilité *in vitro* des souches cliniques et des souches environnementales de *Vibrio cholerae* O : 1, aux extraits éthanoliques (E.ETH70 %vég. et E.ETH70 %) de *Morinda morindoides*.

II.2.2.2.1. Préparation de l'inoculum.

L'inoculum a été préparé à partir des cultures stocks des souches suivantes (souches cliniques : *V.C O1: 2930*; *V.C O1: 3481/31* et souches environnementales : *V.C O1: 121/B1*; *V.C O1: 131/B2*).

Des suspensions bactériennes ont été préparées à partir des cultures stocks dans du bouillon M.H, pendant douze (12) heures, puis 0,1 mL (soit 100 µL) de la suspension bactérienne standardisée à 0.5 de la gamme de Mc Farland, équivalant à un inoculum de 10⁶ germes / mL ont été utilisés pour les tests microbiologiques.

II.2.2.2.2. Essai microbien.

II.2.2.2.2.1. Tests préliminaires.

Les tests de toxicité du solvant d'extraction (éthanol absolu- eau : 70 : 30 ; V / V), ont été réalisés vis-à-vis de la souche clinique de vibriion cholérique (*VC O1 : 2930*) étudiée. Un contrôle, dont le solvant est l'eau a également été réalisé (MOHAMMEDI, 2005).

La méthode de BAUER *et al.* (1996), pour la réalisation d'un antibiogramme a été adoptée avec les disques d'antibiotiques usuels disponibles (Mumbai, central Mumbai India), sur de la gélose de M.H. Cette gélose contenait une certaine concentration de solvant (éthanol absolu- eau : 70 : 30 ; V/V). Un contrôle sans solvant a également été réalisé.

Cette méthodologie a permis de relever le profil de sensibilité de la souche de vibrions cholériques à l'égard de certains antibiotiques.

L'objectif de ces tests préliminaires est de démontrer que l'activité inhibitrice ou antibactérienne ne serait pas imputée au solvant d'extraction, mais proviendrait plutôt des extraits de *M. morindoides*.

II.2.2.2.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La recherche de ces deux paramètres a été faite en milieu liquide dans du bouillon M.H, selon **DE PAIVA et al. (2003)**.

Les extraits E.ETH70 %vég et E.ETH70 % ont été testés pour déterminer la CMI et la CMB pour chaque souche bactérienne, par la méthode de dilution en milieu liquide. Un antibiotique anticholérique de référence (Ciprofloxacine : Cipro-Cipla 500, Mumbai, India), utilisé en zone d'émergence de résistances des vibrions cholériques aux antibiotiques a été associé à cette étude, en vue de comparer son activité aux activités des extraits de plantes, vis-à-vis des souches de vibrions cholériques.

À cet effet, la méthode de micro dilution dans les plaques de microtitration de 96 puits, a été exécutée (**DE SOUZA et al., 2005**).

- **Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).**

Elle se définit comme étant la plus petite concentration d'extrait de plante ou d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible des microorganismes à l'œil nu.

Ainsi, dans les puits des colonnes de **1** à **12** (rangée **1**), on introduit à l'aide d'une micropipette à embout stérile (PRO Accumex[®]), **100 µL** de bouillon M.H.

On introduit également dans le puits **1**, **100 µL** d'extrait de plante (l'E.ETH70 % vég. ou l'E.ETH70 %) à raison de **60 mg/mL**.

Parallèlement à ces essais, **100 µL** de la solution d'antibiotique, de concentration de **1,88.10⁻³ mg / mL** sont introduits dans un autre puits **1** (rangée **2**).

100 µL du mélange sont reportés de puits en puits, de **1** à **11**, à l'aide de la micropipette, soit une suite géométrique de raison $\frac{1}{2}$.

Les concentrations finales (intermédiaires) ainsi obtenues varient de **30 mg / mL** à **0,028 mg/mL** pour l'E.ETH70 % vég. et l'E.ETH70 %, et **0,94. 10⁻³ mg / mL** à **0,90.10⁻⁶ mg / mL** pour la Ciprofloxacine.

100 µL d'inoculum sont introduits dans chaque puits : les nouvelles concentrations sont alors de **15 à 0,014 mg / mL**, et **$0,47 \cdot 10^{-3}$ à $0,45 \cdot 10^{-6}$ mg / mL** respectivement pour les extraits de plante et la Ciprofloxacine. Ces essais ont été réalisés quatre fois.

Les plaques ont été alors incubées pendant 18 à 24 heures et la CMI des différents extraits de plante et celle de la Ciprofloxacine ont été déterminées par comparaison des contenus des puits des colonies (**1 à 11**), de façon macroscopique, au contenu du puits **12** (qui est un témoin de contrôle de croissance, ne contenant pas d'extrait ou d'antibiotique).

Cette lecture a été faite par appréciation de l'opacité des puits (ou dépôt au fond des puits). Elle a été également soutenue par un révélateur de croissance : le TriphenylTetrazolium Chlorure (TTC), produit par l'Institut Pasteur de Paris) (**DE SOUZA et al., 2005**).

Le TTC (**100 µL**), en présence d'une croissance bactérienne dans les puits est réduit en formozan, rouge. En l'absence de culture, le puits demeure incolore.

- **Concentration Minimale Bactéricide (CMB).**

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) est considérée comme la plus petite concentration d'extrait de plante ou d'antibiotique pour laquelle il y a 0,01 % de vibrions cholériques survivants, comparativement à la ou aux **boîte(s) témoin(s)**.

En effet, une ou des boîte(s) témoin(s) est obtenue par numération de l'inoculum à partir des dilutions (**d**) de ce dernier ; ces dilutions étant : **d** = 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000. La dernière dilution correspond à 0,01% de survivants, tandis que l'inoculum correspond à 100 % de survivants, soit (**d** = 10^0). Les différentes dilutions et l'inoculum sontensemencés sur de la gélose M.H, suivant des traits de 5 cm, réalisés au revers des boîtes de pétri[®] en verre (boîtes de pétri[®] en verre : 120 × 20, JENA^{ER}, GLASWERK SCHOTT& GEN., MA Germany). Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures, puis conservées à 4 °C jusqu'à la fin des essais.

Après la détermination de la CMI le deuxième jour, les contenus des puits, ne présentant pas de trouble visible à l'œil nu sontensemencés de façon identique à celle des boîtes témoins et incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures : ce sont les **boîtes essais**.

La CMB se lit au troisième jour, par comparaison du nombre de survivants des germes bactériens de(s) ou de la boîte(s) essai(s), à ceux de la boîte témoin.

Pour chaque type de test bactériologique, il a été vérifié de façon statistique, à partir du Dispositif Complètement Aléatoire (D.C.A) :

- Si les différentes concentrations des extraits végétaux testés, agissent de la même façon sur la croissance *in vitro* des vibrions cholériques (donc pas de différence significative entre ces concentrations des extraits, sur la croissance des vibrions cholériques).
- Si au moins une des concentrations d'extraits agit différemment sur la croissance des microorganismes (en d'autres termes, s'il y a une différence significative entre les concentrations d'extraits sur la croissance des vibrions cholériques).

Ce test statistique a été adapté par un logiciel d'analyse statistique nommé GRAPHPAD PRISM 5. Ce test pose pour chaque extrait testé au cours de nos travaux, les hypothèses « H » suivantes :

Hypothèse :

H_0 : il n'existe pas de différence significative entre les concentrations sur la croissance *in vitro* de chaque souche testée.

H_C : il existe une différence significative entre les concentrations sur la croissance *in vitro* de chaque souche testée.

II.2.3. Mise en évidence de grands groupes chimiques.

II.2.3.1. Tri phytochimie.

Le tri phytochimie constitue toujours pour une plante, la première étape de son étude chimique et permet d'orienter ou de prévoir les recherches et résultats ultérieurs.

Ainsi, différents essais de caractérisations des principaux groupes chimiques contenus dans ces extraits suivants, à savoir l'**E.ETH70 %**, l'**E.ETH70 % vég.** et l'**E.Taq**, du fait de leur pouvoir antibactérien plus ou moins prononcé, ont été réalisés selon la méthode **BOUQUET (1972)**.

II.2.3.1.1. Recherche des alcaloïdes.

Les méthodes classiques d'extraction des alcaloïdes qui précipitent avec les réactifs de BOUCHARDAT, de MAYER et de DRAGENDORFF, ont été utilisées pour mettre en évidence ces composés.

Principe :

Les alcaloïdes sont caractérisés par le fait qu'ils ont la propriété de se combiner avec les métaux lourds (bismuth, iode, mercure, tungstène...) et donc de précipiter sous forme de sels. Ainsi les métaux lourds utilisés dans les réactifs servant pour leur détermination sont : le réactif de BOUCHARDAT (Iode), qui entraîne la formation de précipité brunâtre, le réactif de

DRAGENDORFF (iode, Bismuth) qui engendre la formation de précipité orangé, la réaction de VALSER-MAYER (Iode, Mercure) qui forme un précipité blanc laiteux.

Caractérisation :

Un échantillon de 6 mL d'extrait de *Morinda morindoides* (E.ETH70 %, E.ETH70 % vég. ou d'E.Taq.), est évaporé à sec dans une capsule en porcelaine au bain de sable. Le résidu est repris dans 6 mL d'éthanol (60 °). La solution ainsi obtenue est répartie dans trois tubes à essai (A, B, C).

- Dans le tube A, deux gouttes de réactif de DRAGENDORFF ont été ajoutées.
- Dans le tube B, deux gouttes de réactif de VALSER-MAYER ont été additionnées.
- Dans le tube C, deux gouttes de réactif de BOUCHARDAT ont été aussi additionnées.

(BOUQUET, 1972).

II.2.3.1.2. Recherche des polyphénols.

Les polyphénols sont des composés qui possèdent plusieurs groupements phénols et hydroxyles.

Principe : La colorimétrie des phénols met à profit la formation de précipité coloré avec une solution de chlorure ferrique (FeCl_3). L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte, indique la présence de composés polyphénoliques. L'appréciation de cette coloration est faite par rapport à un essai témoin qui est une solution de phénol. En outre, en solution aqueuse, les tanins sont précipités par les sels de métaux lourds (Cu, Zn, Sn, Pb, Hg). La réaction au formol chlorhydrique (réactif de STIASNY) nous permet de distinguer les tanins cathéchiques des tanins galliques par saturation à l'acétate de sodium.

- Les tanins cathéchiques sous forme condensée (non hydrolysable) sont précipités par chauffage au bain-marie à 80 °C, suivi de refroidissement. L'observation de gros flocons après refroidissement indique la présence de tanins cathéchiques.
- Les tanins galliques qui sont sous forme d'hétérosides hydrolysables sont hydrolysés après addition d'acétate de sodium. L'addition de quelques gouttes de perchlorure de fer, va donner une coloration spécifique aux polyphénols, indiquant la présence des tanins galliques. Un essai témoin est réalisé avec l'acide gallique.
- Caractérisation des Polyphénols : à 2 mL d'extrait de *Morinda morindoides* (E.ETH70 %, d'E.ETH70 % vég. ou d'E.Taq), est ajoutée une goutte d'une solution alcoolique de chlorure ferrique à 2 % **(BONGA et al., 1995).**

- Caractérisation des tanins cathéchiques : Un échantillon d'extrait de *Morinda morindoides* (5 ml), est évaporé à sec dans une capsule en porcelaine au bain de sable ; à ce résidu sont ajoutés 15 mL du réactif de STIASNY (réaction au formol chlorhydrique). L'ensemble a été porté au bain-marie à 80 °C pendant 30 minutes.
- Caractérisation des tanins galliques : un échantillon d'extrait de *Morinda morindoides* (5 mL), comme précédemment a été filtré et saturé à l'acétate de sodium. On l'y a additionné 3 gouttes de FeCl₃ à 2 %.

II.2.3.1.3. Recherche des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments jaunes très répandus chez les végétaux supérieurs. Ils existent sous forme d'hétérosides dont la génine dérive du noyau benzo- γ -pyrone.

Principe :

Les flavonoïdes sont caractérisés par la réaction à la cyanhydrine dont le principe est que les hétérosides flavoniques en solution alcoolique et en présence d'hydrogène naissant, donnent des dérivés diversement colorés en fonction de la structure chimique du flavonoïde.

- Les flavones vont donner une coloration orange.
- Les flavonols vont donner une coloration rouge.
- Les flavonones vont donner une coloration rouge-violacé.

L'addition successive de trois copeaux de magnésium et de trois gouttes d'alcool iso amylique, qui fait apparaître une coloration rose-orangé ou rouge-violacé intense dans la phase amylique, indique la présence de flavonoïdes (**BROWMAN et RAND, 1980**).

Caractérisation :

Deux (2) mL d'E.ETH70 %, d'E.ETH70 % vég. ou d'E.Taq. sont évaporés à sec dans une capsule en porcelaine au bain de sable. Le résidu est repris après refroidissement dans 5 ml d'alcool chlorhydrique au demi. La solution obtenue est renversée dans un tube à essai.

II.2.3.1.4. Recherche des saponosides.

Les saponosides sont des hétérosides à génine stéroïdique ou tri terpénique, doués de propriétés tensioactives.

Principe :

En solution aqueuse, les saponosides ont un indice de mousse très élevé. Cette propriété est donc mise à profit dans ce test, par agitation d'un échantillon de volume d'extrait. Une hauteur de

mousse formée, mesurée et supérieure ou égale à dix (10) mm, indique la présence de saponosides.

Caractérisation :

Un échantillon de deux (2) mL d'extrait de *Morinda morindoides* est repris à l'eau bouillante, refroidi et filtré. Dix millilitres (10 mL) du filtrat sont ensuite introduits dans un tube à essai. Le tube est ensuite agité verticalement pendant environ 15 secondes et laissé au repos pendant 15 minutes. La hauteur de la mousse formée est mesurée (**LEBEAU *et al.*, 1956 ; BONGA *et al.*, 1995**).

II.2.3.1.5. Recherche des quinones

Tout comme les tanins, les quinones existent sous deux formes (libres ou combinée). Les premières sont mises en évidence par le réactif de BORNTRAEGER, tandis que les secondes doivent être hydrolysées avant leur mise en évidence.

Principe : La caractérisation des quinones est fondée sur le fait qu'ils donnent sous l'action d'une lessive alcaline ajoutée en faible quantité (ammoniacque, soude, eau de chaux), une coloration rouge cerise.

Caractérisation :

Dans une capsule en porcelaine, deux mL (2 mL) d'extrait de *Morinda morindoides* sont évaporés à sec au bain de sable, puis triturés avec 5 mL d'acide chlorhydrique dilué au 1/5. L'ensemble est porté au bain-marie brouillant pendant 30 minutes. Après refroidissement, l'hydrolysât est extrait avec 20 ml de chloroforme dans un tube à essai. Il est ensuite saturé avec 0,5 mL d'ammoniacque dilué au demi.

II.2.3.1.6. Recherche des stérols.

Les composés stéroïdiques et terpéniques sont extraits par macération dans un solvant organique. La recherche des stérols et terpénoïdes a été faite par la réaction de LIEBERMAN-BUCHARD. Ces composés ont une origine commune. En effet, ils sont tous issus d'un même motif de base qui est l'isoprène. C'est la condensation des unités isopréniques qui aboutit, selon la voie de synthèse, soit à un dérivé terpénique soit à un stérol. L'unité isoprénique est elle-même construite dans une première étape, à partir d'un motif comportant deux carbones, fournis par l'acétylcoenzyme-A. Les processus de condensation et de transfert des unités carbonées sont liés à une activité mitochondriale intermédiaire de synthèse d'acéto-acétylCoA, d'acide β -hydroxy- β -méthylglucarique et d'acide mévalonique (**BROWMAN et RAND, 1980**). C'est cette origine

commune qui explique pourquoi la réaction de LIEBERMAN-BUCHARD, met en évidence à la fois les deux familles de composés.

Principe :

L'apport de l'anhydride acétique acidifie l'homogénat de l'extrait végétal. Les stérols et les terpènes sont mis en évidence par l'addition de l'acide sulfurique.

L'apparition d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive. La lecture est faite comparativement à un essai témoin avec le cholestérol ou le sitostérol.

Caractérisation :

L'échantillon (5 mL) d'extrait de *Morinda morindoides* (E.ETH70 %, E.ETH70 % vég. ou E.Taq) est évaporé à sec dans une capsule en porcelaine au bain de sable. Le résidu est dissout à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique. L'ensemble est renversé dans un tube à essai auquel on ajoute 0,5 mL d'acide sulfurique concentré.

III.RESULTATS

III.1. Rendement des extractions.

À partir de cent (100) grammes de poudre de *M. morindoides*, il a été préparé, à l'aide de l'eau distillée ou d'une solution éthanol absolu- eau (70 : 30 ; V/V), respectivement l'extrait total aqueux (E.Taq.) et l'extrait éthanolique 70 % (E.ETH70 % vég). Les masses moyennes obtenues, $m = 13,915 \text{ g}$ correspondent à un rendement moyen $\eta = 13,915 \%$ pour l'E.Taq. et $m = 8,66 \text{ g}$, avec un rendement moyen $\eta = 8,66 \%$ pour l'E.ETH70 % vég.

L'E.Taq., a servi de base à la préparation d'un autre type d'E.ETH70 %, à raison de cinq (5) grammes dissouts dans une solution éthanol absolu- eau (70 : 30 ; V/V). La masse moyenne obtenue $m = 1,1525 \text{ g}$, correspond à un rendement moyen $\eta = 23,05 \%$.

Les rendements de ces différentes extractions, avec leur masse correspondante sont présentés dans le **Tableau VII**.

III.2. Effets des concentrations des extraits de *Morinda morindodes* (*M. morindodes*) sur la croissance *in vitro* des vibrions cholériques (souche clinique BE : 2932).

Après 18 à 24 heures d'incubation des vibrions cholériques en présence des différents extraits testés, il a été observé le nombre de colonies dans les tubes expérimentaux ou aspect des cultures (**annexe 12, annexe 13, annexe 14, annexe 15**). Ce nombre de colonies diminue progressivement, au fur et à mesure que les concentrations des extraits augmentent dans les tubes expérimentaux, comparativement au tube témoin. Cela traduit l'action dose-réponse des extraits, sur la croissance *in vitro* des vibrions cholériques à 18-24 heures d'incubation.

L'appréciation de l'aspect des cultures a permis de recueillir des données expérimentales qui sont présentées dans le **Tableau VIII** et dans le **Tableau IX**.

Ces données expérimentales traduisent respectivement, le pourcentage de survivance des vibrions cholériques en fonction des doses croissantes des extraits testés et le pourcentage d'inhibition de ces germes bactériens par ces mêmes extraits.

Pour apprécier l'activité antibactérienne des quatre (4) extraits testés (**E.Taq., E.ETH70 %, E.Rés., BGG F₅**), les données expérimentales ont permis de tracer pour chaque extrait de plante testé, une courbe de sensibilité des germes bactériens ou courbe-antibiogramme, à cet extrait et aussi, une courbe d'inhibition des mêmes germes par cet extrait. Ces courbes de sensibilité et d'inhibition sont respectivement présentées par la **figure 24A**, la **figure 24B** pour l'E.Taq. ; la

figure 25A, la **figure 25B** pour l'E.ETH70 % ; la **Figure 26A**, la **Figure 26B** pour l'E.Rés. et la **Figure 27A**, la **Figure 27B** pour l'extrait chromatographique aqueux (**BGG F₅**).

Les activités de tous les extraits ont été comparées et sont présentées sous forme de courbes-synthèses par la **Figure 28**.

Les paramètres antibactériens de chaque extrait de *M. morindoides*, à savoir : la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), qui sont des valeurs expérimentales ont également été obtenues. À ces deux valeurs, est ajouté un autre paramètre antibactérien, obtenu à partir des courbes-antibiogrammes : il s'agit de la CI₅₀, qui traduit la concentration d'extrait végétal pour 50 % d'inhibition. Ces valeurs sont présentées dans le **Tableau X**.

Il a été établi des rapports d'efficacité entre les extraits testés, sur la base des CMB et aussi des rapports CMB/CMI qui attestent l'efficacité de chaque extrait. Ces valeurs sont contenues dans le **Tableau XI**.

Les résultats de l'analyse statistique de l'action des différents extraits testés sur les vibrions cholériques sont présentés dans le tableau **annexe 16**.

III.2.1. Activité antibactérienne de l'extrait total aqueux (E.Taq).

- Le résultat de l'activité antibactérienne de l'E.Taq. sur la croissance *in vitro* de *V.cholerae* O : 1 montre une diminution progressive, concentration-dépendante du taux de survivance, traduite par l'allure décroissante de la courbe lorsque les concentrations de l'E.Taq augmentent. Cette courbe de sensibilité révèle que la CMB et la CMI sont confondues au point où le taux de survivance devient nul, c'est-à-dire le point où la courbe coupe l'axe des abscisses. Ce point marque une concentration de 15 mg / mL, valeur de la CMI ou de la CMB. Quant à la CI₅₀, obtenue à partir du graphique, sa valeur est de 2,70 mg / mL, soit CI₅₀ = 2,70 mg / mL (**figure 24 A**).
- Le deuxième volet du résultat de l'activité antibactérienne de l'E.Taq., est l'activité inhibitrice de cet extrait, présentée par la **figure 24 B**. Cette figure est la courbe inverse de la courbe de sensibilité de la figure 24 A. Elle montre l'activité inhibitrice effective de l'E.Taq., sur la croissance *in vitro* des vibrions cholériques. Cette inhibition se traduit par un vide dans les tubes-tests. Cela s'observe soit, par une raréfaction progressive des colonies, soit par une absence de colonie dans les tubes expérimentaux. On note ainsi, une croissance progressive de la courbe à partir du point d'origine 0 (c'est-à-dire le point qui

marque une inhibition nulle ou 100 % de survivance dans le **Tube N°1**), traduisant une augmentation concentration-dépendante du taux d'inhibition. Ce taux d'inhibition qui croît avec la concentration de l'E.Taq., atteint une valeur maximale de 100 % d'inhibition, correspondant à une concentration d'E.Taq à partir de laquelle aucune survivance bactérienne n'a été observée dans les tubes expérimentaux : cela se traduit sur la courbe par un palier, et la première valeur marquant 100 % d'inhibition est de 15 mg/mL. Cette valeur correspond à la CMI et également à la CMB. La CI_{50} de 2,70 mg/mL ne change pas (**figure 24 B**).

III.2.2. Activité antibactérienne de l'extrait éthanolique 70 % (E.ETH70 %)

- Le résultat de l'activité antibactérienne de l'E.ETH70 % sur la croissance *in vitro* des vibrions cholériques, montre aussi une diminution progressive concentration-dépendante du taux de survivance traduite par l'allure décroissante de la courbe, lorsque les concentrations de l'E.ETH70 % augmentent. Cette courbe de sensibilité des vibrions cholériques à l'E.ETH70 %, révèle également que la CMB et la CMI ont les mêmes valeurs : elles sont confondues. Cela s'observe sur la courbe au point où le taux de survivance devient nul, c'est-à-dire le point où la courbe coupe l'axe des abscisses. Ce point marque une concentration de 5 mg / mL, valeur de la CMI ou de la CMB. Quant à la CI_{50} , sa valeur s'obtient à partir du graphique. Elle est de 1,92 mg/mL, soit $CI_{50} = 1,92$ mg / mL (**figure 25 A**).
- Quant au second aspect du résultat de l'activité antibactérienne de l'E.ETH70 %, celle-ci traduit la propriété inhibitrice de cet extrait, sur la croissance *in vitro* des vibrions cholériques (**figure 25 B**). La courbe qui traduit cette activité inhibitrice, est l'inverse de la courbe de la figure 25 A. Cette activité inhibitrice se traduit par un vide dans les tubes-expérimentaux. Cela s'observe soit, par une raréfaction progressive, soit par une absence de colonie dans les tubes expérimentaux. Cela se traduit par une croissance progressive de la courbe à partir du point d'origine 0 (c'est-à-dire le point marquant une inhibition nulle, soit 100 % de survivance dans le **Tube N°1**) au fur et à mesure que les concentrations de l'extrait augmentent : le taux d'inhibition est concentration-dépendante. Ce taux d'inhibition croissant, atteint une valeur maximale de 100 %, correspondant à une concentration d'E.ETH70 % à partir de laquelle aucune survivance bactérienne n'a été possible dans les tubes expérimentaux : cela s'observe sur la courbe par un palier, et la

première valeur marquant 100 % d'inhibition (donc absence de colonie), qui est de 5 mg / mL, correspond à la valeur de la CMI et à celle de la CMB. La CI_{50} s'observe sur le graphique et a pour valeur de 1,92 mg / mL.

III.2.3. Activité antibactérienne de l'extrait résiduel (E.Rés.).

- Le résultat de l'activité antibactérienne de l'E.Rés. sur la croissance *in vitro* des vibrions cholériques, montre une diminution progressive concentration-dépendante du taux de survivance, traduite par l'allure décroissante de la courbe, lorsque les concentrations de l'E.Rés. augmentent. Cette courbe de sensibilité (**Figure 26 A**) des vibrions cholériques à l'E.Rés révèle également que la CMB et la CMI ont les mêmes valeurs. Cela s'observe sur la courbe au point où le taux de survivance est nul, c'est-à-dire le point où la courbe coupe l'axe des abscisses. Ce point marque une concentration de 25 mg / mL. Quant à la CI_{50} , sa valeur se déduit du graphique. Elle est de 6,25 mg / mL, soit $CI_{50} = 6,25$ mg/mL.

- Le second aspect du résultat de l'activité antibactérienne de l'E.Rés., se traduit par l'inhibition effective de la croissance *in vitro* des vibrions cholériques par cet extrait (**figure 26 B**). C'est la courbe-inverse de la courbe de sensibilité de la figure 26 A.

Cette inhibition se traduit par un vide dans les tubes-expérimentaux. Cela s'observe soit, par une raréfaction progressive, soit par une absence de colonie dans les tubes expérimentaux. On note ainsi, une croissance progressive de la courbe à partir du point d'origine 0 (c'est-à-dire une inhibition nulle, soit 100 % de survivance dans le **Tube N⁰1**), traduisant une augmentation concentration-dépendante du taux d'inhibition. Ce taux d'inhibition croissant, atteint une valeur maximale (100 %), correspondant à une concentration d'E.Rés., à partir de laquelle aucune survivance bactérienne n'a été observée dans les tubes expérimentaux : cela se traduit sur la courbe par un palier et la première valeur marquant 100 % d'inhibition (donc absence de colonie), qui est de 25 mg / mL, correspond à la valeur de la CMI et à celle de la CMB. La CI_{50} s'observe sur le graphique. Elle a pour valeur de 6,25 mg / mL (**figure 26 B**).

III.2.4. Activité antibactérienne de la fraction chromatographique aqueuse (BGGF₅).

- Le résultat de l'activité antibactérienne de BGGF₅ sur la croissance *in vitro* des vibrions cholériques, montre également une diminution progressive concentration dépendante du taux de survivance, traduite par l'allure décroissante de la courbe, lorsque

les concentrations de **BGGF₅** augmentent. L'analyse de cette courbe de sensibilité révèle que la CMB et la CMI ont les mêmes valeurs. C'est le point marquant un taux de survivance nul, c'est-à-dire le point où la courbe coupe l'axe des abscisses.

Ce point marque une concentration de 50 mg / mL. Quant à la CI_{50} , c'est à partir du graphique qu'elle est obtenue, soit $CI_{50} = 33,50$ mg/mL (**figure 27 A**).

