

# CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PROPRIETES ANTIBACTERIENNES D'UN EXTRAIT D'ORIGINE VEGETAL CODE Tm1

par

M. ANDRIANTSOA

## 1. — INTRODUCTION :

Plusieurs techniques ont été décrites dans la littérature sur le dosage bactériologique d'une substance antibactérienne.

Si actuellement, la mise en œuvre de telles méthodes ne pose pratiquement plus de problème en ce qui concerne les produits chimiquement définis, leur application à l'étude d'extrait d'origine végétale nécessite encore vraisemblablement un certain nombre de mises au point.

Dans une précédente note\*, nous avons déjà évoqué le problème que nous avons rencontré concernant la mauvaise miscibilité de nos extraits à tester avec les milieux de culture classiques utilisés en bactériologie, à base de peptone. Ce principe toxique se trouvant en partie piégé dans un complexe précipitant, toute estimation quantitative devenait alors trop aléatoire et difficilement reproductible.

Au cours de ce travail, nous avons essayé d'effectuer une analyse du phénomène sur l'exemple de l'extrait de HE 01146 et de HE 01089.

## 2. — MATERIEL ET METHODE :

Pour mettre en évidence les propriétés antibactériennes de notre extrait, nous avons utilisé la méthode de dilution en milieu liquide avec inoculum calibré.

\* Archives du C. N. R. P. 1983 (2) 184-187.

### 2.1. Milieux :

Pour les essais, on utilise du bouillon nutritif enrichi à 3 ‰ d'extrait de levure et préparé à double concentration. Ce milieu sera dilué au demi lors de son utilisation.

### 2.2. Souches bactériennes et inoculum :

A l'exception de *Escherichia coli* ATCC 10536, les souches que nous avons utilisées proviennent du Centre Hospitalier de Marseille, du Laboratoire de Bactériologie dirigé par le Professeur PELOUX. Ce sont :

- 1 - *Salmonella enteritidis*,
- 2 - *Salmonella typhi-murium*,
- 3 - *Salmonella panama*,
- 4 - *Salmonella para-B*,
- 5 - *Escherichia coli* O<sub>26</sub> B<sub>6</sub>,
- 6 - *Shigella flexneri*,
- 7 - *Shigella sonnei*,
- 8 - *Shigella dysenteriae*,
- 9 - *Plesiomonas*,
- 10 - *Aeromonas*,
- 11 - *Vibrio N. A. G.*,
- 12 - *Vibrio alginolyticus*,
- 13 - *Vibrio parahaemolyticus*,
- 14 - *Yersinia enterocolitica*,
- 15 - *Escherichia coli* ATCC 10536.

L'inoculum en suspension dans le diluant T.C.E. (cf. annexe 1) contient 1 à 3 : 10<sup>8</sup> cellules par millilitre. Pour l'essai, il sera dilué au 1/100<sup>e</sup> en eau distillée stérile, puis au 1/5<sup>e</sup> dans le milieu de culture. On obtient ainsi une suspension titrant environ 2 à 6.10<sup>5</sup> cellules par millilitre, qui, au moment du test sera dilué au 1/2 avec l'extrait à tester ; l'inoculum est donc de 1 à 3. 10<sup>5</sup> cellules par millilitre.

### 2.3. Extraits étudiés :

Deux extraits végétaux ont pu être testés au cours de ces travaux ; ce sont :

- l'extrait Tm1 provenant de HE 01146,
- l'extrait Br1 provenant de HE 01089.

Le lot utilisé au cours de ces travaux a été conservé sous forme de lyophilisat et rehydraté extemporanément à chaque essai.

#### 2.4. Lecture des résultats :

La masse cellulaire obtenue après chaque croissance a été appréciée par la méthode turbidimétrique à 623 nm.

Les cinétiques de croissance sont suivies au biophotomètre et transcrites en D.O. par la formule  $D.O. = L_n \frac{1}{T}$  ; T étant le pourcentage de transmission.

### 3. - RESULTATS EXPERIMENTAUX :

#### 3.1. Spectre d'activité de Tm1 à 300 µg/ml :

La mauvaise reproductibilité d'une expérience peut essentiellement être due soit :

- à une mauvaise réaction,
- au choix d'une réponse au test trop difficile à lire ; l'erreur se situerait alors au niveau de l'appréciation,
- à l'existence d'une réaction parallèle qui embrouillerait la lecture des résultats.

La première éventualité peut être écartée, car nous avons observé à chaque essai, une bonne reproductibilité de la réponse du témoin de croissance.

Pour le deuxième cas, bien qu'en terme d'inhibition de croissance bactérienne, la démarcation entre les réponses entièrement négatives et celles entièrement positives ne peut pas être nette, l'appréciation chiffrée à des résultats au spectrophotomètre, situe directement chaque réponse par rapport à celle des témoins positif et négatif ; reste donc le troisième cas qui stipule l'existence d'une réaction parallèle incontrôlée. Notre démarche a été la suivante :

Nous avons observé qu'à la concentration finale de 300 µg/ml l'extrait Tm1 préparé dans le neutralisant N<sub>1</sub> (Cf. annexe 5.2.) se mélange parfaitement avec le milieu d'essai sans formation apparente de complexe précipitant.

Nous avons alors recherché parmi les germe-tests, ceux qui sont sensibles à Tm1 à une concentration inférieure ou égale à 300 µg/ml.

Six germes ont réagi positivement au test. Ce sont :

- 1 - *Salmonella panama*,
- 2 - *Shigella dysenteriae*,
- 3 - *Plesiomonas*,
- 4 - *Aéromonas*,

5 - *Vibrio alginolyticus*,

6 - *Yersinia enterocolitica*

L'intervalle de concentration à l'intérieur de laquelle se situe la C.M.I. a été déterminé pour chacun de ces 6 germe-tests (Cf. Tableau 1).

Tableau 1 : Concentration minimale inhibitrice de l'extrait Tm1 vis-à-vis d'un lot de 6 germe-tests.

Germe-test	<i>Salmonella panama</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Aéromonas</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
CMI $\mu\text{g/ml}$	] 210-240 ]	] 240-270 ]	N. F.	] 60-90 ]	] 150-180 ]	] 210-240 ]

Un deuxième essai effectué dans strictement les mêmes conditions a donné les résultats suivants (Tableau 2) :

Tableau 2

GERME-TEST	C. M. I. ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	1er essai	2e essai
<i>Vibrio alginolyticus</i>	] 150-180 ]	] 90-120 ]
<i>Yersinia enterocolitica</i>	] 210-240 ]	] 150-180 ]

Nous avons observé que si l'inhibition de la croissance du germe-test reste vérifiée, la valeur de la C.M.I. accuse une fluctuation non négligeable.

### 3.2. Etude cinétique de l'influence de l'extrait Tm1 sur la croissance de *Shigella dysenteriae* :

*Shigella dysenteriae* : a été cultivé en biophotomètre en présence d'une concentration croissante de l'extrait Tm1 (Tableau 3).

Tableau 3

Essai n°	1	2	3	4	5	6
Tm1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	100	200	300	400	500
Milieu de culture	+	+	+	+	+	+
Germe-test	+	+	+	+	+	+

+ présent      - absent

Les résultats transcrits graphiquement sur la figure 1 montrent une inhibition de la croissance dès la concentration de 200  $\mu\text{g/ml}$ . Toutefois, nous avons également noté que les courbes de croissance se rapportant aux essais 3 à 6 ne sont pas parallèles à la ligne de base, et la dérive, s'opérant essentiellement au début de la phase de latence semble être liée à la concentration en Tm1 dans le milieu réactionnel.

Ce phénomène, totalement absent sur la courbe témoin semblerait être consécutif à l'addition de Tm1 dans le milieu réactionnel.

