

Activités biologiques des extraits de *Psychotriabridsoniae* A. Davis & Govaerts (Rubiaceae) de Madagascar

Lalaso Ranaivoarison Ranarivelo(1), Tiana Sylvia Rasoarivelo Ralambonirina(1), Oliva Jaconnet Andrianaivoravelona(2), Henintsoa Harizafy(2), Faliarivony Randriamialinoro(1), Stéphan Rakotonandrasana(1), Andriamalala Rakotondrafara(1), Edouard Ravalison Andrianarison(3), Marylin Leccö(4), Philippe Antoine Andrianary(2), Michel Ratsimbason(1), Vahinalahaja Eliane Razafintsalama(1)

- (1) Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques, BP702, Antananarivo101, Madagascar
- (2) Laboratoire de Chimie Physique du Département Génie Chimique de l'Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo, BP 1500, Madagascar
- (3) Laboratoire de Chimie Organique du Département Génie Chimique de l'Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo, BP 1500, Madagascar
- (4) Laboratoire de Microbiologie de l'Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, 4 Avenue de l'Observatoire – 75006 Paris, France.

*Correspondance courriel:lrnarivelo@yahoo.com

Résumé :

Les analyses des activités biologiques des extraits de la partie aérienne de *Psychotriabridsoniae* (Rubiaceae), une plante endémique de Madagascar, ont montré que l'extrait méthanolique présente une activité antimicrobienne intéressante contre les bactéries Gram (+), essentiellement sur *Streptococcus pyogenes*, avec une CMI de 39,06µg/ml et une CMB de 78,13µg/ml. Ce même extrait possède également un pouvoir antioxydant, avec une valeur importante de 3568mMTrolox/l d'extrait par la méthode DPPH, et une valeur de 22,59mMTrolox/l d'extrait par la méthode ORAC. Cette activité antioxydante peut être due à la présence des produits phénoliques dans la plante notamment à des flavonoïdes détectés lors du screening phytochimique. Outre les flavonoïdes, nous avons également détecté des iridoïdes, des stéroïdes et des tanins dans la partie aérienne de *Psychotriabridsoniae*.

Mots-clés : *Psychotriabridsoniae*, Rubiaceae, phytochimie, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abstract: Biological activities of the *Psychotriabridsoniae* A.Davis & Govaertsextracts, Rubiaceae from Madagascar

Biological tests revealed that the methanol extract of *Psychotriabridsoniae* (Rubiaceae) endemic to Madagascar inhibits Gram (+) bacteria, especially *Streptococcus pyogenes* with MIC value 39.06µg / ml and MBC value 78.13µg/ml. The methanol extract of the plant also showed an antioxidant activity with a high value of 3568mMTrolox /l of extract by DPPH method, and 22.59mMTrolox /l of extract by ORAC method.

Antioxidant activity should be due to phenolic compounds such as flavonoids detected on phytochemical screening of the plant which also showed the presence of tannins, steroids and iridoids in its aerial part.

Keywords: *Psychotriabridsoniae*, Rubiaceae, phytochemistry, iridoids, antimicrobial and antioxidant activity.

1. INTRODUCTION

Psychotriabridsoniae (Rubiaceae) est une plante endémique de Madagascar [1], qui n'a pas encore été très étudiée du point de vue phytochimique et biologique. Or, plusieurs plantes du genre *Psychotria* sont utilisées dans le monde pour le traitement de diverses maladies dont l'inflammation de la gorge, la dysenterie, la fièvre, les maux de dents, les maux d'oreilles et les blessures [2,3,4] ; les morsures de serpent [5]; les infections virales et bactériennes, et les inflammations [6,7,8]; l'hypertension, les dysfonctionnements cardiovasculaires, les perturbations mentales et les désordres alimentaires [9] , la malaria, la leishmaniose. [10], les maux d'estomac, les maladies vénériennes [11]. Compte tenu de ces indications, nous avons axé nos recherches sur les propriétés biologiques de cette plante notamment les activités antimicrobienne et antioxydante.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Collecte et identification

Les feuilles et inflorescences de *Psychotriabridsoniae* ont été récoltées en juillet 2011 dans la Réserve Naturelle Intégrale (RNI) de Tsaratanana, Commune de Manambato, District d'Ambanja, de la Région Diana (Madagascar). L'identification de la plante a été effectuée par les botanistes du Département Botanique du CNARP au sein duquel est déposé un herbier de référence Rakotondrafara A. 1056 (Figure 1).



Figure 1: Herbar de *Psychotriabridsoniae*, Rakotondrafara A. 1056
(Source : Herbarium CNARP)

2.2. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique, suivant les méthodes adoptées par H.H.S. Fong et *al.* (1977), D.R. Dalton (1979), G. Cordell (1981), J. Bruneton (1987, 1993, 2009), A. Gurib-Fakim (1994), V. Plouvier et *al.* (1971) a servi pour la détection des familles de molécules présentes dans la plante. Ces méthodes utilisent des réactifs spécifiques pour chaque famille chimique à détecter. Les tests sont basés sur la formation de complexes insolubles ou de complexes colorés, à partir de poudre de plantes, ou d'extrait hydroéthanolique.