- Quant au second aspect du résultat de l'activité de **BGGF₅**, traduite par son inhibition sur la croissance *in vitro* des vibrions cholériques, il est montré par la **figure 27 B**. C'est la courbe-inverse de la courbe de sensibilité de la figure 27 A. Cette courbe montre l'effectivité de l'inhibition de **BGGF₅** sur la croissance *in vitro* des vibrions cholériques. On note aussi une croissance progressive de la courbe à partir du point 0 (c'est-à-dire une inhibition nulle ou 100 % de survivance dans le **Tube N^o1**), traduisant une augmentation concentration-dépendante du taux d'inhibition. Ce taux d'inhibition croissant, atteint une valeur maximale (100 %), correspondant à une concentration de **BGGF₅** à partir de laquelle aucune survivance bactérienne n'a été possible dans les tubes expérimentaux : cela se traduit sur la courbe par un palier et la première valeur marquant 100 % d'inhibition est égale à 50 mg / mL. Elle correspond à la CMI et à la CMB. La CI_{50} ne varie pas. Elle est égale à 33,5 mg/mL (**figure 27 B**).

III.2.5. Activités comparatives des différents extraits de *Morinda morindoides*

- Le résultat des activités comparatives des différents extraits de *Morinda morindoides*, est traduit sous forme de courbes-synthèses (**Figure 28**). Ces courbes permettent de comparer la sensibilité des vibrions cholériques aux différents extraits testés. D'une manière générale, les courbes présentent une allure décroissante. Cependant, la différence s'observe au niveau de la pente. En effet, les courbes de sensibilité des quatre extraits (**I'E.ETH70%**, **I'E.Taq.**, **I'E.Rés.** et **BGG F₅**), prises dans cet ordre, aux vibrions cholériques, présentent respectivement une pente de moins en moins forte.

Tableau VII : Rendement des extractions

Extraits de <i>Morinda morindoides</i> .	Masse de matière végétale traitée M_1 (g)	Moyennes des masses de chaque extrait : M_2 (g)	Rendements : $(M_2 / M_1) \times 100 = \eta$
Extrait Total Aqueux (E.Taq.)	100	13,915	13,915
Extrait Éthanolique 70 % ₁ (E.Eth70 %)	5	1,1525	1,1525
Extrait Éthanolique 70 % ₂ (E.Eth70 %vég)	100	8,66	8,66

Tableau VIII : Survivance (%) des vibrions cholériques dans les tubes-tests, traduisant l'effet des extraits testés sur la croissance des vibrions cholériques

			Tube Témoin (T)	Tubes - tests									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Différents extraits de <i>Morinda morindoides</i>	E.Taq	Gamme de concentration (mg/mL)	Gélose sans inoculum, sans extrait	0	0,125	0,23	0,46	0,93	1,875	3,75	7,5	15	30
		Pourcentage de survivance (%)		100 ± 0,00	94 ± 1,826	83,25 ± 0,1780	72,40 ± 0,3266	61,20 ± 0,1826	56 ± 1,414	46,30 ± 0,2449	27,50 ± 0,4082	0 ± 0,000	0 ± 0,000
	E.ETH 70%	Gamme de concentration (mg/mL)		0	0,156	0,312	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40
		Pourcentage de survivance (%)		100 ± 0,00	90 ± 1,41	73 ± 0,81	65 ± 2,94	59 ± 2,16	43 ± 2,94	0 ± 0,000	0 ± 0,000	0 ± 0,000	0 ± 0,000
	E.Rés	Gamme de concentration (mg/mL)		0	0,78	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50	100	200
		Pourcentage de survivance (%)		100 ± 0,00	79 ± 2,16	70 ± 2,82	60 ± 3,55	50 ± 3,74	24 ± 2,16	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,0	0 ± 0,00
	BGG F ₅	Gamme de concentration (mg/mL)		0	0,39	0,78	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50	100
		Pourcentage de survivance (%)		100 ± 0,00	96 ± 2,16	94 ± 3,55	91 ± 2,16	83 ± 2,16	81 ± 2,16	78 ± 2,16	76 ± 2,16	0 ± 0,00	0 ± 0,00

Tableau IX : Taux d'inhibition des vibrions cholériques dans les tubes –tests : exprimant l'ampleur de l'efficacité des extraits testés

			Tube Témoin (T)	Tubes - tests									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Différents extraits de <i>Morinda morindoides</i>	E.Taq	Gamme de concentration (mg/mL)	Gélose sans inoculum, sans extrait	0	0,125	0,23	0,46	0,93	1,875	3,75	7,5	15	30
		Pourcentage d'inhibition (%)		0	6	16,75	27,60	38,80	44	53,70	72,50	100	100
	E.Eth 70%	Gamme de concentration (mg/mL)		0	0,156	0,312	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40
		Pourcentage d'inhibition (%)		0	10	27	35	41	57	100	100	100	100
	E.Rés	Gamme de concentration (mg/mL)		0	0,78	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50	100	200
		Pourcentage d'inhibition (%)		0	21	30	40	50	76	100	100	100	100
	BGG F ₅	Gamme de concentration (mg/mL)		0	0,39	0,78	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50	100
		Pourcentage d'inhibition (%)		0	4	6	9	17	19	22	24	100	100

Tube 1 : sans extrait, avec croissance sans inhibition ; **Tube témoin T** : évalue la stérilité de la gélose, traduit les conditions aseptiques d'expérimentation. **E** : Extrait ; **Taq** : Total aqueux ; **Eth70%** : Ethanolique 70% ; **Rés** : Résiduel ; **BGG F₅** : Extrait chromatographique aqueux.)

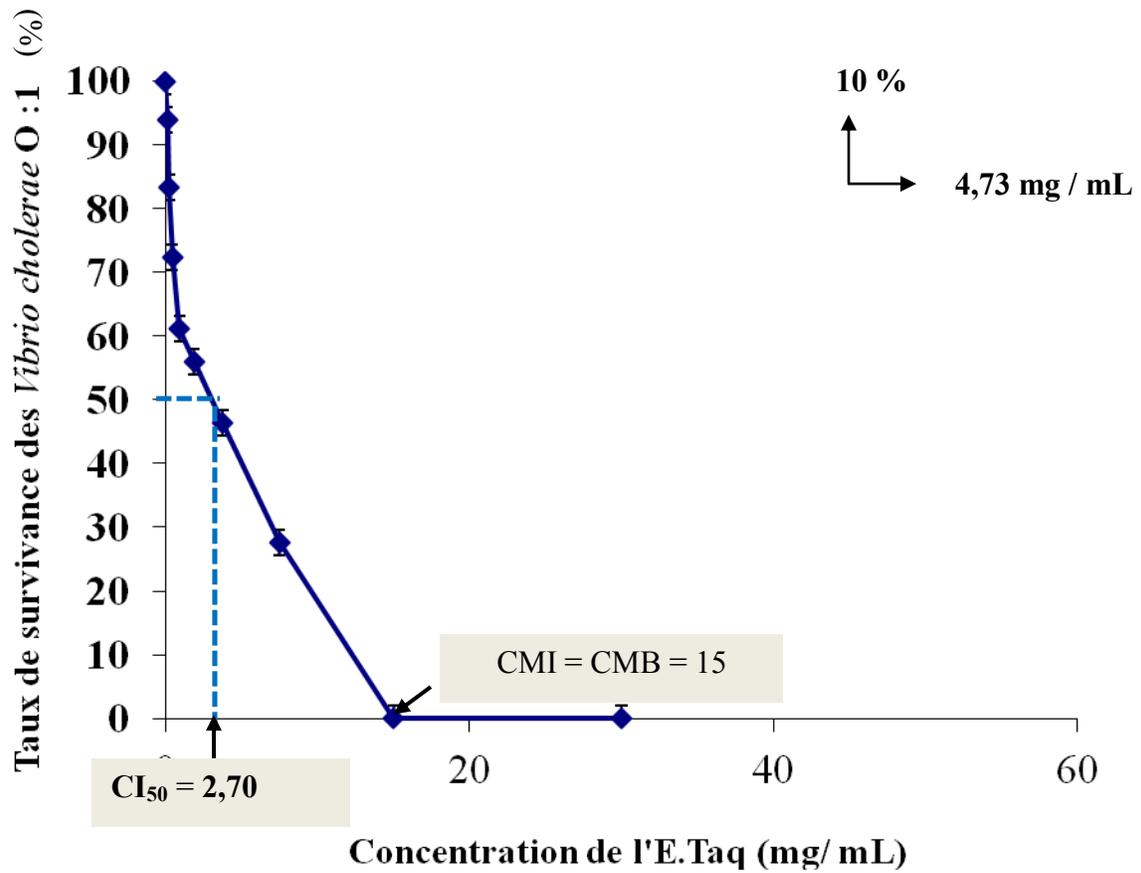


Figure 24 A : Courbe de sensibilité de *Vibrio cholerae* O : 1 à l'E.Taq. de *Morinda morindoides*.

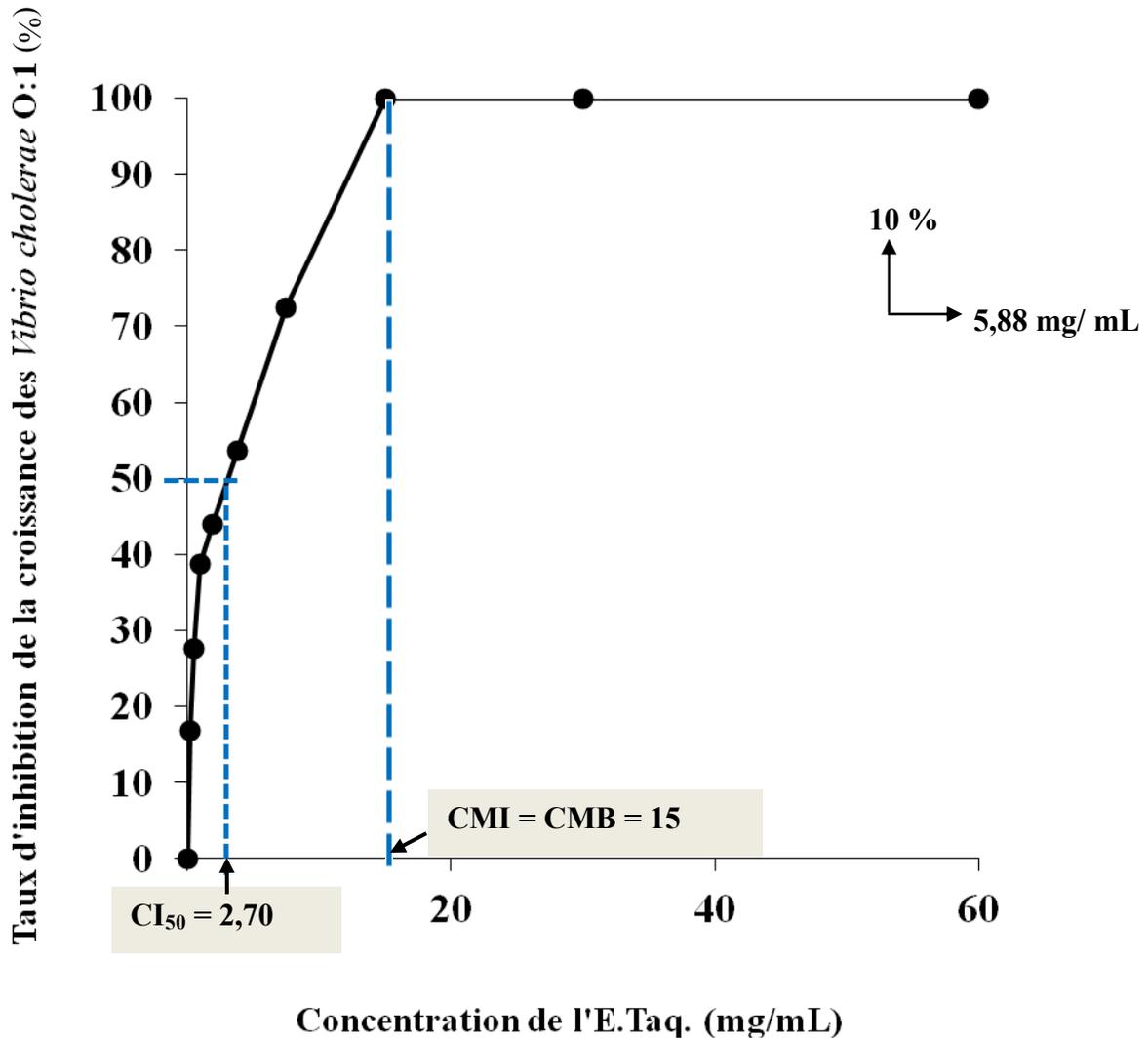


Figure 24 B : Courbe d'inhibition de l'E.Taq. de *Morinda morindoides* sur la croissance de *Vibrio cholerae* O : 1.

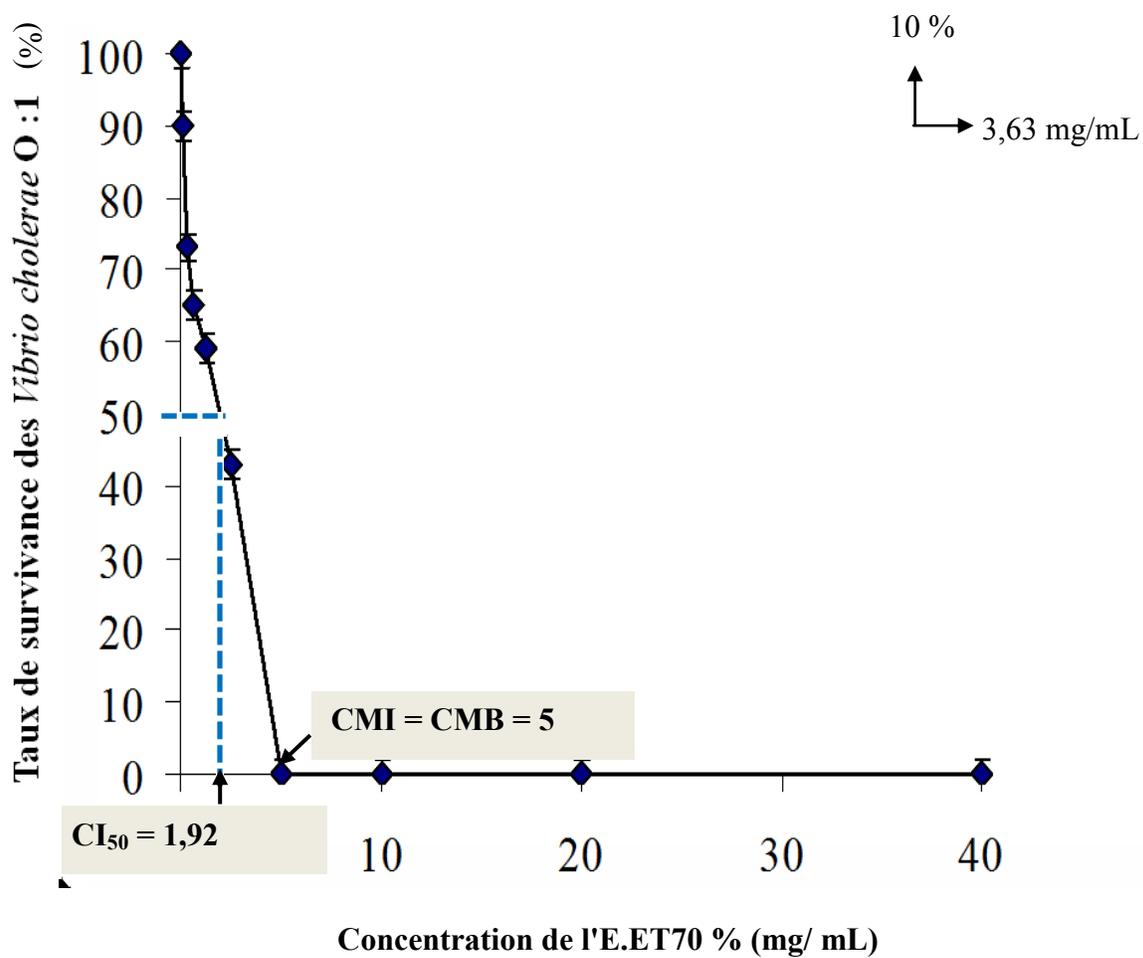


Figure 25A : Courbe de sensibilité de *Vibrio cholerae* O : 1 à l'E.ETH70 % de *Morinda morindoides*.

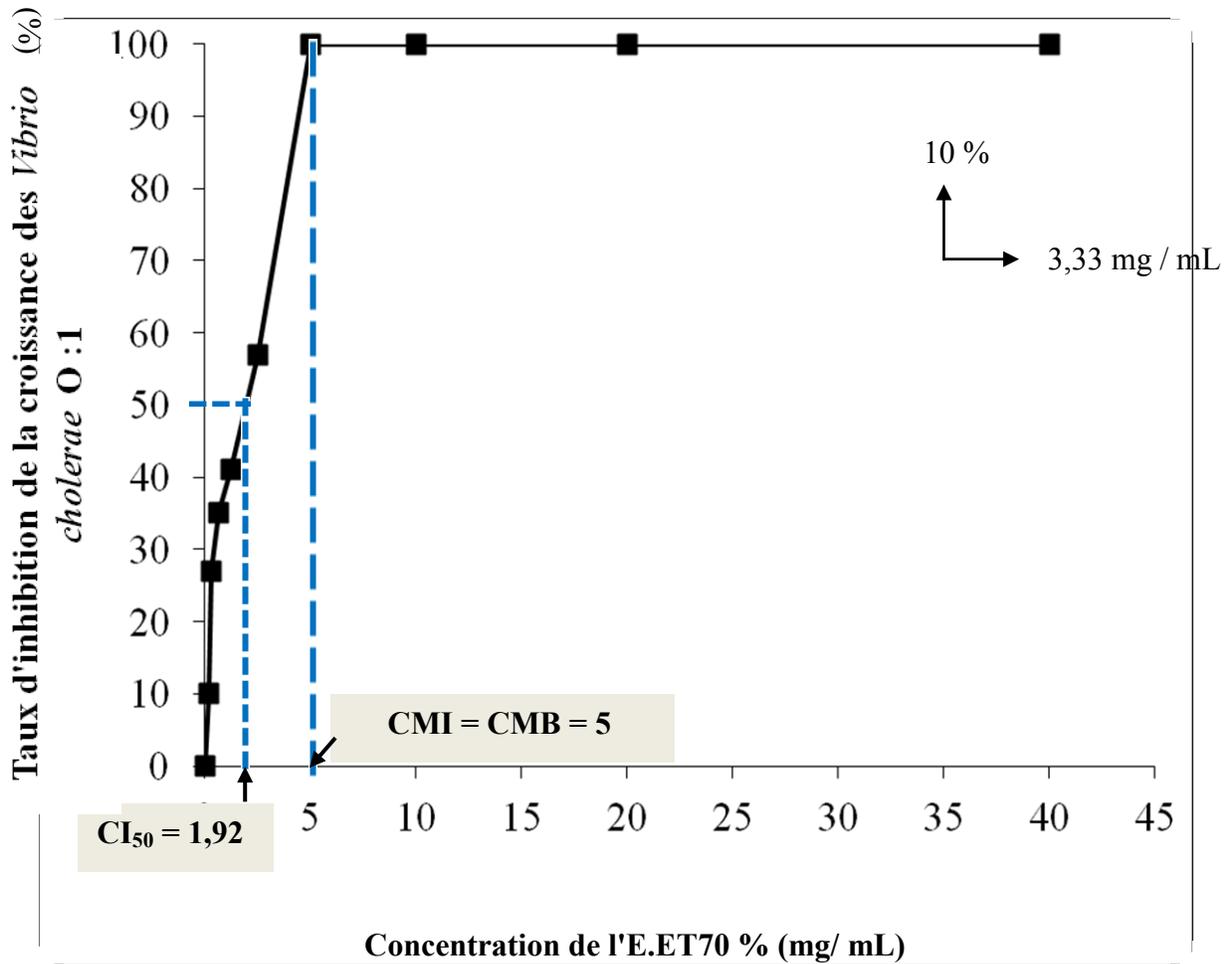


Figure 25B : Courbe d'inhibition de l'E.ETH70 % de *Morinda morindoides* sur la croissance de *Vibrio cholerae* O : 1.

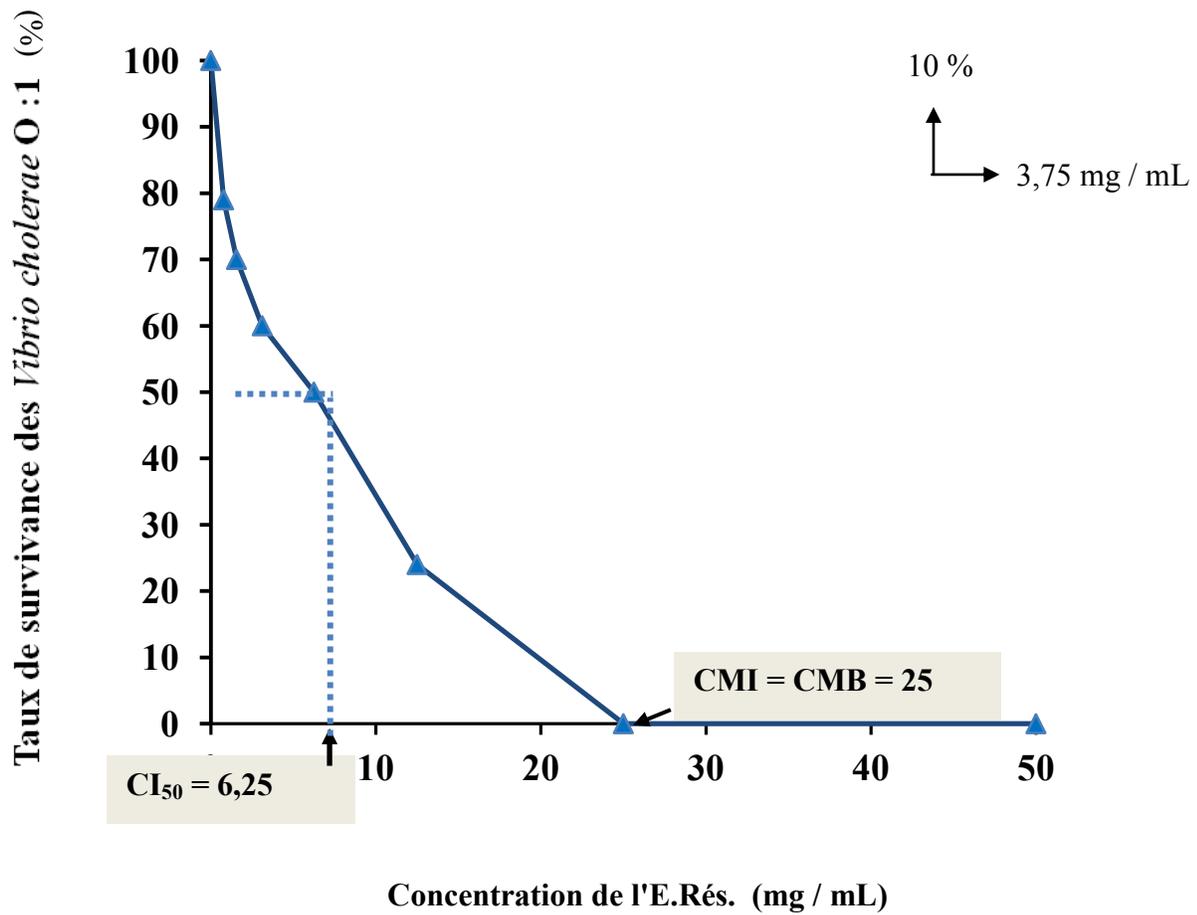


Figure 26 A : Courbe de sensibilité de *Vibrio cholerae* O : 1 à l'E.Rés. de *Morinda morindoides*.

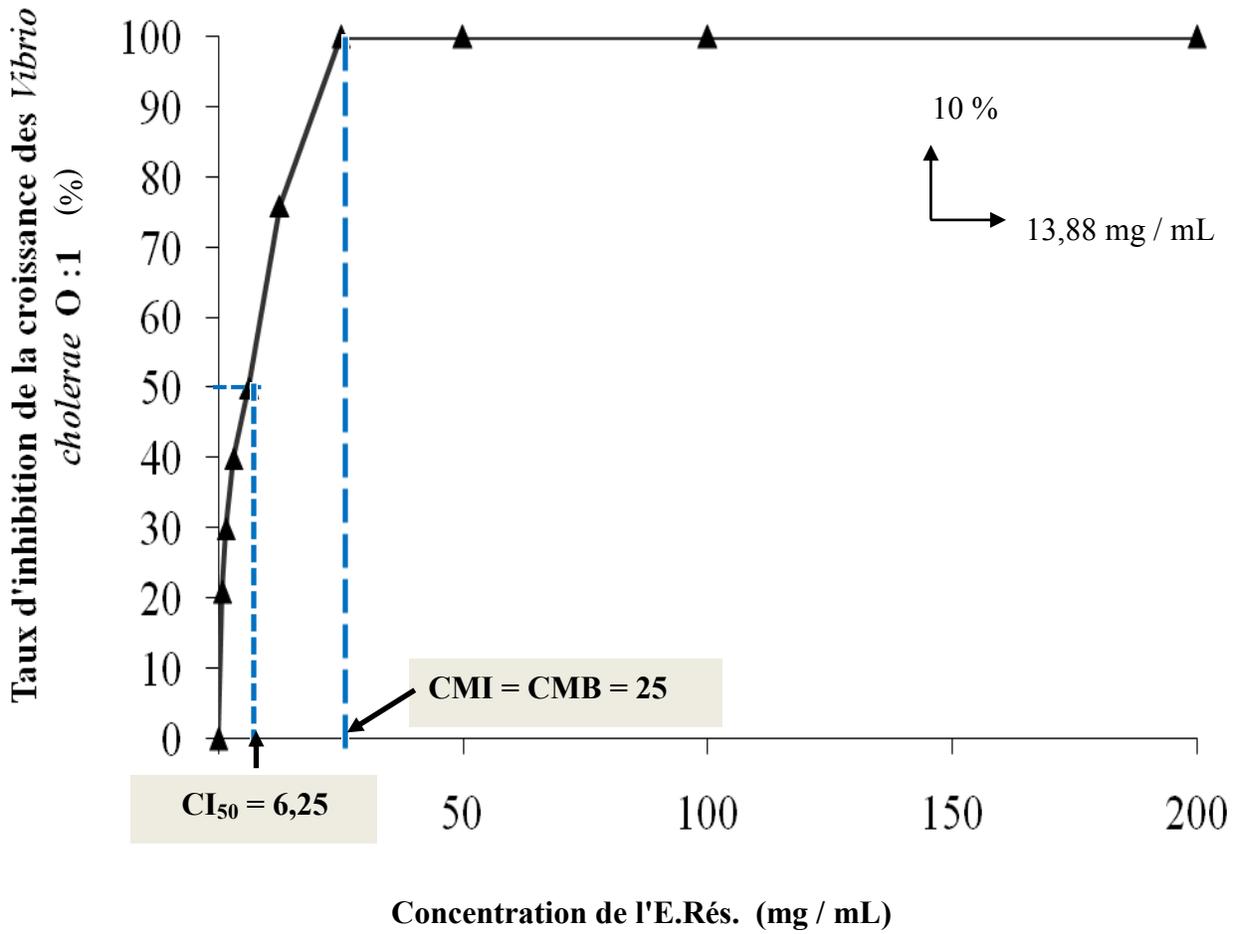


Figure 26 B : Courbe d'inhibition de l'E.Rés. de *Morinda morindoides* sur la croissance de *Vibrio cholerae* O : 1.

