

**ACTIVITE ANTI-DIARRHEIQUE DE *Thonningia sanguinea* (THOS)
SUR LES INFECTIONS A *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis*
lysotype 6 CHEZ LA POULE PONDEUSE**

**K. OUATTARA¹, A. COULIBALY¹, J-D. N'GUESSAN^{1,*},
A. J. DJAMAN^{1,2} et F. GUEDE-GUINA¹**

¹Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, UFR Biosciences -
Université de Cocody, Abidjan (Côte d'Ivoire)

²Laboratoire de Microbiologie - Institut National de Santé Publique (INSP)
d'Abidjan (Côte d'Ivoire)

(Reçu le 18 Octobre 2004, accepté le 10 Janvier 2005)

* Correspondance et tirés à part, e-mail: nguess100jd@yahoo.fr

RESUME

Les salmonelloses sont des infections causées par des entérobactéries du genre *Salmonella*. Elles déciment fréquemment les populations animales domestiques comme sauvages. Lorsque certaines conditions d'hygiène ne sont pas respectées, l'homme peut en être également victime ; c'est le cas des toxi-infections alimentaires et gastro-entérites plus ou moins graves.

Le traitement de ces pathologies repose essentiellement sur l'emploi d'antibiotiques. Mais, la diversité des souches de *Salmonella* impliquées et la pression de sélection par l'antibiothérapie favorisent l'apparition de mutants résistants aux antibiotiques. De ce fait, les traitements deviennent de moins en moins efficaces.

Les salmonelloses expérimentales sont induites chez les poules pondeuses et l'efficacité de THOS, substance naturelle d'origine végétale, est évaluée sur ces diarrhées. THOS qui a montré son efficacité dans le traitement de la diarrhée induite par *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* lysotype 6, souche multirésistante, pourrait être utilisé contre les salmonelloses.

Mots-clés : *Salmonellose, Thonningia sanguinea, traitement.*

ABSTRACT

**THOS'S ANTI-DIARRHOEIC ACTIVITY ON LAYING HENS'
INFECTIONS WITH *SALMONELLA ENTERICA* SEROTYPE
ENTERITIDIS LYSOTYPE 6.**

Salmonellosis are infections caused by enterobacteria just like *Salmonella*. They frequently decimate flocks of domestic and wild animals. They can also

affect humans when basic hygiene is not respected: more or less severe toxoinfections and gastro-enteritis are then observable. The treatment of these pathologies can be carried out by using antibiotics. But, as the strains of *Salmonella* causing salmonellosis are various and as there are difficulties bound to antibiotherapy, there exists strains of *Salmonella* that have become resistant to antibiotics. Consequently, the treatment with antibiotics is less and less efficient.

THOS, a vegetal substance, has treated efficiently experimental diarrhea induced with *S. enterica* serotype *Enteritidis* lysotype 6, which has got a real resistance in laying hens. With regards to those results, THOS could be used as a treatment against most animal salmonellosis.

Keywords: *Salmonellosis, Thonningia sanguinea, treatment*

I - INTRODUCTION

Les salmonelloses sont à l'origine de nombreuses pertes lorsqu'elles surviennent dans un élevage de volailles. Elles provoquent un syndrome diarrhéique dont les conséquences peuvent éventuellement être une perte de poids, une baisse ou un arrêt de ponte et une augmentation du taux de mortalité en absence de traitements [1, 2].

Le contrôle des salmonelloses repose essentiellement sur une antibiothérapie. Cependant, certaines souches de salmonelles dont *Salmonella enterica ser Enteritidis* lysotype 6 se montrent résistantes vis-à-vis de plusieurs classes d'antibiotiques [3]. Aussi, est-il nécessaire de trouver des molécules ou substances nouvelles pour lutter efficacement contre ces pathologies.

Nous avons donc entrepris d'étudier l'activité d'une substance naturelle végétale anti-microbienne [4, 5, 6, 7, 8, 9] que nous avons codifiée THOS, contre les diarrhées induites par la souche multirésistante, *S. enterica ser Enteritidis* lysotype 6, chez des poules pondeuses.

II - MATERIEL ET METHODES

II-1. MATERIEL

II-1-a. LE MATERIEL VEGETAL

Nous avons utilisé un extrait à base d'une plante parasite, *Thonningia sanguinea* appartenant à la famille des Balanophoracées, codifiée « THOS » [10]. THOS est utilisé traditionnellement en mixture dans le traitement des dermatoses, des diarrhées et de l'asthme [9].