2.3. Préparation des extraits

Les feuilles et les inflorescences de *Psychotriabridsoniae* sont séchées, broyées puis macérées dans des solvants de polarité croissante : a) mélange dichlorométhane/hexane [60 :40] cinq fois, b) méthanol cinq fois.

2.4. Analyse des activités biologiques

L'analyse des activités biologiques concerne les tests sur les activités antibactériennes et les activités antioxydantes des extraits dichlorométhane et méthanolique de *Psychotriabridsoniae*.

2.4.1. Tests des activités antimicrobiennes

Plusieurs méthodes ont été utilisées dont la dilution en milieu solide, l'antibiogramme, la bioautographie et la microdilution en milieu liquide.

2.4.1.1- Screening antibactérien par la méthode de dilution en milieu solide

La méthode de dilution sur gélose en milieu solide est réalisée sur boîtes de Pétri en utilisant l'inoculateur de Steers. Elle permet de détecter le spectre antibactérien du produit testé à l'issue de l'inhibition ou non de la croissance des souches. Les échantillons sont testés à une dose de 100 mg/l sur des souches de référence. Ils sont mis en solution dans du DMSO pour faciliter leur diffusion dans l'agar. Le témoin négatif contient le DMSO et le témoin positif est constitué de l'Ofloxacin. L'incubation dure 24 h à 37 °C. Pour ce screening, 47 espèces bactériennes (30 Gram négatif et 17 Gram positif) provenant de souches de référence ont été utilisées.

2.4.1.2.-Méthode de l'antibiogramme

La méthode utilisée est celle développée par Nielsen *et al.*, 2000, Pyun *et al.*, 2006 et Ngameni *et al.*, 2009 afin de mesurer l'inhibition des bactéries par les extraits de la plante sur boîtes de Pétri [12,13,14].

Après ensemencement d'une quantité de 2ml de suspensions de bactéries, correspondant à 0,5 Mac Farland, à la surface d'un milieu gélosé Mueller Hinton dans une boîte de Pétri, des disques stériles, de 6mm de diamètre, type BioMérieux, imprégnés de 10µl d'extrait brut de concentration de la solution mère égale à 100 mg/ml soit 1mg/disque, y sont placés. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h. Après incubation, les zones d'inhibition de la croissance des bactéries par l'extrait, caractérisées par le diamètre d'halo d'inhibition autour de chaque disque, sont mesurées en mm [15]. La mesure est réalisée en triple.

2.4.1.3.-Méthode par « bioautography »

La méthode est similaire à la méthode de l'antibiogramme, mais dont l'extrait à tester diffuse dans l'agar inoculé à partir de la plaque de chromatographie [16,17].

La technique utilisée est la bioautography par immersion. Elle consiste à immerger la plaque dans la gélose Mueller Hinton, ou à la placer dans une boîte de Pétri et à la recouvrir ensuite du milieu gélosé.

La plaque CCM contenant le spot de la solution de l'extrait méthanolique est placée dans une boîte de Pétri, puis recouverte du milieu gélosé. Après solidification, les bactéries sont ensemencées et la boîte de Pétri est ensuite incubée à 37°C pendant 24h [18]. Afin de permettre une meilleure diffusion des composés testés dans l'agar, les boîtes peuvent rester à basse température durant quelques heures avant incubation. La présence d'une bande claire entourant le spot sur la plaque indique la présence d'activité antibactérienne.

2.4.1.4.- Méthode de microdilution en milieu liquide

Cette technique permet la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) qui empêche la croissance d'un microorganisme après 24 heures d'incubation à 37 °C dans un milieu de croissance non spécifique, et de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), qui est la plus faible concentration de la substance antimicrobienne, laissant subsister moins de 0,01 % de survivants. La méthode utilisée est décrite par Fawole, 2009 et Kuete, 2009, utilisant une microplaque de 96 puits. [19][20]

100µl de l'extrait testé de concentrations égales à 5mg/ml et 7mg/ml sont dilués avec 95µl du Mueller Hinton Broth (MHB) puis répartis dans les 96 puits. 5 µl d'inoculum, standardisé entre 0,5 et 1 MacFarland, sont ajoutés dans chaque puits. Ces dilutions sont réalisées de façon à avoir des concentrations finales des extraits comprises entre 4,88 et 2500µg/ml d'une part et 6,83 et 3500µg/ml d'autre part.

Un témoin négatif et un témoin positif sont utilisés :

- Témoin négatif : 100µl du MHB
- Témoin positif: 95 µl du MHB additionnés de 5 µl d'inoculum

Les plaques sont ensuite recouvertes de papier aluminium stérile, puis incubées à 37°C pendant 24h.