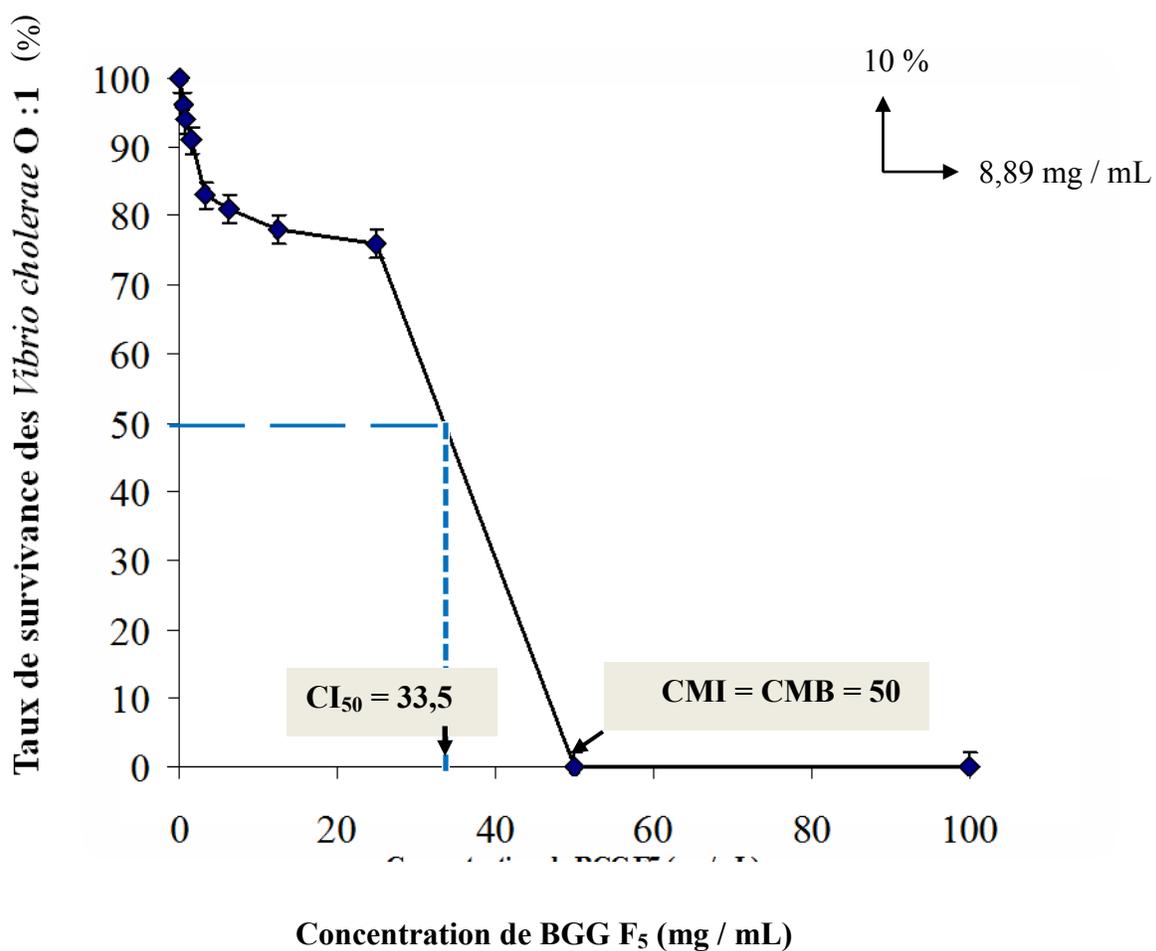


Figure 27 A : Courbe de sensibilité de *Vibrio cholerae* O : 1 à l'extrait chromatographique aqueux (BGG F₅) de *Morinda morindoides*.

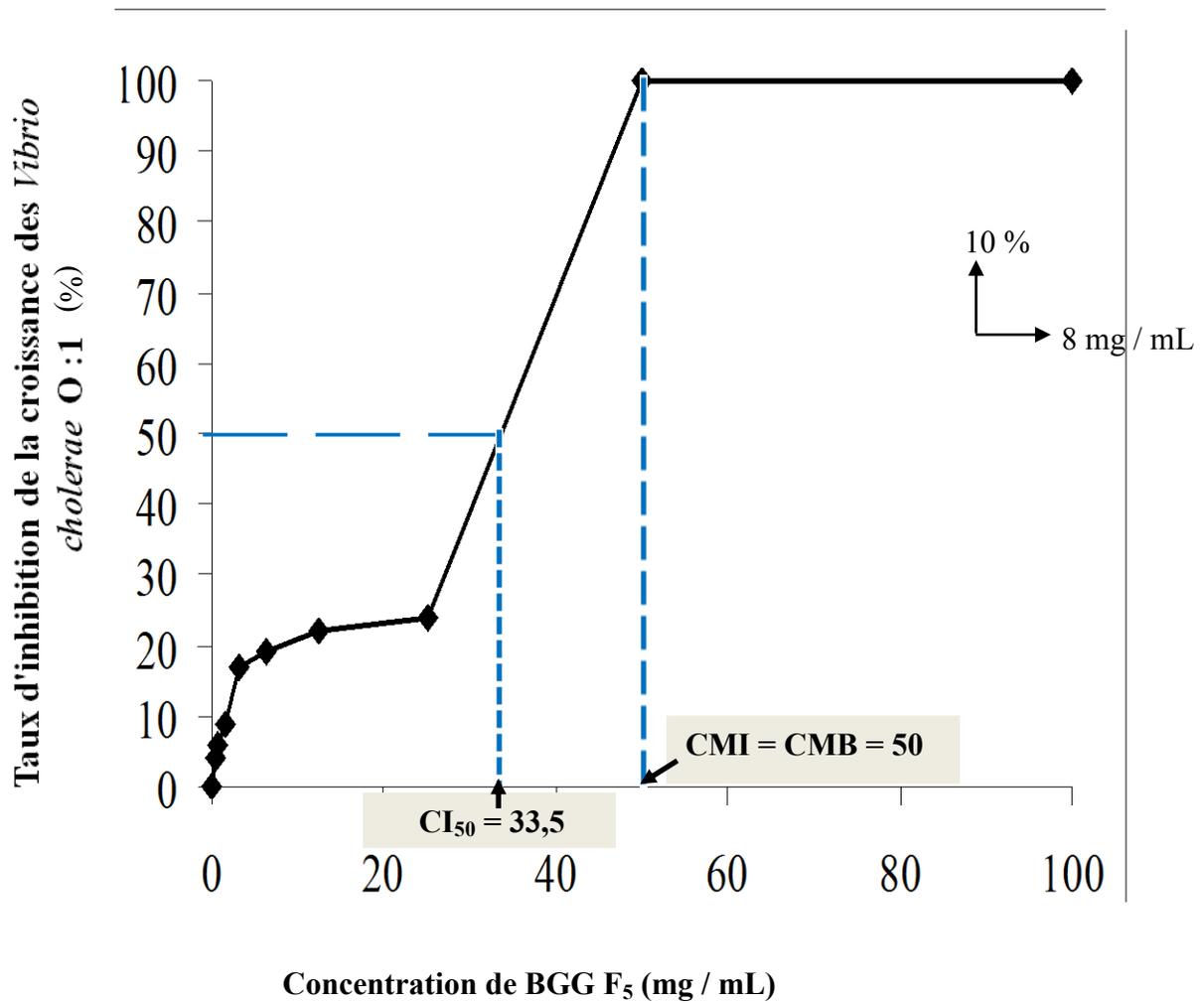


Figure 27 B : Courbe d'inhibition de l'extrait chromatographique aqueux (**BGG F₅**) sur la croissance de *Vibrio cholerae* O : 1.

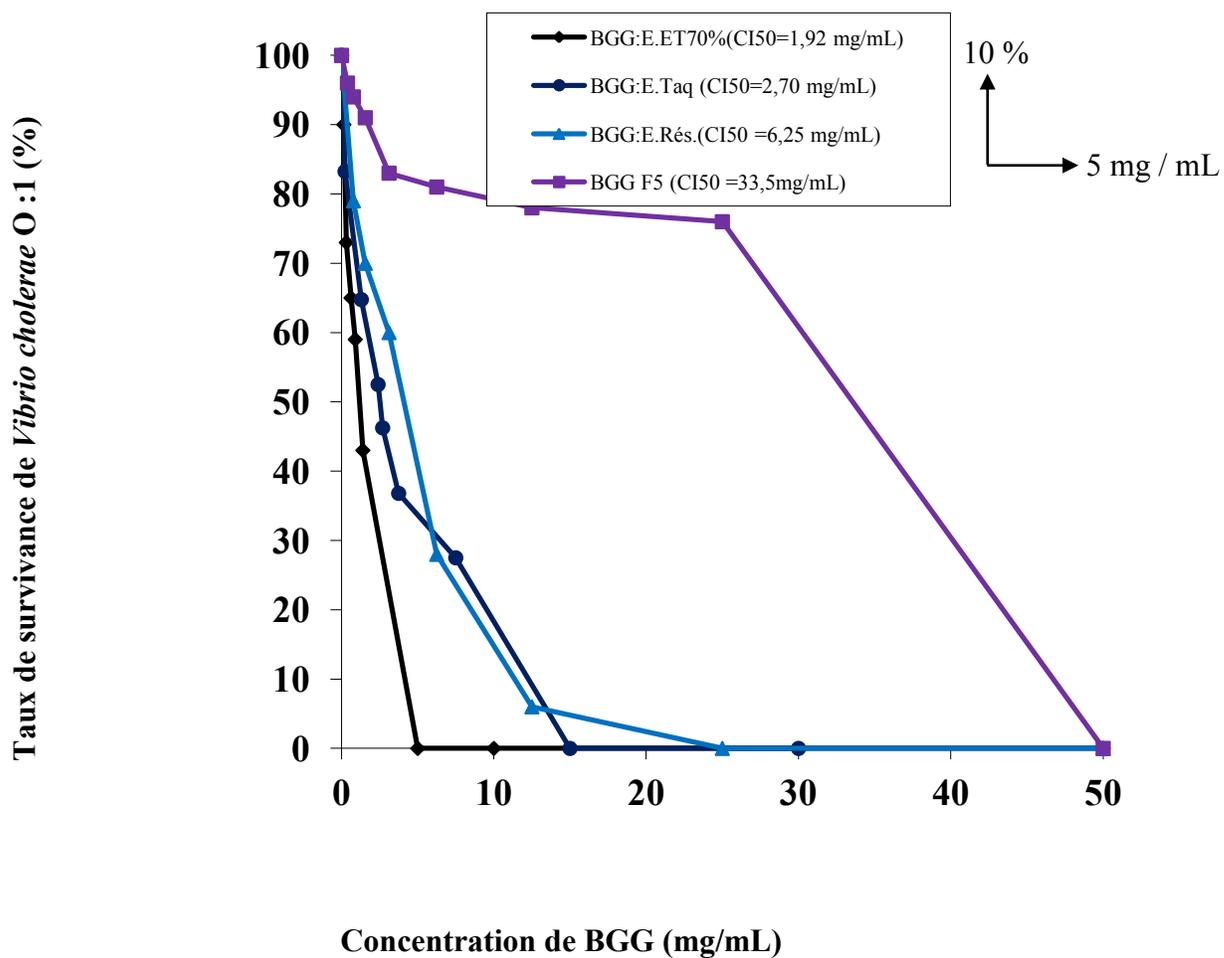


Figure 28 : Courbes d'activités comparées des différents extraits (E.Taq., E.ETH70%, E.Rés., BGGF₅) de *Morinda morindoides*.

TABLEAU X : Valeurs des paramètres antibactériens des différents extraits

Extraits de <i>Morinda morindoides</i>.	Paramètres antibactériens (mg / mL)		
	CI₅₀	CMI	CMB
Extrait Total Aqueux (E.Taq.)	2,7	15	15
Extrait Éthanolique 70 % (E.Eth70 %)	1,92	5	5
Extrait Résiduel (E.Rés.)	6,25	25	25
Extrait chromatographique aqueux (BGG F₅)	33,5	50	50

TABLEAU XI : Rapport d'efficacité des extraits sur la base des CMB et rapport CMB/CMI.

Extraits de <i>Morinda morindoides</i> .	Rapport $\frac{\text{CMB}_{\text{Extraits}}}{\text{CMB}_{\text{E.TH70 \%}}}$	Rapport $\frac{\text{CMB}}{\text{CMI}}$
Extrait Éthanolique 70 % (E.ETH70 %)	Nr	5 / 5 = 1
Extrait Total Aqueux (E.Taq.)	15 / 5 = 3	5 / 5 = 1
Extrait Résiduel (E.Rés.)	25 / 5 = 5	25 / 25 = 1
Extrait chromatographique aqueux (BGG F ₅)	50 / 5 = 10	50 / 50 = 1

Nr = Non rapporté, car l'E.ETH70 % sert de référence pour les comparaisons, compte tenu de la valeur de sa CMB, plus petite, synonyme d'une meilleure activité antibactérienne (ACKAH et al., 2008)

III.3. Comparaison de la sensibilité des souches de vibrions cholériques de source clinique et des souches de vibrions cholériques de source environnementale, à deux types d'extraits éthanoliques de *Morinda morindoides* : (E.ETH70 %, E.ETH70 %vég.).

III.3.1. Influence du solvant d'extraction (éthanol absolu- eau (70: 30 ; V/V), sur la croissance de *Vibrio cholerae* O : 1.

Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, l'éthanol absolu- eau (70: 30 ; V/V), à 5 µL / mL de gélose M.H, (soit 0,1 mL de solvant pour 20 mL de gélose M.H), n'exerce aucune inhibition sur la croissance des bactéries, comparativement aux boîtes de gélose sans éthanol absolu- eau (70: 30 ; V/V). En revanche, pour une concentration de solvant de 50 µL / mL de gélose M.H, (soit 1 mL de solvant pour 20 mL de gélose M.H), les bactéries croissent de façon irrégulière. Autrement dit, cette concentration de solvant influence la croissance des vibrions cholériques.

Les diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques testés, (dans le milieu gélosé, à 5 µL / mL de solvant, favorable à une croissance bactérienne), synonymes d'absence de croissance bactérienne, sont mesurés (en mm) à l'aide d'un pied à coulisse. Les diamètres des zones d'inhibition sont également mesurées dans le milieu sans éthanol absolu- eau (70: 30 ; V/V). Ces observations sont présentées dans le **Tableau XII**.

III.3.2. Sensibilités comparées des souches de vibrions cholériques aux extraits hydroalcooliques (l'E.ETH70 % et à l'E.ETH70 %vég.)

Les valeurs des paramètres antibactériens (CMI, CMB) des extraits hydroalcooliques de *M. morindoides* testées (l'E.ETH70 % et l'E.ETH70 %vég.), celles de la Ciprofloxacine et les valeurs des rapports **CMB/CMI** sont présentées dans le **Tableau XIII**.

III.4. Tri phytochimie des extraits.

L'analyse tri phytochimique, de type qualitatif des différents extraits : l'E.Taq., l'E.ETH70 %1 et l'E.ETH70 %vég., compte tenu de leur pouvoir antibactérien plus ou moins important, a permis de mettre en évidence les composés chimiques suivants : les alcaloïdes, les polyphénols, les tanins catéchiques, les tanins galliques, les flavonoïdes, les saponosides, les quinones et les stérols. Ces tests révèlent la présence plus ou moins importante de ces grands groupes chimiques dans les extraits testés (**Tableau XIV**).

L'analyse de ce tableau, révèle que d'une manière générale, lorsque nous passons de l'E.Taq. à l'E.ETH70 %vég., certaines entités chimiques se concentrent, tandis que d'autres se raréfient.

Tableau XII : Influence du solvant d'extraction sur la croissance de *Vibrio cholerae* O : 1, souche (2930), par la méthode des antibiogrammes.

Solvant	Mueller Hinton sans solvant	Éthanol absolu- eau (70 :30 ; V/V)	
Concentration (mL/20 mL de M.H)	0	0,1	1
Diamètre d'inhibition des antibiotiques (en mm)			
Ceftriaxone (30µg)	25(S)	25(S)	croissance irrégulière des bactéries
Ampicilline (10 µg)	18 (S)	18 (S)	
Tétracycline(30 µg)	17(R)	17(R)	
Kanamycine(30 µg)	15 (R)	15 (R)	
Ofloxacine (5 µg)	24 (S)	24 (S)	
Gentamycine(10µg)	17 (S)	17 (S)	

S : Sensible à l'antibiotique testé, par rapport à une échelle selon la méthode utilisée.

R : Résistant à l'antibiotique testé, par rapport à une échelle selon la méthode utilisée.

Tableau XIII : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'E.Eth70 % vég. et de l'E.Eth70 %1, de *Morinda morindoides* contre les souches cliniques et les souches environnementales de *Vibrio cholerae* O : 1.

<u>Extraits testés</u>	<u>Souches testées</u>	<u>Paramètres antibactériens</u> (mg / mL)			Rapport $\frac{\text{CMB}_{\text{Extraits}}}{\text{CMB}_{\text{E.TH70 \%2}}}$
		<u>CMI</u>	<u>CMB</u>	CMB/CMI	
E.ETH70%vég Ou E.ETH70%2	<u>Souches cliniques</u>				Nr
	VC O1 : 2930	3,75	7,5	2	
	VC O1 : 3481/ 31	3,75	7,5	2	
	<u>Souches environnementales</u>				Nr
VC O1 : 121/B1	1,875	3,75	2		
	VC O1 : 131/B2	1,875	3,75	2	
E.ETH70% 1 Ou E.TH70%	<u>Souches cliniques</u>				15/7,5 = 2
	VC O1 : 2930	7,5	15	2	
	VC O1 : 3481/ 31	7,5	15	2	
	<u>Souches environnementales</u>				7,5/3,75 = 2
VC O1 : 121/B1	3,75	7,5	2		
	VC O1 : 131/B2	3,75	7,5	2	
CIPRO	<u>Souches cliniques</u>				$7,5/0,1175 \cdot 10^{-3}$ = 63829
VC O : 1 : 2930	$0,058 \cdot 10^{-3}$	$0,1175 \cdot 10^{-3}$	2		
	VC O : 1: 3481/ 31	$0,058 \cdot 10^{-3}$	$0,1175 \cdot 10^{-3}$	2	

E.ETH70 % 1 ou E.ETH70 % : Extrait éthanolique 70 %, extrait à partir de l'extrait total aqueux ; **E.ETH70 % vég. ou E.ETH70% 2**: Extrait éthanolique 70 % végétal, extrait à partir de la poudre végétale de *M. morindoides*. Le solvant commun, est la solution éthanol absolu-eau (70 : 30 ; V/V). **V.C** (vibron cholérique) : *Vibrio cholerae* O : 1

Nr : Non rapporté car cet extrait (**E.ETH70 % vég.**) sert de référence, du fait de la plus petite valeur de la CMI, synonyme de meilleure activité antibactérienne (**ACKAH et al., 2008**).

Tableau XIV : Familles chimique des extraits (**E.Taq.**, **E.ETH70%**, **E.ETH70%vég**) de *Morinda morindoides*

Groupes chimiques recherchés	Extrait total aqueux (E.Taq)	Extrait éthanologique 70 % (E.ETH70 %)	Extrait éthanologique 70 %vég. (E.ETH70 %2)
Alcaloïdes	++	+++	+++
Polyphénols	++	++	++
Tanins catéchiques	++	+	+
Tanins galliques	+	+	+
Flavonoïdes	+++	+	+
Saponosides	+++	+++	+++
Quinones	+	+	+
Stérols	+	+	++

+ : Présence du groupe chimique recherché (moins abondant)

++ : Présence du groupe chimique recherché (abondant).

+++ : Présence du groupe chimique recherché (très abondant)

IV. DISCUSSION

Au cours de ces travaux, des extraits de *Morinda morindoides* ont été soumis à des essais bactériologiques sur la croissance *in vitro* de trois souches cliniques et de deux souches environnementales de *Vibrio cholerae* O : 1 (*V. cholerae*).

L'analyse des premiers résultats issus de l'activité antibactérienne de l'extrait total aqueux (**E.Taq.**), l'extrait éthanolique 70 % aqueux (**E.ETH70 %**), l'extrait chromatographique aqueux (**BGG F₅**) et l'extrait résiduel (**E.Rés.**), sur la croissance *in vitro* de la souche clinique de *Vibrio cholerae* O : 1 (**Souche 2932**), montre que cette souche clinique est sensible à ces quatre extraits testés de *M. morindoides* (**codifiée BGG**). Cela se traduit par une diminution progressive (concentration-dépendante) du taux de survivance des vibrions cholériques, traduite par l'allure décroissante des courbes de sensibilité de ces germes bactériens aux extraits testés, lorsque les concentrations de ceux-ci augmentent : cette sensibilité de *V.cholerae* O : 1 aux différents extraits testés, est attribuée à la relation dose-effet des extraits.

À partir de ces résultats, la comparaison de l'activité antibactérienne de ces quatre extraits laisse apparaître que l'E.ETH.70 % présente une meilleure activité anti vibrio cholérique, car il détient les plus petites valeurs de Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) ou de Concentration Minimale Bactéricide (CMB) et de Concentration pour 50 % d'inhibition (CI₅₀), par rapport aux autres extraits : (soit CMB = CMI = 5 mg / mL et CI₅₀ = 1,92 mg / mL) contre (CMB = CMI = 15 mg / mL et CI₅₀ = 2,7 mg/mL pour **l'E.Taq.** ; CMB = CMI = 25 mg / mL et CI₅₀ = 6,25 mg / mL pour **l'E.Rés.**, enfin CMB = CMI = 50 mg / mL et CI₅₀ = 33,50 mg / mL pour l'extrait chromatographique aqueux ou **BGG F₅**). Cette meilleure activité anti vibrio cholérique de **l'E.ETH.70 %** par rapport aux autres extraits est aussi soutenue par la pente de la courbe de sensibilité des vibrions cholériques à cet extrait, telle que l'ont aussi démontré **ACKAH et al. (2008)**. Cette pente est plus forte, comparée aux pentes des autres courbes de sensibilité de ces germes bactériens à **l'E.Taq.**, à **l'E.rés.** et à **BGG F₅** : celles-ci deviennent respectivement de moins en moins fortes, car elles s'éloignent de plus en plus de l'axe des ordonnées. D'autre part, les rapports d'efficacité de ces extraits sur la base des CMB, ($\text{CMB}_{\text{Extraits}} / \text{CMB}_{\text{E.ETH70 \%}}$), montrent que **l'E.ETH70 %** est trois fois plus actif que **l'E.T.aq**, cinq fois plus actif que **l'E.Rés.** et dix fois plus actif que **BGG F₅**.

Les rapports ($\text{CMB} / \text{CMI} = r$), attestant l'efficacité d'une drogue (rapport qui, lorsqu'il est strictement inférieur à quatre (4) équivaut à une bactéricidie, et lorsqu'il est supérieur ou égal à quatre (4), équivaut à une bactériostase, c'est-à-dire empêche la multiplication de la

bactérie), montre que les différents extraits ont une activité anti vibrio cholérique bactéricide, car $r = 1 < 4$, selon **MARMONNIER (1990)**.

Vu ces résultats, cette étude de l'activité antibactérienne de *M. morindoides* sur la croissance *in vitro* de *Vibrio cholerae* O : 1 suggère que cette plante a effectivement des propriétés anti vibrio cholériques bactéricides et crédibilise son usage traditionnel.

Au regard des résultats de travaux d'autres auteurs, sur cette même plante et sur des souches d'*Escherichia coli*, responsables de gastroentérites infantiles, nos résultats sont en harmonie avec les leurs, sur les pouvoirs antibactériens de cette plante (**MOROH et al., (2008)**). Mais nos résultats sont nettement meilleurs, car la plus petite valeur des CMBs rapportée par ces auteurs est de 7,5 mg / mL contre 5 mg / mL pour ce présent travail. Les résultats de ces travaux présentent également une meilleure activité inhibitrice des extraits testés par rapport aux résultats de travaux antérieurs de **SAURABH et al. (2009)**. En effet, ces Chercheurs ont évalué l'activité antibactérienne d'autres plantes sur la croissance *in vitro* de *Vibrio cholerae* O : 1. Ils ont rapporté des valeurs de CMB allant jusqu'à 24 mg/mL.

Le deuxième volet de nos travaux a consisté à mener une étude comparative *in vitro* de la sensibilité de deux souches cliniques et de deux souches environnementales de *V. cholerae* O : 1, à deux types d'extrait éthanolique 70 % : **l'E.ETH70 %1** ou **l'E.ETH70 %** et **l'E.ETH70 % 2** ou **E.ETH70 %vég**. Cette comparaison s'est étendue à une molécule anticholérique de référence : la ciprofloxacine, requise en zone d'émergence des vibriions cholériques résistants aux antibiotiques.

Aussi, le choix de souches de *Vibrio cholerae* O : 1 de sources différentes (source hospitalière et de source environnementale) n'est-il pas fortuit. Car, faut-il rappeler que lors des flambées épidémiques de choléra, **DALSGAARD et al. (2001)** ont montré à travers des études de caractérisations moléculaire et phénotypique que les souches de *Vibrio cholerae* O : 1, agents pathogènes du choléra peuvent avoir une source environnementale. Les études de caractérisations génotypique et phénotypique réalisées par **AIDARA et al. (1998)**, ont également montré qu'il n'y a pas de différence entre les souches environnementales de *Vibrio cholerae* O : 1 isolées à partir de l'eau et celles isolées à partir de selles de malades du choléra. Et notre souci, est d'être à mesure d'inhiber les souches de *V. cholerae* O : 1 de différentes origines.

Enfin, la recherche de la toxicité de la solution éthanol absolu-eau (70 : 30 ; V/V), solvant d'extraction, réside dans le fait que, si l'E.ETH70 %vég et l'E.ETH70 % doivent être soumis aux essais biologiques, les traces de solvant sur ces extraits testés (si elles existaient), ne

devraient pas empêcher le procédé biologique. Une attention particulière devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissouts pendant que le solvant réagit avec certains composés pour produire des complexes, ou pour causer la décomposition, la déshydratation ou l'isomérisation de ces composés, comme l'a décrit **MOHAMMEDI (2005)**. En somme, une éventuelle activité antibactérienne ne doit être imputée qu'aux extraits testés et non à la solution hydroalcoolique. En d'autres termes, cette dernière ne doit pas être toxique pour les bactéries étudiées. Elle ne doit donc pas influencer la croissance bactérienne.

Ainsi, l'analyse des résultats de nos travaux révèlent que les souches cliniques et les souches environnementales de *Vibrio cholerae* O : 1 (VC O1) sont toutes sensibles à l'E.ETH70 % et à l'E.ETH70 % vég. de *Morinda morindoides*. Toutefois, l'observation des paramètres antibactériens montre que les valeurs des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) varient de 1,875 à 3,75 mg/mL tandis que celles des Concentrations Minimales Bactéricides (CMBs) varient de 3,75 à 7,5 mg/mL pour l'E.ETH70 %vég. Il en est de même pour l'E.ETH70 % dont les CMI et CMBs prises dans ce même ordre varient respectivement de 3,75 à 7,5 mg/mL et de 7,5 à 15 mg/mL. Il en ressort que ces valeurs sont de l'ordre du **mg/mL**.

Quant à la molécule pure (Ciprofloxacine), les valeurs de la CMI et de la CMB sont de l'ordre du **µg/mL** : soit (CMI = 0,058 µg / mL et CMB = 0,1175 µg / mL).

On déduit que les valeurs des CMI ou CMBs des extraits hydroalcooliques sont donc au moins **10³** fois supérieures à celles de la molécule de Ciprofloxacine.

Cette différence serait due au fait que l'E.ETH70 %vég. et l'E.ETH70 %, se trouvent dans leur forme impure et contiendraient des substances ne possédant aucune activité antibactérienne et qui pourraient interagir avec l'activité antibactérienne (**GEORGE et al., 2002**).

Toutefois, l'E.ETH70 %vég est deux fois plus actif que l'E.ETH70 % ; la Ciprofloxacine est **63829** fois plus active que l'E.ETH70 %vég car celle-ci est une molécule pure (par référence au rapport d'efficacité sur la base des CMBs ; $\text{CMB}_{\text{Composé}} / (\text{CMB}_{\text{E.ETH70\%vég}})$).

La valeur de la CMI de 0,058 µg / mL de la Ciprofloxacine corrobore celle trouvée par **KOFFI et al. (2009)**. Ceux-ci ont rapporté après avoir testé cette même molécule sur trois souches hospitalières de *Vibrio cholerae* O : 1, des valeurs de la CMI variant de à 0,5 à 1 µg / mL.

