



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

South African Journal of Botany

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sajb

Antimicrobial activities of *Dilobeia thouarsii* Roemer and Schulte, a traditional medicinal plant from Madagascar

Vahinalahaja Razafintsalama^a, Samira Sarter^{b,f}, Lengo Mambu^c, Ranjana Randrianarivo^a, Thomas Petit^d, Jean François Rajaonarison^e, Christian Mertz^f, Danielle Rakoto^a, Victor Jeannoda^{a,*}

^a Department of Fundamental and Applied Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Antananarivo, BP 906, Antananarivo 101, Madagascar

^b CIRAD, UMR QUALISUD, 101 Antananarivo, Madagascar

^c UMR 7245 CNRS-MNH, Molécule de Communication et Adaptation des Micro-organismes, Muséum National d'Histoire Naturelle, 63 rue Buffon, 75005 Paris, France

^d Université de la Réunion, Laboratoire de Chimie Des Substances Naturelles et Des Sciences des Aliments (LCSNSA), 15 Avenue René Cassin, 97 715 Saint-Denis La Réunion, France

^e Institut Malgache de Recherche Appliquée (IMRA), BP 3833 Avarobohitra Itaasy, Antananarivo, Madagascar

^f CIRAD, UMR QUALISUD, F-34398 Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 April 2012

Received in revised form 22 June 2012

Accepted 22 February 2013

Available online xxxx

Edited by J Van Staden

Keywords:

Dilobeia thouarsii

Proteaceae

Medicinal plant

Antibacterial

Plant extract

Phenolic compound

ABSTRACT

The leaves of *Dilobeia thouarsii* (Roemer and Schulte), a tree that is endemic to Madagascar (Proteaceae), are used in traditional Malagasy medicine to treat bacterial skin infections and wounds. This study investigated the *in vitro* antibacterial activities of *D. thouarsii* leaf extracts and identified the bioactive compounds with the aim of providing a scientific basis for its use against skin diseases. Using broth microdilution method for leaf crude extract and its compounds, we investigated inhibition of the growth of *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella antarctica*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae*. The two purified phenolic compounds from leaf ethyl acetate extracts (**1**, **2**) were found to be more active than the crude extract itself. The structure of the two compounds was elucidated by NMR and mass spectrometry: compound **1** was identified as 4-aminophenol and compound **2** as 4-hydroxybenzaldehyde. A marked inhibitory effect (MIC < 0.1 mg/ml) was found against *S. aureus*, which is a major agent in skin infections. We observed moderate activities (MIC values of between 0.1 and 0.5 mg/ml) for *E. faecalis*, *Vibrio* spp., and *Bacillus* spp. Neither compound was active against *Salmonella* spp., *E. coli* and *K. pneumoniae* (MICs > 1 mg/ml). To conclude, the high antimicrobial activity of *D. thouarsii* leaf extracts against *S. aureus* supports its traditional use to treat skin infections.

© 2013 Published by Elsevier B.V. on behalf of SAAB.

1. Introduction

Traditional medicine is an important component of the health care system in Madagascar and a large number of plants remain to be studied, including *Dilobeia thouarsii*, a tree that belongs to the family Proteaceae and is endemic to Madagascar (Boiteau, 1986). This species is widely distributed in the Central, Eastern, South-Eastern regions and in the high Matsiatra Fianarantsoa in Madagascar (Bossier and Rabevohitra, 1991) and is known by the common names of Vivaona, Hazontavolo and Tavolohazo (Rabesa, 1986). In southern Madagascar, decoctions of the leaves and bark of *D. thouarsii* are used for abortion, or as an anthelmintic, or a diuretic (Beaujard, 1988; Rabesa, 1986). Concerning the East coast of Madagascar (Mandraka region), our ethnobotanical investigations confirmed the use of the leaves in traditional medicine to treat bacterial skin infections and wounds (Razafintsalama, 2012).