Sur la figure 2, le milieu d'essai n'a pas étéensemencé et on note encore après 3 heures d'observation 12 % de dérive pour 300  $\mu\text{g/ml}$  de Tm1 et 20 % pour 500  $\mu\text{g/ml}$  (Figure 2).

A pH 6,4, nous avons noté pour 500  $\mu\text{g/ml}$  de Tm1 une dérive de 38 % par rapport à la ligne de base (Fig. 3), tandis qu'à pH 8,4, elle était de 48 % (fig. 4), la durée de l'observation était de 15 heures.

L'extrait Tm1 a été alors testé sur *Shigella dysenteriae* en présence d'une concentration croissante d'acide ascorbique (Tableau 4).

Tableau 4

Essai n°	1	2	3	4	5	6
Milieu de culture	+	+	+	+	+	+
* Acide ascorbique	150.000	15.000	1.500	150	15	1,5
* [ Tm1 ]	750	750	750	750	750	750
** Germe-test	$5.10^8$	$5.10^8$	$5.10^8$	$5.10^8$	$5.10^8$	$5.10^8$

\* en  $\mu\text{g/ml}$

\*\* nombre de cellules par ml de milieu d'essai

+ présent

Les courbes correspondant aux essais 1 et 2 ne figurent pas sur la figure 5, car elles sont passées en dessous de la ligne de base.

— Seul le tracé décrivant l'essai 3 présentait le minimum de dérive, après 11 heures d'observation (figure 5).

— La courbe 4, évoluant près de la ligne de base au cours des deux premières heures, s'en est écartée par la suite.

Ainsi pour le test d'activité de l'extrait TM1, vis-à-vis de *Shigella dysenteriae*, nous avons retenu la formule suivante :

— [ germe-test ] :  $5.10^8$  cellules/ml

— [ Tm1 ] : 750  $\mu$ g/ml

— [ Acide ascorbique ] : 1.500  $\mu$ g/ml

Par la suite, nous avons contrôlé la validité de cette démarche en l'appliquant, d'une part, à d'autres extraits végétaux, et d'autre part, à d'autres germe-tests ; mais auparavant, nous avons vérifié si l'acide ascorbique possédait une activité toxique propre vis-à-vis de *Shigella dysenteriae*.

### 3.3. Test de la toxicité de l'acide ascorbique vis-à-vis de *S. dysenteriae* :

Pour un inoculum titrant à  $10^5$  cellules par millilitre, aucune inhibition de la croissance n'a été observée jusqu'à 2.600  $\mu$ g/ml d'acide ascorbique (figure 6).

### 3.4. Test d'activité de Br1 sur *Shigella dysenteriae* :

Pour l'extrait Br1, la proportion convenable semble être la suivante : (Cf. figure 7).

— Germe test :  $5.10^8$  cellules/ml

— Br1 : 1.000  $\mu$ g/ml

— Acide ascorbique : [ 200–2.000 ]  $\mu$ g/ml

### 3.5. Activité de Tm1 sur d'autres germe-tests :

4 germe-tests ont pu être testés. Ce sont :

— *E. coli* ATCC 10536,

— *E. coli* O<sub>26</sub> B<sub>6</sub>,

— *Salmonella enteritidis*,

— *Shigella flexneri*.

Bien qu'aucune inhibition n'ait été observée sur la croissance d'*E. coli*, le tracé des courbes ne présentait plus d'anomalie (figure 8 et 9).

Pour *Salmonella enteritidis*, on note encore une augmentation anormale de la D.O. pour les essais correspondant à 400 et 320  $\mu\text{g/ml}$  de Tm1 (figure 10).

Pour *Shigella flexneri*, la dérive redevient apparente à partir de 120  $\mu\text{g/ml}$  de Tm1 dans le milieu réactionnel (figure 11).

L'effet stabilisateur de l'acide ascorbique semblerait subir une atténuation due à des produits de transformation propres au germe-test.

### 3.5. Effet biologique de l'addition d'acide ascorbique :

L'effet biologique de l'acide ascorbique peut être :

- direct et dû principalement à ses propriétés physico-chimiques,
- indirect et lié à son rôle dans les différentes transformations biochimiques.

- En absence d'acide ascorbique, la CMI de Tm1 vis-à-vis de *Shigella dysenteriae* était de 240 à 270  $\mu\text{g/ml}$ .

- En présence d'une quantité équivalente à quatre fois celle de Tm1, elle est devenue inférieure à 50  $\mu\text{g/ml}$  (figure 12); une valeur de 30  $\mu\text{g/ml}$  a été obtenue au cours d'un essai en milieu liquide et en tube à essai.

## 4. — DISCUSSION ET CONCLUSION :

Pour la détermination de l'activité anti-bactérienne, l'essai en milieu liquide reste encore de loin celui qui offre le plus de précision. L'addition d'acide ascorbique dans l'extrait Tm1 a permis dans nos essais de réduire l'ampleur d'une réaction parallèle qui, pendant la durée de l'observation, gênait beaucoup la lecture des résultats.

Par ailleurs, nous avons remarqué une certaine potentialisation de l'activité de Tm1 consécutive à cette addition.

La quantité requise n'est pas seule fonction de la concentration de l'extrait à tester et de l'importance de l'inoculum, mais dépendrait aussi vraisemblablement de la nature du germe-test.