Parmi les souches bactériennes de *V.C O1* testées, les souches environnementales sont plus sensibles à ces extraits que les souches cliniques. Elles ont requis 3,75 mg / mL pour leur inhibition, tandis qu'il faut deux fois plus de cette valeur (soit 7,5 mg/mL), pour inhiber la croissance des souches cliniques de *V.C O1* par l'E.ET 70 %vég.. Cette parité est également respectée pour l'E.ETH70 % ; soit 7,5 mg/mL et 15 mg/mL.

En effet, ces souches hospitalières pourraient avoir déjà été en contact avec les antibiotiques usuels car selon **NDOUR et al. (2006)**, la sélection des vibrions cholériques résistants fait suite à une utilisation extensive des antibiotiques usuels. En revanche, les souches isolées de poissons de la Lagune ÉBRIÉ d'Abidjan, quand bien même que cette lagune souffrirait de pollutions de tout genre (**KOUASSI et al., 1995 ; KOUADIO, 2000**), n'auraient probablement jamais été en contact avec des agents antimicrobiens.

Ces deux types d'extraits hydroalcooliques ont également une activité antibactérienne bactéricide sur la croissance *in vitro* de *Vibrio cholerae* O : 1 (**MARMONNIER, 1990**).

Ces résultats constituent une preuve, étayant l'intérêt des populations du centre ouest de la Côte d'Ivoire, pour cette plante, pour son utilisation traditionnelle.

Au regard d'autres travaux entrepris dans le domaine des plantes médicinales par d'autres Chercheurs, (dans la recherche des phytomolécules à activités anti vibrio cholériques), les résultats de ce présent travail sont nettement améliorés car ces Auteurs ont rapporté de leurs travaux des valeurs de la CMI et de la CMB comprises respectivement entre 0,125 à 32 mg / mL et 0,25 à 32 mg / mL (**SAURABH et al., 2009**). Quant à ce présent travail, il rapporte les valeurs maximales de ces mêmes paramètres (CMI et CMB), respectivement de 3,75 mg/mL et 7,5 mg/mL.

L'explication de l'activité anticholérique de ces différents extraits réside en l'existence de diverses familles de composés chimiques, que nous avons mis en évidence à partir du tri phytochimie.

En effet, ces tests (qualitatifs) ont permis de montrer que l'E.Taq. contient tous les groupes chimiques recherchés : cet extrait est très riche en saponosides et en flavonoïdes, riche en alcaloïdes, en polyphénols et en tanins catéchiques et peu riche en tanins galliques, en quinones et en stérols ou terpènes. Les deux types d'extraits hydroalcooliques (**E.ETH70 %**, **E.ETH70 %vég**), sont très riches en alcaloïdes et en saponosides, riches en polyphénols et peu riches en tanins galliques et catéchiques, en flavonoïdes, en quinones. L'**E.ETH70 %** est peu riche en stérols ou terpènes, tandis que l'**E.ETH70 %vég** est riche en stérols.

D'une façon générale, lorsque nous passons de l'extrait total aqueux à l'extrait éthanolique 70 %vég, nous remarquons que certaines entités chimiques se concentrent, tandis que certaines se raréfient. Ainsi par exemple, les alcaloïdes qui étaient riches dans l'E.Taq., deviennent très riches dans les extraits hydroalcooliques ; les stérols ou terpènes qui étaient moins riches dans les extraits aqueux (E.T.aq) et éthanoliques 70 % deviennent riches dans l'E.ETH70 %vég.

Les composés chimiques, supports des activités antibactériennes des plantes médicinales dans leur généralité sont communément les flavonoïdes (**KOUAKOU et al., 2006 ; N'GUESSAN et al., 2007 ; RAMZI et al., 2010**). L'activité antimicrobienne et donc anti-infectieuse des flavonoïdes a été prouvée par de nombreuses études. Cette activité est due principalement à la capacité de ces molécules d'inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes (**ULANOWSKA et al. 2006**). Des travaux, dont ceux de **SAURABH et al. (2009)** et **BATISTA et al. (1994)**, ont respectivement aussi montré que, des plantes ayant des activités anticholériques contiennent des flavonoïdes, les polyphénols et des terpènes.

Selon **HARBORNE et WILLIAMS (2000)**, l'une des fonctions fondamentales des flavonoïdes est leur rôle de protection contre les invasions microbiennes. À cause de ce rôle protecteur, il n'est pas surprenant que les plantes riches en flavonoïdes, comme décrites par **CUSHINIE et LAMB (2005)**, soient utilisées depuis de longues dates, dans la médecine traditionnelle pour soigner les maladies infectieuses. Ces mêmes groupes de composés, selon **ERASTO et al. (2004)** possèdent également des propriétés antibactériennes, ceux-ci ayant travaillé isolement sur des flavonoïdes purs. Les résultats de ces travaux antérieurs corroborent ceux de ce présent travail, et confirmés par les travaux de **TONA et al. (1998)** et ceux de **CIMANGA et al. (2006a)**. **CIMANGA et al. (2006a)**, ont même isolé des flavonoïdes de cette même espèce végétale : la lutéoline et ses glycosides, dont les activités antibactériennes ont été déjà prouvées à partir des travaux de **BASILE et al. (1999) ; ZHU, ZHANG et LO (2004)**, ceux-ci ayant travaillé sur des flavonoïdes purifiés et isolés.

D'autres travaux antérieurs sur les plantes médicinales anti diarrhéiques, ont montré que les supports chimiques de l'activité antibactérienne de ces plantes, résident en l'existence dans les extraits testés, de terpènes (**KOUAME. et al., 2008**). Certains de ces composés ont même été isolés de *Morinda morindoides*, qui est une plante médicinale anti diarrhéique, par **KOUAME et al. (2010)**. Cela est en phase sur le pouvoir anti vibrio cholérique de ces extraits testés, mais aussi avec les résultats des travaux de **SAURABH et al. (2009)** et

BATISTA et al. (1994), qui ont montré que les plantes contenant des terpènes ont une activité anti vibrio cholérique.

Il conviendrait ainsi de retenir, à partir de toutes ces informations issues de travaux antérieurs, et du présent tri phytochimie réalisé, qu'on pourrait expliquer l'activité antibactérienne anticholérique des extraits testés, par l'existence de ces grands groupes chimiques mis en évidence.

D'autre part, **KAROU et al. (2006)** et **LONGANGA et al. (2006)**, ont montré à partir d'alcaloïdes purifiés, que ces composés chimiques sont doués d'activité antibactérienne. Les résultats de ces travaux antérieurs soutiennent la meilleure activité anti vibriocholérique de l'E.ETH70 %vég et l'E.ETH70 % car ces extraits sont plus riches en alcaloïdes que l'E.Taq..

L'activité anti vibriocholérique de ces extraits, est donc en conformité avec les résultats de travaux de **PAULO et al. (1994)**, qui ont rapporté que la Cryptolepine, principal alcaloïde de *Cryptolepis sanguinolenta*, a une activité anti vibrio cholérique. Ces groupes chimiques qui existent dans les extraits testés pourraient éventuellement expliquer l'activité anti vibrio cholérique des autres extraits. Les résultats de ce présent travail sont aussi en phase avec ceux de **N'GUESSAN et al. (2006, 2009)** : ceux-ci ont montré que les activités anticholériques de *Boerhvia diffusa* et *Petersianthus macrocarpus*, plantes utilisées dans la pharmacopée ivoirienne, se justifient par leur abondance en polyterpènes, en stérols et en alcaloïdes. Le pouvoir anti vibrio cholérique plus important de l'E.ETH70 % vég., est aussi renforcé par les résultats des travaux de **KOUAME et al. (2010)** : ceux-ci ont isolé de cette espèce végétale, les composés terpéniques. Ces grands groupes chimiques, isolés à partir d'autres plantes médicinales ont également des propriétés antibactériennes (**ERASTO et al., 2006** ; **VILJOEN et al., 2003** ; **BASSOLE et al., 2003**). Ils pourraient également contribuer, par leur présence, à l'explication de l'activité anticholérique de tous les extraits testés et particulièrement, de la meilleure activité anti vibrio cholérique de l'E.ETH70 %vég.

Il faut également retenir que les pouvoirs antibactériens des extraits testés (E.Taq., E.ETH70 %, E.ETH70 %vég), qui pourraient aussi être attribués aux saponosides présents en abondance dans ces extraits, sont en accord avec les travaux de **LOUBAKI et al. (1999)**. Ces auteurs ont montré les propriétés antibactériennes de ces groupes chimiques sur les germes bactériens isolés de produits pathologiques. Mais aussi, à coté de ces grands groupes chimiques, nous avons les tanins catéchiques qui ont une capacité d'inhiber la croissance *in vitro* de *Vibrio cholerae* O : 1, mais aussi la capacité d'inactiver la toxine du choléra, qui est le véritable pouvoir pathogène de *Vibrio cholerae* O : 1 (**BORRIS, 1996**). Toutes ces

observations suggèrent que leur présence pourrait contribuer sous deux aspects, à l'inhibition des vibrions cholériques : l'un, étant l'activité antibactérienne et l'autre l'inactivation de la toxine.

Du point de vue biochimique, nous pourrions également admettre que les molécules que contiendraient les extraits testés, pourraient se fixer sur les sites d'action de la molécule de la toxine cholérique. Ces sites sont des gangliosides GM₁ situés sur la bordure en brosse des cellules de l'intestin grêle. La saturation de ces sites de fixation de la toxine par les phyto molécules contenues dans les extraits, empêcherait la toxine d'y accéder, et de ce fait, pourrait empêcher l'inhibition de l'absorption active des ions Na⁺ et Cl⁻, inhibition qui favorise une excrétion ionique active et une fuite hydrique.

À l'issue de ces discussions, l'on pourrait retenir que l'originalité de ce travail réside dans le fait qu'il n'y a pas de travaux similaires portés sur l'activité anti vibrio cholérique d'alcaloïdes, de terpènes et ou de stéroïdes de cette espèce végétale. Et la meilleure activité anti cholérique reposerait sur l'existence de composés alcaloïdiques, terpéniques et / ou stéroïdiques en forte concentration dans l'E.ETH70 %vég. Ces entités chimiques pourraient constituer le support des propriétés anti vibrio cholériques de cet extrait.

Par ailleurs, la solution éthanol absolu-eau (70 : 30 ; V/V) qui a été le solvant d'extraction, de l'extrait possédant la meilleure activité anti vibrio cholérique, constitue un des solvants propices pour la concentration de certains composés ayant des propriétés anticholériques, car il n'est pas toxique pour les vibrions cholériques. Cela est en phase avec les résultats des travaux de **MOHAMMEDI (2005)** et ceux de **KABORE et al. (1998)**. Ceux-ci ont en effet aussi rapporté que la solution hydro alcoolique dans les mêmes proportions n'est pas toxique pour la croissance des microorganismes testés. C'est donc l'activité biologique de l'extrait qui est en vigueur et non l'interaction de l'éthanol absolu-eau (70 : 30 ; V/V) - microorganismes.

V. CONCLUSION

Le choléra constitue de nos jours, un réel problème de santé publique et demeure une maladie généralement endémo-épidémique dans les pays en développement. Cette maladie est toujours meurtrière, malgré l'antibiothérapie qui accompagne le traitement lors des épidémies.

Cette étude, axée sur les propriétés antibactériennes de *Morinda morindoides*, particulièrement contre *Vibrio cholerae* O : 1, agent pathogène du choléra, s'inscrit dans un programme de recherche de nouvelles molécules anticholériques contenues dans les plantes anitidiarrhéiques.

Singulièrement, cette présente étude de recherche de principes actifs à propriétés anticholériques, revêt plusieurs objectifs dont les plus fondamentaux sont, entre autres :

- Identification de la nature chimique des principes actifs contenus dans les extraits testés, dans le but de rechercher plus tard, de nouvelles molécules bon marché, disponibles, sans effets secondaires et capables de palier les problèmes de résistances bactériennes observées lors des épidémies de choléra.
- La valorisation des plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne.

Au terme des différentes investigations, il ressort que les cinq extraits de *Morinda morindoides* (l'extrait total aqueux (E.Taq.), l'extrait éthanolique 70 % aqueux (E.ETH70 %), l'extrait éthanolique 70 % vég. (E.ETH70 % vég.), l'extrait chromatographique aqueux (BGGF₅) et l'extrait résiduel (E.Rés.), sont actifs à des degrés divers sur la croissance *in vitro* des souches de *Vibrio cholerae* O : 1 testés. L'E.ETH70 % vég., qui présente la meilleure activité anti vibrio cholérique, pourrait mieux concentrer les principes actifs. Les alcaloïdes, les stéroïdes et/ou terpènes pourraient être responsables de la meilleure activité antibactérienne bactéricide de cet extrait. Les résultats des présents travaux constituent ainsi, une assise scientifique qui vient d'être établie à l'usage traditionnel de cette plante de la pharmacopée ivoirienne. En plus, ils viennent confirmer l'effectivité de l'existence d'agents thérapeutiques, particulièrement, les agents anticholériques. Toutefois, l'on pourrait affirmer à ce stade des investigations, que nos objectifs sont atteints dans la mesure où l'on a réussi à inhiber la croissance *in vitro* des agents étiologiques des diarrhées cholériques (*Vibrio cholerae* O : 1), qu'ils soient d'origine clinique ou environnementale, et à identifier les grandes familles de composés chimiques, responsables des propriétés anticholériques des extraits testés.

Par ailleurs, dans cette lutte contre ce fléau redoutable qu'est le choléra, l'E.ETH70 % vég. de *Morindoides morindoides* s'annonce comme une lueur d'espoirs pour le traitement de cette maladie, s'il est amélioré.

VI. PERSPECTIVES.

En perspectives, une extension du spectre d'action des extraits (avec variation de solvants d'extraction), aux souches multi-résistantes de *Vibrio cholerae* O : 1, porteuses de plasmides ou productrices de bêta- lactamase, mériterait d'être effectuée et ceci, en vue de sélectionner la fraction la plus active.

Par ailleurs, cette sélection de la fraction active nécessiterait l'isolement de chaque grande famille moléculaire soutenu par des fractionnements bioguidés. Des études plus poussées, notamment grâce aux techniques de chromatographie en phase gazeuse, couplées à la résonance magnétique nucléaire, permettront à l'avenir de séparer et d'isoler les molécules ayant des activités anticholériques à travers des tests *in vitro*.

Pour terminer, les tests *in vivo* pourraient compléter ces travaux dans le but d'étudier l'efficacité de ces molécules et leurs propriétés pharmacocinétiques à partir de modèles animaux.

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACKAH J. A. A. B., KRA A. K. M., ZIRIHI G. N., GUÉDÉ-GUINA F., 2008.** Evaluation et essais d'optimisations de l'activité anticandidosique de *Terminalia catappa* LINN (TEKAM3), un extrait de Combretaceae de la Pharmacopée ivoirienne. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 77 : 120-36.
- ADEOTI M. F., DJYH G. B., DJAMAN A. J., GUEDE-GUINA F., SESS E. D., 2010.** Méthode d'extraction et de purification de la mansonine d'écorses de *Mansonia altissima*. *Journal des Sciences pharmaceutiques et biologiques*. 11(2) : 6-12
- AGASSOUNON D. T. M., DE SOUZA C., ANANI K. T., KOUMAGLO K., TOUKOUROU F., GBEASSOR M., 2001.** Evaluation des activités cytotoxique, antivirale, antibactérienne et antifongique de six plantes médicinales. *Pharmacopée et Médecines Traditionnelles Africaines*. 11 : 93-105.
- AIDARA A., KOBLAVI S., BOYE C. S., RAPHENON G., GASAMA A., GRIMONT F., GRIMONT P. A. D., 1998.** Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolates from a recent cholera outbreak in Senegal: Comparison with isolates from Guinea-Bissau. *The American Journal of tropical medicine and hygiene*. 58(2): 163-167.
- AKE-ASSI., 2000.** Flore du Parc National de Tai (Côte d'Ivoire). Manuel de reconnaissance des principales plantes. éd. Kasperek Verlag, 319 P.
- ALAM N. H., YUNUS M., FARUQUE A. S. G., GYR N., SATTAR S., PARVIN S. et al., 2006.** Symptomatic hyponatremia during treatment of dehydrating diarrheal diseases with reduced osmolarity Oral Rehydration Solution. *Journal of American Medical Association*. 296: 567- 73.
- ALBERT M. J., ANSARUZZAMAN M., BARDAN P. K., FARUQUE A. S., FARUQUE S. M. et al., 1993.** Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *Lancet*. 342 : 387- 390.
- ALIBERT G., RANJEVA R., et BOUDET M.A., 1977.** Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phenoliques. *Physiologie Vegetale*.15 : 279-301.
- AMJAD H. M., 2005.** Neem seed oil: Bangladesh. Examples of the development of pharmaceutical products from medicinal plants. *Bangladesh Council of scientific and industrial Research* 10: 59-63.

- ANONYME, 1998.** Diagnostic épidémiologie répartition géographique-taxonomie-Symptomatologie ; Paris. Éditions scientifiques et médicales Elsevier 1998 : 1126- 1130.
- ARUOMA O. I., SPENSER J. P. E., BUTTER J., et HALLIWELL B., 1995.** Commentary reaction of plant-derived and synthetic antioxidants with trichloromethyl peroxy radicals. *Free Radical Research*. 22: 187-190.
- AVERY M. E., SNYDER J. D., 1990.** Oral therapy for acute diarrhea. The underused simple solution. *New England Journal of Medicine*; 323: 891-894.
- AYEBE E. K., YAPI H. F., EDJEME A. A., MEITE S., M'BOH M. G., YAPO A. F., MONNET D., DJAMAN A. J., NGUESSAN J. D., 2012.** *In vivo, in vitro* Antioxidant Activity Assessment & Acute Toxicity of Aqueous Extract of *Cola Nitida* (Sterculiaceae). *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*. 4 (2): 144-155
- BAGRÉ I., BAH I C., GNAHOÛÉ G., DJAMAN A. J., GUÉDÉ G. F., 2007.** Composition phytochimique et Evaluation *in vitro* de l'activité antifongique des extraits des feuilles de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh (Rubiaceae) sur *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*. *Journal des Sciences Pharmacologiques et Biologiques* 8 : 15-23.
- BAGRE I., BAH I C., MEITE S., DJAMAN A. J., GUEDE G. F., 2006.** Evaluation et Amélioration *in vitro* de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh (Rubiaceae) sur *Cryptococcus neoformans*, un champignon responsable de mycose humaine. *Journal des Sciences Pharmacologiques et Biologiques* 7 : 37-46.
- BAHI C., 1998.** Mécanismes biochimiques d'une action cholinolytique de BGG, une substance anti diarrhéique de source naturelle. Thèse de 3è cycle. FAST. Université de Cocody-Abidjan, 103 P.
- BAHI C., DJAMAN A. J., NGUESSAN J. D., TREBISSOU J. N. D. et GUEDE G. F., 2003.** Effet de la fraction chromatographique d'un extrait aqueux de *Morinda morindoides* (Bark.) Milne-Redh (Rubiaceae) et *Mareya micranta* (Benth.) Müll. Arg (Euphorbiaceae) sur l'activité de l'acétylcholinestérase de lapin. *Journal des Sciences Pharmaceutiques et biologiques*. 4 : 36-43.
- BAHORUN T., GRESSIER B., TROTIN F., BRUNET C., DINE T., LUYCKX M., VASSEUR J., CAZIN M., CAZIN J. C., and PINKAS M., 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung/Drug Research* 46 II (11): 1086 - 1089.
- BASILE A., GIORDANO S., LOPEZ-S J. A., COBIANCHI B. C., 1999.** Antibacterial activity of pure flavonoïds isolated from mosses. *Phytochemistry*, 2 (8): 1419-82.

- BASSOLE I. N. H., OUATTARA A. S., NEBIE R., OUATTARA C. A. T., KABORE Z. I., TRAORE A. S., 2003.** Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry* 62: 209-212.
- BATISTA O., DUARTE A., NASCIMENTO J., SIMOES M. F., DE LA TORRE M. C., RODRIGUEZ B., 1994.** Structure and antimicrobial activity of diterpenes from the roots of *Plectranthus hereroensis*. *Journal of Natural Products*. 57: 858-861
- BAUER A.W., KIRBY W.M., SHERRIS J.C., JURCK M., 1966.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American journal of pathology* 45: 493-496.
- BELGHAZI L., LAHLOU N., ALAOU I. M., ABOUSAOUIRIA T., HABTI N., TANTAOU I. A., TALBI M., BLAGHEN M. et FELLAT-Z. K., 2002.** Extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de la Menthe pouliot. Test antifongique. Congrès de Biochimie. Casablanca. *Biochimie et santé*. 38-40.
- BERTHOD A., BILLARDELLO B., et GEOFFROY S., 1999.** Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation 1. Analysis. *EDP Sciences, Wiley – VCH*. 27: 750-757.
- BERECHE P., 1998.** La réémergence du choléra. *Médecine thérapeutique*. 4 (3) : 213-22.
- BETA T., NAM S., DEXTER J. E. et SAPIRSTEIN H. D., 2005.** Phenolic content and Antioxidant. Activity of Pearled Wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal chemistry*. 82 (4): 390-393.
- BHATTACHARYA M. K., BHATTACHARYA S. K., GARG S., SAHA P. K., DUTTA D., NAIR G. B., DEB B. C., DAS K. P., 1993.** Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in India and Bangladesh. *Lancet*. 341: 1346–1347.
- BIDET D., GRAIGNAULT J.C., GIRARD P., et TROTIN F., 1987.** Inflammation, Allergie, douleur et acide arachidonique : du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique : Les flavonoïdes. *L'actualité chimique*. 89-97.
- BIDIE A. DIT PH., N'GUESSAN B. B., YAPO A .F., N'GUESSAN J. D. et DJAMAN A. J., 2011.** Activités anti oxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*. 8 (1) : 1 - 11
- BIEGO G. H. M., KONAN A. G., DOUATI T. E. et KOUADIO L. P., 2012 .** Physicochemical Quality of Kernels from *Terminalia catappa* L. and Sensory Evaluation of the Concocted Kernels. *Sustainable Agriculture Research*. 1(2): 1-6

- BIK E. M., GOUW R. D. et MOOI F. R., 1996.** DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: a tool to identify epidemic strains. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1453 – 1461.
- BILOSO M. A., 2008.** Valorisation des produits forestiers non ligneux, des Plateaux de Batéké, en périphérie de Kinshasa (RDC). Faculté des Sciences, École inter facultaire de Bio ingénieurs. Université Libre de Bruxelles, Université d'Europe ; Thèse de Docteur en Sciences Agronomiques et Ingénieries Biologiques. 252 P.
- BLAKE P. A., WEAVER R. E., HOLLIS D. G., 1980.** Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Annual Review of Microbiology*, 34:341-367.
- BONGA G. M., VANGAH-M. M., DE SOUZA C. et GUEDE-GUINA. F., 1995.** Mise en évidence des phytostéroïdes antifongiques contre *Cryptococcus neoformans*. *Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines*. 9: 21-30.
- BORRIS R. P., 1996.** Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology*. 51: 29-38.
- BOUQUET A., 1972.** Plantes médicinales du Congo- Brazzaville. Travaux et documents de l'ORSTOM, Paris. France, 112 p.
- BROWMAN W.C. et RAND M.J., 1980.** Textbook of Pharmacology. Blackwell Scientific Publication, Second Edition. 5 : 1928 p.
- BROWNLEE H. E., HEDGER J. et SCOTT I. M., 1992.** Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipallis perniciosa*. *Physiology and Molecular and Plant Pathology*. 40 : 227-232.
- BRUNETON J., 1993.** Pharmacognosie et Phytochimie. *Plantes médicinales*. Paris, France : Lavoisier. 278-279.
- BRUNETON J., 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales (3è éd). Paris : France : Editions médicales Internationales. Editions Tee et Lavoisier. 1120 p
- CAILLARD J., 2003.** Les plantes, des usines chimiques en miniature. Dossier de ressources documentaires. CRDP Midi-Pyrénées. 6 P.
- CASH R. A., MUSIC S. I., LIBONATI J. P. et al., 1974a.** Response of man to infection with *Vibrio cholerae*. I. Clinical, serologic and bacteriologic response to a known inoculum. *Journal of Infectious Diseases*. 129, 45-51.
- CASH R. A., MUSIC S. I., LIBONATI J. P. et al., 1974b.** Response of man to infection with *Vibrio cholerae*. II. Protection from illness afforded by previous disease and vaccine. *Journal of Infectious Diseases*. 130: 325-33.

- CHEN C.W. et HO C.T., 1995.** Antioxidant properties of polyphenols extracted from green tea and black tea. *Journal of Lipids*. 2: 35-46.
- CHEN C. N., WENG M. S., WU C. L. et LIN J. K., 2004.** Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 1(2): 175-185.
- CIMANGA K., DE BRUYNE T., HU J. P., COS P., APERS S., PIETERS L., TONA L., KAMBU K., VANDEN B. D., VLIETINCK A. J., 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., DE BRUYNE T., VAN P. B., MA Y., CLAEYS M., PIETERS L., BAKANA P., KAMBU K., TONA L., VANDEN B. D., VLIETINCK A. J., 1997.** Complement modulating properties of a kaempferol 7-O- rhamnosyl-sophoroside from the leaves of *Morinda morindoides*. *Planta Medica*, 63: 220-223.
- CIMANGA K., HERMANS N., APERS S., VAN M. S., VANDEN H. H., CLAEYS M., PIETERS L., VLIETINCK A. J., 2003.** Complement-inhibiting iridoids from *Morinda morindoides*. *Journal of Natural Products* 66: 97-102;
- CIMANGA K., KAMBU K., TONA L., HERMANS N., APERS S., TOTTE J., PIETERS L., VLIETINCK, A. J., 2006b.** Antiamoebic activity of Iridoids from *Morinda morindoides* leaves. *Planta Medica*. 7(8): 751-3.
- CIMANGA R. K., KAMBU K., TONA L., HERMANS, N., APERS S., TOTTE J., PIETERS L., VLIETINCK A. J., 2006a.** Cytotoxicity and *in vitro* susceptibility of *entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 83-90.
- COWAN M. M., 1999.** Plant products as antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4): 564-582.
- CUSHINIE T.P., et LAMB A. J., 2005.** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26: 243-56.
- DALSGAARD A., FORSLUND A., SANDVANG D., ARNTZEN L., KEDDY K., 2001.** *Vibrio cholerae* O: 1 outbreak isolates in Mozambique and South Africa in 1998 are multiple-drug resistant, contain the SXT element and the aad A2 gene located on class I integrons. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48(6): 827-838.

- DANIELS N. A., MACKINNON L., BISHOP R., ALTEKRUSE S., RAY B., HAMMOND R. M., THOMPSON S., WILSON S., BEAN N. H., GRIFFIN P. M., SLUTSKER L., 2000.** *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *Journal of Infectious Diseases.*, 181 (5):1661-1666.
- DAS H. C, WANG J. H et LIEN E. J., 1994.** Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids: A structure-system-activity relationship. (SSAR) analysis. P.133-136. *In: Jucker E. ed. Progress in Drug Research Basel: Birkhauser Verlag (Germany)*
- DASTIDAR S. G., MANNA A., KUMAR K. A., MAZUMDAR K., DUTTA N. K., CHAKRABATARY A. N., MOTOHASHI N. et SHIRATAKI Y., 2004.** Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 23 : 99-102.
- DE OLIVEIRA M. M., SAMPAIO M. R. P., SIMON F., GILBERT B. et MORS W. B., 1972.** Antitumor activity of condensed flavenols. *An. Aca. Brasil.* 44: 41-44.
- DE PAIVA S. R., FIGUEIREDO M. R., ARAGAO T. V., KAPLAN M. A., 2003.** Antibacterial activity *in vitro* of Plumbagin isolated from Plumbago species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 : 959-61.
- DE S. N. et CHATTERJEE D.N., 1953.** An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *Journal of Pathology and Bacteriology.* 66 : 553-562.
- DE SOUZA S. M., FRANCO D. M., et SMANIA A. J. R. 2005.** *Z. Naturforsch.C Biosciences.* 60, 693-700
- DELAVEAU P., 1987.** Les Epices. Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments. Albin Michel Editeur. 372 P.
- DIDRY N., PINKAS M. et TORCK M., 1982.** Sur la composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de *Grindelia Pl.* *Medecine and Phytotherapy* XVI : 7-15.
- DJAMAN A. J., DJE K. M., et GUEDE-GUINA. F., 1997.** Evaluation d'une action antiplasmodiale de *Olox subscorpioides* sur les souches choloquinorésistantes de *Plasmodium falsiparum*. *Rev. Med. Ethn. Pharm. Afric.* (11-12) : 177-183
- DODIN A., 1987.** Actualités du choléra d'importation en France. *Médecine et Hygiène* 45 : 670-674.
- DUBOIS G. E., GROSBY G. A et SAFFRON P., 1977.** Non nutritive Sweeteners: Taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones. *Science.* 195: 397-399.

