



Étude botanique, évaluation de l'activité antifongique sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans* et de la toxicité sur des cellules HFF de feuilles de *Mallotus oppositifolius* (Geiseler) Müller.Arg (Euphorbiaceae)

Yoméh. C. V. YAPO¹ ; N'Dri Gilles KONKON¹ ; Kiyinlma COULIBALY² ; Djeneb CAMARA¹ ; Guédé Noël ZIRIHI¹

¹Laboratoire de Botanique. UFR Biosciences. Université Félix HOUPHOUËT- BOIGNY (UFHB), 22 BP 582 Abidjan 22 Côte d'Ivoire.

²Laboratoire de Biologie Végétale, UFR des Sciences Biologiques. Université Peleforo GON COULIBALY, BP 1328 Korbogo.

*Auteur pour correspondance : e-mail : yomehcynthia@gmail.com Tel : (+225)57325456

Mots clés : *Mallotus oppositifolius*, cellule HFF, extraits végétaux, activité antifongique, *Candida albicans*.
Key words: *Mallotus oppositifolius*, HFF cells, plants extracts, antifungal activity, *Candida albicans*.

1 RESUME

Mallotus oppositifolius est une plante qui est citée de façon récurrente dans plusieurs prescriptions thérapeutiques en médecine traditionnelle, contre les infections, les mycoses.... Dans le but de mieux connaître cette plante, nous avons réalisé une étude botanique, évalué l'activité antifongique des extraits : total aqueux (ETA), éthanolique 70% (EE70%), résiduel aqueux (ERA) sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans* et la toxicité sur des cellules HFF (Human Foreskin Fibroblasts). La méthode de la double dilution et celle de Mosman ont servi à évaluer respectivement l'activité des extraits et la toxicité. Cette toxicité sur ces cellules HFF a été faite avec l'extrait éthanolique. Les résultats obtenus montrent que les trois extraits de la plante ont des activités antimicrobiennes sur *Candida albicans*. Parmi les extraits testés, la fraction ERA avec une Concentration Minimale Fongicide (CMF)= 0,195mg/ml et une Concentration inhibitrice 50 % (CI₅₀)= 0,097mg/ml est la plus active. Le test de toxicité réalisé *in vitro* sur des cellules HFF a mis en évidence des effets non-toxiques de la plante sur les cellules humaines à des concentrations de 125 à 1000µg/ml, suggérant une sécurité d'emploi de cette substance végétale dans le traitement traditionnel.

SUMMARY

Mallotus oppositifolius is a plant that is mentioned in a recurrent way in several therapeutics prescriptions in traditional medicine, against infections, fungus diseases. In order to know this plant and be able to identify it, we have realized a botany study, and evaluated the antifungal activity of some extracts: Total Extract Aqueous (ETA), 70 percent of Ethanolic Extract (70% EE), Residual Aqueous Extract (ERA) on respectively, the growth *in vitro* of *Candida albicans* and Human Foreskin Fibroblast's cells. The method of double dilution and this of Mossman served to evaluate respectively the extracts's activity. This toxicity on these HFF cells has been done with ethanolic extract. The microbiological tests results showed that all the extracts of this



plant have antimicrobial activities on *Candida albicans*. Among the tested extracts, the fraction (ERA) (CMF = 0,195 mg/ml; CI50 = 0,097 mg/ml) is most active. The toxicity test realized in vitro on HFF cells showed cytotoxic effects of the plant on the human cells at concentrations from 125 to 1000 mcg/ml, suggest a security use of this vegetal substance in the traditional treatment.

2 INTRODUCTION

Selon Adjanohoun *et al.* (2000), les plantes médicinales servent essentiellement au bien être humain. En dehors des plantes cultivées, certaines espèces végétales, parfois peu connues ont une grande importance traditionnelle, culturelle et un fort potentiel économique pour l'alimentation, les soins, l'énergie, l'habillement et la construction des logements (Yinyang *et al.*, 2014). Selon ces auteurs, les médecines « douces », particulièrement la phytothérapie, connaissent un succès considérable dans nombreuses régions d'Afrique, d'Asie et d'Europe. Actuellement, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la planète ont recours à la médecine traditionnelle à base de plantes en tant que soins de santé primaire (OMS, 2003 ; Koffi *et al.*, 2014). L'utilisation des plantes s'explique par leur accessibilité et la disponibilité de la médecine traditionnelle dans les pays en développement d'une part, ainsi que le coût élevé et la nocivité des effets secondaires causés par les médicaments de synthèse d'autre part (Biyiti *et al.*, 2012 ; Koffi *et al.*, 2014). Dans le monde, il existe des maladies graves et mortelles provoquées par les microorganismes (Yao, 2013). Ces microbes peuvent être des bactéries, des virus, des champignons et des parasites. Des traitements sont disponibles mais on constate que les microorganismes pathogènes sont devenus résistants à la plupart des agents anti-infectieux conventionnels existants (Yao, 2013). Cette situation rend difficile la prise en charge des personnes atteintes de maladies infectieuses (Yao, 2013). Les phénomènes de résistance sont en

