

ÉVALUATION ET ESSAIS D'OPTIMISATIONS DE L'ACTIVITÉ
ANTICANDIDOSIQUE DE *Terminalia catappa* LINN (TEKAM₃), UN
EXTRAIT DE COMBRETACEAE DE LA PHARMACOPEE IVOIRIENNE.

ACKAH Jacques Auguste Alfred Bognan^{1*}, KRA Adou Koffi Mathieu¹,

ZIRIHI Guédé Noël² et GUEDE-GUINA¹ Frédéric

¹ Laboratoire de pharmacodynamie biochimique, U. F. R. Biosciences, Université de Cocody,
22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

² Laboratoire de Botanique, U. F. R. Biosciences Université de Cocody,
22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

RÉSUMÉ

Malgré les progrès réalisés en médecine au cours des dernières décennies, de nombreux traitements médicamenteux restent insuffisants face aux fléaux tels que le paludisme, le cancer, les infections virales, bactériennes et fongiques.

Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ces fléaux. C'est dans ce but que notre équipe a testé vingt fractions issues de la chromatographie sur gel de filtration sephadex G₂₅ de X_{1.2} issu de la partition hexane-eau de TEKAM₃ une poudre végétale obtenue à partir de *Terminalia catappa* une combretacée sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. Les résultats obtenus montrent que *Candida albicans* est sensible aux vingt fractions de TEKAM₃. Parmi ces vingt fractions testées, F₁₂ possède la plus forte activité inhibitrice (CMF = 5 µg/ml ; CI₅₀ = 1 µg/ml). La méthode de préparation de l'extrait (X_{1.2}) par partitions de l'extrait éthanolique dans une succession de plusieurs solvants suivie de chromatographie sur gel de filtration sephadex G₂₅ est une bonne voie pour arriver à une meilleure concentration des principes actifs. Par ce procédé nous avons obtenu F₁₂ qui est l'extrait le plus actif obtenu à ce jour.

MOTS CLÉS : *Terminalia catappa*, activité anticandidosique, chromatographie.

ABSTRACT

ASSESSMENT AND TESTS OF OPTIMIZATIONS OF THE ANTICANDIDOSIC ACTIVITY OF *TERMINALIA CATAPPA*, AN EXCERPT OF COMBRETACEAE OF THE PHARMACOPEIA OF THE COTE D'IVOIRE.

In spite of achievements in medicine during the last decades, many medicinal treatments remain limited against curses such as: malaria, cancer, viral, bacterial and fungus infections. The elaboration of new therapeutic agents proves to be essential to fight those curses. It is in this goal that our team tested twenty fractions from the chromatography on frost of sephadex G₂₅ of X_{1.2} filtration from hexane-water partition of *Terminalia catappa*, a plant powder got

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

from a combretaceae on the *in vitro* growth of *Candida albicans*. The results show that *Candida albicans* is reactive to the twenty fractions of *Terminalia catappa*. Among these twenty fractions tested, F₁₂ possesses the strongest inhibitory activity (FMC = 5 µg/ml; CI₅₀ = 1 µg/ml). The method of preparation of the extract (X_{1,2}) by partitions of the ethanolic extract in a succession of several solvents followed by chromatography on frost of sephadex G₂₅ filtration is a good way to obtain a better concentration of the active principles. Through that process we got F₁₂ that is the most active extract obtained today.

KEY WORDS: *Terminalia catappa*, anticandidosic activity, chromatography.

1. INTRODUCTION

La lutte que nous menons contre les infections se fonde sur le fait que ces vingt dernières années ont vu une nette recrudescence des pathologies infectieuses, aggravées depuis 1980 par l'avènement des récives et des maladies nouvelles dont les infections à VIH et leur concert d'infections opportunistes [1-22]. Parmi ces infections opportunistes, on compte aussi bien des viroses, des bactérioses que des mycoses. Au niveau des mycoses, les candidoses, les cryptococcoses et les aspergilloses constituent le trio de tête. Elles sont devenues de nos jours, un réel problème de santé public.

Par ailleurs les populations africaines, du fait des contextes économiques difficiles, n'ont pas toutes accès aux produits pharmaceutiques importés. De ce fait elles ont de plus en plus recours aux plantes médicinales pour se soigner.

Pour aider ces populations démunies à tirer un réel avantage de l'usage des plantes médicinales, de leur pharmacopée, notre équipe de recherche a entrepris depuis plus d'une dizaine d'années d'évaluer sur le plan scientifique, l'efficacité des plantes à vertu thérapeutique et d'en isoler les principes actifs. Pour y parvenir, nous avons mené des enquêtes ethnobotaniques qui ont abouti à la sélection de plusieurs plantes auxquelles on prête des vertus anti infectieuses et qui sont très utilisées par les tradithérapeutes. Plusieurs travaux ont déjà été initiés en vue d'évaluer le pouvoir antimicrobien de certaines de ces plantes [17, 23, 24]. Parmi les plantes les plus sollicitées, figure *Terminalia catappa*. C'est une plante pantropicale. Elle est originaire de l'ancien monde (Asie du Sud Est). Cette plante est connue sous les appellations de Cocoma en Côte d'Ivoire, de Badamier en Europe, de M'handaya aux Comores et d'Amandier des indes en Inde. Elle se trouve en Côte d'Ivoire surtout sur le littoral. Elle est principalement utilisée en ornementation [25-29].