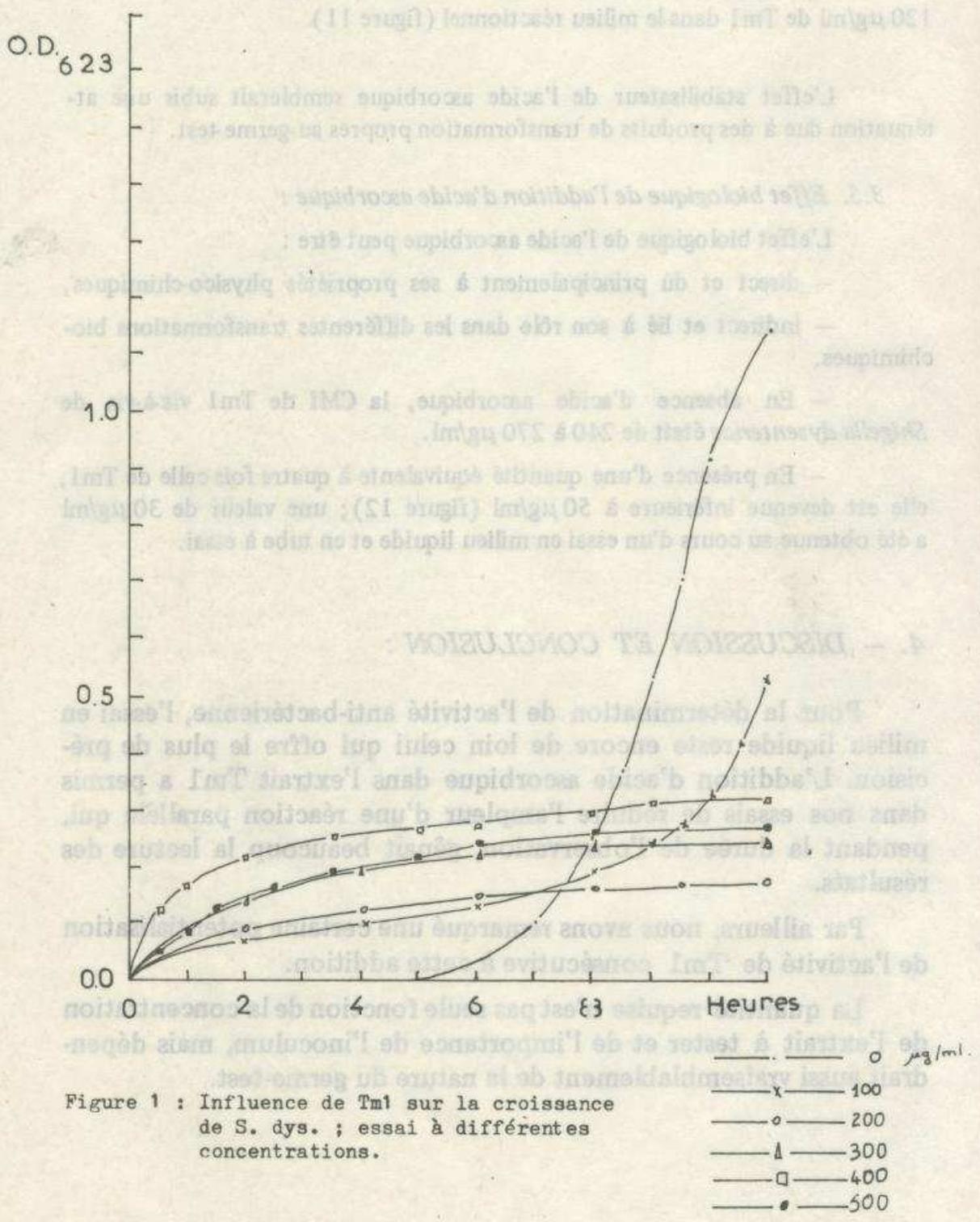


Figure 1 : Influence de Tm1 sur la croissance de S. dys. ; essai à différentes concentrations.

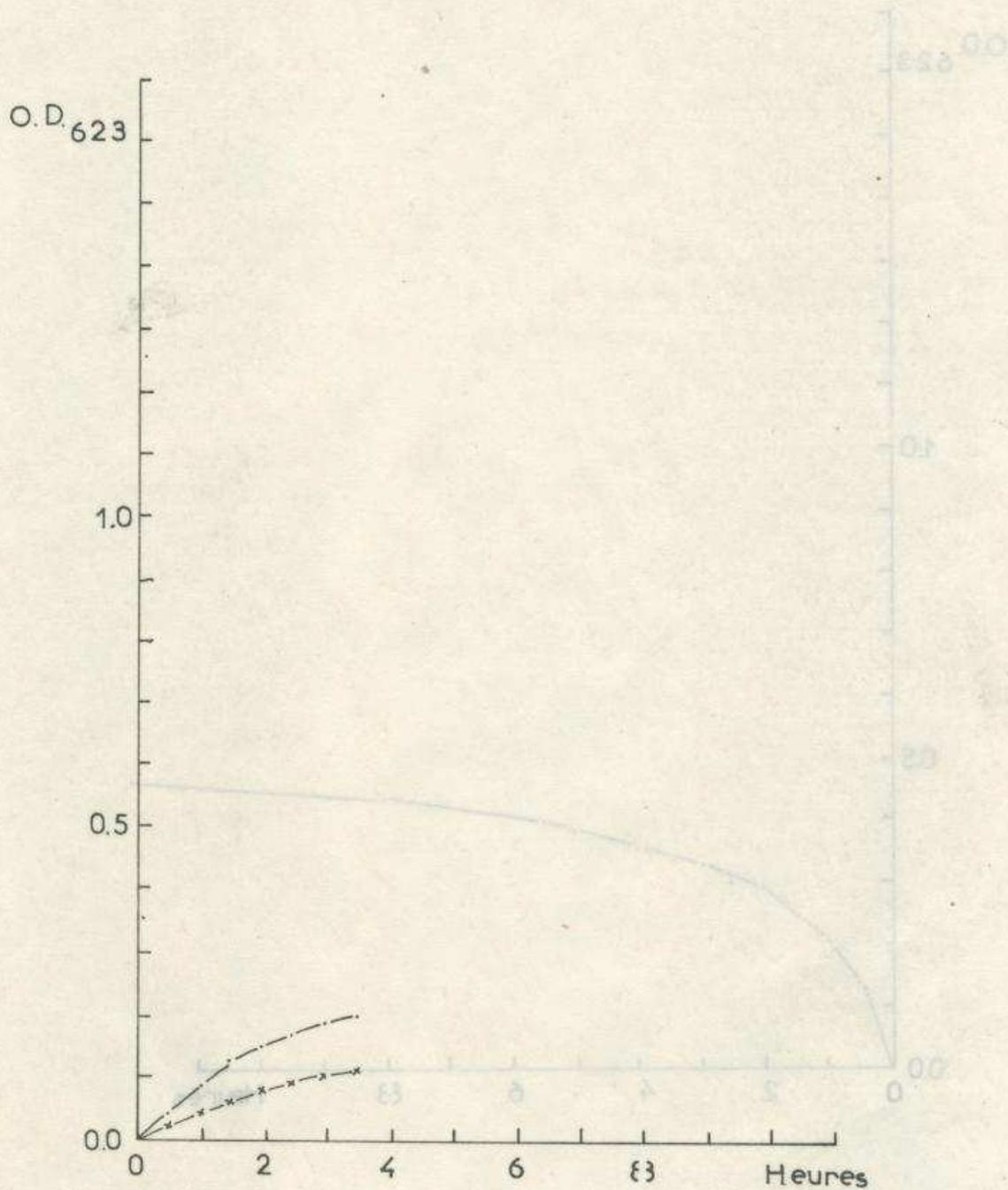


Figure 2 : Variation au cours du temps de la D.O. 623 du milieu réactionnel non ensemencé.

