

VALORISATION DE COQUES D'ARACHIDE AVEC ISOLEMENT DES SUBSTANCES BIOLOGIQUES EXTRAITES

RABEMAHEFA L. F.¹, RAJESTERA F.¹,
DJOUDI R.², RASOLONJATOVO M. Z.²,
RASOANANDRASANA E.²

1 : Doctorant à l'EDGVM de l'Université de Mahajanga
mail du correspondant : fridolinlouis@gmail.com

2 : Enseignant-Chercheur à la FSTE

Résumé

La richesse moléculaire d'organe des végétaux constitue une source importante de molécules bioactives d'origine naturelle. Les études chimiques ont permis de caractériser 3 produits purs CAA₁ et CAA₂ résultent de l'isolement de l'extrait Acétate d'éthyl, et CM01 à l'issue de l'extrait Méthanolique qui ont été soumis au test biologique (antibactérienne). La Technique Résonance Magnétique Nucléaire a déterminé la structure de deux composés isolés comme Eriodictyol et luteolin. L'extrait brut, les extraits Acétate d'éthyl et méthanolique ont montré une très bonne activité antibactérienne in vitro vis-à-vis de souche *Streptococcus pneumoniae*

Mots-clés : molécule bioactive, extrait, antibactérienne, structure

Famitinana

Ny harena molekiola ao amin'ny zavamaniry dia loharano manan-danja amin'ny molekiola biôlôjika voajanahary voajanahary. Ny fanadihadiana simika dia nahafahana nanondro ny vokatra telo madio CAA₁ sy CAA₂ vokatry ny fitokanana ny fitrandrahana etyil acetate, ary ny CM01 tamin'ny faran'ny fitrandrahana methanolika izay niharan'ny fitsapana biolojika (anti-bakteria). Ny Technique « Resonance Magnetic Nuclear » dia namaritra ny firafitry ny fitambarana roa mitoka-monina toa an'i Eriodictyol sy Luteolin. Ny fitrandrahana solika, ethyl acetate ary ny methanolika dia naneho fiasan'ny bakteria tena tsara tamin'ny fitsapana « in vitro » nanohitra ny fatra « *Streptococcus pneumoniae* »

Teny fototra: molekiola biolojika, fitrandrahana, anti-bakteria, firafitra

Abstract

The molecular richness of plant organs constitutes an important source of bioactive molecules of natural

origin. The chemical studies made it possible to characterize 3 pure products CAA₁ and CAA₂ resulting from the isolation of the ethyl acetate extract, and CM01 at the end of the methanolic extract which were subjected to the biological test (antibacterial). The Nuclear Magnetic Resonance Technique determined the structure of two isolated compounds such as Eriodictyol and Luteolin. The crude extract, ethyl acetate and methanolic extracts showed very good antibacterial activity in vitro against the strain *Streptococcus pneumoniae*

Keywords: bioactive molecule, extract, antibacterial, structure

Introduction

L'arachide est originaire de l'Amérique tropicale et a été introduite dans les pays tropicaux (Charrier et al., 1997). Parmi les différentes espèces connues, c'est *Arachis hypogaea* est la plus importante sur le plan économique. C'est une légumineuse qui présente une aptitude à s'associer à des bactéries du sol (Rhizobiacées) pour former la nodosité racinaire (Nes et al., 1992 ; Mabry et al., 1970). Elle constitue une source très importante de protéines et lipides et entrent dans l'alimentation humaine et animale (Perkin, 1909). La famille des légumineuses compte 700 genres et 17 000 espèces environ, répandues dans le monde entier (Oksuz & Topçu, 1987 ; Morales & Larghlu, 1989). Elle est réputée dans le monde par ses propriétés médicinales et utilisée par la population locale pour soigner les maladies. Actuellement, la multiplication des microbes et de virus et l'installation croissante de la chimiorésistance chez l'homme, vis-à-vis des médicaments produits par les industries pharmaceutiques sont au centre de problème des scientifiques. A la fois, ces médicaments ont des prix exorbitants, et ils ne sont pas à la portée de tous, notamment pour la

