

Available online at <http://www.ifg-dg.org>

Int. J. Biol. Chem. Sci. 10(1): 23-34, February 2016

ISSN 1997-342X (Online), ISSN 1991-8631 (Print)

International Journal
of Biological and
Chemical Sciences

Original Paper<http://ajol.info/index.php/ijbcs><http://indexmedicus.afro.who.int>

Etude ethnobotanique, évaluation *in vitro* de l'activité antifongique et cytotoxique des extraits de *Enantia polycarpa* (DC) Engl. et Diels (Annonaceae)

Alain S.A. AMBE^{1*}, Djeneb CAMARA¹, Djakalia OUATTARA¹, Cynthia Y. YAPO¹,
Aimé SOUMAHORO², Guédé N. ZIRIHI¹, Kouakou E. N'GUESSAN¹

¹Laboratoire de botanique, UFR biosciences, Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY,
22 BP 582, Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

²Laboratoire de biochimie, UFR biosciences, Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY,
22 BP 582, Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

*Auteur correspondant : E-mail : ambealain@yahoo.fr; Tel : (+225)47543058

RÉSUMÉ

En Afrique subsaharienne, les écorces de *Enantia polycarpa* (DC) Engl. et Diels sont utilisés dans le traitement de nombreuses affections cutanées et digestives. Afin de justifier cette utilisation traditionnelle, la présente étude a été entreprise pour étudier le mode de préparation, d'évaluer l'activité antifongique et cytotoxique *in vitro* des écorces de *Enantia polycarpa* sur *Candida albicans* et des cellules HFF (Human Foreskin Fibroblast). Des extraits totaux aqueux (ETA), éthanolique 70% (EE70%) et résiduels aqueux (ERA) des écorces de *Enantia polycarpa* ont été préparés et testés *in vitro*. L'extrait éthanolique a montré le plus grand rendement (56,4%) et s'est avéré plus efficace sur la croissance de *Candida albicans* avec une valeur de concentration minimale fongicide (CMF) de 1,56 mg/ml et une concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) de 0,58 mg/ml, justifiant certainement l'usage de la plante en médecine traditionnelle. Le test de cytotoxicité réalisé *in vitro* sur des cellules HFF a mis en évidence des effets cytotoxiques de la plante sur les cellules humaines à des concentrations de 125 à 1000 µg/ml, suggérant ainsi la prise de précaution quant à l'emploi de cette substance végétale dans le traitement traditionnel.

© 2015 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés: Mode de préparation, *Candida albicans*, cytotoxicité, Cellules HFF ; *Enantia polycarpa*.

Ethnobotanical study, *in vitro* evaluation of antifungal and cytotoxic activity of *Enantia polycarpa* (DC) Engl. and Diels (Annonaceae) extracts

ABSTRACT

In sub-Saharan Africa, the bark of *Enantia polycarpa* (DC) Engl. and Diels are used in the treatment of numerous skin and digestive disorders. To justify this traditional use, the present study was undertaken to study the mode of preparation, to evaluate the *in vitro* antifungal and cytotoxic activity of the barks of *Enantia polycarpa* on *Candida albicans* and HFF (Human Foreskin Fibroblast) cells. Aqueous, ethanolic 70% and residual extracts of *Enantia polycarpa* stem barks were prepared and tested *in vitro*. The ethanolic extract showed the highest efficiency (56,4 pc.) and proved more effective on the growth of *Candida albicans* with a

© 2015 International Formulae Group. All rights reserved.

2530- IJBSC

DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v10i1.3>

value of minimal fungicidal concentration (MFC) of 1.56 mg/ml and an inhibitory concentration 50 pc. (IC₅₀) of 0.58 mg/ml, justifying the use of the plant in traditional medicine. The test of cytotoxicity realized *in vitro* on HFF cells highlighted cytotoxic effects of the plant on human cells in concentrations from 125 to 1000 µg/ml, so suggesting some precautions as for the use of this plant substance in the traditional treatment.
© 2015 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: Mode of preparation, *Candida albicans*, cytotoxicity, HFF cells; *Enantia polycarpa*.

INTRODUCTION

Avec environ 17 millions de victimes chaque année, les maladies infectieuses demeurent la principale cause de mortalité dans le monde. L'Afrique, qui représente les deux tiers de la charge de cette mortalité, est le continent qui paie le plus fort tribut (Gangoué-Piéboji et al., 2005 ; OMS, 2006). Ces maladies infectieuses constituent donc une préoccupation importante de santé publique à cause de leur fréquence et de leur gravité. Parmi les maladies infectieuses les plus courantes, on note celles d'origine fongique dues à des germes du genre *Candida*, qui est responsable des candidoses dont 54,3% sont dues à l'espèce *albicans*. Ce dernier est une cause importante de mortalité chez les patients immunodéprimés tels que les patients atteints du Sida et ceux sous thérapies immunosuppressives (Lagane, 2007). Au niveau thérapeutique, il existe plusieurs antifongiques. Cependant, certaines de ces molécules antifongiques présentes sur le marché et utilisées en thérapeutique ont perdu de leur efficacité à cause des phénomènes de résistance. Ces difficultés prennent aussi en compte le coût élevé des médicaments modernes, hors de portée donc pour des populations africaines à revenus modestes (Ahon, 2014). De ce fait, ces populations ont de plus en plus recours aux plantes médicinales pour se soigner. Selon le rapport annuel de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 80% de cette population utilisent les plantes pour se soigner (OMS, 2003 ; Elujoba et al., 2005). Mais l'usage abusif de ces plantes les expose à divers accidents parce qu'en plus des principes actifs, les médicaments traditionnels

contiennent d'autres molécules dont certaines ont des effets toxiques.