En médecine traditionnelle, on attribue à cette plante des propriétés antiparasitaires, anti-infectieuses, antihypertensives et antidiabétiques [30]. Les feuilles sont la partie de la plante la plus utilisée

Ainsi,

- dans l'île de la Réunion, l'infusion des feuilles mûres soignent la dysenterie et l'hypertension, tandis que la décoction des feuilles traite l'asthme ;
- à l'île Maurice, le décocté des feuilles est employé comme un antidiabétique et celui de l'écorce comme un antidiarrhéique [31] ;
- en Côte d'Ivoire et au Congo Brazzaville, le décocté des feuilles et de l'écorce sont utilisés pour traiter le diabète, l'hypertension artérielle et les infections cutanées [25-29] ;
- au Nigeria, le macéré des feuilles dans l'huile de palme est utilisé comme remède dans les amygdalites [32] ;
- aux Philippines et au sud de l'Inde, la sève des jeunes feuilles est utilisée dans une pommade contre les scarifications de la peau et la lèpre [30] ;
- en médecine asiatique, l'écorce est utilisée comme astringent dans la dysenterie. Le décocté est utilisé contre la blennorragie, les leucorrhées, la fièvre bilieuse et les crampes d'estomac [29,30].

Au vu de ces propriétés intéressantes, notre équipe a voulu vérifier le bien fondé des vertus antimicrobiennes accordées à cette plante. Nous avons choisi de tester le pouvoir antimycosique notamment l'activité anticandidosique des extraits d'écorce de cette plante. Dans cette étude, nous livrons les premiers résultats obtenus lors de ces investigations.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2. 1. Préparation des extraits totaux

L'écorce de *Terminalia catappa* a été récoltée, découpée et séchée à l'abri du soleil. Après leur séchage, les éléments végétaux ont été finement broyés dans un broyeur électrique. La poudre obtenue a été nommée TEKAM₃.

Pour obtenir les extraits totaux aqueux et éthanoliques, la poudre de TEKAM₃ a été extraite comme suit :

Cent grammes de poudre de TEKAM₃ ont été extraits dans un litre de solvants (eau distillée ou éthanol 70%) par broyage dans un blender (mixer). L'homogénat obtenu est d'abord essoré dans un carré de tissu, puis filtré successivement deux fois sur du coton hydrophile et sur du papier filtre Wattman 3mm. Le filtrat obtenu est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Bücher à la température de 60 °C.

L'extrait éthanolique est évaporé à sec, par contre l'extrait aqueux est seulement concentré pour avoir une pâte qui est lyophilisée. L'extrait éthanolique est appelée X_0 et l'extrait aqueux X_{aq} .

Trois portions de 10 grammes de X_0 sont constituées et soumises séparément à partition dans 100 ml de trois différents mélanges de solvants (hexane - eau ; acétate d'éthyle - eau ; butanol - eau 50/50 ; v/v). Après décantation, les différentes phases ont été séparées et concentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif. On obtient respectivement les extraits suivants :

$X_{1,1}$: la phase hexanique ;

$X_{1,2}$: la phase aqueuse issue de la partition hexane – eau ;

$X_{2,1}$: la phase acétatique ;

$X_{2,2}$: la phase aqueuse issue de la partition acétate d'éthyle – eau ;

$X_{3,1}$: la phase butanolique ;

$X_{3,2}$: la phase aqueuse issue de la partition butanol – eau ;

$X_{1,2}$ a été ensuite chromatographié sur une colonne de filtration de sephadex G_{25} . Les caractéristiques de cette colonne sont : diamètre = 1 cm, hauteur du gel = 55 cm, débit=0,22 ml/mn. Nous avons obtenu 20 fractions.

Tous les vingt huit extraits ont été testés séparément sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*.

2. 2. Champignons testés

La souche de champignon à savoir : *Candida albicans*, sur laquelle nous avons fait les tests microbiologiques, a été fournie par le laboratoire de mycologie de l' UFR des Sciences Médicales de Université de Cocody (Abidjan, Côte d'Ivoire). Ces germes ont été isolés des patients en provenance du service des maladies infectieuses du CHU de Treichville.

Candida albicans, est un champignon opportuniste qui est à l'origine de diverses mycoses cutanées, muqueuses, phanériennes, septicémiques ou viscérales. Ses infections généralisées chez des sujets sévèrement immunodéprimés conduisent souvent à des décès [17, 24, 33-35].

2. 3. Préparation des milieux de culture

Les cultures de *Candida albicans* ont été faites sur milieu Sabouraud (BIOMERIEUX/ Réf : 51078 : 777666501). L'incorporation des différents extraits végétaux à la gélose Sabouraud a été faite selon la méthode de la double dilution, en tubes penchés [23, 33-35]. Tous les extraits ont été testés séparément. Chaque série comporte pour chaque extrait végétal 9 tubes tests contenant les extraits végétaux et 2 tubes témoins dont un est sans extrait végétal, servant

de contrôle de croissance des germes, l'autre sans germes et sans extrait servant de contrôle de la stérilité du milieu de culture. Pour les 9 tubes tests, les concentrations varient de 1560 à 5 µg/ml selon une liaison géométrique de raison $\frac{1}{2}$.

Après l'incorporation des extraits, tous les 11 tubes de chaque série sont stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes et ensuite inclinés avec petit culot à la température de la salle afin de permettre leur refroidissement et la solidification de la gélose [23, 33-36].

2. 4. Essai antimicrobien

L'inoculum est préparé à partir des cultures jeunes de *Candida albicans* (âgés de 48 heures d'incubation). La suspension mère (dite 10^0) concentrée à 10^6 cellules /ml est d'abord préparée, par homogénéisation d'une colonie de *Candida albicans* dans 10 ml d'eau distillée stérilisée. À partir de la suspension 10^0 , une seconde suspension (10^{-1}) est préparée par dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de la première. Cette dernière est concentrée à 10^5 cellules/ml. Pour chacun des tubes à essai de chaque série des huit extraits de plante, la culture des germes a été faite sur des milieux précédemment préparés par l'ensemencement en stries transversales (jusqu'à épuisement) de 10 µl de la suspension 10^{-1} . Cela correspond à 1000 cellules ensemencées.