majorité des gens malgaches. Ainsi, les chercheurs sont amenés à trouver de nouveaux produits d'origine naturelle de plus en plus actifs. Jusqu'à présent, sur ces 300 000 espèces végétales recensées dans le monde, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques (Verpoorte, 2002), ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré. Les organes de plantes sont formés de plusieurs milliers de constituants différents qu'ils sont responsables de l'effet thérapeutique (Boiteau & Allorge, 2000 ; Debray et al., 1971). La coque d'arachide est le principal déchet obtenu après décorticage de l'arachide. Au Sénégal, certains résidus agricoles comme la coque d'arachide peuvent devenir des sources d'énergie et utilisé comme combustibles domestiques. La coque d'arachide est un produit essentiellement cellulosique et constitue une bonne matière pour la production furfural. Elles peuvent servir à la fabrication des planches d'agglomérés utilisés en menuiserie et des briquettes de combustibles. Elles servent de combustibles dans les chaudières qui alimentent de nombreuses huileries. Certaines inquiétudes ont été émises vis-à-vis de la nature dangereuse de la coque d'arachide et de son impact sur l'environnement et la santé. Les déchets présentent des effets nocifs sur le sol, la flore et la faune, dégradant les paysages et portant atteinte à la santé de l'homme et à l'environnement. À Madagascar, notamment au District de Mandritsara, fokontany Ambohimahavelona, la coque d'arachide est le sous produit agricole le plus important, compte tenu du volume estimé à

quelques dizaines de tonne. À la lumière de l'information apportée par les autres chercheurs et par la richesse de sa composition chimique, la coque d'arachide apparaît comme un fragment d'organe très intéressant pour analyser et identifier les molécules bioactives. Cela a suscité la présence étude, afin d'optimiser la valorisation de ce déchets (coque d'arachide). L'objectif de ce travail a été de mettre en œuvre la valorisation des déchets de la coque d'arachide (leguminosae) par l'étude chimique et l'étude bactérienne des différents extraits.

Méthodologie

Le travail se focalise à l'étude chimique et l'étude biologique (antibactérienne).

Arachis hypogea, c'est une plante appartient à la famille de *leguminosae* et sous famille papilionacée. Notre étude a porté sur la coque d'arachide sur la variété "voanjo mena" appelé *valencia*. La variété *valencia* est la plus courante, provient de la commune urbaine de Mandritsara, Fokontany Ambohimahavelona. L'échantillon est le résidu de la récolte du mois de Mai 2015.

Etude chimique

L'extraction se fait par une macération alcoolique (extraction solide – liquide). Le principe est le transfert de composé de la phase solide à la phase liquide et elle consiste à extraire sélectivement plusieurs composés sur la base de propriétés chimiques.

Le fractionnement par partage se fait selon le gradient de la polarité du solvant.

Fractionnement et isolement (analyse chromatographique)

L'objectif est d'obtenir différents produits qui seront utilisés pour les investigations biologiques. Les extraits et les produits à l'issue de la purification se résument dans le schéma suivant.

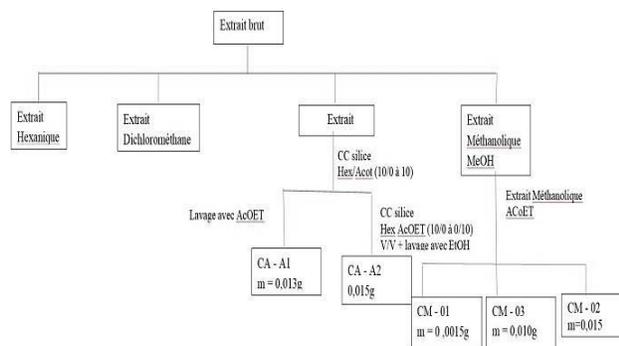


Figure 1 : Schéma des différents extraits et des produits purifiés utilisés pour les tests biologiques

L'isolement et la purification ont été fondés sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques solide – liquide sur Chromatographie sur couche mince et chromatographie sur colonne de gel de silice.

