

Manuscrit reçu le 9 décembre 2009 et accepté le 17 janvier 2011

**Activité anti-mycobactérienne *in vitro* des extraits de *Phyllanthus amarus*
(Schum et Thonn) sur les souches de *Mycobacterium ulcerans* en
Côte d'Ivoire.**

COULIBALY Bakary^{1 2**}, N'GUESSAN Kouassi Raymond², AKA N'guetta², EKAZA Euloge³,
N'GOLO David Coulibaly³, TRÉBISSOU Noël¹, OUATTARA Lassiné², BAH I Calixte¹,
COULIBALY Adama¹, ASSANDÉ Jean Marc², MOHUI Philomène², YAO Hubert², DJAMAN
Allico Joseph¹ & DOSSO Mireille^{2 3}

¹ Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique, UFR Biosciences, Université de Cocody,
22 BP 582 Abidjan 22

² Unité des Mycobactéries tuberculeuses et atypiques, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, 01 BP
490 Abidjan 01

³ Unité de Microbiologie Moléculaire, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, 01 BP 490 Abidjan
01

RÉSUMÉ

Malgré les progrès réalisés en médecine humaine au cours des dernières années, le traitement médicamenteux des mycobactéries restent insuffisants face à l'émergence des fléaux tels que la tuberculose, la lèpre et l'ulcère de Buruli. Le développement de nouvelles molécules antimycobactériennes s'avère indispensable pour lutter contre ces fléaux. C'est dans ce but que cette étude a été réalisée en évaluant l'activité des extraits aqueux et éthanolique de *P. amarus* sur la croissance *in vitro* de sept souches de *Mycobacterium ulcerans* isolées de régions différentes de la Côte d'Ivoire.

Tous les extraits ont exercé une activité inhibitrice effective sur les souches testées à 32 mg/ml après une période de 8 semaines d'observation. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait aqueux était la même que celle de l'extrait éthanolique. La valeur de la CMI était égale pour toutes les souches de *M. ulcerans*. Cependant les CI₅₀ variaient d'une

* Auteur à qui adresser la correspondance.
Adresse courriel : benipoho7@yahoo.fr

souche à l'autre et d'un extrait à l'autre. La souche de référence H37Rv de *M. tuberculosis* a été utilisée pour le contrôle de qualité et pour optimiser la méthode de détermination de l'activité anti-mycobactérienne à partir des mycobactéries.

Mots clés : *M. ulcerans*, *M. tuberculosis*, *Phyllanthus amarus*, activité anti-mycobactérienne, ulcère de Buruli.

ABSTRACT

Despite the human medical advancements over the past years, medical treatment of mycobacteria remains ineffective before rampant diseases such as tuberculosis, leprosy and Buruli ulcer. The development of new antimycobacterial molecules is necessary to fight against these plagues. It is in this objective that our study has been conducted in order to evaluate the activity of the aqueous solution and ethanolic of *Phyllanthus amarus* on the *in vitro* growth of seven isolates of *Mycobacterium ulcerans* of different areas of Ivory Coast.

All extracts exerted an effective inhibitory activity on the tested strains at 32 mg/ml after a period of eight weeks of observation. The minimal inhibitory concentration (MIC) of aqueous and ethanolic extract were similar with MIC values one all tested strains of *M. ulcerans*. However, the CI_{50} vary from one strain to another and from one extract to another. The reference *M. tuberculosis* H37Rv strain was used for the quality control and to optimize the method of determination of anti-mycobacterial activity to the mycobacteria.

Key words : *M. ulcerans*, *M. tuberculosis*, *Phyllanthus amarus*, antimycobacterial activity, Buruli ulcer.

I-Introduction

Mycobacterium ulcerans est une mycobactérie de la même famille que celle responsable de la tuberculose et de la lèpre. Elle provoque des vastes ulcérations cutanées chroniques et invalidantes appelées communément ulcère de Buruli. La Côte d'Ivoire est le premier pays à avoir fait de la lutte contre cette affection un problème de santé publique (1). L'ulcère de Buruli est en expansion en Côte d'Ivoire avec plus de 17861 cas cumulés en 2005 (2, 3). La maladie y sévit à l'état épidémiologique dans quatre régions principalement, qui sont le centre (Yamoussoukro), le centre-ouest (Daloa), le centre Nord (Bouaké) et le sud ouest (San Pedro). C'est la deuxième maladie mycobactérienne après la tuberculose en Côte d'Ivoire. (2). Le traitement médical repose sur l'utilisation de substances antituberculeuses, antihanseniennes ou antibiotiques presque toujours sans antibiogramme préalable. *M.*