La CMI est évaluée par ajout de 40µl de solution de *p*-iodonitrotetrazoliumchloride, indicateur coloré en jaune, à une concentration de 0,2mg/ml dans chaque puits, après incubation à 37°C pendant 30mn [19]. Un virage de couleur au violet indique qu'il y a croissance bactérienne. La CMI est indiquée par la cupule qui contient la plus faible concentration d'extrait où aucun changement de coloration n'est observé.

La CMB a été estimée par ensemencement de 5 µl de chaque puits qui ne présente pas de trouble sur Mueller Hinton Agar (MHA), et l'observation de colonies bactériennes après incubation à 37°C pendant 24h. La CMB correspond à la plus faible concentration où aucune colonie bactérienne n'est observée.

L'évaluation finale des résultats est indiquée par le rapport de la CMB et de la CMI.

Le produit testé est dit :

- bactériostatique lorsque le rapport CMB/CMI est supérieur à 4 ;
- bactéricide lorsque le rapport CMB/CMI est inférieur à 4.

2.4.1.5.-Méthode de dilution en milieu solide pour le test antimoississure

L'étude de l'activité antifongique est réalisée par la technique décrite par Favel *et al.* en 1994 [21].

Un millilitre de l'extrait de la plante de concentration finale égale à 1mg /ml est ajouté dans 19ml de milieu de culture PDA (PotatoDextrose Agar) maintenu à 45 °C. Le mélange est ensuite versé dans des boîtes de Pétri. Ces dernières sont mises à sécher pendant 15 mn à 37 °C. 10µl de chaque germe testé à une suspension correspondante à 0,5 MacFarland sont déposés en strie à la surface du milieu. Les boîtes de Pétri sont incubées à 25 °C pendant 72 h.

Le résultat est observé par la croissance normale visible ou non des moisissures. Les témoins négatifs ont été préparés par spot des souches testées à la surface des milieux sans extraits.

2.4.2. Analyses de l'activité antioxydante

La détection de l'activité antioxydante des extraits de la plante est effectuée par trois méthodes différentes : méthode DPPH, méthode « bioautography », et méthode ORAC.

2.4.1.1.- Méthode DPPH

La méthode par DPPH ou 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, est une méthode spectrophotométrique, reposant sur le transfert d'électrons, c'est-à-dire sur la réduction du radical libre DPPH⁺ par la présence d'une molécule antioxydante. Cette réduction se traduit par une décoloration facilement mesurable par spectrophotométrie à 515 nm. Le pourcentage de DPPH⁺ restant est proportionnel à la concentration d'antioxydants [23,24]. Une microplaque est utilisée pour cet essai. Dans chaque puits sont déposés en triplicat 20 µl de solution méthanolique de l'échantillon à tester de concentration 0,1mg/ml, 20 µl de Trolox ((S)-(-)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique), l'antioxydant de référence, de concentration 150 à 600 µmol/l, et 20 µl de blanc (mélange DPPH et MeOH).

280 µl de solution méthanolique de DPPH à 0,004% (4mg/10ml) sont ensuite ajoutées dans chaque puits sauf dans celui du blanc.

Le mélange est laissé à incuber pendant 1 heure à 30°C. L'absorbance est mesurée à 515nm.

L'absorbance moyenne de l'extrait, et une courbe d'étalonnage Absorbance en fonction de la Concentration du Trolox sont obtenues, et sont comparées.

Les résultats sont donnés en équivalent Trolox et en pourcentage d'inhibition.

L'activité antioxydante de l'extrait est exprimée par la concentration correspondant à l'absorbance du Trolox, équivalent à l'absorbance de l'extrait, en nmol/µl ou mM Trolox/l de l'extrait.

Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - 100 (A_{\text{produit testé}} / A_{\text{blanc}})$$

A_{produit testé} : Absorbance du produit testé

A_{blanc} : Absorbance du DPPH et MeOH

2.4.1.2.-Méthode « bioautography »

La technique utilisée est basée sur la décoloration en jaune du DPPH de couleur pourpre en présence d'un composé antioxydant.

L'extrait à tester est solubilisé dans du méthanol, puis la solution est déposée sur une plaque CCM. La plaque est ensuite éluée. Puis, cette dernière est pulvérisée par le révélateur DPPH, en solution méthanolique à 25%. Le test est positif lorsqu'il y a apparition de décoloration au niveau des taches ou spots des produits.

2.4.1.3.-Méthode ORAC

La méthode ORAC, Oxygen Radical Absorbance Capacity est un test qui combine à la fois le pourcentage d'inhibition de la réaction d'oxydation et la longueur dans le temps de cette inhibition en spectrofluorimétrie. Elle est basée sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine (3',6'-dihydrospiro[isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-3-one]) en présence de l'oxydant chimique AAPH (2,2'-Azobis [2-methyl-propionamidin] dihydrochloride), générateur du radical peroxy libre. La technique réalisée sur une microplaque consiste en une mesure de la protection exercée par une molécule donnée contre l'oxydation de la fluorescéine par le radical libre [25].