Enantia polycarpa (DC) Engl. et Diels est une espèce Guinéo-congolaise distribuée depuis la Sierra Leone jusqu'au Nigeria et l'Ouest du Cameroun. Elle est particulièrement abondante en Côte d'Ivoire et en Sierra Leone. C'est un arbuste de sous-bois des forêts denses sempervirentes. L'écorce de tige est utilisée dans le traitement traditionnel de la fièvre typhoïde, du paludisme, de la trypanosomiase, de la diarrhée et de diverses affections oculaires en Côte d'Ivoire (Atindehou et al., 2004 ; Bolou et al., 2011 ; Ambé et al., 2015). Au Nigéria, l'écorce de tige de la plante est également utilisée pour traiter le paludisme, les ulcères, la lèpre et les plaies (Anosa et al., 2014). Les études pharmacologiques réalisées sur les extraits des écorces de *Enantia polycarpa* ont montré une variabilité d'activité antimicrobienne sur *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, et *Klebsiella pneumoniae* (Ajali, 2000).

Bien que des études antimicrobiennes aient été menées sur cette plante, il est à noter que celles relatives aux activités antifongiques sont rares en particulier sur *Candida albicans*, un champignon très pathogène (responsables des candidoses cutanées et digestives) redouté chez les sujets immunodéprimés. Pour corriger cette insuffisance, la présente étude se propose alors d'étudier les modes de préparation des écorces de *Enantia polycarpa*, d'évaluer son activité antifongique *in vitro* sur *Candida albicans* et d'étudier la toxicité des extraits de cette plante *in vitro* en culture cellulaire sur des cellules HFF (Human Foreskin Fibroblast) afin de valider en partie son usage en médecine traditionnelle.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Matériel végétal

Le matériel végétal était une poudre végétale obtenue à partir des écorces de *Enantia polycarpa*.

Matériel biologique

Le matériel biologique était constitué d'une souche de *Candida albicans* (un champignon opportuniste responsable en grande partie des candidoses) et des cellules HFF (Human Foreskin Fibroblast). La souche de *Candida albicans* nous a été fournie par le service de mycologie de l'UFR des Sciences Médicales de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY (Abidjan, Côte d'Ivoire). Elle a été isolée chez un patient en provenance du service des maladies infectieuses. Quant aux cellules HFF, nous avons utilisé des cellules confluentes et des cellules en division. Elles ont été fournies par le Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes (LAPM) de Grenoble en France. Ces cellules ont la particularité de former un tapis cellulaire après plusieurs jours de culture (4 jours soit 96 heures), 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 (cellules en division). Ces cellules sont utilisées dans plusieurs laboratoires de recherches pour l'évaluation de la cytotoxicité des substances d'intérêt thérapeutique.

Méthodes

Enquête ethnobotanique

Une enquête ethnobotanique a été conduite dans les marchés de Yopougon, Abobo, Adjamé et Port-bouët, quatre communes d'Abidjan sur le mode de préparation des écorces de *Enantia polycarpa*.

Collecte de la plante

Les écorces de *Enantia polycarpa* ont été récoltées en janvier 2014 au Sud de la Côte d'Ivoire, dans la sous-préfecture de Yakassé-Méh (région de l'Agnéby).

L'identification de cette plante a été faite à l'aide des flores de Aké-Assi (2001 ;

2002) et Arbonnier (2000) et la vérification au Centre National de Floristique (CNF). Après la récolte, les écorces ont été débarrassées des impuretés, séchées à l'ombre et à l'air libre pendant deux à trois semaines puis pulvérisées à l'aide d'un broyeur électrique de marque IKA. La poudre fine obtenue a été conservée dans un bocal en verre pour éviter les moisissures.

Préparation des extraits

Les extraits ont été préparés suivant la méthode mise au point par Zirihi et al. (2003). Préparation des extraits totaux : La poudre obtenue a été extraite selon la méthode de Zirihi et al. (2003) comme suit, cent grammes (100 g) de poudres ont été extraits dans un litre d'eau distillée, par broyage dans un Mixeur Blinder de type Moulinex pendant 10 à 15 minutes. L'homogénat obtenu a été filtré successivement sur du coton hydrophile puis sur du papier Wattman 3 mm. Après filtration, le volume du filtrat obtenu a été séché par évaporation dans une étuve de type Venticell à 60 °C. La poudre ainsi obtenue constitue l'extrait total aqueux (codifié ETA_{AD01}).

Préparation des extraits par partition Ethanol / Eau : cinq grammes (5 g) de l'extrait total aqueux (codifié ETA_{AD01}) ont été dissouts dans 100 ml d'une solution hydroalcoolique (70% Ethanol + 30% Eau distillée) pendant 10 à 15 minutes dans un Mixeur Blinder de type Moulinex. A l'aide d'une ampoule à décanter la phase hydroalcoolique et le dépôt ont été séparés (Zirihi et al., 2003 ; Coulibaly, 2012). La phase hydroalcoolique a été séchée à l'étuve de type Venticell à 60 °C. La poudre obtenue a été l'extrait éthanolique 70% (codifié EE70%_{AD01}). Le dépôt aqueux résiduel a été récupéré puis séché à l'étuve de type Venticell à 60 °C. La poudre obtenue a été l'extrait résiduel aqueux (codifié ERA_{AD01}).

