



Évaluation de l'activité antifongique des extraits de *Cassia alata* L. et de *Piliostigma thonningii* (Schumach.) Milne Redh. (Fabaceae) sur *Candida albicans*

Amégninou AGBAN¹, Koffi Apeti GBOGBO², Yao Patrick HOEKOU^{1*},
Kokou ATCHOU¹, Tchadjobo TCHACONDO¹, Komlan BATAWILA²,
Comlan de SOUZA¹ et Messanvi GBEASSOR³

¹Laboratoires de Chimie, de Biologie et de Microbiologie, École Supérieure des Techniques Biologiques et Alimentaires, Université de Lomé, B.P. 1515, Lomé, Togo.

²Laboratoire de Botanique et Écologie Végétale, Faculté des Sciences, Université de Lomé, B.P. 1515, Lomé, Togo.

³Laboratoire de Physiologie et de Pharmacologie, Faculté des Sciences, Université de Lomé, B.P. 1515, Lomé, Togo.

*Auteur correspondant, E-mail: yhoekou@gmail.com

RESUME

Les activités antifongiques des extraits de *Cassia alata* L. et de *Piliostigma thonningii* (Schumach.) Milne Redh. ont été évaluées sur *Candida albicans* par la méthode de dilution en milieu liquide couplée à l'étalement sur milieu gélosé. Les résultats obtenus montrent que *C. albicans* est totalement inhibé par l'extrait éthanolique des feuilles de *C. alata* et par l'extrait au dichlorométhane des feuilles de *P. thonningii* avec des concentrations minimales inhibitrices respectives de 0,312 et 0,625 mg/ml.

© 2013 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : *Cassia alata*, *Piliostigma thonningii*, extraits de feuilles, propriétés antifongiques.

INTRODUCTION

Dans les pays en développement, près de 80% de la population rurale ont recours aux plantes médicinales pour se soigner (WHO, 2009). Cette attitude est justifiée par la culture et la civilisation ancestrales qui se basent entièrement ou partiellement sur la phytothérapie en raison de l'efficacité, de l'accessibilité, de la disponibilité, de la faible toxicité et de la tolérance des plantes (Akharaiyi and Boboye, 2010). Aussi, l'éloignement des structures de santé à certaines agglomérations, les difficultés liées aux déplacements, le coût élevé des

prestations et des médicaments conventionnels et les facteurs socio-économiques, ne laissent à une grande partie de la population rurale d'autres choix que celui de la médecine traditionnelle pour traiter leurs maladies (Bossokpi, 2002). C'est dans ce cadre que les tradithérapeutes utilisent *Cassia alata* et *Piliostigma thonningii*, deux plantes médicinales appartenant à la famille des *Fabaceae* pour traiter diverses affections. Parmi les affections les plus courantes, on note celles d'origine fongique dues aux germes fongiques comme le genre *Candida*, qui est responsable des candidoses. Ce dernier

est une cause importante de mortalité chez les patients immunodéprimés tels que les patients atteints du Sida, les patients cancéreux sous chimiothérapie ou après transplantation de moelle osseuse (Lagane, 2007).

Aujourd'hui, nombreux sont les laboratoires qui se tournent vers les plantes pour la recherche des composés actifs (Pousset, 2006). Cet intérêt particulier est motivé par la résistance permanente de certains germes aux antibiotiques classiques qui suscite la recherche de nouveaux principes actifs à base de plantes comme sources de composés pour supprimer ou si possible éradiquer définitivement les cas de résistances afin de mettre sous contrôle de nouvelles infections (Akharaiyi and Boboye, 2010). Une enquête ethnobotanique menée auprès des tradithérapeutes de la région des plateaux du Togo a montré que *C. alata* et *P. thonningii* sont utilisées pour traiter les candidoses mais toujours avec des connaissances ancestrales. Or les plantes utilisées en médecine traditionnelle doivent faire l'objet d'étude botanique, phytochimique et pharmacologique dans le but de s'assurer de leur efficacité afin de justifier leur utilisation (Pousset, 2006). Les investigations menées par bon nombre de chercheurs concernant l'évaluation des propriétés biologiques de ces deux plantes, révèlent que très peu visent l'évaluation de leur activité antifongique en particulier sur *C. albicans*. Pour corriger cette insuffisance, la présente étude se propose alors d'évaluer les propriétés antifongiques de ces deux plantes de la flore togolaise sur *C. albicans* afin de valider en partie leur usage en médecine traditionnelle.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué par les feuilles de *C. alata* et de *P. thonningii*. Ces organes sont récoltés en décembre 2007 à Kolocopé, village situé à environ 170 km au nord-ouest de Lomé suite à une enquête ethnobotanique menée auprès des tradithérapeutes de la localité. Les feuilles de ces deux plantes sont utilisées localement