La Chromatographie sur couche mince c'est une chromatographie d'adsorption solide – liquide. Les composants sont élués à des vitesses différentes selon leur adsorption derrière le front du solvant (Hamon et al., 1990 ; Hostettmann et al., 1998 ; Ngameni et al., 2009).

La chromatographie sur colonne repose sur l'affinité différente des composés à séparer d'une part de la phase stationnaire solide et de la phase mobile liquide.

Spectrométrie de masse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est la méthode pour élucider la structure d'une molécule. Elle est fondée sur les propriétés magnétiques que

possèdent certains noyaux présentant une rotation nucléaire (spin). Pour la détermination structurale, les données RMN sont enregistrées sous forme de spectres à une dimension 1D et spectres à deux dimensions 2D.

Etude bactériologique

L'activité antibactérienne de chaque extrait a été évaluée sur une souche bactérienne à Gram (+) selon la méthode de disque en milieu solide et une dilution cascade en milieu liquide.

Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer l'activité antibactérienne des différents extraits. Ce sont :

1- Méthode par disque

L'activité antibactérienne in vitro des extraits a été déterminée par la méthode ensemencement par écouvillonnage en milieu solide ou méthode des disques. Il s'agit de déterminer les diamètres d'halo d'inhibition décrite par Pyun et al. (2006) et Ngameni et al. (2009). Cinq extraits : extrait brut, extrait hexanique, extrait dichlorométhane, extrait acétate d'éthyl et extrait méthanolique ont été soumis au test antibiogramme.

Le support biologique est une souche isolée hospitalière : *Streptococcus pneumoniae* repiquée sur une gélose ordinaire et Muller Hinton Agar comme milieu de culture servant à étudier la sensibilité des bactéries aux extraits en milieu solide. Au bout de 24h, la souche jeune isolée est ensemencée par écouvillonnage sur la surface du muller hinton agar.

Préparation d'extrait : 200 mg d'extrait brut ont été dissouts dans 1ml de méthanol et servi comme solution mère. Les autres extraits sont repris dans l'eau distillée à raison de 200mg/ml.

Les disques de 6mm de diamètres imprégnés de 10µl de la solution des différents extraits de concentration 200 mg/ml sont déposés sur la boîte de pétri. Les boîtes de pétri sont incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h. L'activité de chaque extrait est appréciée par le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque (Doughari et al., 2007).

2- Méthode par dilution (Milieu liquide)

Milieu de culture : Milieu d'enrichissement BCO102M

Souche bactérienne : *Streptococcus pneumoniae*

L'inoculum bactérien ajusté à 0,5 Mac Farland a été réparti sur les tubes puis y rajouter l'extrait à tester à volume précis. On examine la croissance bactérienne dans chaque tube qui se traduit par une turbidité. La Concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration de la série de tube où il n'y a pas de concentration visible de germe. Par phytochimie, elle consiste à détecter de façon qualitative les principales familles trouvées dans les différents extraits par la méthode utilisée par Firdouse et Alam, (2011).

Résultats

Selon le type de solvant utilisé, on obtient 4 fractions moléculaires extraites selon leur polarité. Il s'agit de l'extrait hexanique, extrait dichoro-méthane, extrait acétate d'éthyle et extrait méthanolique. Seulement l'extrait acétate d'éthyl (AcOEt) et l'extrait méthanolique (MeOH) présentent une activité antibactérienne. C'est pourquoi ces deux extraits ont été soumis à l'analyse chromatographique et le rendement obtenu est de 5,4% de l'extrait.