Ces extraits ainsi obtenus ont été pesés dans l'optique d'évaluer leur rendement. Ils ont été ensuite conservés dans des bocaux en verre stériles à -4 °C en vue de leur utilisation future. Au total, trois extraits végétaux ont été réalisés.

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 : $R = m / M \times 100$

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

Préparation du milieu de culture

Quarante-deux (42) grammes de gélose en poudre du milieu Sabouraud Chloramphénicol Agar (HIMEDIA / Réf: M 1067-500G Lot 0000215703) ont été solubilisés jusqu'à homogénéisation complète dans mille (1000) ml d'eau distillée, sur un agitateur magnétique IKA-MAG RCT. La solution obtenue constitue le milieu de culture. Le milieu ainsi préparé est coulé dans des séries de 10 tubes numérotés de 1 à 10 à raison de 20 ml dans le tube T₁ et de 10 ml dans les autres tubes (allant du T₂ à T₁₀). Pour ces séries, on note deux tubes témoins contenant chacun 10 ml du milieu de culture. L'un des tubes sert de témoin de contrôle de la croissance des germes et l'autre de témoin de contrôle de la stérilité du milieu de culture (Ahon, 2014 ; Coulibaly, 2012 ; Thès, 2001).

Incorporation des extraits végétaux à la gélose

L'incorporation des extraits végétaux à la gélose a été réalisée selon la méthode de la double dilution en tubes penchés (Guédé-Guina et al., 1997 ; Zirihi et al., 2003 ; Ackah et al., 2008). Chaque série comportait 10 tubes tests contenant l'extrait végétal incorporé au milieu de culture et 2 tubes témoins dont un sans extrait végétal pour le contrôle de croissance des germes, l'autre sans extrait végétal ni germe pour le contrôle de la stérilité du milieu de culture. Les tubes tests contenaient des gammes de concentrations décroissantes des extraits qui variaient de 50 mg/ml à 0,097 mg/ml avec une liaison géométrique de raison un demi. Pour réaliser la double dilution, 1g d'extrait végétal a été homogénéisé dans 20 ml de gélose Sabouraud préalablement préparé dans le tube T₁ (portant la plus forte concentration : 50 mg/ml). Puis la moitié du volume de ce mélange homogène a été transférée dans le tube suivant (T₂),

contenant au préalable 10 ml de gélose Sabouraud et homogénéisée. Cette opération a été répétée successivement pour les autres tubes jusqu'au tube 10 (T₁₀), comportant la plus faible concentration (0,097 mg/ml) ; pour ce dernier la moitié du volume du mélange est rejetée. Les tubes ainsi préparés ont été stérilisés à 121 °C à l'autoclave pendant 15 mn et inclinés avec petit culot à la température du laboratoire pour permettre le refroidissement et la solidification de la gélose.

Réalisation des tests antifongiques

L'*inoculum* a été préparé à partir des cultures jeunes de *Candida albicans* (âgés de 48 heures). La suspension mère (dite 10⁰) concentrée à 10⁶ cellules /ml a été d'abord préparée, par homogénéisation d'une colonie de *Candida albicans* dans 10 ml d'eau distillée stérile. À partir de la suspension 10⁰, une seconde suspension (10⁻¹) a été préparée par dilution au 1/10^{ème} de la première. Cette dernière a été concentrée à 10⁵ cellules/ml.

Après la solidification de la gélose et la préparation de l'*inoculum*, tous les tubes (T₁ à T₁₀ et le témoin de contrôle de la croissance) sauf le témoin de contrôle de la stérilité ont été ensemencés en stries transversales avec 10 µl d'une suspension contenant environ 1000 cellules. Pour chaque série, les tests sont répétés 3 fois, pour plus de fiabilité, puis les tubes ainsi préparés ont été incubés à 30 °C pendant 72 heures. Au terme du temps d'incubation, les colonies ont été dénombrées par comptage direct. La croissance des germes dans les différents tubes expérimentaux de chaque série a été exprimée en pourcentage de survivance, calculé par rapport à 100% de survivance dans le tube témoin de contrôle de croissance selon la formule (Guédé-Guina et al., 1997; Zirihi et al., 2003 ; Ackah, 2004) :

$$S = n / N \times 100$$

n = nombre de colonies dans le tube expérimental ; N = nombre de colonies dans le tube témoin ;

S = survivance des germes (en %).

Le traitement des données expérimentales a permis de déterminer les paramètres antifongiques (CMI, CMF, CI₅₀).

Pour vérifier la fongicidie 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 heures. A la fin du temps d'incubation, chaque extrait a été évalué comme étant fongicide si aucune colonie ne germe, dans le cas contraire l'extrait végétal est déclaré fongistatique (Coulibaly, 2012 ; Ahon, 2014).

Critère de comparaison des activités des extraits

La comparaison des activités des extraits a été faite sur la base des valeurs des CMF et/ou CI₅₀. Ainsi un extrait a été considéré plus actif que les autres si et seulement si la valeur de sa CMF et/ou CI₅₀ était plus faible que celles des autres (Ahon, 2014).

Réalisation des tests cytotoxiques

Le test de cytotoxicité consistait à mesurer la viabilité des cellules en culture lorsqu'elles sont mises en présence de nos extraits de plante. La cytotoxicité a été déterminée en utilisant le test colorimétrique MTT (Mossman, 1983).