croissance dans le monde et constituent un véritable problème de santé publique dans les pays en développement (Goossens *et al.*, 2006). Une étude réalisée dans la région des grands ponts en Côte d'Ivoire a montré que parmi les plantes médicinales prescrites dans le traitement des maladies microbiennes dans cette région, *Mallotus oppositifolius* est toujours citée lors des enquêtes ethnobotaniques (Aké-Assi, 1984). Des études antérieures ont montré qu'en Côte d'Ivoire et à Madagascar, les extraits éthanoliques des feuilles et d'inflorescences de *M. oppositifolius* ont une activité inhibitrice de la croissance "in vitro" de *Plasmodium falciparum* (Atteindehou, 2004 ; Harinantenaina *et al.*, 2013). Des études antimicrobiennes ont également mis en évidence une activité fongicide des extraits aqueux et hydroalcoolique d'écorce de tige de *M. oppositifolius* sur des souches de *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Microsporium audouinii*, *Penicillium* sp, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichoderma* sp et *Trichosporon cutaneum*. (Chhabra *et al.*, 1990) . Cependant aucune étude n'a été entreprise à notre connaissance sur l'activité fongicide des extraits aqueux, hydroalcoolique et résiduel des feuilles de cette plante sur des souches de *Candida albicans*. Le présent travail a pour objectif de faire une étude ethnopharmacologique de cette plante utilisé dans la région des grands ponts en Côte d'Ivoire sur *Candida albicans*. Plus spécifiquement, nous ferons une description botanique de cette plante, nous évaluerons l'activité antifongique sur *Candida albicans* et la toxicité de la plante sur les cellules HFF (Human Foreskin Fibroblasts).

3 MATERIEL ET METHODES

3.1 Matériel

3.1.1 Matériel végétal : Il est constitué des feuilles de *Mallotus oppositifolius* (Geiseler) Müll. Arg (Euphorbiaceae)

3.1.2 Matériel fongique : Les tests antifongiques ont été effectués sur une souche clinique de *Candida albicans* sous le numéro 13-304. Cette souche nous a été fournie par le



laboratoire de Mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire). Elle a été isolée d'un patient atteint de Leucorrhée 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 ou viscérales.

3.1.3 Matériel cellulaire : Le support cellulaire est constitué de cellules humaines HFF (Human Foreskin Fibroblasts). Ce sont des cellules humaines qui témoignent de l'activité toxique d'un extrait. Elles ont la particularité de former un tapis cellulaire après plusieurs jours de culture (96 heures - 4 jours), on dit alors qu'elles sont confluentes, elles arrêtent de se diviser par inhibition de contact. Lorsque ces cellules sont en culture depuis seulement 24 heures, elles sont dans un état de mitose (ou cellules en division). Ces cellules HFF sont cultivées à 37°C, sous 5% de CO₂ dans un milieu D10 (Dulbecco Minimum Essential Medium, Gibco, additionné de sérum de veau fœtal 10% ; glutamine 1% ; pénicilline 50 U.ml⁻¹ et streptomycine 50 µg/µl).

3.2 Méthodes

3.2.1 Collecte de la plante : Les feuilles de *Mallotus oppositifolius* ont été récoltées en novembre 2014 au Sud de la Côte d'Ivoire dans le département de Jacqueville (Région des grands Ponts). Les échantillons récoltés ont été identifiés par Monsieur ASSI Yapo Jean technicien botaniste au Centre National de Floristique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët Boigny.

3.2.2 Étude botanique : L'étude botanique prendra en compte : la description botanique, la répartition géographique et l'usage thérapeutique.

3.2.3 Préparation des extraits végétaux : Après la récolte, les feuilles ont été débarrassées des impuretés, séchées à l'ombre et dans un laboratoire climatisé pendant une semaine puis pulvérisées à l'aide d'un broyeur électrique. Les poudres fines obtenues ont été conservées dans des bocaux en verre pour éviter les moisissures.