Selon de nombreux travaux, THOS possède des propriétés anti-anaphylactiques [11], des actions hépatoprotectrices [12,13] et des propriétés antioxydantes [14,15].

II-1-b. LE MATERIEL ANIMAL

Pour cette étude, nous avons utilisé 100 poules pondeuses de race WARREN/ISA-BROWN. Elles sont âgées de 18 semaines et pèsent en moyenne 1,67 kg.

II-1-c. LA SOUCHE MICROBIENNE

La souche, *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* lysotype 6 N°981633, nous a été fournie par le Laboratoire de Bactériologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

II-1-d. LES MILIEUX DE CULTURE

Selon l'objectif poursuivi, nous avons utilisé comme milieux, préparés selon les recommandations du fabricant:

- le bouillon au Sélénite de Leifson qui est un milieu d'enrichissement sélectif.
- le milieu gélosé Hektoen, milieu d'isolement.
- les milieux Mannitol-Mobilité, Urée-Indole et Kligler-Hajna pour l'identification présomptive.

II-2. METHODES

II-2-a. EXTRACTION DE THOS

Les inflorescences de THOS sont découpées et séchées à l'abri du soleil pendant dix jours, puis broyées en poudre. 20 grammes de poudre sont pesés et ajoutés à 2 litres d'eau distillée. Le mélange obtenu est agité à la température ambiante pendant 48 heures avec un agitateur magnétique.

L'homogénat est filtré sept fois sur du coton hydrophile et une fois sur du papier Wattman 3 mm. Le filtrat obtenu est évaporé sous vide à 30°C dans un Rotavapor Büchi. La poudre obtenue constitue l'extrait total aqueux de THOS.

II-2-b. ELEVAGE

Les poules élevées en batteries sont réparties en 2 lots :

- un lot contaminé et non traité référencé : C-NT
- un lot contaminé et traité codifié : C-T

Chaque lot comprend 50 poules élevées chacune dans une cage individuelle munie d'un abreuvoir, d'un mangeoire et d'un pondoir. Les deux lots sont bien séparés l'un de l'autre pour éviter toute contamination horizontale.

II-2-c. INDUCTION DE LA SALMONELLOSE ET TRAITEMENT DE LA DIARRHEE PAR THOS

Après une incubation de 18 à 24 heures à 37°C, 3 colonies de *S. enterica* ser *Enteritidis* lysotype 6 sont mises en suspension dans 20 ml de bouillon Mueller-Hinton qui sont ensuite incubés pendant 3 à 4 heures à 37°C. Après ce délai, la concentration du germe est en général de l'ordre de 10⁷ bactéries par ml. 0,1 ml de cette préculture servant d'inoculum est ajouté à 50 ml d'eau de boisson pour la contamination d'une poule. Après une période d'acclimations d'une semaine sur le site d'élevage, les poules sont régulièrement contaminées suivant le même protocole toutes les 48 heures jusqu'au 22^{ème} jour.

Le traitement de la diarrhée induite débute le 26^{ème} jour, soit 4 jours après la fin de la période de contamination. Chaque poule malade à cet effet, reçoit tous les 2 jours 50 ml d'eau de boisson contenant l'extrait aqueux total de THOS à 10 mg/ml. Le traitement s'étend sur deux semaines.

Pendant toute la durée de l'expérimentation, des prélèvements de fientes fraîches sont réalisés tous les deux jours. Après les avoir pesées pour déterminer le poids humide (PH), les fientes sont placés à l'étuve à 130°C pendant 2 heures. Après ce délai, elles sont pesés et le poids sec (PS) est noté. La teneur en eau dans ces fientes est calculée selon cette relation [16]:

$$\% \text{ eau} = \frac{PH - PS}{PH} \times 100$$

Nous avons également déterminé les taux de mortalité dans les deux lots de poules.

II-2-d. RECHERCHE DE SALMONELLES DANS LES FIENTES

Afin de suivre l'induction de la salmonellose et d'apprécier l'efficacité du traitement par THOS, une recherche systématique des salmonelles a été entreprise dans les fientes. La flore microbienne étant d'ordinaire abondante et variée, il s'avère nécessaire de disposer d'une méthode permettant de mettre en évidence uniquement les salmonelles par l'emploi de milieux sélectifs classiques. Ainsi, quelques aliquotes de fientes fraîchement prélevées (10 g) sont ajoutées au bouillon au Sélénite de Leifson (100 ml) pour l'enrichissement sélectif. Après une incubation de 24 heures à 37°C, 0,1 ml de ce bouillon de culture est ensemencé sur milieu Hektoen puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

Les colonies suspectes vertes ou bleutées à centre noir ont été prélevées pour l'identification présomptive et ensemencées à cet effet les milieux Urée-Indole, Mannitol-Mobilité et Kligler-Hajna.

