

**ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS DE
TERMINALIA IVORENSIS (TEKAM 2) SUR LA CROISSANCE IN
VITRO DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS*.**

**(EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *TERMINALIA IVORENSIS*
(TEKAM2) EXTRACTS ON THE IN VITRO GROWTH OF *ASPERGILLUS*
FUMIGATUS.)**

OUATTARA Sitapha ^{1,*}, KRA Adou K. M. ¹, KPOROU Kouassi E. ¹ et GUEDE-GUINA F. ¹.

¹Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, UFR Biosciences,

Université de Cocody-Abidjan, 22 BP 582 ABIDJAN 22 (Côte d'Ivoire).

RÉSUMÉ

Parmi les maladies opportunistes, les aspergilloses, mycoses de l'appareil respiratoire essentiellement de l'homme et des animaux, sont causées par des champignons du genre *Aspergillus* [1]. Pour apporter notre contribution à l'éradication de ces mycoses nous avons testé l'efficacité des résidus de *Terminalia ivorensis* A.Chev. (une combrétacée) sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*. Les résidus ont été incorporés à la gélose sabouraud selon la méthode de la double dilution en tubes penchés. Nous avonsensemencé 1000 cellules de *Aspergillus fumigatus* sur ces milieux. Les cultures ont été incubées à 30°C pendant 48 heures. Les résultats des tests antifongiques montrent que parmi les dix résidus testés, le résidu non hexanosoluble X₄₂ (CMF = 40 µg/ml ; CI₅₀ = 4,56 µg/ml) est le plus actif. Par contre le résidu aqueux X_{aq} (CMF = 190 µg/ml ; CI₅₀ = 39,60 µg/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 *Terminalia ivorensis* A.Chev.

Mots clés : combrétacée, résidu végétal, double dilution, champignons opportunistes

* Correspondance et tirés à part, e-mail : ositapha73@yahoo.fr , Cell : 07 46 03 46.

ABSTRACT

Among the opportunistic diseases, aspergillosis, mycosis of the breathing apparatus essentially for man and animals, are provoked by toadstool of *Aspergillus* kind [1]. To bring our contribution (help) for rooting out these mycosis, we tested extract des residue's efficiency of *Terminalia ivorensis* A.Chev.(a combretaceae) on the *in vitro* growth of *Aspergillus fumigatus*. The extracts residue's were incorporated into Sabouraud gelose medium according to the Agar slant method. We sed 1000 cells of *Candida albicans* on these cultures media which were incubated at 30°C for 48 hours. The results of the antifungal tests show that the non hexanosoluble residue X₄₂ (FMC =40 µg/ml ; CI₅₀ = 4, 56 µg/ml) is the most active among the ten tested residues. On the other hand, the aqueous residue X_{aq} (FMC = 190 µg/ml; CI₅₀ = 39,60 µg/ml) is less active. The solvent with 70% ethanol and 30% water followed by a delipidation with hexane is the combined solvent which permits a better concentration of the active principle of *Terminalia ivorensis* A.Chev.

Keywords : combretaceae, plant residue, dilution double, toadstool opportunistic.

I-INTRODUCTION

Des enquêtes ethnobotaniques réalisées dans le sous région ouest-africaine sur la médecine traditionnelle ont révélé que *Terminalia ivorensis* A.Chev une combretacée (**Spécimen examiné** : Forêt d'Adiopodoumé, 17 Mai 1966, Aké Assi 8855) est souvent sollicitée par les guérisseurs traditionnels pour le traitement de nombreuses affections (affections cutanées, toux, diarrhées, diabète, hypertensions, affections bucco-dentaires). En Côte d'Ivoire, *T. ivorensis* A.Chev est utilisée comme cure-dent contre les extinctions de voix. Afin de vérifier les vertus médicinales accordées à cette plante, nous avons initié cette étude dans le but de comparer l'activité antifongique des extraits de *T. ivorensis* A.Chev. La cible biologique choisie est *Aspergillus fumigatus* qui est une espèce filamenteuse de champignon pathogène. Ce champignon est surtout un pathogène opportuniste, très virulent en cas de baisse d'immunité notamment chez le malade VIH positif. Il peut induire des infections cutanées et systémiques notamment broncho- pulmonaires, soit par sa forme végétative soit par le biais de spores dotées de pouvoir infectieux qu'il dissémine dans l'air. *Aspergillus fumigatus* est aussi connu comme étant particulièrement pernicieuse et rebelle aux thérapeutiques non seulement du point de vue chirurgical, mais aussi au plan chimiothérapeutique. Ces raisons justifient le choix de cette souche pour évaluer le pouvoir antifongique des extraits de *T.*

ivorensis A.Chev.