La mesure de la cytotoxicité a été effectuée sur des cellules HFF (Human Foreskin Fibroblasts) en culture avec l'extrait éthanolique de *Enantia polycarpa*. Ces cellules ont étéensemencées dans des microplaques de 96 puits et maintenues en culture à 37 °C, sous 5% de CO₂ pendant 24 heures (cellules en division) et/ou 96 heures (cellules confluentes) à raison de 3000 à 5000 cellules par puits dans 100 µl de 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). Ces cellules ont ensuite été exposées pendant 24 heures à 100 µl de chaque concentration (125 µg/ml – 1000 µg/ml) d'extrait éthanolique 70% de *Enantia polycarpa* solubilisé dans du tampon PBS. Cela a été fait en triplicate ainsi que le témoin de contrôle de la viabilité sans extrait de

plante. La viabilité a été déterminée par ajout dans chaque puits de 500 µg/ml du bromure de 3-(4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium (MTT) et incubé pendant 3 heures à 37 °C. L'anneau de tétrazolium qu'il contenait a été réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes métaboliquement actives. La réduction a libéré des cristaux de formazan qui ont précipité et donné une couleur violette. La quantité du précipité formé est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Les cristaux de formazan ont été solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) 10 mM puis l'absorbance ou la densité optique (DO) a été mesuré. La mesure de la densité optique (DO) de chaque puits à 544 nm au spectrophotomètre Safir (Tecan) a permis de déterminer la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de viabilité par rapport au témoin de contrôle sans extrait de plante selon la formule :

$$\text{Pourcentage de viabilité} = (\text{Abs}_{544 \text{ nm}} \text{ extrait} / \text{Abs}_{544 \text{ nm}} \text{ témoin}) \times 100$$

Analyse statistique

L'analyse statistique relative à la distribution des modes de préparation a été menée avec le logiciel SPSS 12.0. Toutes les expériences ont été réalisées en triple. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD.

RÉSULTATS

Enquête ethnobotanique

Les herboristes utilisent différents modes de préparation de *Enantia polycarpa* pour le traitement traditionnel. L'eau est le solvant le plus utilisé pour la préparation des recettes et la décoction constitue le mode de préparation le plus fréquent dans les 4 communes (Figure 1).

Rendement des extraits

Les extractions des écorces de *Enantia polycarpa* ont fourni des extraits ayant des colorations variables allant de l'orange claire à l'orange relativement foncé avec une masse

moyenne de 5 g (extrait total aqueux), 2,82 g (fraction éthanologique) et 1,77 g (fraction résiduelle). Les valeurs représentant la moyenne des rendements en pourcentage de la plante étudiée varient de 5 à 56,4% (Figure 2). Ces résultats montrent que le plus grand rendement est observé avec la fraction éthanologique 70% (56,4%) et le plus faible rendement avec l'extrait aqueux (5%).

Activité antifongique des extraits de *Enantia polycarpa* (DC) Engl. et Diels

Après 72 heures d'incubation, des inhibitions nettes et effectives ont été obtenues à différentes concentrations selon les extraits. Nous avons observé comparativement au témoin une diminution progressive du nombre de colonies dans les différentes séries au fur et à mesure que la concentration de chaque extrait augmentait dans les tubes expérimentaux. A partir des données du dénombrement des colonies, dans les tubes expérimentaux, les courbes de sensibilité de *Candida albicans* en fonction de la concentration des extraits de *Enantia polycarpa* ont été tracées (Figure 3). Dans l'ensemble, toutes les courbes obtenues présentent une allure décroissante, avec des pentes plus ou moins forte selon l'extrait. Ce qui traduit une nette activité antifongique de chaque extrait de *Enantia polycarpa*. La courbe de l'activité antifongique de la fraction éthanologique 70% sur *Candida albicans* possède une pente relativement forte. Elle est suivie de celle de l'extrait total aqueux. Par contre, la courbe de l'activité de la fraction résiduelle sur la souche de *Candida albicans* a une pente relativement faible. À l'exception de la courbe de la fraction résiduelle, les 2 autres courbes, touchent l'axe des abscisses au même niveau.

Les paramètres antifongiques des différents extraits CMF (Concentration Minimale Fongicide) et CI_{50} (Concentration pour 50% d'inhibition) sont résumés dans le Tableau 1. Les plus faibles valeurs de CI_{50} (0,58 mg/ml) et CMF (1,56 mg/ml) ont été

obtenues avec la fraction éthanologique. Cela signifie que l'extrait éthanologique codifié EE70% possède une meilleure activité antifongique sur *Candida albicans*. Il est suivi de l'extrait total aqueux noté ETA avec CI_{50} (0,65 mg/ml) et CMF (1,56 mg/ml). La fraction résiduelle aqueuse est moins active que les autres extraits sur la souche de *Candida albicans*.

Cytotoxicité de *Enantia polycarpa*

La cytotoxicité de *Enantia polycarpa* a été réalisée en culture *in vitro* dans des microplaques de 96 puits, sur des cellules HFF (cellules confluentes et cellules en division) avec la fraction éthanologique 70%. Nous avons observé dans chaque puits, comparativement au témoin de contrôle sans extrait de plante *in vitro*, une diminution progressive de la coloration violette au fur et à mesure que la concentration en extrait augmentait de 125 à 1000 μ g/ml. A partir des mesures de la DO, le pourcentage de viabilité des cellules HFF en présence de l'extrait éthanologique 70% de *Enantia polycarpa* a été déterminé et représenté (Figure 4). Les diagrammes obtenus présentent une allure progressivement décroissante, selon que la cellule est confluite ou en division. Ce qui traduit une forte diminution de la quantité relative des cellules HFF vivantes. En effet, la fraction éthanologique entraîne une mortalité cellulaire supérieure à 30% pour des concentrations de 125 à 1000 μ g/mL.