Ces analyses bactériologiques sont effectuées aux différentes étapes de l'expérimentation à savoir avant la contamination, pendant la salmonellose et après le traitement par THOS.

III - RESULTATS

III-1. MORTALITE

Durant la période de contamination, on a enregistré 7 poules mortes sur 50 dans le lot témoin (lot C-NT), soit 14% de mortalité et 8 mortes sur 50 dans le lot expérimental (lot C-T), soit un taux de mortalité de 16%.

Dès l'instauration du traitement par THOS, seule une poule morte sur un total de 42 (soit 2% de mortalité) a été observé dans le lot expérimental. Dans lot témoin par contre, on a noté 9 poules mortes sur 42, soit 21% de mortalité (*Tableau I*).

Tableau I : Influence de THOS sur le taux mortalité des poules

	Période de contamination		Période de traitement avec THOS*	
	Nombre de poules mortes	Taux de mortalité (en %)	Nombre de poules mortes	Taux de mortalité (en %)
Lot contaminé et non traité	7	14	9	21
Lot contaminé et traité	8	16	1	2

* Le nombre de poules par lot après la période de contamination, est déterminé par les survivants. Il est respectivement de 43 pour le lot contaminé et non traité et 42 pour le lot contaminé et traité.

III-2. TENEUR EN EAU DES FIENTES.

La figure 1 montre qu'avant la contamination, la teneur en eau dans les fientes varie de 38 à 39% dans les deux lots.

Cette teneur en eau augmente durant la salmonellose pour atteindre sa valeur maximale de 85% chez les poules non traités. Pour le lot traité avec THOS

par contre, on observe une diminution de la teneur en eau des fientes, car elle passe de 77 à 38,5%.

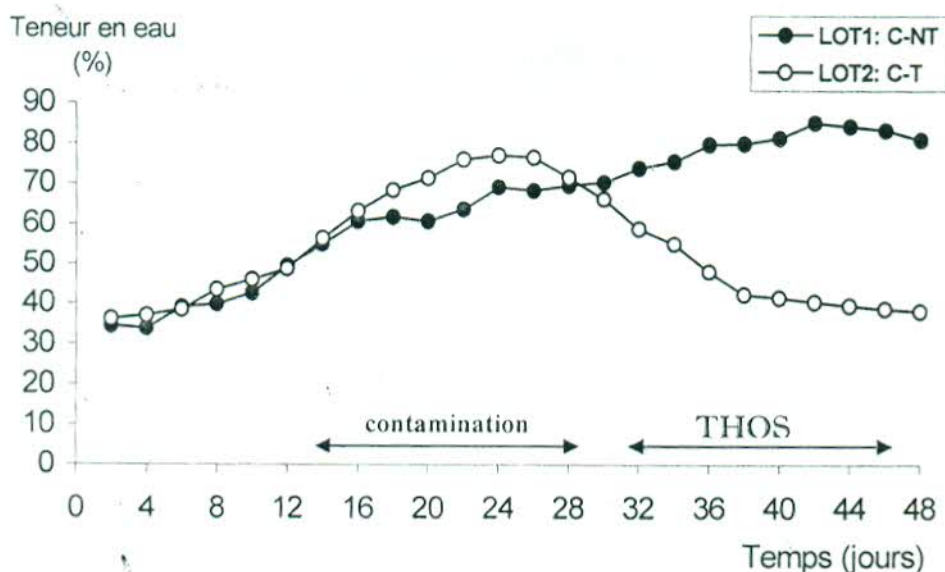


Figure 1: Influence de THOS sur l'évolution de la teneur en eau des fientes.

III-3. ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DES FIENTES

Avant la contamination, la culture sur bouillon sélectif Sélénite et gélose d'isolement Hektoen a révélé l'absence de salmonelles dans les fientes chez toutes les poules.

A la fin de la période de contamination, des prélèvements de fientes des mêmes poules ont été analysés. Elles ont, en effet, présenté toutes un bouillon sélénite trouble dont l'ensemencement sur gélose Hektoen après une incubation de 24 heures à 37°C, indique la présence de colonies transparentes à centre noir, c'est-à-dire des salmonelles (*Tableau II*).

