

Evaluation de l'efficacité de l'extrait éthanolique de *Maytenus undata* (THUMB.) BLAKELOCK sur les germes responsables des diarrhées glairosanglantes

By ^aMUGIRANEZA JP., ^bNSHIMIYIMANA F., ^bBAJYANA E.

^aInstitut de Recherche Scientifique et Technologique(IRST)/Centre de Recherche en Phytomédicaments et Sciences de la Vie/ Département des Pyhtomédicaments et de Médecine Traditionnelle, B.P: 227Butare, Rwanda. ^bUniversité Nationale du Rwanda (UNR), Faculté des Sciences, Département de Biologie, BP: 117 Butare, Rwanda.

Résumé

Les écorces de tronc de *Maytenus undata* ont été testées pour son évaluation antimicrobienne, avec l'extrait éthanolique et ses différentes fractions. On a constaté que ces derniers montrent une activité satisfaisante sur les *Escherichia coli*, *Salmonella B*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexineri*, *Candida albicans*. Pour l'évaluation de l'activité antiprotozoaire, seul l'extrait éthanolique a été utilisé. Ce dernier a été responsable de la réduction ou disparition des formes mobiles de parasites dans les milieux expérimentaux liquides avec la hausse des formes de résistance selon les concentrations employées.

Il y avait une bonne corrélation entre la vitesse de disparition des formes mobiles et la concentration employée. Après avoir absorbé les polyphénols, suivi par l'évaluation sur les mêmes microorganismes, les résultats permettent de conclure que les tannins et les flavonoides (polyphénols) de *Maytenus undata* sont parmi les biomolécules attribuées à ces activités.

Mots clés: *Plantes médicinales, Maytenus undata, activité antimicrobienne, activité antiprotozoaire.*

Abstract

The bark of mature tree species of *Maytenus undata*'s was tested for antimicrobial activity, with alcoholic extract and their diverse fractions; we found that extract shows a satisfactory effect against *Escherichia coli*, *Salmonella B*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexineri*, *Candida albicans*. For antiprotozoal screening, only ethanolic extract was used. The extract has also been attributed with ability to inhibit parasites` moblie forms in aqueous solution and an increase of resistant forms.

There was a positive correlation between the clearance rate of mobile parasites and the concentration used. After absorbing the polyphenols, followed by testing on the same microorganisms, the results lead us to conclude that tannins and flavonoids (polyphenols) are among bioactive compounds attributed to the above activities.

Keywords: *Medicinal plants, Maytenus undata, antimicrobial activity, antiprotozoal activity.*

INTRODUCTION

L'espèce de *Maytenus undata* est largement employée en Médecine Traditionnelle rwandaise pour traiter les diarrhées et les troubles gastriques. En Arabie Saoudite, ce genre de *Maytenus* regroupe neuf espèces et il est connu depuis qu'on a isolé la molécule antitumeur de maytansine en 1972 [1]. *Maytenus arbutifolia* est utilisé en Arabie Saoudite pour traiter les gastro-entérites, les dysenteries, les maux de l'estomac et contre les crises asthmatiques tandis que l'espèce amazonienne de *Maytenus guyanensis* Klotzch est employée au Pérou et Colombie comme stimulant, tonifiant, relaxant musculaire et calmant les douleurs dues aux arthrites et les rhumatismes, les éruptions cutanées et prévention des cancers de la peau [2].

Les tradipraticiens du Dispensaire de la Médecine Traditionnelle de Mamba au Rwanda fournissent les écorces de tronc de *Maytenus undata* pour traiter les malades qui souffrent de diarrhées glairosanglantes et les malades qui souffrent de mal de l'estomac. La présente étude a pour but d'étudier les activités biologiques de l'extrait éthanolique des écorces de tronc de l'espèce de *Maytenus undata* et ses fractions sur les germes qui parasitent le tractus intestinal (genre entéropathogènes) avec comme conséquence la diarrhée. Les travaux phytochimiques réalisés sur cette drogue ont montré l'absence totale des alcaloïdes et la dominance de saponosides, de terpènes stéroïdes et de polyphénols représentés surtout par les tannins [3]. Dans la perspective de valoriser les plantes qui ont un intérêt thérapeutique après les avoir étudiées scientifiquement, le présent travail va s'intéresser à l'évaluation du pouvoir inhibiteur de l'extrait de *Maytenus undata* sur les bactéries, les levures et les protozoaires couramment rencontrés.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Les écorces de *Maytenus undata* ont été récoltées au pied de la montagne localisée dans la région de Gishwati au Nord du Rwanda au mois de septembre 2005. Elles ont été séchées à l'abri du soleil pendant une dizaine de jours au Centre de Recherche en Phytomédicaments et Sciences de la Vie de l'Institut de Recherche Scientifique et Technologique. Après avoir raclé la saleté sur les écorces séchées, ces dernières ont été pulvérisées avec un broyeur électrique.