In vitro assays have shown that phenolic compounds are often responsible for the antimicrobial activities of different plant extracts (Shikanga et al., 2010; Tepe et al., 2005; Zampini et al., 2005). Several species belonging to the family Proteaceae, such as *Grevillea robusta*, *Toronia toru*, *Gevuina avellana*, *Kermadecia elliptica*, *Protea obtusifolia* or *Lomatia hirsuta* contain phenolic compounds (Ahmed et al., 2000; Chuang and Wu, 2007; Moure et al., 2001; Perry and Brennan, 1997; Simonsen et al., 2006; Verotta et al., 1999). In addition, species belonging to this family display antimicrobial activities against different microorganisms. *L. hirsuta*, which is used in traditional medicine in Chile, is active against the pathogenic fungus *Candida albicans* (MIC = 8 µg/ml) (Simonsen et al., 2006). A phenolic glycoside ester isolated from the New Zealand tree *T. toru* is active against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* (Perry and Brennan, 1997). A glycoside compound isolated from *Persoonia linearis* × *pinifolia*, a cross hybrid of *P. pinifolia* and *P. linearis*, displays antimicrobial activity against *E. coli* and *Phytophthora cinnamoni* (MacLeod et al., 1997). An extract made from leaves of *Protea simplex*, a plant used in South Africa against human dysentery and diarrhea, provides good antimicrobial

* Corresponding author. Tel.: +261 32 02 402 20.

E-mail address: victor_jeannoda@yahoo.fr (V. Jeannoda).

activities against *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis* and *C. albicans* (Fawole et al., 2009).

To the best of our knowledge, no report has been published on the chemical composition and the biological activities of *D. thouarsii* (Bossier and Rabevoahitra, 1991). In the present study, we investigated the antibacterial activity of *D. thouarsii* and identified bioactive compounds in order to provide a scientific basis for its traditional use, and to characterize the potential of this medicinal plant in Madagascar. Bioassay fractionation enabled isolation of two phenolic compounds that were identified on the basis of spectroscopic data including 1D NMR and mass spectrometry (MS).

2. Material and methods

2.1. Plant material

The leaves of *D. thouarsii* were harvested in Mandraka region, in the eastern part of Madagascar, 70 km from Antananarivo. Leaves were collected in April 2008. The plant was identified by Dr. Rabarison Harison from the Botany Department of Antananarivo Faculty of Sciences. Reference specimens (HERB/DBEV/4708) were deposited in the herbarium of the same department of the University of Antananarivo.

2.2. Extraction of *D. thouarsii* leaves

Plant materials were dried at room temperature and ground to a fine powder. The obtained powder (100 g) was extracted successively through a maceration process using 500 ml $\times$ 6 of solvents of increasing polarity (hexane, ethyl acetate and methanol). Each combined extract was evaporated under reduced pressure to yield crude hexane extract (0.7 g), EtOAc extract (5 g), and MeOH extract (10 g), respectively. Extracts were stored at room temperature until use.

2.3. Bioassay-guided extract

Part of the ethyl acetate extract (1.5 g) was subjected to flash chromatography on a silica gel 60 (10–40 μ) column (CC) eluted with 0–100% gradient of EtOAc in hexane followed by MeOH in EtOAc. Fourteen 100 ml fractions were collected: Hex–EtOAc 80:20 (1–4), Hex–EtOAc 40:60 (5–8), Hex–EtOAc 20:80 (9–12), EtOAc (13), and MeOH (14). On the basis of the analytic TLC, and according to the antimicrobial assay, similar active fractions 5–8 (0.15 g) were combined and rechromatographed on the same support using the same solvent system. Fourteen new fractions were obtained, but only two displayed antibacterial activity. Each active fraction was treated with 75% ethanol and concentrated to yield compounds **1** (100 mg) and **2** (40 mg). The antimicrobial activity of these compounds was evaluated on Gram-positive and Gram-negative bacteria.