• **Extrait Total Aqueux (E.T.A) :** Les feuilles séchées de la plante ont été pulvérisées par un broyeur électrique de type Moulinex. La poudre obtenue a servi à préparer les différents

extraits. Ainsi E.T.A a été obtenu selon la méthode suivante (Zirihi et Kra, 2003 ; Bagré et al., 2006): Cent grammes de poudre de plante sont extraits à l'eau distillée par broyage dans un mixeur (Blender) trois fois trois minutes à la température ambiante. L'homogénéat obtenu est essoré dans un carré de tissu puis filtré successivement quatre fois sur du coton hydrophile et ensuite sur du papier Wattman (3mm). Le filtrat est évaporé à 55 °C à l'aide d'une étuve de type venticell®. L'évaporat sec de couleur noirâtre ou marron constitue l'extrait total aqueux (ETA)

• **Extrait Ethanolique 70 % (E.E70 %) et Extrait Résiduel Aqueux (ERA) :** E.E70 % et E.R.A proviennent de l'extrait total aqueux, selon la méthode suivante (Zirihi et al., 2003) : cinq grammes d'extrait total aqueux sont dissous dans cent millilitres d'une solution éthanol absolu-eau (70 : 30 ; V/V), puis homogénéisés dans un Blender. Dans une ampoule à décanter, le surnageant est recueilli. La phase supérieure contenant les éléments alcool hydrosolubles constitue l'extrait E.E70 % et la phase inférieure l'extrait E.R.A et sont ensuite séchées à l'étuve (50°C) pour obtenir des poudres.

3.2.4 Calcul du rendement : Le rendement est la quantité d'extrait obtenue à partir de la poudre végétale. Il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$R = \frac{m}{M} \times 100$$

R: rendement d'extraction ; m: masse de l'extrait ; M : masse de la poudre fine.

3.2.5 Préparation des milieux de culture : Les cultures de *Candida albicans* ont été faites sur le milieu Agar Sabouraud Chloramphenicol (Ref : M1067-500G, lot : 0000215703) fourni par HIMEDIA. L'incorporation des différents extraits végétaux à la gélose Sabouraud a été faite selon la méthode de la double dilution, en tubes penchés (Holt, 1975 ; Thes, 2001 ; Kra, 2001). Tous les extraits ont été testés séparément. Chaque série comporte pour chaque extrait végétal 10 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 10 tubes tests, les concentrations varient de 50 à 0,098 mg/ml selon une liaison géométrique de raison $\frac{1}{2}$. Après l'incorporation des extraits, tous les 12 tubes de chaque série sont stérilisés à l'autoclave PBI STEMATIC III à 121°C pendant 15 minutes et ensuite inclinés avec petit culot à la température de la salle pour les refroidir et solidifier la gélose (Zirih et al., 2003; Bagré et al., 2011).

3.2.6 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. A partir de la suspension 10^0 , une seconde suspension (10^{-1}) est préparée par dilution au 1/10ème de la première. Cette dernière est concentrée à 10^5 cellules/mL. Pour chacun des tubes à essai de chaque série des trois extraits de plante, la culture des germes a été faite sur des milieux précédemment préparés par ensemencement en stries transversales (jusqu'à épuisement) de 10 μ L 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. La croissance dans les 10 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 (Leclerl et al., 1982 ; Dupont, 1987 ; Cromberg et al., 1988 ; Ackah et al., 2004 ; Bagré et al., 2006). 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.

- **La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) :** c'est la concentration d'extrait dans le tube pour lequel il n'y a aucune croissance visible à l'œil nu. Pour vérifier la fongicide des extraits, tous les tubes à partir de la CMI ont été repiqués dans de nouveaux tubes à essai contenant du milieu Sabouraud Chloramphénicol Agar et porté à incubation dans les mêmes conditions que précédemment pendant 72 à 120 heures. A la fin du temps d'incubation, chaque extrait est évalué comme étant fongicide si aucune colonie ne germe, dans le cas contraire l'extrait végétal est fongistatique (Coulibaly, 2012).

