

**EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS
DE *TERMINALIA IVORENSIS* (TEKAM 2) SUR LA CROISSANCE *IN
VITRO* DE *CANDIDA ALBICANS***

**Sitapha OUATTARA^{*}, K. A. Mathieu KRA, Kouassi Elysée KPOROU
et Frédéric GUEDE-GUINA**

*Laboratoire de pharmacodynamie biochimique, UFR Biosciences,
Université de Cocody-Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22 (Côte d'Ivoire).*

(Reçu le 14 Mars 2008, accepté le 28 Septembre 2008)

* Correspondance et tirés à part, e-mail: *ositapha73@yahoo.fr*

RÉSUMÉ

Dans un souci général d'aider à trouver des remèdes contre les infections cutanées et de faire reculer les maladies qui apparaissent suite à la défaillance du système immunitaire (maladies opportunistes), nous avons testé l'efficacité de 10 extraits de *Terminalia ivorensis* (TEKAM 2) une combrétacée, sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. Les extraits ont été incorporés à la gélose sabouraud selon la méthode de la double dilution en tubes penchés. 1000 cellules de *Candida albicans* ont étéensemencées sur ces milieux.

Après incubation des tubes à 30°C pendant 48 heures, les résultats des tests antifongiques montrent que parmi les dix extraits testés, le résidu non hexanosoluble X₄₂ (CMF = 10µg/mL ; CI₅₀ = 2,64µg/mL) est le plus actif. Par contre l'extrait total aqueux X_{aq} (CMF = 390µg/mL ; CI₅₀ = 5,76µg/mL) est le moins actif. L'utilisation d'un solvant comportant 70 % d'éthanol et 30 % d'eau suivie d'une délipidation à l'hexane est la combinaison de solvant qui permet de mieux concentrer les principes actifs de TEKAM 2.

Mots-clés : *Combrétacée, extrait végétal, anticandidosique, TEKAM 2, double dilution, champignons opportunistes.*

ABSTRACT

Evaluation of antifungal activity of *terminalia ivorensis* (TEKAM 2) extracts on the *in vitro* growth of *candida albicans*

In the general worry to find remedies against cutaneous infections and to get under control the diseases which appear after immune faintness (opportunistic diseases), we tested the efficiency of 10 extracts of *Terminalia ivorensis* (TEKAM 2), a combretaceae on the *in vitro* growth of *Candida albicans*. The extracts were incorporated into Sabouraud gelose medium according to the Agar slant method. 1000 cells of *Candida albicans* have been sed on these cultures media.

After incubation of the tubes at 30°C for 48 hours, the results of the antifungal tests show that the nonhexanosoluble extract X₄₂ (FMC = 10µg/mL; CI₅₀ = 2,64µg/mL) is more active among the ten tested extract. On the other hand, aqueous extract X_{aq} (FMC = 390µg/mL; CI₅₀ = 5, 76µg/mL) is less active. The solvent with 70 % ethanol and 30 % water followed by a delipidation with hexan is the combined solvent which permits a better concentration of the active principle of TEKAM 2.

Keywords : *Combretaceae, plant extract, anticandidosic, TEKAM 2, dilution double, toadstool opportunistic.*

I - INTRODUCTION

La santé est un élément primordial pour l'homme. Pour maintenir cette santé, il a toujours recours à des médicaments. Cependant ces dernières années, le coût de plus en plus élevé des médicaments modernes surtout les antibiotiques fait que nos populations ont recours aux plantes de la pharmacopée pour soigner leurs maux. Mais cela pourrait les exposer à divers accidents de santé. Pour les aider à tirer un réel profit de l'utilisation des plantes de la pharmacopée, notre équipe de recherche a initié depuis plus d'une décennie plusieurs travaux pour établir les bases scientifiques de l'action des plantes à vertus médicinales.