- DUH P. D., TU Y. Y. et YEN G. C., 1999.** Antioxydant activity of water extract of harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensmittel-Wissenschaft and Technology* 32: 269-277.
- DUHAMEL J. F., LAURANS M., HAMEL A., RIBAUT V., BROUARD J., 2001.** Les traitements médicaux des diarrhées aiguës. *Revue Internationale de Pédiatrie*. 309: 17- 22
- DURAI PANDIYAN, V., AYYANAR, M., IGNACIMUTHU, S., 2006.** Antimicrobial Activity of some Ethnomedical Plants Used by Paliyar Tribe from Tamil Nadu, India. *BMC complementary and alternative medicine*. pp 635.
- DWECK A. C, 2002.** Herbal medicine for the skin. Their chemistry and effects on skin and mucous membranes. *Personal Care Magazine*. 3 (2) : 19-21.
- ERASTO P., BOJASE-M. G., MAJINDA R. R. T., 2004.** Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the roots wood of *Bolusanthus spesiosus*. *Phytochemistry* 65: 875-880.
- ERASTO P., GRIERSON D. S., AFOLAYAN A. J., 2006.** Bioactive sesquiterpene lactones from leaves of *Vernonia amygdalina*. *Journal of Ethnopharmacology* 106: 117-120.
- ESSAWI T., SROUR M., 2000.** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* .70: 343-9.
- FALBO V., CARATTOLI A., TOSINI F., PEZZELA C., DIONISI A. M., LUZZI I., 1999.** Antibiotic resistance conferred by a conjugative plasmid and a class I integron in *Vibrio cholerae* O:1 EL TOR strains isolated in Albania and Italy: *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 43(3): 693-696.
- FARNSWORTH N. R., SOEJARTO D. D., 1985.** Potential consequence of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. *Economic Botany* 39: 231-40.
- FINKELSTEIN R. A., 1976.** Progress in the study of cholera and related enterotoxins. In A.W. Bernheimer, Mechanisms in bacterial toxinology. John Wiley and sons, New York, pp. 52-84.
- FOUCHE J. G., MARQUET A. et HAMBUECKERS A., 2000.** Les plantes médicinales, de la plante au médicament. *Observatoire du monde des plantes*. Sart-Tilman. Liège, Belgique, pp. 1–18
- FOURNIER J. M., QUILICI M. L., 2007.** Choléra. *La Presse Médicale*.36 :727-739.
- FRANKEL E.N., WATERHOUSE A. L, TEISSE DRE P. L., 1995.** *Agricultural and Food Chemistry*, 43: 221-235 p.

- GEFFRAY L., GUERIN L., BOUTEILLER P., 2000.** Le choléra en l'an 2000 : Épidémiologie, problèmes thérapeutiques. *Antibiotiques*. 2 (4): 259-270.
- GEORGE T., FRANK R., OLIGA H., KIM H., 2002.** Multi-drug pump inhibitors uncovers remarkable activity of plant antimicrobial agents. *Chemotherapy*. 10 (46): 3133-3141.
- GOMA EPIDEMIOLOGY GROUP, 1995.** Public health impact of Rwandan refugee crisis: what happened in Goma, Zaire, in July, 1994? *Lancet*. 345: 339-343.
- GOODGAME R. W et GREENOUGH W. B, 1975.** Cholera in Africa: a message for the West. *Annual of International Medecine*. 82: 101-106.
- GRIFFITHS S. L., FINKELSTEIN R. A., CRITCHLEY D. R., 1986.** Characterization of the receptor for cholera toxin and Escherichia coli heat-labile toxin in Rabbit intestinal brush borders. *Biochemical Journal*. 238: 313-322.
- GUEDE-GUINA. F., TSAI C. S. , SMITH M. et OCHILLO, R. F., 1991.** Pharmacoloycal effets of an acqeous extact of *Mareya micranta* (MAR) on the muscularis muscle of *Bufo marinus*". *The pharmacologist* 33 (3) 185 p
- GUEDE-GUINA. F., TSAI C. S., SMITH M. et OCHILLO, R. F., 1997.** "Pharmacoloycal charaterization and concentration of active ingredients in aqueous extracts of *Mareya micrantha*". *Afrique Biomédicale*. ,2 ,(2) :11-22
- GUEDE-GUINA. F; BERREBI-B. I., SMITH M. D. et OCHILLO R. F., 1992.** Pharmacological characterization of Ouabaïn analog from *Mansonia altissima*: an in vitro investigation of effects on Na⁺, K⁺ATPase. *Cell. Molecular Biology*. 5, 241-247.
- GUEDE-GUINA. F., VANGAH-M. M., HAROUNA D. et BAHY C., 1993.** Potencies of MISCA, a plant source concentrate against fungi. *Journal of Ethnopharmacology*. 14: 45-53.
- GUINKO S., 1989.** Opothérapie: Quelques usages médicaux du miel dans l'Ouest du Burkina Faso. *Bulletin de Médecine Traditionnelle*. 3 (2): 11-115.
- HADI M., 2004.** La quercétine et ses dérivés : Molécules à caractères pro-oxydant ou capteur de radicaux libres. Études et applications thérapeutiques. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences de l'Université de Louis Pasteur, domaine pharmacochimie. 155 p.
- HALE A. L., 2003.** Screening potato genotypes for antioxidant activity, Identification of the responsible compounds and differentiating Russet Norkotah strains using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. Office of graduate studies of Texas. A & M University. Genetics. 260 P.

- HAMAD I., MEHMOOD Z., MOHAMMAD F., 1998.** Screening of some Indian medical plants for their antimicrobial properties. *Journal of Ethnopharmacology*. 62: 183- 193.
- HARBORNE J. B., et WILLIAMS C. A., 2000.** Advances in flavonoïds research since 1972. *Phytochemistry*. 55: 481-504.
- HARDMAN J. G., LIMBERD L. E., 1992.** The Pharmacological basis of therapeutics. *In: Goodman and Gilman's (Eds), 10th edition, Mac Graw Hill, New York, pp. 914- 931.*
- HARIKRISHNA D., APPA RAO A.V.N. et PRABHAKAR M.C., 2004.** Pharmacological investigation of prunin-6''-O-P-Coumarate: A flavonoid glycoside. *Indian Journal of pharmacology* 36 (4): 244-250.
- HARISOLO R., SERI C. S., YAO K. P. A., OKPEKON T., ADIKO V. A., DJAKOURE L. A., COFFY A. A., 2009.** A Ketosteroid Isolated from *Morinda Morindoides*. *European Journal of Scientific Research* 28 (4): 621-626.
- HATANO T., EDAMATSU R., HIRAMATSU M., MORI A., FUJITA Y., YASUHARA T., YOSHIDA T. et OKUDA T., 1989.** Effect of interaction of tannins with co-existing substances VI. Effect of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 37: 2016-2021.
- HAYASE F. et KATO M. 1984.** Antioxidant compounds of sweet potatoes. *Journal of Nutritional Sciences and Vitaminology*. 30: 37-46.
- HOCHHUT B., LOTFI Y., MAZEL D., FARUQUE S. M., WOODGATE R., WALDOR M. K., 2001.** "Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O: 139 and O1 SEXT constins". *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 45(11): 2991-3000
- HOLMGREN J., LÖNNROTH R. A., MÄNSSON J. E., SVENNRHOLM L., 1975.** Interaction of cholera toxin and membrane GM1 ganglioside of small intestine. *Biochemistry*. 72: 2520-2524.
- HOLT R. J., 1975.** Laboratory test of antifungal drugs. *Journal of Clinical Pathology*. 18: 767-774.
- HOSTETTMANN K., MARSTON A., 2002.** Twenty years of research into medicinal plants: results and perspectives. *Phytochemistry Reviews* 12: 75-285.
- HSU C.Y., CHAN Y.P. et CHANG J., 2007.** Antioxidant activity of extract from *Polygonum cuspidatum*. *Biology Research*, 40: 13-21.
- JIGNA P., RATHISH N., SUMITRA C., 2005.** Preliminary screening of some folklore medicinal plants from western India for potential antimicrobial activity. *Indian Journal of Pharmacology*. 37(6): 408-409.

- JOPPA K. M., VOVOR A., EKLUG. K., AGBONON A., AKLIKOKOU K., GBEASSOR M., 2008.** Effet de *Morinda lucida* benth. (*Rubiaceae*) et de *Newbouldia leavis* P. Beauv. (*Bignoniaceae*) sur la falciformation. *Médecine Tropicale*. 68 : 251-256.
- JOY P. P., THOMAS J., MATTHEW S., SKARIA B. P., 1998.** In Bose TK et al (eds) Medicinal plants. Naya Prokash publishers, Calcutta, *Tropical. Horticulture*. 2: 449-632.
- JUKIC M. et MILOS M., 2005.** Catalytic oxidation and antioxidant properties of Thyme Essential Oils (*Thymus vulgaris* L.). *Croatica Chimica Acta*. 78 (1) : 105-110.
- KABORE I. Z., SAWADOGO A., 1986.** : Effets toxiques de *Nauclea latifolia* Séminaire de Pédiatrie Africaine : *Communication*, Ouagadougou, 7-9 Novembre.
- KABORE. I. Z., GUISSOU I. P., SOURABIE S. et GNANGAO G., 1998.** Éléments de monographie sur *Nauclea latifolia* SM. (*Rubiaceae*) : Chimie, Activités biologiques, Toxicité. *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine*. 10 : 42-54
- KAMBU K., TONA L., LUKI N., CIMANGA K., UVOYA A., 1990.** Antibacterial activity of extracts from plants used in preparations as antidiarrheal at Kinshasa, Zaire. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 48(5) : 255-263.
- KAPER J. B., MORRIS J. G. et LEVINE M. M., 1995.** Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*. 8: 48-86.
- KAROU D. S., TCHADJOBOT. P., ILBOUDO D. P. et SIMPORE J., 2011.** Sub-saharan *Rubiaceae*: A Review of their Traditional uses. Phytochemistry and Bioloical Activities. *Pakistan Journal of Biological Sciencies*. 14(3): 149-169.
- KAROU D., NADEMBEGA W. M. C., OUATTARA L., ILBOUDO D. P., CANINI A., NIKIÉMA J. B., SIMPORE J., COLIZZI V., TRAORE A. S., 2007.** African Ethnopharmacology and New Drug Discovery. *Medicinal and Aromatic Plant Sciences and Biotechnology* 1: 61-69.
- KAROU D., SAVADOGO A., CANINI A., YAMEOGO S., MONTESANO C., SIMPORE J., COLIZZI V., TRAORE A. S., 2006.** Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology* 5: 195-200.
- KERHARO J., 1974.** La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. *Plantes médicinales et toxiques*. Ed. Vigot Frères, Paris, 1963.
- KIRBY G. C., 1996.** Medicinal plants and the control of parasites. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90: 605-609.
- KOCH R., 1884.** An address on cholera and its bacillus. *British Medical Journal*. 403-404.

- KOFFI A. E., YAPO A. F., YAPI H. F., BAHİ C., DJAMAN A. J., 2011.** Comparative Study of *in vitro* Susceptibility of Clinical and Environmental Strains of *Vibrio Cholerae* O:1 Strains to Ethanol Extracts of *Morinda Morindoides*. *European Journal of Scientific Research* 66 (2): 284-292.
- KOFFI A. E., YAPI H. F., BAHİ C., GUESSEND K. N., DJAMAN J. A., GUEDE- G. F[†], 2010.** Activité de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* du vibrion du choléra : expérimentation en Côte d'Ivoire. *Médecine Tropicale* 70: 53-56.
- KOFFI B. F., YAPI A. D., OUATTARA M., GUESSENND A. N., DOSSO M., OUATTARA L., 2009.** Evaluation de l'activité anticholérique de deux composés dérivés de l'acide 4-oxo-1,4-di hydro-1,10-phénanthroline-3- carboxylique. *Journal des sciences pharmaceutiques biologiques*. 10(2) : 14-20.
- KOUADIO F., KANKO C., JUGE M., GRIMAUD N., JEAN A., N'GUESSAN Y.T. et PETIT J.Y., 2000a .** "Analgesic and anti-inflammatory activities of an extract from *Parkia biglobosa* used in traditional medicine in the Ivory Coast" *Phytotherapy Research*. 14(8): 635-637.
- KOUADIO K., 2000.** Contribution à l'étude de la spéciation de quelques métaux dans les sédiments d'une lagune tropicale (lagune Ebrié) : cas de la baie de Yopougon, Mémoire de DEA, Univ. Abobo- Adjamé, Côte d'Ivoire, 82 p.
- KOUAKOU A. V., N'GUESSAN J. D., KRA A. K. M., et GUEDE- G. F., 2006.** Etude de l'action antifongique et tri phytochimique de *Thonningia sanguinea* (Thos). *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie* . 22 : 21-25
- KOUAME B. F., 2006.** Activité antibactérienne de BGG, une substance antidiarrhéique de source naturelle sur *Samonella O.M.A.* (Extrait total aqueux et éthanolique 70 %). Mémoire de DEA. Biotechnologies et sciences des aliments option Pharmacologie des Substances Naturelles. Université de Cocody, UFR Biosciences, Abidjan, Côte d'Ivoire. 47 p.
- KOUAME B. F.P., BEDI G., KOFFI A. M., CHALCHAT J. C. et N'GUESSAN T. Y., 2010.** Volatiles Constituents from Leaves of *Morinda morindoides* (Rubiaceae): A Medicinal Plant from the Ivory Coast. *The Open Natural Products Journal* 3: 6-9.
- KOUAMÉ R. O., SÉRY Y., BOTI J. B., KOUAMÉ N. G., COFFY A., CASANOVA J., 2008.** Étude chimique et activité anti diarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*. 24(1) : 94-103.

- KOUASSI A., GUIRAL D. et DOSSO M., 1995.** Variations saisonnières de la contamination microbienne de la zone urbaine d'une lagune tropicale estuarienne. *Revue d'Hydrobiologie Tropicale*. 23, pp. 181-194.
- KREOFISKY T., SCHLAGER J. W., VUK-P. Z., ABRAHAM R. T. et ROHRBACH M. S., 1992.** Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from rabbit resident alveolar macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 7: 172-181.
- LAMARTI A., BADOUC A., DEFFIEUX G. et CARDE J. P., 1994.** Biogenèse des monoterpènes. *Bulletin- Société de Pharmacie*. Bordeaux. 133 : 69-118.
- LEBEAU P. et JANOT M., 1956.** Traité de pharmacie chimique. Masson, Paris. France, vol. 5, 838 p. Tome 2, 3, 4 et 5.
- LEE C. C., TONG K. L., HOWE H. S., LAM M. S., 1997.** *Vibrio vulnificus* infections: case reports and litterature review. *Annals Acadamy of Medicine. Singapore*.26 (5): 705-712.
- LESNE J., FOURNIER J-M., 1998.** *Vibrio*. In Manuel de Bactériologie Alimentaire, Sutra L., M. Federighi, J-L Jouve, coordinateurs, ed. Polytechnica, 308 p.
- LEVINE M. M., 1991.** South America: the return of cholera. *Lancet*. 338: 45-46.
- LONGANGA O. A., APERS S., PIETERS L., CLAEYS M., PANNECONQUE L., DE CLERCQ E., VAN ZEEBROECK A., LAUWERS S., FREDERICH M., FORIER A., 2006.** Biological alkaloids from the root bark of *Epinetrum villosum*. *Journal of Ethnopharmacology* 102: 89-94.
- LOUBAKI B. C., OUATTARA A. S., OUATTARA C. A. T., TRAORE R. O., TRAORE A. S., 1999.** Activités antimicrobiennes des extraits aqueux totaux de *Detarium microcarpum* [Cesalpinaeae (Guill et Perr)] sur huit espèces bactériennes impliquées dans certaines maladies infectieuses au Burkina Faso. *Sciences et Médecine*. (Rev. CAMES Serie A) 1 : 66-73.
- LUGASI A., HOVARI J., SAGI K. V. et BIRO L., 2003.** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis* 47 :(1-4) 119-125.
- MABRY T. J. et ULUBELEN A., 1980.** Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins and lignans. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 28: 188-196.
- MARMONIER A. A., 1990.** Introduction aux techniques d'études des antibiotiques. In : *Bactériologie Médicale, Techniques usuelles*. Doin, Paris, France. 227-236.

- MASQUELIER J., DUMON M. C. et DUMAS J., 1979.** Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. *Acta Theurapeutica* 1: 101-104
- MECKES M., TORRES J., CALZADA F., RIVERA J., CAMORLINGA L., LEMUS H., RODRIGUEZ G., 1997.** Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum* (*H glomeratum*), a plant used in Maya traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytotherapy Research* 11(2): 128-131.
- MEDIĆ-Š. M., JASPRICA I., SOMOLČIĆ-B. et MORNAR A., 2004.** Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer chromatography of flavonoids and Phenolic Acids. *Croatica Chemica Acta.* 77(1-2): 361-366.
- MEITE S., N'GUESSAN J. D., BAHİ C., YAPI H .F., DJAMAN A. J., et GUEDE-G. F., 2009.** Antidiarrheal Activity of the Ethyl Acetate Extract of *Morinda morindoides* in Rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 8 (3): 201-207.
- MOHAMMEDI Z., (2004-2005).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la Région de Tlemcen. Thèse de Diplôme de Magistère de Biologie, opt. Produits naturels, Activités biologiques et Synthèse. Fac. Sc. Univ. Abou Bakr Belkaïd. Tlemcen (Rép. Algérienne Démocratique et Populaire) 155 p.
- MOROH J. L. A., BAHİ C., DJE K., LOUKOU Y. G., GUEDE-G. F., 2008.** Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait acetatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) Milne- Redhead (Rubiaceae) sur la brisance *in vitro* des souches d'*Echerichia coli*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 77: 44-61.
- MUELLER J . H. et HINTON J., 1941.** A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 48:330-333.
- NACOUUMA-O. O., 1996.** Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso : cas du Plateau central, Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles, Université de Ouagadougou, (Burkina-Faso), 605 pp.
- NDOUR C. T., MANGA N. M., KA R., DIABADIANE. N. M., FORTEZ L., SEYDI M., et al., 2006.** L'épidémie de choléra de 2004 à Dakar : Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques. *Médecine Tropicale* 66: 33-38.
- NEWMAN D. J., CRAGG G. M., SNADER K. M., 2000.** The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Report* 17:175-285.
- N'GUESSAN J. D., DINZEDI M. R., NGUESSEND, COULIBALY A., DOSSO M., DJAMAN A. J., GUEDE-GUINA. F., 2007.** Antibacterial activity of aqueous extract of

Thonningia sanguinea against extended- spectrum- β lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 6 (3): 779-783.

N'GUESSAN J. D., ZIRIHI G. N., KRA A. K. M., KOUAKOU K., DJAMAN A. J. et GUEDE-GUINA F., 2007. Free radical scavenging activity, flavonoid and phenolic contents of selected Ivoirian plants. *International Journal of Natural and Applied Sciences*. 4: 425-429.

N'GUESSAN K., BEUGRE K., ZIRIHI G. N., TRAORÉ D. et AKÉ-ASSI L., 2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire) *Sciences & Nature* 6(1): 1 – 15.

N'GUESSAN K., KOUASSI K. E., ZIRIHI G. N., 2006. Etudes botaniques et tri phytochimiques de *Petersianthus macrocarpus* (p. beauv.) liben (barringtoniaceae), une plante utilisée en médecine traditionnelle, dans la lutte contre le cholera. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* XIV: 97-116

NOSTRO A., GERMANÒ M. P., D'ANGELO V., MARINO A. et CANNATELLI M. A., 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettres en microbiologie appliquée*. 30(5): P.379.

OKAMURA H., MIMURA A., YAKOU Y., NIWANO M., et TAKAHARA Y., 1993. Antioxidant activity of Tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry* 33 : 557- 561.

OKOU O. C., KRA A. K. M., ZIRIHI G. N., DOSSO M., GUEDE-GUINA. F., 2006. Antivité antibactérienne des extraits de *Mitracarpus scaber* sur la croissance *in vitro* des streptocoques bêta hémolytiques. *Journal des Sciences Pharmacologiques et Biologiques* 7(1) : 17-27.

OKUDA T., KIMURA Y., YOSHIDA T., HATANO T., OKUDA H. et ARICHI S., 1983. Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects of lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 31: 1625-1631.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (O.M.S), 2001. Choléra, 2000. *Relevé Epidémiologique hebdomadaire* 76 :2333- 2340.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (O.M.S), 2009. Choléra, 2008. *Relevé Epidémiologique Hebdomadaire* 84 : 309-324.

- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (O.M.S), 2010.** Choléra, 2009. *Relvé Epidémiologique Hebdomadaire* 85 : 293-308.
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (OMS), 2008.** Choléra 2007. *Relevé Epidémiologique Hebdomadaire* 83 : 269-84.
- OUATTARA L., KOUDOU J., OBAME L. C. E., KAROU D.S, TRAORE A. and BESSIERE, 2007.** Chemical composition and antibacterial activity of *Cochlospermum planchoni* Hook. Ex Planch. Essential oil from Burkina Faso. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10: 4177-4179.
- PAULO A., PIMENTEL M., VIEGAS S., PIRES I., DUARTE A., CABRITA J., GOMES E.T., 1994.** *Cryptolepsis sanguinolenta* activity against diarrhoeal bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*. 44(2) : 73-77.
- PAVIA A. T., BRYAN J. A., MAHER K. L., HESTER J. R T.R, FARMER J.J. 3rd, 1989.** *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. *Annals of Internal Medicine*. 111: 85-86.
- POLLITZER R., 1959.** History of the disease, P 11-50 In: R. POLLITZER (ed) –*Cholera*. OMS, Genève.
- PORTER N., 2001.** Essential oils and their production. *Crop & Food Research*. Number 39.
- PSOTOVÁ J., LASOVSKÝ J. et VICĀR J., 2003.** Metal-chelating Properties, Electrochemical Behaviors, Scavenging and Cytoprotective Activities of six Natural Phenolics. *Biomedical Papers* 147 (2): 147-153.
- QUILICI M. L., 2011.** Le diagnostic bactériologique du choléra. *Revue Francophone des Laboratoires*. 431 : 29-43.
- RAKOTO A. A. O., DROMIGNY J. A., PFISTER P., MAUCLERE P., 2001.** *Vibrio cholerae* à Madagascar : étude d'une souche multi résistante. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar*. 67 (1-2): 6-13.
- RAMZI A.A. M., SALAH A. A. A., SIDGI H., FAISAL M. N. ALTHAWAB, SAMA A. Z. ALAGHBARI et URLIKE L., 2010.** Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 7: 323-330.
- RAVN H., ANDARY C., KOVACS G. et MOLGAARD P., 1984.** Caffeic acid esters as *in vitro* inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. *Biochemical Systematics and Ecology*.17:175-184.
- RECIO M. C., RIOS J. L., VILLAR A., 1989.** A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reports in literature. *Phytotherapy Research* 3: 117-25

- SAINTY D., BAILLEUL F., DELAVEAU P. et JACQUEMIN H., 1981.** Iridoides du *Borreria verticillata*. *Journal of Medicinal Plant Research.*, 42: 260-264 .
- SANCHEZ J. L. et TAYLOR D., 1997.** Cholera. *Lancet* 349 : 1825-1830.
- SANTOS P. R., OLIVEIRA A. C., TOMASSINI T. C., 1985.** Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. *Revista Farmácia e Bioquímica.* 31: 35- 8.
- SAURABH A., AMARENDRA P. et PRASANTA K. B., 2009.** Evaluation of antimicrobial activity of some Medicinal plants against enteric bacteria with particular reference to multidrug resistant *Vibrio cholerae*. *Tropical journal of pharmaceutical Research.* 8(3): 231-237.
- SCHNAUBELT K., 1998.** Advanced aromatherapy: the sciences of essential oil therapy. Healing Art Press (Rochester, Vermont). 138 p
- SCHWÄMMLE B., WINKELHAUSEN E., KUZMANOVA S. et STEINER W., 2001.** Isolation of Carvacrol Assimilating Microorganisms. *Biotechnology.* 39 (4): 341-345.
- SCIENTIFIC CORRESPONDENCE, 2003.** Broad Spectrum antimycotic drug for treatment of ringworm infection in human beings. *Current Science* 85(1): 30-34.
- SMALLFIELD B., 2001.** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research.* Number 45, 4 p.
- SMYTHE P. M., SCHONLAND M., BRERETON-S. G. G. et al., 1971.** Thymolymphatic deficiency and depression of cell-mediated immunity in protein-caloric malnutrition. *Lancet.* 2: 939-944.
- SNOW J., 1855.** On the mode of communication of cholera. J. Churchill, 2nd ed., London, p. 1-162.
- STAVRIC B. et MATULA T. I., 1992.** Flavonoids in food. Their significance for nutrition and health. p. 274 - 294. In : ONG ASH and PACKER L eds. *Lipid soluble and antioxidants: Biochemistry and clinical applications.* Basel : Birkhauser Verlag, Germany.
- STEFANOVITS-B. É., TULOK M. H., HEGEDŰS A., RENNER C. et VARGA I.S., 2003.** Antioxidant effect of Various rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) clones. *Acta Biologica Szegediensis.* 47(1-4): 111-113.
- STEFFEN R., ACAR J., WALKER E., ZACKERMAN J., 2003.** Cholera: Assessing the risk to travellers and identifying methods of protection. *Travel Medicine and Infectious Diseases.* 1 (2): 80-8.
- SVOBODA K. P. et HAMPSON J. B., 1999.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plant: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related

pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK, KA6 5HW.

TANON A. K., EHOLIE S. P., EHUI E., 2004. Épidémie de choléra au C.H.U de Treichville (Abidjan) en 2001: aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques, *Médecine Afrique Noire*. 51(11) : 559-566.

TEIXEIRA D. S. J- A., 2004. Mining the essential oils of the *Anthemideae*. *African Journal of Biotechnology*. 3 (12): 706-720.

THES P. M., ZIRIHI G. N., KRA A. K. M., SOUMAHORO I. A., GUEDE-G. F. 2006. Action du savon fait à partir des huiles de *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae) »misca», *Mareya micrantha* (euphorbiaceae)- «g243» et de *Cassia alata* (Caesalpiniaceae) sur la croissance *in vitro* de *candida albicans*.et *trichophyton mentagrophytes*. *Journal des sciences pharmaceutiques et biologiques*.7(1) : 28-36

TONA L. K., KAMBU N., NGIMBI K., CIMANGA A. J., VLIETINCK, 1998. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethno pharmacology*. 61: 57-65.

TONA L., CIMANGA R. K., MESIA K., MUSUAMBA C. T., DE BRUYNE T., APERS T. S., HERMANS N., VAN M. S., PIETERS L., TOTTE J., VLIETINCK A. J., 2004. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* . 93(1): 27-32.

