

SPECTRE ANTI-INFECTIEUX DE MISCA-F₁ SUR LA CROISSANCE IN VITRO DE *CANDIDA ALBICANS* ET *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*, *ASPERGILLUS FUMIGATUS*, *ASPERGILLUS FLAVUS*, *TRICHOPHYTON RUBRUM* ET *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES*

**Elisée K. KOUASSI^{*}, Mathieu A. K. KOFFI,
Sitapha OUATTARA et Frédéric GUEDE-GUINA**

*Laboratoire de pharmacodynamie biochimique, UFR Biosciences Université
de Cocody, 22 BP 582 Abidjan 22*

(Reçu le 27 Mars 2008, accepté le 17 Septembre 2008)

* Correspondance et tirés à part, e-mail : *elykoua@yahoo.fr*

RÉSUMÉ

Dans le but d'apporter notre contribution à la lutte contre les mycoses opportunistes en forte recrudescence chez les malades du SIDA, notre équipe a testé une fraction chromatographique MISCA -F₁ obtenue à partir de l'extrait total éthanolique d'une rubiacée sur la croissance *in vitro* de six (6) souches de champignons dont deux levures (*Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*) et quatre moisissures (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton mentagrophytes*). Les tests antifongiques ont été réalisés sur milieu Sabouraud.

L'extrait végétal a été incorporé à ce milieu selon la méthode de la double dilution en tubes penchés. Toutes les souches testées sont sensibles à MISCA-F₁ ; cependant, la comparaison de la sensibilité des souches sur la base des valeurs de CMF montre que la souche de *Trichophyton* est plus sensible (CMF =12,5 mg/mL), la souche de *Aspergillus* a une sensibilité intermédiaire (CMF= 87,5 mg/mL) tandis que les levures sont les moins sensibles (CMF =150 mg/mL). Ainsi, l'éthanol est le solvant qui permet de mieux concentrer les principes actifs antifongiques de MISCA. En aval, une étude par tri phytochimique suivie de chromatographie sur colonne et sur couche mince permettrait de séparer les différentes molécules contenues dans MISCA-F₁ et de connaître la nature de la molécule active.

Mots-clés : *MISCA, Rubiacée, extrait végétal, champignons opportunistes, activité antifongique*

ABSTRACT

Anti-infectious spectrum of misca-f₁ on the in vitro growth of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*

In the goal to bring our contribution to the struggle against opportunists mycosis in strong upsurge at patients of the AIDS, our team tested a chromatographic fraction MISCA-F₁ gotten from the total ethanolic extract of a rubiacée on the *in vitro* growth of six (6) stumps of fungi of which two yeasts (*Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*) and four mildews (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*). Antifungal tests have been made on Sabouraud medium culture.

Extract has been inserted to this medium according to the Agar slant method. All tested stumps are sensible to MISCA-F₁; however, the comparison of the MFCs values shows that the *Trichophyton* strain is more sensible (MFC =12,5 mg/mls), the *Aspergillus* strain has an intermediate sensitivity (MCF = 87,5 mg/mls) while yeasts are less sensible (MCF =150 mg/mls). So, ethanol is the solvent that permits the best concentration of active principles of MISCA. Downstream, a survey by sorting follow-up phytochimic of chromatography on column and on thin layer would permit to separate the different restrained molecules in MISCA-F₁ and to know the nature of the active molecule.

Keywords : *MISCA, Rubiacée, extract plant, fungi opportunists, activity antifungal*

I - INTRODUCTION

Les mycoses constituent des infections très fréquentes chez les sujets vivant avec le VIH. Les fréquences de plus en plus élevées de ces mycoses sont liées à plusieurs facteurs dont les phénomènes de résistance aux molécules usuelles, l'inefficacité et la toxicité pour certains médicaments, l'inadaptation des moyens de diagnostic et enfin la forte avancée des infections à VIH avec leurs infections opportunistes [1,2]. Cette situation oblige la communauté scientifique à rechercher de nouvelles molécules capables de soulager les populations.