2.4. Antimicrobial assays

2.4.1. Microorganism strains

Four Gram-positive (*Bacillus cereus* LMG 6910, *Bacillus megaterium* LMG 7127, *S. aureus* ATCC 25920, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) and six Gram-negative bacteria (*Vibrio harveyi* ATCC 14126, *Vibrio fischeri* ATCC 49387, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella antarctica* LMG 3264, *E. coli* CCM 451, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883) were used to study antibacterial activity. The bacteria were obtained from the collections of both the University of La Réunion (LCSNSA: Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des aliments, Saint Pierre) and Cirad (Montpellier, France).

2.4.2. MIC and MBC determination

The MIC (minimum inhibitory concentration) and MBC (minimum bactericidal concentration) were evaluated using the microdilution method described by Kuete et al. (2009). The samples were first

dissolved in sterile distilled water. The concentration of the resulting solutions was adjusted to 7 mg/ml. This was serially diluted twofold to obtain concentration ranges of 0.027–7 mg/ml. Next, 100 μ l of each concentration was added in a well (96-well microplate) containing 95 μ l of Zobell medium for vibrios (1 g/l yeast extract, 4 g/l peptone, 30 g/l NaCl) or Mueller-Hinton broth for the other microorganisms and 5 μ l of inoculum (standardized at 1.5×10^6 cfu/ml by adjusting the optical density to 0.125 at 600 nm). A positive control containing the bacterial culture without the extract and a negative control containing only the medium were also analyzed. The plates were covered with sterilized aluminum foil, and then incubated for 24 h at 25 °C for *Vibrio* sp. and at 37 °C for the other strains. The assay was repeated three times. The MIC of each compound was defined as the lowest concentration that inhibited the microorganism growth. Bacterial growth was visually evaluated based on the degree of turbidity (Kil et al., 2009).

For the determination of MBC, 5 μ l from each well not showing turbidity was placed on Mueller-Hinton agar and incubated at 37 °C for 24 h. The lowest concentration at which no growth occurred on the agar plates after 24 h of incubation at 37 °C corresponded to the MBC.

3. Results and discussion

3.1. Active compounds identified

Compound **1** (Fig. 1) was isolated as an amorphous powder. HRESI-TOF performed in the negative mode exhibited a deprotonated molecular ion at m/z 108.0435 [$M - H$] $^-$ indicating a molecular formula of C_6H_7NO (calcd. 108.0447) requiring 4° of unsaturation. The ^{13}C NMR spectrum revealed the presence of an oxygenated quaternary carbon at δ 151.2, another quaternary carbon at δ 117.4 and a methine carbon at δ 115.8.

The 1H NMR spectrum of this small molecule displayed an intense signal of four aromatic protons at δ 6.49. As the spectra were realized in CD_3OD , the three remaining protons not observed as suggested the molecular formula are exchangeable protons. Comparison with RMN data of the sample indicated that compound **1** was a 4-aminophenol (Sigma-Aldrich catalog).

The molecular formula of compound **2** (Fig. 1) was deduced as $C_7H_6O_2$ from the deprotonated molecular ion peak at m/z 122.0368 [$M - H$] $^-$ observed in the HRESI-MS compatible with four degrees of unsaturation. Its 1H NMR spectrum showed the presence of an aldehyde proton at δ 9.73 and two doublets at δ 6.9 (2H, $J = 8.4$ Hz, H-3; H-5) and 7.8 (2H, $J = 8.4$ Hz, H-2; H-6). In comparison with **1**, the difference of 13 uma suggested that the amino group was replaced

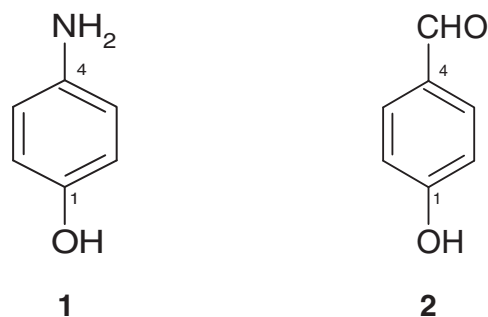


Fig. 1. Structure of the two purified compounds **1** and **2** from the leaf ethyl acetate extract of *Dilobeia thouarsii*.

by an aldehyde group (Chen et al., 1999). Consequently, compound 2 was identified as 4-hydroxybenzaldehyde.