TONA L., MESIA K., NGIMBI N. P., CHRIMWAMI B., OKOND'AHOKA, CIMANGA K., DE BRUYNE T., APERS S., HERMANS N., TOTTE J., PIETERS L., VLIETINCK A. J., 2001. *In vivo* antimalarial activity of *Cassia occidentalis*, *Morinda morindoides* and *Phyllanthus AJ*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 95(1): 47-57.

TONA L., NGIMBI N.P., TSAKALA M., MESIA K., CIMANGA R. K., APERS. S., DE BRUYNE T.,TOTTE J., PIETERS L., VLIETINCK A. J., 1999a. Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrheal in Kinshasa, Congo. *Phythomedicine* 6(1): 59-66.

TONA L., NGIMBI N. P., TSAKALA M., MESIA K., CIMANGA K., APERS. S., DE BRUYNE T., PIETERS L., TOTTE J., VLIETINCK A. J., 1999b. Antimalarial activity of 20 crude extracts from nine African medicinal plants used in Kinshasa, Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 68(1-3): 193-203.

- TOURÉ A., BAHİ C., BAGRÉ I., N'GUESSAN J. D., DJAMAN A. J., et COULIBALY A., 2010.** *In vitro* Antifungal Activity of Soap Formulation of Haxane Leaf Extract of *Morinda morindoides*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 9(3): 237-242
- TRA BI F.H., 1997.** Utilisation des plantes, par l'homme, dans les forêts classées du Haut Sassandra et du Scio, en Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat 3è cycle, Fast, Université de Cocody, Abidjan. 225 P.
- TRA BI F.H., IRIÉ G.M., N'GAMAN K. C. C. et MOHOU C. H. B., 2008.** "Study of some therapeutic plants used to treat arterial hypertension and diabetes: two emergent diseases in Côte d'Ivoire" *Sciences & Nature*. 5(1): 39- 48.
- TRA- BI O. I., DJYH B. N., BAHİ C., MEITE S. et N'GUESSAN J. D., 2010.** A Study of the Hepatic Tolerance of the Ethyl Acetate Fraction of *Morinda morindoides* (Baker) *Milne-Redhead* (Rubiaceae) Extract in Rabbit. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* . 9 (6): 573-579.
- TRA-BI O. I., DJYH B. N., YEO D., ITO M. P. Mrs TEBELE, DJAMAN A. J., N'GUESSAN J. D., 2011.** Renal Tolerance Study of the Ethyl Acetate Fraction of *Morinda morindoides* (Baker) *Milne-Redhead* (Rubiaceae) Extract in Rabbit. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2: 530-540.
- ULANOWSKA K, TRACZYK A., KONOPA G., WEGRZYM G., 2006.** Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Archives of Microbiology*. 184 (5): 271-8.
- URASSA W. K., MHANDO Y. B., MHALU F.S., MJONGA S. J., 2000.** Antimicrobial susceptibility pattern of *Vibrio cholerae* O: 1 Strain during two cholera outbreaks in Dar es Salaam, TANZANIA. *East African Medical Journal*. 77(7): 350-353.
- VICTORA C. G, BRYCE J., FONTAINE O., MONASCH R . 2001.** Maladies diarrhéiques : réduire la mortalité grâce à la thérapie par réhydratation orale. *Bulletin of the World Health Organization*. 4 : 122-131.
- VILJOEN A., VAN V. S., ERNST E., KLEPSE M., DEMIRCI B., BASSER H., VAN W. B-E., 2003.** *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae) – The antimicrobial and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *Journal of Ethnopharmacology*. 88: 137-143.
- VON M. H. T., 1996.** *Trees and Shrubs of the Sahel*. Verlag Josef Margraf, Weikersheim, Germany, 562 pp.

- WANG J. et MAZZA, 2002.** Effects of Anthocyanidins and other phenolic compounds on the production of Tumor Necrosis Factor α in LPS/IFN- γ - Activated RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4183-4289.
- WEST P.A., 1989.** The human pathogenic vibrios-a public health update with environmental perspectives. *Epidemiology and Infection.* 103(1):1–34.
- WONG H. C., LIU S. H., KU L. W., LEE I. Y., WANG T. K., LEE Y. S., LEE C. L., KUO L. P., SHIH D. Y., 2000.** Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *Journal of Food Protection.* 63 (7): 900-906.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (W.H.O.), 2002.** Traditional Medicine Strategy 2002–2005. Geneva: World Health Organization.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (W.H.O.), 2003.** Traditional medicine. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/print.html>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (W.H.O.), 1997.** Reducing mortality from major childhood killer diseases, fact- sheet N°178, Geneva: World Health Organisation, September 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (W.H.O.), 1996.** Water and sanitation, fact-sheet N° 112, Geneva: World Health Organisation, November 1996. [http:// www.who.int/inf-fs/en/fact112.html](http://www.who.int/inf-fs/en/fact112.html).
- YAPO A. F., EDJEME-AKÉ N. A., YÉO D., YAPI H. F., N'GUESSAN J. D., DJAMAN A. J., 2012.** “Hepatic and Glucose Biotolerance Induced by the Aqueous Extract of Leaf of *Parkia biglobosa* in Rabbit”. *Journal of Asian Scientific Research* . 2(4): 189-199.
- YAPO A. F., YAPI F.H., SANGARE M., AHIBOH H., YAYO E., ATTOUNBRE H. M-L., EDJEME N. A., LATTE T., KASSI H., SAWADOGO D., MONNET D. et DJAMAN A. J., 2010.** "Effects of aqueous extract of leaves of *Parkia biglobosa* on markers of cellular immunity in rabbits" *Agriculture and Biology Journal of North American.* 1(6): 1340-1348.
- ZHANG X., 2004.** Traditional medicine: its importance and protection. In: Twarog S, Kapoor P (eds). Protecting and Promoting Traditional Knowledge: Systems, National Experiences and International Dimensions. Part 1. The Role of Traditional Knowledge in Healthcare and Agriculture. New York: United Nations. 3–6.
- ZHU X., ZHANG H., LO R., 2004.** Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke(*Cynara scolymus L.*) and their antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 52: 7272- 8.

ZIRIHI G. N., KRA A. K. M. et GUEDE-GUINA F. (2003). Évaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Lamarck) O. Kuntze (Asteraceae) "pymi" sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Rev Méd Pharm Afr*, 17: 11-18.

ZIRIHI G. N., 1991. « Contribution au recensement, à l'identification et à la connaissance de quelques espèces végétales utilisées en Médecine traditionnelle chez les Bété du Département d'Issia », Thèse de Doctorat du 3^e cycle, Université de Cocody, Côte d'Ivoire, F.A.S.T, 253 P.

ZIRIHI G. N., 2006B. Études botanique, pharmacologique et phytochimique de quelques plantes médicinales anti-paludiques et/ou immunogènes utilisées chez les Bété du Département d'Issia, dans l'ouest de la Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Cocody-Abidjan, UFR Biosciences, 126 p.

ZIRIHI G. N., GRELLIER P., GUEDE-GUINA F., BODO B. et LENGU M., 2005A. Isolation, Characterisation and antiplasmodial activity of steroidal alkaloids from *Funtumia elastica* (Preuss) Stapf. *Biorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **15** : 2637-2640.

ZIRIHI G. N., KRA A. K. M., ETIEN D. T., 2007. Etude botanique et évaluation des activités antifongiques de *Mitracarpus villosus* (MV) (Rubiaceae) et *Spermacoce verticillat* (SV) (Rubiaceae) sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*. *Revue de Médecines et de Pharmacopées Africaines*. 20 : 9-17.

ZIRIHI G. N., MAMBU L., GUEDE-GUINA F., BODO B., GRELLIER P., 2005. *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of Malaria. *Journal of Ethnopharmacology* 98: 281- 285.

ZIRIHI G. N., N'GUESSAN K., KASSY N. J., COULIBALY K. et DJAMAN A. J., 2012. Evaluation and comparison of antifungal activities of *Terminalia catappa* and *Terminalia mantaly* (Combretaceae) on the *in vitro* growth of *Aspergillus fumigates*. *Journal of Medicinal Plants Research* . 6(12): 2299-2308.

ZIRIHI G. N., N'GUESSAN K., ETIEN D. T. et SERIKOUASSI B. PH. 2009. Evaluation *in vitro* of antiplasmodial activity of ethanolic extracts of *Funtumia elastica* , *Rauvolfia vomitoria* and *Zanthoxylum gillettii* on *Plasmodium falciparum* isolates from Côte d'Ivoire *Journal of Animal & Plant Sciences*. 5(1): 406 - 413.

ANNEXES

Annexe 1 : Diagnostic bactériologique de *Vibrio cholera* O : 1



Les galleries API System 20 E sont un appoint important au diagnostic rapide.
Le code d'identification dans le catalogue analytique : 5 347 124

Annexe 2 : Espèces de *Morinda*.

Morinda ammitia

Morinda angolensis

Morinda angustifolia

Morinda artensis

Morinda asperula

Morinda asteroscepa

Morinda aurantiaca

Morinda badia

Morinda bartlingii

Morinda batesii

Morinda billardierei

Morinda brachycalyx

Morinda brevipes

Morinda buchii

Morinda bucidifolia

Morinda calciphila

Morinda callicarpifolia

Morinda calycina

Morinda candollei

Morinda canthoides

Morinda celebica

Morinda cinnamomea

Morinda cinnamomifoliata

Morinda citrifolia

Morinda citrina

Morinda cochinchinensis

Morinda collina

Morinda constipata

Morinda coreia

Morinda coriacea

Morinda corneri

Morinda costata

Morinda debilis

Morinda decipiens

Morinda deplanchei

Morinda elliptifolia

Morinda elmeri

Morinda fasciculata

Morinda ferruginea

Morinda geminata

Morinda gjellerupii

Morinda glaucescens

Morinda glomerata

Morinda grayi .

Morinda guatemalensis

Morinda hainanensis

Morinda hirtella

Morinda hispida

Morinda hoffmannioides

Morinda hollrungiana

Morinda howiana

Morinda hupehensis

Morinda hypotephra

Morinda jackiana

Morinda jasminoides

Morinda kanalensis

Morinda lacunosa

Morinda lastelliana

Morinda latibractea

Morinda leiantha

Morinda leparensis

Morinda leptocalama

Morinda litseifolia

Morinda longiflora
Morinda longifolia
Morinda longiloba
Morinda longipedunculata
Morinda longipetiolata
Morinda longissima
Morinda lucida
Morinda micrantha
Morinda microcephala
Morinda moaensis
Morinda mollis
Morinda montana
Morinda morindoides
Morinda myrtifolia
Morinda nana
Morinda nanlingensis
Morinda neocaledonica
Morinda nitida
Morinda oblongifolia
Morinda odontocalyx
Morinda officinalis
Morinda oligocephala
Morinda panamensis
Morinda pandurifolia
Morinda parvifolia
Morinda peduncularis
Morinda pedunculata
Morinda persicifolia
Morinda philippinensis
Morinda phyllireoides
Morinda piperiformis
Morinda platyphylla
Morinda podistra

Morinda polyneura

Morinda pubiofficialis

Morinda pumila

Morinda reticulata

Morinda retropila

Morinda retusa

Morinda ridleyi

Morinda rigida

Morinda rosiflora

Morinda royoc

Morinda rugulosa

Morinda sarmentosa

Morinda scabrída

Morinda scabrifolia

Morinda schultzei

Morinda scortechinii

Morinda sessiliflora

Morinda siebertii

Morinda sparsiflora

Morinda subcaudata

Morinda surinamensis

Morinda tenuiflora

Morinda titanophylla

Morinda triandra

Morinda trimera

Morinda triphylla

Morinda truncata

Morinda turbacensis

Morinda umbellata

Morinda undulata

Morinda villosa

Morinda waikapuensis

Morinda wallichii ; *Morinda yucatanensis*

Annexe 3 : Composition chimique des huiles essentielles des feuilles de *Morinda Morindoides* (KOUAME et al., 2010)

N°	Compound
	Monoterpenes
1	gamma terpinene
2	n-octanol
3	linalool
4	linalool
5	alpha terpineol
6	methyle salicylate
7	beta cyclocitral
8	nerol
9	geraniol
10	vitispirane
	Total monoterpenes
	Sesquiterpenes
11	hex-3-enyle tiglate
12	delta elemene
13	(E)-beta-damascenone
14	béta elemene
15	béta caryophyllene
16	(E)-alpha ionone
17	geranyl acetone
18	alpha humulene
19	6-demethoxy ageratochromene
20	D -germacrene
21	(E)-beta ionone
22	alpha selinene
23	tiglate de benzyle

24	(E,E)-alpha farnesene
25	gamma cadinene
26	delta cadinene
27	zingigerone
28	elemol
29	nerolidol
30	tetradecanal
31	10-epi-gamma eudesmol
32	alpha cadinol
33	7-epi-gamma eudesmol
34	hex-3-enyle salicylate
35	eudesm-7(11)-en-4-ol
36	pentadecanal
37	6,10,14-trimethyl pentadecan-2-one
38	octadecan-9-yne
39	methyle linolenate
40	farnesyle acetone
	<input type="checkbox"/> Total sesquiterpenes
	Aromatic compounds
41	para cymene
42	thymol
43	Z -hex-3-enyle benzoate
44	hexyle benzoate
45	E- 'hex-3-enyle benzoate
46	benzyle benzoate
47	benzyle salicylate
	<input type="checkbox"/> Total aromatics compounds
	Diterpenes
48	isophytol
49	acide hexadecanoïque
50	Phytol trans
	<input type="checkbox"/> Total diterpenes

Annexe 4**GÉLOSE THIOSULFATE CITRATE BILE SACCHAROSE (T.C.B.S)**Composition type g/litre :

Peptone de caséine :.....	5
Peptone de viande :.....	5
Extrait de levure :.....	5
Citrate de sodium :.....	10
Thiosulfate de sodium :.....	10
Bile de bœuf desséchée :.....	5
Cholate de sodium :.....	3
Saccharose :.....	20
Chlorure de sodium:.....	10
Citrate ferrique :.....	1
Bleu de thymol :.....	0,04
Bleu de bromothymol:.....	0,04
Agar- agar:.....	14
PH : 8,6 ± 0,2	

Annexe 5**GÉLOSE MUELLER HINTON (M.H)**

Composition :

Infusion de viande de bœuf :.....	300 g
Amidon :.....	1,5 g
Hydrolysate de caséine :.....	17,5 g
Agar :.....	10 à 17* g
Calcium :.....	60 à 200 mg
Magnésium :.....	20 à 40 mg
Eau distillée :.....	compléter à 1000 mL

Annexe 6**BOUILLON MUELLER HINTON (B.M.H)**

Composition :

Infusion de viande de bœuf :.....	6,0 g
Hydrolysate de caséine :.....	17,5 g
Amidon :.....	1,5 g
Eau distillé:.....	compléter à 1000 mL

Annexe 7**GÉLOSE NUTRITIVE ALCALINE (GNA)**

Composition :

Peptone :.....	20 g
Gélose :.....	15 g
Chlorure de sodium :.....	5 g
Eau distillée. :.....	Compléter à 1000 mL

Annexe 8**EAU PEPTONÉE ALCALINE (EPA)**

Composition :

Peptone :20 g

Chlorure de sodium.....5 g

Eau distillée.....compléter à 1000 mL

Annexe 9

Produits chimiques :

Les produits chimiques suivants ont été utilisés au cours de cette étude.

- Éthanol 96% (éthanol absolu).
- Eau distillée stérile.
- Eau physiologique stérile.
- Gel de sephadex G₅₀.
- Sérums agglutinants polyvalents anti vibrions cholériques (*Vibrio cholerae* 0:1) : sérums anti O : 1.
- Triphenyl Tetrazolium Chlorure (T.T.C).
- Galerie API 20 E.
- Anhydride acétique.
- Acide sulfurique.
- Solution alcoolique de chlorure ferrique 2 %.
- Alcool chlorhydrique dilué 2 fois.
- Copeaux de magnésium.
- Réactif de Stiasny .
- Chlorure ferrique 2 %.
- Réactif de Borntraeger (ammoniaque dilué 2fois).
- HCl au 1/5.
- Chloroforme.
- Réactif de Dragendorff.
- Réactif de Bouchardat .
- Alcool isoamylique

Annexe 10**Matériel électrique.**

- Balance de précision électrique, de type SARTORIUS.
- Évaporateur rotatif.
- Hotte (Telstar).
- Four Pasteur.
- Broyeur mécanique, type IKA[®] Labortechnik STAUFEN
- Agitateur magnétique chauffant de type IKAMAG RCT
- Étuve de type VENTICELL
- Évaporateur rotatif BUCHI 461 WATER BAICH
- Bain-marie

Annexe 11

Verrerie et petit matériel.

La verrerie de laboratoire a servi « d'ustensiles » pour l'exécution des travaux.

Ce sont entre autres :

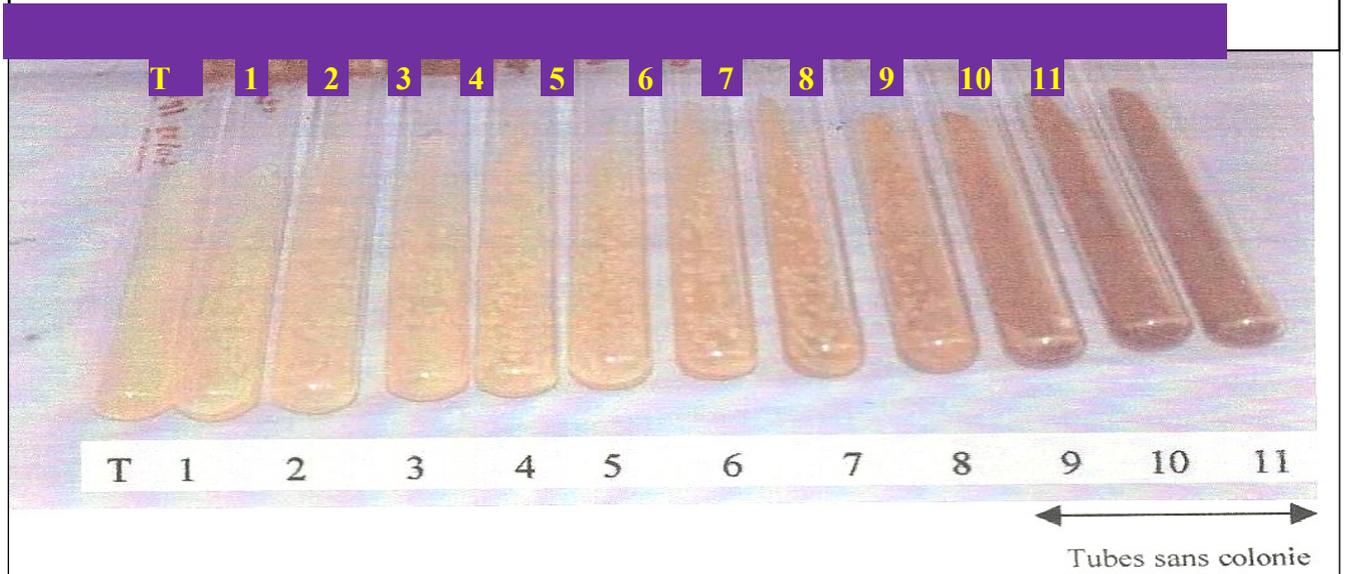
- Lames porte-objets et lamelles de microscopes.
 - Tubes à essais en verres non bouchés (fond rond, épaisseur 0,8 à 1,4 mm, bord droit).
 - Tubes à hémolyse en verre, réutilisables.
 - Pipettes Pasteur stériles.
 - Pipettes stériles à usage unique (10, 20, 50 mL).
 - Boîtes de Pétri en verre (diamètres 120 mm).
 - Boîtes de Pétri stériles, à usage unique sans ergot (diamètre 90 mm).
- Etc....

D'autres matériels courants ont été également utilisés, notamment :

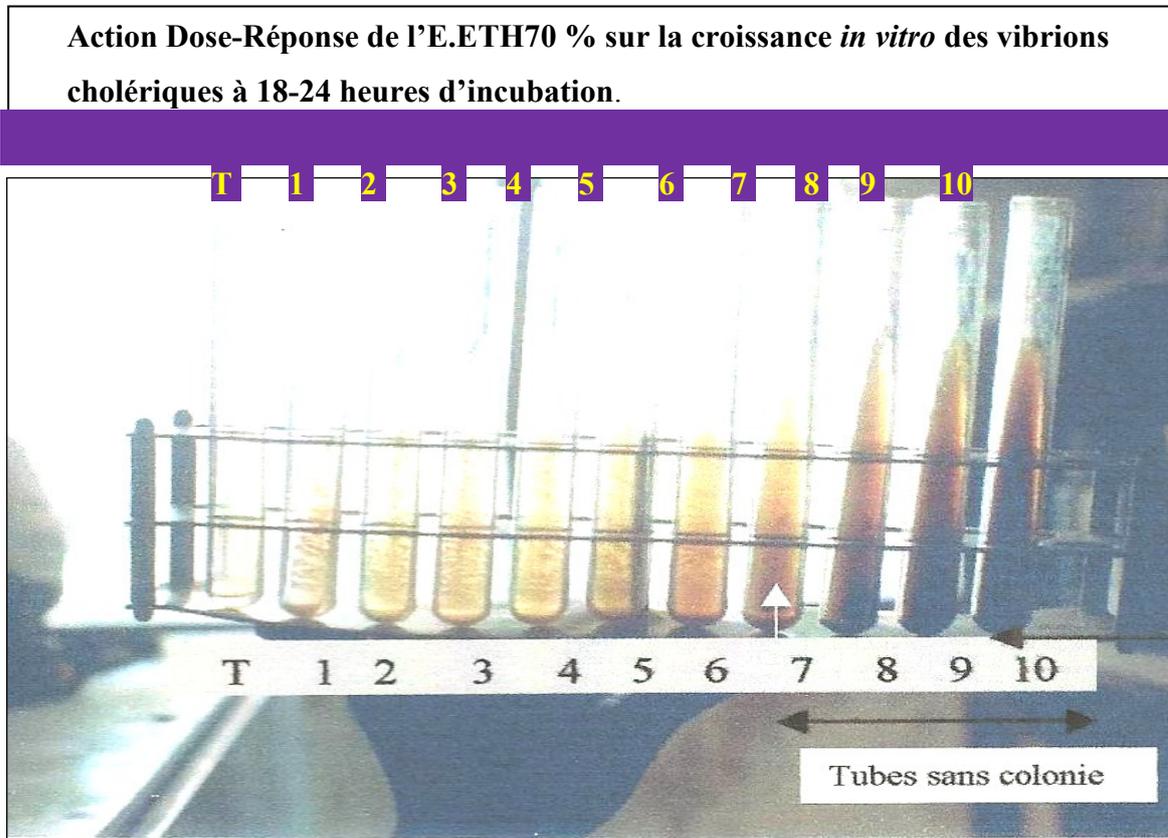
- Micro tubes Eppendorf avec bouchon.
- Embouts stériles.
- Oëse en platine (calibrée avec manche de 15 cm, vol. 10 µL.)
- Micropipettes (Pro Accumex[®]).

Annexe 12 : Aspect des cultures des vibrions cholériques à 18-24 h d'incubation

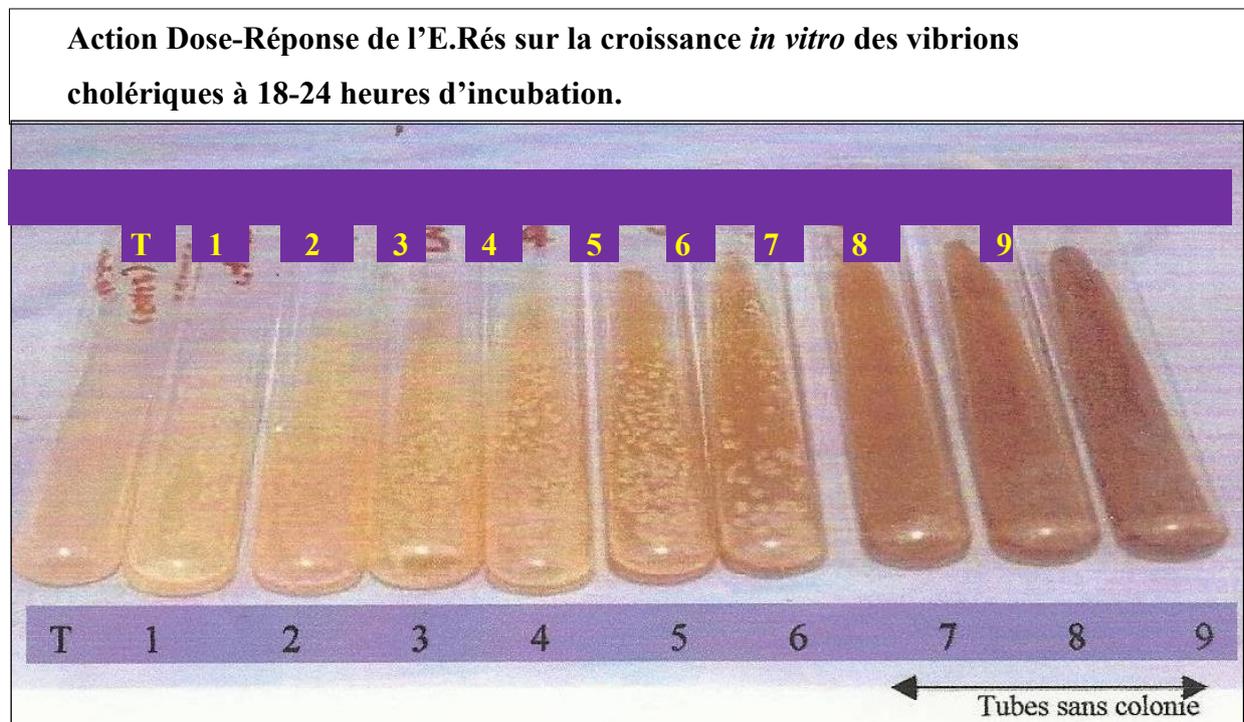
Action Dose-Reponse de l'E.Taq. sur la croissance *in vitro* des vibrions cholériques à 18-24 heures d'incubation.



Annexe 13. Aspect des cultures des vibrions cholériques à 18-24 h d'incubation à 37°C.



Annexe 14 : Aspect des cultures des vibrions cholériques à 18-24 h d'incubation à 37°C



Annexe 15. Aspect des cultures des vibrions cholériques à 18-24 h d'incubation à 37°C

Action Dose-Reponse de BGGF₅ sur la croissance *in vitro* des vibrions cholériques à 18-24 heures d'incubation.



Annexe 16. Analyse statistique de l'action de l'E.Taq sur les vibrions cholériques.

<u>Sdv</u>	<u>ddl</u>	<u>Sc</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>
Concentrations	9	3367	374,2	***
Erreur	30	0,001875	0,000124	0,9988^{ns}
Total	39	3367	-	-

Sdv = source de variation ; **ddl** = degré de liberté ; **Sc** = somme des carrés ; **CM** = carré moyen ; **Fcal** = F calculée ; **Fth** = Fthéorique

Le tableau ci-dessus représente l'analyse statistique réalisée à partir des données de l'extrait **E.Taq**. testé. Il se caractérise par une analyse de variance à un facteur. Il s'agit de tester l'effet des concentrations de l'E.Taq sur le pourcentage de survivance des vibrions cholériques (**souche de référence 2932**).

Les données statistiques obtenues à l'aide du logiciel GRAPHPAD PRISM 5, ont utilisé le dispositif complètement aléatoire (D. C. A), avec une précision α égale à 5 % de niveau de confiance.

Fcal (0,9988) est strictement inférieur à Ftab (3,94), (${}_{30}^9F_{0,05} = 2,21$) ; on accepte donc l'hypothèse nulle H_0 à 95 % de niveau de confiance et on rejette H_C . Pour une concentration donnée, Il n'y a donc pas de différence significative entre les différents tests bactériologiques.