ulcerans est classiquement résistant à l'isoniazide, à l'éthambutol, l'acide para amino salicylique et l'éthionamide (4) mais il est sensible à la rifampicine (4,5), la streptomycine et la kanamycine (4). *In vitro* et expérimentalement chez la souris la rifampicine possède une activité remarquable. Le traitement médicamenteux actuel repose sur l'utilisation de l'association de la rifampicine et de la streptomycine (6). Malgré les progrès observés dans la prise en charge médicale, l'arsenal thérapeutique de l'ulcère de Buruli est limité (7, 8,9).

P. amarus est une plante herbacée du genre *Phyllanthus* appartenant à la famille des Euphorbiacées. Elle est très répandue dans les zones tropicales des deux hémisphères (10,11). Cette plante aux multiples vertus thérapeutiques selon les investigations scientifiques menées, notamment en Amérique latine et dans le sous continent indien se caractérise par diverses actions entre autre :

- ses propriétés antivirales (12) notamment dans le traitement des hépatites virales.
- ses propriétés antifongiques et antibactériennes (13). En Inde, cette plante est utilisée dans le traitement traditionnel de la tuberculose (11).

En vue de contribuer à la recherche de nouvelles molécules antimycobactériens spécifiques contre *M. ulcerans* les activités antimycobactériennes de l'extrait aqueux et éthanolique de *P. amarus* ont été évaluée sur la croissance *in vitro* des souches de *M. ulcerans* isolées chez des patients porteurs d'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire.

II-MATÉRIEL ET MÉTHODES

II-1-Matériel végétal

Le matériel végétal se compose de poudre obtenue à partir de l'extraction aqueuse et éthanolique des feuilles séchées de *P. amarus*. Ces feuilles ont été récoltées sur le site du campus universitaire d'Abobo-Adjamé (Abidjan, Côte d'Ivoire) en juin 2007 et identifiées sous le numéro et de la façon suivante : *Phyllanthus amarus*, Côte d'Ivoire : région d'Abidjan, campus universitaire d'Abobo-Adjamé, 16 Décembre 2007, Coulibaly Bakary n° 21195 bis, in Herbar Aké Assi.

II-2-Souches microbiennes

Le support microbien est composé de 7 souches d'origine géographique différente de *M. ulcerans* isolées d'échantillons d'exsudats et de biopsies prélevées sur des patients atteints d'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire. Les échantillons provenaient des sites de prise en charge à savoir : Institut Raoul Follereau d'Adzopé (n=2), Centre Padre Pio anti-ulcère de Buruli

(n=2) Manikro-Bouaké (n=1), Zoukougbeu-Daloa (n=2), Une souche de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) a été utilisée pour le contrôle de qualité de croissance. Les souches ont été confirmées par PCR IS 2404 par l'unité de microbiologie moléculaire de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. L'ADN de la souche de référence ITM-94-511 de *M. ulcerans* provenant de l'Institut de Médecine tropicale d'Anvers a été utilisée comme témoin positif pour la détection de la séquence IS 2404

II-3-Prélèvement des échantillons.

Du fait de l'illettrisme de la grande majorité des patients, un consentement oral de chacun ou du tuteur pour les enfants mineurs a été obtenu.

Exsudats : Quatre écouvillons de sérosité ont été réalisés par site d'ulcération chez chaque patient. Ces écouvillons ont été immédiatement déchargés dans un tube contenant 2 ml d'un mélange de milieu Middelbrook 7H9 (Difco) (4 Volumes) supplémenté de chlorure de cétypyridinium monohydraté (Sigma) à 1 % (CPC) dans un rapport (4 volumes 7H9 et 2 volumes CPC).

Biopsies : Des prélèvements profonds de peau qui vont jusqu'à l'hypoderme c'est-à-dire la graisse sous-cutanée ont été effectués. Les échantillons ont été plongés immédiatement dans 2 ml du mélange 7H9+CPC.