[Tm<sub>1</sub>]  
 ——— 500 µg/ml  
 —x— 300

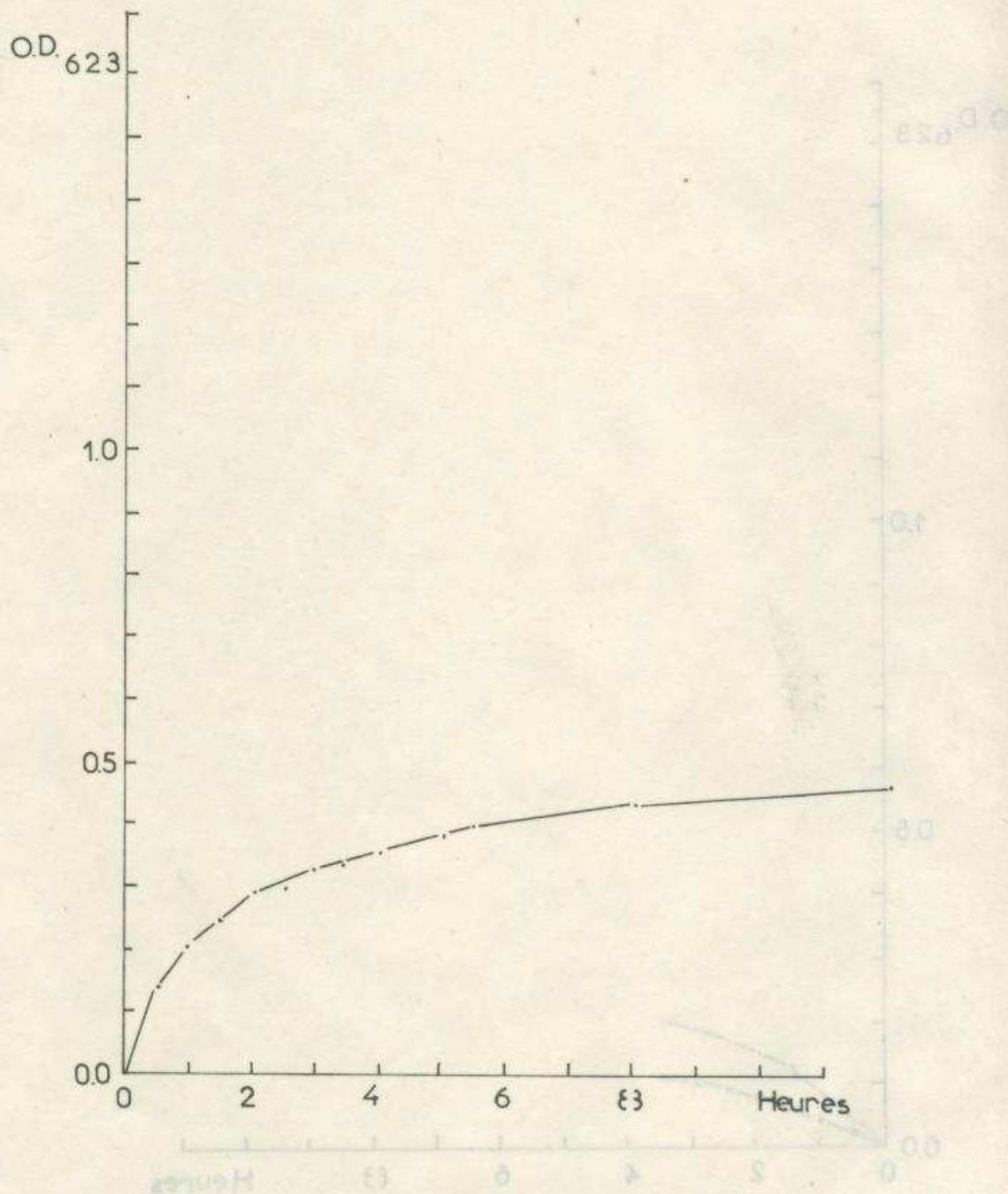


Figure 3 : Variation au cours du temps de la D.O. 623 du milieu réactionnel non ensemencé et à pH 6,4

[Tm] = 500  $\mu\text{g/ml}$

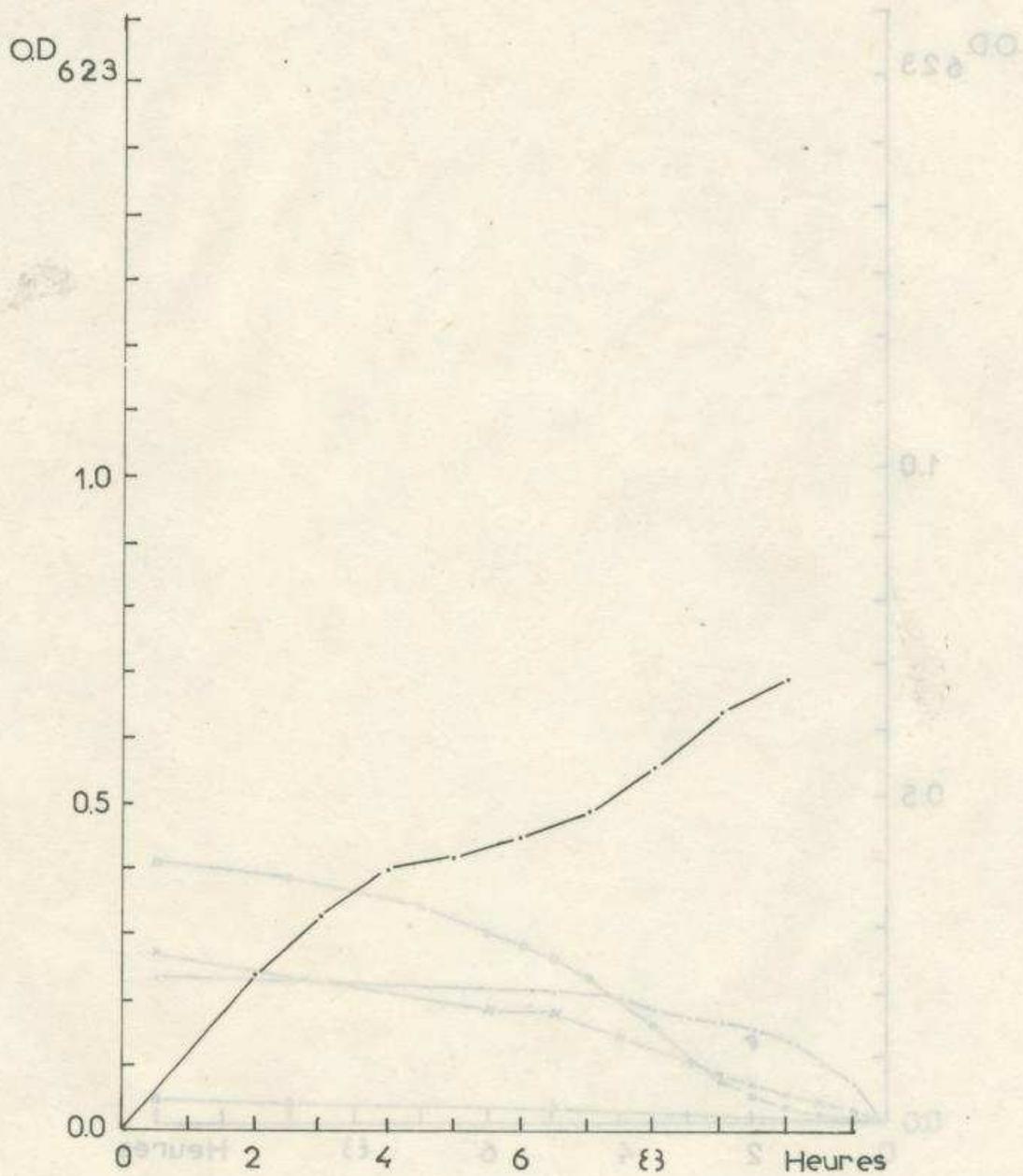


Figure 4 : Variation au cours du temps de la D.O.623 du milieu réactionnel non ensemencé et à pH 8,4  
 [Tm1] = 500 µg/ml