Des travaux ont déjà fait l'objet de l'évaluation du pouvoir antimicrobien de certaines plantes médicinales [1-3]. Dans la même veine après des enquêtes ethnobotaniques auprès des vendeuses des plantes médicinales et des tradithérapeutes, plusieurs plantes ont été sélectionnées dans le but de tester leur effet anti-infectieux.

Dans la présente étude, nous livrons les résultats des tests d'évaluation de l'activité anticandidosique de divers extraits aqueux et alcooliques de *Terminalia ivorensis*, une combrétacée (codifiée TEKAM 2) répertoriée durant nos enquêtes ethnobotaniques et qui est beaucoup utilisée dans la pharmacopée ivoirienne pour soigner plusieurs maladies.

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

II-1. Matériel

II-1-1. Matériel végétal

Le matériel végétal est une poudre végétale obtenue à partir des écorces de *Terminalia ivorensis* (TEKAM 2). Ces écorces ont été récoltées sur le campus de l'Université d'Abobo-Adjamé (Abidjan ; Côte d'Ivoire).

II-1-2. Germes testés

Nous avons travaillé sur une souche de *Candida albicans* (un champignon opportuniste, levuriforme responsable des candidoses des voies génitales, oropharyngées, des mycoses cutanées) qui nous a été fournie par le service de mycologie de l'UFR des Sciences Médicales de l'Université de Cocody (Abidjan). Cette souche a été isolée sur des malades du SIDA du service des maladies infectieuses du CHU de Treichville.

II-1-3. Milieu de culture

Nous avons utilisé de la gélose Sabouraud (Bio-RAD/Réf : 64449 ; Lot : 7A2211). C'est un milieu couramment utilisé pour l'étude de la croissance des champignons.

II-2. Méthodes

II-2-1. Préparation des extraits végétaux

Les écorces de tronc de TEKAM 2 ont été récoltées, découpées en petits morceaux et séchées à l'abri du soleil pendant 7 jours. Après séchage, les écorces ont été broyées et réduites en poudre fine grâce à un broyeur électrique de type IKA-MAG.

Cent (100) grammes de cette poudre ont été extraits dans un litre d'eau distillée par broyage au blender. L'homogénat obtenu est essoré dans un carré

de tissu et filtré successivement deux fois sur coton hydrophile et une fois sur papier whatman 3mm. Le filtrat est concentré dans un évaporateur rotatif de type Büchi à 60°C. La poudre marron foncée obtenue constitue l'extrait total aqueux (X_{aq}). L'extrait éthanolique a été préparé selon le même procédé en utilisant un mélange de solvant comportant 70 % d'éthanol et 30 % d'eau. Cela a donné l'extrait X₀. A partir de l'extrait X₀, nous avons constitué trois portions de 10g qui ont été soumises séparément à partition dans différents mélanges de solvants comportant 300 mL de solvant (50 % Hexane / 50 % Eau), 300 mL de solvant (50 % Acétate d'éthyle / 50 % Eau), 300 mL de solvant (50 % Butanol / 50 % Eau).

Après décantation et concentration des différentes phases. Nous avons obtenu les extraits suivants :

- X₁₁ (phase Hexanique)
- X₁₂ (phase aqueuse de la partition Hexane / Eau)
- X₂₁ (phase acétatique)
- X₂₂ (phase aqueuse de la partition Acétate d'éthyle / Eau)
- X₃₁ (phase butanolique)
- X₃₂ (phase aqueuse de la partition Butanol / Eau)

Par ailleurs en plus de ces trois partitions, une portion de 10g de X₀ a subi une délipidation directe et très poussée au soxhlet avec l'hexane comme solvant. Cette opération a permis d'obtenir une huile végétale codifiée X₄₁ et un résidu non hexanosoluble X₄₂ [3]. Tous ces extraits ont été testés séparément sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*.

II-2-2. Préparation des milieux de culture

L'incorporation des différents extraits à la gélose Sabouraud a été faite selon la méthode de la double dilution en tubes penchés. La série comporte pour chaque extrait 11 tubes à essai dont 9 tubes tests contenant l'extrait végétal et 2 tubes sans extraits végétaux (dont un sert de témoin de contrôle de croissance des germes et l'autre servant de témoin de contrôle de stérilité du milieu). Les concentrations des 9 tubes varient de 1560µg/mL à 5µg/mL selon une liaison géométrique de raison ½.

