

Etude *in vitro* de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait hydroéthanolique des écorces de *Maytenus undata*

Par KIMENYI Patrick (1), KABAKURA Mwima Godefroy (2),
BAJYANA Songa Emmanuel (1)

1. Faculté des sciences, Département de Biologie, Université Nationale du Rwanda
2. Faculté des sciences, Département de Pharmacie, Université Nationale du Rwanda

Résumé

Cette étude avait pour objectif global de vérifier l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait hydroéthanolique de *Maytenus undata* sur une gamme étendue de microorganismes pathogènes (Staphylocoques, entérocoques, bacilles, streptocoques et candidoses). Les objectifs spécifiques étaient de faire l'extraction hydroéthanolique et de le fractionner, tester l'activité inhibitrice de l'extrait sur les microorganismes, étudier la préservation de l'activité à des différentes températures et degrés de pH ainsi que la sensibilité de l'extrait aux protéases. L'extrait hydroéthanolique contenant en prédominance des tanins est obtenu à partir des écorces de *Maytenus undata*. Cet extrait manifeste une activité antibactérienne et antifongique avec respectivement des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de : 20 µg/ml pour *Staphylococcus aureus* et les Staphylocoques coagulase négatif (SCN), la concentration de 25 µg/ml inhibait les souches d'*Enterococcus faecalis et faecium* ainsi que *Streptococcus pyogenes*. Tandis que la souche de *Candida albicans* est inhibée à 16 µg/ml. *Bacillus sp* résistait à l'action de l'extrait jusqu'à la concentration de 1 mg/ml. L'activité de l'extrait est perdue à une température de 80°C, cependant elle reste conservée à 70°C et en dessous. A des degrés de pH : 5,7 et 9, cette activité est également conservée. L'extrait et ses fractions F2 et F3 obtenues par chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie sur colonne (CC) conservent leur activité après l'ajout des protéases de différentes spécificités (α-chymotrypsine et la papaine). La concentration minimale inhibitrice (CMI) pour les différents microorganismes étudiés est comparable à celle des antibiotiques vendus dans le commerce international. L'inhibition de la croissance microbienne serait due, soit à l'action de l'acide tannique ayant une grande affinité pour les ions de fer indispensables à la réduction de ribonucléotides, soit à l'astringence des tanins éllagiques permettant l'inhibition des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. Les conditions optimales d'activité relevées par l'étude de sensibilité à la température, pH et aux protéases permettent de mieux comprendre la nature du principe actif ainsi que l'optimisation de la technologie de production et de conservation pour une utilisation améliorée.

Mots clés : *Maytenus undata*, tanins, extrait hydroéthanolique, Bactéries, Chromatographie, CMI.

Abstract

The purpose of this study was to assess the antibacterial and antifungal activity of an extract from *Mytenus undata* against different pathogenic microorganisms (Staphylococci, Enterococci, Bacilli, Streptococci and Candidoses). Specifically we were looking for a hydroethanolic extract and fractionate it, the minimum inhibitory concentrations(MIC) against microorganisms, assessing the preservation of the inhibitory activity under different degrees of temperature and pH then assess the effect of proteases on the extract activity. A hydroethanolic extract which contains tannins was obtained from the *Maytenus undata* bark. This extract shows an antibacterial and antifungal activity with respectively minimum inhibitory concentrations of: 20µg/ml for *Staphylococcus aureus* and for negative coagulase staphylococci, 25µg/ml for *Enterococcus faecalis* and *faecium* and the same concentration for *Streptococcus pyogenes*. *Candida albicans* strain was inhibited by a concentration of 16 µg/ml. *Bacillus sp* has been proven to be resistant to the extract action up to a concentration of 1mg/ml. The

extract activity is inactivated at 80°C of temperature, but this activity is still preserved at 5, 7 and 9 degrees of pH. The activity of the extract and its fractions (F2 and F3) obtained by thin layer chromatography and column chromatography is also conserved after the use of proteases (*a*-chymotrypsin and papain) of different specificities. The minimum inhibitory concentration (MIC) against different microorganisms in the study is comparable to those of some antibiotics commercialized at international level. This inhibition action might be due to the tannic acid action which complex with iron ions and prevents the reduction of ribonucleotides. It might be due also to the astringency properties of ellagitannins through the inhibition of the peptidoglycan biosynthesis enzymes. The optimum activity conditions (temperature, pH and proteases) allow the better understanding of the nature of the extract and new applications to be taken through production and conservation technologies for better use.