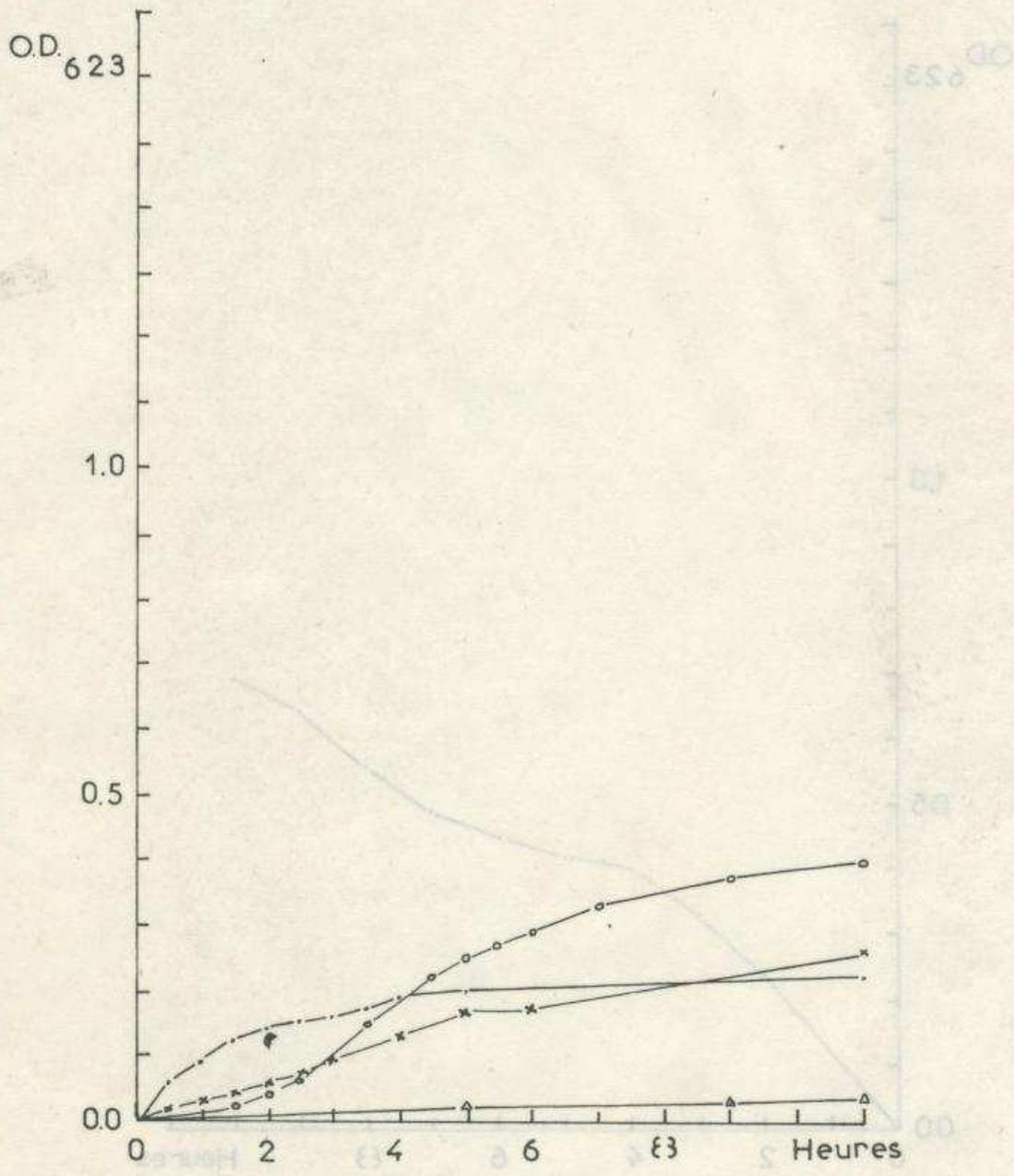


Figure 5 : Influence de l'addition d'acide ascorbique sur la croissance de S. dys. en présence de l'extrait Tml.

—•—	150.000
—□—	15.000
—△—	1500
—○—	150
—x—	15
—•—	1.5 µg/ml

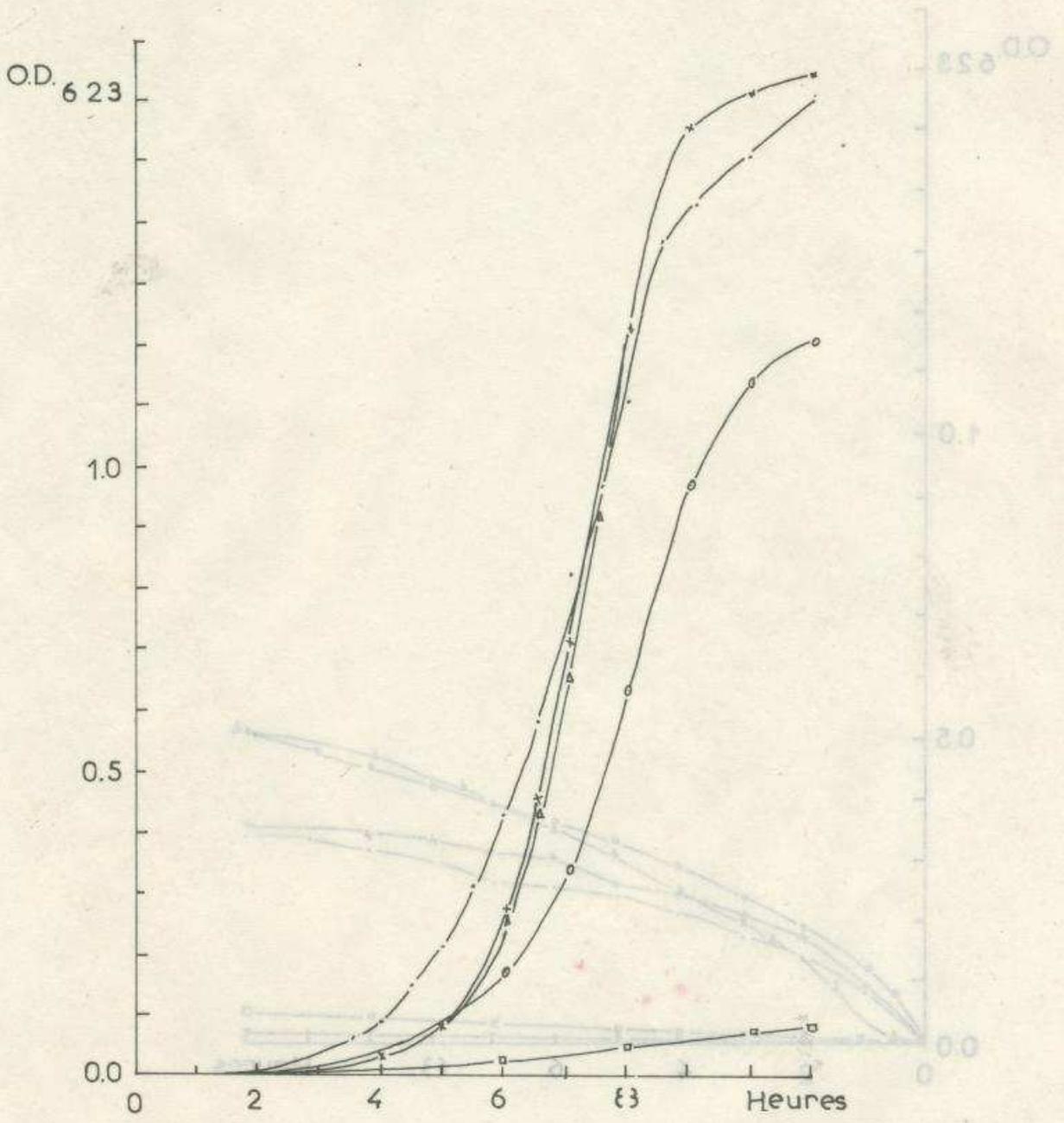


Figure 6 : Contrôle de la toxicité propre de l'acide ascorbique sur *S. dysenteriae*.