3.2. Antibacterial activity

This is the first time that antimicrobial activity of *D. thouarsii* extracts has been reported. The two phenolic compounds determined from the leaf ethyl acetate extract (4-aminophenol and 4-hydroxybenzaldehyde) were more active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria than the crude extract itself (Table 1). MIC and MBC values varied with the extracts and compounds tested. *S. aureus* was the most sensitive strain. According to Oussou et al. (2008), the ratio observed for MICs and MICs (MIC:MIC < 4) indicated that the bactericidal effect of the compounds on the majority of strains tested could be expected. Globally, Gram-positive bacteria were more sensitive to these compounds than Gram-negative ones (Table 1).

MIC values obtained with the two compounds for *S. aureus* were lower than those of leaves and bark extracts of *P. simplex* (a Proteaceae from South Africa) which ranged between 0.147 and 0.780 mg/ml (Fawole et al., 2009). MIC values of our extracts were lower than 0.1 mg/ml for *S. aureus*, which, according to Holetz et al. (2002), can be considered as good antimicrobial activity. *S. aureus*, which is a major agent in skin infections, was sensitive to other African plant extracts of species including *Combretum vendae* (Combretaceae), *Commiphora harveyi* (Burseraceae), *Khaya anthotheca* (Meliaceae), *Kirkia wilmsii* (Kirkiaceae), *Loxostylis alata* (Anacardiaceae), *Ochna natalitia* (Ochnaceae), *Protorhus longifolia* (Anacardiaceae), *Lippia* spp., *Garcinia smeathmannii* (Clusiaceae) and *Ficus ovata* (Moraceae) (Kuate et al., 2009; Shikanga et al., 2010; Suleiman et al., 2010). Sato et al. (1997) examined the activity of three extracts from the fruiting bodies of *Terminalia chebula* RETS against methicillin-sensitive and methicillin-resistant *S. aureus* as well as 12 other Gram-negative and Gram-positive bacteria. The two compounds isolated from the Et₂O soluble part material, gallic acid and its ethyl ester derivative proved to be more effective against both types of *S. aureus* than against other species. It appears that the ability to inhibit respiratory electron transport systems plays an essential role in the antibacterial activity of alkyl gallates against Gram-positive bacteria.

The MIC values of between 0.1 and 0.5 mg/ml that we observed for *E. faecalis*, *Vibrio* spp., and *Bacillus* spp. can be considered as moderate antimicrobial activity according to Holetz et al. (2002) (Table 1). Neither purified compound (1, 2) was shown to be active against *Salmonella* spp., *E. coli* and *K. pneumoniae* (MICs > 1 mg/ml).

Table 1

The minimum inhibitory concentration (MIC mg/ml) and minimum bactericidal concentration (MBC g/ml) of *Dilobeia thouarsii* leaf ethyl acetate extract against bacteria tested in microdilution assays.

Bacterial species	Leaf ethyl acetate extracts (mg/ml)				
	Crude extract	Compounds			
		1	2		
	MIC	MIC	MBC	MIC	MBC
Gram-positive					
<i>Bacillus cereus</i>	12.5	0.109	0.437	0.054	0.109
<i>Bacillus megaterium</i>	12.5	0.109	0.218	0.437	3.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.5	0.054	0.218	0.027	0.109
<i>Enterococcus faecalis</i>	12.5	0.437	0.875	3.5	1.75
Gram-negative					
<i>Vibrio harveyi</i>	12.5	0.109	0.437	0.109	0.109
<i>Vibrio fischeri</i>	12.5	0.218	0.437	0.437	0.875
<i>Salmonella</i> Typhimurium	> 100	3.5	3.5	3.5	3.5
<i>Salmonella</i> antarctica	> 100	3.5	3.5	3.5	3.5
<i>Escherichia coli</i>	> 100	1.75	1.75	1.75	3.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 100	1.75	1.75	7.0	7.0

4. Conclusion

Its antimicrobial activity against *S. aureus*, a major agent in skin infections, provides a scientific basis for the traditional Malagasy use of *D. thouarsii* (Roemer and Schulte) in the treatment of skin infections. The two purified phenolic compounds from leaf ethyl acetate extracts involved in this antimicrobial activity were 4-aminophenol and 4-hydroxybenzaldehyde. Consequently, leaf ethyl acetate extract could be used in further investigations to identify the other molecules present in this plant.