Les cultures ainsi réalisées ont été incubées à 30°C. Après 48 heures et 72 heures d'incubation à 30°C, les colonies de *Candida albicans* ont été dénombrées par comptage direct grâce à un stylo compteur de colonies (N^0 de série 23382 de marque Scinceware de Bel-Art). La croissance dans les 9 tubes expérimentaux de chaque série a été évaluée en pourcentage de survivance, par rapport à 100 % de survivance dans le tube témoin de contrôle de croissance [23, 33-36].

Le traitement des données expérimentales a permis de déterminer les paramètres antifongiques suivants :

- concentration minimale fongicide (CMF). C'est la concentration d'extrait dans le tube qui donne 99,99% d'inhibition comparativement au tube témoin de contrôle de croissance. Inversement, c'est la concentration d'extrait du tube qui laisse une survivance de 0,01% par rapport au témoin de contrôle de croissance ;
- concentration pour cinquante pour cent d'inhibition (CI_{50}). C'est la concentration qui donne 50% d'inhibition, estimée par rapport au nombre de colonies dénombrées dans le tube témoin de contrôle de croissance. C'est un paramètre déterminé graphiquement.

3. RÉSULTATS

Après 48 heures d'incubation à 30 °C, on observe comparativement au témoin, une diminution progressive du nombre de colonies de *Candida albicans* au fur et à mesure que les concentrations des extraits végétaux augmentent dans les tubes expérimentaux. Cela est observé pour toutes les séries des vingt-huit extraits.

Des inhibitions nettes et effectives ont été obtenues à différentes concentrations selon les extraits. Les valeurs des CMF (concentration minimale fongicide) et CI_{50} (concentration pour 50% d'inhibition) pour les huit extraits (X_{aq} , X_0 , $X_{1.1}$, $X_{1.2}$, $X_{2.1}$, $X_{2.2}$, $X_{3.1}$ et $X_{3.2}$) sont consignées dans le tableau 1. Les données expérimentales traduites sous forme de courbes de sensibilité sont présentées à la figure 1.

Tableau 1 : Valeurs des paramètres antifongiques des différents extraits de TEKAM₃ à 30 °C et à 48 h d'incubation des cultures de *Candida albicans*.

Extraits de <i>Terminalia catappa</i>	Paramètres antifongiques	
	CI_{50} (µg/ml)	CMF (µg/ml)
X_{aq}	550	780
X_0	150	195
$X_{1.1}$	70	395
$X_{1.2}$	10	45
$X_{2.1}$	60	195
$X_{2.2}$	20	95
$X_{3.1}$	580	1560
$X_{3.2}$	50	195

De façon générale, toutes les courbes des huit extraits ont une allure décroissante, avec des pentes plus ou moins fortes. Les extraits $X_{1.2}$, $X_{2.2}$, $X_{2.1}$ et $X_{3.2}$ ont des courbes ayant les pentes relativement fortes, singulièrement celle de $X_{1.2}$ tandis que X_0 et $X_{1.1}$ ont des courbes à pentes moyennes. Les pentes les plus faibles sont observées avec celle de X_{aq} et particulièrement l'extrait $X_{3.1}$. Toutes les 8 courbes coupent l'axe des abscisses à différents niveaux selon les extraits.