Key words: *Maytenus undata*, hydroethanolic extract, tannins, Bacteria, Chromatography, MIC.

Introduction

Au Rwanda, en République Démocratique du Congo et au Congo (Brazzaville) les écorces de *Maytenus undata* sont utilisées pour soigner les diarrhées d'origine infectieuse. [3]. Cependant peu de recherches scientifiques prouvant l'efficacité de cette activité ont été faites. Au Rwanda, cette espèce est menacée de disparition parce que son milieu naturel est surexploité (forêt de Gishwati situé au nord ouest du Rwanda.) Cette étude avait pour objet de relever son importance médicale jusque là ignorée ou sous-estimée ainsi que chercher les conditions optimales de son activité contre différents microorganismes pathogènes. Ceci ayant un impact sur la conscientisation pour la protection de cette espèce ainsi qu'éveiller les recherches plus poussées à propos de la plante. Les plantes de ce genre comme *Maytenus arbutifolia*, *Maytenus undata*, sont utilisées en Arabie Saoudite pour traiter les gastro-entérites, l'estomac et contre les crises asthmatiques. Au Nigeria, les écorces de *Maytenus undata* sont mélangées avec celles de *Triumfetta cordifolia* contre les diarrhées. Au Bénin, les écorces de *Maytenus* séchées et mélangées à celles de l'*Elephantopus plurisetus* traitent les gastro-entérites et coliques aiguës. [6]. Au cours de cette étude, nous avons recherché premièrement l'activité antibactérienne et antifongique de *Maytenus undata* sur une gamme étendue de microorganismes pathogènes: *Staphylococcus aureus*, Staphylocoques coagulase négatif (SCN), *Enterococcus faecalis* et *faecium*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Bacillus sp*, *Salmonella B et D*, l'*E.coli* et le *Shigella flexneri*. En second lieu nous avons étudié les conditions optimales d'activité (température, pH, protéases) de l'extrait de *Maytenus undata*.

Matériel et méthodes

1. Matériel

Le matériel végétal utilisé est constitué des écorces de *Maytenus undata*. Au cours de l'expérimentation, le matériel de laboratoire était constitué d'appareils et verrerie tels que : le rotavapor rotatif, l'autoclave, le bain-marie, l'étuve, le pH-mètre, les plaques et la colonne de chromatographie. De réactifs tels que : les solvants d'extraction (éthanol et l'eau) et les solutions d'élution pour la chromatographie, les solutions tampon pour ajuster le pH de l'extrait et les protéases (α -chymotrypsine et la papaïne). On a utilisé aussi les milieux de culture (Mueller-Hinton, le Gélose au sang, le Sabouraud, Slanetz et Bartley et le casein agar) ainsi que les souches microbiennes (*Staphylococcus aureus*, Staphylocoques coagulase négatif (SCN), *Enterococcus faecalis* et *faecium*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Bacillus sp*, *Salmonella B* et *D*, *Escherchia coli* et le *Shigella flexneri*.

2. Méthodes

2.1. Extraction des tanins

L'extraction des tanins a été faite avec un mélange hydroalcoolique[1] dans les proportions (éthanol/eau) respectivement de 6/4. Après le repos de 48 heures du mélange dans le percolateur, l'évaporation des solvants est faite au rotavapor à 40°C. La caractérisation de la prédominance des tanins par rapport aux autres métabolites secondaires est vérifiée à l'aide du screening phytochimique.

