

Etudes des activités antimicrobienne et antioxydante de l'extrait de racine d'*Anthospermum perrieri* (RUBIACEAE)

Vahinalahaja Eliane Razafintsalama (1), Rojoniaina Ambinintsoa Rakotoarison (2), Mbolatiana Abigaela Rakotoarison (1), Danielle Aurore Doll Rakoto-Ranoromalala (2), Lalasoana Ranaivoarison Ranarivelo(1), Faliarivony Randriamialinoro(1), Michel Ratsimbason (1), Sylvia Tiana Rasoarivelo Ralambonirina (1),

(1) Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques, rue R. P. Rahajarizafy A. de Padoue, Ambodivoanjo Ambohitovo, BP 702, 101 Antananarivo, Madagascar.

(2) Faculté des Sciences, Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée. BP. 906, Antananarivo 101, Madagascar

*Correspondance courriel : raverazahaja@gmail.com

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de la flore malgache, l'étude de la plante *Anthospermum perrieri*, une Rubiaceae endémique de Madagascar, a été effectuée.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a montré que l'extrait est actif contre les bactéries Gram+ (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*) et les bactéries Gram - (*Salmonella enterica*, *Shigella flexnerii* et *Yersinia enterocolitica*). La valeur de la Concentration Minimale Inhibitrice est égale à 1800µg/ml et celle de la Concentration Minimale Bactéricide est supérieure à 3800µg/ml. La recherche de l'activité antioxydante a permis de montrer qu'à une concentration de 0,5mg/ml, l'extrait est doté d'un pouvoir antioxydant avec une réduction du radical libre 2,2-diphényl 1- picrylhydrazyl (DPPH) de 25,73% correspondant à l'équivalent α - tocophérol de 338,42mM /mg /l d'extrait.

Mots clés : *Anthospermum perrieri*, Rubiaceae, plante endémique, activité antimicrobienne, activité antioxydante

Abstract

For the valorisation of medicinal plants of Madagascar's flora, the study of plant *Anthospermum perrieri*, an endemic Rubiaceae Madagascar, was performed.

The antimicrobial activity evaluation showed that the extract is active against Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*) and Gram - (*Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* and *Shigella flexnerii*). The value of the Minimum Inhibitory Concentration is equal to 1800µg / ml and that of the minimum bactericidal concentration is greater than 3800µg / ml. The antioxidant activity research has shown that at a concentration of 0.5mg / ml, the extract has an antioxidant with a reduction of free radical 2,2-diphenyl 1- picrylhydrazyl (DPPH) 25.73% of the equivalent α - tocopherol 338,42mM / mg / l of extract.

Keywords: *Anthospermum perrieri*, Rubiaceae, endemic plant, antimicrobial, antioxidant activity

1 INTRODUCTION

L'*Anthospermum perrieri*, plante connue sous les noms vernaculaires de « Hazonorana, Kofehimamy », et « Hazomamy » Ralambonirina, (2010), est une plante endémique de Madagascar. Elle appartient à la famille des Rubiaceae. Les Rubiaceae occupent la quatrième place parmi les familles de plantes à fleurs. Elle est des plus importantes avec 13 200 espèces environ incluses dans 650 genres. A Madagascar, les Rubiaceae représentent 7 à 9 % de la phytodiversité de la Grande Ile. Elles sont abondantes et omniprésentes dans les forêts tropicales humides et sèches. L'*Anthospermum perrieri* se trouve surtout aux environs d'Antananarivo. La tisane de la plante entière est utilisée pour soulager les maux de têtes. *Anthospermum perrieri* peut être associée à d'autres plantes pour soigner d'autres maladies : maladie cutanée, la toux, maux d'estomac et du foie (Ralambonirina, 2010).