Préparation de l'extrait éthanolique

100 gr de *Maytenus undata* pulvérisés ont été macérés dans l'éthanol 55% pendant 24 heures. Après filtration, l'extrait a été concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif de marque Büchi réglé à une température de 40°C de

bain marie à 100-125 rpm, puis le fluide de l'extrait a subi un séchage doux à l'étuve à 40°C pendant une semaine. 27.6gr de cristaux brunâtres obtenus (extrait éthanolique) ont été broyés puis tamisés avec un tamis de type *Mw 0.090 mm* de mailles.

Préparation des fractions

13g de l'extrait éthanolique de *Maytenus undata* ont été fractionnés sur colonne en verre (COLONNE CHROMATO CN29, 40 x 800cm sans jaquette avec fritté) entassé de 128.4g de Silica gel de 100 à 200 mesh mélangé avec du chloroforme. L'élution a été effectuée successivement avec l'acétate d'éthyle, le méthanol, et en fin l'éthanol 55%. Comme précédemment les fractions ont été évaporées, séchées, broyées et tamisées pour obtenir des poudres.

Souches biologiques

Après les étapes d'isolement, d'identification, de repiquage et de striation d'une colonie microbienne isolée sur milieu frais de MacConkey, l'ensemencement radial s'effectuait sur la surface gélosée de *Shigella Salmonella* (SS) pour *Escherichia coli*, *Salmonella B*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri* et Saboureaud pour *Candida albicans* et milieu liquide de Jones pour *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba coli* et *giardias* et milieu liquide de Kupferberg pour les *Trichomonas vaginalis*.

Nous avons employé deux souches de *Salmonella B*, deux souches de *Salmonella typhi*, deux souches de *Shigella flexneri*, trois souches d'*Escherichia coli*, deux souches de *Candida albicans*, un échantillon des selles issue d'un sujet porteur à la fois d'*Entamoeba histolytica* et d'*Entamoeba coli*, un échantillon de *giardia* et un échantillon de *Trichomonas vaginalis* (8000 parasites/ml).

Détermination de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne a été déterminée par la méthode de dilution de l'agar selon Mitcher avec de légères modifications: 0.2 ml et 1 ml de la solution mère ont été incorporés dans le milieu agar pour obtenir une concentration de 1mg/ml et de 5mg/ml. Ensuite on a laissé reposer toute la nuit à 37°C avant le test [4]. Les microorganismes sont alors inoculés radialement sur milieu gélose incorporé de l'extrait ou fraction. Les boîtes contrôles témoins ont été préparées selon le solvant utilisé pour extraction ou fractionnement. L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été faite après incubation à 37°C /24heures et 37°C /5 jours (*Candida albicans*) par comptage des colonies [5].

Les concentrations 1mg/ml, 5mg/ml, 15mg/ml d'extrait éthanolique ont été utilisées pour l'évaluation antiprotozoaire dans un milieu de Jones (4°C/20 jours) et la détermination de l'activité anti-trichomonas dans un milieu liquide de Kupferberg (37°C/48-72h).

L'évaluation de l'activité antiprotozoaire a été mesurée par comptage des formes des parasites mobiles sous le microscope dans la cellule de Burker [4].

RESULTATS ET DISCUSSION

Les Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne sont repris dans le tableau I et II présentant les concentrations inhibitrices (mg/ml) de *Maytenus undata*.