Lorsqu'on compare l'activité de la fraction éthanologique 70% de *Enantia polycarpa* sur les cellules confluentes à celle des cellules en division, on constate que pour des concentrations variant de 125 à 1000 μ g/ml en extrait de plante, le pourcentage de viabilité des cellules HFF en division (varie de 67 à 55%) est plus élevé que celui des cellules HFF confluentes (varie de 52 à 36%). Cela signifie que la fraction éthanologique 70% tue beaucoup plus les cellules HFF confluentes.

Tableau 1: Valeurs des paramètres antifongiques des extraits de *Enantia polycarpa*.

Extraits de <i>Enantia polycarpa</i>	Paramètres antifongiques (mg/ml)			
	CMI	CMF	CI ₅₀	Fongicide
ETA	1,56	1,56	0,65	
ERA	6,25	6,25	1,46	Fongicide
EE70%	1,56	1,56	0,58	

ETA : Extrait Total Aqueux ; ERA : Extrait Résiduel Aqueux ; EE70% : Extrait Ethanolique 70%.

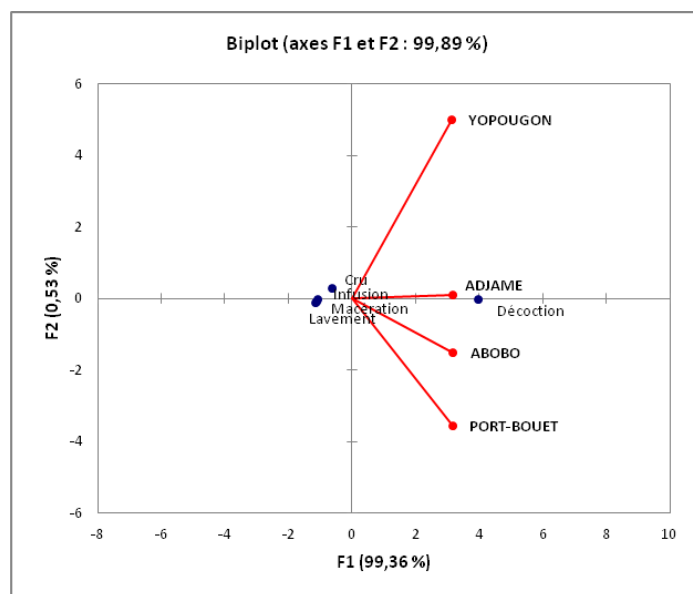


Figure 1: Distribution des modes de préparation de *Enantia polycarpa* en fonction des communes (plan 1 et 2).

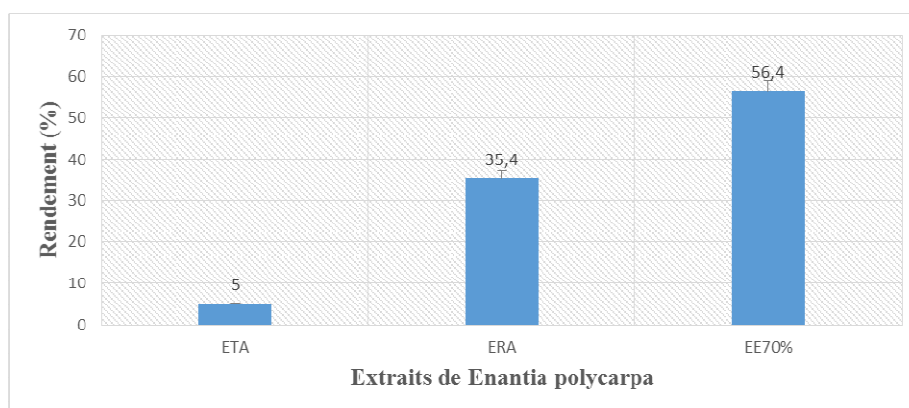


Figure 2 : Rendement des extraits de *Enantia polycarpa*. Moyenne \pm SD de trois essais ; ETA : Extrait Total Aqueux ; ERA : Extrait Résiduel Aqueux ; EE70% : Extrait Ethanolique 70%.

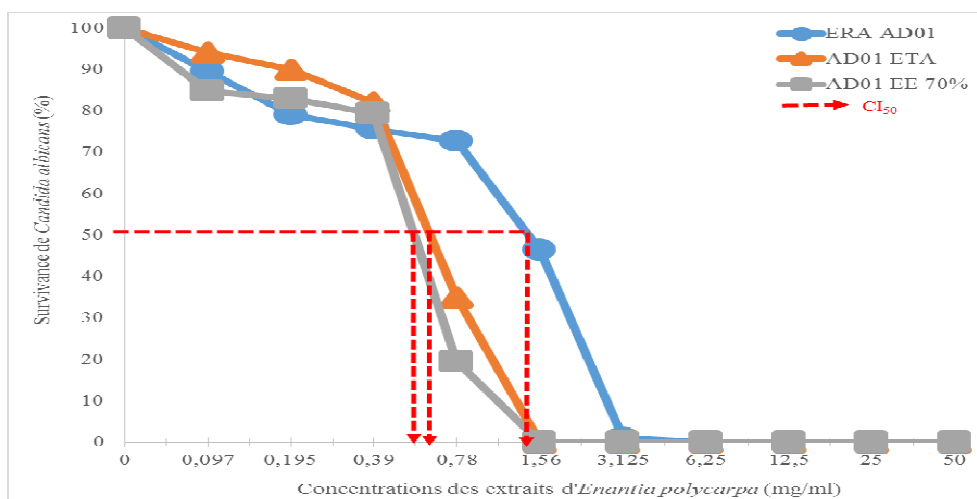


Figure 3: Courbe de l'évolution de la survivance de *Candida albicans* en fonction de la concentration des extraits de l'écorce de *Enantia polycarpa* (DC) Engl. et Diels.