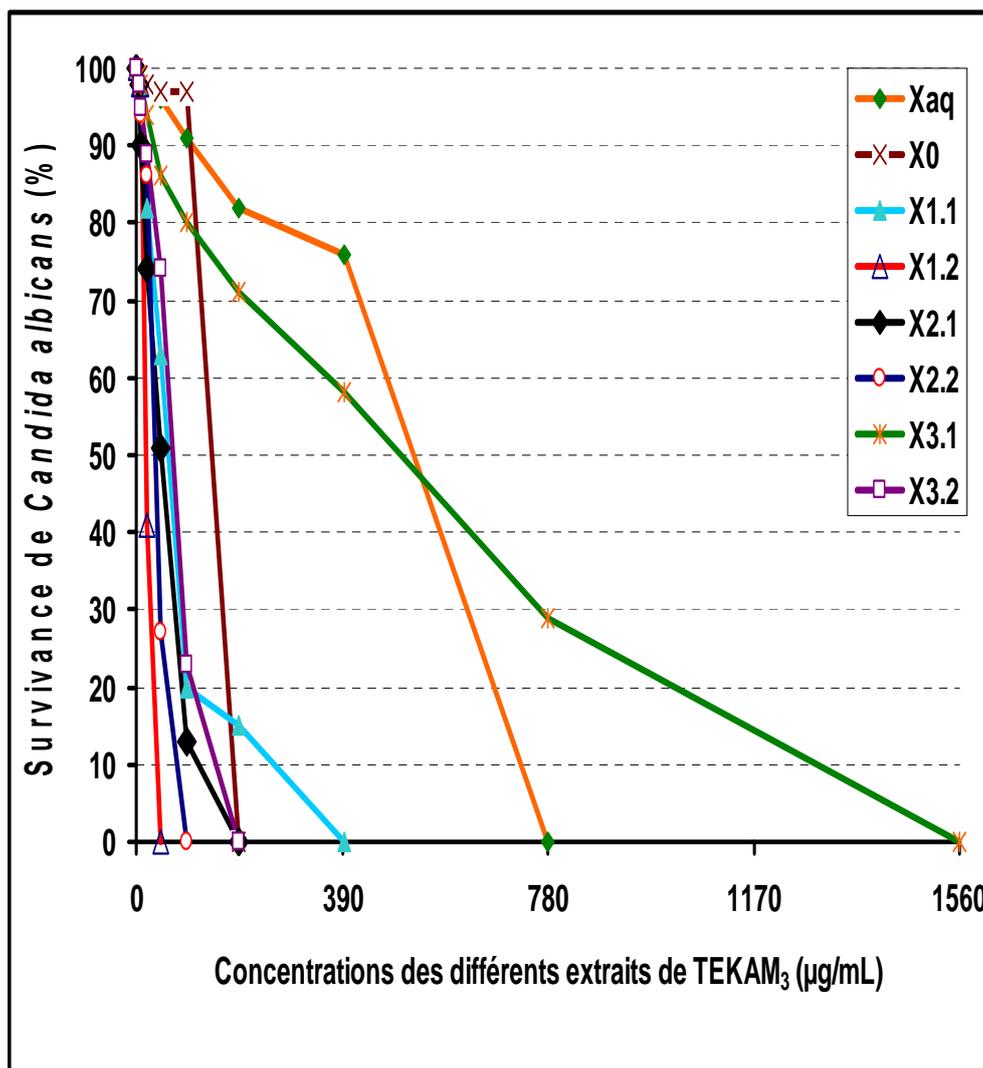


Figure 1 : Sensibilité de *Candida albicans* aux différents extraits de TEKAM₃.

En ce qui concerne les 20 fractions, l'activité antifongique de ces fractions donne des valeurs de CMF (voir tableau 2) dont certaines se répètent. En tenant compte de ces valeurs de CMF et aussi des pentes ainsi que de l'allure des courbes, ces 20 fractions peuvent être classées selon leur performance en 5 groupes (G) :

- groupe 1 comprenant les fractions F₁ à F₅ et F₁₅ à F₁₇ dont la valeur de la CMF est de 200 µg/ml. Dans ce groupe, la F₁₅ est l'extrait qui a la meilleure CI₅₀ (24 µg/ml) ;
- groupe 2 comprenant les fractions F₆ à F₈ et F₁₃ à F₁₄ dont la valeur de la CMF est de 20 µg/ml. Dans ce groupe, la F₆ est l'extrait qui a la meilleure CI₅₀ (10 µg/ml) ;
- groupe 3 renfermant les fractions F₉ à F₁₁ dont la valeur de la CMF est de 10 µg/l. Dans ce groupe, la F₁₁ est l'extrait qui a la meilleure CI₅₀ (2,9 µg/ml) ;

- groupe 4 constitué seulement de la fraction F₁₂ dont la valeur de la CMF est égale à 5 µg/ml.
- groupe 5 qui renferme les fractions F₁₈ à F₂₀ dont la valeur de la CMF est supérieure à 200 µg/ml. Dans ce groupe, la F₁₈ est l'extrait qui a la meilleure CI₅₀ (190 µg/mL).

Tableau 2 : Valeurs des paramètres antifongiques des différentes fractions de TEKAM₃ à 30 °C et à 48 h d'incubation des cultures de *Candida albicans*

Paramètres antifongiques			
Groupes	Fractions	CMF (µg/ml)	CI ₅₀ (µg/ml)
1	F ₁	200	25
	F ₂	200	30
	F ₃	200	29
	F ₄	200	31
	F ₅	200	27
	F ₁₅	200	24
	F ₁₆	200	25,8
	F ₁₇	200	30
2	F ₆	20	10
	F ₇	20	11,6
	F ₈	20	22,8
	F ₁₃	20	15,4
	F ₁₄	20	15,7
3	F ₉	10	03,1
	F ₁₀	10	03,2
	F ₁₁	10	02,9
4	F ₁₂	05	1,6
5	F ₁₈	>200	190
	F ₁₉	>200	192
	F ₂₀	>200	197

La figure 2 présente des antifongigrammes qui illustrent la sensibilité de *Candida albicans* aux 5 groupes de fractions. Sur cette figure, on constate que de façon générale, toutes les 5 courbes ont une allure décroissante avec des pentes plus ou moins fortes.