Cette conclusion des traitements statistiques est identique pour les différents extraits testés, c'est-à-dire que les différentes concentrations d'extraits agissent de la même façon sur les développements des vibrions cholériques.

Activité de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* du vibrion du choléra : expérimentation en Côte d'Ivoire

Koffi AE¹, Yapi HF³, Bahi C³, Guessend KN², Djaman JA^{1,4}, Guede-Guina F^{3†}

1. Laboratoire de Microbiologie, Institut National de Santé Publique (INSP).

2. Laboratoire de Bactériologie Virologie, Institut Pasteur.

3. Laboratoire de Pharmacodynamie biochimique, UFR Biosciences.

4. Laboratoire de Biochimie fondamentale et clinique, Institut Pasteur.

Abidjan, Côte d'Ivoire.

Med Trop 2010; **70** : 53-56

RÉSUMÉ • Le choléra constitue un problème majeur de santé publique dans les pays en développement. En Côte d'Ivoire, afin d'apporter notre contribution dans la prise en charge de cette maladie, nous avons évalué l'activité antibactérienne de quatre extraits. Il s'agit des extraits total aqueux, éthanologique 70 %, résiduel, et la fraction chromatographique F5 : BGG-F5) des feuilles de *Morinda morindoides*, plante de la pharmacopée ivoirienne, qui ont été testés sur une souche pathogène de *Vibrio cholerae* O:1. Les quatre extraits testés ont une efficacité antibactérienne *in vitro* considérable sur *Vibrio cholerae* O:1. L'extrait éthanologique 70 % est le plus actif sur la croissance *in vitro* de *Vibrio cholerae* O:1 avec une concentration minimale bactéricide de 5 mg/mL. Les propriétés antibactériennes de cette plante peuvent être bénéfiques pour la prise en charge du choléra.

MOTS-CLÉS • *Morinda morindoides*. Concentration minimale Bactéricide. *Vibrio cholerae*. Choléra. Côte d'Ivoire.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *MORINDA MORINDOIDES* ON *IN VITRO* GROWTH OF *VIBRIO CHOLERAE* IN CÔTE D'IVOIRE

ABSTRACT • Cholera is a major public health problem in developing countries. As a contribution to management of this disease, the study described herein was carried out in Côte d'Ivoire. The purpose was to evaluate the antibacterial activity of products obtained by various techniques from the leaves of *Morinda morindoides* on a pathogenic strain of *Vibrio cholerae* O:1. *Morinda morindoides* is a medicinal plant in the Ivorian pharmacopoeia. The products were obtained as aqueous extracts, 70% ethanolic extracts, residual extracts and a chromatographic fraction (BGG F5). All three extracts and the chromatographic fraction showed considerable *in vitro* antimicrobial efficacy against *Vibrio cholerae* O:1. The most active against *in vitro* growth of *Vibrio cholerae* O:1 was the 70% ethanolic extract with a minimal bactericidal concentration of 5 mg/ml. The antibacterial properties of this medicinal plant can be of great benefit for management of cholera.

KEY WORDS • *Morinda morindoides*. Minimal bactericidal concentration. *Vibrio cholerae*. Cholera. Cote d'Ivoire.

Le choléra constitue aujourd'hui un véritable problème de santé publique dans le monde entier, en Afrique et particulièrement en Côte d'Ivoire (1).

En 2006 et en 2007, 236 896 et 177 963 cas de choléra ont été respectivement déclarés à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) avec respectivement 6 311 et 4 031 décès dans plus de cinquante pays, en Afrique, en Asie et dans une moindre mesure en Amérique et en Océanie (1). L'Afrique seule notifie le plus grand nombre de cas de choléra et de décès : 234 349 cas en 2006, ce qui représente 99 % du total mondial dont 6 303 décès et 166 583 cas en 2007 avec 3 994 décès (1,2).

Le traitement actuel du choléra est basé essentiellement sur la réhydratation par voie orale (3). Quant aux autres moyens thérapeutiques (antibiothérapie), la Tétracycline est l'antibiotique de premier choix (même si quelques souches sont résistantes), mais d'autres molécules sont également efficaces notamment le cotrimoxazole, l'érythromycine, la doxycycline, le chloramphénicol, le furazolidone (4). Les fluoroquinolones aussi bien que la norfloxacine sont aussi indiquées mais des résistances ont été rapportées (5). Ces antibiotiques n'ont pas prouvé leur efficacité à cause de l'émergence des germes résistants (5, 6) et de leur coût très élevé (donc

inaccessibles aux populations démunies). Face à cette situation préoccupante, la mise au point d'un phytomédicament simple, peu coûteux et efficace semble être plus que jamais d'actualité. *Morinda morindoides* (*Rubiaceae*) constitue ainsi une espèce végétale de choix car elle est utilisée traditionnellement par les peuples du centre ouest de la Côte d'Ivoire pour guérir les diarrhées.

Les travaux récents entrepris sur cette espèce végétale ont montré que, outre ses propriétés « antidiarrhéiques », elle possède des propriétés antifongiques (7, 8), antiplasmodiales, (9) et anti-protozoaires (10).

L'objectif du présent travail a été de tester les différents extraits (total aqueux, éthanologique 70 %, résiduel, fraction chromatographique), de cette espèce végétale sur la croissance *in vitro* de *Vibrio cholerae* O:1.

Matériel et méthodes

Matériel

• Matériel d'origine végétale

Le matériel végétal est constitué de feuilles de *Morinda morindoides* (BGG) préalablement lavées puis séchées lentement à l'abri du soleil, à la température ambiante.

• Correspondance : koffiallali@yahoo.fr

• Article reçu le 11/09/2008, définitivement accepté le 2/11/2009.

• Matériel microbien

Le support microbien est une souche de *Vibrio cholerae* O:1 fournie par le Laboratoire de Bactériologie Virologie de l'Institut Pasteur d'Abidjan (Côte d'Ivoire : IPCI), isolée à partir des selles d'un malade (souche hospitalière : BE 2942).

Méthodes

• Préparation des extraits végétaux

- Extrait total aqueux (E.T.aq)

Les feuilles séchées de la plante ont été pulvérisées par un broyeur mécanique de type IKA® Labortechnik Staufen; Germany : Janke & Kunkel). La poudre obtenue a servi à préparer les différents extraits. Ainsi E.T.aq a été obtenu selon la méthode suivante ((7) : Cent grammes de poudre végétale sont extraits par macération dans un litre d'eau distillée sous agitation magnétique pendant vingt quatre heures sur un agitateur de type RTC B, IKA® Labortechnik Staufen; Germany : Janke & Kunkel). L'homogénat obtenu est filtré successivement deux fois sur du coton hydrophile et ensuite sur du papier Wattman®, (diamètre =150 mm, Nr. 0859, Marke Selecta, Germany : Carl Schleicher & Schüll). Le filtrat est évaporé à pression réduite à 60 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif du type RVO5-ST, IKA® Labortechnik; Germany). Ce concentré de produit obtenu de couleur noirâtre est ensuite lyophilisé et on obtient ainsi une poudre noirâtre, l'extrait total aqueux : (E.T.aq).

- Extrait éthanolique 70 % (E.Eth70 %) et extrait résiduel (E.Rés.)

E.Eth70 % et E.Rés. proviennent de l'extrait total aqueux, selon la méthode suivante (7,11) : cinq grammes d'extrait total aqueux sont dissous dans cent millilitres d'une solution éthanol absolu-eau (70 : 30; V/V). La phase supérieure contenant les éléments alcool hydro solubles constitue E.Eth70 % et la phase inférieure constitue E.Rés. Toutes ces phases sont aussi concentrées, puis lyophilisées pour obtenir des poudres.

- Fraction chromatographique (BGG-F5)

BGG-F5 a été obtenu selon la méthode suivante : trois cent milligrammes d'E.T.aq, sont dissous dans 5 mL d'eau distillée. Le tout est passé à travers une colonne (1,8 x 50 cm) de gel de sephadex G50. Le 5^e éluat de couleur orangée est collecté, concentré puis lyophilisé (12).

• Préparation des milieux de culture

L'incorporation des différents extraits végétaux préparés précédemment à la gélose Mueller-Hinton® (BIO-RAD, Marnes-la-coquette, France) a été inspirée de la méthode des doubles dilutions. A cet effet, nous avons utilisé quatre séries de 10 tubes numérotés de 1 à 10. Pour chaque série d'expérimentation avec un extrait, le tube n°1 sert de témoin de culture (sans extrait) et un tube T sert de témoin de stérilité de la gélose (sans inoculum, sans extrait).

Pour les différents tests, les concentrations des différents extraits varient de 60 mg/mL à 0,23 mg/mL pour E.T.aq ; 40 mg/mL à 1,156 mg/mL pour E.Eth.70 % ; 200 mg/mL à 0,78 mg/mL pour E.Rés. et 100 mg/mL à 0,390 mg/mL pour BGG-F5 selon une suite géométrique de raison 1/2.

Tous ces tubes ainsi préparés sont stérilisés à 121 °C pendant quinze minutes à l'autoclave et inclinés à la température de la salle pour permettre à la gélose de se solidifier (7, 8, 12, 13).

• Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture stock de notre souche de *Vibrio cholerae* O:1 repiquée par la méthode des stries sur gélose Mueller-

Hinton et incubée pendant 18 à 24 heures, l'inoculum est obtenu à partir d'une colonie parfaitement isolée et émulsionnée dans 10 mL de bouillon Mueller-Hinton® (Bio-Rad, Marnes la coquette, France) permettant d'obtenir 106 germes.

• Essai microbien

Dix microlitres de l'inoculum (préalablement préparé) dilués 100 fois ont été ensemencés à la surface de la gélose contenue dans les tubes contenant les extraits. Après 18 à 24 h d'incubation à 37°C, les colonies de *V. cholerae* O:1 ont été comptées à partir d'un compteur de colonies de type pbi Digicont® (Pool Bioanalysis. Italiana) et la croissance dans chaque série de tubes expérimentaux a été évaluée en pourcentage de survie, calculé par rapport à 100 % de survie de colonies dans le tube n°1, témoin de contrôle de croissance (7, 8, 12, 13).

Résultats

Après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C, on a observé (dans toutes les séries d'expérimentations) comparativement aux tubes témoins, une diminution progressive du nombre de colonies au fur et à mesure que les concentrations des différents extraits augmentent.

Les données expérimentales traduites sous forme de courbes antibiogrammes sont résumées à la figure 1. Les valeurs des paramètres antibactériens des quatre extraits à savoir la CI₅₀ (concentration pour 50 % d'inhibition) déterminée graphiquement, la CMB (concentration minimale bactéricide) et les rapports d'efficacité des extraits sur la base des CMB sont respectivement présentés dans le tableau 1 et le tableau 2.

D'une façon générale, chaque extrait testé a une courbe qui présente une allure décroissante.

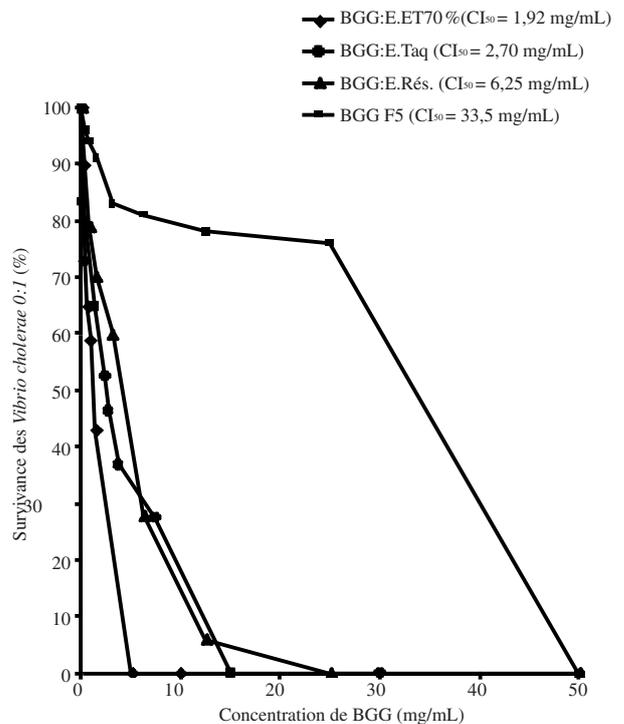


Figure 1. Sensibilité de *Vibrio cholerae* O:1 aux extraits de BGG (E.Taq; E.Rés; E.Eth70%, BGGF5).

Tableau 1. Valeurs des paramètres antibactériens des différents extraits.

Extraits de BGG	Paramètres antibactériens	
	CI ₅₀ (mg/mL)	CMB (mg/mL)
E.T.aq	2,7	15
E.Eth70 %	1,92	5
E.Rés.	6,25	25
BGG F5	33,5	50

Tableau 2. Rapport d'efficacité des extraits sur la base des CMB.

Extraits de BGG	CMB extrait
	CMB. E. ETH 70 %
E.T.aq	15/5 = 3
E.Rés.	25/5 = 5
BGG F5	50/5 = 10

Discussion

Le choix de *Morinda morindoides* pour cette étude résulte de son utilisation traditionnelle pour soigner les diarrhées. L'utilisation de l'eau comme solvant d'extraction constitue le premier mode d'utilisation de cette plante. L'association d'alcool absolu à l'eau permet d'accroître le potentiel thérapeutique des extraits (11-13). Afin d'optimiser ce pouvoir thérapeutique, nous avons aussi procédé à une chromatographie de filtration sur gel (12). Enfin, le choix d'un germe bactérien hospitalier par rapport à une souche sauvage de référence se justifie par le fait que ce germe a été plus en contact avec des agents thérapeutiques ; l'une de nos priorités étant dans un premier temps de nous préoccuper de l'activité antibactérienne des extraits de notre plante aux germes bactériens pathogènes, en particulier *V. cholerae O:1*. En effet, la sélection de Vibrions résistants a été démontrée par l'utilisation extensive des antibiotiques (6). C'est ce qui justifie la non recherche du profil de sensibilité de ce germe aux antibiotiques usuels. Ainsi, l'analyse de nos résultats montre que *Vibrio cholerae O:1* est sensible aux quatre extraits de BGG testés. La diminution progressive du nombre de colonies de *V. cholerae O:1* observées dans les tubes expérimentaux, inversement aux concentrations des différents extraits montre cette sensibilité de *V. cholerae O:1* aux différents extraits et est attribuée à la relation dose effet des extraits. A partir de ces résultats, la comparaison de ces quatre extraits laisse apparaître que l'E.Eth.70 % présente une meilleure activité vibriocide car il détient les plus petites valeurs de CMB (CMB= 5 mg/mL) et de CI₅₀ (CI₅₀ = 1,92 mg/mL). D'autre part, les rapports d'efficacité de ces extraits sur la base des CMB montrent que l'E.Eth70 % est trois fois plus actif que l'E.T.aq, cinq fois plus actif que l'E.Rés. et dix fois plus actif que BGG F5. Ainsi, les résultats de cette étude *in vitro* sur la croissance de *Vibrio cholerae O:1* suggèrent que notre plante a effectivement des propriétés antibactériennes bactéricides et crédibilisent l'usage traditionnelle de cette plante. Au regard des résultats de travaux d'autres auteurs, sur cette même plante, nos résultats sont en accord avec ceux de Moroh *et al.* sur les pouvoirs antibactériens de cette plante (11), mais les nôtres sont nettement améliorés car la plus petite valeur des CMBs rapportée par cet auteur est de 7,5 mg/mL contre 5 mg/mL pour ce présent travail ; les résultats de nos travaux présentent également une meilleure activité inhibitrice des extraits testés par rapport aux résultats de travaux antérieurs d'autres auteurs sur l'activité antibactérienne d'autres espèces de plantes (14). Les résultats de leurs travaux ont rapporté comme valeur de la plus la petite CMB, (CMB= 90 mg/mL) contre 15 mg/mL pour nos travaux.

Dans cette vaste investigation sur cette même plante, une étude tri-phytochimique réalisée par Bagré *et al.* a révélé une abondance en alcaloïdes, en saponosides et flavonoïdes dans ces extraits de plantes (8). Les alcaloïdes, de façon générale sont aussi reconnus pour leurs pouvoirs antibactériens élevés (15). Nous pourrions donc penser que l'activité antibactérienne de notre « drogue » reposerait sur la présence de ces composés. Ces résultats sont corroborés par ceux de Mohamed, qui a travaillé séparément sur les flavonoïdes (16), comme l'ont aussi rapporté Sanogo, Riffel *et al.*, (17, 18). Les résultats de cette étude montrent que parmi les solvants utilisés, l'Ethanol 70 % constitue le solvant qui permet de concentrer le mieux les principes actifs de nos extraits et donc, améliore l'activité inhibitrice.

Conclusion

Notre étude, axée sur les propriétés antibactériennes de *Morinda morindoides* a permis de montrer que les différents extraits de cette plante possèdent effectivement une activité antibactérienne bactéricide sur la croissance *in vitro* de *Vibrio cholerae O*.

Des études plus poussées notamment grâce aux techniques de chromatographie en phase gazeuse couplées à la résonance magnétique nucléaire, permettront à l'avenir de séparer les molécules à activité antibactérienne de celles possédant des propriétés antifongiques.

Ces travaux mériteraient d'être complétés par des tests *in vivo* pour l'étude de l'efficacité de ces molécules et de leurs propriétés pharmacocinétiques.

Références

1. Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Choléra 2007. *REH* 2008 ; 83 : 269-84.
2. Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Choléra 2006 *REH*. 2007 ; 82 : 273-84.
3. Alam NH, Yunus M, Faruque ASG, Gyr N, Sattar S, Parvin S *et al.* Symptomatic hyponatremia during treatment of dehydrating diarrheal disease with reduced osmolarity Oral Rehydration Solution. *JAMA* 2006; 296: 567-73.
4. «Cholera treatment». Molson Medical Informatics. 2007. Available from: <http://sprojects.mmi.mcgill.ca/tropmed/disease/chol/treatment.htm>. Retrieved on 2008-01-03.
5. Krishna BVS, Patil AB, Chandrasekhar MR. Fluoroquino-lone-resistant *Vibrio cholerae* isolated during a cholera outbreak in India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006 ; 100 : 224-26.
6. Ndour CT, Manga NM, Kâ R, Dia/Badiane NM, Fortez L , Seydi M. *et al.* L'épidémie de cholera de 2004 à Dakar: Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques. *Med Trop* 2006 ; 66 : 33-38.
7. Bagré I, Bahi C, Méité S, Djaman A J, Guédé GF. Evaluation et Amélioration *in vitro* de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh (Rubiaceae) sur *Cryptococcus neoformans*, un champignon responsable de mycose humaine. *J Sci Pharm Biol* 2006 ; 7 : 37-46.
8. Bagré I, Bahi C, Gnahoué G, Djaman A J, Guédé GF. Composition phytochimique et Evaluation *in vitro* de l'activité antifongique des extraits des feuilles de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh (Rubiaceae) sur *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*. *J Sci Pharm Biol* 2007 ; 8 : 15-23.
9. Tona L, Cimanga RK, Mesia K, Musumba CT, De Bruyne T, Apers S. *et al.* *in vitro* antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 2004 ; 93 : 27-32.
10. Cimanga RK, Kambu K, Tona L, Hermans N, Apers S, Totté J, *et al.* Cytotoxicity and *in vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents. *J Ethnopharmacol* 2006 ; 107 : 83-90.
11. Moroh JLA, Bahi C, Djé K, Loukou YG, Guédé Guina F. Etude de l'activité antibactérienne de l'Extrait Acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh (Rubiaceae) sur la croissance *in vitro* des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 2008 ; 77 : 44-61.

12. Akah Jacques Auguste AB, Kra Adou KM, Zirihi Guédé N, Guédé Guina F. Evaluation et essais d'optimisations de l'activité anticandidosique de *Terminalia catappa* LINN (TEKAM3), un extrait de Combretaceae de la Pharmacopée ivoirienne. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 2008; 77 : 120-36.
13. Zirihi Guédé N, Kra Adou KM, Ettien DT. Etude botanique et évaluation des activités antifongiques de *Mitracarpus villosus* (MV) (*Rubiaceae*) et *Spermacoce verticillata* (SV) (*Rubiaceae*) sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*. *Rev Med Pharm Afr* 2007; 20 : 9-17.
14. Ayoade Abdulfatai Adesokan, Musbau Adewu Akanji and Musa Toyin Yakubu. Antibacterial potentials of aqueous extract of *Enantia chlorantha* stem bark. *Afr J Biotechnol* 2007; 6 : 2502-5.
15. Muster D, Lotfi Ben Slama. Thérapeutique médicale buccodentaire : moyens et Méthodes. Elsevier. Masson ed, Paris, 2004, 290 p.
16. Mohamed Zohra. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la Région de Tlemcen. Thèse de Diplôme de Magistère de Biologie, opt. Produits naturels, Activités biologiques et Synthèse. Fac. Sc. Univ. Abou Bakr Belkaïd. Tlemcen (Rép. Algérienne Démocratique et Populaire). 2004-2005. 155 p.
17. Sanogo R, Diallo D, Diarra S, Ekoumou C, Bougoudogo F. Activité antibactérienne et antalgique de deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. *Mali Medical* 2006; Tome XXI : 18-24.
18. Riffel A, Medina LF, Stefani V, Santos RC, Bizani D, Brandelli A. *in vitro* antimicrobial activity of a new series of 1, 4 naphthoquinones. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35 : 811-8.



Récolte d'arachides, Sénégal © Michel R.

Comparative Study of in Vitro Susceptibility of Clinical and Environmental Strains of *Vibrio Cholerae* O1 Strains to Ethanol Extracts of *Morinda Morindoïdes*

Allali Koffi Eugene

*Laboratory of Microbiology, National Institute of Public Health (INSP) of Côte d'Ivoire
Pharmacodynamics Biochemical Laboratory
UFR Biosciences, University of Cocody Abidjan
E-mail: koffiallali@yahoo.fr*

Yapo Adou Francis

*Pharmacodynamics Biochemical Laboratory
UFR Biosciences, University of Cocody Abidjan*

Yapi Houphouet Felix

*Pharmacodynamics Biochemical Laboratory
UFR Biosciences, University of Cocody Abidjan*

Bahi Calixte

*Pharmacodynamics Biochemical Laboratory
UFR Biosciences, University of Cocody Abidjan*

Djaman Allico Joseph

*Laboratory of Basic and Clinical Biochemistry, Pasteur Institute of Côte d'Ivoire
Pharmacodynamics Biochemical Laboratory
UFR Biosciences, University of Cocody Abidjan*

Abstract

Controlling cholera with antibiotherapy faces a major challenge of resistance from *Vibrio cholerae* strains to the antibiotics along with their numerous side effects. It is therefore necessary, even imperious to resort to other molecule sources consisted of medicinal plants.

These research focus on the sensitivity of the clinical and environmental strains of the etiologic agent of the cholera (*Vibrio cholerae* O: 1) to ethanolic extract from *Morinda morindoïdes* by the method of dilution in a liquid area.

Results of this research showed that the most sensible micro-organism to that extract was the environmental strain. The level of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) were determined and showed that, that strain required 3, 75 mg/mL for its inhibition.

Morinda morindoïdes could be a potential source for new antibacterial agents especially vibriocidal agents and the sensitivity of tested germs could be used as biological indication to purify the active principles of the that plant.

Keywords: *Morinda morindoïdes*, Minimal bactericidal concentration, Minimal inhibitory Concentration, clinical, environmental, strain, *Vibrio cholerae*, Côte d'Ivoire.

1. Introduction

Globally, cholera poses a continuing threat on people health concern in developing countries, and represents, according to World Health Organization (WHO) (2009.2010), a key indicator of social development.

In 2008 and 2009, the cholera number cases reported to WHO were respectively 190 130 and 221 226 including respectively 5143 and 4946 deaths.

The African continent remains the most affected by massive outbreaks of this disease and Côte d'Ivoire, in sub-Saharan Africa is not also spared (WHO, 2009.2010)

In order to treat cholera, WHO recommended by his program against diarrheal diseases, a therapeutic method based on oral rehydration (Alam NH et al, 2006) and despite the relative success of this program, antibiotics are widely used. Thus, antibiotics therapy, background in addition to oral rehydration therapy, which shortens the duration of diarrhea and excretion of vibrios in the stool (Geffray et al, 2000), found the major problem of resistance of *Vibrio cholerae* to antibiotics (Falbo V et al, 1999; Urassa WK et al, 2000; A Dalsgaard et al, 2001; Hochhut B et al, 2001 and AO Rakoto Alson et al, 2001.

Tetracycline and cotrimoxazole are commonly used as antibiotics during cholera epidemics (JP Olives, 2002; Djadou KE et al, 2001). However, quinolones (fluoroquinolones, norfloxacin) required for the emergence area of multidrug-resistant strains (Geffray et al, 2000) are indicated, but resistance has been reported by BVS Krishna and *al.* (2006).

In addition to the resistance developed by these microorganisms to "traditional" antibiotics, it was reported that those are sometimes associated with side effects such as hypersensitivity, immunosuppression and allergic reactions as reported I. Hamad and *al.*, 1998. Therefore, the search for a new potential source of antimicrobial agents is necessary (Recio MC et al, 1989; Essawi T et al, 2000)

Plants are for this purpose as a glimmer of hope because, according to WHO, these medicinal plants are the best source for a new variety of medicines. This same institution showed that approximately 80% of the population in developed countries uses traditional medicine which has bioactive chemical compounds from plants for their first aid. (PR Santos and *al.*, 1985; Farnsworth NR and *al.*, 1985).

Morindoides Morinda (Rubiaceae), appears as a plant species of choice because it has a real reputation in traditional medicine in Africa. Indeed, the decoction of its leaves is used for the treatment of malaria, gastrointestinal disorders and amoebiasis (Kambu K and *al.*, 1990; Tona L and *al.*, 1999).

In Côte d'Ivoire, in addition to antidiarrhoeal properties of this plant (used by the peoples of the Midwest for the treatment of diarrhea), the decoction of its leaves are also well known for treating malaria (Zirihi GN, 1991).

Microbiological studies conducted by Bagré I. and *al.*, (2006, 2007), Moroh JLA and *al.*, (2008) and Koffi AE and *al.* in 2010 and the study of biological activities carried out by Zirihi GN and *al.* in 2005; L Sutton and *al.* in 2004; Cimanga RK and *al.*, (2006) and R. Mankelle and *al.* in 2006 on the same plant species credibility to its traditional use.

This study is therefore aimed to compare the *in vitro* sensitivity of clinical strains (isolated from faeces of cholera patients) and environmental (isolated in coastal water from fish) of *Vibrio cholerae* O: 1 to the ethanolic extracts of *Morinda morindoïdes*.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

- Plant materials

The plant material used was the fresh leaves of *Morinda morindoides*, previously washed and dried slowly in shadow at room temperature in a dry and airy area.

- Bacterials strains and growth conditions:

Testing strains were *Vibrio cholerae* O: 1:

- Two clinical strains (VC O1: 2930; VC O1: 3481/31) provided from the Microbiology Laboratory of National Institute of Public Health (INSP) (Côte d'Ivoire), isolated from the stools of cholera patients (clinical isolates).
- Two environmental strains (VC O1: 121/B1; VC O1: 131/B2), isolated in the coastal water (Ebrié lagoon, communicating with Atlantic Ocean), from fishes (*Cyprinus carpio* species).

All strains were kept in Mc Cartney bottles (as stock cultures) on Mueller-Hinton agar ® (Bio Rad ®, Marnes la coquette, France) slants at 4°C to maintain their growth.

2.2. Methods

- Preparation of plant extracts.
- Ethanolic extract : (E.Eth70% veg.)

The dried leaves of *Morinda morindoides* (*M. morindoides*) were powdered with a mechanical grinder type IKA ® (Labortechnik Staufen, Germany: Jank & Kunkel). The powdered crude of plant was used to prepare ethanolic extracts.

