ACTIVITE ANTIFONGIQUE ET SCREENING PHYTOCHIMIQUE DE THOS (EXTRAIT AQUEUX DE *THONNINGIA SANGUINEA)*

A. V. Kouakou[1,2], J. D. N'guessan [1]*, A. K. M. Kra[1], F. Guédé-Guina[1]

[1]Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, UFR Biosciences, Université de Cocody-Abidjan 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire ; nguess100jd@yahoo.fr
[2]Laboratoire Central Vétérinaire de Bingerville, BP 206 Bingerville Côte d'Ivoire

(Reçu le 06/12/2004 – Accepté après révision 07/04/2005)

Summary: To fight against mycosis which cause enormous damage to human and animals, our team tested total extract of *Thonningia sanguinea* (THOS) on the growth *in vitro* of three germs namely *Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus and Candida albicans*. The results of this study show that *Candida albicans* is the most sensitive stream with a FMC = 1,56 mg/ml often came others both streams with a common FCM of 12,5 mg/ml. THOS has an inhibitrice activity on three germs. The phytochemical screening shows that THOS contains saponins, quinons and polyphenols which could be responsible of it's antifungal activity.

Keywords : *Thonningia sanguinea*, antifungal activity, phytochemical screening, FMC

Résumé : Les mycoses sont à l'origine de nombreux dommages au niveau de la santé des animaux et des hommes. Dans le but d'apporter sa contribution dans la lutte contre ces pathologies, notre équipe de recherche a testé l'extrait total de *Thonningia sanguinea* (THOS) sur la croissance *in vitro* de trois germes à savoir *Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus* et *Candida albicans*. Les résultats montrent que *Candida albicans* est la souche la plus sensible (CMF = 1,56 mg/ml) ensuite viennent les deux autres souches (CMF = 12,5 mg/ml). THOS a une activité inhibitrice sur ces trois germes. Le tri phitochimique de THOS a permis de mettre en évidence la présence de saponines, de quinones et de polyphénols qui pourraient être responsables de son activité antifongique.

Mots clés : *Thonningia sanguinea*, activité antifongique, tri phytochimique, CMF

I-INTRODUCTION

Ces dernières années, nous assistons à une forte recrudescence des mycoses. Parmi ces mycoses, les aspergilloses et les candidoses constituent des infections fréquentes et graves chez les immunodéprimés [1,2]. Par ailleurs, les aspergilloses sont à l'origine d'importantes pertes au niveau économique lorsqu'elles surviennent chez les poussins. Ches les pondeuses, leur survenue dans l'élevage entraîne une baisse de la ponte [3]. Les travaux de plusieurs auteurs ont montré que la forte progression de ces infections est liée à certains facteurs à savoir :

- l'émergence de nouvelles espèces pathologiques suite à diverses mutations
- l'apparition de résistance aux antifongiques usuels [1,4].

Devant cette situation, notre approche est d'explorer la pharmacopée africaine en vue de d'isoler de nouvelles molécules efficaces et à moindre coût, pouvant aider dans les traitements des mycoses.

Des travaux antérieurs ont montré que l'extrait aqueux de *Thonningia sanguinea* que nous avons codifié THOS, a un effet inhibiteur sur la croissance de *Salmonella.enteritidis* [5] ; *Salmonella typhi ; Shigella sonnei,*

Escherichia coli ; Cryptococcus neoformans et Staphylococcus aureus [6,7,8].

Cette étude vise à évaluer la sensibilité de 3 germes fongiques à savoir *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* et *Candida albicans* à l'extrait total aqueux de THOS. Nous avons également effectué un screening phytochimique de THOS afin de déterminer les différents groupes chimiques présents dans cet extrait.

II- MATERIELS ET METHODES

1-Matériels

Matériel végétal : Nous avons utilisé les inflorescences et les bractées florales d'une plante parasite *Thonningia sanguinea* de la famille des Balanophoracées[9] que nous avons codifié « THOS ».

1-1-Les germes utilisés

Les souches d'*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* et *Candida albicans* sur lesquelles nous avons travaillé nous ont été fournies par le Laboratoire Central Vétérinaire de Bingerville.