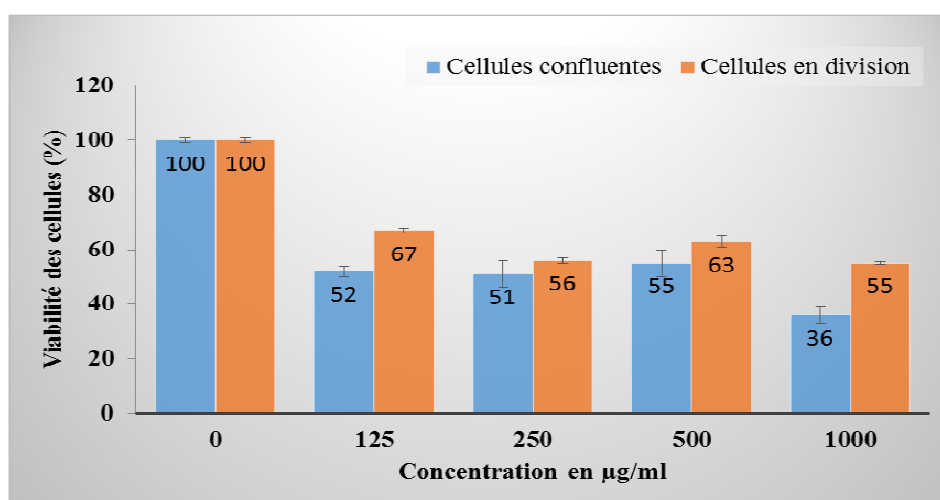


Figure 4 : Pourcentage de viabilité des cellules HFF en présence de l'extrait éthanolique 70% de *Enantia polycarpa* (moyenne \pm SD de trois essais).

DISCUSSION

La présente étude a montré que l'écorce de *Enantia polycarpa* est principalement utilisée en décoction dans le traitement traditionnel de la diarrhée. Nos résultats sont corroborés par ceux de plusieurs auteurs qui ont montré en Côte d'Ivoire (Bolou et al., 2011 ; Atindehou et al., 2004), au Nigéria et ailleurs en Afrique (Anosa et al., 2014) que

l'écorce de tige de la plante est également utilisée en décoction dans le traitement traditionnel de diverses affections. La fréquente utilisation du décocté s'explique par le fait que la décoction permet de recueillir le plus de principes actifs et atténue ou annule l'effet toxique de certaines recettes (Salhi et al., 2010). Le choix de l'écorce de tige est lié au fait que cette partie de la plante est

traditionnellement utilisée pour traiter des affections microbiennes courantes particulièrement la fièvre typhoïde, le paludisme, les ulcères, la lèpre, les plaies et la diarrhée (Bolou et al., 2011 ; Atindehou et al., 2004 ; Anosa et al., 2014 ; Ambé et al., 2015).

Les rendements des extractions par macération aqueuse et par partition éthanol/eau ont donné respectivement 5 et 56,4%. En comparant les rendements obtenus au cours de cette étude avec ceux rapportés dans la littérature, nous avons constaté que nos résultats sont différents de ceux rapportés par Konan (2015). En effet, cet auteur a montré que le meilleur rendement est obtenu avec l'extraction par macération aqueuse de l'écorce de *Terminalia glaucescens* avec 15% environ. Les différences de rendement de l'écorce pourraient s'expliquer par le lieu de récolte de l'espèce, la période de récolte et la durée de séchage.

Les tests antifongiques effectués sur *Candida albicans* ont montré que la croissance (nombre de colonies) dans les tubes expérimentaux diminuait au fur et à mesure que la concentration de chacun des extraits totaux aqueux, éthanolique 70% et résiduel aqueux augmentait dans les tubes, jusqu'à s'annuler respectivement à 1,56 mg/ml pour les deux premiers extraits et 6,25 mg/ml pour le dernier extrait. La souche de *Candida albicans* est donc sensible aux extraits de *Enantia polycarpa* selon la relation dose-réponse. Au regard de l'allure des courbes de sensibilités, la pente la plus forte est celle de la courbe d'activité de l'extrait éthanolique 70%. Elle est suivie de celle de l'extrait total aqueux, car elles sont respectivement plus proches de l'axe des ordonnées donc beaucoup plus active sur la souche fongique testée.

L'analyse des résultats avec les paramètres antifongiques (CMF et CI_{50}) des extraits de *Enantia polycarpa*, révèle que la valeur de la CMF_{ETA} est 1,56 mg/ml, celle de la $CMF_{EE70\%}$ est 1,56 mg/ml et celle de la CMF_{ERA} est de 6,25 mg/ml. Ces valeurs des CMF montrent que *Candida albicans* est sensible à tous les extraits testés. D'une

manière générale, les extraits de *Enantia polycarpa* présentent une activité très intéressante car ils inhibent fortement la croissance de *Candida albicans*.