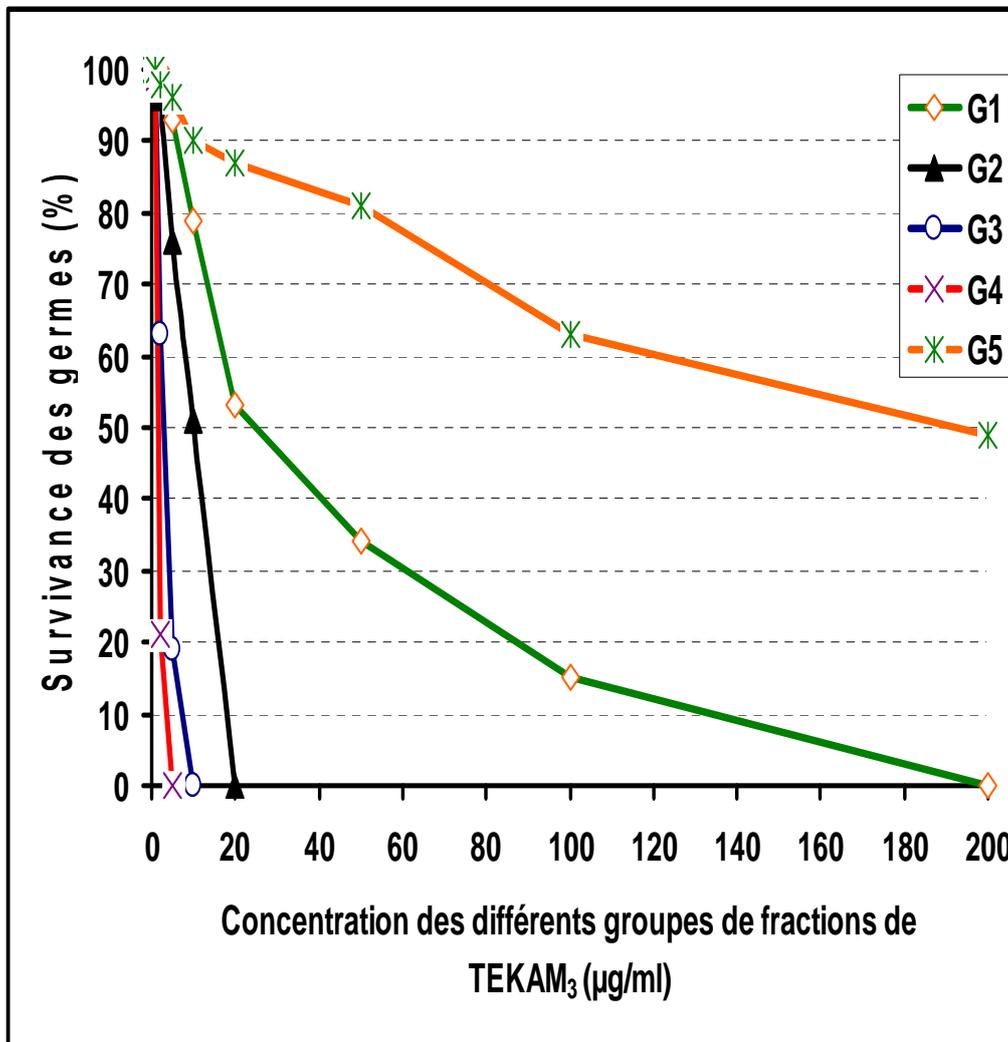


Figure 2 : Sensibilité de *Candida albicans* aux différents groupes de fractions de TEKAM₃.

Sur la base des valeurs relatives de ces pentes, ces courbes peuvent être regroupées en 3 catégories :

- la courbe dont la pente est très faible et qui illustre l'activité des extraits de G₅ ;
- les courbes ayant des pentes à valeur moyenne G₂ et G₁ ;
- les courbes ayant des pentes fortes correspondant aux activités de G₃ et G₄. Parmi elles, celle de G₄ possède la plus forte pente.

À l'exception de la courbe G₅, les courbes G₁, G₂, G₃ et G₄ coupent l'axe des abscisses à différents niveaux selon les extraits.

4. DISCUSSION

Afin de vérifier les vertus anti-infectieuses accordées à *Terminalia catappa*, nous avons de prime abord préparé l'extrait aqueux étant donné que l'eau est le solvant le plus utilisé pour la préparation des recettes traditionnelles.

Dans la seconde partie de notre étude, vu les bonnes performances obtenues avec l'extrait aqueux, nous avons voulu savoir si nous pouvions améliorer l'activité des extraits en utilisant d'autres solvants pour l'extraction. Au regard des travaux de ZIRIHI et KRA en 2003 [24], nous avons choisi le mélange éthanol eau 70/30(v/v) comme solvant d'extraction. C'est à partir de ce solvant que nous avons préparé l'extrait éthanolique codifié X_0 .

L'analyse des résultats des tests antifongiques avec les extraits de TEKAM₃ montrent que *Candida albicans* est sensible à tous les 8 extraits testés (CMF X_{aq} = 780 µg/mL, CMF X_0 = 195 µg/ml, CMF $X_{1.1}$ = 395 µg/ml, CMF $X_{1.2}$ = 45 µg/ml, CMF $X_{2.1}$ = 195 µg/ml, CMF $X_{2.2}$ = 95 µg/ml, CMF $X_{3.1}$ = 1560 µg/ml et CMF $X_{3.2}$ = 195µg/ml). Aucun cas de résistance n'a été noté. Toutefois les performances des extraits varient selon les solvants. Les valeurs des concentrations inhibitrices obtenues révèlent que les extraits ont des activités antifongiques plus ou moins accentuées. Pour ces extraits, nos résultats montrent qu'il y a une diminution progressive du nombre de colonies en fonction de l'augmentation de la concentration des différents extraits dans les tubes. Nous en déduisons que *Candida albicans* est sensible aux différents extraits de TEKAM₃ selon une relation dose-reponse. La figure 1 récapitule toutes les courbes de sensibilité des 8 extraits testés sur *C. albicans*. Elle permet une comparaison des performances de ces 8 extraits. Notons que plus la pente d'une courbe est forte c'est-à-dire plus la pente se rapproche de l'axe des ordonnées, plus l'extrait considéré est actif. Sur cette figure, on constate que de façon générale, toutes les 8 courbes ont une allure décroissante avec des pentes plus ou moins fortes. Sur la base des valeurs relatives de ces pentes, ces courbes peuvent être regroupées en 3 catégories :

- les courbes dont les pentes sont très faibles et qui illustrent l'activité des extraits de $X_{3.1}$ et X_{aq} ;
- les courbes ayant des pentes à valeur moyenne X_0 et $X_{1.1}$;
- les courbes ayant des pentes fortes correspondant aux activités de $X_{1.2}$, $X_{2.1}$, $X_{2.2}$, et $X_{3.2}$.

Parmi elles, celle de $X_{1.2}$ possède la plus forte pente (voir figure 1 et tableau 1).

Nos résultats révèlent que la valeur de la CMF de X_{aq} est 780 µg/ml et celle de X_0 est 195 µg/ml (voir tableau I). Cela justifie donc l'utilisation de la plante en milieu traditionnel

comme antimicrobien. La comparaison des activités de l'extrait aqueux et de l'extrait éthanolique sur la base des CMF, montre que X_0 (CMF = 195 $\mu\text{g/ml}$) est 4 fois plus actif que X_{aq} .

La comparaison des performances de cet extrait avec l'extrait aqueux de *Mitracarpus scaber* selon les travaux de Ackah [34] ayant une valeur de CMF = 150000 $\mu\text{g/ml}$ sur cette même souche montre que TEKAM₃ est nettement plus actif (192 fois).