Par ailleurs, une culture sur galerie minimale composée des milieux Urée-Indole, Mannitol-Mobilité et Kligler-Hajna a été réalisée. Le profil biochimique sur les différents milieux des colonies isolées est représenté dans le *Tableau III*.

Tableau II: Résultats de la recherche des salmonelles dans les fientes des poules

+ : culture positive

- : culture négative

Période de l'expérience	Milieux de culture	Fientes
Avant contamination.	Bouillon Sélénite	-
	Hektoen	-
Pendant la salmonellose.	Bouillon Sélénite	+
	Hektoen	+
Après traitement par THOS.	Bouillon Sélénite	-
	Hektoen	-

Tableau III : Profil biochimique des colonies isolées

+ : positif

- : négatif

Caractéristiques biochimiques	Fientes
Urée-Indole	-
Mannitol-Mobilité	+
Lactose	-
Glucose	+
H ₂ S	+
Gaz	+

Enfin, après le traitement par THOS, les analyses effectuées ont révélé l'absence de salmonelles dans les fientes (*Tableau II*).

IV - DISCUSSION

La diarrhée se définit comme l'émission de selles liquides ou aqueuse au moins 3 fois par jour [17]. Les causes principales à l'origine des diarrhées sont les infections microbiennes et les détériorations des conditions physico-chimiques de digestion qui relèvent souvent des intoxications alimentaires et

des insuffisances nutritionnelles. Ces causes sont à la base d'un dérèglement des mouvements péristaltiques et des échanges hydrominéraux de l'estomac et des intestins [18].

Notre objectif dans cette étude est de mettre en évidence les effets antidiarrhéiques de THOS sur les diarrhées d'origine microbienne induites par *S. enterica ser. Enteritidis lysotype 6* chez les poules pondeuses. A cet effet, nous avons suivi des paramètres tels que la fluidité des fientes, la présence des salmonelles et le taux de mortalité. Les résultats ont montré que la teneur en eau des fientes augmente après la contamination passant d'environ 39% à 85% ; cette augmentation de la teneur en eau traduit l'installation du syndrome diarrhéique.

Par ailleurs, les résultats de la recherche des salmonelles dans les fientes des poules malades a révélé la présence de salmonelles dans ces fientes, ce qui montre bien que notre inoculum a été efficace dans l'induction de la diarrhée. Nos résultats montrent à cet effet, que THOS ramène la teneur en eau des fientes à sa valeur obtenue avant la diarrhée. Cela se traduit par des fientes dont la fluidité est identique à celle des fientes émises par les poules saines. THOS empêche donc la déshydratation des poules, ce qui pourrait expliquer le fait que le taux de mortalité du lot traité est nettement inférieur à celui du lot non traité. En effet, la perte d'eau est la principale cause de mortalité dans les diarrhées [17].

Il est important de signaler que sur les 9 poules mortes dans le lot traité avec THOS, 8 sont mortes pendant la phase de contamination et une seule, juste 24 h après l'instauration du traitement ; ce qui permet de dire que le début du traitement a pratiquement annulé la mortalité dans le lot traité.

La recherche des salmonelles chez les poules après le traitement montre que THOS élimine totalement les salmonelles dans les fientes des animaux traités. Cela signifie donc que l'effet antidiarrhéique de THOS observé dans cette étude *in vivo* s'explique par sa potentielle action antisalmonellique. Cette action antisalmonellique de THOS avait déjà été mise en évidence par M'baïasbe [5] qui avait montré que THOS inhibe *S. enterica ser. Enteritidis lysotype 6* avec une CI_{50} de 4,68 mg/ml. THOS inhibe également d'autres serovars de salmonelles tels *Salmonella Gallinarum* [5], *Salmonella Typhi* [4]. Hormis les salmonelles THOS inhibe aussi *Cryptococcus neoformans* [6] et d'autres germes fongiques tels que *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus* [19]. Ces actions antimicrobiennes observées *in vitro* justifient donc l'action antisalmonellique et antidiarrhéique chez la poule pondeuse observée dans notre étude.

Karamoko OUATTARA et al.

V - CONCLUSION

Cette étude nous a permis de montrer que THOS est efficace dans le traitement de la salmonellose aviaire induite par *S. enterica ser. Enteritidis lysotype 6*, une souche polychimiorésistante.

THOS se révèle comme un moyen thérapeutique efficace contre les salmonelloses aviaires provoquées par des salmonelles multirésistantes. THOS pourrait permettre la mise au point d'un médicament vétérinaire contre les salmonelloses animales et spécifiquement aviaires.