dans le traitement des maladies de la peau surtout les candidoses. *C. alata* et *P. thonningii* ont été identifiées à l'herbarium du Laboratoire de Botanique et d'Ecologie Végétale de la Faculté des Sciences de l'Université de Lomé (Togo), où des échantillons d'herbier ont été déposés.

Souche microbienne

La souche fongique testée est *C. albicans*, une levure isolée du prélèvement vaginal chez une malade atteinte de candidose au Laboratoire de Microbiologie du Centre Hospitalier Universitaire Sylvanus Olympio (Togo).

Extraction

L'extraction a été réalisée dans le Laboratoire de chimie de l'Ecole Supérieure des Techniques Biologiques et Alimentaires (ESTBA) de l'Université de Lomé. La méthode utilisée est celle de la séparation par fractionnement des composés par la chromatographie sur colonne. Elle a consisté à effectuer un dépôt sur colonne, du mélange de composés à séparer, élué par le système de solvants (Kaouadji et al., 1986). Il est effectué un dépôt solide de 100 g de poudre de feuilles sur gel de silice 60 élué par le système de solvant suivant :

Met-CO-Met : Et-COO-Met = 1/3 : 2/3 ; Et-COO-Me : CH₂Cl₂ = 1/2 : 1/2 ; *CH₂Cl₂ = 1 ; CH₂Cl₂ : EtOH = 1/2 : 1/2 et 1/3 : 2/3 ; *EtOH = 1 ; EtOH : H₂O = 1/2 : 1/2 et 1/4 : 3/4 ; *H₂O = 1.

* Composés testés

Les filtrats obtenus sont concentrés en faisant évaporer totalement les solvants au Rotavapor BÜCHIR-114 pour obtenir des extraits secs.

Tests antifongiques

Les tests antimicrobiens ont été effectués selon la technique décrite par de Souza et al. (1993) ; et reprise par Hoekou et al. (2012).

Préparation de la suspension microbienne

Une colonie de 24 heures est prélevée à l'aide d'une anse stérile et inoculée dans 10

ml de bouillon Sabouraud. Un prélèvement d'une aliquote de 1 ml de cette suspension bien homogénéisée est effectué et dilué à 10^{-3} dans du bouillon Sabouraud pour avoir la suspension microbienne qui a servi à la réalisation des tests. Dix (10) μ l de cette suspension ont été ensemencés par étalement sur gélose Sabouraud Chloramphénicol. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 48 heures puis les colonies sont dénombrées en vue de déterminer la charge microbienne qui est mise en contact des extraits.

Préparation de la solution d'extrait

Les extraits testés : l'extrait dichlorométhanique, l'extrait éthanolique et aqueux ont servi à préparer des solutions de concentration 10 mg/ml, qui ont été stérilisées par filtration à l'aide de seringues-filtre sur membrane millipore 0,22 μ m. La stérilité des solutions d'extraits a été vérifiée en ensemencant des aliquotes de chaque solution sur les géloses : Mueller Hinton incubée à 37 °C pendant 24 heures et Sabouraud Chloramphénicol incubée à 30 °C pendant 48 heures.