Les 11 tubes de chaque série ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15mn et ensuite inclinés avec petit culot à la température de la salle pour permettre leur refroidissement et la solidification de la gélose [1,2,7-12].

II-2-3. Essai antimicrobien

L'inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de *Candida albicans* âgée de 48 heures et mis en croissance sur gélose en pente à 30°C. Les germes ont été prélevés à l'aide d'une anse de KOCH puis homogénéisés dans 10 mL d'eau distillée. Nous obtenons ainsi une suspension 10^0 de germes à partir de laquelle est préparée la suspension 10^{-1} , par dilution au $1/10^{\text{ème}}$. La suspension 10^{-1} est celle utilisée pour l'ensemencement en stries transversales de 10µL de la suspension 10^{-1} correspondant à 1000 cellules ensemencées sur les milieux précédemment préparés [1,3]. La suspension 10^0 est concentrée à 10^6 cellules par mL et 10^5 cellules par ml pour la suspension 10^{-1} .

Les cultures ont été ensuite incubées à 30°C pendant 48 heures. Après cette incubation, les colonies de *Candida albicans* ont été dénombrées grâce à un compteur de colonies. La croissance dans les 9 tubes expérimentaux de chaque série a été évaluée en pourcentage de survivance, calculé par rapport à 100 % de survivance dans le tube témoin de contrôle de croissance [4-6,12].

III - RESULTATS

Après 48 heures d'incubation à 30°C, nous observons comparativement au témoin de contrôle de croissance des germes, une diminution progressive du nombre de colonies dans les différentes séries au fur et à mesure que la concentration des extraits augmente dans les tubes expérimentaux. Les données expérimentales traduites sous forme de courbes sont résumées par la **Figure 1**.

Les paramètres antifongiques des différents extraits CI_{50} (Concentration pour 50 % d'inhibition) et CMF (Concentration minimale fongicide qui donne 99,99 % d'inhibition comparativement au tube témoin de contrôle de croissance) sont consignés dans le **Tableau 1**.