1-2-Milieu de culture et Produits chimiques

Gélose de Sabouraud (Biorad), Copeaux de Magnésium (Merck), Alcool isoamylique (Prolabo), Formol (Gifrer Berbezat), Acide Chlorhydrique (PRS), Acétate de Sodium (Prolabo), Ethanol (Merck), Anhydride acétique (Prolabo), Acide Sulfurique concentré (Prolabo), Chlorure Ferrique 2% (Merck), Ether éthylique (Merck), Ether de Pétrole (Quimicen).

2-Méthodes

2-1-Obtention de l'extrait total aqueux de THOS.

Les inflorescences et bractées florales de la plante codifiée « THOS », ont été récoltées, lavées, découpées et séchées à l'abri du soleil. Ces organes végétaux ont été ensuite réduits en poudre fine et traités selon la méthode suivante: 20 grammes de poudre de « THOS » sont homogénéisés dans 2 litres d'eau distillée pendant 48 heures sur un agitateur magnétique à la température ambiante. La décoction obtenue est filtrée successivement sur du coton hydrophile et sur du papier Watmann. Le volume du filtrat est réduit sous vide (à 30°C) à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'évaporat sec est récupéré sous forme de poudre qui constitue l'extrait total aqueux [5].

2-2-Préparation du milieu de culture

La gélose de Sabouraud a été préparée selon les recommandations du fabricant. L'incorporation de l'extrait total aqueux a été faite selon la méthode de la double dilution en tubes penchés.

Nous avons utilisé des séries de 12 tubes à essai dont 10 tubes tests (contenant l'extrait végétal) et 2 tubes témoins (dont un sans extrait végétal sert de témoin de contrôle de croissance des germes ; l'autre sans germe et sans extrait végétal sert de témoin de témoin de contrôle de la stérilité du milieu de culture). Pour les 10 tubes essais, la gamme de concentration va de 100 mg/mL à 0,19 mg/mL (selon une liaison géométrique de raison ½).

Tous les douze tubes de chaque série (une série pour chaque germe) sont stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 min et ensuite inclinés à la température de la salle pour permettre leur refroidissement et la solidification de la gélose [10].

2-3-Essai antimicrobien

La culture des germes sur les milieux précédemment préparés a été faite par l'ensemencement de 1000 cellules équivalent à 10 µL d'une suspension 10^{-1} (de culture de 48 heures d'incubation de *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus*). Après 48 heures d'incubation à 30°C, les

colonies des différents germes dans chaque série ont été comptées et la croissance dans les 10 tubes a été évaluée en pourcentage de survivance, calculée par rapport à 100% de survivance dans le tube témoin de contrôle de la croissance [10,11].

2-4-Méthodes chimiques

L'étude chimique a pour but de détecter la présence des constituants chimiques de l'extrait aqueux de THOS. Les méthodes utilisées pour la détermination de ces constituants chimiques sont celles qui sont classiquement utilisées dans le screening chimique des plantes médicinales [12].

III-RESULTATS

Les figures 1; 2 et 3 présentent les antifongigrammes qui illustrent l'activité de THOS pour 48 heures d'incubation à 30°C. Les courbes présentent deux phases : une phase décroissante et une phase stationnaire qui se confond avec l'axe des abscisses. L'abscisse des points d'intersection de ces courbes avec l'axe des abscisses détermine la Concentration Minimale Fongicide (CMF) qui est respectivement de 1,56 mg/mL pour *Candida albicans* ; 12,5 mg/mL pour *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*. Ces antifongigrammes permettent également de déterminer graphiquement les CI50 qui correspondent aux concentrations de drogues qui inhibent 50% des germes ($CI50_{C.albicans}$ = 0,18 mg/mL ; $CI50_{A.flavus}$ = 0,78 mg/mL; $CI50_{A.fumigatus}$= 0,9 mg/mL)

Les valeurs des paramètres antifongiques sont consignées dans le Tableau I.

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence de saponines caractérisés par une réponse positive au test de mousse ; de substances quinoniques matérialisé par une réponse positive au test de Borntaeger et la présence de composés polyphénoliques mis en évidence par le chlorure ferrique à 2% (Tableau II).