En Afrique, singulièrement en Côte d'Ivoire, le coût élevé des molécules habituellement utilisées en médecine moderne oblige les populations à se tourner vers l'utilisation des plantes médicinales. Pour aider ces populations à

tirer un véritable profit de leur pharmacopée, notre équipe de recherche a entrepris depuis plus d'une décennie, d'évaluer sur le plan scientifique l'efficacité des plantes à vertus thérapeutiques [3-12].

Le but de ce travail est d'évaluer l'activité antifongique d'un extrait hydro-alcoolique d'une rubiacée [13] codifiée MISCA-F1 sur la croissance *in vitro* de six (6) souches de champignons dont deux (2) levures : *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*, et quatre (4) moisissures : *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton mentagrophytes*. Tous ces germes sont responsables d'infections cutanées et systémiques chez les malades du SIDA [14].

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

II-1. Préparation de l'extrait végétal

Les tiges feuillées de MISCA ont été récoltées, lavées, séchées à l'abri du soleil pendant 7 jours et rendues en poudre fine grâce à un broyeur de type IKA-MAG. La poudre a été extraite selon la méthode de *Guédé-Guina et al.*, [4] comme suit :

Cent grammes (100g) de poudre de MISCA sont extraits par macération dans un litre d'éthanol pur sous agitation magnétique pendant 48 heures sur un agitateur de type IKA-MAG-RTC. Le macéré obtenu est filtré successivement deux fois sur coton hydrophile et ensuite une fois sur papier Whatman. Après évaporation du filtrat à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Büchi, on obtient une pâte verdâtre qui constitue l'extrait total éthanolique noté MISCA-ET.

MISCA-ET a été chromatographié sur gel de filtration Sephadex G₂₅ selon une combinaison des méthodes de Morris (1961) et *Guede-Guina et al.* [5]. L'éluant composé de 20 % d'éthanol et de 80 % d'eau distillée permet de séparer les éléments hydrosolubles de couleur rouge brique. Cette fraction lyophilisée constitue la fraction 1 notée MISCA-F₁ qui sera testée sur les six (6) souches.

II-2. Les germes testés

Les souches *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton rubrum* ont été fournies par le laboratoire de mycologie de l'UFR des sciences médicales de l'Université de Cocody (Abidjan, Côte d'Ivoire). Ces souches ont été isolées chez des patients malades du SIDA.

II-3. Préparation des milieux de culture

Les tests antifongiques ont été réalisés sur milieu de culture Sabouraud (BIO RAD 64494, lot 7A2211). L'incorporation de l'extrait végétal à la gélose a été faite selon la méthode de la double dilution en tubes penchés [11]. Notre série comporte 12 tubes à essai dont 10 tubes tests (contenant l'extrait végétal) et 2 tubes témoins (un sans extrait végétal, sert de témoin de contrôle de croissance des germes ; l'autre sans germes et sans extrait sert de témoin de contrôle de la stérilité du milieu de culture). Notre série de tubes tests contient ainsi des concentrations de l'extrait allant de 150 à 0,292 mg/mL avec une liaison géométrique de raison $\frac{1}{2}$. Tous les 12 tubes sont stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes et ensuite inclinés avec petit culot à la température de la salle pour permettre leur refroidissement et la solidification de la gélose [15-17].

II-4. Essai antimicrobien

La culture des germes sur les milieux précédemment préparés a été faite par l'ensemencement de 1000 cellules de chaque souche. Les cultures ainsi réalisées ont été incubées à 30°C pendant 48 H pour *C. albicans*, *C. neoformans*, *A. flavus*, *A. fumigatus* et 5 à 10 jours pour *T. mentagrophytes* et *T. rubrum*. Les colonies ont été dénombrées par comptage directe grâce à un compteur de colonies de type Geiger et la croissance dans les 10 tubes expérimentaux a été évaluée en pourcentage de survivance, calculé par rapport à 100 % de survivance dans le tube témoin de contrôle de la croissance [15-20].

III - RÉSULTATS

Après 48 H d'incubation à 30 °C pour les levures et les *Aspergillus* et 5 jours pour les dermatophytes (*Trichophyton*), on observe comparativement au témoin une diminution progressive du nombre de colonies au fur et à mesure que les concentrations de l'extrait augmentent dans les tubes expérimentaux. Les données expérimentales traduites sous forme de courbes sont résumés à la *Figure 1*.