E. Eth70% veg. was obtained following Koffi and *al.* (2010) method slightly modified: briefly, one hundred grams of this powdered crude drug were macerated with a liter (L) of ethanol absolute water solution in a ratio 70: 30 (v/v), with continuous stirring for twenty four hours on a shaker type RTC B IKA ® (Labortechnik Staufen, Germania: Jank & Kunkel). The obtained macerated is successively filtered twice through wool cotton and then a Whatman ® paper filter (diameter: 150 mm, Nr.0859, Selecta Marke, Germany: Carl Schleicher & Schuller). The extraction solvent was evaporated at reduced pressure at 60 ° C using a rotary evaporator type RVOT5-ST IKA ® Labortechnik: Germany. The concentrated extract is then lyophilized and we obtained ethanolic extracts, constituting E.TH70%veg.

E.TH70%veg. was kept in sterile bottles under refrigerate conditions (4°C) for further processing.

- Antimicrobial assay.
- Preparation of inocula.

Bacterial suspensions were prepared from stock cultures in Mueller-Hinton (M.H) broth (Bio Rad ®, Marnes la coquette, France) for twelve hours, then 0.1 mL of bacterial suspension standardized to 0.5 Mc Farland equivalent to an inoculum's of 10⁶ cells / mL were used for microbiological tests.

- Preliminary tests:

Toxicity tests of the extraction solvent (absolute ethanol-water 70: 30, V / V), had made against *Vibrio cholerae* strains in use.

Antimicrobial susceptibility pattern was determined using Bauer AW and *al.* (1996) method with standard antibiotics disks (Mumbai, central Mumbai, India) over M.H. agar containing a certain solvent concentration. Solvent-free control was also performed.

This methodology allowed us to register the sensitivity profile of one of bacterial strains.

The purpose of these preliminary tests had to demonstrate that the inhibitory activity would not be charged to extraction solvent, but rather come from plant extracts. Thus, using method described by

De Paiva and *al.* (2003), minimal inhibitory concentration (MIC) and bactericidal (MBC) were determined in a M.H medium broth liquid.

Both drugs (E.Eth70% veg. and Ciprofloxacin.) were tested to determine MIC and MBC for each bacterial strain by the two- fold serial techniques dilution methods in liquid medium.

To this end, micro dilution method in micro titer plates with 96 wells was performed.

MIC is defined as the lowest concentration of plant extracts or antibiotic inhibiting visible growth of each organism.

Thus, in column wells 1 to 12, we introduced with a sterile tip micropipette of 100-1000 microL (PRO Accumex ®) , 100 microL of MH broth. We also introduced in well 1, 100 microL of plant extract solution or Ciprofloxacin which concentration was 60 mg / mL or $1,88.10^{-3}$ mg / mL, respectively for E. Eth70% veg. and for Cipro-500 Cipla (Mumbai, central Mumbai, India).

Using the micropipette, we postponed well to well from 1 to 11, 100 microL of mixture representing a geometric reason $\frac{1}{2}$.

The final intermediate concentrations obtained ranged from 30 mg / mL to 0,028 mg / ml for E. Eth70% veg. and from $0,94. 10^{-3}$ mg / mL to $0, 90.10^{-6}$ mg / mL for ciprofloxacin.

We added to each well, 100 microL of inoculum: the new concentrations obtained ranged from 15 to 0,014 mg / mL; and from $0, 47.10^{-3}$ to $0, 45.10^{-6}$ mg / mL respectively, for E. Eth70% veg. and Ciprofloxacin.

The plates were then incubated from 18 to 24 hours and MIC of the plant extract and ciprofloxacin was determined by comparison with the growth control (wells 12 or control, without extract or antibiotic) in a macroscopic observation .

This reading was made by evaluating the opacity of the wells (or sediment at the bottom of the wells). It was also supported by an indicator of growth: the triphenyltetrazolium chloride (TTC) provided from Paris Pasteur Institute).

TTC (100 microL) , in bacterial growth presence in wells is reduced in formozan (red color) . In lack of bacterial growth, the well remains colorless.

The minimum bactericidal concentration (MBC) is considered as the lowest concentration of plant extract or antibiotic for which there is 0, 01% surviving germs, when compared to control Petri dishes (s).

Indeed, one or more control(s) box (s) is performed by counting of inocula from their dilutions (**d**) (**d** = 1 / 10, 1 / 100, 1 / 1000, 1 / 10000); **d** = 1 / 10000 corresponds to 0, 01% of survivors while **d** = 10^0 , to 100% of survivors. Various dilutions and inocula were seeded (following lines of 5 cm, made on the underside of glass Petri® dishes : 120 x 20 JENA ER, GLASWERK SCHOTT & GEN., MA Germany) on MH agar Petri dishies, and incubated at 37 ° C for 18 to 24 hours, then stored at 4 ° C until the end of the trials.

Two days later, after MIC determination, wells contents showing no visible disturbance, synonymous with bacterial growth were seeded in an identical manner to that of the control Petri dishes or boxes: these are the test boxes.

CMB is read by comparing survivors number of test boxes to the witness boxes or control boxes.

3. Results

- Preliminary tests

After 18 to 24 hours of incubation at 37 ° C, solvent containing 5µL/mL (i.e. 0, 1 ml/20 ml of MH agar), exerted no inhibition on bacteria growth. While with 50µL/mL (i.e. 1 ml/20 ml of MH agar), the bacteria had irregularly grown which did not have a confluence of these.

Also, inhibition zone diameters around the antibiotic disks, synonymous of bacterial growth absence is measured (in mm) using a caliper; this is registered in the **Table 1**

Level of MIC and MBC of each tested bacterial strain and the level of MBC / MIC ratio were also determined. They were registered in the **Table 2**.

Table 1: Influence of solvent extraction on the growth of VC OI (2930) by the method of susceptibility testing.

Solvent	M.H without solvent	Absolute ethanol- water (70: 30, V / V)	
Concentration in (mL /mL of M.H agar)	0	0,1	1
ANTIBIOTICS DIAMETER INHIBITION in (MM)			
Ceftriaxon (30µg)	25(S)	25(S)	Irregular groth of bacteria
Ampicillin (10 µg)	18 (S)	18 (S)	
Tétracyclin (30 µg)	17(R)	17(R)	
Kanamycin (30 µg)	15 (R)	(15 R)	
Ofloxacin (5 µg)	24 (S)	24 (S)	
Gentamycin (10µg)	17 (S)	17 (S)	

Sensible: S

Resistant: R

Table 2: Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of E. Eth70% veg. of *Morinda morindoides* against clinical and environmental *Vibrio cholerae* O: 1 strains

Tested compound	Souches à tester	Antibacterial Parameters (mg/mL)		CMB/CMI
		CMI	CMB	
E.ETH70% veg	<u>Clinical strains</u>			
	VC O1 : 2930	3,75	7,5	2
	VC O1: 3481/ 31	3,75	7,5	2
	<u>Environ mental strains</u>			
	VC O1 : 121/B1	1,875	3,75	2
CIPRO	VC O1 : 131/B2	1,875	3,75	2
	VC O1 : 2930	0,058. 10 ⁻³	0,1175. 10 ⁻³	1
	VC O1: 3481/ 31	0,058. 10 ⁻³	0,1175. 10 ⁻³	1

4. Discussion

Morinda morindoides has a real reputation in the traditional treatment of diarrhoeal diseases in central western of Côte d'Ivoire. The use of medicinal plants is no exception, because many researchers including Saurabh Acharyya and *al*, 2009; Mecke M and *al*, 1997; Batista O and *al*, (1994), carrying out investigations on new sources of vibriocidal agents referred to medicinal plants in traditional use.

Also, the selection of *Vibrio cholerae* O1 strains of different sources (hospital source, environmental source) is not accidental.

Indeed, during cholera outbreaks , Dalsgaard A and *al.*, (1998) showed through studies of molecular and phenotypic characterizations that strains of *Vibrio cholerae* O: 1, causative agents of cholera may have an environmental source. Studies of genotypic and phenotypic characterizations performed by Aidara A and *al.*, (1998), also showed that there is no difference between environmental strains of *Vibrio cholerae* O: 1 isolated from water and those isolated from stool of cholera patients.

Finally, the establishment of the sensitivity profile of a clinical strain (VC OI : 2930) (instead of the 4 strains), with varying concentrations of the extraction solvent (5 and 50 microL / mL of MH agar) lies in the fact that, if E.ETH70% veg. should be tested for biological activities, solvent toxicity should not change the biological process. Particular attention should be paid to possible interactions between the solvent and solute while the solvent reacts with certain compounds to produce complex or

to cause decomposition, dehydration or isomerization of these compounds, as described by Mohamed Z. (2004 - 2005). In short, no repression of the solvent on bacterial growth should exist but rather a potential antibacterial activity due to the extract.

Thus, analyzing the results of our work indicate that the clinical or environmental strains of *Vibrio cholerae* O: 1 (V.CO1) are all sensitive to E.ETH 70%Veg. of *Morinda morindoïdes* (*M. morindoïdes*).

Any time the observation of antibacterial parameters shows that MIC values ranged from 1.875 to 3.75 mg / mL, while those of CMB ranged from 3.75 to 7.5 mg / mL.

As for the pure molecule (Ciprofloxacin.), the levels of MIC and MBC are in the microgram (ie MIC = 0.058 microgram / mL, MBC = 0.1175 microgram / mL).

This difference may due to the fact that E.ETH 70% veg., is in its impure form and contained substances that may interact with the antibacterial activity as described by George T et al (2002).

Among the tested bacterial strains of VC O1, environmental strains are more sensitive to E.ETH 70% veg. of *M. morindoïdes* than the clinical strains. They required 3.75 mg / ml for inhibition, while it necessits twice this value (i.e. 7.5 mg / mL) to inhibit the clinical strains growth.

Indeed, the hospital strains were already in contact with common antibiotics because according to Ndour CT and al, (2006), the selection of resistant bacteria is attributed to the extensive use of antibiotics.

The ratio of bacterial parameters (MBC / MIC = r), which showed the efficiency of the tested extract (bacteriostasis, $r \geq 4$; bactericidal, $r < 4$), gives r values ranging from 1 to 2 (**Table 2**). This allowed us to deduce that E. ETH70% veg. has a bactericidal activity (vibriocidal) against VC O: 1.

These results provide evidence, supporting the interest in this plant for its traditional use in the treatment of diarrhea.

In view of numerous investigations in the field of medicinal plants of other researchers, in order to seek vibriocidal phytomolecules activities, the results of this present work had improved significantly since Saurabh Acharyya and al, (2009) reported their works MIC and MBC values ranging respectively from 0.125 to 32 mg / mL and from 0.25 to 32 mg /mL, while in the present work, the values of these parameters are, respectively, in the same rows from 1.875 to 3.75 mg / mL and from 3.75 to 7.5 mg / mL.

The supports Chemical compounds of antibacterial activities of all these plants are commonly flavonoids (Kouakou AV and al, 2006; JD N'Guessan and al, 2007; Ramzi AA and al, 2008).

Also, work with those of Saurabh Acharyya and al, (2009); Batista O and al., (1994) showed that plants with vibriocidal activities contain flavonoids.

According to Harborne JB and Williams CA (2000), one of the fundamental functions of flavonoids is their role in protection against microbial invasion. Because of this protective role, it is not surprising that plants rich in flavonoids, as described by (Cushin TP, and AJ Lamb 2005), are used for a long time, in traditional medicine to treat infectious diseases.

This is consistent with the traditional use of *M morindoïdes* in Côte d'Ivoire because of its abundance of flavonoids proved by Cimanga RK et al, 2006; L Sutton et al, 1998.

So, Cimanga RK and al., (2006) isolated luteolin and its glycosides from flavonoids of the same plant species, whose antibacterial activities have already been identified from the work of Basile A and al. (1999), and those of Zhu X, Zhang H, Lo R, (2004).

It follows from the results of these studies that bactericidal activities of E. ETH70% veg of *M. morindoïdes* be linked clearly to the presence of these flavonoid compounds in this extract and absolute ethanol-water (70: 30, V / V) is a solvent suitable for the concentration of some compounds with vibriocidal properties as not being toxic to micro-organisms (**Table 1**), as also reported Mohamed Z (2004-2005) in his work.

5. Conclusion

This study focused on the comparative study of *in vitro* susceptibility of clinical and environmental strains of *Vibrio cholerae* O: 1 to E. ETH70% veg of *Morinda morindoides*, revealed the effectiveness of the sensitivity of the tested strains in this excerpt; any time, environmental strains remain sensitive to it.

Moreover, in this fight against this diarrhoeal disease, E. ETH70% veg of *M. morindoides* promises to be a glimmer of hope for the treatment of cholera.

However, an extension of the action spectrum of extracts (with change in solvent extraction) to multi-resistant strains of VC: O1 carrying plasmids producing beta-lactamase deserves to be made, this in order to make a selection of the most active fraction to purify it.

References

- [1] Aidara A., Koblavi S., Boye C.S., Raphenon G., Gasama A., Grimont F., Grimont P.A.D. 1998 Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolates from a recent cholera outbreak in Senegal: Comparison with isolates from Guinea- Bissau. *The American Journal of tropical medicine and hygiene*. 58(2): 163-167.
- [2] Alam N.H., Yunus M., Faruque A.S.G., Gyr N., Sattar S., Parvin S. et al.2006. Symptomatic hyponatremia during treatment of dehydrating diarrheal disease with reduced osmolarity Oral Rehydration Solution. *Journal of the American Medical Association*. 296: 567- 73.
- [3] Bagré I., Bahi C., Gnahoué G., Djaman A.J., Guédé G.F. 2006. Composition phytochimique et Amélioration *in vitro* de l'activité antifongique des extraits des feuilles de *Morinda morindoïdes* (Baker) Milne- Redh (Rubiaceés) sur *Aspergillus fimugatus* et *Candida albicans* un champignon responsable de mycose humaine. *Journal des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques* 7 : 37-46.
- [4] Bagré I., Bahi C., Méité S., Djaman A.J., Guédé G.F. 2007.Evaluation et Amélioration *in vitro* de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne- Redh (Rubiaceés) sur *Cryptococcus neoformans*, un champignon responsable de mycose humaine. *Journal des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques* 8 : 15-23.
- [5] Basile A., Giordane S., Lopez-Saez J.A., Cobiانchi R.C. 1999. Antibacterial activity of pure flavonoïdes isolated from mosses. *Phytochemistry* 52: 1479- 82.
- [6] Batista O., Duarte A., Nasciment O.J., Simoes M.F., De La Torre M.C., Rodriguez B.1994 Structure and antimicrobial activity of diterpenes from roots of *Plectranthus hereroensis* . *Journal of natural products*. 57(6): 858- 861.
- [7] Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Jurck M. 1996.Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American journal of pathology* 45: 493-496.
- [8] Cimanga R. K., Kambu K., Tona L., Hermans, N., Apers S., Totte J., Pieters L., Vlietinck A. J. 2006. Cytotoxicity and *in vitro* susceptibility of *entomoeba histolytica* to *Morinda morindoïdes* leaf extracts and its isolated constituents. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 83-90.
- [9] Cushinie T.P. and Lamb A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoïdes. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26: 243-56
- [10] Dalsgaard A., Forslund A., Sandvang D., Arntzen L., Keddy K. 2001. *Vibrio cholerae* O: 1 outbreak isolates in Mozambique and South Africa in 1998 are multiple- drug resistant, contain the SXT element and the aad A2 gene located on class I integrons. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48(6): 827-838.
- [11] Dalsgaard A., Serichantalergs O., Forslund A., Pitarangsi C.; Echeverria P. 1998. Phenotypic and molecular characterization of *Vibrio cholerae* O:1 isolated in Samutsakorn, Thailand before, during and after the emergence of *Vibrio cholerae* O:139. *Epidemiology and infection*. 121 (2): 259- 268.

- [12] De Paiva S.R., Figueiredo M.R., Aragao T.V., Kaplan M.A. 2003. Antibacterial activity *in vitro* of Plambagin isolated from *Plumbago* species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 959-61.
- [13] Djadou K.E., Atakouma D.Y., Agbobli Apetslanyi E., Assimadi K. 2001. Epidémie de cholera à Dapaong (Togo) de Juillet à Octobre 1998: Cas de l'Hôpital d'enfants. *Medecine d'Afrique noire*. 48 (5): 187-190.
- [14] Essawi T, Srour M. 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* .70:343-9.
- [15] Falbo V., Carattoli A., Tosini F., Pezzela C. Dionisi A.M., Luzzi I. 1999. Antibiotic resistance conferred by a conjugative plasmid and a class I integron in *Vibrio cholerae* O:1 EL TOR strains isolated in Albania and Italy: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43 (3), 693-696.
- [16] Farnsworth N.R., Soejarto D.D. 1985. Potential consequence of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. *Economic Botany* 39: 231-40.
- [17] Geffray L., Guerin L., Bouteiller P. 2000. Le cholera en l'an 2000 : épidémiologie, problèmes thérapeutiques. *Antibiotiques*. 2(4): 259-270.
- [18] George T., Frank R., Oliga H., Kim H. 2002. Multi-drug pump inhibitors uncovers remarkable activity of plant antimicrobial agents. *Chemotherapy*. 10(46): 3133-3141.
- [19] Hamad I., Mehmood Z., Mohammad F.1998. Screening of some Indian medical plants for their antimicrobial properties. *Journal of Ethnopharmacology* 62: 183- 193.
- [20] Harborne, J.B., and Williams, C.A. 2000. Advances in flavonoïdes research since 1972. *Phytochemistry*. 55: 481-504.
- [21] Hochhut B., Lotfi Y., Mazel D., Faruque S.M., Woodgate R., Waldor M.K 2001.. "Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SEXT constins" *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45(11): 2991-3000.
- [22] J.D. N'guessan, M.R. Dinzedi, Nguessend, A. Coulibaly, M. Dosso, A.J. Djaman, F Guédé Guina. 2007. Antibacterial activity of aqueous extract of *Thonningia sanguinea* against extended- spectrum- β lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 6(3): 779-783.
- [23] Kambu K., Tona L., Luki N, Cimanga K., Uvoya A. 1990. Antibacterial activity of extracts from plants used in preparations as antidiarreal at Kinshasa, Zaire. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 48(5): 255-263.
- [24] Koffi A.E., Yapi H.F., Bahi C., Guessend K.N., Djaman J.A., Guédé Guina. F[†].2010. Activité de *Morinda morindoïdes* sur la brisance *in vitro* du vibrion du cholera: expérimentation en Côte d'Ivoire. *Médecine Tropicale* 70 : 53-56.
- [25] Kouakou A.V., N'guessan J.D., Kra A.K.M. and Guédé Guina F. 2006. Etude de l'action antifongique et tri phytochimique de *Thonningia sanguinea* (Thos). *Journal de la société Ouest-Africaine de Chimie* . 22 : 21-25.
- [26] Krishna B.V.S., Patil A.B., Chandrasekhar M.R. 2006. Fluoroquinolone- resistant *Vibrio cholerae* isolated during a cholera outbreak in India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100: 224- 26.
- [27] L. Tona K., Kambu N., Ngimbi K., Cimanga A.J. Vlietinck. 1998 Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethno pharmacology*. 61: 57-65.
- [28] Meckes M., Torres J., Calzada F., Rivera J., Camorlinga M., Lemus H., Rodriguez G.1997. Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum* (*H glomeratum*), a plant used in Maya traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytotherapy Research* 11(2): 128-131.
- [29] Mohamed Zobra.2004-2005. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la Région de Tlemcen. Thèse de Diplôme de

- Magistère de Biologie, opt. Produits naturels, Activités biologiques et Synthèse. Fac. Sc. Univ. Abou Bakr Belkaïd. Tlemcen (Rép. Algérienne Démocratique et Populaire) 155p.
- [30] Moroh J.L.A., Bahi C., Dje K., Loukou Y.G., Guédé Guina F. 2008. Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait acetatique (EAC) de *Morinda morindoïdes* (Baker) Milne- Redh (Rubiaceae) sur la brisance in vitro des souches d'*Echerichia coli*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 77: 44-61.
- [31] Ndour C.T., Manga N.M., Kâ R., Dia/ Badiane N.M., Fortez L., Seydi M. et al. 2006. L'épidémie de cholera de 2004 à Dakar : Aspect épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques. *Médecine Tropicale* 66 : 33-38.
- [32] Olives J.P.2002. Traitement des diarrhées aiguës infectieuses de l'enfant : les douleurs abdominales chez l'enfant. *Revue internationale de Pédiatrie* 320 : 6-12
- [33] Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S). 2009. Choléra, 2008. *Relevé Epidémiologique Hebdomadaire (REH)*. 84 : 309-324.
- [34] Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S). 2010. Choléra, 2009.*Relévé Epidémiologique Hebdomadaire (R.E.H)*. 85 : 293-308.
- [35] R. Mankele, J. –M. Ouamba, A.A. Abena, F. Yala. 2006. Étude des effets de *Morinda morindoïdes* (Back) sur le système immunitaire de l'homme. *Phytothérapie*. 2 : 68-73.
- [36] Rakoto Alson A.O., Dromigny J.A., Pfister P., Mauclere P. 2001. *Vibrio cholerae* à Madagascar: étude d'une souche multi résistante. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar*. 67(1-2) : 6-13.
- [37] Ramzi A.A. Mothana, Salah A.A. Abdo, Sidgi Hasson, Faisal M.N. Althawab, Sama A.Z. Alaghbari and Urlike Lindequist. 2010. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 7: 323-330 .
- [38] Recio M.C., Rios J.L., Villar A. 1989. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reports in literature. *Phytotherapy Research* 3: 117-25
- [39] Santos P.R., Oliveira A.C., Tomassini T.C., 1985. Controle microbiologico de produtos fitoterapicos. *Revista Farmática e Bioquímica*. 31: 35- 8.
- [40] Saurabh Acharyya, Amarendra Patra and Prasanta K. Bag.2009. Evaluation of antimicrobial activity of some Medicinal plants against enteric bacteria with particular reference to multi-drug resistant *Vibrio cholerae*. *Tropical journal of pharmaceutical Research*. 8(3): 231- 237.
- [41] Tona L., Ngimbi N.P., Tsakala M., Mesia K., Cimanga R.K., Apers. S, De Bruyne T., Totte J., Pieters L., Vlietinck A.J., 1999. Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrheal in Kinshasa, Congo *Phythomedicine* 6(1): 59-66.
- [42] Tona L., Cimanga R.K., Mesi K., Musuamba C.T., De Bruyne T., Apers S., et al., 2004. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*. 93: 27-32.
- [43] Urassa W.K., Mhando Y.B., Mhalu F.S., Mjonga S.J., 2000. Antimicrobial susceptibility pattern of *Vibrio cholerae* O:1 Strain during two cholera outbreaks in Dar es Salaam, Tanzania. *East African Medical Journal* 77(7):350-353.
- [44] Zhu, X.; Zhang, H.; Lo, R., 2004. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus L.*) and their antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 7272- 8.
- [45] Zirihi GN, Mambu L, Guédé- Guédé F, Bodo B, Grellier P., 2005. *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of Malaria. *Journal of Ethnopharmacology* 98: 281- 285.
- [46] Zirihi GN., 1991. « Contribution au recensement, à l'identification et à la connaissance de quelques espèces vegetales utilisées en Medecine traditionnelle chez les Bété du Departement d'Issia », Thèse du Doctorat du 3è cycle, Université de Cocody, Côte d'Ivoire, 179P.

RESUMÉ.

L'antibiothérapie qui accompagne la réhydratation par voie orale recommandée par l'OMS pour le traitement du choléra rencontre le problème majeur de résistances des vibriens cholériques. Le but de cette étude était de trouver des principes actifs issus des feuilles de *Morinda morindoides* (Rubiaceae), plante codifiée BGG et qui seraient sources de molécules anti vibrio cholériques. Les investigations ont porté sur cinq (5) extraits : l'extrait total aqueux (E.Taq.), l'extrait éthanolique 70 % (issu de l'E.Taq.), l'extrait résiduel (E.Rés.), l'extrait chromatographique aqueux (BGG F₅) et l'extrait éthanolique 70 %vég.(E.ETH70%vég.), (issu de la poudre végétale de BGG). L'E.Taq., l'E.ETH70 %, l'E.Rés. et BGG F₅ ont été soumis à des tests bactériologiques sur la croissance *in vitro* d'une souche clinique de *Vibrio cholerae* O1, en milieu solide ; ensuite, l'on a comparé les activités antibactériennes de l'E.ETH70 % et de l'E.ETH70 %vég. sur la croissance *in vitro* de deux souches cliniques et de deux souches environnementales de *V. cholerae* O1, en milieu liquide. Les tests de toxicité du solvant d'extraction, à savoir la solution éthanol absolu-eau (70 :30; V/V) ont également été menés, suivis du triphytochimie de l'E.Taq., l'E.ETH70% et l'E.ETH70%vég. Les résultats obtenus ont révélé que l'E.ETH70 %vég. de *Morinda morindoides* est le plus actif avec des CMI variant de 1,875 à 3,75 mg/mL pour les souches environnementales et des CMBs allant 3,75 à 7,5 mg/mL pour les souches cliniques. Le triphytochimie a montré que l'E.Taq., l'E.ETH70 % et l'E.ETH70 %vég. contiennent les groupes chimiques recherchés, contrairement à l'E.ETH70 %vég. qui renferme des groupes fortement représentés. Aussi, la solution d'extraction s'est-elle avérée non toxique pour les vibriens cholériques. Par conséquent, ces résultats attestent que l'E.ETH70 %vég., pourrait contribuer à la lutte contre le choléra s'il est amélioré.

Mots clés : *Morinda morindoides* ; Rubiaceae ; Concentration minimale inhibitrice ; Concentration minimale bactéricide ; Choléra ; *Vibrio cholera* ; Environnemental ; clinique ; Côte d'Ivoire.

SUMMARY

The antibiotherapy coupled with the oral route rehydration recommended by the World Health Organization (WHO), for the treatment of cholera is confronted with the major resistance of choleric vibrios. The purpose of this study is to find out the active ingredients from the leaves of *Morinda morindoides* (Rubiaceae), a plant that is codified BGG and which is said to be the sources of anticholeric molecules. The research covered five (5) extracts: the total aqueous extract (E.Taq.), the ethanol extract 70% (from the E.Taq), the residual extract (E.Rés.), the aqueous chromatographic extract (BGG F₅) and the ethanol extract 70 %vég.(E.ETH70%vég.) (from the powder of BGG). The E.Taq., the E.ETH70 %, the E.Rés. and BGG F₅ were submitted to bacteriological tests on the *in vitro* growth of a clinical strain of *Vibrio cholerae* O1 (*V. cholerae*), in a solid environment; later, the antibacterial activities of the E.ETH 70 % and that of the E.ETH70 %vég on the *in vitro* growth of two clinical strains and two environmental strains of *V. cholerae* O1, in a liquid area, in parallel with the antibacterial activity of Ciprofloxacin, a molecule used in the area of emergence of the resistant vibrios on the *in vitro* growth of a clinical strain of the *V. cholerae* O1. The tests of toxicity of the extraction solvent, i.e the absolute alcohol solution - water (70 :30; V/V) have been carried out, followed by phytochemical tests on the E.Taq., the E.ETH70% and E.ETH70%vég.. The results revealed that the E.ETH70 %vég is more active on the *in vitro* growth of both clinical and environmental strains with the Minimal inhibitory concentration (MICs) varying from 1,875 to 3,75 mg/mL for the environmental strains and the MBCs going from 3,75 to 7,5 mg/mL for the clinical ones. The triphytochemical test reveals that these three extracts contain the chemical groups the research aim to study, contrary to the E.ETH70 %vég which contain very respected groups. These results certify that E.ETH70 %vég. could contribute to the fight against cholera if it is improved.

Keywords: *Morinda morindoides* ; Rubiaceae; Minimal bactericidal concentration; Minimal inhibitory concentration; clinical; environmental; strain; *Vibrio cholera* O1; Côte d'Ivoire.