Tous les échantillons ont été transportés au laboratoire dans une glacière contenant des « ice packs » conservés au préalable à -20°C. Les prélèvements ont été traités immédiatement ou conservés à +4°C et traités les 7 jours suivant le prélèvement.

II-4-Culture

Ecouvillonnages : Le mélange est centrifugé directement à 3000 trs/min sans décontamination préalable. Le culot est suspendu dans 2 ml de NaCl à 9 ‰. Un volume de 100 µl de la suspension estensemencé directement, sur 3 tubes de milieu Löwenstein-Jensen (L-J) supplémenté avec 0,75 % de glycérol (L-J+glycérol).

Biopsies : Le culot de centrifugation du broyat subit une décontamination par la méthode à l'acide sulfurique 4%. Le culot de décontamination est mis en suspension dans 1 ml de NaCl à 9 ‰ et 100 µl de la suspension sont estensemencé sur 3 tubes de milieu L-J+glycérol.

Les tubesensemencés sont incubés à +30°C pendant six mois. Les observations se font tous les jours et le temps d'apparition des colonies visibles est noté.

Les colonies apparues ont été confirmées par PCR utilisant la séquence d'insertion IS2404 spécifique à *M. ulcerans* par l'Unité de Microbiologie Moléculaire de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

II-5-Méthodes d'extraction de *P. amarus*

Les plantes de *P. amarus* récoltées sur le site du campus universitaire d'Abobo-Adjamé (Abidjan, Côte d'Ivoire) sont séchées à l'abri du soleil à température ambiante pendant six semaines. Les feuilles séchées sont broyées. Une poudre de couleur verdâtre est obtenue. Cette poudre est traitée selon la méthode décrite par Guédé Guina et coll. (1993) (13) pour en obtenir l'extrait brut avec l'eau distillée et de l'éthanol 70 %.

Pour l'extrait aqueux, 100 g de poudre sèche sont macérés dans 2 L d'eau distillée sur un agitateur magnétique Ikamag-RTC pendant 24 h. La solution est filtrée 2 fois sur coton hydrophile et sur papier Whatman 3MM. Le filtrat est séché après évaporation à pression réduite au rotavapor Büchi à 60°C. Une poudre de couleur marron est ainsi obtenue.

Pour l'extrait éthanolique 5 g de poudre de l'extrait aqueux seront macéré dans 100 ml d'éthanol 70% sur un agitateur magnétique Ikamag- RTC pendant 48 heures. La solution est filtrée deux fois sur du coton hydrophile et sur du papier Watman. Le filtrat est séché après évaporation à pression réduite au rotavapor Büchi à 60°C. Une poudre de couleur marron est aussi obtenue.

II-6-préparations des milieux de culture.

II-6-1- Milieu Löwenstein-Jensen base (PS PARK scientific limited Northampton, UK 500g).

Une masse de 37.2 g de poudre sont dissouts dans 600 ml d'eau distillée stérile contenant 12 ml de glycérol. Le mélange est chauffé lentement en agitant constamment jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène, puis stérilisé à l'autoclave pendant 15 minutes. à 121°C

II-6-2-Préparation des œufs frais

Les œufs sont trempés pendant 30 min dans une solution de soude 5%, puis 10 minutes dans de l'alcool 70°. Les œufs sont cassés à coté de la flamme du Bec-Bunsen et leur contenu est renversé dans une éprouvette graduée jusqu'à obtenir un volume de 1000 ml. Ce volume d'œuf est mélangé au 600 ml de L-J au MOULINEX de marque (Waring commercial, Laboratory Blender). Le milieu L-J est constitué du mélange des 600 ml de L-J base stérile et aux 1000 ml d'œufs.

II-7-Détermination de l'activité antimicrobactérienne

II-7-1-Préparation de l'extrait végétal.

Une solution mère de 100 mg/ml de l'extrait végétal a été préparée par dissolution de 10g de poudre de chaque extrait dans 100 ml d'eau distillée. Toutes ces solutions sont stérilisées à l'autoclave pendant 15 min à 121 °C.