Les études antérieures concernant les fractions méthanoliques et l'huile essentielle de la racine de la plante ont montré sa richesse en métabolites secondaires à potentialités biologiques intéressantes Ralambonirina et al.(2011). En effet, l'étude a montré la présence de 3 quinones : anthospermoquinone, lapachol-1,4-di-O- β -glucoside et déhydro- α -lapachone ; 4 flavonoïdes : quercétol, isoquercitroside, rutoside, catéchine; 2 coumarines : fraxétine, fraxine; un acide phénol : acide proto-catéchique ; 2 iridoïdes : aspéruloside, acide aspérulosidique et un stéroïde : 3-O-glucosyl-stigmastérol. Les extraits bruts et les iridoïdes isolés de cette plante se sont avérés actifs à partir de 0,3 mg/ml sur 2 espèces d'*Achromobacter*, 4 espèces de *Burkholderia*, sur

Stenotrophomonas maltophilia, *Alcaligenes faecalis* et sur *Serratia amarcenscens*. Ces germes sont responsables de diverses maladies à savoir la mucoviscidose, la mélioïdose ou maladie de Whitmore et les infections nosocomiales.

En outre, les huiles essentielles des parties aériennes de cette plante contiennent plus de 80 produits monoterpéniques et sesquiterpéniques et elles ont été actives sur une vingtaine d'espèces bactériennes Gram positif et Gram négatif.

D'après les études bibliographiques, le genre *Anthospermum* reste jusqu'à présent très peu étudié : les seules données chimiques et biologiques disponibles dans la littérature concernant la plante *Anthospermum perrieri* ont été obtenues grâce aux travaux de Ralambonirina et al. en 2011.

D'autre part, les extraits obtenus par le dichlorométhane de la racine de cette plante n'ont fait encore l'objet d'aucune étude, à notre connaissance. Cette étude a pour d'en étudier les propriétés biologiques.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Matériel végétal

Des plantes entières d'*Anthospermum perrieri* (figure 1) ont été récoltées sur le versant Ouest de la colline rocailleuse d'Ambohimanompo. Cette colline appartient à la Commune rurale d'Arivonimamo, région Itasy, se situant à 40 km à l'ouest de la ville d'Antananarivo. La plante a été identifiée au sein de l'Herbarium du Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza (PBZT). Des échantillons d'herbier ont été déposés au PBZT et au Département de Botanique du Centre National d' Application des Recherches Pharmaceutiques (CNARP). Après la récolte, la plante a été séchée, puis broyée à l'aide d'un broyeur mécanique à hélice modèle 02, marque WILEY MILL, jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. La poudre a été conservée dans des sachets scellés à la température ambiante. Elle constitue le matériel végétal de départ.



Figure 1 : Photos (à l'état naturel et herbier) et dessins (agrandissement des organes) d'*Anthospermum perrieri* (source : Sylvia Tiana Rasoarivelo Ralambonirina)

2.2 Préparation de l'extrait de plante

400g de poudre des racines d'*Anthospermum perrieri* sont lixiviées dans le dichlorométhane. Les macérats obtenus sont filtrés sur du coton pour retenir les marcs. Les marcs sont récupérés puis mis de nouveau en suspension dans le dichlorométhane. Les filtrats obtenus sont ensuite évaporés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif de marque Büchi, à la température de 45°C. Les extraits obtenus sont pesés. L'opération est répétée jusqu'à ce que la poudre soit épuisée c'est-à-dire lorsque les poids des extraits restent constants.

2.3 Germes testés

Deux bactéries Gram + : *Clostridium perfringens* ATCC13124; *Staphylococcus aureus* ATCC11632, cinq bactéries Gram - : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145; *Salmonella enteritidis* ATCC13076, *Yersinia enterocolitica* ATCC23715 et *Shigella flexnerii* ATCC12022 et une levure : *Candida albicans* ATCC10231 ont été utilisées pour la recherche de l'activité antimicrobienne de la plante. Ces souches proviennent de la collection du laboratoire de l'Université La Réunion (LCSNSA: « Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des aliments », Saint Pierre, La Réunion).