—•—	0 µg/ml
—x—	26
—o—	260
—Δ—	2600
—□—	26000

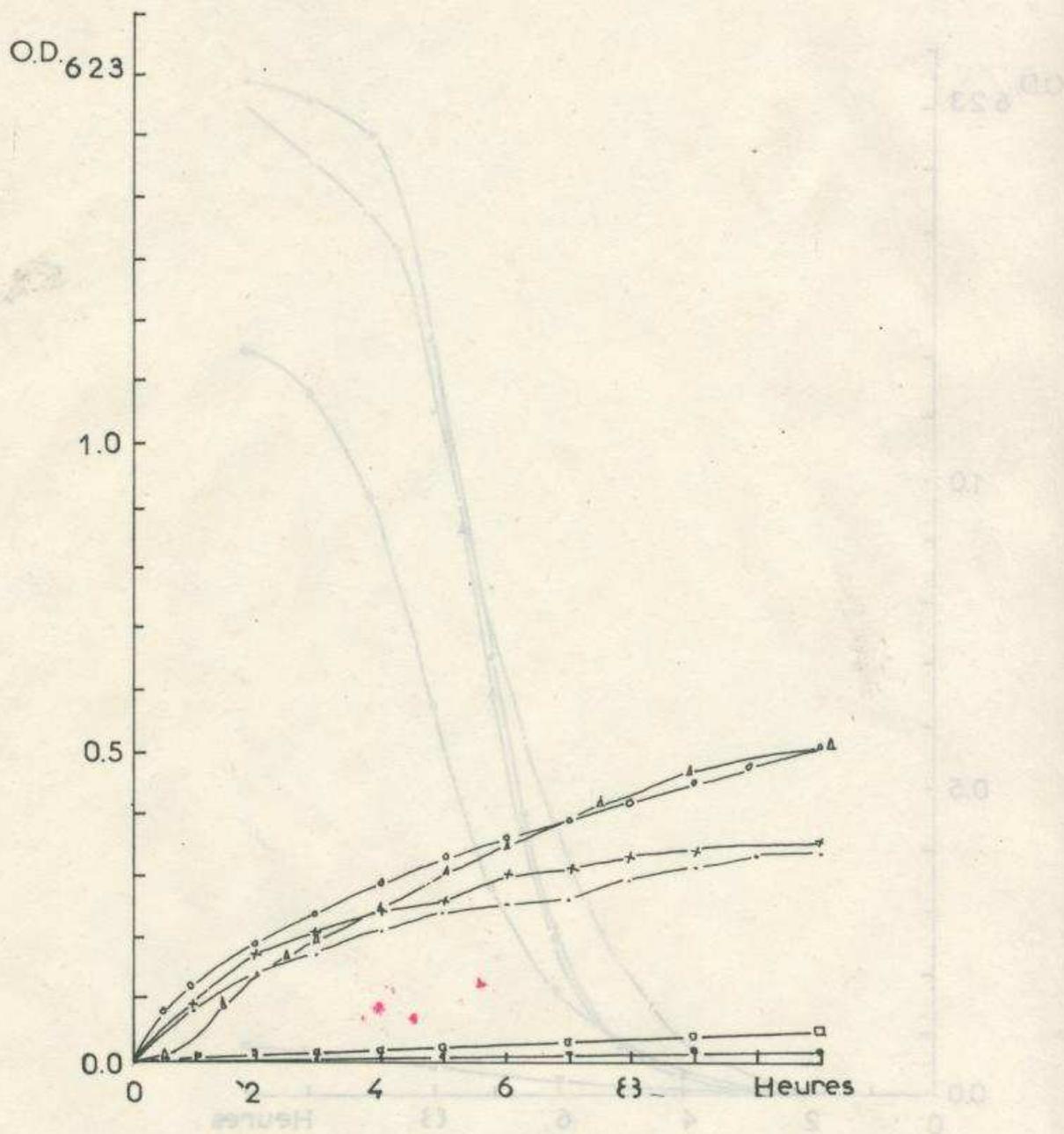


Figure 7 : Influence de l'addition d'acide ascorbique sur l'extrait BR1

- — — 0 µg/ml
- x — 0.2
- o — 2
- Δ — 20
- □ — 200
- ● — 2000

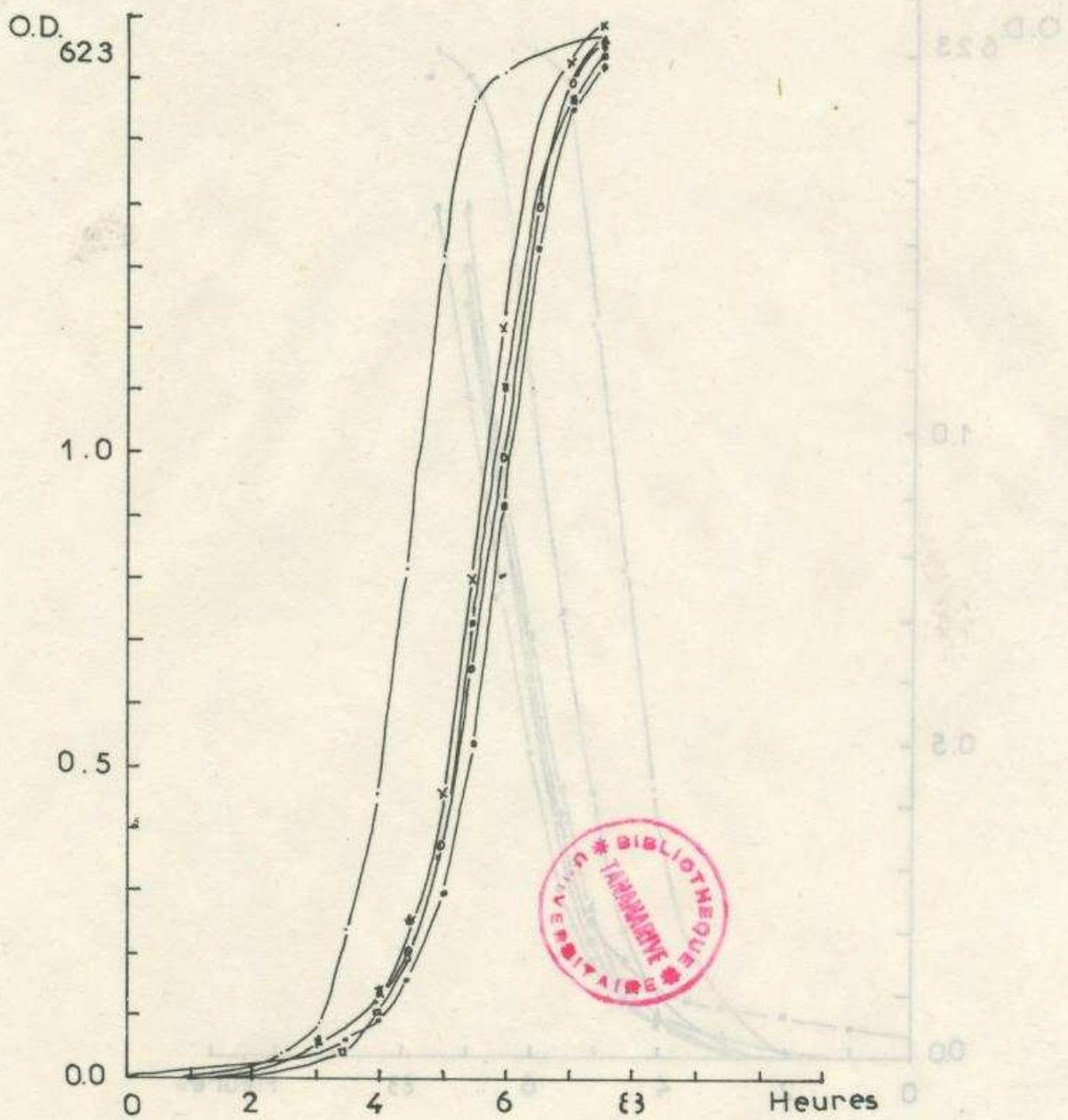


Figure 8 : Influence de l'addition d'acide ascorbique sur la croissance de E. coli ATCC 10536 en présence de l'extrait EM1.