Toutefois, d'autres études plus poussées sont envisagées afin de purifier et d'isoler les molécules antisalmonelliques et d'en étudier les mécanisme de l'action antibactérienne.

REFERENCES

- [1] - R.F. GORDON, "Pathologie des Volailles". Maloine S.A. éditeur: Paris, (1979), 267 p.
- [2] - K. FRITZSCHE et E. GUERRIETS, "Maladies des volailles". Vigot Frères : Paris (1965), 421 p.
- [3] - M. DOSSO, "Résistance de *Salmonella enterica ser. Enteritidis lysotype 6* aux drogues". 1^{ères} Journées Biologiques Nationales d'Abidjan. (1998) : Communication personnelle.
- [4] - J.Y KAZOCK, "Activité antibactérienne de THOS contre *S. typhi*". DEA de Pharmacologie des substances naturelles. Université de Cocody, (2001), 30 p.
- [5] - Y.J. M'BAÏASBE, K. TOURE et F. GUEDE-GUINA, "Evaluation d'une action thérapeutique de THOS, un antisalmonellaire naturel, sur les salmonelloses aviaires". AFRIQUE BIOMEDICALE, , 7(3) (2002) 32-35.
- [6] - B. OUATTARA, "Evaluation de l'activité antifongique de THOS sur *Cryptococcus neoformans*". DEA. Biosciences Université Cocody. Abidjan, (2003), 34 p.
- [7] -] K. OUATTARA, "Activité antibactérienne de THOS sur la croissance de *S. Enteritidis lysotype 6*". DEA de Pharmacologie des substances naturelles. Université de Cocody Abidjan, (2001), 34 p.
- [8] - K. TOURE, "Traitement thérapeutique de l'influence de la salmonellose aviaire sur la ponte". DEA de Pharmacologie des substances naturelles. Université de Cocody, Abidjan, (1998), 30 p.
- [9] - M. VANGAH-MANDA, M. DJE, F. GUEDE-GUINA et C. DE SOUZA, "Evaluation des effets antimicrobiens et cytotoxiques des extraits aqueux totaux de THOS". *Rev. Med. et Pharma. Afr.*, 8 (2) (1994), 154-157.

Karamoko OUATTARA et al.

- [10] - E. ADJANOHOOUN et A.L. AKE, "Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire". Université d'Abidjan Centre National Floristique édition CRES; (1979), 358 p.
- [11] - M.E. ADDY. and A.K. NYAKO, "Anti-anaphylactic properties of *Thonningia sanguinea*". *Planta Medica*, 5 (1985), 360-363.
- [12] - M.A. GYAMFI, M. YONAMINE and Y. ANIYA, "Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries". *General Pharmacol.*, 32 (5) (1999) 661-7
- [13] - M.A. GYAMFI, N. HOKOMA, K. OPPONG-BOACHIE and Y. ANIYA, "Inhibitory effects of medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, on liver drug metabolising enzymes of rats". *Bourdonnement Exp. Toxicol.*, 19 (11), (2000) 623-31
- [14] - I.I. OHTANI, N. GOTOH, J. TANAKA, T. HIGA, M.A. GYAMFI and Y. ANIYA, "Thonningianins A and B, new antioxidants from African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*" *J. Nat. Prod.*, 63 (5) (2000) 676-9
- [15] - M.A. GYAMFI and Y. ANIYA, "Antioxydant properties of Thonningianin isolated from the African medicinal herbs *Thonningia sanguinea*". *Biochem. Pharmacol.*, 63(9) (2002) 1725-37
- [16] - Bureau International d'Etudes Analytiques. "Recueil des méthodes d'analyses des communautés européennes", (1976) 140 p.
- [17] - F.R. TALL, J.P LOUBOUTIN-CROC, I. SANOU et B. NACRO, "La Thérapie par Réhydratation Orale (TRO) Mythe ou réalité. Place de la TRO dans la lutte contre les maladies diarrhéiques".. *Publ. Med. Afr.*, 98 (1989) 52-57
- [18] - C. BAHİ, J.D. N'GUESSAN et F. GUEDE-GUINA, "Mise en évidence d'une action myorelaxante et cholinolytique de Bitter-GG (BGG), un antidiarrhéique de source végétale". *Afrique Biomédicale*, 5(1) (2000) 11-18
- [19] - A.V. KOUAKOU, J.D. N'GUESSAN, A. M. KRA et F. GUEDE-GUINA, "Etude de l'action antifongique et tri phytochimique de *Thonningia sanguinea* (THOS)". *Journal de la Société Ouest Africaine de Chimie*, (2004) (Soumis)