2.4 Recherche de l'activité antimicrobienne

2.4.1 Méthode du disque

L'activité antimicrobienne *in vitro* des extraits dichlorométhane de l'*Anthospermum perrieri* a été évaluée par la méthode développée par Ponce et al. (2003) ; Moroh et al. (2008) et Razafintsalama et al. (2013). Une quantité égale à 2ml de suspension de bactéries et de levures correspondant à 0,5Mac Farland est étalée uniformément et respectivement à la surface : du milieu Mueller Hinton Agar pour *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* et du milieu Sabouraud pour *Candida albicans*. Des disques de cellulose stériles de 6mm de diamètre (BioMérieux) imprégnés de 10µl des extraits bruts à la concentration égale à 100 mg/ml, soit 1mg/disque, sont placés à la surface des géloses ensemencées. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour les levures. Le diamètre de la zone d'inhibition (mm) autour de chaque disque est mesuré après 24h. Les antifongiques et les antibiotiques de référence ketoconazole à 50µg /disque et Streptomycine à 500µg /disque, respectivement, sont utilisées comme des témoins positifs.

2.4.2 Méthode de Microdilution en milieu liquide

La détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) a été faite suivant la méthode décrite auparavant (Razafintsalama et al., 2013) avec quelques modifications. L'extrait dichlorométhane a été dissout dans du DMSO à 3% pour avoir une concentration égale à 1mg/ml, puis stérilisée par filtration millipore ayant de 0,22 µm de diamètre des pores. Ensuite, 100µl de chaque extrait à tester ont été dilués avec 95µl du Muller Hinton Broth (MHB) puis répartis dans les microplaques à 96 puits. 5 µl d'inoculum standardisés à 10⁸ CFU/mL et ajustés à 0,5McFarland sont ajoutés dans chaque puits. Ces dilutions ont été réalisées de façon à avoir des concentrations finales des extraits comprises entre 0.24µg /ml et 500µg/ml. Un contrôle positif de croissance contenant l'inoculum sans extrait et un contrôle négatif qui ne comporte que le milieu MHB sont également préparés. Chaque microplaque est par la suite celée avec du parafilm (MicroAmp® Optical Adhesive Film; Applied Biosystems). Le test est répété trois fois. La CMI a été évaluée par ajout de 20µl de solution de 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) à 10% dans chaque puits, après incubation à 37°C pendant 30min (Kwete et al., 2008). Le MTT, un indicateur coloré de couleur jaune vire au violet lorsqu'il y a croissance bactérienne. En effet, la CMI est indiquée par la cupule qui contient la plus faible concentration d'extrait où aucun changement de coloration n'est observé. Pour la détermination de la CMB, le contenu de chaque puits (10µL) utilisé pour la détermination de la CMI qui ne présente pas de croissance visible est repiqué sur milieu de Mueller Hinton Agar puis incubé à 37°C pendant une nuit. La CMB correspond à la plus faible concentration de l'extrait où aucune colonie bactérienne ne pousse après incubation.

2.5 Recherche de l'activité antioxydante

La méthode du 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) a été utilisée pour la recherche de l'activité antioxydante. L'activité est déterminée selon la méthode d'Awika et al. (2003). En effet, 25mg de DPPH sont dissous dans 100 ml de méthanol et gardés à -20 °C à l'abri de la lumière avant utilisation. Dans des tubes secs, 200 µl de la solution à tester sont introduits, puis 3800 µl de la solution de DPPH à 25% sont ajoutés. Pour chaque concentration, un blanc constitué de 3800 µl de DPPH, additionné de 200 µl de méthanol est préparé. Après 30min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante, l'absorbance à 517nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'activité antioxydante qui exprime la capacité de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. Elle est donnée par la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = (A_{\text{blanc}} - A_{\text{produit testé}} / A_{\text{blanc}}) \times 100$$

A_{produit testé} : Absorbance du produit testé

A_{blanc} : Absorbance du DPPH et MeOH

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures ± écart type.