Tableau à 5 mg/ml de concentration

	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Salmonella B</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
<i>E_e</i>	+	+	-	-	-
<i>F_e</i>	+	+	+	+	-
<i>F_m</i>	+	+	-	-	-
<i>F_{ae}</i>	+	+	+	+	-

Tableau à 1 mg/ml de concentration

	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Salmonella B</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
<i>E_e</i>	+	+	-	-	-
<i>F_e</i>	+	+	+	+	-
<i>F_m</i>	+	+	-	-	-
<i>F_{ae}</i>	+	+	+	+	-

-: absence de colonies sur milieu gélosé, +: présence de colonies, **E_e**: extrait éthanolique, **F_e**: fraction éthanolique, **F_m**: fraction méthanolique, **F_{ae}**: fraction acétate d'éthyle

Concernant l'évaluation antimicrobienne de l'extrait éthanolique, seuls les *salmonella* (*Salmonella typhi*, *Salmonella B*) testés sont résistants à 1 mg/ml alors qu'à 5mg/ml toutes les souches testées sont inhibées ainsi que sa fraction éthanolique à l'exception de *Salmonella B*. Alors qu'à 1mg/ml de cette dernière, les *salmonella* (*Salmonella typhi*, *Salmonella B*) ne peuvent pas être inhibés. Quant à la fraction méthanolique, seuls les *salmonella* résistent également à la concentration de 1mg/ml tandis qu'à 5mg/ml les *Salmonella B* résistent et les autres sont inhibés. Pour la fraction d'acétate d'éthyle, les *C. albicans* et les *S. flexneri* sont inhibés jusqu'à 5mg/ml. Avec la fraction chloroformique on n'a pas pu déterminer la concentration inhibitrice sur les différents microorganismes.

Tableau III- Résultats de l'évaluation de l'activité antiparasitaire de *Maytenus undata*

	1mg/ml	5mg/ml	15mg/ml
<i>Giardia</i>	+ +	+	-
<i>Amibes (Ent. histolytica ou Ent. coli)</i>	+ +	+	-
<i>T. vaginalis</i>	+	-	-

+: rares kystes, ++: beaucoup de kystes, -: ni kystes ni formes mobiles, Ee: extrait éthanolique.

Quant à l'évaluation antiprotozoaire, selon les concentrations de l'extrait éthanolique, le nombre de parasites mobiles a été sensiblement réduit au sixième jour de l'expérience. A la concentration de 1 mg/ml, on a constaté beaucoup de kystes formés chez les amibes et les giardias dès le quatrième jour avec quelques formes mobiles (1 à 2/champ). A la concentration de 5 mg/ml, de rares kystes (2 à 3/champ) ont été observées mais aucune forme mobile au quatrième jour. A 15 mg/ml aucune forme kystique ni végétative n'était observée. Pour *Trichomonas vaginalis*, on a seulement observé au sixième jour de rares kystes à la concentration de 1mg/ml, mais à la concentration de 5 mg/ml et 15 mg/ml ni les parasites mobiles ni les kystes n'ont été observés. A 5 mg/ml la majorité des souches employées était inhibée par les extraits et fractions éthanoliques.

L'activité de l'extrait éthanolique de *Maytenus undata* peut être attribué à des polyphénols, des terpènes stérols et des saponosides qui sont d'ailleurs des composés chimiques qui sont présents dans de nombreuses plantes de la famille des *Celastraceae*. Les études phytochimiques sur l'espèce *Maytenus spp.* ont révélé la présence de triterpènes, flavonoïdes, sesquiterpène β -agarofurane et alcaloïdes de sesquiterpène evoninoate ont été isolés et on a étudié leurs activités biologiques comme antitumeur, antimicrobien et comme insecticide par exemple *Maytenus scutioides* [6-8].

On constate également que souvent l'extrait et la fraction éthanolique répondent à la même valeur inhibitrice, ce qui justifie que les composés actifs sont conservés même si le volume est réduit. Les plantes contenant les tanins sont plus intéressantes dans la prévention des cancers. Les polyphénols jouent un grand rôle dans les activités antioxydantes et antiradicalaires dans les cellules et sont réputés antitumoral du fait de leur pouvoir antioxydant sur les cellules [2]. L'activité antimicrobienne portée sur les bactéries Gram négatifs et Gram positifs et les champignons ont montré que tous les différents extraits (chlorofomiques, méthanoliques et éthanoliques) sont actifs sur les bactéries Gram négatifs et Gram positifs et *C. albicans* à 200 μ g/ml.