II-7-2-Incorporation de l'extrait végétal au milieu à l'œuf de Löweinstein –Jensen (méthode de Canetti, Rist et Grosset, 1963) (14)

La solution mère de l'extrait est incorporée au milieu L-J pour réaliser des dilutions finales de raison géométrique 2 dont les concentrations s'échelonnent de 64 mg/ml à 0.125 mg/ml à raison de 5 ml par tube. Le pH des milieux est déterminé sur un volume de 5 ml non distribué pour chaque concentration avec extrait à l'aide d'un pH-mètre de marque. Metrohn 632-pH-Meter Swiss Made. Tous les milieux (avec extrait et sans extrait) sont coagulés en position incliné à 85°C pendant 40 minutes

II-7-3- Préparation de la suspension microbienne.

À partir des souches repiquées, une suspension bactérienne est réalisée en eau distillée stérile et ajusté par opacimétrie avec l'étalon BCG de 1 mg/ml. L'ensemble des milieux (essai et témoin) est inoculé avec 0.2 ml de l'inoculum, puis incubé à 30 °C. Les tubes sont observés pendant 8 semaines. La souche H37Rv de *M. tuberculosis* a été incubée à 37 °C. Les tests sont répétés 3 fois.

Le dénombrement des colonies s'est fait à la 7^{ème} et 8^{ème} semaines par comptage direct. Il est exprimé en pourcentage de survivance, calculé par rapport à 100 % de survivance dans les tubes témoins. Les essais (tubes avec extraits) sont examinés quand la croissance dans les tubes témoins (tubes sans extrait) est visible. La méthode de calcul du pourcentage de survivance peut se résumer par la formule suivante :

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

où :

S : survivance des germes (en %),

N : nombre de colonies dans le tube témoin,

n : nombre de colonies dans le tube expérimental.

La CMI, est déterminée selon la méthode décrite par Heifets (1988) (15). C'est la plus faible concentration d'extrait végétal où il est dénombré 1 % de bactéries survivantes par rapport au tube témoins.

La CI 50 a été déterminé graphiquement à partir de la courbe de sensibilité de *M. ulcerans* en fonction des concentrations d'extrait végétal.

II-8-Analyse statistique.

L'exploitation des résultats à été effectué en utilisant l'analyse des variables (Anova-one way) suivant le test "t" de Student. La différence est considéré comme significative pour un niveau de probabilité p inférieur à 0.05. Le logiciel est Graph Pad (version 5.1, Software, USA).

III-RÉSULTATS

III-1-Effet de l'extrait aqueux et éthanolique de *P. amarus* sur le pH du milieu de culture L-J.

L'extrait aqueux de *P. amarus* a des valeurs de pH compris entre 6.97 et 6.62 (n= 3). Ceux de l'extrait éthanolique sont compris entre 6.97 et 5.94. (n=3)
La valeur normale du pH du milieu de L-J selon le fabricant est 6.6 ± 0.2 . Ces valeurs sont proches statistiquement ($p > 0.05$). L'ajout de l'extrait aqueux et éthanolique de *P. amarus* ne modifie pas significativement le pH du milieu de L-J.

III-2-Influence de l'extrait aqueux et éthanolique de *P. amarus* sur la croissance *in vitro* de *M. ulcerans*.

Les effets de l'extrait aqueux et éthanolique de *P. amarus* sur la croissance *in vitro* des souches de *M. ulcerans* ont donné les résultats suivants.

-Les photographies 1 et 2 donnent l'aspect des cultures de *M. ulcerans* après huit (8) semaines d'incubation sur milieu L-J en présence ou en absence des différentes concentrations de l'extrait aqueux et éthanolique de *P. amarus*.

Dans les tubes témoins (sans extrait) il est observé une croissance maximale des germes. Dans les tubes contenant les concentrations croissances des extraits aqueux et éthanolique de *P. amarus* (0.125 mg/ml ; 0.25 ; 0.5 ; ; 64 mg/ml) il est observé une diminution progressive et dose-dépendante du nombre de colonies.

A 32 mg/ml il est noté une absence totale de colonies dans les tubes contenant cette concentration pour toutes les souches de *M. ulcerans* (Photographies : 1et 2).



Photographie 1 : Aspect des cultures *in vitro* de *M.ulcerans* après 8 semaines d'incubation à 30 °C sur milieu de L-J incorporé à l'extrait aqueux de *P. amarus* (06-120)

-T1 : **Témoin** (tube sans extrait) : croissance maximale du germe

-0.5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16 mg/ml (tubes avec extrait): diminution progressive du nombre de colonies dans les tubes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente.

- 32 mg/ml et 64 mg/ml (tubes avec extrait): pas de croissance visible à l'œil nu du germe à ces deux concentrations.