3.2.7 Test de toxicité : Les tests de toxicité ont été réalisés au LAPM (Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes) à Grenoble en France. Pour mesurer la toxicité de l'extrait éthanolique, les cellules HFF (Human Foreskin Fibroblasts) ont été ensemencées dans des plaques de 96 puits (CellStar) à raison de 3000 à 5000 cellules par puits dans 100 μ l de milieu D10. Ces cellules sont maintenues en culture pendant 24 heures (cellules en division) ou 96 heures (cellules confluentes). Par la suite elles ont été exposées pendant 24 heures à différentes concentration (0 -1000 μ g/ml) en extrait de plante solubilisé dans du tampon PBS. Cela a été fait en triplicate. La viabilité a été déterminée à l'aide du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules métaboliquement actives, qui précipite et donne une couleur violette. La quantité du précipité formé est proportionnelle au nombre de cellules

vivantes. Dans chaque puits, le MTT est ajouté à une concentration de 500 µg/ml et incubé pendant 3h à 37°C. Les cristaux de formazan sont solubilisé dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) 10 mM. La mesure de la densité optique à 544 nm a été faite à l'aide d'un

spectrophotomètre Safir (Tecan) ; cette mesure de l'absorbance permettra de déterminer la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement (Mosman, 1983).

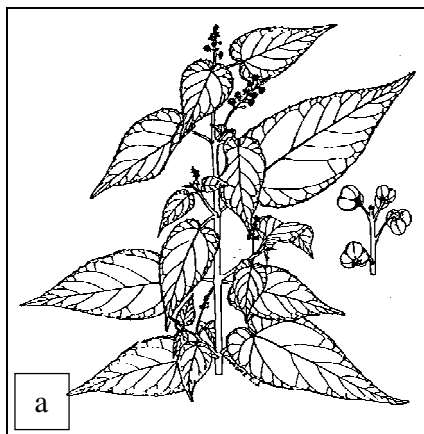
Taux viabilité = (Abs544 nm extrait/ Abs544 nm témoin) × 100

4 RESULTATS

4.1. Étude botanique de *Mallotus oppositifolius* (Geisel.) Müll.-Arg

4.1.1 Description botanique : *M. oppositifolius* est un arbuste d'environ 6 m de haut (Figure 1). Les jeunes pousses sont couvertes de poils étoilés alors que les rameaux âgés sont presque glabres. Les feuilles sont simples et opposées (Figure 1: Aa). Chaque paire avec un pétiole long et un pétiole court légèrement épaissi aux deux extrémités. Les stipules sont très petites et tombent rapidement. Le limbe est largement

ovale de taille inégale sur chaque paire avec une base faiblement arrondie ou tronquée. Le bord est presque entier, plus ou moins profondément dentés ou lobés avec 3 nervures partant de la base, garni de poils étoilés disséminés. L'inflorescence est une grappe terminale ou axillaire (Figure 1: 4B). Les fleurs sont unisexuées, parfumées sans pétales avec de nombreuses étamines. Les fruits sont constitués de trois lobes avec des grains lisses, brillantes de couleurs brun grisâtre (Figure 1: Ab).



A : a -Rameau feuillé; b- fruits

B : Photo (Yapo, 2014)

Figure 1: *Mallotus oppositifolius* (Geisel.) Müll.-Arg

4.1.2 Répartition géographique et Usage thérapeutique : Espèce guinéo-congolaise, on la trouve, souvent, sur les lisières des forêts. - *Mallotus oppositifolius* est traditionnellement utilisé pour traiter diverses pathologies. Ainsi, l'infusion de feuilles ou d'écorce de tige se prend pour pulser le ténia et traiter la diarrhée.

- Les feuilles fraîches, écrasées ou masticquées, parfois mélangées à du beurre de karité, se mettent sur les coupures et les écorchures, où elles servent d'agent hémostatique et antibactérien, et sur les éruptions cutanées et les

démangeaisons pour hâter la cicatrisation.

- Les feuilles broyées ou en infusion s'emploient pour traiter les infections urinaires, les maladies vénériennes, le paludisme, la lèpre, la varicelle et la stérilité féminine.

4.1.3 Rendement de la plante : Les extractions des feuilles de *Mallotus oppositifolius* ont fourni des extraits ayant des rendements variables. Les valeurs représentant la moyenne des masses obtenues avec ETA = 16g soit un rendement de 16%, EE70%= 2,24g soit un rendement de 44,8% et ERA= 1.32g soit 26,4%.



Ces résultats montrent que le plus grand rendement est observé avec les extraits éthanolique 70% de *Mallotus oppositifolius*.