25 µl de solution méthanolique d'échantillon de concentration 0,001 mg/ml, 25 µl Trolox de concentration de 6,25-75 µM et 25 µl de blanc (mélange fluorescéine + AAPH (sans antioxydant)) sont déposés dans chaque puits de la microplaque. Puis un ajout de 150 µl de solution de fluorescéine à 8,38. 10⁻⁵ mM est fait sauf dans les puits du blanc. La microplaque est mise à incuber pendant 15 minutes à 37°C, puis 25 µl d'AAPH (153 mM) sont ajoutés dans chaque puits sauf dans celui contenant le blanc.

Par la suite, la microplaque est analysée par le spectrofluorimètre du lecteur de microplaque pendant 1h40, à une longueur d'onde d'excitation et d'émission respectivement de 485±9nm et 530±20nm.

L'aire sous la courbe (fluorescence en fonction du temps) obtenue de l'échantillon est ensuite comparée à la gamme étalon de Trolox. Les résultats sont obtenus par le calcul du rapport ci-dessous :

$$\frac{(AUC_{\text{éch}} - AUC_{\text{blc}})}{(AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{blc}})} \times \frac{C_{\text{Trolox}}}{(C_{\text{éch}})}$$

AUC_{éch} : aire sous la courbe de l'échantillon

AUC_{blc} : aire sous la courbe du blanc

C_{Trolox} : concentration du Trolox

C_{éch} : concentration de l'échantillon

L'activité antioxydante est donnée par la concentration Trolox, correspondant à celle donnant une valeur du rapport égale à 1, en valeur ORAC ou en Trolox équivalent (mMTrolox par g ou l d'extrait).

Plusieurs méthodes ont été adoptées dans la mesure des activités antimicrobiennes des extraits de la plante. L'ensemble des tests ont été effectués sur l'extrait méthanolique.

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Rendement de l'extraction

160g de poudre de plante ont donné 3,55g d'extrait dichlorométhane, de couleur vert très foncé, soit un rendement de 2,22% et 22,22g d'extrait méthanolique, de couleur marron jaunâtre, avec un rendement de 13,89%.

3.2. Screening phytochimique

Le tableau1 donne les résultats obtenus lors du screening phytochimique de *Psychotria bridsoniae*.

Tableau 1: Résultats du criblage phytochimique des feuilles et inflorescences de *Psychotria bridsoniae*

Famille chimique à détecter	Réactifs de caractérisation	Résultats
<i>Alcaloïdes</i>		
Alcaloïdes	KI, I ₂ , HgCl ₂ , Bi(NO ₃) ₃ , acide tartrique	+
<i>Composés phénoliques</i>		
Flavanones, flavanonols	HCl concentré, tournures de magnésium	+++
Flavones	HCl concentré, tournures de magnésium, alcool isoamylique	+++
Anthocyanes	HCl 25% aqueux, ammoniacale	-
Leucoanthocyanes	HCl concentré	+++
Coumarines	NaOH 20% aqueux	-
Anthraquinones	NH ₄ OH	-
Hétérosides anthraquinones	HCl 12 %, NH ₄ OH 20%	-
Tanins	Gélatine salée 1 % (gélatine 1 % + NaCl 10 %, 50/50 v/v)	++
Tanins condensés	FeCl ₃ 10%	+++
Phénols et flavanes	Solution hydroéthanolique à 2 % de vanilline et 12 % de HCl	+++
Polyphénols	Gélatine à 1 %	+++
<i>Terpénoïdes</i>		
Stéroïdes	Anhydride acétique, H ₂ SO ₄ concentré	+++
Cardénolides	H ₃ PO ₄ à 2 %, Acide trichloracétique à 20 %	-
Iridoïdes	HCl, CuSO ₄ , Glycérol	+++

- : test négatif : aucune réaction observée

+ : faible coloration ou formation de peu de précipité

++ : Coloration franche ou précipité abondante

+++ : Coloration intense ou floculation immédiate ou hauteur de mousse supérieure à 5cm.

Ce tableau montre la présence des métabolites secondaires suivants dans *Psychotriabridsoniae*:

- des composés phénoliques et dérivés, qui sont surtout représentés par les flavonoïdes (flavanones, flavanonols, flavanones, leucoanthocyanes), les tanins condensés et les phénols.
- des terpénoïdes dont les iridoïdes et les stéroïdes.

Cependant on a remarqué que la plante ne contient qu'une quantité infime d'alcaloïdes.

3.3. Activité antimicrobienne

3.3.1 - Screening antibactérien par méthode de dilution en milieu solide

Un panel de 47 souches de référence (American Type Culture Collection (ATCC), Collection de l'Institut Pasteur (CIP), appartenant à 45 espèces bactériennes: 18 souches (17 espèces) à Gram (+), 29 souches (28 espèces) à Gram (-), ont été testées à une dose de 100mg/ml d'extrait méthanolique. Cet extrait inhibe 30 espèces (16 Gram + et 14 Gram -) bactérienne sur 47. Les souches non inhibées ont été *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Brevundimonas diminuta*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*. Les résultats sur les souches sensibles sont présentés dans le tableau 2 et la figure 2.