Dans les tubes témoins (sans extrait) il est observé une croissance maximale des germes. Dans les tubes contenant les concentrations croissances des extraits aqueux de *P. amarus* (0.125 mg/ml ; 0.25 ; 0.5 ; ; 64 mg/ml) il est observé une diminution progressive et dose-dépendante du nombre de colonies.



Photographie 2 : Aspect des cultures *in vitro* de *M.ulcerans* après 8 semaines d'incubation à 30 °C sur milieu de L-J incorporé à l'extrait éthanolique de *P. amarus* (06-120)

-T1 : **Témoin** (tube sans extrait): croissance maximale du germe

1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16 mg/ml (tubes avec extrait): diminution progressive du nombre de colonies dans les tubes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente.

- 32 mg/ml et 64 mg/ml (tubes avec extrait): pas de croissance visible à l'œil nu du germe à ces deux concentrations

En considérant comme 100% la survivance des germes dans le tube témoin de croissance, les différentes valeurs obtenues par ce procédé en ajoutant les autres concentrations ont donné le tracé de la figure 1. Ce sont les anti-mycobiogrammes obtenus à partir des pourcentages de survivance en fonction des différentes concentrations des extraits de *P. amarus*. L'allure globale de ces courbes est décroissante et exprime l'inhibition progressive et dose-dépendante de la croissance *in vitro* des souches de *M. ulcerans*. Ces courbes ont permis de déterminer les paramètres anti-mycobactériens que sont les concentrations pour 50 % d'inhibition (CI_{50}) et la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Pour toutes les souches mycobactériennes testées, la CMI de l'extrait aqueux est égale à celle de l'extrait éthanolique (figures 1).

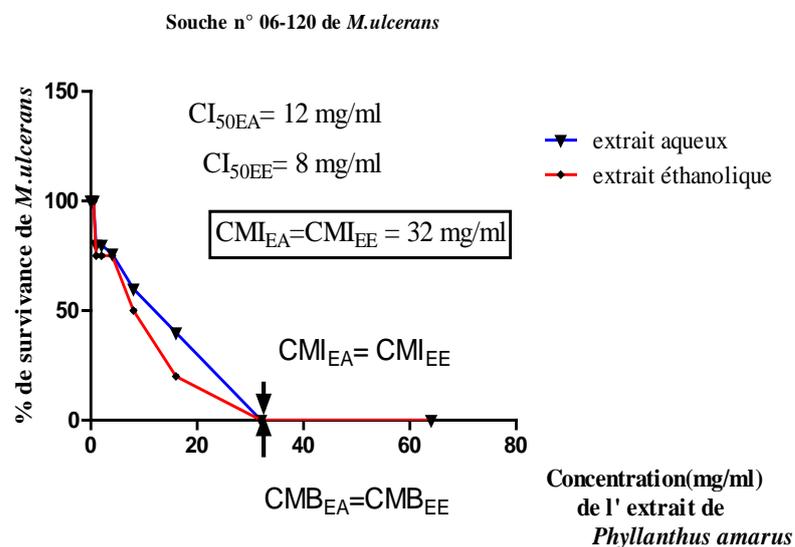


Figure 1 : Courbe effet dose-réponse de l'extrait aqueux et éthanolique de *Phyllanthus amarus* sur la croissance *in vitro* de *M. ulcerans*

La figure 1 représente les anti-mycobiogrammes obtenus à partir des valeurs du dénombrement des colonies sur les tubes témoins et les tubes expérimentaux. Ces courbes représentent la survie des germes au fur et à mesure que la concentration d'extrait augmente. La courbe s'annule à 32 mg/ml. Cette valeur est donc la concentration minimale inhibitrice à laquelle l'extrait aqueux (EA) et l'extrait éthanolique (EE) inhibe toute croissance à l'œil nu de *M. ulcerans*. Les CI_{50} sont les concentrations auxquelles la moitié des germes est inhibé. Ce sont des valeurs qui ont été déterminées graphiquement. Ces valeurs sont de 12 mg/ml pour l'extrait aqueux et 8 mg/ml pour l'extrait éthanolique.