- 0 µg/ml
- x — 60
- o — 120
- Δ — 180
- □ — 240
- ● — 300

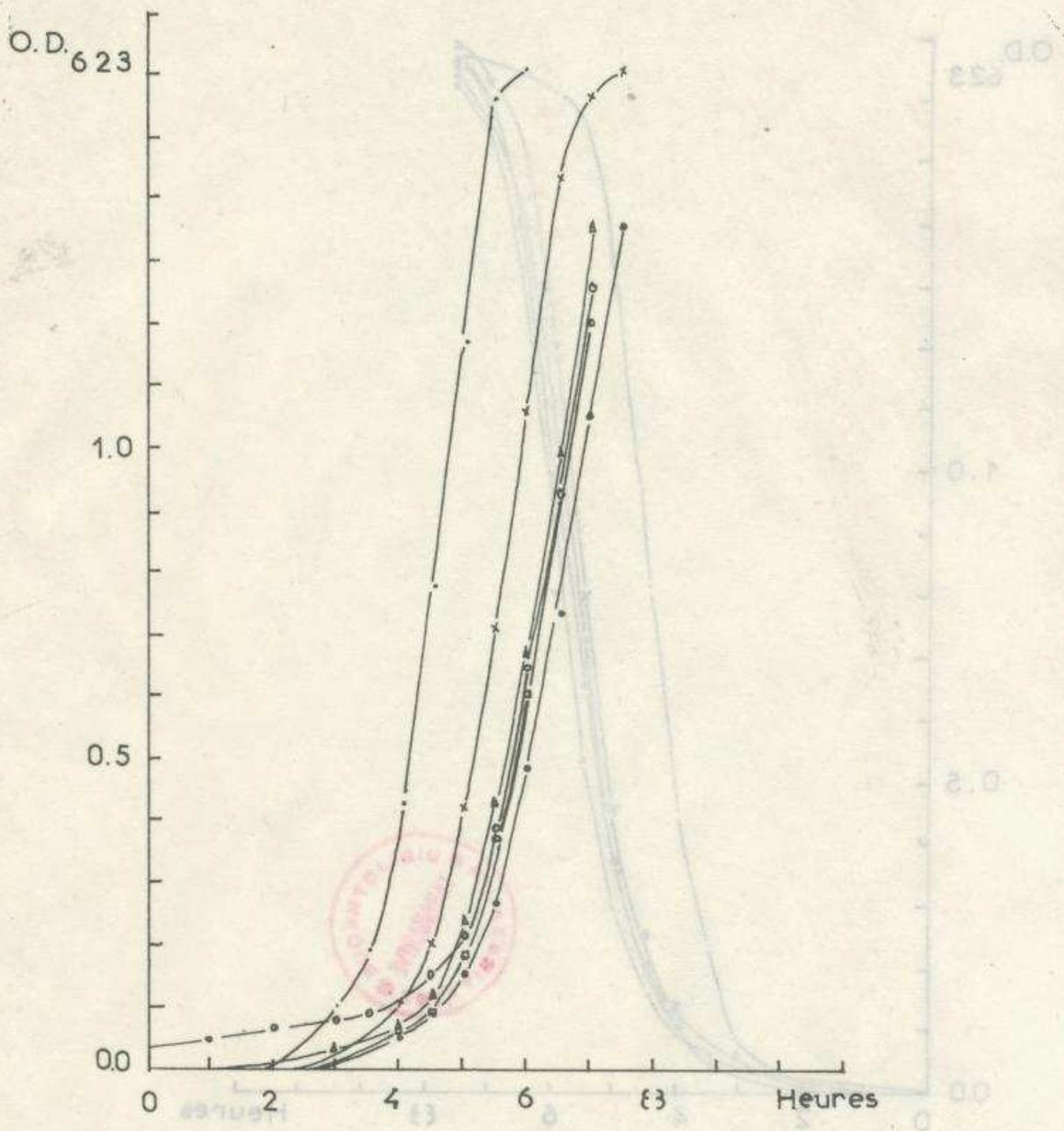


Figure 9 : Influence de l'addition d'acide ascorbique sur la croissance de E. coli 026B6 en présence de l'extrait Tm1.

- . — 0 µg/ml
- x — 30
- o — 160
- Δ — 240
- □ — 320
- • — 400

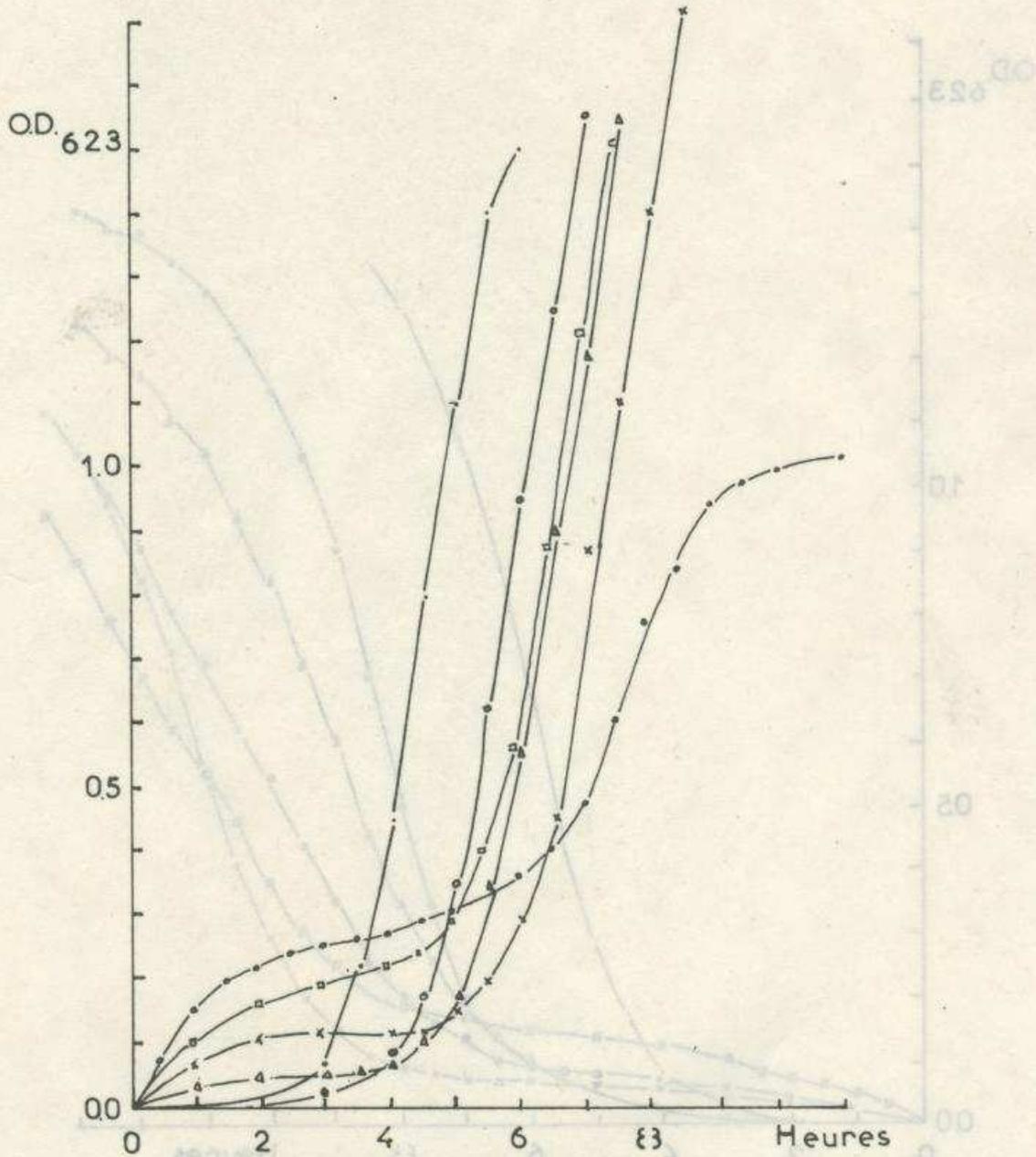


Figure 10 : Influence de l'addition d'acide ascorbique sur la croissance de *Salmonella enteritidis* en présence de l'extrait Tm1.

