

Test d'activité antibactérienne des extraits de *Rhaponema latifolia* et optimisation de cette activité par fonctionnalisation de leurs composés

Christian R. RAZAFINDRABE* et Gisèle RASOARIVÉLO

Laboratoire de Chimie, Mention Sciences Chimiques, Faculté des Sciences,
Université d'Antsiranana, Antsiranana 201 BPO, Madagascar

* Correspondance, courriel : razafichris@gmail.com

Résumé

La détection des résidus d'antibiotiques dans le lait est très courante dans des laboratoires d'analyse. En revanche l'utilisation de cette technique pour le test d'activité antimicrobienne des extraits s'avère très économique et assez rapide pour un grand nombre d'échantillon. Dans ce travail, nous avons utilisé le lait bouilli contenant des extraits de feuilles de *Rhaponema latifolia* et le ferment contenant de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* et permettant de coaguler ceci pour produire de l'acide lactique. Pour augmenter la probabilité de trouver une molécule antimicrobienne, ces extraits ont été traités par des différentes réactions en fonctionnalisant leurs composés. Les extraits hexanique oxydé et butanolique réduit ont montré une activité antibactérienne dont les DE_{50} sont respectivement $(9,837 \pm 0.001)$ et $(9,745 \pm 0.001)$ ppm.

Mots-clés : *activité antimicrobienne, fonctionnalisation, héli-synthèse, menispermaceae, Rhaponema latifolia.*

Abstract

Test of antibacterial activity extracts *Rhaponema latifolia* and optimization of this activity by functionalizing their compounds

The detection of antibiotic residues in milk is very common in analytical laboratories. However the use of this technique for the antimicrobial activity test extracts is very economical and fast enough for a lot of sample. In this work, we used the boiled milk containing leaf extracts *Rhaponema latifolia* and ferment containing *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* to coagulate it to produce lactic acid. To increase the probability of finding an antimicrobial molecule, these extracts were treated with different reactions functionalizing compounds. The hexane extract oxidized and reduced butanol extract showed antibacterial activity with ED_{50} are respectively $(9,837 \pm 0.001)$ and $(9,745 \pm 0.001)$ ppm.

Keywords : *antimicrobial activity, fictionalization, menispermaceae, Rhaponema latifolia, semisynthesis.*

1. Introduction

Plusieurs méthodes sont évoquées sur la détection des résidus d'antibiotiques tels que les bêta-lactamines, les macrolides, les pénicillines, les aminosides, les tétracyclines, le chloramphénicol à des doses importantes [1 - 5] dans le lait, il y en a qui sont plus rapides que la méthode officielle [6]. Dans notre cas, trois facteurs sont mis en exergue, le coût, la rapidité d'analyse et l'écologie. C'est vrai que plusieurs laboratoires possèdent plus de moyen financier que d'autres et ce cas n'a jamais été évoqué dans la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes. En plus l'utilisation de souches résistantes augmente le risque de contamination de l'air. Tous les chercheurs ne font que suivre les méthodes dont le coût dépasse énormément leur budget en espérant de pouvoir obtenir un financement dans le futur. Ce trio coût, rapidité et écologie nous a permis une ouverture aux autres chercheurs qui ont la possibilité de produire et pourraient sélectionner les extraits qui ont une activité antimicrobienne dans le respect de l'environnement. Ce travail a pour but de formuler une technique avec laquelle on peut alimenter les grands laboratoires en extrait antimicrobiens pour le test sur des souches plus résistantes.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel

Les tiges et les feuilles de *Rhaphanema latifolia* ont été récoltées dans le village Tsaratanimbary au périphérique de la réserve spéciale d'Analamerana. Les extraits de ces feuilles sont : extrait hexanique, extrait à l'éther di-éthylique, extrait à l'acétate d'éthyle, au dichlorométhane et extrait butanolique. La tétracycline à 10 ppm a été utilisée comme témoin de la fermentation et permettant de comparer le temps de coagulation de chaque échantillon.

2-1-1. Matériel de laboratoire

- Une balance de précision à 0.1 g près et une balance électronique à 10^{-4} g près, modèle JK-EAB-2004N, numéro de produit 030120 ;
- Un réfrigérateur pour le stockage des produits ;
- Une yaourtière.