Pour la souche de référence H₃₇Rv de *M. tuberculosis*, la CMI est de 16 mg/ml et la CI_{50} est de 3.2 mg/ml. En comparant la CMI de *M. ulcerans* à celle de la souche de référence de *M.*

tuberculosis, il ressort que l'extrait aqueux et éthanolique de *P. amarus* sont deux fois plus actifs sur *M. tuberculosis* que *M. ulcerans*.

III-3-Effet comparé de l'extrait aqueux et éthanolique de *P. amarus* sur la croissance *in vitro* de *M. ulcerans*.

La figure 1 représente les antimycobiogrammes obtenus à partir des valeurs du dénombrement des colonies sur les tubes témoins et les tubes expérimentaux. Ces courbes représentent la survie des germes au fur et à mesure que la concentration d'extrait augmente. La courbe s'annule à 32 mg/ml pour les concentrations d'extrait aqueux et éthanolique. Cette valeur est donc la concentration minimale inhibitrice à laquelle l'Extrait aqueux (EA) et l'extrait éthanolique (EE) inhibent toute croissance visible à l'œil nu de *M. ulcerans*. La CMI de l'extrait aqueux est la même que celle de l'extrait éthanolique pour toutes les souches testées. Les CI_{50} sont les concentrations aux quelles la moitié des germes est inhibé. Ce sont des valeurs qui ont été déterminées graphiquement. Ces valeurs varient d'une souche à l'autre et d'un extrait à l'autre. Ainsi pour la souche n° 06-120 (origine Manikro, Bouaké) la CI_{50} de l'extrait aqueux est de 12 mg/ml alors que celle de l'extrait éthanolique est de 8 mg/ml (figure 1).

IV-DISCUSSIONS

Cette étude avait pour objectif de déterminer une activité anti-mycobactérienne de *Phyllanthus amarus*. Pour ce faire, deux types d'extraction ont été réalisés pour obtenir l'extrait brut : une extraction à l'eau distillée et une extraction utilisant un mélange éthanol eau 70/30 (v/v).

Toutes les souches de *M. ulcerans* testées ont été sensibles aux extraits aqueux et éthanolique de *P. amarus* selon une relation dose-effet, cela s'est traduit par une allure décroissante de toutes les courbes de sensibilité correspondant à la diminution progressive du nombre de survivants au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration des extraits (figure 1).

Cet effet inhibiteur de croissance de *P. amarus* s'est accru à partir de la concentration de 32 mg/ml. En effet, les résultats obtenus à partir de cette concentration montrent qu'aucune souche de *M. ulcerans* n'a survécu. Cette observation suggère que cette plante contiendrait des substances qui inhiberaient les mycobactéries. Cela justifie dans une certaine mesure l'utilisation de la plante en milieu traditionnel dans le traitement de la tuberculose (11) et de plusieurs autres pathologies.

La comparaison des activités de l'extrait aqueux et de l'extrait éthanolique sur la base des CMI montre que l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique ont la même activité. Il est reconnu l'activité des plantes médicinales peut être améliorée en utilisant des solvants organiques(17,18). Les résultats de notre étude montrent que l'éthanol n'a pas amélioré l'activité de notre substance.

Plusieurs auteurs ont observé des différences de profil, en testant l'activité de certains antibiotiques usuels sur la croissance *in vitro* des souches de *M. ulcerans* d'origine géographique différente (19, 20,21). D'autres auteurs se sont basés sur ces variations génétiques pour classer les souches de *M. ulcerans* en fonction de leurs régions géographiques (22 23). Des études effectuées sur la sensibilité *in vitro* des souches de *M. ulcerans* à la clarithromycine, aux quinolones et à la rifampicine ont donné respectivement des CMI de l'ordre de 0.125 à 2 µg/ml ; de 0.1 à 2 mg/l et de 0.5 à 1 µg/ml (19, 20,24). Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues avec les extraits aqueux et éthanolique. En effet plusieurs travaux réalisés sur l'activité anti-infectieuse des plantes médicinales ont prouvé que l'activité des extraits totaux peut être améliorée par le fractionnement à l'aide des techniques chromatographiques qui permet de cibler les fractions actives (25). Les CMI obtenues au cours de notre étude suggèrent qu'il faut procéder à une purification ou à défaut à un fractionnement pour un meilleur rendement de ces extraits.