Acknowledgments

This work was financially supported by the project "Pôle d'Excellence Régional" (AUF/ref/n^o. 2708PL708) funded by AUF (Agence Universitaire de la Francophonie).

References

- Ahmed, A.S., Nakamura, N., Meselhy, R.M., Makhboul, A.M., El-Emary, N., Hattoria, M., 2000. Phenolic constituents from *Grevillea robusta*. *Phytochemistry* 53, 149–154.
- Beaujard, P., 1988. Plantes et Médecine traditionnelle dans le Sud-Est de Madagascar. *Journal of Ethnopharmacology* 23, 165–266.
- Boiteau, P., 1986. Médecine traditionnelle et pharmacopée: précis de matière médicale malgache. Karthala, Paris.
- Bosser, J., Rabevohitra, R., 1991. Famille 57-Proteaceae. In: Morat, P. (Ed.), Flore de Madagascar et de Comores, pp. 47–57 (Antananarivo).
- Chen, Y.-C., Chang, R.-F., Teng, M.-C., Wu, C.-Y., 1999. Cheritamine, a new N-fatty acyl tryptamine and other constituents from the stems of *Annona cherimola*. *Journal of the Chinese Chemical Society* 46, 77–86.
- Chuang, T.H., Wu, P.L., 2007. Cytotoxic 5-alkylresorcinol metabolites from the leaves of *Grewillea robusta*. *Journal of Natural Products* 70, 319–323.
- Fawole, O.A., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2009. Antimicrobial activity and mutagenic effects of twelve traditional medicinal plants used to treat ailments related to the gastro-intestinal tract in South Africa. *South African Journal of Botany* 75, 356–362.
- Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V., Filho, B.P.D., 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 1027–1031.
- Kil, H.Y., Seong, E.S., Ghimire, B.K., Chung, I.-M., Kwon, S.S., Goh, E.J., Heo, K., Kim, M.J., Lim, J.D., Lee, D., Yu, C.Y., 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chemistry* 115, 1234–1239.
- Kuate, V., Nana, F., Ngamen, B., Mbaveng, A.T., Keumedjio, F., Ngadjui, B.T., 2009. Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 124, 556–561.
- MacLeod, K.J., Rasmussen, B.H., Willis, C.A., 1997. A new glycoside antimicrobial agent from *Persoonia linearis* × *pinifolia*. *Journal Natural Product* 60, 620–622.
- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., 2001. Antioxidant activity of extracts from *Gevuina avellana* and *Rosa rubiginosa* defatted seeds. *Food Research International* 34, 103–109.
- Oussou, K.R., Yolou, S., Boti, J.B., Guessenn, K.N., 2008. Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *European Journal of Scientific Research* 24 (1), 94–103.
- Perry, N.B., Brennan, N.J., 1997. Antimicrobial and cytotoxic phenolic glycosides esters from the New Zealand tree *Toronia toru*. *Journal of Natural Products* 60, 623–626.
- Rabesa, Z.A., 1986. Pharmacopée d'Alaotra. CIDST. Imprimerie Tatsinanana, Antananarivo.
- Razafintsalama, V., 2012. Etudes chimique et biologique d'une plante médicinale malgache: *Dilobeia thouarsii* (Proteaceae). Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée. Université d'Antananarivo, Antananarivo, p. 164.
- Sato, Y., Oketani, H., Singyouchi, K., Ohtsubo, T., Kihara, M., Shibata, H., Higuti, T., 1997. Extraction and purification of effective antimicrobial constituents of *Terminalia chebula* RETS against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 20, 401–404.
- Shikanga, E.A., Combrinck, S., Regnier, T., 2010. South African *Lippia* herbal infusions: total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. *South African Journal of Botany* 76, 567–571.
- Simonsen, H.T., Adersen, A., Berthelsen, L., Christensen, S.B., Guzmán, A., Molgaard, P., 2006. Ethnopharmacological evaluation of radal (leaves of *Lomatia hirsuta*) and isolation of 2-methoxyxylone. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6, 29.
- Suleiman, M.M., McGaw, L.J., Naidoo, V., Eloff, J.N., 2010. Evaluation of several tree species for activity against the animal fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *South African Journal of Botany* 76, 64–71.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry* 90, 333–340.
- Verotta, L., Orsini, F., Pelizzoni, F., Torri, G., Rogers, C.B., 1999. Polyphenolic glycosides from African Proteaceae. *Journal of Natural Products* 62, 1526–1531.
- Zampini, I.C., Vattuone, M.A., Maria, I.I., 2005. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 450–456.