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* A.Chev. 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 *Aspergillus fumigatus* (un champignon opportuniste responsable en grande partie des aspergillomes pulmonaires). Cette souche nous a été fournie par le service de mycologie de l'UFR des Sciences Médicales de l'Université de Cocody (Abidjan).

II-1.3. Milieu de culture

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

II-2. MÉTHODE

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. Après séchage, les éléments ont été broyés et réduits 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 homogénéisation dans un 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 le résidu total aqueux (X_{aq}). Le résidu 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 le résidu X_0 . À partir du résidu X_0 , nous avons constitué trois portions de 10g qui ont été soumises séparément à partition dans différents mélanges de solvants

comprenant 300 ml de solvant (50% Hexane / 50% Eau), 300ml de solvant (50% Acétate d'éthyle / 50% Eau) et 300ml de solvant (50% Butanol / 50% Eau). Après décantation et concentration des différentes phases, nous avons obtenu les extraits suivants :

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

Par ailleurs, en plus de ces trois partitions, une portion de 10 g de X₀ a subi une délipidation directe et très poussée au soxhlet avec de l'hexane comme solvant. Cette opération a permis d'obtenir une huile végétale codifiée X₄₁ et un résidu non hexanosoluble X₄₂ [6]. Tous ces extraits ont été testés séparément sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*.

II-2.2. Préparation des milieux de culture

L'incorporation des différents résidus à la gélose Sabouraud a été faite selon la méthode de la double dilution en tubes penchés. La série comporte pour chaque résidu 11 tubes à essai dont 9 tubes tests contenant le résidu végétal et 2 tubes sans extraits végétaux (dont un sert de témoin de contrôle de croissance des germes et l'autre de témoin de contrôle de stérilité du milieu). Les concentrations des 9 tubes varient de 1560 µg/ml à 5 µg/ml selon une progression géométrique de raison 1/2.

Les 11 tubes de chaque série ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn et ensuite inclinés avec petit culot à la température de la salle pour permettre leur refroidissement et la solidification de la gélose [7-14].

II-2.3. Essai antimicrobien

Les tests antifongiques ont été réalisés par l'ensemencement de 1000 cellules de *Aspergillus fumigatus*, sur les milieux précédemment préparés [15,16]. Les cultures ont été ensuite incubées à 30°C pendant 48 heures. Après cette incubation, les colonies de *Aspergillus fumigatus* 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.

III- RÉSULTATS

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 résidus augmente dans les tubes expérimentaux.

Les données expérimentales traduites sous forme de courbes sont résumées par la Figure 1. Les paramètres antifongiques des différents résidus CI_{50} (Concentration pour 50% d'inhibition) et CMF (Concentration minimale fongicide) sont consignés dans le Tableau I.