Par ailleurs, le rapport d'efficacité établi sur la base des valeurs de CMF, montre que les extraits aqueux et éthanolique 70% sont 4 fois plus actifs que l'extrait résiduel. Cependant, la comparaison des activités de l'extrait total aqueux et de l'extrait éthanolique sur la base des CI_{50} , montre que l'extrait éthanolique 70% est plus actif que l'extrait aqueux. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les principes actifs contenus dans l'extrait éthanolique 70% ont un plus grand potentiel antifongique. En effet, le solvant de l'extrait hydroalcoolique étant constitué de l'eau et de l'éthanol permet d'extraire que les composés lipidiques de faibles et moyennes tailles, polaire, renfermant un ou plusieurs atomes d'oxygène. Par contre, l'eau seule n'extrait que de faibles quantités de composés lipidiques, sucres de grandes et moyennes tailles plus ou moins complexes. Cette différence de solvants des extraits expliquerait la différence de l'activité antifongique de nos extraits (Ahon, 2014).

Le pouvoir antifongique des extraits de *Enantia polycarpa* n'a jamais été évalué. Cependant, 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 *Enantia polycarpa* ont une meilleure activité anticandidosique 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), *Kaya ivoirensis* (CMF= 100 mg/ml). De plus, la comparaison de nos résultats avec ceux de Zirih et al. (2003) révèle que les extraits aqueux et éthanolique de *Enantia polycarpa* sont 32 fois plus actifs que l'extrait hydroalcoolique de *Microglossa pyrifolia* (CMF= 50 mg/ml). Mais moins actif que les extraits de *Terminalia superba* (CMF= 0,39 mg/ml) et

de *Terminalia catappa* (CMF= 0,78 mg/ml) obtenu respectivement par Ahon (2014) et Ackha et al. (2008). Durant toute cette expérimentation, les valeurs des CMF sont restées constantes après 72 à 120 heures soit 3 à 5 jours d'incubation, ce qui signifierait que les extraits de *Enantia polycarpa* exercent des activités fongicides sur *Candida albicans*.

Les tests cytotoxiques effectués sur les cellules HFF ont montré une diminution progressive de la coloration violette dans chaque puits. Le colorant ne pénétrant que dans les cellules vivantes, la coloration est d'autant plus faible que l'extrait de plante est cytotoxique par inhibition des cellules HFF (Irie-N'guessan et al., 2011). La forte diminution de la quantité relative des cellules HFF vivantes pourrait s'expliquer par le fait que les cellules HFF seraient tuées par l'extrait éthanolique de *Enantia polycarpa*. En effet, les extraits de plantes entraînant une mortalité cellulaire supérieure ou égale à 50% à 1000 µg/ml sont considérés comme cytotoxiques (Zirihi, 2006). Cet extrait pourrait donc contenir un composé chimique qui inactiverait la succinate déshydrogénase, une enzyme importante pour la respiration mitochondriale, dont le blocage conduirait à la mort cellulaire. L'extrait éthanolique 70% tue beaucoup plus les cellules HFF confluentes que les cellules HFF en division. Cela s'expliquerait par le fait que les cellules HFF confluentes sont des cellules statiques, qui ne se divisent plus par inhibition de contact alors que les cellules en division ont une activité métabolique plus intense qu'une cellule statique.

Ces résultats ont démontré que l'extrait éthanolique 70% de *Enantia polycarpa*, une Annonaceae de la pharmacopée ivoirienne semblerait cytotoxique contre la lignée cellulaire testée au cours des présents travaux. Ces résultats de la cytotoxicité corroborent ceux d'autres auteurs sur la même famille de plantes. Ainsi, il a été montré que les extraits des écorces de *M. tiebaghiensis*, une Annonaceae endémique de Nouvelle-Calédonie, sont fortement cytotoxiques contre les cellules embryonnaires de poumon humain ou MRC5 (Coulerie, 2012). Ces extraits ont également montré une forte activité

antifongique contre *Candida albicans*. Suggérant ainsi une certaine sécurité d'emploi de cette substance végétale dans le traitement traditionnel.

Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence le potentiel antifongique et le caractère cytotoxique de *Enantia polycarpa*. Elle a également révélé que *Enantia polycarpa* est principalement utilisé en décoction. Nous retiendrons que, tous les résidus de *Enantia polycarpa* possèdent une activité antifongique plus ou moins accentuée sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans* à 72 heures d'incubation. L'extrait éthanolique 70% a donné la meilleure activité anticandidosique et semble cytotoxique contre les cellules HFF. Nous retiendrons aussi que la méthode d'extraction qui combine l'usage d'un solvant 70% éthanol et 30% eau est la bonne combinaison qui concentre mieux les composés actifs.

Par ailleurs, une étude plus poussée par tri phytochimique suivie de chromatographie, nous permettra d'isoler les molécules actives de *Enantia polycarpa* afin de justifier ses multiples activités biologiques et ses indications thérapeutiques en médecine traditionnelle.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

Tous les auteurs ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail. Ainsi ASAA et DO ont réalisé l'enquête ethnobotanique. ASAA, CYY et AS ont effectué les tests antifongiques, DC quant à elle a réalisé le test de cytotoxicité. ASAA, DC et DO ont contribué aux travaux de recherches et à la rédaction du manuscrit. GNZ et KEN'G ont contribué par leur lecture à l'amélioration et à l'approbation de la version finale du manuscrit.

CONFLIT D'INTERET

Les auteurs déclarent qu'il n'y a pas de conflit d'intérêts.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Laboratoire Adaptation et Pathogénie des

Microorganismes (LAPM) de Grenoble en France et le Laboratoire de Biochimie de l'École Normale Supérieure (ENS) d'Abidjan, Côte d'Ivoire pour leur contribution technique dans la réalisation de ce travail.