Tableau 2: Résultats positifs du screening antibactérien de l'extrait MeOH par la méthode de dilution sur gélose sur 47 souches de références (provenant du Laboratoire de Microbiologie de l'Université Paris Descartes)

Souche bactérienne	Référence	Extrait MeOH (100mg/l)	Souche bactérienne	Référence	Extrait MeOH(100mg/l)
<i>Listeria innocua</i>	E044	++	<i>Shigella sonnei</i>		++
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	E260	+++	<i>Aeromonas hydrophila (bestiarum)</i>	CIP 74.30T	+++
<i>Enterococcus hirae</i>	CIP 5855	++	<i>Flavimonas oryzae</i>	CIP 102.961	+++
<i>Micrococcus luteus</i>	E216	++	<i>Klebsiella oxytoca</i>	N718	+++
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	ATCC 43.809	+++	<i>Providencia stuartii</i>	CIP 107.808	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25.923	++	<i>Morganella morganii</i>	Coll. p. 396-1	+++
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CIP 53.124	+++	<i>Citrobacter freundii</i>	CIP 57.32	++
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	CIP 81.56	+++	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	CIP 54.90	+++
<i>Enterococcus faecium</i>	CIP 103.014	++	<i>Alcaligenes faecalis</i>	CIP 67.23	+++
<i>Streptococcus agalactiae</i>	CIP 103.227	+++	<i>Citrobacter koseri</i>	CIP 82.87	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 103.214	+++	<i>Acinetobacter baumannii</i>	CIP 70.34	++
<i>Enterococcus gallinarum</i>	BM4174 Nadège	+++	<i>Burkholderia cepacia</i>	CIP 80.24	+++
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	CIP 76125	++	<i>Achromobacter xylosoxidans denitrificans</i>	CIP 71.32	+++
<i>Bacillus cereus</i>	CIP 6624	+++	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	SA04072409	++
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CIP 103.018	++	<i>Comamonas testosteroni</i>	HC07070111	+++
<i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 103.575	++	<i>Aeromonas hydrophila</i>	CIP 76.14	+++
			<i>Comamonas acidovorans</i>	UR10024190	+++
			<i>Pseudomonas mosselii</i>	CIP 105.259	+++
			<i>Aeromonas caviae</i>	CIP 76.16	+++
			<i>Pseudomonas monteilii</i>	CIP 104.883	+++
			<i>Yersinia enterocolitica</i>	CIP 80.27	+++

++ : Présence d'une seule colonie

+++ : Test positif = aucune colonie ne pousse

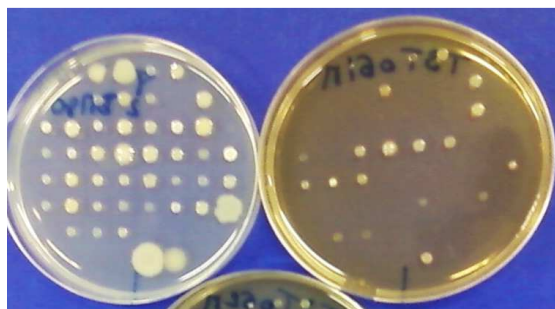


Figure 2 : Photo de boîtes de Pétri montrant l'activité antibactérienne de l'extrait de *P. bridsoniae* par rapport à un témoin sans produit.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique de *P. bridsoniae* possède un pouvoir antibactérien à large spectre, notamment sur les bactéries à Gram (+). La croissance de 14 souches de bactéries à Gram (+) sur 17 souches testées est totalement inhibée. Cet extrait inhibe également la croissance des bactéries à Gram(-). En effet, 16 souches de bactéries à Gram (-) sur 30 souches testées sont entièrement inhibées.

Voici quelques données sur les espèces bactériennes sensibles à l'extrait de *P. bridsoniae* :

- Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* sont responsables des intoxications alimentaires ;
- Streptococcus agalactiae* provoque la méningite et la septicémie chez les nourrissons ;
- Enterococcus faecalis* est responsable d'inflammations chroniques de l'intestin, d'infections urinaires et d'endocardites;
- les bactéries Gram (-) sont en général responsables des infections nosocomiales, comme *Flavimonasoryzihabitans*, *Pseudomonas mosselii*.

3.3.2 - Méthode de l'antibiogramme

Les extraits dichlorométhane et méthanolique de la plante ont été testés sur 6 souches au sein du laboratoire du CNARP :

- Gram (+) : *Staphylococcus aureus* ; *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*;
- Gram (-) : *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*;

Les antibiotiques de référence utilisés sont la Néomycine (30µg/disque), le Gentamycine (30µg/disque), et la Tétracycline.