2-1-2. Matériel biologique

- Lait frais ;
- Ferment d'yaourt contenant de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*.

2-2. Fonctionnalisation des composés d'extraits bruts

Sur ce travail, plusieurs réactions chimiques ont été réalisées pour convertir les extraits bruts. Ces réactions nous permettent d'obtenir des nouveaux produits. Chaque extrait suit la réaction d'oxydation et réduction mis à part l'extrait acétate d'éthylique et l'extrait éther diéthylique. Ces deux derniers ont été traités par la réaction d'hydrolyse acide. La partie expérimentale de chaque réaction est illustrée dans les **Tableaux** qui suivent.

Tableau 1 : Réaction d'oxydation [7]

Extrait brut à traiter	Réactif et solvant	Partie expérimentale
Extrait hexanique	AcOEt	<p>Dans 5 mg d'extrait hexanique est ajouté 2 mL de la solution de KMnO_4 à 6.32 mmol. Le mélange est agité à 28°C pendant 1 h et contrôlé sur CCM.</p> <p>L'agitation du milieu réactionnel est continue jusqu'à la réaction totale.</p> <p>La solution est filtrée au méthanol et évaporée.</p>
	KMnO_4	
	MeOH	
	H_2O	
Extrait à l'éther di-éthylique	AcOEt	<p>5 mg d'extrait d'éther diéthylique est dissout dans 1 mL d'AcOEt et ajouté 2 mL de la solution de KMnO_4 à 6.32 mmol, dilué dans 1 mL de H_2O.</p> <p>Après 1 h d'agitation, la réaction est totale d'après le contrôle sur CCM. Cette solution est filtrée au méthanol et évaporé.</p>
	KMnO_4	
	MeOH	
	H_2O	
Extrait à l'acétate d'éthyle	AcOEt	<p>Dans 5 mg d'extrait d'acétate d'éthylique est ajouté 2 mL de la solution de KMnO_4 à 6.32 mmol, dilué dans 1 mL de H_2O. Le milieu réactionnel est agité à 28°C durant 45 min, et suivi sur CCM. La solution est filtrée au méthanol et évaporée.</p>
	KMnO_4	
	MeOH	
	H_2O	
Extrait butanolique	KMnO_4	<p>4 mL d'extrait butanolique a été mis dans un bain marie chauffé à 80°C pendant 5 min d'agitation. Puis, 5 mL de la solution de KMnO_4 acidifié est versé dans cet extrait et agité durant 45 min environ. Après refroidissement, cette réaction est contrôlée sur CCM. Elle est basifiée à l'aide de la solution NaHCO_3 saturée à $\text{pH} = 8$ et filtrée, suivie d'une extraction au dichlorométhane et évaporée.</p>
	H_2SO_4	
	CH_2Cl_2	
	H_2O	
Extrait au dichlorométhane	KMnO_4	<p>2.5 mg d'extrait dichlorométhanique est solubilisé dans 1 mL de CH_2Cl_2 et ajouté 2 mL de KMnO_4 à 6.32 mmol dilué avec 1 mL H_2O. Après 70 min d'agitation, la réaction est contrôlée sur CCM, suivie d'une filtration et évaporation.</p>
	CH_2Cl_2	
	H_2O	

Tableau 2 : Hydrolyse acide [8]

Extrait brut à traiter	Réactif et solvant	Partie expérimentale
Extrait à l'acétate d'éthyle		<p>Dans 5 mg d'extrait d'acétate éthylique est ajouté 5 mL de H_2O et agité au bain de glace. Puis 1 mL de H_2SO_4 concentré est versé dans cette solution.</p> <p>Après quelques minutes, le mélange est agité à la température 60°C pendant 1h 15 min.</p> <p>Ensuite, la solution est remis au bain de glace en ajoutant la solution de NaHCO_3 saturée jusqu'à $\text{pH} = 8$, suivie d'une extraction à l'acétate d'éthyle et évaporée.</p>
	AcOEt	
	H_2SO_4	
	NaHCO_3	
	H_2O	

Extrait à l'éther di-éthylrique	AcOEt	Dans 5 mg d'extrait d'éther diéthylique est ajouté 5 mL de H ₂ O et agité au bain de glace. Puis 1 mL de H ₂ SO ₄ concentré est versé dans cette solution.
	H ₂ SO ₄	Après 5 min, le milieu réactionnel est agité à la température de 60°C pendant 1h 15 min.
	NaHCO ₃	
	H ₂ O	Ensuite, la solution est remise au bain de glace en ajoutant la solution de NaHCO ₃ saturée jusqu'à pH = 8, suivie d'une extraction à l'acétate d'éthyle et évaporée.