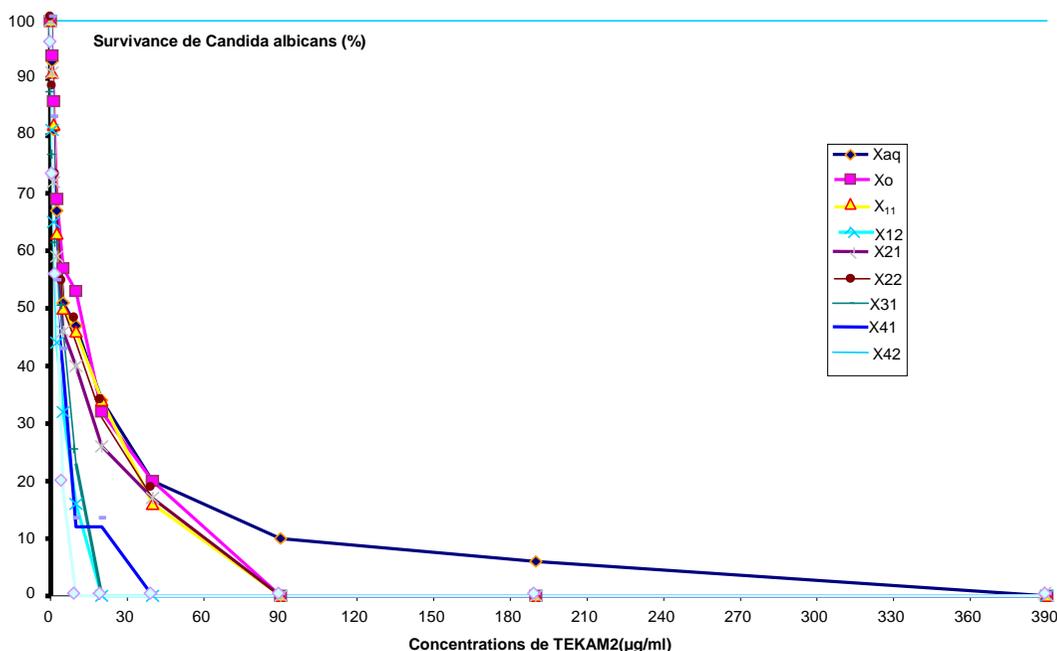


Figure 1 : Sensibilité de *Candida albicans* aux extraits de TEKAM 2 (X_{aq} , X_0 , X_{11} , X_{12} , X_{21} , X_{22} , X_{31} , X_{32} , X_{41} , X_{42})

Tableau 1 : Valeurs des paramètres antifongiques des dix extraits de TEKAM 2 (X_{aq} , X_0 , X_{11} , X_{12} , X_{21} , X_{22} , X_{31} , X_{32} , X_{41} , X_{42}) à 48 heures d'incubation et à 30°C.

EXTRAITS DE TEKAM 2	Paramètres antifongiques	
	CI ₅₀ (µg/mL)	CMF (µg/mL)
Extrait total aqueux (X_{aq})	5,76	390
Extrait éthanolique 70 % (X_0)	11,40	90
Phase hexanique (X_{11})	5,04	90
Phase aqueuse de la partition Hexane/Eau (X_{12})	2,16	20
Phase acétatique (X_{21})	4,20	90
Phase aqueuse de la partition Acétate d'éthyle/Eau (X_{22})	5,04	90
Phase butanolique (X_{31})	3,84	20
Phase aqueuse de la partition Butanol / Eau (X_{32})	2,50	40
Phase hexanosoluble (X_{41})	Pas d'inhibition, pas de CI ₅₀ ni CMF.	
Résidu non hexanosoluble (X_{42})	2,64	10

IV - DISCUSSION

L'analyse des résultats montre que hormis La phase hexanosoluble X_{41} , la souche testée est sensible à tous les extraits selon une relation dose-reponse. *Candida albicans* est sensible aux extraits testés (CMF X_{aq} = 390 μ g/mL, CMF X_0 = 90 μ g/mL, CMF X_{11} = 90 μ g/mL, CMF X_{12} = 20 μ g/mL, CMF X_{21} =90 μ g/mL, CMF X_{22} = 90 μ g/mL, CMF X_{31} = 20 μ g/mL, CMF X_{32} = 40 μ g/mL et CMF X_{42} = 90 μ g/mL) En effet les résultats montrent qu'il y a diminution progressive du nombre de colonies au fur et à mesure que les concentrations de l'extrait augmentent dans les tubes à essai. Les performances de TEKAM 2 varient en fonction du solvant utilisé. Les valeurs de concentrations inhibitrices obtenues attestent que les extraits ont des activités antifongiques plus ou moins accentuées.

Les données expérimentales ont permis de tracer les courbes de sensibilité (*Figure 1*).

Les valeurs des paramètres antifongiques CMF et CI_{50} sont consignées dans le *Tableau 1*.

Notons que pour X_{41} , la courbe de sensibilité présente une allure linéaire et elle est parallèle à l'axe des abscisses. Nous n'avons pas donc noté de valeur de CMF ni de CI_{50} dans l'intervalle des concentrations choisies dans cette étude.

Pour tous les autres extraits la courbe de sensibilité présente une allure régulièrement décroissante illustrant la sensibilité dose dépendante de la souche testée. La comparaison des extraits sur la base des valeurs des CMF montre que pour les extraits totaux, X_0 (CMF = 90 μ g/mL, CI_{50} = 11,40 μ g/mL) est plus actif que X_{aq} (CMF = 390 μ g/mL, CI_{50} = 5,76 μ g/mL) étant donné que la valeur de la CMF de X_0 est inférieure à celle de X_{aq} .