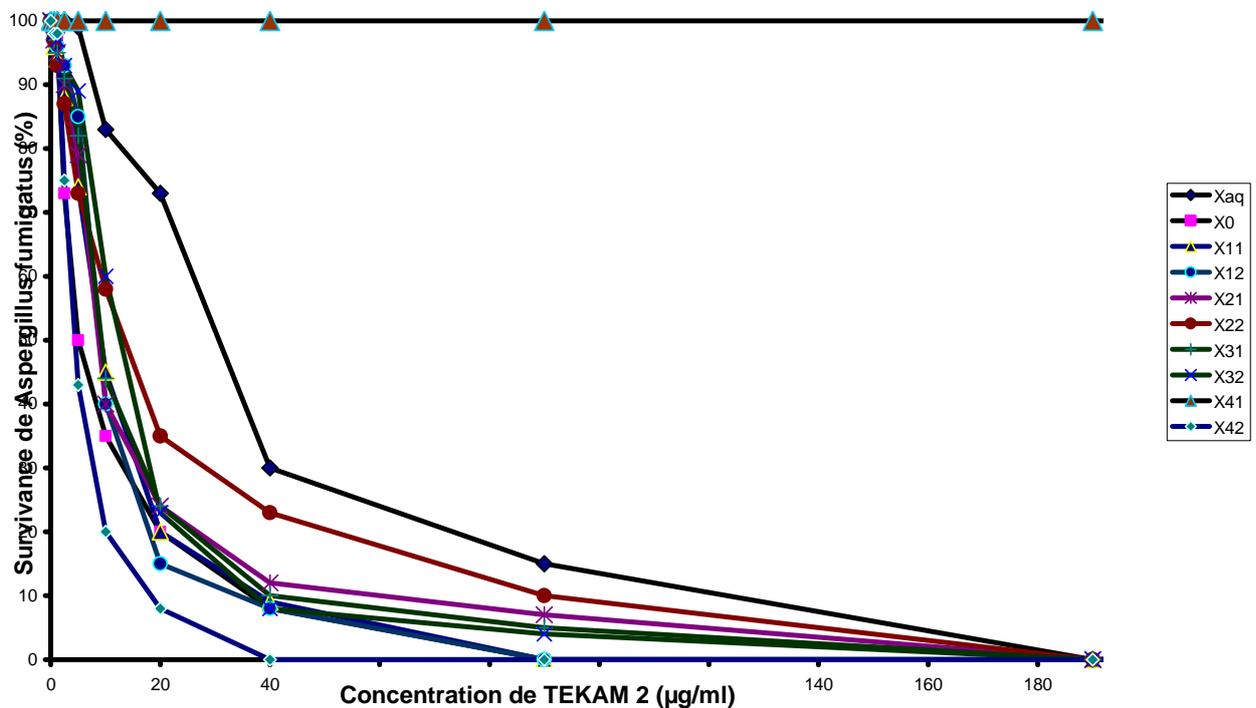


Figure1 : Sensibilité de *Aspergillus fumigatus* aux extraits de *Terminalia ivorensis* A.Chev (Xaq, X0, X11, X12, X21, X22, X31, X32, X41, X42)

Tableau I : Valeurs des paramètres antifongiques des dix extraits de *Terminalia ivorensis* A.Chev (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)
X_{aq}	39,6	190
X_0	5,16	90
X_{11}	9,12	90
X_{12}	3,76	90
X_{21}	8,64	190
X_{22}	13,2	190
X_{31}	9	190
X_{32}	12,48	190
X_{41}	Pas d'inhibition, pas de CI ₅₀ ni de CMF.	
X_{42}	4,56	40

IV-DISCUSSION

L'analyse des résultats montre que hormis la phase hexanosoluble X_{41} , la souche testée est sensible à tous les résidus selon une relation dose-réponse. En effet les résultats montrent qu'il y a une diminution progressive du nombre de colonies au fur et à mesure que les concentrations du résidu augmentent dans les tubes à essai. Le traitement des données expérimentales a permis de tracer les courbes de sensibilité. Les valeurs des paramètres antifongiques CMF et CI₅₀ sont consignées dans le tableau I. 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 CI₅₀ dans la gamme de concentrations choisies. Cela illustre donc que X_{41} n'a pas d'effet antiaspergillaire dans cette gamme de concentrations choisies.

Pour tous les autres résidus la courbe de sensibilité présente une allure régulièrement décroissante illustrant la sensibilité dose-dépendante de la souche testée. La comparaison des performances des extraits sur la base des valeurs de CMF montre que pour les résidus totaux, X_{aq} (CMF = 190 µg/ml, CI₅₀ = 39,6 µg/ml) est moins actif que X_0 (CMF = 90 µg/ml, CI₅₀ = 5,16 µg/ml).

Parmi les résidus issus des trois partitions, les résultats révèlent que X_{12} (CMF = 90µg/ml, CI₅₀= 3,76 µg/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 la courbe de sensibilité est la plus forte.