4.2 Tests antimicrobien : Après 72h d'incubation à 30°C, on observe comparativement aux témoins, une diminution progressive du nombre de colonies de *Candida albicans* au fur et à mesure que la concentration des extraits augmente dans les tubes expérimentaux. Cela a été observé dans toutes les séries des tubes. Des inhibitions nettes et effectives ont été obtenues à différentes concentrations selon les extraits. Les valeurs des paramètres antifongiques des trois extraits, CMF

(Concentration minimale fongicide) et CI_{50} (Concentration pour 50% d'inhibition) sont consignées dans le Tableau 1. De façon générale, tous les trois extraits ont des courbes présentant une allure décroissante, avec des pentes plus ou moins fortes selon les extraits. L'extrait résiduel a une courbe ayant une pente relativement plus forte ; alors que les deux extraits aqueux et éthanolique ont des courbes à pente moyennes. Tous les trois courbes coupent l'axe des abscisses, à différents niveaux selon les extraits. Les données expérimentales traduites sous forme de courbes de sensibilité sont résumées à la Figure 2.

Tableau 1 : Valeurs des paramètres antifongiques comparées des extraits de feuilles de *Mallotus oppositifolius* après 72h d'incubation.

Extraits végétaux	Extrait Total Aqueux (ETA)	Extrait Ethanolique 70% (EE70%)	Extrait Résiduel Aqueux (ERA)
Paramètres antifongiques (mg/ml)			
CI_{50}	0,292	0.585	0.097
CMF	-	-	0.195
CMFs	0.39	0.78	-
Fongicidie	Fongistatique	Fongistatique	Fongicide

CMFs : Concentration Minimale Fongistatique

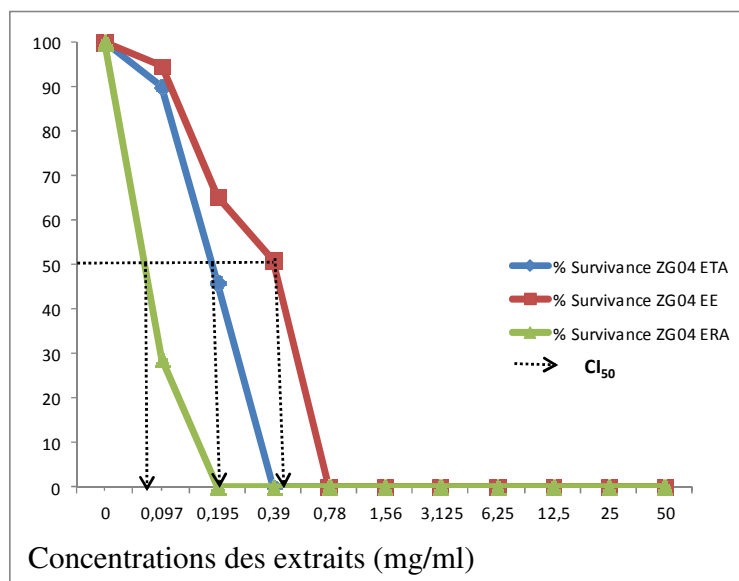


Figure 2 : Courbe d'évolution de la survivance de *Candida albicans* en fonction de la concentration des trois extraits de *Mallotus oppositifolius* (Geiseler) Müll. Arg (Euphorbiaceae)

4.3 Toxicité : La Figure 3 donne le pourcentage de viabilité des cellules HFF cultivées en présence des concentrations de 125 à 1000 µg/ml pour l'extrait éthanolique 70% de *Mallotus oppositifolius* par rapport au contrôle sans

extrait de plante. Le nombre de cellules augmente au fur et à mesure que la concentration de l'extrait éthanolique 70% de *Mallotus oppositifolius* augmente.