Tableau 3 : Réaction de réduction [9]

Extrait brut à traiter	Réactif et solvant	Partie expérimentale
Extrait hexanique	AcOEt	5 mg d'extrait hexanique est solubilisé dans 20 mL de dichloromethane anhydre et agité au bain de glace pendant 10 min, puis 0.5 g de NaBH ₄ est ajouté sur cette solution. Après, elle est agitée à la température ambiante pendant 1 h et suivie sur CCM ; ensuite elle est remis au bain de glace en ajoutant 1 mL de H ₂ O pour traiter cette réaction. Enfin, l'agitation de cette réaction s'est fait à la température ambiante jusqu'à la formation des pattes, et puis elle est filtrée et évaporée.
	H ₂ SO ₄	
	NaHCO ₃	
	NaBH ₄	
	H ₂ O	
Extrait butanolique	AcOEt	4 mL d'extrait butanolique et 4 mL d'hexane sont mélangés avec la silice et agités au bain de glace pendant 10 min. 0.5 g de NaBH ₄ est ajouté sur cette solution, ensuite elle est agitée à la température ambiante pendant 1 h. Après avoir contrôlé cette réaction, elle est traitée avec 1 mL de H ₂ O au bain de glace, suivie d'une filtration et évaporation.
	H ₂ SO ₄	
	NaHCO ₃	
	NaBH ₄	
	H ₂ O	
Extrait au dichlorométhane	AcOEt	2.5 mg d'extrait au dichlorométhane est solubilisé dans 20 mL de dichlorométhane anhydre et agité au bain de glace pendant 10 min, puis 0.3 g de NaBH ₄ est ajouté. La solution est agitée à la température ambiante, après 1 h, elle est contrôlée sur CCM ; ensuite elle est remis au bain de glace en ajoutant 0.5 mL de H ₂ O pour traiter cette réaction. L'agitation de cette réaction s'est faite à la température ambiante jusqu'à la formation des pattes, et puis elle est filtrée et évaporée.
	H ₂ SO ₄	
	NaHCO ₃	
	NaBH ₄	
	H ₂ O	

2-3. Screening d'antibiotique des différents produits de réaction

La détection des résidus d'antibiotique dans le lait est très pratique chez les producteurs de yaourt industriel pour éviter la contamination et l'inhibition de la fermentation. En revanche la recherche de résidus à activité antimicrobienne dans le lait frais a été réalisée par la méthode de fermentation. La conversion biologique de lactose en acide lactique est assurée par *Lactobacillus Bulgaricus* et *Streptococcus Thermophilus*. C'est une technique pratique très rapide et moins coûteuse. Les molécules antibactériennes comme les antibiotiques et les antiseptiques inhibent cette conversion [10]. Dans cet article cette détection a été effectuée sur les quatre extraits bruts et les nouveaux produits de réactions : extrait d'éther diéthylique, extrait à l'acétate d'éthyle, extrait butanolique et extrait au dichlorométhane. La concentration de chaque extrait a été préparée à 10 mg / L pour le volume du lait 100 mL. Les étapes que nous avons faites sur les extraits bruts ont été remises en évidence pour la réalisation de cette détection. Le lait doit être bouilli et refroidi, suivi d'une préparation d'ensemencement de l'échantillon refroidi pendant 30 min à l'aide d'une souche sensible aux antibiotiques, ainsi que les matériaux utilisés sont pasteurisés. L'échantillon ensemencé a été mis en cuve et bien agité sur un agitateur magnétique pour solubiliser ces extraits. Après 2h d'incubation, ces échantillons ont été vérifiés. L'extrait n'est pas actif si le lait se coagule. La réaction acido-basique a pour but de titrer l'acide lactique contenu dans le lait, afin de déterminer sa fraîcheur en mesurant son degré Dornic qui a pour **Formule** [11] :

$$D = Co / 0,1 \quad (1)$$

où, Co : la concentration massique de l'acide lactique.