2.2. Fractionnement de l'extrait hydroéthanolique

Le fractionnement débute avec la chromatographie sur colonne (CC) avec 150 g de gel de silice suspendu dans l'heptane. L'élution s'est faite avec les proportions des solvants ayant produit une meilleure séparation avec la chromatographie sur couche mince (CCM). Les trois fractions obtenues ; F1, F2 et F3 ont été ensuite soumises à la CCM faite sur les plaques enduites de gel de silice 60 F254 de 20*20cm. La phase mobile était formée de : Propanol / Ethyl acétate / Butanol / Eau dans les proportions respectives de : 40/40/15/5. Le révélateur était la solution de FeCl₃ 5% et la visualisation s'est effectuée sous lampe UV à 254 nm.

2.3. Recherche de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait

Pour le test d'antibiogramme, la méthode utilisée est celle de dilution en milieu solide. Chaque souche microbienne était ensemencée sur le milieu de culture convenable ; pour la croissance de *S.aureus* et les

Staphylocoques coagulase négatif c'était le Mueller-Hinton, les entérocoques et les streptocoques sur gélose au sang et le Slanetz et Bartley, pour *Candida albicans* on a utilisé le sabouraud et pour les bacilles c'était le «casein agar». La recherche de la concentration minimale inhibitrice (CMI) s'est faite sur une gamme de concentrations suivante ; 10µg/ml, 16µg/ml, 20µg/ml, 25µg/ml, 30µg/ml et 50 µg/ml.

2.4. Etude des conditions optimales d'activité de l'extrait

L'étude de l'effet de la température sur l'activité de l'extrait et les fractions F2 et F3 était conduite avec différentes portions de l'extrait soumises à des températures de : 37°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C et 100°C au bain-marie avant la recherche de l'activité par la méthode de dilution en milieu solide. Pour l'étude de l'effet de pH, le pH de l'extrait et ses fractions était ajusté à pH : 5, 7 et 9 à l'aide de deux solutions tampon ; l'hydrogénéphthalate de potassium et bicarbonate de sodium, suivi de la vérification de l'activité par méthode de dilution en milieu solide. Enfin l'action des protéases sur l'extrait et ses fractions était conduite avec deux protéases avec des spécificités différentes (l' α -chymotrypsine et la papaïne) ayant respectivement l'activité de 40 à 60 unités/mg pour l' α -chymotrypsine et 20 à 40 unités/mg pour la papaïne.

Résultats et interprétation

L'extraction des tanins par un mélange hydroéthanolique de proportions (6/4) suivie d'une caractérisation phytochimique qualitative a révélé la prédominance des tanins (Tableau I) dans l'extrait par rapport aux autres métabolites testés (Alcaloïdes, stérols-terpènes, leucoanthocyanes, flavonoïdes et les saponosides). Une quantité de tanins de l'ordre de 20,6% de la poudre brute est obtenue.

Tableau 1. Caractérisation de la prédominance des tanins

Composé	Alcaloïdes	Stérols - terpènes	Leuco-anthocyanes	Flavonoïdes	Saponosides	Quinones	Tanin
Résultats obtenus	-	-	-	-	-	-	+

Légende :- : Absence
+ : Présence

Le fractionnement par chromatographie sur colonne a produit 45 fractions dont l'évaluation faite avec la chromatographie sur couche mince a révélé trois types de fractions avec trois différentes valeurs du facteur de rétention (R_f) (Tableau II et Figure 1). L'évaporation des solvants a permis de retenir deux fractions F2 et F3 avec des quantités requises pour l'antibiogramme.

Tableau 2. Résultats des fractions hydroéthanoliques et les quantités obtenues

Fractions	Facteur de Retention	Poudre (g)
F1	0,90	0.0016g
F2	0,85	2.5g
F3	0,35	1.4g