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 Rakotoarisoa (1), Danielle Aurore Doll Rakoto-Ranoromalala (2), Lalaso 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.

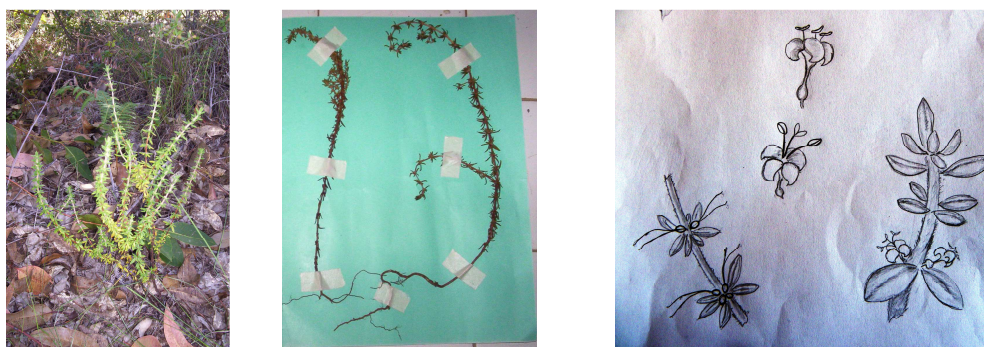


Figure 1 : Photos (à l'état naturel et herbier) et dessins (agrandissement des organes) d'*Anthospermum perrieri* (source : Sylvia Tiana Rasoarivelo Ralambonirina)

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 (Kuethe 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 dichlorométhanique 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.

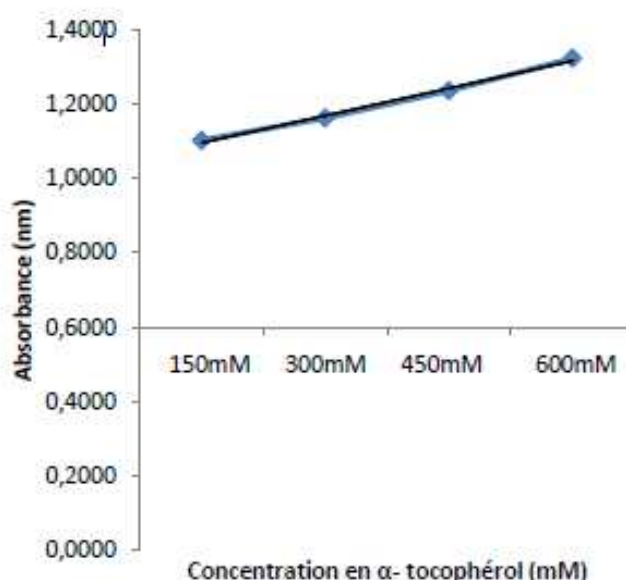


Figure 2 : Courbe standard de l' α -tocophérol

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 Moyse (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., Kuiate, 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-Herrera, 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 picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin 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 Moyse, 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., Lecsö, 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.