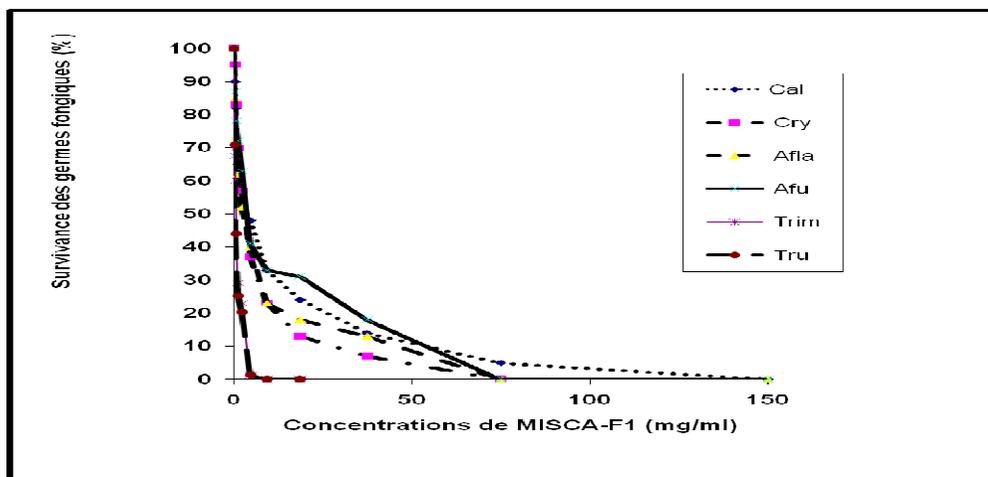


Figure 1 : Sensibilité de *Candida albicans* (Cal), *Cryptococcus neoformans* (Cry), *Aspergillus flavus*(Afla), *Aspergillus fumigatus*(Afu), *Trichophyton mentagrophytes*(Trim), *Trichophyton rubrum*(Tru) à l'extrait MISCA-F₁

De façon générale, toutes les courbes présentent une allure décroissante avec des pentes de valeur variable selon les souches.

La courbe de sensibilité de *Trichophyton rubrum* a une pente relativement forte ; celle de *Cryptococcus neoformans* a une pente faible et celles de *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans* ont des valeurs moyennes.

Les valeurs des paramètres antifongiques de l'extrait pour les six souches; CI₅₀ (concentration pour 50 % d'inhibition) et CMF (concentration minimale fongicide) graphiquement déterminés sont consignées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Valeurs des paramètres antifongiques de l'extrait MISCA-F₁ à 48 Heures et 5 jours d'incubation à 30 °C.

GERMES FONGIQUES	PARAMETRES ANTIFONGIQUES	
	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF mg/mL
<i>Candida albicans</i>	3	150
<i>Cryptococcus neoformans</i>	6	150
<i>Aspergillus flavus</i>	1,50	87,5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3,75	87,5
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1	12,5
<i>Trichophyton rubrum</i>	0,5	12,5

L'extrait MISCA F₁ inhibe ces germes selon une relation dose-réponse. A 72 heures d'incubation, il possède une action fongicide effective obtenue à :

150 mg/mL pour *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* ;

87,5 mg/mL pour *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus* ;

12,5 mg/mL pour *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton rubrum*.

IV - DISCUSSION

La présente étude a portée sur deux types de champignons à savoir : des champignons levuriformes et des champignons filamenteux. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches testées sont sensibles à MISCA-F₁. En effet les résultats montrent une diminution progressive du nombre de colonies au fur et à mesure que la concentration de l'extrait MISCA-F₁ augmente dans les tubes expérimentaux, comparativement aux témoins. Il y a donc inhibition des deux formes de champignons par l'extrait MISCA-F₁.

Par ailleurs ; dans toutes nos séries expérimentales, des inhibitions nettes et effectives de la croissance des six (6) souches de champignons ont été observées à diverses valeurs de concentrations de l'extrait MISCA-F₁ (**Tableau 1**).