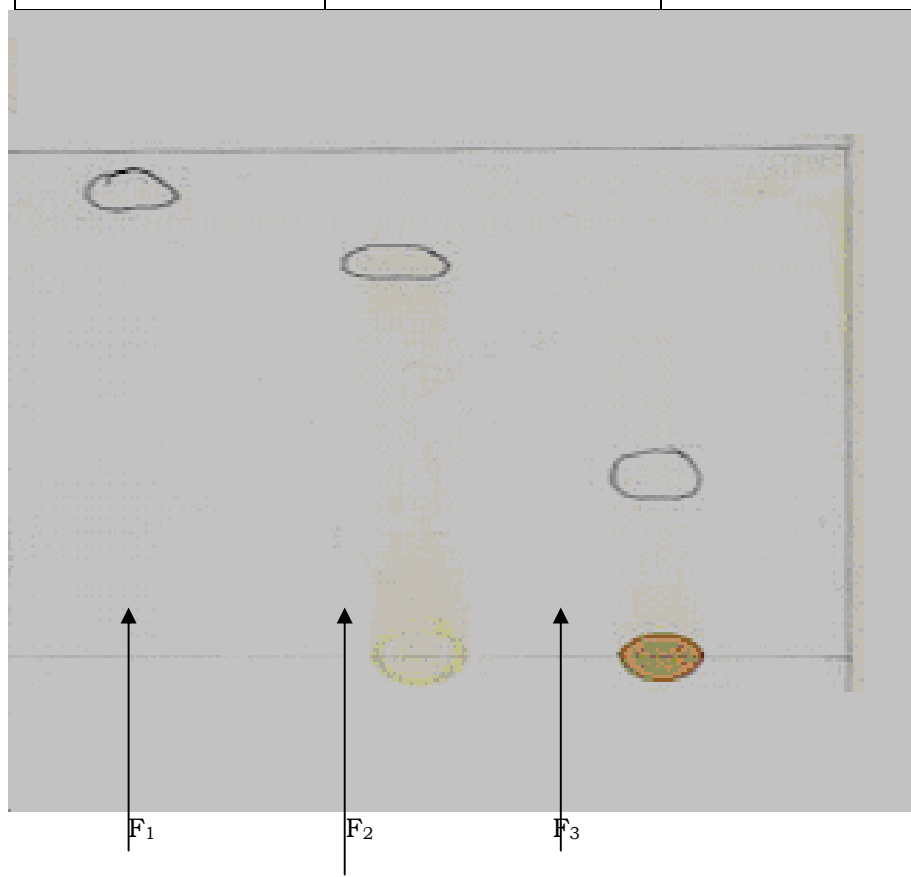


Figure 1 : Chromatographie sur couche mince des fractions

Les figures ci-après montrent la sensibilité des différentes souches microbiennes à l'extrait hydroéthanolique, à la fraction F2 ainsi qu'à la fraction F3 respectivement. Signalons que faute de quantités suffisantes des fractions F2 et F3, la recherche de la concentration minimale inhibitrice pour les Staphylocoques du groupe A et les *Bacillus sp* a porté uniquement sur l'extrait hydroéthanolique.

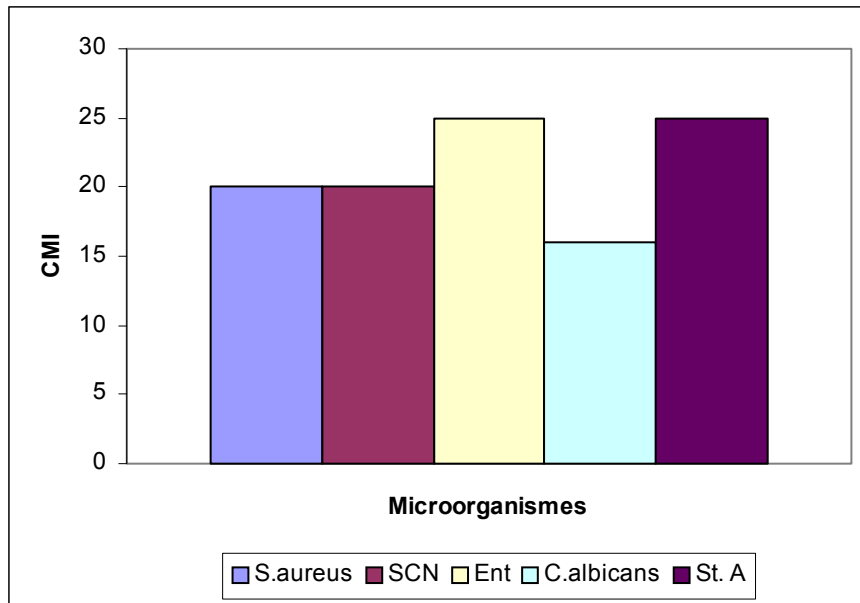
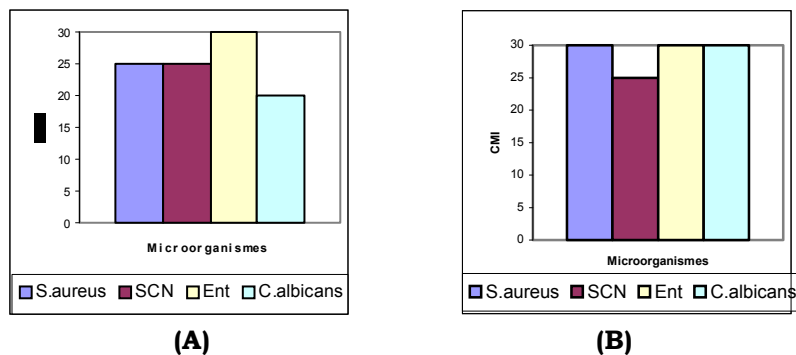