Il s'agit d'un titrage avec un indicateur coloré phénolphthaléine, en utilisant la solution de NaOH à une concentration très faible à 0.025 mol / L pour le dosage. La concentration massique de l'acide lactique est calculée par la **Formule** suivante :

$$Co = (Cl \times V\acute{e}q \times M) / VO \quad (2)$$

où, Cl : la concentration de NaOH ; $V\acute{e}q$: le volume équivalent de NaOH ; M : la masse molaire de la molécule d'acide lactique ; Vo : le volume du lait à doser.

3. Résultats et discussion

3-1. Résultats de test d'activité antimicrobienne

3-1-1. Test sur les extraits bruts

Suivant le test antimicrobien réalisé sur les différents extraits à 10 ppm, nous avons constaté que ces extraits ne contiennent pas des antibiotiques. Ces extraits sont ensuite traités par des réactions chimiques pour avoir des nouveaux extraits à tester.

3-1-2. Test antimicrobien sur les composés fonctionnalisés

La détection des composés antimicrobiens a été remise en évidence sur les nouveaux produits fonctionnalisés. Parmi les dix extraits traités, l'extrait hexanique oxydé et extrait butanolique réduit présentent une activité. Le résultat du test est montré sur le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Résultat du test d'antimicrobien sur les nouveaux produits

Souche	Produit à tester	Résultat
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> et <i>Streptococcus thermophilus</i>	Extrait hexanique oxydé	+
	Extrait éther diéthylique oxydé	-
	Extrait acétate d'éthylique oxydé	-
	Extrait butanolique oxydé	-
	Extrait dichloromethanique oxydé	-
	Extrait éther diéthylique hydrolysé	-
	Extrait acétate d'éthylique hydrolysé	-
	Extrait hexanique réduit	-
	Extrait butanolique réduit	+
	Extrait dichloromethanique réduit	-
	Lait+ Ferment	-
TEMOINS	Lait+ Ferment+ Ampicilline	+

(+): présence d'antibiotique ; (-): absence d'antibiotique

Nous avons repris les deux produits actifs pour confirmer l'inhibition et en réalisant le dosage acido-basique de l'acide lactique formé en présence de la solution de soude 2N. Le calcul de concentration massique de l'acide lactique a été nécessaire pour la détermination du pourcentage en degré Dornic. Le **Tableau 5** dénote le dosage de l'acide lactique de l'extrait hexanique.

Tableau 5 : Dosage d'acide lactique de l'extrait hexanique oxydé

N° Tubes	(ppm)	V _{NaOH} (mL)	[C] _m (g / L)	D	% d'ac. lact. produit	% d'inhib.
1	200	3.1	0.697	6.97	60.19	39.81
2	100	2.35	0.528	5.28	45.60	54.40
3	50	2.25	0.506	5.06	43.70	56,30
4	20	2.2	0.495	4.95	42.75	57.25
5	10	2	0.45	4.5	38.86	61.14
6	Témoin (lait+ ferment)	5.15	1.158	11.58	100	0

D : degré Dornic

Le dosage d'acide lactique a été effectué pour déterminer la concentration active de l'extrait hexanique oxydé sur cinq concentrations à étudier.

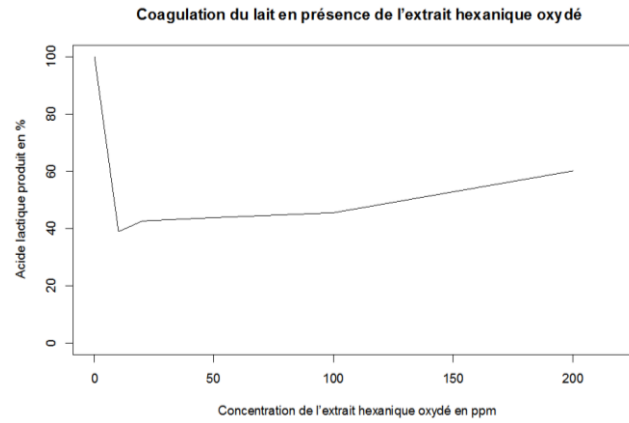


Figure 1 : Courbe de fermentation du lait en présence de l'extrait hexanique oxydé