De plus, la comparaison de nos résultats avec ceux de ZIHIRI et KRA en 2003 [24] révèle que les extraits aqueux et éthanolique de TEKAM₃ sont nettement plus actifs que les extraits de *Microglossa pyrifolia* "PYMI" (PYMI₀, CMF = 50000 $\mu\text{g/ml}$; PYMI₁, CMF = 25000 $\mu\text{g/ml}$). En fait, X_{aq} et X_0 sont respectivement 64 et 131 fois plus actifs.

Pour la suite des travaux, nous avons voulu améliorer les performances de X_0 en faisant des partitions avec plusieurs solvants tels que décrit dans la partie "méthode". Ces partitions nous ont donné six extraits codifiés $X_{1,1}$, $X_{1,2}$, $X_{2,1}$, $X_{2,2}$, $X_{3,1}$ et $X_{3,2}$. L'analyse des résultats obtenus avec les six extraits issus des trois partitions montre que parmi ces extraits, $X_{1,2}$ (CMF = 45 $\mu\text{g/ml}$ et CI_{50} = 10 $\mu\text{g/ml}$) est le plus actif. En effet, la comparaison avec les extraits issus des différentes partitions montre que $X_{1,2}$ est 2 fois plus actif que $X_{2,2}$; 4,75 fois plus actif que $X_{2,1}$ et $X_{3,2}$. Il est aussi 9,75 fois plus actif que $X_{1,1}$ et enfin 39 fois plus actif que $X_{3,1}$. Par rapport aux extraits totaux aqueux et éthanoliques, la comparaison sur la base de la CMF montre que $X_{1,2}$ est 4,75 fois plus actif que X_0 l'extrait de base ayant servi à sa préparation. Cette même analyse montre que $X_{1,2}$ est 19,5 fois plus actif que l'extrait total aqueux.

De l'analyse de l'ensemble des résultats, il ressort 4 aspects essentiels :

- la souche *Candida albicans* est sensible à tous ces extraits testés ;
- il a été possible d'avoir de meilleures performances en préparant l'extrait à partir d'un solvant comportant 70% d'éthanol et 30% d'eau ;
- il a été possible d'améliorer la performance de l'extrait éthanolique en procédant à sa partition dans divers solvants. Ce qui a permis d'aboutir à $X_{1,2}$ qui, à ce niveau de notre étude est l'extrait possédant la meilleure activité anticandidosique ; donc le meilleur potentiel antifongique. Ce qui nous amène à déduire que la méthode de partition initiée par Zihiri et Kra en 2003 [24] est une bonne voie permettant de mieux sélectionner les principes actifs ;
- la bonne performance de $X_{1,2}$ permet de dégager que la combinaison de solvant hexane- eau (v/v) est celle qui convient pour une meilleure concentration du principe actif. Il a donc servi de base à un fractionnement chromatographique sur gel de

sephadex G₂₅. 20 fractions ont été recueillies. Les valeurs des paramètres antifongiques sont consignées dans le tableau 2.

La comparaison des 5 groupes de fractions entre eux montre que les fractions du groupe 2 sont 10 fois plus actives que celles du groupe 1. Quant aux fractions du groupe 3, elles sont 2 fois plus active que celles du groupe 2 et 20 fois plus active que les fractions du groupe 1. Toutes les fractions des groupes 1, 2, 3 et 4 sont plus actives que celles du groupe 5.

De plus la comparaison des extraits aqueux (X_{aq}), ethanolique 70% (X_0), $X_{1,2}$ (phase aqueuse issue de la partition hexane – eau) et la fraction F_{12} montre que la fraction F_{12} est 156 fois plus active que X_{aq} et 38 fois plus active que X_0 l'extrait de base. Elle est enfin 8 fois plus active que $X_{1,2}$ qui a servi à sa préparation.

Les travaux de Bagré *et al.* [37] ont porté sur l'évaluation de l'activité antifongique des feuilles de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* d'une souche de *Candida albicans*. Ces auteurs ont obtenu une fraction F_1 la plus active sur la souche de *Candida albicans*, une inhibition nette et effective avec une valeur de CMF = 780 µg/ml. En comparant cette donnée à nos résultats, F_{12} de *Terminalia catappa* donne la meilleure activité antifongique (CMF = 5 µg/ml) par rapport à F_1 de *Morinda morindoides*. Le rapport établi sur la base de la valeur des CMF, montre que F_1 de *Morinda morindoides* / F_{12} de *Terminalia catappa* = 780 / 5 = 156 en faveur de F_{12} . Ce qui signifie que F_{12} de *Terminalia catappa* est donc 156 fois plus active que F_1 de *Morinda morindoides*.

En dehors de l'effet fongicide, les concentrations moyennes des extraits de *Terminalia catappa* exercent des effets fongistatiques sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*.

De tout ce qui précède, nous retiendrons que F_{12} est la fraction la plus active obtenue à ce jour dans cette étude. Il a donc été possible en combinant des méthodes de partitions à la chromatographie sur gel de filtration, d'améliorer considérablement l'activité anticandidosique de l'extrait de base X_0 . Cette stratégie a permis d'obtenir F_{12} .

Ces résultats font donc ressortir que l'obtention de la fraction la plus active est assurée en utilisant comme solvant de base un mélange d'éthanol-eau dans les proportions 70/30 v/v. L'extrait obtenu doit être partitionné dans un mélange hexane-eau v/v. Dans cette opération, seule la phase aqueuse doit être retenue pour être chromatographiée sur gel de filtration sephadex G₂₅. Par ce procédé, nous avons donc atteint notre objectif qui est d'optimiser l'activité antifongique des extraits de *Terminalia catappa*.