Le pourcentage d'inhibition ainsi calculé est comparé à une courbe d'étalonnage de l'α- tocophérol entre 100mM à 600mM.

3 RÉSULTATS

3.1 Rendement de l'extraction

L'épuisement de 400 g de poudre des racines de la plante *Anthospermum perrieri* a permis d'obtenir 5 g d'extrait dichlorométhane de couleur marron, donc un rendement égal à 1,25%.

3.2 Activité antimicrobienne

Les résultats des tests antimicrobiens sont présentés dans le tableau 1

Tableau 1: Effets de l'extrait dichlorométhane d'*Anthospermum perrieri* à 1mg/disque sur la croissance des bactéries

Souches		activité	extrait dichlorométhane	Streptomycine	Kétoconazole
Bactéries Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	ZI	10±0	21±0	NT
		CMI	1800	NT	NT
		CMB	>3800	NT	NT
	<i>Clostridium perfringens</i>	ZI	9±0	19±0,33	NT
		CMI	1800	NT	NT
		CMB	>3800	NT	NT
Bactéries Gram -	<i>Salmonella Enteritidis</i>	ZI	14±0	20±0	NT
		CMI	>3800	NT	NT
		CMB	>3800	NT	NT
	<i>Escherichia coli</i>	ZI	-	22±0	NT
		CMI	NT	NT	NT
		CMB	NT	NT	NT
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ZI	-	25±0	NT
		CMI	NT	NT	NT
		CMB	NT	NT	NT
	<i>Shigella flexnerii</i>	ZI	10±0,3	20±0,6	NT
		CMI	1800	NT	NT
		CMB	>3800	NT	NT
<i>Yersinia enterocolitica</i>		ZI	12±0,5	NT	NT
		CMI	>3800	25±0	NT
		CMB	>3800	NT	NT
levure	<i>Candida albicans</i>	ZI	-	NT	11±0,5
		CMI	NT	NT	NT
		CMB	NT	NT	NT

- : aucune zone d'inhibition ; NT : Non testé ; ±SD : Moyenne des trois essais ; ZI : zone d'inhibition ; CMI : Concentration Minimale inhibitrice ; CMB : Concentration Minimale bactéricide ; extrait dichlorométhane : testé à 1mg/disque ; Streptomycine et Kétoconazole testés à 500µg/disque et à 50µg/disque, respectivement.

Il a résulté de la mesure des zones d'inhibitions (ZI) que les 2 souches bactériennes Gram + *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*, et les 3 souches Gram – : *Salmonella enterica*, *Shigella flexnerii*, *Yersinia enterocolitica*, ont été sensibles à l'extrait dichlorométhane avec des diamètres d'inhibition compris entre 9 et 14 mm. Les souches bactériennes *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que la levure *Candida albicans* ont été résistantes à l'extrait. Cependant, l'extrait est moins actif que l'antibiotique de référence (Streptomycine) dont le diamètre du halo d'inhibition varie de 19 à 25mm. Pour la recherche de la CMI et de la CMB des souches sensibles, l'extrait dichlorométhane a une valeur de CMI= 1800µg/ml contre *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* et *Shigella flexnerii*. Elle est supérieure à 3800 µg/ml sur *Salmonella Enteritidis* et *Yersinia enterocolitica*.

3.3 Pouvoir antioxydant

Tableau 2 : Activité antioxydante de l'extrait dichlorométhane d'*Anthospermum perrieri* à 0,5 mg/ml

extrait	% d'inhibition de DPPH	équivalent α-tocophérol mM/mg/L extrait
---------	------------------------	---

extrait dichlorométhane	25,73	338,42
-------------------------	-------	--------

La recherche du pouvoir antioxydant de l'extrait dichlorométhane par la méthode de DPPH a montré qu'à une concentration de 0,05 mg/ml, sa capacité à réduire le DPPH est de 25,73%.