D'après la courbe que nous avons obtenue, la dose efficace DE_{50} calculée dans la zone d'activité en utilisant la fonction glm du logiciel R est $(9,837 \pm 0.001)$ ppm. Le calcul de la dose efficace à 50 % de l'activité maximale a donné des valeurs inférieures à 10 ppm. La **Figure 1** montre une faible augmentation de production de l'acide lactique à partir de 10 ppm. C'est la résistance. En ce qui concerne l'extrait butanolique réduit, le dosage de l'acide lactique est montré dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Dosage d'acide lactique de l'extrait butanolique réduit

N° Tube	$[C]_{xt}$ (ppm)	Log $[C]_{xt}$	V_{NaOH} (mL)	$[C]_{lm}$ (g/L) ac. lact.	D	% A. L. produit	% d'inhib.
1	200	2.30	3.8	0.855	8.55	37.22	62.78
2	100	2	4.1	0.922	9.22	44.66	55.34
3	50	1.69	3.6	0.697	6.97	19.66	80.34
4	20	1.30	3.5	0.787	7.87	29.66	70.34
5	10	1	3.63	0.816	8.16	32.88	67.12
6	Témoin(lait+ferment)	-	4	0.9	9	100	0

D : degré Dornic

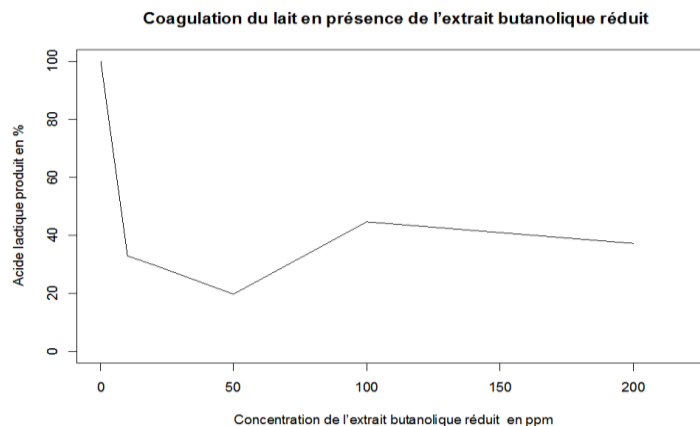


Figure 2 : Courbe de fermentation du lait en présence de l'extrait butanolique réduit

La dose efficace DE_{50} calculée en utilisant la fonction glm du logiciel R est $(9,745 \pm 0.001)$ ppm d'extrait butanolique réduit. Ce calcul a été établi en considérant la zone d'activité de l'extrait. Si la dose augmente, l'activité augmente jusqu'à 50 ppm suivie d'une légère résistance puis une réactivité à partir de 100 ppm. La **Figure 2** résume l'activité antibactérienne de cet extrait. En revanche, selon J. W. Pette et al l'incubation ne doit pas être longue et ne dépasse pas 3 h pour éviter l'inhibition de la croissance de *Streptococcus thermophilus* par l'acide lactique produit en culture mixte [12]. Un peu plus tard N. J. Moon *et al.* a découvert en 1976 qu'en raison de sa croissance rapide, *S. thermophilus* était un meilleur concurrent de *Lactobacillus bulgaricus* pour limiter les nutriments dans le milieu. Cela a entraîné une inhibition de la croissance de *L. bulgaricus* [13]. C'est la raison pour laquelle dans ce travail la durée de teste est limitée à 2h 30 min.