Cependant selon VANDER et al. (1989)(26) en extrapolant ces données à un être humain de 70 kg qui posséderait un volume sanguin de 5600 ml, la quantité d'extrait total de *P. amarus* dans le sang qui devrait inhiber l'action des souches de *M. ulcerans* serait de 179200 mg soit 2.56 mg/kg de p.c. Cette valeur serait 49 fois inférieure à la dose maximale tolérée (DMT) qui est estimée à 125 mg/kg de pc (27) chez la souris de race SWISS. Ce rapprochement montre que les extraits aqueux et éthanolique de *P. amarus*, actif *in vitro* sur les germes de *M. ulcerans* pourrait être utilisé sans risque majeur *in vivo* à des doses inférieurs à 125 mg/kg de poids corporel.

V-Conclusion

Cette étude s'inscrit dans le programme de la valorisation de la pharmacopée ivoirienne par la recherche de nouvelles molécules anti-infectieuses.

L'évaluation de l'effet des extraits aqueux et éthanolique de *P. amarus* a montré que ces extraits possèdent une activité anti-mycobactérienne marquée sur la croissance *in vitro* de *M. ulcerans*. La plante *P. amarus* contiendrait donc une substance inhibitrice de la croissance de

M. ulcerans Dans notre étude, la CMI déterminée est de 32 mg/ml. Cette étude confirme donc l'utilisation traditionnelle de cette plante dans le traitement de la tuberculose, de l'ulcère de Buruli et de plusieurs autres pathologies. Cependant ce travail mérite d'être approfondi par le tri-phytochimique afin de connaître la nature des principaux constituants chimiques actifs contenus dans les extraits. Ce qui va déboucher sur un arsenal thérapeutique amélioré à base de plante au profit des malades de l'ulcère de Buruli.

Références bibliographiques.

- 1- F. PORTAELS, Epidemiology of mycobacterial diseases. *Clin Dermatol*, **13** (1995) 207-222.
- 2- J. M. KANGA et E. D. KACOU, Aspects épidémiologique de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire. Résultats d'une enquête nationale. *Bull soc path Exot*, **94** (2001) 46-51.
- 3- J. AUBRY, L'infection à *Mycobacterium ulcerans* : aspects épidémiologique, cliniques et thérapeutiques. Com Insem Paris, (2006) 43 p.
- 4- H. DARIE, S. DJAKEAUX et Cautoclaud, Approche thérapeutique des infections à *Mycobacterium ulcerans*. *Bull Soc Pathol Exot*, **85** (1994) 355-358.
- 5- K. H. SCHRODER, Investigations into the relationship of *Mycobacterium ulcerans* and other Mycobacteria. *Ann Rev Respir Dis*, **111** (1975) 559-562.
- 6- S. ETUAFUL, B. CARBONNELLE, J. GROSSET, S. LUCAS et C. HORSFIELD, Efficacy of the combination rifampin-streptomycin in preventing growth of *Mycobacterium ulcerans* in early lesions of Buruli ulcer in humans. *Antimicrob Agents Chemother*, **49** (2005) 3182-6.
- 7- D. K. ESPEY, D. G. DJOMAN, I. DIOMANDE, M. DOSSO, M. Z. SAKI, J. M. KANGA, R. A. SPIEGEL, B. J. MARSTON, L. GORELKIN, W. M. MEYERS, F. PORTAELS, M. S. DEMING et J. R. HORSBURGH, Pilot study of treatment of Buruli ulcer with rifampicin and dapsone. *Int J Inf Dis*, **6** (2002) 60-65.
- 8- D. OUATTARA, J. P. MENINGAUD, L. KABA, A. SICA et H. ASSE, Les procédés de couverture cutanée dans le traitement des séquelles de l'ulcère de Buruli. À propos de 16 observations. *An Chir Plas Esth*, **48** (2003) 13-19.
- 9- J. GROSSET, Essai clinique d'un traitement de l'ulcère de Buruli par l'association Rifampicine –streptomycine. *Bull l'ALLF*, **14** (2004) 33.
- 10- A. R. S. SANTOS, O. P. RAFAEL et DE CAMPOS, Antinociceptive properties of extracts of new species of plants of the genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). Depart of pharmacol (CCB) University federal de Santa Catarina. (2000) 229-238.
- 11- L. TAYLOR, Secrets des plantes des forêts tropicales 2^{ème} édition presse, (2002). Page 16.
- 12- S. P. THYAGARAJAN, S. SUBRAMANIAN, T. THIRUNALASUN DARI, Effects of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus, **1**(1988) 764
- 13- A. L. MBAYE, Évaluation de l'activité antifongique *Cassia alata*, de *Misca* et de *Phyllanthus amarus* sur la croissance *in vitro* d'*Aspergillus flavus*. DEA, Université de Cocody, Abidjan. (2000) 35p.