Les études phytochimiques et pharmacologiques de l'espèce *Maytenus forsskaoliana* ont démontré quatre biomolécules friedelin, β -amyrin, β -sitosterol, beturin et leurs structures chimiques ont été établies (9). Ces biomolécules n'avaient aucun signe clinique lors des tests pharmacologiques [10]. β -sitosterol et beturin isolés de l'extrait chloroformique ont présenté avec une activité prononcée de beturin sur les bactéries Gram négatifs et Gram positifs avec la concentration minimale inhibitrice et une concentration minimale bactéricide de 20 μ g/ml. L'acide maytenfolique montre une activité antimicrobienne modérée par inhibition de la croissance de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* [11]. *M. ilicifolia* (Schrad.) Planch. et *M. aquifolium* Mart. (*espinheira-santa*) étaient employés dans le traitement de l'ulcère [12-15]. Les résultats des études de cytotoxicité par la méthode de Brine Schrimp portaient sur les oeufs de brine schrimp, *Artemia salina* (Leach), un grand nombre de larves (*nauplii*) obtenues a été mesuré, les extraits chloroformiques et éthanoliques ont respectivement montré une activité très élevée avec IC₅₀ 190, 1000 μ g/ml. L'analyse *in vitro* des fractions lors de l'activité antioxydant, basée sur les réactions avec 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) a révélé que l'activité antioxydante est associée aux composés de polarité intermédiaire [2]. Il serait dû à l'acide 3, 4-secotriterpene et acide 20-epi-koetjapic qui inhibaient potentiellement la génération de l'anion superoxide (IC₅₀ = 1.9 μ M) (16). De même l'extrait éthanolique total est classé non toxique, car les études toxicologiques portant sur les rats ont montré qu'à 2 g/kg l'animal ne manifeste aucun signe clinique de toxicité. On signale que lors des travaux de Muhammad et ses collaborateurs [16] ceux-ci ont isolé à partir des parties aériennes de *Maytenus undata* quatre nouvelles molécules dont l'une est l'acide Koetjapic qui inhibait la croissance de *Staphylococcus aureus*, et l'autre, methicilline à laquelle résistent *S. aureus*, et *Pseudomonas aeruginosa*, avec CMI comprise 3.125-6.25 μ g/ml [16].

CONCLUSION

L'extrait brut a été préparé en utilisant la méthode de macération se rapprochant du mode de préparation traditionnel afin de permettre la justification scientifique de la valeur thérapeutique chez les patients. Cette méthode de macération permet d'obtenir les principes actifs non dénaturés conservant au maximum leur pouvoir curatif [17]. La méthode employée permet également d'obtenir un artéfact de biomolécules (les polyphénols, les saponosides et les terpènes stérols) dont leur efficacité antimicrobienne et antifongique a été étudiée. En effet, dans le cas d'une amibiase intestinale aiguë accompagnée d'une diarrhée, le traitement par les amoebicides tissulaires s'impose [18]. L'usage antidiarrhéique des écorces de *Maytenus undata* par les tradipraticiens du Dispensaire de la Médecine Traditionnelle de Mamba semble être justifié par les résultats

obtenus sur les bactéries (*Escherichia coli*, *Salmonella B*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexineri*), les champignons (*C. albicans*) et protozoaires (*E. histolytica*, *T. vaginalis*). Nous pouvons conclure que les polyphénols, les terpènes stéroïdes et les saponosides sont responsables de cette activité. En effet, dans le domaine des produits naturels des plantes médicinales, il existerait une synergie d'action des substances chimiques [19]. De même, il s'avère nécessaire de poursuivre dans l'avenir la cristallisation des fractions actives et de les isoler afin d'établir leurs structures chimiques; et en même temps révéifier leur activité biologique. Cela permettra de comparer l'homogénéité des biomolécules actives de *Maytenus undata* à travers les autres plantes de la famille des *Maytenus* spp.

REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leurs remerciements au feu Kabakura Godefroid, qui était enseignant à l'Université Nationale du Rwanda d'avoir initié la recherche sur cette plante médicinale au sein de l'IRST et à l'UNR en vue de la mettre en valeur comme phytomédicament.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Sneden, A.T., Beemsterboer, G.L, Normaytansine (1980) *A antileukemic Ansa Macrolide from Maytenus Buchananii*. Journal of Natural products, **43**: 637-640
- [2] Macari, P.A., Portela, C.N., Pohlit, A.M *Antioxidant, cytotoxic and UVB-absorbing activity of Maytenus guyanensis* Klotzch. (Celastraceae) bark extracts, Food Chemistry, **47**: 403-406
- [3] J.P. Mugiraneza et M. Kabakura (2006) *Etude chimique de quelques plantes antidiarrhéiques et amoebicides utilisées en Médecine Traditionnelle au Rwanda* In Rwanda Medical Journal/Revue Médicale Rwandaise, 37^{ème} Année Volume 65(1) **58**: 27-32
- [4] Puyvelde V.L. (1988) *Contribution to the study of Rwandese medicinal plants*. Leiden 155:11
- [5] Rwangabo, PC. (1986) *Recherche des substances chimiques susceptibles de justifier l'activité biologique de quelques plantes utilisées largement en Médecine Traditionnelle Rwandaise*, Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences pharmaceutiques, Université Libre de Bruxelles
- [6] Gonzalez, A.G, Alvazena, N.L., Bazzocchi, I.I., Laverro A.G., Moujir, L. (1999) *Triterpene Trimers from Maytenus scutioides: Cycloaddition compounds*, Journal of Natural products, **62**: 1185-1187

- [7] Chavez. H., Steve-Braun, A., Lavel A.G. and Gonzalez, A.G (1998) *Friedelane triterpenoids from Maytenus macrocarpa*, Journal of Natural products, **61**: 82-85
- [8] Orrabi, K.Y., Al-Quasoumi, S.I., El-Olemy, M.M., Mosa, J.S., and Muhamamd, I., Dihydroagarofuran Alkaloid and triterpenes from *Maytenus Arbutifolia* (2001) *Phytochemistry*, **58**: 475-480
- [9] Kadria S.E, Rwaida A.A, Jaber S.M. and Abdel A.M. (2003) *Phytochemical and Pharmacological studies of Maytenus forsskaoliana*, Saudi Pharmaceutical Journal, vol.**11**, N° 4 p184-191
- [10] Reiner, R., *Antibiotics und Ausgewahlte Chemotherapeutica*, Georg Thieme Verlag. Stuttgart, 1974
- [11] Orabi K.Y.; AL-Qasoumi S.I.; Olemy M.M.; Mossa J.S.; Muhammad I., (2001) *Dihydroagarofuran alkaloid and triterpenes from Maytenus heterophylla and Maytenus arbutifolia*, *Phytochemistry (Phytochemistry)*, vol. 58, n°3, pp. 475-480
- [12] Vilegas, W.; Sanommiya, M.; Rastrelli, L.; Pizza, C. (1999) *Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of Maytenus aquifolium leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion*. Journal of Agricultural and Food Chemistry
- [13] Souza-Formigoni, M.L.O.; Oliveira, M.G.M.; Monteiro, M.G.; Silveira-Filho, N.G.; Braz, S.; Carlini, E.A.(1991) *Antiulcerogenic effects of two Maytenus species in laboratory animals*. Journal of Ethnopharmacology, **34**(1): 21-27
- [14] Gonzalez, F.G.; Portela, T.Y.; Stipp, E.J.; Di Stasi, L.C. (2001) *Antiulcerogenic and analgesic effects of Maytenus aquifolium, Sorocea bomplandii and Zolernia ilicifolia*. Journal of Ethnopharmacology, **77**(1): 41-47
- [15] Queiroga, C.L.; Silva, G.F.; Dias, P.C.; Possenti, A.; Carvalho, J.E. 2000. *Evaluation of the antiulcerogenic activity of friendelan- 3b-ol and friedelin isolated from Maytenus ilicifolia (Celastraceae)*. Journal of Ethnopharmacology, **72**(3): 465-468
- [16] Muhammad I., Khalid A.E., Jaber S.M., Mansour S.A., Farouk S.E., Alice M.C., Charles D.H., Stephen O., and Alejandro M.S.M. (2000) *Bioactive 12-Oleanene Triterpene and Secotriterpene Acids from Maytenus undata*, Journal of Natural product, **63**(5): 605-10
- [17] Pamplona, R. (2001) *Guide des plantes médicinales*, éditorial safeliz, Alfajarin, Zaragoza (Espagne), vol **2**, p. 72-357
- [18] Gentilini M., Amat-Rose JM., Bricaire F., Brousse G., Brucker G., Caumes E., Chippaux A. (1993) *Médecine tropicale*, 5^{ème} édition, Flammarion, Paris pp.345-359
- [19] Jacques Fleurentin (2006) *Ethnopharmacologie appliquée de la plante médicinale au médicament*, Document pédagogique, Metz, France