En outre, les antifongigrammes sont tous décroissants et cela illustrent bien que l'extrait MISCA-F₁ est actif selon une relation dose-réponse. Ils ont permis de déterminer les concentrations inhibitrices pour 50 % de survivance des germes (CI₅₀) (**Tableau 1**).

L'analyse des résultats, sur la base des valeurs des paramètres antifongiques montre que *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton mentagrophytes* sont les souches les plus sensibles car les valeurs de CMF= 12,5 mg/mL sont les plus faibles, singulièrement *Trichophyton rubrum* avec une valeur de CI₅₀= 0.5 mg/mL est la plus sensible; alors que *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* sont les souches les moins sensibles (les valeurs CMF= 150 mg/mL sont les plus élevés), notamment *Cryptococcus neoformans* avec de CI₅₀= 6 mg/mL est la moins sensible.

Quant à *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*, elles présentent une sensibilité intermédiaire comparée aux quatre (4) souches précitées (valeurs de CMF = 87,5mg/mL). Les levures seraient donc moins sensibles à l'extrait de MISCA-F₁ que les moisissures.

Ces résultats confirment ceux obtenus par M. A. Kra [11], Moubié et al. [7] ; et de J. ACKA [12] sur la nature de la sensibilité des germes étudiés à tout extrait de MISCA. Toutefois, la fraction F₁ est moins active que les fractions

F₂ et F₃ extraites avec un solvant hydro alcoolique comportant plus de 20 % d'éthanol et testés respectivement par S. Ouattara [18] et J. Aka [7].

De l'analyse de tous ces résultats, il ressort que l'éthanol est un solvant qui permet de mieux extraire les principes actifs antifongiques de MISCA.

V- CONCLUSION

En définitive, cette étude nous a permis de montrer que l'extrait de MISCA F₁ a une activité antifongique plus ou moins accentuée sur la croissance *in vitro* des deux types de champignons testés : levures (*Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*), moisissures (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton rubrum*). Il inhibe en effet la croissance de ces germes selon une relation dose-réponse et possède une action fongicide effective. Cette action fongicide est plus accentuée sur *Trichophyton rubrum*. *Cryptococcus neoformans* est le moins sensible à L'extrait MISCA-F₁.

De plus, nous retiendrons que la méthode d'extraction par l'éthanol est une voie permettant de mieux concentrer les principes actifs de MISCA. En outre, les valeurs des paramètres antifongiques obtenues sont relativement élevées ; mais elles restent intéressantes car cet extrait n'est pas purifié. Enfin, nous pouvons dire que l'utilisation en médecine traditionnelle de MISCA contre les infections fongiques est justifiée.

Des études ultérieures par tri phytochimique de la fraction F₁ suivies de chromatographie sur colonne et sur couche mince permettraient d'isoler la molécule active et d'améliorer l'activité de MISCA-F₁.

RÉFÉRENCES

- [1] - G. MIDGLEY, H. J. RODERICK, Y. M. CLAYTON, Atlas de poche de mycologie. Med. Flam. (1998)1-93.
- [2] - F. DROMER AND B. DUPONT "The increasing problem of fungal infections in the immunocompromised host". *J. Mycol. Med.*, 6 suppl. 1 (1996) 1-6.
- [3] - G. MAYNART, S. MBOUP, A. SAMB, B. N'DIAYE, C. J. POUSSET, M. A. YAMEOGO, « Plantes médicinales africaines IX. Contribution à l'étude d'une plante spontanée *Mitracarpus scaber* Zucc. (Rubiaceae) ». *Med. Afr. Noire*, Vol. 29, N°27 (1982) 519-521.
- [4] - M. VANGAH-MANDA, D. HAROUNA, F. GUEDE-GUINA, « Ciblage de l'action antifongique de MISCA, un concentré de source