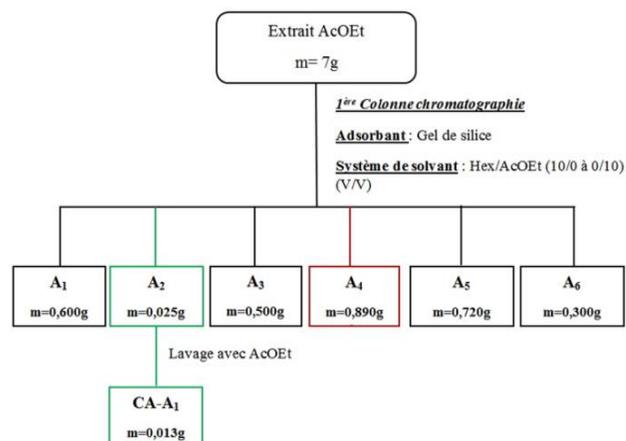


Figure 2: Diagramme de fractionnement d'extrait AcOEt et isolement de Produit CA – A1

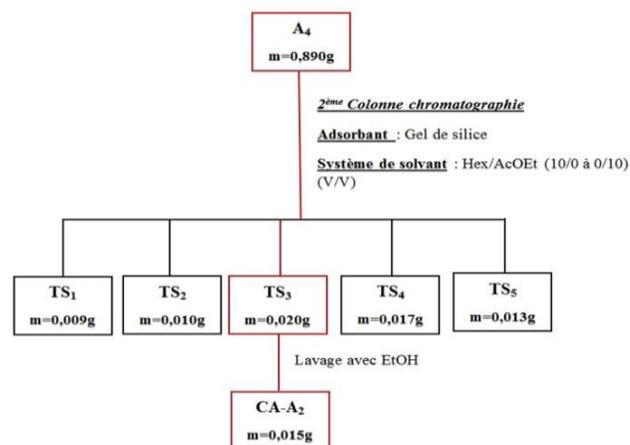


Figure 3 : Isolement de produit CA – A2

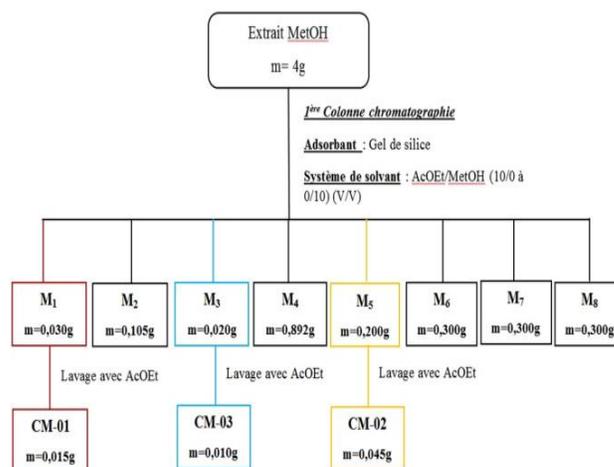


Figure 4: Diagramme d'isolement des produits CM – 01, CM – 02, CM – 03

Deux produits nommés CA-A1 et CA-A2 ont été isolés suite de la purification de l'extrait AcOEt par lavage avec AcoEt. Parmi les deux produits, le CA-A1 se précipite lors de la RMN.

Trois produits nommés CM-01, CM-02 et CM-03 ont été obtenus suite de lavage des fractions à l'issu de l'extrait MeOH. Parmi les trois produits, CM-02 présente une contamination lors de l'analyse bactérienne et CM-03 la quantité est insuffisante pour la RMN.

Grace aux différentes méthodes d'analyse spectrale, la structure des deux composés isolés de la coque d'*Arachis hypogaea* tel que CA-A2 et CM-01 sont déterminés comme étant respectivement l'eriodictyol et luteolin. L'eriodictyol est un flavonoïde appartenant au groupe des flavanones. Il a déjà été isolé de *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth (Boraginaceae) (Sâmia Andricia S. et al., 2010). Le luteolin est un flavonoïde appartenant au groupe des flavones. Il a déjà été isolé de *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth (Boraginaceae) (Samia Andricia S. et al., 2010).