Figure 2 : La concentration minimale inhibitrice de l'extrait hydroéthanolique



(A)

(B)

Figure 3 : La concentration minimale inhibitrice des fractions F2 (A) et F3 (B)

En comparant l'activité des deux fractions, on remarque que la F2 exprime une efficacité supérieure à celle de la F3. Cette efficacité est sans doute liée à sa composition qui requiert une étude plus approfondie de la structure moléculaire et de son mode d'action. Les mécanismes d'action de cet extrait de tanins peuvent être envisagés à partir de la composition de ces tanins même et à partir de la nature des microorganismes sur lesquels ces tanins agissent et en particulier sur le plan moléculaire. Les tanins ici en question sont en prédominance des tanins condensés de part leur

extraction hydroalcoolique et de part l'absence de l'hydrolyse par les protéases (l' α -chymotrypsine et la papaïne). L'acide tanique serait en prédominance et cet acide est réputé dans l'inhibition des microorganismes aérobiques, parce qu'il possède une grande affinité pour les ions métalliques et en particulier ceux de fer et que les microorganismes aérobiques ont besoin de ces ions pour accomplir les fonctions telles que la réduction des ribonucléotides précurseurs dans la formation de l'ADN et d'autres. Ces propriétés antimicrobiennes de l'acide tanique sont liées à la liaison ester entre l'acide gallique et le glucose (pour former l'acide tanique), parce que l'acide gallique à lui seul ne pourrait pas inhiber la croissance microbienne. [4] Les propriétés astringentes des tanins peuvent aussi induire la compléxation de ces derniers avec les enzymes ou les substrats. Beaucoup d'enzymes microbiennes sous forme de filtrats bruts ou purifiés sont inhibés lorsqu'ils sont mélangés avec les tanins. De ceci les enzymes impliquées dans les métabolismes cellulaires tels que la biosynthèse du peptidoglycane et d'autres fonctions essentielles pourraient être inhibées après perméabilisation de la membrane cellulaire par les tanins éllagiques possédant aussi les propriétés de se lier aux protéines. [4] Cependant la résistance du *Bacillus sp* à cette action serait liée, soit à l'acquisition de plasmides® de résistance aux antibiotiques, soit à la paroi cellulaire couverte de capsule, à la sporulation ou aux mêmes mécanismes d'autoprotection contre les substances antibiotiques produites par certaines souches comme la *Bacillus pumilus*. [2] La concentration minimale inhibitrice du principe actif antibactérien et antifongique de *Maytenus undata* varie de 16 $\mu\text{g/ml}$ à 30 $\mu\text{g/ml}$ selon la souche microbienne de cette étude, elle est comparable à celle des antibiotiques vendus dans le commerce international comme l'amikacine, la céfalotine, la céfazoline et d'autres. [5] Les effets de la température, du pH ainsi que celui de protéases sur le principe actif antibactérien de *Maytenus undata* figurent dans les tableaux ci-après :

Tableau 3 : Test de l'effet de la température sur l'activité antibactérienne de l'extrait hydroéthanolique