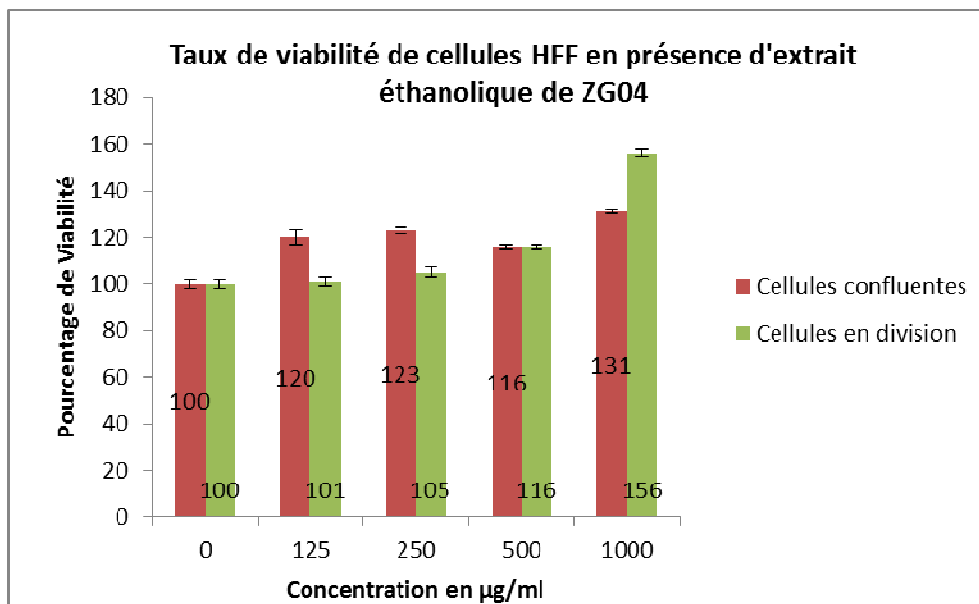


Figure 3 : Taux de viabilité de cellules HFF en présence d'extrait éthanolique de *Mallotus oppositifolius*

DISCUSSION

Sur le plan botanique, *Mallotus oppositifolius* est une Euphorbiaceae qui présente toutes les caractéristiques de cette famille. Elle colonise le sous-bois des forêts secondaires. En écologie, elle se développe dans la lisière des forêts et dans les brousses associées ou les fourrées, ainsi que le long des rivières, depuis le niveau de la mer jusqu'à 1650 m d'altitude. Cela s'avère positif, car *Mallotus oppositifolius* renferme plusieurs propriétés thérapeutiques peu ou pas exploitées. Par les travaux de Zirihi *et al* (2003), 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 EE70%. Sur le plan microbien, l'analyse des résultats des tests antifongiques avec les extraits de *Mallotus oppositifolius* ont montré que *Candida albicans* est sensible à tous les 3 extraits testés. Nos résultats ont démontré qu'il y a une diminution progressive du nombre de colonies au fur et à mesure que la concentration des extraits

augmente dans les tubes. Nous en déduisons que *Candida albicans* est sensible aux différents extraits selon une relation dose-réponse. Nos résultats ont révélé que la valeur de la CI₅₀ de l'ETA est 0,292 mg/ml, celle de l'EE70% est 0,585 mg/ml et celle de l'ERA est de 0,097 mg/ml, ce qui pourrait expliquer l'inhibition nette et effective de *Candida albicans*, justifiant ainsi l'utilisation de *Mallotus oppositifolius* en médecine traditionnelle. La comparaison des activités des trois extraits sur la base des CI₅₀ a montré que l'ERA a été plus actif que l'ETA qui lui a été plus actif que l'EE70%. Le rapport des CI₅₀ donne :

$$CI_{50\text{ ETA}}/CI_{50\text{ ERA}} = 0,292/0,097 = 3$$

$$CI_{50\text{ EE70\%}}/CI_{50\text{ ERA}} = 0,585/0,097 = 6$$

Cela signifie que l'ERA est 2 fois plus actif que l'ETA et 6 fois plus actif que l'EE70%. Cela s'expliquerait par le fait que les principes actifs contenus dans l'extrait résiduel ont un plus grand potentiel antifongique. En effet, les solvants de cet extrait ont la capacité à extraire les composés



de nature lipidiques de grandes et moyennes tailles et concentrer le principe actif, justifiant ainsi la forte activité antifongique des extraits résiduels (Ahon, 2014). Nous en déduisons que la méthode d'extraction éthanol/eau utilisée améliore l'efficacité de l'ETA qui a servi de base à sa préparation (Coulibaly, 2012). Une analyse comparée de nos résultats avec ceux des travaux antérieurs réalisés sur la même souche fongique par Coulibaly *et al.* (2010) a montré que les extraits de *Mallotus oppositifolius* ont une meilleure activité antifongique que les extraits de *Entandrophragma angolense* (CMF= 12,5 mg/ml), *Nesogordonia papaverifera* (CMF= 25 mg/ml), *Milicia excelsa* (CMF= 25 mg/ml), *Ceiba pentadra* (CMF= 50 mg/ml), *Entandrophragma cylindricum* (CMF= 50 mg/ml), *Guarea cedrata* (CMF= 100 mg/ml), *Khaya ivoiensis* (CMF= 100 mg/ml). De plus la comparaison de nos résultats avec ceux de Zirihi *et al.* (2003) révèle que les extraits résiduels de *Mallotus oppositifolius* sont 256 fois plus actifs que l'extrait hydroalcoolique de *Microglossa pyrifolia* (CMF= 50 mg/ml). Ces extraits sont également plus actifs que les extraits de *Terminalia superba*