Un test sur 9 autres souches, provenant de la collection de l'Université de La Réunion (LCSNSA) a été également effectué:

- Gram (+) : *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*;
- Gram (-) : *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella flexnerii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis*.

Les antibiotiques de référence sont la Kanamycine (30µg/disque) et la Streptomycine (10µg/disque).

Le tableau 3 résume les résultats obtenus par cette méthode.

Tableau 3 : Résultats des tests antimicrobiens par la méthode antibiogramme (souches provenant du Laboratoire de Chimie de Substances Naturelles et Sciences des Aliments de l'Université de La Réunion)

Souches		Extrait CH ₂ Cl ₂	Extrait MeOH	Neomycine	Tétracycline	Kanamycine	Streptomycine	Gentamycine
		Diamètre d'halo d'inhibition (mm)						
Gram(+)	<i>S. aureus</i>	8±0,1	11±0,0	13±4	-	-	-	-
	<i>B. megaterium</i>	0	12±0,0	-	26	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	8±0,1	15±0,0	-	40	-	-	-
	<i>L. monocytogenes</i>	-	12±0,0	-	-	30±0,0	22±0,33	-
	<i>C. perfringens</i>	-	8±0,0	-	-	20±0,0	15±0,0	-
	<i>S. pyogenes</i>	-	16±0,0	-	-	35±0,0	NT	-
Gram (-)	<i>K. pneumoniae</i>	0	12±0,2	-	-	-	-	-
	<i>P. mirabilis</i>	-	12±0,0	-	-	27±0,33	20±0,33	-
	<i>S. flexnerii</i>	-	0	-	-	21±0,66	20±0,66	-
	<i>E. coli</i>	0	0	-	-	-	-	20±2
	<i>S. typhi</i>	0	0	-	34	-	-	-
	<i>V. parahaemolyticus</i>	-	0	-	-	24±0,0	21±0,0	-

	<i>S. enterica</i>	-	0	-	-	20±0,0	NT	-
	<i>P. aeruginosa</i>	-	0	-	-	11±0,0	NT	-
	<i>Y. enterocolitica</i>	-	10±0,0	-	-	NT	17±0,33	-

0 : aucune zone d'inhibition NT: Non testé

L'extrait méthanolique, à une concentration de 1mg/disque, inhibe la croissance des bactéries à Gram (+), avec un diamètre d'halo d'inhibition variant de 11 à 16 mm dont *S. pyogenes* est la plus sensible (16±0,0 mm). Il inhibe également la croissance des bactéries à Gram (-) avec un diamètre d'halo d'inhibition variant de 10 à 12 mm, dont *P. mirabilis* et *K. pneumoniae*, sont les plus inhibées (12 ±0,0 mm). L'extrait dichlorométhane est moins actif car l'ensemble des souches testées sont peu sensibles. Les deux extraits présentent une faible activité par rapport aux témoins.

3.3.3 - Méthode par bioautography

L'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique a été testée sur 4 souches:

- Gram (+) : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* ;
- Gram (-) : *Klebsiellapneumoniae*.

Cette méthode permet de confirmer la détection de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique sur certaines souches testées par méthode d'antibiogramme. Cette activité est marquée par la formation d'une bande claire entourant le spot du produit à tester.

3.3.4 - Méthode de microdilution en milieu liquide

6 souches bactériennes ont été testées pour la mesure de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique :

- Gram (+) : *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis* ;
- Gram (-) : *Shigella flexnerii*, *Yersinia enterocolitica*.

Le tableau suivant permet de résumer les résultats issus de ce test.

Tableau 4: Résultats de CMI et de CMB de l'extrait méthanolique de *P. bridsoniae* par microdilution en milieu liquide

	Souches Gram (+)			Souches Gram (-)		
	<i>L.monocytogenes</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>S. flexnerii</i>
CMI (µg/ml)	312,5	625	39,06	625	625	IN
CMB (µg/ml)	312,5	1250	78,13	1250	1250	IN
CMB/CMI	1	2	2	2	2	-

IN = inactif

Les résultats (tableau 4) confirment d'une part l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique, et d'autre part montrent plus de spécificités pour les valeurs CMI et CMB différentes obtenues.

En se référant au rapport CMB/CMI, l'extrait méthanolique est bactéricide vis-à-vis de l'ensemble des bactéries, à une concentration minimale inhibitrice allant de 39,06µg/ml à 625 µg/ml, et une concentration minimale bactéricide de 78,13µg/ml à 1250µg/ml.

3.3.5 - Méthode de dilution en milieu solide pour le test antimoississure

Le test a été fait sur 5 souches de champignons, provenant de la collection de l'Université de La Réunion (LCSNSA): *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus var terreus*, *Fusariummonoliforme*, *Fusariumsporotrichoides*, *Trichoderma viride*.