5. CONCLUSION

Cette étude s'inscrit dans le programme de recherche de notre laboratoire dont l'objectif est de valoriser les plantes médicinales de notre pharmacopée. Et surtout de chercher de nouvelles molécules à partir d'extrait de plantes pouvant servir de nouvelles têtes de séries de médicaments.

Dans ce travail, la plante étudiée *Terminalia catappa* est une espèce à laquelle on accorde des vertus anti-infectieuses en milieu traditionnel. Cette étude confirme non seulement le bien fondé de cette assertion mais aussi on peut retenir les faits saillants suivants :

- la souche testée est sensible aux 28 extraits selon une relation dose-réponse ;
- parmi les six extraits issus de la partition de X_0 , $X_{1,2}$ est le plus actif et son activité anticandidosique est 4 fois plus élevée que celle de X_0 ;
- parmi les 20 fractions issues de la chromatographie de $X_{1,2}$, F_{12} (CMF=5 $\mu\text{g/ml}$; CI_{50} =1,6 $\mu\text{g/ml}$) est non seulement l'extrait le plus actif parmi les fractions mais aussi il est surtout 8 fois plus actif que $X_{1,2}$ et 38 fois plus actif que X_0 l'extrait de base. On retiendra par contre que dans ce groupe, les fractions F_{18} , F_{19} et F_{20} sont les moins actives ;
- L'obtention de la fraction la plus active a nécessité la préparation de l'extrait de base à partir d'un mélange ethanol-eau (70/30 v/v) suivi d'une partition dans la combinaison de solvant hexane-eau, dont l'extrait issu de la portion aqueuse est ensuite chromatographiée sur gel de sephadex G_{25} .

Cette méthode d'extraction nous a donc permis d'atteindre notre objectif qui était non seulement d'évaluer mais aussi d'optimiser l'activité anticandidosique des extraits de *Terminalia catappa*. Par ce procédé, nous avons obtenu F_{12} qui est l'extrait le plus actif obtenu à ce jour. Les vertus anti infectieuses accordées à cette plante sont donc justifiées.

Une analyse plus poussée, nous permettra de déterminer qualitativement la structure chimique de ce principe actif par des méthodes combinées de spectroscopie de masse, d'infrarouge et de résonance magnétique nucléaire. Elle nous permettra également d'essayer la synthèse chimique de cette molécule. De rechercher une formulation galénique stable pouvant servir de support à la molécule pour en faire un médicament contre les mycoses cutanées et systémiques. D'étudier les domaines de toxicité du principe actif et du médicament final. D'étudier les mécanismes d'action du principe actif sur les champignons et les bactéries. De

rechercher les moyens de produire industriellement le médicament final. De rechercher les activités biologiques intéressantes des autres fractions.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements à tous les tradipraticiens qui nous ont permis de découvrir la plante. Nos remerciements vont aussi à l'égard de nos collaborateurs qui nous ont permis la réalisation de ce travail.

RÉFÉRENCES

- [1] J. Callot et J. Helluy, *Parasitologies médicales*, Éd: Méd. Flam., **4** (1970) 557-600.
- [2] S. Kernbaum, *Éléments de Pathologie infectieuse*. Éd. Méd., Chap. XII, Villebranne, Paris, Spécia, **3** (1980) 1-185.
- [3] O. Ann, *Maladies parasitaires et fongiques*. Éd. C et R, (1982) 246-285.
- [4] P. Leclerc, C. Artigou, S. Gagnebien, O. De Fenoyl, J. Rochemaure, *Aspergillose broncho-pulmonaires*. Revue générale poumon-cœur, Masson Paris, **5** (1982) 25-33.
- [5] E. Chouvalova, *Les maladies tropicales*, Éd. Mir, Moscou, **3** (1984) p. 194.
- [6]. B. Dupont, *Mycoses et SIDA*. Résumé des rapports, communications affichées, Institut Pasteur, Paris, **16** (1987) 4-9.
- [7]. S. Cromberg, J. Beylout et M. Ray. *Maladies infectieuses*, Éd. Mason, (1988) 232 - 625.
- [8]. P. Bouchet, P. Regis., J. L. Crugnard et G. Madulo-Lelbond, *Mycologie générale et médicale*, Éd. Masson, Paris, (1989) 325-378.
- [9] B. T. Faure, J.X. Biondi, J. P. Flanagan, and R. Clarke, *Aspergillar osteomyelites of acetabulum*, A case report and review of literature, *Orthopaedic review*, **19** (1990) 58-64.
- [10]. Therizol-Ferly, *Cours de mycologie médicale pour le CES de parasitologie*, Fac. Méd., Univ. Cocody, Abidjan (1990) 169 pp.
- [11]. S. P. Eholié, *Étude des infections opportunistes au cours du SIDA, à propos de 262 cas diagnostiqués*. Thèse. Dipl. d'État. Méd. Abj. N°1517, (1993) p. 81.
- [12] M. Gentilini, E. Caumes, M. Danis, J. Mouchet, B. Duflo, B. Lagardière, R.L. Dominique et G. Brucker, *Médecine tropicale*, Éd. Flam. Méd. Sciences, **5** (1993) 955pp.
- [13] D. Chabasse, *Les nouveaux champignons opportunistes apparus en médecine*. *Revue générale*, J. Mycol. Méd., **4** (1994) 9-28.