- · — 0 µg/ml
- ○ — 30
- △ — 160
- × — 240
- □ — 320
- ● — 400

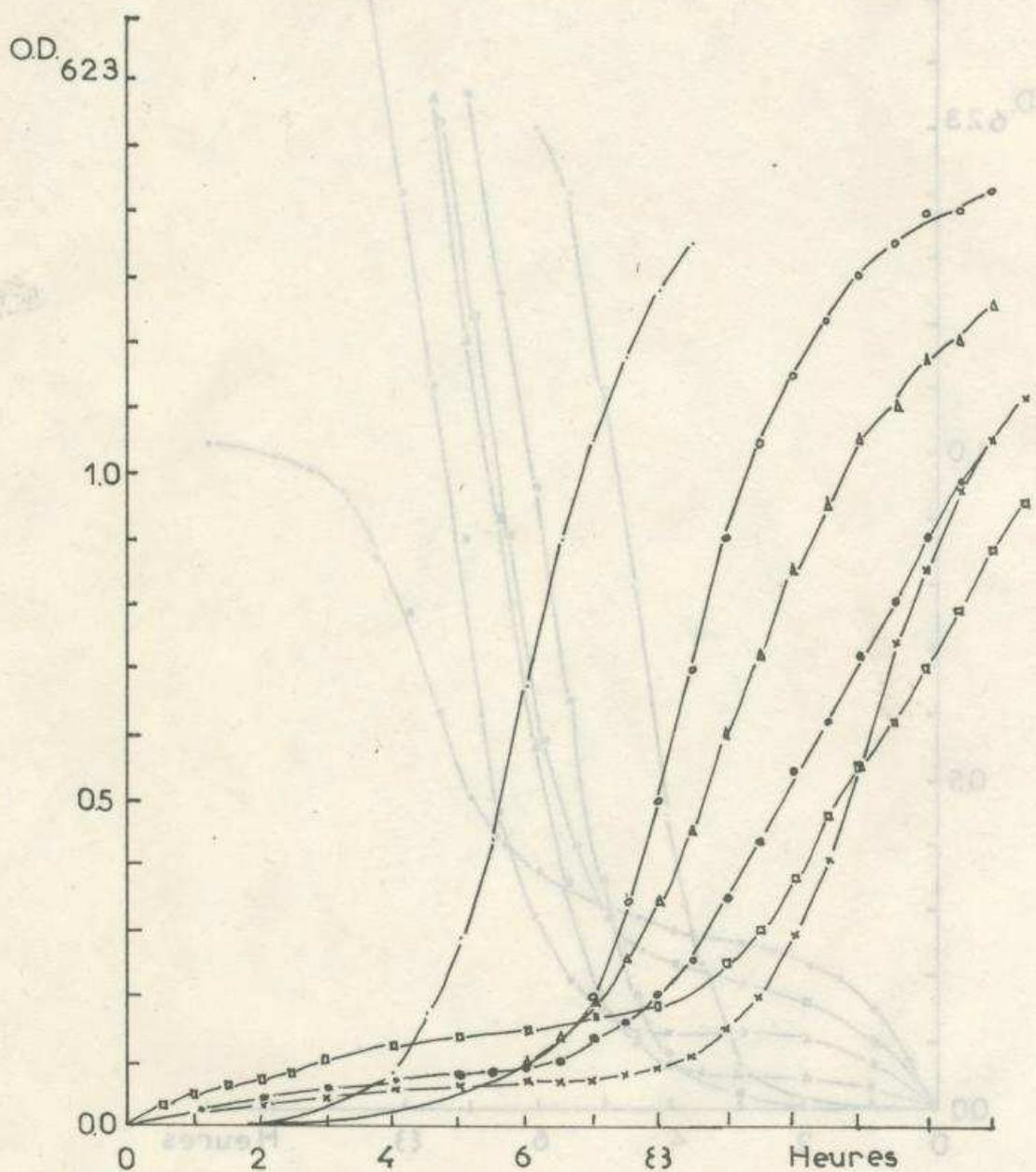


Figure 11 : Influence de l'addition d'acide ascorbique sur la croissance de *S. flexneri* en présence de l'extrait Tm1.

—	0	µg/ml
—○—	60	
—△—	120	
—x—	180	
—●—	240	
—□—	300	

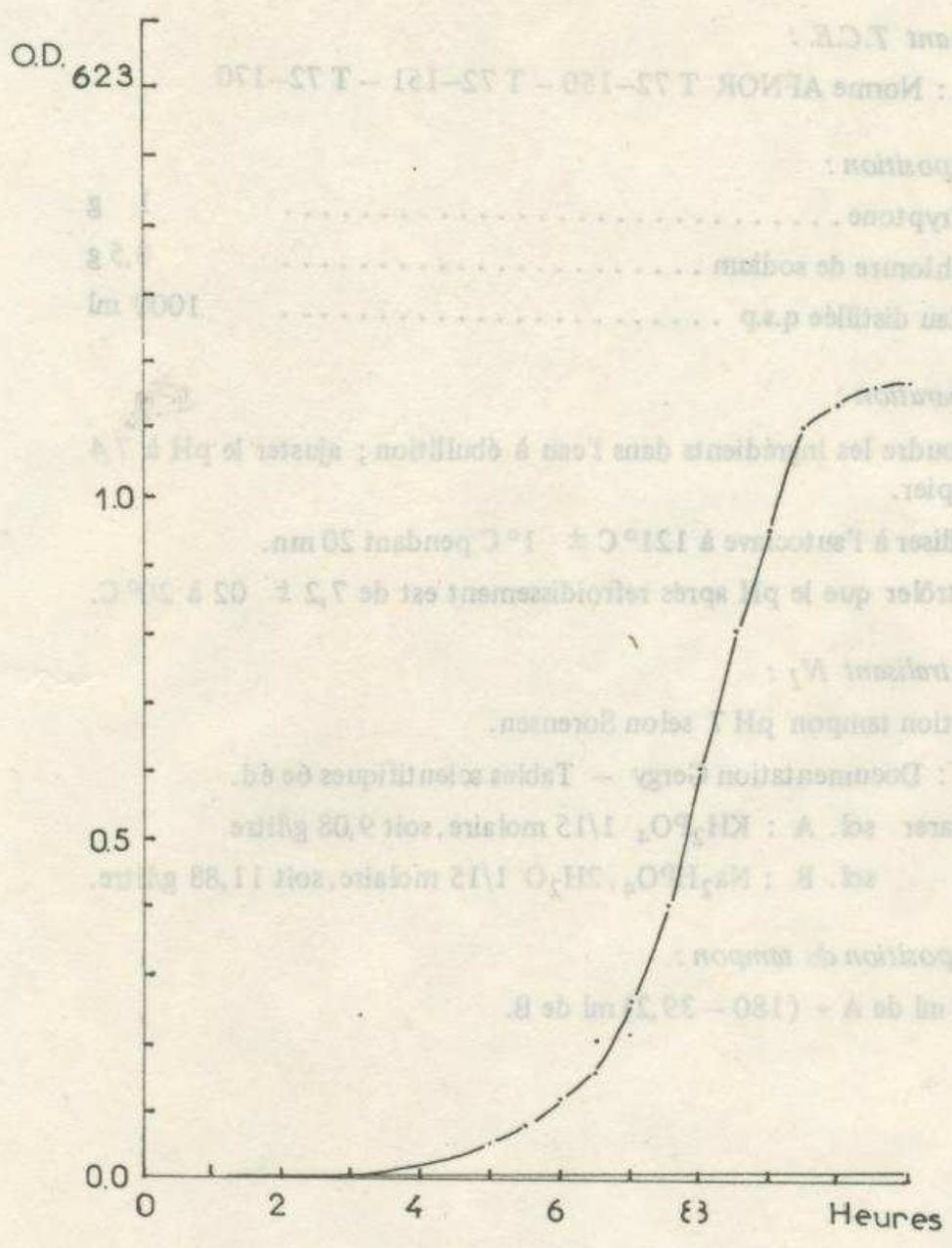


Figure 12 : Action de l'extrait Tm1 sur la croissance de S. dys. en présence d'une quantité croissante d'acide ascorbique.

- - - - - Témoin  
 ———— Essai  
 [Tm1] : [50 à 250] µg/ml

5. - ANNEXE :

5.1. Diluant T.C.E. :

Réf. : Norme AFNOR T 72-150 - T 72-151 - T 72-170

Composition :

- Tryptone . . . . .	1 g
- Chlorure de sodium . . . . .	8,5 g
- Eau distillée q.s.p . . . . .	1000 ml

Préparation :

Dissoudre les ingrédients dans l'eau à ébullition ; ajuster le pH à 7,4 environ au papier.

Stériliser à l'autoclave à  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 20 mn.

Contrôler que le pH après refroidissement est de  $7,2 \pm 0,2$  à  $20^{\circ}\text{C}$ .

5.2. Neutralisant  $N_1$  :

Solution tampon pH 7 selon Sorensen.

Réf. : Documentation Gergy - Tables scientifiques 6e éd.

Préparer sol. A :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1/15 molaire, soit 9,08 g/litre

sol. B :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$  1/15 molaire, soit 11,88 g/litre.

Composition du tampon :

39,2 ml de A + (180 - 39,2) ml de B.