Parmi les extraits issus des trois partitions, les résultats révèlent que X_{12} (CMF = 20 μ g/mL, CI_{50} = 2,16 μ g/mL) issu de la partition Hexane/Eau est le plus actif car ses valeurs des paramètres sont les plus faibles. De plus la pente de sa courbe de sensibilité est la plus forte et se rapproche plus de l'axe des ordonnées.

Sur l'ensemble de tous les extraits testés, le résidu nonhexanosoluble X_{42} est plus actif car la pente de sa courbe de sensibilité est la plus forte parmi les dix courbes de sensibilité et se rapproche plus de l'axe des données. X_{aq} est le moins actif car la pente de sa courbe de sensibilité est la plus faible parmi les dix courbes de sensibilité et s'éloigne plus de l'axe des données. Les autres extraits (X_0 , X_{11} , X_{12} , X_{21} , X_{22} X_{31} X_{32}) ont une sensibilité intermédiaire à X_{aq} et à X_{42} .

Le rapport d'activité sur la base des CMF montre que X₄₂ est 2 fois plus actif que X₁₂, X₃₁ ; 4 fois plus actif que X₃₂ ; 9 fois plus actif que X₀, X₁₁, X₂₁, X₂₂ et 39 fois plus actif que X_{aq}.

L'action antifongique des extraits pourrait donc être améliorée en procédant à des partitions. La méthode d'extraction combinant l'usage d'un solvant comportant 70 % d'éthanol et 30 % d'eau suivie d'une délipidation directe à l'hexane serait celle qui concentre mieux les composés actifs de TEKAM 2.

En effet l'inhibition de la croissance fongique dans ce cas est plus importante, comparé aux résultats trouvés par d'autres auteurs tels que ceux de *Ackah*, [15] qui a testé l'extrait 96 % alcoolique de MISCA-F3 sur la même souche (CMF = $5.10^4 \mu\text{g/ml}$), également *Ouattara*, [16] qui a testé l'extrait 70 % alcoolique de MISCA-F2 sur *Candida albicans* (CMF = $10.10^4 \mu\text{g/ml}$), ainsi que *Kporou*, [17] qui a testé l'extrait 80 % alcoolique de MISCA-F1 sur *Candida albicans* (CMF = $15.10^4 \mu\text{g/ml}$), et *Coulibaly*, (18) qui a testé l'extrait 70 % alcoolique de TEKAM 2 sur *Candida albicans* (CMF = $195 \mu\text{g/ml}$). L'utilisation de cette plante en milieu traditionnel est donc justifiée.

V - CONCLUSION

Cette étude a révélé que tous les extraits de TEKAM 2 possèdent une activité antifongique plus ou moins accentuée sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. En effet ils possèdent tous une activité inhibitrice effective, mais plus importante avec l'extrait X₄₂.

Par ailleurs, le solvant ainsi que la méthode d'extraction utilisés dans cette étude permettent de mieux concentrer les principes actifs de TEKAM 2 et donc d'améliorer l'activité antifongique des différents extraits. Une étude plus poussée tri phytochimique suivie de chromatographies, nous permettra d'isoler les molécules actives de TEKAM 2 afin de préciser leur nature et leurs paramètres antifongiques.

L'utilisation de cette plante en milieu traditionnel est donc justifiée.