Tableau I : Valeurs des paramètres antifongiques de THOS

	CI_{50} (mg/mL)	**CMF (mg/mL)**
Candida albicans	0,18	1,59
Aspergillus Flavus	0,78	12,5
Aspergillus fumigatus	0,9	12,5

Tableau II : Screening chimique de THOS

Groupes chimiques	**Réactifs d'identification**	**Résultats**
Alcaloïdes	Dragendhorff	-
Saponines	Test de production de mousse	+
Flavonoïdes	Cyanidine	-
Quinones	Borntrager	+
Stéroïdes	Lieberman	-
Polyterpènes	Lieberman	-
Polyphénols	Chlorure ferrique	+
Tanins	Stiasny	-

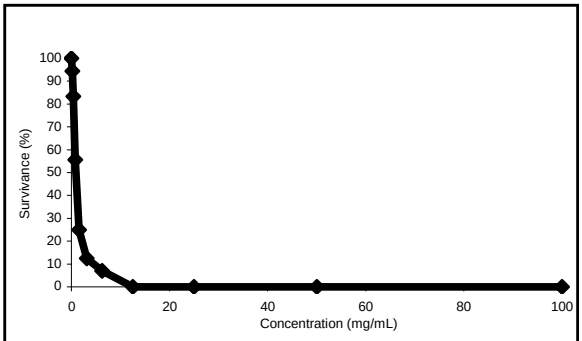

Figure 1: Evolution de la survivance de *Aspergillus fumigatus* en fonction de la concentration de THOS

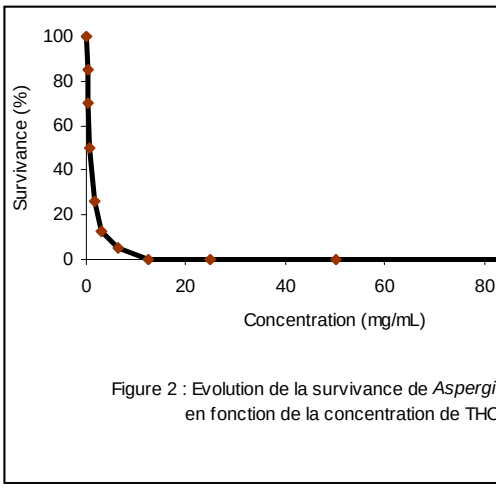

Figure 2 : Evolution de la survivance de *Aspergi* en fonction de la concentration de THC

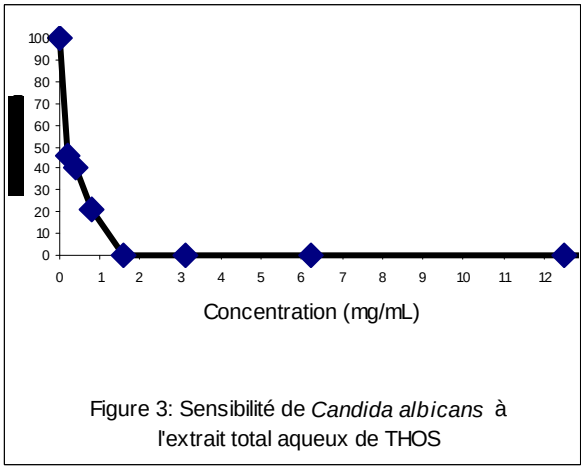

Figure 3: Sensibilité de *Candida albicans* à l'extrait total aqueux de THOS

IV-DISCUSSION ET CONCLUSION

Nos résultats montrent que *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* et *Candida albicans* sont sensibles à l'extrait total de THOS.

Des inhibitions nettes et effectives de *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* ont été observées à 48 heures d'incubation pour les CMF indiqués dans les résultats.

Ces résultats sont en accord avec ceux de divers auteurs qui avaient mis en évidence une action antimicrobienne des extraits obtenus à partir des racines de *Thonningia sanguinea* [13].

Sur la base des CMF et CI50, la comparaison de la sensibilité de ces trois germes à l'extrait aqueux montre que *candida albicans* est le plus sensible et viennent ensuite *Aspergillus fumigatus*, et *Aspergillus flavus*. Cette action antifongique vient élargir le spectre de l'action antimicrobienne de THOS qui avait déjà montré des actions antibactérienne sur *Salmonella enteritidis* [5,14]. *Salmonella typhi* [8], *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* [6] et sur *Cryptococcus neoformans*, un germe fongique [7].