Tableau 1: Valeur moyenne des diamètres de zone d'inhibition de croissance de *Streptococcus pneumoniae* en milieu solide.

Micro organisme <i>Streptococcus pneumoniae</i>	GRAM +	Valeur moyenne de diamètre du halo d'Inhibition (en mm) obtenue sur les 2 boîtes						
		Extrait brut			Extraits			
		2mg/ disque	1mg/ disque	0,5m/ disque	Hexani- que	DCM	AcOEt	MeOH
		10	0	0	8	0	12	11

Tableau 2: Activité antibactérienne des différents produits purs et des fractions obtenus sur *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae	Gram +	Diamètre de la zone d'Inhibition (mm)									
		CAA ₁	CAA ₂	CM01	CM02	CM03	M ₂	M ₅	M ₆	M ₇	M ₈
		10	9	9	Contaminé	0	0	0	0	0	0



Figure 5: Test d'activité antimicrobienne des différents extraits sur *Streptococcus pneumoniae* (1 : Extrait brut pur ; 2 : Extrait brut 1/2 ; 3 : Extrait brut 1/4 ; 4 : Extrait hexanique ; 5 : Extrait DCM ; 6 : Extrait Acétate d'éthyl ; 7 : Extrait Méthanolique. L'extrait brut (1), l'extrait AcOEt (5), l'extrait MetOH (6) présentent une activité anti-bactérienne. L'extrait Hexanique présentent une faible activité. L'extrait Diclorométhane est en contact et il ne présente aucune activité.)

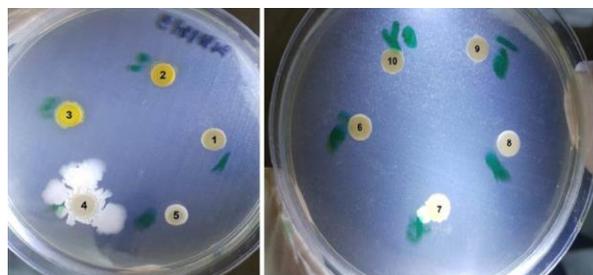


Figure 6: Test d'activité antimicrobienne des produits purs et des fractions sur *Streptococcus pneumoniae*.

Les produits purs CA-A1 (1), CA-A2 (2), CM-01 (3) présentent une activité antibactérienne. Le produit pur CM O2 (4) est contaminé. Le produit pur CM 03 (5) et les cinq fractions M-2 (6), M-5 (7), M-6 (8), M-7 (9), M-8 (10) sont en contact. Ils ne présentent aucune activité .

La valeur de la CMI pour l'extrait brut est de 6,25mg/ml, l'extrait acétate d'éthyl est de 3,125mg/ml et l'extrait méthanolique est de 3,125mg/ml.

Pour la CMI des produits purs et actifs à l'issu d'isolement de l'extrait AcOEt et l'extrait MeOH, la souche utilisée c'est *Streptococcus pyogenes*. Malgré la non disponibilité de souche

Streptococcus pneumoniae, les valeurs de la CMI pour CA-A1, CA-A2 et CM-01 sont respectivement 100mg/ml, 200mg/ml et 100mg/ml.

Criblage phytochimique

Tableau 3: Tableau récapitulatif des familles chimiques présentes

Alcaloïde			Flavonoïdes et Leucoanthocyanes			Tanins et polyphénols			Quinones			Stéroïdes et Terpénoïdes			Saponines		Polysaccharide	
W	M	D	W	WM	BS ₁	BS ₂	g	gs	fe	am	as	LB	S	BK	KK	mo	al	
++	++	+++	+	+	+	+	++	+	-	-	+	++	+++	-	-	+	+++	

Le criblage phytochimique révèle la présence d'une forte concentration d'alcaloïdes, de polysaccharide. Les tanins, polyphénols, stéroïde, flavonoïdes et terpénoïdes se trouvent en quantité moyenne. Les saponines sont présentes en quantité assez faible. Notons l'absence des quinones.