L'extrait méthanolique a été utilisé à une concentration finale égale à 1mg /ml. Le résultat est observé par la croissance normale visible ou non des moisissures.

Tableau5 : Résultats des tests antimoississures sur l'extrait MeOH de *P. bridsoniae*

Souches	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus terreus</i> var. <i>terreus</i>	<i>Fusariummonoliforme</i>	<i>Fusariumsporotrichoides</i>	<i>Trichoderma viride</i>
	Pourcentage d'inhibition de la croissance des moisissures (%)				

Extrait MeOH	21	16	36	19	45
Témoin (milieu + souche, sans extrait)	0	0	0	0	0

Les résultats présentés dans le tableau 5 montrent que l'extrait méthanolique de *P. bridsoniae* inhibe la croissance des champignons filamenteux de 16 à 45% par rapport au témoin. L'inhibition est en général moyennement faible, mais l'extrait présente une activité plus marquée contre la souche de *Trichodermaviride* (45%), par rapport aux autres souches testées. Pour le témoin, l'inhibition est nulle.

3.2 Analyses d'activités antioxydantes

La détection de l'activité antioxydante des extraits de la plante a été effectuée par trois méthodes différentes : méthode DPPH, méthode « bioautography », et méthode ORAC.

3.2.1 - Méthode DPPH

La technique d'analyse de l'activité antioxydante, faite sur microplaque, avec une solution méthanolique DPPH à 4mg/10ml, a permis de mettre en évidence d'une part une activité antioxydante élevée de l'extrait méthanolique de 3568mMTrolox/l d'extrait, et d'autre part, un résultat positif pour l'extrait dichlorométhane, mais caractérisé par une valeur d'inhibition faible de 63mMTrolox/l d'extrait.

3.2.2.- Méthode « bioautography »

L'extrait dichlorométhane est inactif vis-à-vis du DPPH alors que l'extrait méthanolique présente une activité antioxydante. Cette dernière est montrée par la décoloration de la couleur violette aux alentours des dépôts c'est-à-dire le piégeage du radical libre (DPPH+) par les composants organiques des extraits testés.

3.2.3 - Méthode ORAC

Le test d'activité antioxydante des extraits de la plante, suivant la méthode ORAC par le principe de transfert d'hydrogène, a donné les valeurs respectives de 22,59mMTrolox/l d'extrait pour l'extrait méthanolique et 15,60 mMTrolox/l d'extrait pour l'extrait dichlorométhane. Cette méthode permet de confirmer l'activité importante de l'extrait méthanolique par rapport à l'extrait dichlorométhane.

4. CONCLUSION

Le criblage phytochimique réalisé sur la plante a montré la présence de composés phénoliques, de stéroïdes et d'iridoïdes.

Les tests antibactériens ont révélé que l'extrait méthanolique de la plante présente une activité antibactérienne à large spectre essentiellement sur *Streptococcus pyogenes*, avec une CMI de 39,06µg/ml et une CMB de 78,13µg/ml. L'analyse des activités antioxydantes a également montré la potentialité de l'extrait méthanolique, avec une valeur élevée de 3568mMTrolox/l d'extrait par méthode DPPH, et une valeur 22,59mMTrolox/l d'extrait par méthode ORAC. Ces résultats permettent de confirmer les activités antibactériennes et antioxydantes mises en évidence lors des travaux préliminaires réalisés.

L'ensemble des résultats obtenus sont comparables avec les données antérieures répertoriées sur quelques espèces du genre *Psychotria*. Néanmoins, *Psychotriabridsoniae* ne renferme qu'une quantité infime d'alcaloïdes. Notre étude a permis de montrer l'intérêt biologique de *Psychotriabridsoniae*. Elle a ouvert une nouvelle voie de recherche de molécules antibactérienne et antioxydante. L'extrait méthanolique de *P. bridsoniae* peut donc faire l'objet de recherches biologiques approfondies dans le traitement des infections telles que l'angine streptococcique, le scarlatine, l'impétigo, la pneumonie, les infections urinaires, les infections nosocomiales, et dans le traitement des toxi-infections alimentaires.

5. REMERCIEMENTS :

- Laboratoire de Microbiologie de l'Université Paris Descartes
- Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Paris Descartes
- Laboratoire de Chimie de Substances Naturelles et Sciences des aliments de l'Université de La Réunion
- Bourse du Gouvernement Français - Projet PARRUR