Test présomptif

La méthode de dilution en milieu liquide couplée à l'étalement sur milieu gélosés a été utilisée comme décrite par Souza et al. (1993), et reprise par Hoekou et al. (2012). Le test présomptif consiste à utiliser une seule concentration des extraits pour identifier les extraits actifs. L'essai a été constitué en introduisant dans un tube à hémolyse stérile, 0,5 ml de l'extrait à tester et 10 μ l de la suspension microbienne. Dans le tube témoin, l'extrait a été substitué par 0,5 ml de bouillon Sabouraud stérile. Un témoin positif a été réalisé dans les mêmes conditions en utilisant la nystatine (10 μ g/ml). Les tubes ainsi constitués sont incubés à 30 °C pendant 48 heures puis les essais et les témoins sont étalés sur milieu gélosé Sabouraud Chloramphénicol à raison de deux boîtes par tube. Les milieux sont ensuite incubés à 30 °C pendant 24 à 48 heures. Les colonies sont alors comptées sur chaque boîte et les pourcentages d'inhibition sont calculés par

rapport au témoin négatif selon la formule :

$$PI = 100 (1 - X / Y)$$

PI : Pourcentage d'inhibition. ; **X** : nombre de colonies du germe dénombré sur la boîte test.

Y : nombre de colonies du germe dénombré sur la boîte témoin.

Test pour l'établissement de la courbe de sensibilité

Ce test dépend des résultats du test présomptif et a été effectué lorsque le test présomptif a révélé que l'extrait inhibe totalement le germe étudié. A partir d'une solution mère, une série de dilutions successives par progression géométrique de raison 2 a été effectuée de manière à obtenir une gamme de concentrations finales dans les tubes, comprise entre 10 et 0,156 mg/ml. La procédure reste la même que pour le test présomptif.

Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI a été déterminée pour les extraits au dichlorométhane de feuilles de *P. thoningii* et à l'éthanol de feuilles de *C. alata* ayant induit l'inhibition totale de la croissance de *C. albicans* ; à l'œil nu, et correspond donc à la plus faible concentration de l'extrait pour laquelle aucune croissance n'est visible.

RÉSULTATS

Rendements d'extraction

Les résultats d'extraction des feuilles de *C. alata* et de *P. thoningii* sont consignés dans le Tableau 1. Sur 100 g de poudre de feuilles, les rendements sont respectivement de 0,40% ; 0,80% et 0,20% pour les extraits dichlorométhanique, éthanolique et aqueux de *C. alata*. Les aspects des extraits sont pâteux (dichlorométhane), friable (éthanol) et poudreux (aqueux). Les extraits au dichlorométhane et à l'éthanol ont une couleur noir vert. L'extrait aqueux a une couleur marron vert. La couleur verte persiste dans tous les extraits à cause de l'abondance de la chlorophylle qui masque ainsi l'apparition des pigments des composés extraits par le dichlorométhane, l'éthanol et l'eau. Le rendement d'extraction par l'éthanol est plus important par rapport aux autres solvants. Sur

100 g de poudre de feuilles de *P. thonningii*, les rendements en pourcentage sont respectivement de 0,30 ; 2,80 et 2,40 pour les extraits dichlorométhanique, éthanolique et aqueux. Les trois extraits ont un aspect pâteux. L'extrait au dichlorométhane a une couleur verte foncée, celle de l'éthanol est noire et marron pour l'extrait aqueux. Le rendement d'extraction par l'éthanol est plus important par rapport aux autres solvants.

Activités antifongiques de *C. alata* et de *P. thonningii* sur *C. albicans*

Le Tableau 2 présente les pourcentages d'inhibition des différents extraits dichlorométhanique, éthanolique et aqueux des feuilles de *C. alata* et de *P. thonningii* testés.

A la concentration de 10 mg/ml, les extraits des deux plantes testés sont actifs sur *C. albicans* avec des pourcentages d'inhibition variant de 82,40 à 100%. L'extrait éthanolique des feuilles de *C. alata* et l'extrait dichlorométhanique des feuilles de *P.*

thonningii ont inhibé totalement la croissance de *C. albicans*. L'extrait aqueux de *C. alata* a inhibé *C. albicans* à 91,79% et celui de *P. thonningii* à 97,21%. L'extrait dichlorométhanique des feuilles de *C. alata* a montré une inhibition de 94,13% contre 82,40% pour l'extrait éthanolique des feuilles de *P. thonningii* qui s'est révélé le moins actif parmi les extraits testés. La drogue de référence testée, la nystatine à 10 µg/ml a montré également une inhibition totale.