RÉFÉRENCES

- Ackah JAB, Kra AKM, Zirih GN, Guede-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. *Bull. Soc. Roy. Scien. Liège*, **77**: 120 – 136. DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v9i2.47>
- Ackah JA. 2004. 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. Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 34 p.
- Ahon GM. 2014. Evaluation 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, Université Félix HOUPOUET-BOIGNY, Abidjan, Côte d'Ivoire, 117p.
- Ajali U. 2000. Antibacterial activity of *Enantia polycarpa* bark. *Fitoter.*, **71**(200): 315–316.
- Aké-Assi L. 2001. Flore de la Côte d'Ivoire : catalogue systématique, biogéographie et écologie. Genève. *Boissiera*, **57**: 1-396.
- Aké-Assi L. 2002. Flore de la Côte d'Ivoire : catalogue systématique, biogéographie et écologie. Genève. *Boissiera*, **58**: 1-401.
- Ambe ASA, Ouattara D, Tiebre MS, Vroh BTA, Zirih GN, N'guessan KE. 2015. Diversité des plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel de la diarrhée sur les marchés d'Abidjan (Côte d'Ivoire). *J.A.P.S.*, **26**(2): 4081-4096. <http://www.m.elewa.org/JAPS>.
- Anosa GN, Udegbunam RI, Okoro JO, Okoroafor ON. 2014. *In vivo* antimalarial activities of *Enantia polycarpa* stem bark against *Plasmodium berghei berghei* in mice. *J. Ethnopharma.*, **153**: 531–534. DOI : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.02.022>.
- Arbonnier M. 2000. *Arbres, Arbustes et Lianes des Zones Sèches d'Afrique de l'Ouest*. CIRAD: Paris; 541p.
- Atindehou KK, Schmid C, Brun R, Koné MW, Traoré D. 2004. Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Côte d'Ivoire. *J. Ethnopharma.*, **90**: 221–227. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.032>
- Bolou GEK, Bagré I, Ouattara K, Djaman AJ. 2011. Evaluation of the antibacterial activity of 14 medicinal plants in Côte d'Ivoire. *Tropic. J. Pharmac. Res.*, **10**(3): 335-340. DOI: <http://www.tjpr.org/10.4314/tjpr.v10i3.3>
- Coulerie P. 2012. Étude phytochimique et pharmacologique de plantes de Nouvelle-Calédonie à potentialités anti-dengue. Thèse, Université de la Nouvelle-Calédonie, 296 p.
- Coulibaly K. 2012. Etudes 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, Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, 200 p.
- Coulibaly K, Zirih GN, Amari ASG. 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). *Ethnopharmacol.*, **46**: 81-86.
- Elujoba AA, Odeleye OM, Ogunyemi CM. 2005. Traditional medicine development for medical and dental primary health care delivery system in Africa. *AJTAM*, **2**: 46- 61.
- Gangoué-Piéboji J, Bedenic B, Koulla-Shiro S, Randegger C, Adiogo D, Ngassam P, Ndumbé P, Hachler H. 2005. Extended-Spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Yaounde, Cameroon. *J. Clin. Microb.*, **43**: 3273-3277.
- Guédé-Guina F, Kra AKM, Vangah-Manda M, Bonga GM. 1997. Inhibition par MISCA-F2 de la croissance de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* trois germes opportunistes du SIDA. *J. Afrique Bioméd.*, **2** : 11-16.
- Irie-N'guessan AG, KABLAN BJ, Kouakou-Siransy NG, Leblais V, Champy P. 2011. Evaluation de la toxicité de cinq plantes antiasthmatiques de la médecine traditionnelle ivoirienne. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **5**(3): 1316-1319. DOI: <http://ajol.info/index.php/ijbcs>.
- Konan KF. 2015. Activité antibactérienne sur les entérobactéries productrices de β -lactamases a spectre élargi, et potentiel antioxydant *in vitro* de *Terminalia glaucescens* Planch ex Benth. (Combretaceae), une plante médicinale ouest-africaine. Thèse, Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, 183p.
- Lagane C. 2007. Rôle de l'il-13 et des ligands de PPAR- γ dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *Candida albicans*. Implication de PPAR- γ . Thèse, Université de Toulouse III, 151 p.
- Mossman T. 1983: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. immunolog. Meth.*, **65**: 55-63.
- OMS. 2006. Maladies infectieuses en Afrique. Situation et perspectives d'action. 7^{ème} Réunion du forum pour le partenariat avec l'Afrique. Moscou, Russie, 19p.
- OMS. 2003. *Médicaments Essentiels et Politiques Pharmaceutiques : Donner un Soutien aux Pays pour Réduire le Manque d'Accès aux Médicaments*. OMS: Genève, Suisse ; 20p.
- Salhi S, Fadli M, Zidane L, Douira A. 2010. Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). *Laza.*, **31**: 133-146 DOI:10.5209/rev_LAZA.2010.v31.9.
- Thès PM. 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.
- Zirihi GN. 2006. Eudes botanique, pharmacologique et phytochimique de quelques plantes médicinales anti-paludiques et/ou immunogènes utilisées chez les bété du département d'Issia, dans l'ouest de la Côte-d'Ivoire. Thèse, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 199 p.
- Zirihi GN, Kra AM, Guédé-Guina F. 2003. 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**: 11-18.