Discussion

La macération alcoolique favorise que les substances actives sont solubles dans l'eau. L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction

L'activité antibactérienne des extraits est due à la présence de constituants biologiquement actifs contenus dans les deux extraits AcOEt et MeOH. Le principe actif est concentré sur chacun de ces produits et ils agissent individuellement sans combinaison de composés et il est lié à sa structure chimique. L'extrait AcoEt et MeOH contiennent plus de composé pur que l'extrait brut et ils sont plus concentrés en principes actifs. Cette perte d'activité inhibitrice pour les autres extraits peut être due à la séparation dans les

différents extraits, des molécules agissaient de manière synergique dans l'extrait brut. L'activité antibactérienne est liée à la polarité des substances bioactives. En combinant les résultats de bioactivité et du criblage phytochimiques, nous avons pu mettre en évidence que les activités bactériennes sont liées à la présence de molécule alcaloïde, terpène, polyphénols et polysaccharide.

Les résultats de test peuvent être expliqués par la différence de composition et de la concentration en principes actifs des différents extraits (Boulou et al., 2011). L'extrait brut, l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait méthanolique présentent l'activité antibactérienne vis-à-vis de la souche *S. pneumoniae* avec les diamètres de la zone d'inhibition respectifs 10 mm, 12 mm et 11 mm. Ceci pourrait expliquer l'activité de nos extraits par le fait que l'acétate d'éthyle et le méthanol sont capables d'extraire des composés actifs qui inhibent la croissance bactérienne. La quantité des polyphénols est abondante dans l'extrait acétate d'éthyle. La présence de deux groupements hydroxyle libre est essentielle à l'activité. Ils vont causer la perturbation normale du transport d'ions à travers la membrane cytoplasmique et l'inactivation des enzymes microbiens et l'inhibition de la mobilité des bactéries.

Les CMI des différents extraits varient de 3,125mg/ml à 6,25mg/ml. L'extrait AcOEt et MeOH possèdent une forte inhibition sur la croissance des microorganismes (CMI : 3,125mg/ml). Selon Kouitcheu et al. (2013), un extrait brut était considéré comme actif par rapport à tout microorganisme testé si sa CMI était inférieure ou égale à 8 mg/ml. Si l'interprétation de

Kouitcheu et al (2013) était prise en compte, on peut dire que la majorité des extraits utilisés pourraient être qualifiés de bons antimicrobiens.

L'étude phyto chimique a mis en évidence que la coque d'arachide contenait des molécules couvrant une large gamme de polarité. Plusieurs métabolites secondaires ont été détectés dans l'extrait brut de la coque d'*Arachis hypogaea*. Les stérols, terpènes et saponines sont plus faciles à caractériser dans les extraits apolaires tandis que les alcaloïdes, polyphénols et tanins sont facilement caractérisés dans les produits polaires. L'extraction liquide liquide permet de partager les molécules selon leurs propriétés physico-chimiques entre deux phases liquides non miscibles ; chaque solvant extrait les substances solubles à ce solvant.

Conclusion

L'extrait Acétate d'éthyle et l'extrait Méthanolique présentent l'activité antibactérienne sur souche *Streptococcus pneumoniae*. Deux produits purs codés CA-A1 et CA-A2 ont été obtenus sur fractionnement et l'isolement de l'extrait AcOEt, ainsi que trois produits purs codés CM-01, CM-02 et CM-03 ont été obtenus sur le fractionnement et l'isolement de l'extrait MetOH. Il nous a permis de justifier l'extraction des terpènes, les polyphénols et les alcaloïdes. Leur structure moléculaire du principe actif nous permet de justifier aussi leur activité biologique et leur mécanisme d'action. Les résultats démontrent clairement la forte potentialité des extraits comme source de molécules antimicrobiennes naturelles à large spectre. Ainsi, l'utilisation de ses extraits en tant qu'antibiotique naturel pourrait être

envisagée afin d'éviter l'apparition des phénomènes de résistance.