- végétale contre *Cryptococcus neoformans* ». Premier congrès de la pathologie infectieuse tropicale. Abidjan, 17-18 Mars. *Afr. Biomédicale*, 1 (1) (1993) 16-19.
- [5] - F. M. G. BONGA, M. VANGAH-MANDA., C. DE SOUZA et F. GUEDE-GUINA, « Mise en évidence des phytostéroïdes antifongiques contre *Cryptococcus neoformans* ». *Revue Med. et pharm. Afr.*, 9 (1) (1995) 21-30.
- [6] - F. M. G. BONGA, M. A. K. KRA et F. GUEDE-GUINA, « Identification chimique et pharmacologique des phytostéroïdes anticryptococcique de MISCA, un antifongique de source naturelle ». *JBNA-1 Abj.* (1998), 30 Nov-04 Déc.
- [7] - P. D. MOBIE, M. A. K. KRA, F. GUEDE-GUINA, « Action antifongique de l'huile de MISCA sur *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton mentagrophytes* ». *Afr. Biomédicale* 1 (1998), Abidjan, 30 Nov. - 04 Déc.
- [8] - F. GUÉDÉ-GUINA, M. VANGAH-MANDA, D. HAROUNA et C. BAH, "Potencies of MISCA, a plant source concentrate against fungi". *Mycol. Med.*, 5 (4) (1993) 225-229.
- [9] - F. GUEDE-GUINA, M. A. K. KRA, M. VANGAH-MANDA et F. M. G. BONGA, Inhibition par MISCA-F₁ de la croissance de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* opportunistes du SIDA. *Afr. Biomédicale*, 2 (1) (1997) 11-16.
- [10] - M. A. K. KRA, "Evaluation des effets d'un nouvel anti-aspergillaire de source naturelle". DEA de Biotechnologie, option Pharmacologie - Microbiologie, Université de Cocody, Abidjan 30 pages(1997)
- [11] - M. A. K. KRA, « Evaluations et améliorations par séquençage chromatographique d'une action antifongique de MISCA contre *Aspergillus fumigatus* ». Thèse. Bioch. UFR Biosciences. Univ. Abidjan. (2001) 126 pages
- [12] - J. ACKA, « Spectre anti-infectieux de MISCA F₃ sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* ». DEA de Biotechnologie, option Pharmacologie des substances naturelles, Université de Cocody Abidjan (2004) 35 pages.
- [13] - J. E. ADJANOHO, « Les plantes africaines à propriétés thérapeutiques largement confirmées par l'ethnomédecine ». In communication scientifiques présentées au 3^{ème} symposium interafricain OUA/CSRT sur la pharmacopée traditionnelle et les plantes médicinales africaines, Abidjan, 25-29 Sept. 79. Côte d'Ivoire (1979) 89-91.

- [14] - B. DUPONT, L. IMPROVISI, F. DROMER, « Facteurs d'échec clinique du traitement des candidoses oropharyngées au cours du SIDA ». *La lettre de l' infectiologie*. Institut Pasteur – Paris (1997) 23-30
- [15] - L. AJELLO, K. L. GEORG, W. KAPLAN and L. KAUFMAN, Laboratory manual for medical mycology. 2nd ed. John Wiley and sons, Inc. New York (1963) 20-35
- [16] - J. R. HOLT, "Laboratory test of antifungal drugs"; *J. clin. Path.*, (18) (1975) 767-774
- [17] - N. G. ZIRIHI; M. A. K. KRA ET F. GUEDE-GUINA, « Evaluation de l'activité Antifongique de *Microglossa pyrifolia* (LAMARCK) O. KUNTZE (ASTERACEAE) « PYMI » sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans* ». *Revue de Méd. et Pharm. Afr.* 17 (2003) 11 – 18
- [18] - S. OUATTARA, « Spectre anti-infectieux de MISCA F₂ sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* ». DEA de Biotechnologie, option Pharmacologie des substances naturelles, Université de Cocody Abidjan (2004) 35 pages.
- [19] - N. G. ZIRIHI; M. A. K. KRA ET E. T. DIBIE, « Etude botanique et évaluation des activités des activités antifongiques de *Mitracarpus villosus* (MV) (Rubiaceae) et *Spermacoceae verticillata* (SV) (Rubiaceae) sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus* ». *Revue Med Pharm Afr*, Vol. 20 (2007) 9-17
- [20] - E. K. KPOROU, M. A. K. KRA, S. OUATTARA ET F. GUEDE-GUINA « Evaluation de la sensibilité de *Candida albicans* aux extraits de *Mitracarpus scaber* une Rubiaceae codifiée MISCA », *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 78 (2009) 12-23.