- [14] E. A. Monnan. *Les aspergilloses respiratoires en Côte d'Ivoire. Aspects épidémiologiques, diagnostiques, thérapeutiques et évolutifs à propos de 89 cas colligés au CHU de Treichville de 1973 à 1994*. Thèse. Fac de Méd. Abj., Univ. Cocody, (1995) 137 pp.
- [15] B. F. Dupont, F. Dromer, and L. Improvisi, *The probleme of azole resistance in Candida*, J. Mycol. Méd., **6** suppl. 2 (1996) 12-19.
- [16] S. Coulibaly et F. Guédé-Guina, *Étude de la tolérance cardiovasculaire de MISCA-F2 un anticryptococcique de source végétale*, JBNA-1, Abidjan, 30 nov-04 déc. (1998).
- [17] A. K. M. Kra, *Évaluation et amélioration par séquençage chromatographique d'une action antifongique de MISCA contre Aspergillus fumigatus*, Thèse. Pharma., Bioch. Univ. Abidjan, (2001) 126 pp.
- [18] M. Develoux et S. Bretagne. *Candidoses et levures diverses*. Encycl. Méd. Chir., Maladies infectieuses, 8 - 062 - A - 10, (2005), 10p.
- [19] A. Ketani, Z. H. Belkhadir, A. Mosadik, M. Faroudy, A. Ababou, et C. Lazreq. *Traitement antifongique des candidoses systémiques en réanimation*, J. Mycol. Méd. **16** (2006) 16-25.
- [20] D. Charles, P. Loulerque, J. P. Viard, F. Drauer et O. Lortholary, *Infections fongiques au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine*. Encycl. Méd. Chir., Maladies infectieuses, 8 - 002 - C - 10, (2007), 8p.
- [21] S. J. Vouriot, M. Berle et E. Paillaud, *Candidoses orales chez les personnes âgées hospitalisées : fréquence, facteurs de risque et prévention*, Encycl. Méd. Hygiènes, **15** (2007) 385-390.
- [22] P. M. Thès, *Contribution à l'élaboration d'un savon antimicrobien à des fins cosmétiques et médicales*, Thèse n^o 548/2008 de Doctorat d'Université. UFR Biosciences. Univ. Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire (2008) 200pp.
- [23] F. Guédé-Guina, A. K. M. Kra, M. Vangah-Manda et G. M. Bonga, *Inhibition par MISCA-F₂ de la croissance de Aspergillus fumigatus, Candida albicans et Cryptococcus neoformans trois germes opportunistes du SIDA*. J. Afrique Bioméd., **2** (1997) 11-16.
- [24] G. N. Zirih, A. M. Kra et F. Guédé-Guina, *Évaluation de l'activité antifongique de Microglossa pyrifolia (LAMARCK) O. KUNZE (ASTERACEAE) <<PYMI>> sur la croissance in vitro de Candida albicans*, Revue de Méd. et Pharm. Afr., **17** (2003) 11-18.
- [25] E. J. Adjanohoun et L. Aké-Assi, *Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire*, CRES. Université Côte-d'Ivoire, Centre National de Floristique, (1979) 40-219.

- [26] L. Aké-Assi. et S. Guindo, *Plantes utilisées dans la médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest*. Éd. Roches (1991). 151pp.
- [27] A. A. Diafouka, J. Lejoly, *Plantes hypotensives utilisées en médecine traditionnelle à Brazzaville (Congo)*, BARAB Actes du 2ème Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 2ème Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg (1993) 24-27 mars 1993. 5p.
- [28] G. K. N. Ahoussou, Abdourahamane Sangaré et Alassane Sangaré, Côte d'Ivoire : *Rapport de pays pour la conférence internationale de la FAO sur les ressources phytogénétiques*, (Leipzig, 1996). 75p
- [29] S. Fofana, *Exploration biochimique sur le pouvoir immunogène de trois plantes en Côte d'Ivoire : Alstonia boonei (APOCYNACEAE), Mitragyna ciliata (RUBIACEAE) et Terminalia catappa (COMBRETACEAE)*, Thèse. Dipl. d'État. Pharm. Abj., (2004) 100 p.
- [30] H.M. Burkill,. *The useful plants of West Tropical Africa*. ed. 2, Royal Bot. Garden Kew (1997) 138-140; 546-547.
- [31] E. J. Adjanohoun, L. Aké-Assi, J. Eymé, N. J. Gassita, E. J. Goudot, J. Gueho, I. P. F. S. L., D. Jackaria, K. K. S. Kalashand, A. Keita, B. Koudogbo, D. Lanndreau, W. Owadally et A. Soopramanin, *Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques à Maurice (Iles Maurice et Rodrigues)*, ACCT, Paris (1983) 214 p.
- [32] D. K. A. Amennoudji et Aké-Assi, *Contribution à la connaissance de la flore ouest africaine*. Rapport de stage au centre national de floristique d'Abidjan du 09/11/1987 au 30/10/1989. (1990).
- [33] P. M. Thès, *Recherche du profil antimicrobien des huiles de G₂₄₃ et de MISCA sur quelques agents de mycoses de la peau*, Mémoire de DEA de biotechnologies, option pharmacologie-microbiologie. Univ. Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire (2001) 34p.
- [34] J. A. Ackah, *Spectre anti-infectieux de MISCA-F₃ sur la croissance in-vitro de Candida albicans, Aspergillus fumigatus, Cryptococcus neoformans, Trichophyton mentagrophytes et Trichophyton rubrum*. Mémoire de DEA de biotechnologies, option pharmacologie-microbiologie. Univ. Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire. (2004) 34 p.
- [35] M. Vangah-Manda, A. M. Kra, G.M. Bonga et F. Guédé-Guina, *Amélioration de l'action antifongique de MISCA, un extrait végétal contre Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus et Candida albicans, trois germes opportunistes du SIDA*, J.B.NA. 2 (1996) 11-16.

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

[37] I. Bagré, C. Bahi, L. Gnahoué, J. A. Djaman et F. Guédé-Guina, *Composition phytochimique et évaluation inn vitro de l'activité antifongique des extraits des feuilles de Morinda morindoides (Baker) Milne-Medhed (Rubiaceae) sur Aspergillus fumigatus et Candida albicans*, J. Sci. Pharm. Biol., **8**, (2007), 15-23.