En amenant ce pourcentage de réduction du DPPH dans l'équation de la courbe de tendance de l' α -tocophérol $y = 0,073x + 1,022$ avec $R^2 = 0,993$ (figure 2), la capacité de l'extrait à réduire le DPPH correspond à 338,42mM/mg/L.

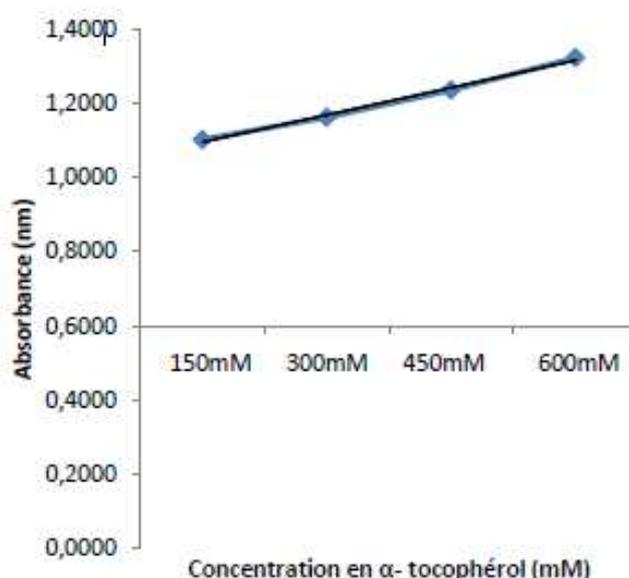


Figure 2 : Courbe standard de l' α -tocophérol

4 DISCUSSION

Cette étude a montré que l'extrait dichlorométhane de la racine d'*Anthospermum perrieri* est doté d'activité antibactérienne contre les bactéries à Gram+ (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*) et les bactéries à Gram- (*Salmonella enterica*, *Shigella flexnerii* et *Yersinia enterocolitica*). Par contre, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* y ont été résistantes.

En ce qui concerne l'activité antioxydante, cet extrait montre la potentialité de l'extrait à piéger le radical libre DPPH.

Ces activités biologiques peuvent être liées à la composition chimique de cet extrait. Ralambonirina, (2010); Bruneton, (1993) ; Paris et Moyses (1965) affirment que les flavonoïdes et certains terpènes possèdent une activité antimicrobienne et jouent un rôle important dans la défense de la plante contre les microorganismes.

D'après Hartwig et al., (2012); Meléndez, (2014), l'activité antioxydante pourrait toujours être attribuée à la présence des composés phénoliques. Il existe plusieurs mécanismes d'action de ces composés selon leur structure et le mode d'arrangement des groupements hydroxyles. Les flavonoïdes agiraient en piégeant ces radicaux libres (Sokol-Letowska et al., 2007) tandis que les tanins agiraient comme donneurs de protons et accepteurs de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'autooxydation (Perret, 2001). Cependant, pour le cas des composés phénoliques (Φ -OH), le principal mécanisme d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• qui est transformé en une molécule stable DPPHH (Molyneux, 2004).

Ces familles chimiques ont été détectées dans l'extrait méthanolique de la partie aérienne de cette plante. Notre étude en cours consiste à la détermination des constituants de l'extrait dichlorométhane de la racine d'*Anthospermum perrieri* qui sont responsables de ces activités.

5 CONCLUSIONS

Pour conclure, cette étude nous a permis de réaliser l'extraction au dichlorométhane des racines d'*Anthospermum perrieri*, d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait et aussi d'étudier l'activité antioxydante. Pour l'activité antimicrobienne, l'extrait possède des activités contre les bactéries à Gram + et quelques bactéries à Gram-. L'extrait possède une capacité antioxydante. A terme, un nouvel antibiotique et anti radicalaire pour ralentir le vieillissement cellulaire, préserver du cancer, prévenir les maladies cardio-vasculaires,...pourrai(en)t être développé(s) à partir de cette plante en procédant à un isolement bioguidé.