5 CONCLUSION

Cette étude nous a permis de montrer que tous les extraits de *Mallotus oppositifolius* possèdent une activité antifongique plus ou moins accentuée sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. A 72h d'incubation à 30°C, tous ces extraits possèdent une activité inhibitrice effective avec des valeurs variables de CMF et de CI₅₀ en fonction de l'extrait. Les extraits résiduels aqueux et totaux aqueux sont les plus actifs dans cette étude. Une

6 REMERCIEMENTS

Cette étude a bénéficié du concours du Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes (LAPM) de Grenoble en France, du Laboratoire de Biochimie de l'École Normale Supérieure (ENS) d'Abidjan, Côte

7 REFERENCES

Ackah J. A., 2004.- "Spectre anti-infectieux de MISCA-F3 sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*,

(CMF= 0,39 mg/ml) et de *Terminalia catappa* (CMF= 0,78 mg/ml) obtenu respectivement par Ahon (2014), Ackha *et al.* (2008) et Ackha (2009). En dehors de l'effet fongicide de l'extrait résiduel, les concentrations moyennes des extraits de *Mallotus oppositifolius* exercent des effets fongostatiques sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. Cela justifie donc l'utilisation de la plante en milieu traditionnel comme antimicrobien. Sur le plan de la toxicité, l'extrait éthanolique de ZG04 n'a pas d'effet toxique sur les cellules humaines que ce soit les cellules confluentes ou les cellules en division. On constate qu'on a une légère hausse du taux de viabilité dès 125 µg/ml. Cette hausse est de 156 % à la concentration de 1000 µg/ml pour les cellules en division, et de 131% pour les cellules confluentes. Cela suggère qu'il y'a dans l'extrait éthanolique une ou plusieurs molécules bénéfiques pour le métabolisme des cellules. La CI₅₀ de l'extrait éthanolique de ZG04 sur *Candida albicans* est de 585 µg/ml, à cette concentration-là, on peut affirmer que cette plante n'est pas toxique pour les cellules humaines.

analyse plus poussée des extraits par fractionnement bio guidée, nous permettra d'isoler les différentes molécules de l'extrait résiduel aqueux afin de préciser la nature des molécules actives. Les résultats de la cytotoxicité pourraient en partie expliquer l'utilisation sans danger, par voie orale ou rectale des extraits de feuilles de *Mallotus oppositifolius*.

d'Ivoire que nous remercions. Nous remercions également les docteurs GNAHOUÉ Goueh, TRA Bi Otis et AMBE Alain Serge pour leur collaboration à cette étude.

Cryptococcus neoformans, *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton rubrum*".
Mémoire de DEA de biotechnologies,