6. REFERENCES

- [1] DAVIS A.P., BRIDSON D., JARVIS C., GOVAERTS R. (2001). The typification and characterization of the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **35**, pp.35–42.
- [2] BOITEAU P., BOITEAU M., BOITEAU L. A. (1997). *Index des noms scientifiques avec leurs équivalents malgaches (Collection « nature ») : Flore de Madagascar*.
- [3] GIAN P.M., SON H.V., SON P.T. (2007). Study on the Chemistry and Antimicrobial Activity of *Psychotria reevesii* Wall. (Rubiaceae). *Journal of Chemistry*, **45** (5), pp. 628 – 633.
- [4] RANDRIAMAHEFA M., RAKOTOZAFY A. (1979). *Tari-dà lana ahafantarany raokandro Malagasy. Recherches Bibliographiques sur les utilisations empiriques des plantes médicinales malagasy*. Inéd.
- [5] GRENAND P., MORETTI C., JACQUEMIN H. (1987). *Pharmacopées traditionnelles en Guyane : Créoles, Palikur, Wayâpi*. Ed. ORSTOM.
- [6] KUO Y.C., CHIEN C.C., TSAI W.J., HO Y.H. (2001). Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. *Antiviral Research*, **51**, pp.95–109.
- [7] LAJIS N.H., MAHMUD Z., TOIA R.F. (1993). The Alkaloids of *Psychotria strata*. *Planta Medica*, **59**, pp.383-384.
- [8] LOCHER C.P., BURCH M.T., MOWER H.F., BERESTECKY J., DAVIS H., VAN POEL B., LASURE A., VANDEN B.D.A., VLIETINCK A.J. (1995). Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from select Hawaiian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **49**, pp.23–32.
- [9] CABALLERO-GEORGE C., VANDERHEYDEN P.M.L., SOLIS P.N., PIETERS L., SHAHAT A.A., GUPTA M.P., VAUQUELIN G., VLIETINCK A.J. (2001). Biological screening of selected medicinal Panamanian plants by radioligand-binding techniques. *Phytomedicine*, **8**, pp.59–70.
- [10] MUHAMMAD I., DUNBAR D. C., KHAN S. I., TEKWANI B. L., BEDIR E., TAKAMATSU S., FERREIRA D., WALKER L. A. (2003). Antiparasitic alkaloids from *Psychotria klugii*. *Journal of Natural Products*, **66**, pp.962-967.
- [12] NGAMENI, B., KUETE, V., SIMO I.K., MBAVENG, A.T., AWOUSSONG, P.K., PATNAM, R., ROY, R., NGADJUI, B.T. (2009). Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorsteniaturbinata* (Moraceae). *South African Journal Botany*, **75**, pp.256 -261.
- [13] NIELSEN E.M., ENGBERG J., FUSSING V., PETERSEN L., BROGREN C.H., ON S.L. (2000). Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, pp.3800–3810.
- [14] PYUN. M.S., SHIN S. (2006). Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine*, **13**, pp.394-400.
- [15] DAVIES T.A., KELLY L.M., JACOBS M.R., APPELBAUM P.C. (2000). Antipneumococcal activity of telithromycin by agar dilution, microdilution, E test, and disk diffusion methodologies. *Journal of clinical microbiology*, **38**, pp. 1444-1448.
- [16] MEYERS E., SMITH D.A. (1964). Bioautography of antibiotic spread-layer chromatograms. *Journal of Chromatography*, **14**, pp. 129-132.
- [17] WAGMAN G.H., BAILEY J.V. (1969). Use of silicic acid—glass fiber sheets for bioautography of antimicrobial substances. *Journal of Chromatography*, **41**, pp. 263-264.
- [18] TASDEMIR D., DONMEZ A.A., CALIS I., RUEDI P. (2004). Evaluation of Biological Activity of Turkish Plants. Rapid Screening for the Antimicrobial, Antioxidant, and Acetylcholinesterase Inhibitory Potential by TLC Bioautographic Methods. *Pharmaceutical Biology*, **42** (4-5), pp. 374-383.
- [19] 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** (2), pp. 356-362.
- [20] KUETE V., MBAVENG A.T., TSAFFACK M., BENG V.P., ETOA F.X., NKENGFACK A.E., MEYER J.J., LALL N. (2008). Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of *Bersama engleriana* (Melianthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **115**, pp.494-501.
- [21] FAVEL A., STEINMETZ M.D. et REGLI P. (1994). In vitro antifungal activity of triterpenoid saponins. *Planta Medica*, **60**, pp.50-53.
- [22] SENHAJI O., FAID M., ELYACHIOUI M., DEHHAOUI M. (2005). Étude de l'activité antifongique de divers extraits de cannelle. *Journal de Mycologie Médicale*, **15** (4), pp. 220–229.
- [23] LEE D-S., KIM N-S., LEE S-H. (2001). 2, 2-Diphenyl-1-1- picrylhydrazyl Hydrate, a Stable Free Radical, Is an α -Glucosidase Inhibitor. *Journal of Biological & pharmaceutical bulletin*, **24** (6), pp. 727-728.
- [24] POPOVICI C., SAYKOVA I., TYLKOWSKI B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, **4**, pp. 25-39.

[25] AGROBIO-RENNES. Méthode ORAC. Consulté le 04/09/2014 sur http://www.agrobio-rennes.com/Etudes_et_Recherches/Tests_de_biologie_fonctionnelle/la-mesure-du-pouvoir-antioxydant-par-la-methode-orac.php