Sur l'ensemble de tous les résidus testés, le résidu non hexanosoluble X₄₂ est plus actif. La pente de la courbe de sensibilité est la plus forte parmi les dix courbes de sensibilité. Le rapport d'activité sur la base des CMF montre que X₄₂ est 2 fois plus actif que X₀, X₁₁, X₁₂, 4,75 fois plus actif que X₂₁, X₂₂, X₃₁, X₃₂, X_{aq}. Les résultats de ces tests montrent donc qu'il est possible d'améliorer l'activité de X₀ en procédant à des partitions. Nous retiendrons que la méthode d'extraction qui combine l'usage d'un solvant 70% éthanol/30%eau suivi d'une délipidation directe à l'hexane est la bonne combinaison qui permet une meilleure concentration des composés actifs de TEKAM 2. La comparaison de nos résultats avec ceux des travaux précédents montre qu'ils sont meilleurs que ceux de ACKAH, 2004 [17] qui a testé le résidu 96% alcoolique (MISCA-F3) de *Mitracarpus scaber* sur la même souche (CMF = 18750 µg/ml). Ils sont également meilleurs que ceux de OUATTARA, 2005[18] qui a testé le résidu 70% alcoolique (MISCA-F2) de *Mitracarpus scaber* sur *Aspergillus fumigatus* (CMF = 50000 µg/ml). C'est aussi le cas de KPOROU, 2005[19] qui a testé le résidu 80% alcoolique (MISCA-F1) de *Mitracarpus scaber* sur *Aspergillus fumigatus* (CMF = 87500µg/ml). L'utilisation de cette plante comme antimicrobien en milieu traditionnel est donc justifiée.

V-CONCLUSION

Cette étude a révélé que tous les résidus de TEKAM 2 possèdent une activité antifongique plus ou moins accentuée sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*. À 48 heures d'incubation à 30°C, ils possèdent tous une activité inhibitrice effective obtenue à 40 µg/ml pour X₄₂ ; 90 µg/ml pour X₀, X₁₁, X₁₂, 190 µg/ml pour X₂₁, X₂₂, X₃₁, X₃₂, X_{aq}.

Le résidu X₄₂ a donné la meilleure activité antiaspergillaire. Parmi les solvants utilisés, nous retiendrons que la méthode d'extraction qui combine l'usage d'un solvant 70% éthanol/30%eau suivi d'une délipidation directe à l'hexane est la bonne combinaison qui concentre mieux les composés actifs de TEKAM 2.

Par ailleurs, cette étude a montré que notre méthode d'extraction est une voie qui concentre mieux les principes actifs et permet d'améliorer considérablement l'activité du résidu total X₀. Une étude plus poussée par tri phytochimique suivie de chromatographies, nous permettra d'isoler les molécules actives de TEKAM 2 afin de préciser leur nature et leurs paramètres antifongiques.

REFERENCES

- [1] THERIZOL-FERLY M. (1990), Cours de mycologie médicale pour le C.E.S de parasitologie. Fac. de médecine-Abidjan, 120-132.
- [2]. J. ADJANOHOUN et L. ASSI. AKE (1979), Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire. CRES, Univ.C.I. Centre National de Floristique, (1979) 89-91
- [3]. L. ASSI. AKE (1984), Flore de la Côte d'Ivoire, (1984)
Étude descriptive et biogéographique avec quelques notes ethnobotaniques. Thèse Fac. Sc. Univ. Abidjan, 3 tomes, 6 volumes, (1984) 1206 pages
- [4]. G.N. ZIRIHI (1991), Contribution au recensement, à l'identification et à la connaissance de plusieurs espèces végétales en médecine traditionnelle chez les Bétés du département d'Issia. Thèse de doctorat de 3^{ème} Cycle, FAST. Université Cocody Abidjan. Cote d'Ivoire. (1991) 235p
- [5]. G. J. LOROUGNON, Médecine traditionnelle Africaine; Tome II: Plantes et pharmacopée chez les Bétés de la région de Daloa (Côte d'Ivoire) Communication personnelle (1995)
- [6]. G.N. ZIRIHI, M. K. A .KRA, F. GUEDE-GUINA, Évaluation 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
- [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. BAH, 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, P.D. MOBIE, M .VANGAH -MANDA et M. G. BONGA,
Inhibition par MISCA-F2 de la croissance de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* 3 germes opportunistes du SIDA. JBNA-1, Abidjan, 30 nov-04déc 1998. (1997)
- [13]. 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
- [14]. M. K. A .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
- [15]. 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
- [16]. 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) 30p
- [17]. J. 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
- [18]. 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 pages
- [19]. E. K. 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 pages.