4. Conclusion

Ce travail nous a permis de trouver une méthode peu coûteuse pour la recherche des nouveaux extraits à activité antimicrobienne. Il consiste à tester plusieurs échantillons pendant 2 h 30 min dans du lait frais préalablement bouilli. La conversion biologique se traduisant par la coagulation du lait en présence de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, permet de constater l'absence d'activité. Pour les cinq extraits de cette plante : extrait hexanique, extrait à l'éther di-éthylique, extrait à l'acétate d'éthyle, extrait au dichlorométhane et extrait butanolique, le résultat s'avère négatif. En revanche, après traitement par plusieurs réactions telles oxydation, hydrolyse et réduction, l'extrait hexanique oxydé et l'extrait butanolique réduit deviennent actifs. L'activité de l'extrait hexanique s'est donc améliorée par réaction d'oxydation et celle de l'extrait butanolique par réduction. Les doses efficaces DE_{50} calculées dans la zone d'activité en utilisant la fonction glm du logiciel R sont $(9,837 \pm 0.001)$ ppm et $(9,745 \pm 0.001)$ ppm pour l'extrait hexanique oxydé et d'extrait butanolique réduit respectivement.

Références

- [1] - C. HILAN et Z. CHEMALI, La contamination des produits laitiers par les antibiotiques au Liban. Annales de recherche scientifique, 1 (1998) 267 - 275.
- [2] - A. ZINEDINE, M. FAID et M. BENLEMLIH, Détection des résidus d'antibiotiques dans le lait et les produits laitiers par méthode microbiologique. Revue de Microbiologie Industrielle, Sanitaire et Environnementale, 1 (2007) 1 - 9.
- [3] - M. KHASKHELI, R. S. MALIK, M. A. ARAIN, A. H. SOOMRO and H. H. ARAIN, Detection of beta-lactam antibiotic residues in market milk. Pakistan Journal of Nutrition, 7(2008) 682 - 685.
- [4] - M. H. BEN-MAHDI et S. OUSLIMANI, Mise en évidence de résidus d'antibiotiques dans le lait de vache produit dans l'Algérois. European Journal of Scientific Research, 36 (2009) 357 - 362.
- [5] - S. E. P. MENSAH, A. B. ABOH, S. SALIFOU, G. A. MENSAH, P. SANDERS, F. A. ABIOLA et O. D. KOUNDANDE, Risques dus aux résidus d'antibiotiques détectés dans le lait de vache produit dans le Centre Bénin. Journal of Applied Biosciences, 80 (2014) 7102 - 7112.
- [6] - A. PECOU, F. BENDALI, Y. SOUSTRE, N. MARIE, É. GILLET, I. LESAGE et V. HERVE, Question sur produits laitiers & Antibiotiques, Hors série n°4b, *Cniel* 42 rue de Châteaudun 75314, PARIS CEDEX 09 (nutritionssante@maisondulait.fr, labo@cniel.com), (2015) pp.
- [7] - R. DANION-BOUGOT, Oxydation des alcools par le permanganate de potassium, *Bulletin de l'Union des Physiciens*, Université de Rennes I, 88(764) (1994) 887 - 894 pp.

- [8] - W. REYBROECK, Evolutions récentes dans le domaine des tests de screening d'antibiotiques, ILVO-T&V, Instituut voor Landbouw en Visserij Onderzoek - Eenheid Technologie en Voeding, Brusselsesteenweg 370, B-9090 Melle, Labinfo, 21-24.
- [9] - C. FELLER, P. JEANSON, P. GIUMMELLY et P. BONALY, Comparaison de différentes méthodes d'hydrolyse acide en vue du dosage des glucides totaux dans les sols, *Science du Sol*, 29(1) (1991) 13 - 22.
- [10] - J. PIEN, J. LIGNAC, P. CLAUDE, Détection biologique des antiseptiques et des antibiotiques dans le lait. *Le Lait*, 33(327) (1953) 369 - 386 pp.
- [11] - G. W. GRIBBLE, Sodium borohydride in carboxylic acid media : a phenomenal reduction system, *Chem. Soc. Rev.*, 27 (1998) 395 - 404 pp.
- [12] - J. W. PETTE, H. LOLKEMA, Symbiosis and antibiosis in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, *Nederlandsch Melk- en Zuiveltijdschrift*, 4 (1950) 197 - 208 pp.
- [13] - N. J. MOON, G. W. REINBOLD, Commensalism and Competition in Mixed Cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, *Journal of Milk and Food Technology (JMFT)*, 5(1976) 322-375 et 337-341 p.