Par le biais de ce travail, nous espérons avoir apporté notre modeste contribution à la valorisation de ces déchets agricoles pour parvenir à la disposition de la population des remèdes à base des résidus agricoles efficaces et accessibles.

Les résultats demeurent prometteurs et pourraient servir de base pour des études cliniques ultérieures afin de confirmer l'efficacité antimicrobienne de ces produits naturels et de proposer leur utilisation en tant qu'agent antimicrobien alternatif.

Références bibliographiques

- Boiteau, P. et L. Allorge (2000): *Plantes médicinales de Madagascar*. Edition 2000. CD-ROM.
- Bolou, G.E.K, B. Attiona, A.C. N'guessan, A. Carbibaly, J.D. N'guessan, A.J. Djaman (2011). Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planche. Sur *Salmonella typhi* et *Salomella typhimurium*.
- Charrier, A., M.J.S. Hamon et D. Nicolas (eds) (1997). *Amélioration des plantes tropicales*. CIRAD et ORSTOM.
- Debray, M., H. Jacquemin et R. Razafindrabo (1971). *Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar*. Travaux et Documents de l'ORSTOM, Tananarive, 1971, 37 pages.
- Doughari, J.H., M.S. Pokuma and Den. (2007). Antibacterial effects of *Balanites aegyptiaca* L. Drel. and *Moringa oleifera* Lam. on *Salmonella typhi*. *African Journal of biotechnology*, **6**(19): 2212 - 2215.
- Firdouse, S. and P. Alam (2011). Phytochemical investigation of extract of *Amorphophallus campanulatus tubers*. *International journal of Phytomedicine*, **3** : 32 – 35.
- Hamon, H., F. Pellerin, M. Guernet, G. Mahuzier (1990). Chimie Analytique. Tome 3. Méthodes spectrales et analyse organique. 2^{ème} édition p 152 – 189 ; 198 – 228.

- Hostettmann, O. Potteray and J.L. Wolfender, (1998).
The potential of higher plants as source of new drugs. *chimie*, 52 pp. 10 – 17.
- Kouitchou L.B.M., J.L. Tahesse, J. Kouam (2013). The anti-shigellois activity of the methanol extract of *Picralima nitida* on *Shigella dysenteriae* type I induced diarrhea in rats. *BMC Complement. Altern. Med.* **13**(211); 4 – 11.
- Mahuzierg, G., M. Hamon (1990). Abregé de chimie Analytique : Méthodes de séparation. Masson, Paris. 266 pages.
- Mabry, T.J., K.R. Markham and M.B.Thomas (1970). *The systematic Identification of Flavonoids* Springer-Verlag, New York. Heidelberg. Berlin.
- Morales, G. and J.L.Mc, Larghlu (1989). *J.Nat.Prod.* (Loydia), **52**,381.
- Nes, D.W., R.A. Norton and M. Benson (1992). *Phytochem.*, **31**, 805-811.
- Ngameni, B., Kuete V., Simo I. K., Mbaveng A. T., Awoussong P. K., Patnam R. R., Ngadjui B. T. (2009). Antibacteria and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae). *S. Afr. J. Bot.*, **75**: 256 – 261.
- Oksuz, S.and G. Topçu (1987). Triterpene fatty acid esters and flavonoids from *Inula britannica*. *Phytochem.*, **26**, 3082-3084.
- Perkin, A.G. (1909). Coloring matters of cotton flowers-*Gossypium herbaceum*. *J.chem.Soc.* **95**, 2181-2193.
- Pyun, M.S, S. Shin (2006). Antifungaleffects of the volatile oils from allium plants against trichophyton species and synergism of the oils with etoconazole. *Phytomedicine*, **13**(6): 394 – 400
- Verpoorte, R., (2002). La pharmacognosie du nouveau millénaire : pistes et biotechnologies. 4^{ème} congrès européen d'éthnopharmacologie Des sources du savoir aux médicaments du futur. IRD Ed : Paris, 274 pages.