- option pharmacologie-microbiologie. Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, (2004) 34.
- Ackah J. A. B., Kra A. K. M., Zirihi G. N. et Guédé-Guina F. 2008.- Évaluation et essais d'optimisations de l'activité anticandidosique de *Terminalia catappa* LINN (TEKAM3), un extrait de combretaceae de la pharmacopée ivoirienne. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 77, pp. 120 – 136.
- Ackah J. A., 2009.- «Évaluation et essai d'optimisation de l'activité antifongique de *Terminalia catappa* Linné, une combretaceae de la pharmacopée ivoirienne sur la croissance in vitro de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Trichophyton mentagrophytes*» Mémoire de thèse de biotechnologies, option pharmacologie-microbiologie. Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 205p.
- Adjanohoun E. 2000.-La biodiversité face au développement des industries pharmaceutiques africaines. In Réseau des «espèces ligneuses médicinales », Eyog Matig O, Adjanohoun E, de Souza S. et Sinsin B. (éd). Compte rendu de la première réunion du réseau tenue 15-17 décembre 1999 à la station IITA Cotonou (Bénin) ; 88-103p.
- Ahon G. M., 2014.- Évaluation et essai d'optimisation de l'activité antifongique des extraits de *Terminalia superba* Engl. Et Diels (Combretaceae) sur la croissance in vitro de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*. Thèse de Doctorat de biochimie, spécialité microbiologie. Université de Félix HOUPHOUET-BOIGNY, Abidjan, Côte d'Ivoire. 117p.
- Aké-Assi L. 1984.- Flore de la Côte d'Ivoire : étude descriptive et biogéographique, avec quelques notes ethnobotaniques. Thèse Doctorat, Université Nationale d'Abidjan, FAST, (Côte d'Ivoire), 1206p.
- Atindehou K. K., Schmid C., Brun R., Koné M.W., Traoré D., 2004. Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Côte d'Ivoire. *J. Ethnopharmacol.* 90, 221–227.
- Bagré I, Bahi C, Méité S, Djaman A J, Guédé GF, 2006.- Évaluation et Amélioration *in vitro* de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh (Rubiaceae) sur *Cryptococcus neoformans*, un champignon responsable de mycose humaine. *J Sci Pharm Biol* ; 7 : 37-46.
- Bagré I, Bahi C, Ouattara K, Zirihi GN, Djaman AJ, Coulibaly A, N'guessan JD, 2011.- Étude botanique et exploration de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh sur la croissance in vitro de *Cryptococcus neoformans*. *Phytothérapie* 9: 136–141.
- Biyiti LF, Tamze V, Nnanga N, Agbor AG, Gangouépieboji J, 2012.- Formulation d'une pommade antibactérienne à base d'un extrait éthanolique des écorces du tronc de *Tabernaemontana crassa* Benth. *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine* Vol.16.15 p.
- Chhabra, S.C., Mahunnah, R.L.A. & Mshiu, E.N., 1990.- Plants used in traditional medicine in eastern Tanzania. 3. Angiosperms (Euphorbiaceae to Menispermaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 28 : 255–283.
- Coulibaly K., 2012.- Études botanique, pharmacologique et explorations phytochimiques des extraits de *Terminalia ivorensis* et *Terminalia superba*, deux espèces ligneuses commerciales, médicinales antimicrobiennes de la forêt de Mopri. Tiassalé (sud de la Côte d'Ivoire). Thèse de Doctorat de botanique, spécialité ethnobotanique. Université de Félix HOUPHOUET-BOIGNY, Abidjan, Côte d'Ivoire 200 p.
- Coulibaly K., Zirihi G. N., Amari A. S. G., 2010.- Evaluation de l'activité anticandidosique des extraits hydro-alcooliques d'écorces de huit espèces ligneuses commerciales, de la forêt de Mopri, Tiassalé (Côte d'Ivoire). *Ethnopharmacologia*, n°46 : 81-86.



- Cromberg S., J. Beylout, M. Ray, 1988.- "Maladies infectieuses". Ed. Mason, 232-625.
- Dupont B., 1987.- "Mycoses et SIDA, Résumé des rapports, communications affichées" Institut Pasteur-Paris, 16 : 4-9.
- Goossens H., Guillemot D., Ferech M., Schlemmer B., Costers M., van Breda M., Baker L. J., Cars O., and Davey P. G., 2006.- National campaigns to improve antibiotic use. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 62 pp. 373-379.
- G. N. Zirihi, A. M. Kra et F. Guédé-Guina, 2003." Évaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (LAMARCK) O. KUNZE (ASTERACEAE) << PYMI >> sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*". *Revue de Med. et Pharm. Afr.* 17:11-18.
- Holt R., 1975.- "Laboratory test of antifungal drug". *J. Clin. Path.* 18 :767-774.
- Kra A. K. M., 2001. Évaluation et amélioration par séquençage chromatographique d'une action antifongique de MISCA contre *Aspergillus fumigatus*". Thèse. Pharma, Bioch. Univ. Abidjan, 126 pp.
- Leclerc P., Artigou C., Gagnebien S., O. De Fenoyl, J. Rochemaure, 1982.- "Aspergilloses Broncho-pulmonaires", *Revue générale poumon-cœur*, Masson Paris, 5 : 25-33.
- Mosman, T., 1983.- Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of immunological Methods* 65, 55-63.
- OMS, 2003.-Médicaments essentiels et politiques pharmaceutiques : donner un soutien au pays pour produire le manque d'accès aux médicaments. Genève : OMS (rapport annuel 2002) 20 p.
- Thes P. M., 2001.- "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. Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire 34p.
- Yao A.C., 2013.- Investigations pour un développement potentiel de nouveaux médicaments antimicrobiens à partir des extraits végétaux, inhibiteurs de la voie du méthylethritolphosphate (MEP), une des voies de biosynthèse des isoprenoïdes. DEA de Botanique, UFR Biosciences ; Université Félix Houphouët-Boigny. 58 p.