6 REFERENCES

Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L. and Cisneros-Zevallos, L. (2003): Screening method to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products, *Journal Agriculture Food Chemistry*, 51(23), 6657-6662.

Bruneton, J. (1993): *Element de phytochimie et de pharmacognosie*, Lavoisier, 2^{èmes} édition, Technique et documentation Lavoisier, Paris.

Hartwig, V. G., Brumovsky, L. A., Fretes, R. M. and Sanchez, B. L. (2012): A novel procedure to measure the antioxidant capacity of yerba mate extracts *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32 (1), 126-133.

Kuete, V., Fozing, D. C., Kapche, W. F. G. D., Mbaveng, A. T., Kuate, J. R., Ngadjui, B. T. and Abega, Z. B. M. (2008): Antimicrobial activity of the methanolic-extract and compounds from *Morus mesozygia* stem bark, *Journal ethnopharmacologie*, 124 (3), 551-5.

Meléndez, N. P., Nevárez-Moorillón, V., Rodríguez-Herrer,a R., Espinoza, J. C. and Aguilar, C. N. (2014): A microassay for quantification of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging, *African Journal of Biochemistry Research*, 8 (1), 14-18.

Molyneux, P. (2004): The use of stable free radical diphenyl picrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarín Journal of Science and Technology*, 26 (2), 211 – 219.

Moroh, J.-L. A. , Bahi, C. , Dje, K. , Loukou, Y. G. et Guede-Guina, F. (2008) : Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides*(Baker) milne-redheat (Rubiaceae) sur la croissance *in-vitro* des souches d'*Escherichia coli*, *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 77, 44 – 61.

Paris, R. et Moyses, H. (1965) : *Précis de matière médicale*, édition MASSON et Cie, Tome 1, collection de précis de pharmacie, Paris

Perret, C. (2001) : Analyse des tanins inhibiteurs de stilbène oxydase produite par *Btrytis cinerea*. , Thèse de Doctorat, Université de Neuchatel, Suisse, 173p.

Ponce, A. G., Fritz, R., Delvalle, C. and Roura, S. I. (2003): Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic swiss chard, *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie.*, 36, 679-684.

Sokol-Letowska, A., Oszmianski, J. and Wojdylo, A. (2007): Antioxydant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap, *Food chemistry*, 103, 853-859.

Ralambonirina Rasoarivelo, S. T. (2010) : Etudes chimique et antibactérienne d'*Anthospermum emirnense* et d'*Anthospermum perrieri*, Rubiaceae endémiques de Madagascar, Thèse de 3ème Cycle, Cotutelle Université Paris Descartes et Université d'Antananarivo, 285 p.

Ralambonirina Rasoarivelo, S. T., Grougnet, R., Vérité, P., Leclerc, M., Butel, M. J., Tillequin, F., Rakotobe, Guillou C. and Deguin, B. (2011): Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Anthospermum emirnense* Baker and *Anthospermum perrieri* Homolle (Rubiaceae), *Chemistry & Biodiversity*, 8, 145-154.

Razafintsalama, V., Girardot, M., Randrianarivo, R., Rakoto, D., Sarter, S., Petit, T., Ralambonirina, S., Deville, A., Grellier, P., Jeannoda, V., Mambu, L. (2013): Dilobenol A-G, Diprenylated dihydro flavonols from the leaves of *Dilobeia thouarsii*. *European Journal of Organic Chemistry* 10: 1929-1936

Razafintsalama, V., Sarter, S., Mambu, L., Randrianarivo, R., Petit T., Rajaonarison, J. F., Mertz, C., Rakoto, D., Jeannoda, V. (2013): Antimicrobial activities of *Dilobeia thouarsii* Roemer and Schulte, a traditional medicinal plant of Madagascar. *South Africa Journal of Botany* 87: 1-3.