Souches microbiennes	Extrait hydroéthanolique					F2					F3				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
37°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
90°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Légende : A : *E.coli*, B : *Shigella flexneri*, C : *Salmonella B*, D : *Salmonella D*, E : *Staphylococcus aureus*, F2 : fraction F2, F3 : fraction F3
 + : croissance (inactif), - : pas de croissance (actif)

Tableau 4 : Test de l'activité de l'extrait et fractions à différents degrés de pH

	Extrait hydroéthanolique					F2					F3				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
Souches microbiennes															
pH : 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH : 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH : 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Légende : A : *E.coli*, B : *Shigella flexneri*, C : *Salmonella B* : *Salmonella D*, E : *Staphylococcus aureus*, F2 : fraction F2, F3 : fraction F3
+ : croissance, - : pas de croissance bactérienne.

Tableau 5 : Test de l'activité antibactérienne de l'extrait hydroéthanolique et les fractions soumises à l'action des protéases.

	Extrait hydroéthanolique					F2					F3				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
Souches microbiennes															
α-chymotrypsine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Papaine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Légende : A : *E.coli*, B : *Shigella flexneri*, C : *Salmonella B* : *Salmonella D*, E : *Staphylococcus aureus*, F2 : fraction F2, F3 : fraction F3
+ : croissance, - : pas de croissance bactérienne.

Les résultats de l'effet de la température (Tableau III) peuvent avoir des répercussions sur l'optimisation de la technologie d'extraction en évitant de travailler avec des températures élevées (supérieures à 70°C) pouvant dénaturer le principe actif ainsi que sur les conditions de conservation. Les paramètres de pH (Tableau IV) et de température permettent aussi de prévoir l'utilisation du principe actif de *Maytenus undata* sur les bactéries ou les levures qui résistent aux conditions du milieu. La conservation de l'activité antibactérienne à l'action des protéases (Tableau V) suggère que ces tanins sont en grande partie de nature condensée donc non facilement hydrolysables par les enzymes.

Conclusion et recommandations

Les résultats obtenus montrent qu'une gamme large de microorganismes est inhibée par l'extrait des écorces de *Maytenus undata* à savoir : *Staphylococcus aureus*, Staphylocoques coagulase négatif (SCN), *Enterococcus faecalis* et *faecium*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Bacillus sp*, *Salmonella B* et *D*, *E.coli* et le *Shigella flexneri*. Il a été constaté cependant que *Bacillus sp* résiste à l'action de cet extrait. La conservation de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait confirme la nature des tanins condensés non hydrolysables et présents dans l'extrait de *Maytenus undata*. En ce qui concerne l'étude de la concentration minimale inhibitrice, celle-ci varie de 16 µg/ml à 30 µg/ml selon la souche microbienne étudiée, et elle est comparable à celle des antibiotiques vendus dans le commerce international. Il est recommandé d'élargir le spectre d'activité, en faisant une expérimentation sur d'autres microorganismes, puis étudier une possibilité de combinaison avec d'autres antibiotiques pour élargir le spectre d'activité. Après ces études, il sera aussi intéressant de faire le *scale-up* de la technologie pour une exploitation industrielle commerciale.

Bibliographie

- [1] BRUNETON J., (1987). Eléments de phytochimie et de pharmacognosie, Technique et documentation Lavoisier, Paris, p.70-360.
- [2] Description du genre *Bacillus* [en ligne]. Disponible sur : <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/bacillus.html> (consulté le 27/01/2006)
- [3] Food and Agriculture organization, (2001). Description des plantes médicinales de l'Afrique. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.fao.org/DOCREP/004/X6814F/X6814F06.htm> (consulté le 18/12/2005).
- [4] Hisanori Akiyama, Kazuyasu Fujii, Osamu Yamasaki, Takashi Oono and Keiji Iwatsuki, (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus* : Journal of Antimicrobial chemotherapy [en ligne]. Disponible sur: <http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/full> (Visitée le 20/07/2006)
- [5] NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997b.) Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents, Document M26-T, Wayne.
- [6] Prelude Medecinal plants database [en ligne]. Disponible sur: www.metafro.be/prelude/view_plants