- 14- F. GUÉDÉ GUINA, M. VANGAH-MANDA, D. HAROUNA, Proteins of MISCA a plant source concentrate against fungi. *J ethnopharmacol*, **105** (1993) 30-45.
- 15- G. CANETTI, N RIST et GROSSET, Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues anti bacillaires par la méthode des proportions. Méthodologie critères de résistance. Résultats. Interprétation. *Rev Tuberc Pneumol*, **27** (1963) 217-272.
- 16- L. HEIFETS, Qualitative and quantitative drug susceptibility tests in mycobacteriology. *Am Rev Respir Dis*, **137** (1988) 1217-1222.
- 17- I. B. SUFFREDINI, H. S. SADER, A. G. GONÇALVES, A. O. REIS, A. C. GALES, A. D VARELLA et R. N. YOUNES, Screening of antibacterial extracts from plants native to the brazilian amazon rain forest and atlantic forest. *Braz J Med Biol Res*, **37** (2004) 379-384.
- 18- J. J. ROJAS, V. J. OCHOA, S. A. OCAMPO et J. F. MUNOZ, Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine : a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *Compl Alter Med*, **6** (2006) 2-8.
- 19- F. PORTAELS, H. TRAORÉ, K. DE RIDDER et W. M. MEYERS, *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium ulcerans* to Clarithromycin. *Ant ag Chem*, **42** (1998) 2070-2073.
- 20- H. S. THANGRAJ, O. ADJEI, B.W. ALLEN, F. PORTAELS, M. R. W. EVANS, D. K. BANERJEE et M. H. WANSBROUOUGH-JONES, *In vitro* activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin, and rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterim ulcerans*. *J Ant Chem*, **45** (2000) 231-233.
- 21- B. JI, S. LEFRANÇOIS, J. ROBERT, A. CHAUFFOUR, C. TRUFFOT et V. JARLIER, *In vitro* and *in vivo* activities of Rifampin, Streptomycin, Amikacin, Moxifloxacin, R207910, Linezolid et PA-824 against *Mycobacterium ulcerans*. *Ant Ag Chem*, **50** (2006) 1921-1926
- 22- K. CHEMLAL, K. DE RIDDER, P. A. FONTEYNE, W. M. MEYERS, J. SWINGS et F. PORTELS, The use of IS 2404 restriction fragment length polymorphisms suggests the diversity of *Mycobacterium ulcerans* from different geographical areas. *Am J Trop Med Hyg*, **64** (2001) 270-273.
- 23- A. ABLOORDEY, R. KOTLOWSKI, J. SWINGS et F. PORTAELS, PCR amplification with primers based on IS2404 and GC- Rich reaped sequence reveals polymorphism in *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Micro*, **43** (2005) 448-451.
- 24- L. MARSOLIER, N. HONORÉ, P. LEGRAS, A. L. MANCEAU, H. KOUAKOU, B. C etARBONNELLE S. T. COLE, Isolation of three *Mycobacterium ulcerans* strains resistant to rifampin after experimental chemotherapy of mice. *Ant Ag Chem*, **47** (2003) 1228-1232.
- 25- K. M. KRA ADOU, N. Zihiri GUEDE et F. GUEDE-GUINA, Évaluation et amélioration par fractionnements chromatographiques d'une action antifongique de MISCA contre *Aspergillus fumigatus*. *Af Bio Med*, **7** (2002) 4-8.
- 26- A. J. VANDER, J. H. SHERMAN, S. Luciano DOROTHY, Physiologies humaines 2^{ème} édition Mc Graw-Hill ; Québec – Canada, (1989) p 801.
- 27- C. TUO, A. F. COULIBALY, B. N. DJYH, A. J. DJAMAN et F. GUEDE-GUINA, Étude de la toxicité aiguë de l'extrait total aqueux de *Phyllanthus amarus* (Schum et Thonn) chez les lapins, *J Sci Pharm Biol*, **6** (2006) 48 - 52.