Le screening phytochimique indique la présence de composés polyphénoliques en abondance, de saponines et de flavonoïdes dans les inflorescences de *Thonningia sanguinea*. La présence de polyphénols a également été mise en évidence dans les racines de *Thonningia sanguinea* par NYARKO et ADDY [15]. Cette classe de molécules pourrait être à la base de l'action antifongique observée. En effet, les polyphénols sont reconnus comme des molécules antibactériennes et antifongiques [16]. L'extraction, le fractionnement bio-guidé des principes actifs antimicrobiens permettra sans doute d'aboutir à la purification de nouvelles molécules pour la mise au point de médicament pour la thérapeutique contre les candidoses et les aspergilloses.

BIBLIOGRAPHIE

[1]-Chabasse D., Les nouveaux champignons opportunistes apparus en médecine .Revue générale. J. Mycol. Méd (1994) 4, 9-28.

[2]-Adou-Bryn K. D., Ouhon J., Assoumou A., Kassi E. A. , Koné M. , Therizol- Ferly. . Champignons et parasites isolés à l'examen de 142 liquides d'aspiration bronchique à Abidjan (Côte d'Ivoire). Médecine d' Afrique noire (1999) 46 (7), 362 - 376 .

[3]-Kacou A.C., Adon G.H., Notions sur les principales maladies des volailles en Côte d'Ivoire et leur prophylaxie (1988), 70 p.

[4]-Dromer F ., Dupont B. The inclusing

problem of fungal infections infections in the immunocompromised. J. Mycol. Med (1996) , 6 , 1-6

[5]-M'Baïasbe Y.J., Touré K., Guede-Guina. F. Evaluation d'une action thérapeutique de THOS, un antisalmonellaire naturel, sur les salmonelloses aviaires. Afrique Biomédicale (2002) 7 (3), 32-35

[6]-Vangah-Manda M., Djé M., Guédé-Guina F., De Souza C. Evaluation des effets antimicrobiens et cytotoxiques des extraits aqueux totaux de THOS. Revue de Médecine et Pharmacopées Africaines, (1994), 8(2), 154-157

[7]-Ouattara B. Evaluation de l'activité antifongique de THOS sur *Cryptococcus néoformans*. DEA de Pharmacologie des substances naturelles. Université de Cocody, (2003) 34 p.

[8]-Kazock J.Y. Activité antibactérienne de THOS contre *S.Typhi*.DEA de Pharmacologie des substances naturelles. Université de Cocody , (2001).30 p.

[9]-Adjanohoun E., Aké Assi L. Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire. Université d'Abidjan Centre National, (1979) 358 p

[10]-Zirihi Guédé N., Kra A.K.M., Guédé-Guina F. Evaluation de l'activité antifongique de *Microglosa pyrifolia* (Lamarck) O. Kuntze (Asteraceae) « PYMI » sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. Revue de Médecine et Pharmacopées Africaine (2003) 17, 11-18

[11]-Holt R . J. Laboratory test of antifungal drugs. J. Clin. Path (1975) 18, 767-774.

[12]-Cuilei I. Methodologies for analysis of vegetable drug. Practical manuals on industrial utilization of medicinal and aromatic plants. Bucharest, Ministry of chemical (1982) , 16-27

[13]-OhirI FC., UZODINMA V.CAntimicrobial properties of *Thonningia sanguinea* root extracts Fitoterapia (2000) 71(2), 176-178

[14]-Ouattara K., Djaman A.J., Coulibaly A., N'Guessan J.D. M'Baïasbe Y.J., Guédé Guina F. Activité anti-bactérienne de Thonningia sanguinea (THOS) sur Salmonella enterica serotype Enteritidis lysotype 6, une souche multirésistante. Revue de Médecine et Pharmacopées Africaines (2004) (Soumis)

[15]-Nyarko A.K., Addy M.E. *In vitro* screening for the anti-anaphylactic agent in *Thonningia sanguinea* . J Ethnopharmacol (1994) 41(1-2): 45-51.

[16]-Remsey C., Manach C., Texier O. Interest of polyphénols in preventive nutrition 96. INRA PARIS 1998. Les colloques (1998) 87: 251-256