RÉFÉRENCES

- [1] - A. K. M. KRA, « Evaluations et améliorations par séquençage chromatographique d'une action antifongique de MISCA contre *Aspergillus fumigatus* ». Thèse. Pharm, Bioch. UFR Biosciences. Univ. Abidjan. (2001) 126 pages.
- [2] - F. GUEDE-GUINA, A. K. M.KRA, P. D. MOBIE, M .VANGAH-MANDA et G. M. BONGA, « Inhibition par MISCA-F2 de la croissance de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* 3 germes opportunistes du SIDA ». *J. Afrique Biomed.*, 2(1) (1997) 11-16.
- [3] - G. N. ZIRIHI, M. K. A .KRA, 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.
- [4] - P. LECLERC, C. ARTIGOU, S. GAGNEBIEN, O. DEFENOYL, J. ROCHEMAURE, « Aspergilloses Broncho-pulmonaires », *Revue générale poumon-cœur*, MassonParis, 5(1982)25-33.
- [5] - B. DUPONT, « Mycoses et SIDA, Résumé des rapports, communications affichées Institut Pasteur-Paris, 16 (1987) 4-9.
- [6] - S. CRMBERG, J. BEYLOUT, M. RAY, *Maladies infectieuses*. Ed. Masson, (1988) 232-625.
- [7] - L. AJELLO, L. K., GEORG, W. KAPLAN and L. KAUFMAN, *Laboratory manual for medical mycology*. 2nd. Ed. JOHN WILEY. and sons, inc. New-York. (1963) 20-35.
- [8] - J. R. HOLT, “Laboratory test of antifungal drugs”. *J. Clin. Path.*, (18) (1975) 767-774.
- [9] - F. GUEDE-GUINA, M .VANGAH -MANDA, D. HAROUNA. and C. BAHI, “Potencies of MISCA, a plant source concentrate against Fungi”. *Mycol. Med.*, 5(4), (1993) 225-229.
- [10] - F. GUEDE-GUINA, M. K. A .KRA, M. BONGA et C, DE SOUZA, « Activité antimicrobienne d'un extrait végétal contre les germes opportunistes au cours du SIDA ». *Rev. Med. Pharm. Afr.* 9(1), (1995) 13-19.
- [11] - F. GUEDE-GUINA, M .VANGAH -MANDA, M. G. BONGA et G. DE SOUZA, « Activité antimicrobienne d'un extrait végétal contre les germes opportunistes au cours du SIDA ». *Rev. Med. et Pharm. Afri.* 9(1), (1996) 13-19.
- [12] - F. GUEDE-GUINA, M. K. A .KRA, M .VANGAH -MANDA, et M. G. BONGA, « Inhibition par MISCA-F1 de la croissance de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* 3 germes opportunistes du SIDA ». *Afr. Bio. Med.*, 2(1) (1997) 11-16.

- [13] - M .VANGAH -MANDA, M. G. BONGA, G. DE SOUZA et F. GUEDE-GUINA, « Amélioration de l'activité antifongique de MISCA, un extrait végétal contre *Cryptococcus neoformans* ». *J. Afr. Bio. Med.*, 1(8) (1995)16-19.
- [14] - P. D. MOBIE, « Activité antifongique d'une huile essentielle de MISCA un extrait végétal contre *Trichophyton rubrum* ». Mémoire de DEA, Biotechnologie : Option pharmacologie. FAST. Université Abidjan Cocody. Cote d'Ivoire. (1996) 30pages.
- [15] - J. A. ACKAH, « Spectre anti-infectieux de MISCA-F3 sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* ». DEA de Biotechnologie et Amélioration des Productions Végétales. Option Pharmacologie des Substances Naturelles, Université de cocody, Abidjan, (2004) 35 pages.
- [16] - S. OUATTARA, « Spectre anti-infectieux de MISCA-F2 sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* ». DEA de Biotechnologie et Amélioration des Productions Végétales. Option Pharmacologie des Substances Naturelles, Université de cocody, Abidjan, (2005) 37.
- [17] - K. E. KPOROU, « Spectre anti-infectieux de MISCA-F1 sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* ». DEA de Biotechnologie et Amélioration des Productions Végétales. Option Pharmacologie des Substances Naturelles, Université de cocody, Abidjan, (2005) 39.
- [18] - K. COULIBALY, « Evaluation de l'activité antifongique des extraits d'écorce d'essence commerciales de la catégorie P1 de la forêt classée de Mopri (Sud de la Côte d'Ivoire) ». Mémoire DEA d'Ecologie Tropicale, Univ .Cocody (Abidjan), UFR Biosciences. (2007) 62 pages.