Le Tableau 3 nous montre l'effet des séries de dilutions successives des extraits éthanolique des feuilles de *C. alata* et dichlorométhanique de *P. thonningii*. Les extraits ont totalement inhibé la croissance de *C. albicans* jusqu'à la concentration de 0,312 mg/ml pour l'extrait éthanolique de *C. alata* et 0,625 mg/ml pour l'extrait dichlorométhanique de *P. thonningii*. Les CMI déterminées sont respectivement de 0,312 mg/ml et 0,625 mg/ml pour l'extrait éthanolique des feuilles de *C. alata* et l'extrait dichlorométhanique des feuilles de *P. thonningii*.

Tableau 1: Rendements des extraits de feuilles de *C. alata* et de *P. thonningii*.

	<i>C. alata</i>			<i>P. thonningii</i>		
	Aspect	Couleur	Rendement (%)	Aspect	Couleur	Rendement (%)
Dichlorométhane	Pâteux	Noir vert	0,40	Pâteux	Vert foncé	0,30
Ethanol	Friable	Noir vert	0,80	Pâteux	Noir	2,80
Eau	Pâteux	Marron	2,40	Pâteux	Marron	2,40

Tableau 2: Activités inhibitrices des extraits de feuilles de *C. alata* et de *P. thonningii* en pourcentage d'inhibition à la concentration de 10 mg/ml.

	Extraits aqueux	Extraits éthanoliques	Extraits CH ₂ Cl ₂	Nystatine (10 µg/ml)
Ca-f	91,79	100	94,13	100
Pt-f	97,21	82,40	100	100

Ca-f : Feuilles de *C. alata* ; Pt-f : Feuilles de *P. thonningii*.

Tableau 3 : Effet des différentes dilutions des extraits éthanolique des feuilles de *C. alata* et dichlorométhanique des feuilles de *P. thonningii* sur *C. albicans* avec les CMI.

Dilutions d'extraits	Pourcentages d'inhibition (%)							CMI (mg/ml)
	0,156	0,312	0,625	1,25	2,5	5	10	
Ca-f (EtOH)	56	100	100	100	100	100	100	0,312
Pt-f (CH ₂ Cl ₂)	14	48	100	100	100	100	100	0,625

DISCUSSION

Les composés sont extraits à l'état naturel par fractionnement sur chromatographie avec le système de solvant énoncé dans la méthodologie. Les extraits secs obtenus restent semi-purifiés et leur rendement varie selon le solvant d'extraction et la plante. Pour les deux plantes, le meilleur rendement est obtenu avec l'extrait éthanolique des feuilles de *P. thonningii* (2,80%) et les extraits aqueux des deux plantes ont donné un même rendement (2,40%). Les faibles rendements sont obtenus avec les extraits au dichlorométhane (0,30% pour *P. thonningii* et 0,40% pour *C. alata*). Ces deux solvants qui ont donné de bons rendements sont ceux utilisés couramment par les tradithérapeutes pour préparer les recettes sous forme d'infusion, de macération ou de décoction. Cependant, les rendements de composés extraits et composés actifs recherchés ne seront pas forcément liés.

Les tests antifongiques réalisés sur *C. alata* et *P. thonningii* ont montré que les extraits testés ont un effet remarquable sur *C. albicans* quelle que soit la nature de l'extrait. Avec *C. alata*, l'extrait éthanolique des feuilles a inhibé totalement la croissance de *C. albicans*, l'extrait aqueux l'a inhibé à 91,79% et l'extrait dichlorométhanique à 94,13%. Ces résultats sont en accord avec ceux de Timothy et al. (2012a) qui ont trouvé que les extraits aqueux et éthanolique des feuilles de *C. alata* inhibent la croissance de *C. albicans* avec respectivement comme CMI 26,90 mg/ml et 5,60 mg/ml. Timothy et al. (2012b) ont

également prouvé que les extraits éthanolique et aqueux des feuilles contiennent des composés chimiques responsables d'activités antifongiques ; et que l'extrait éthanolique renferme d'antraquinones qui sont absents dans l'extrait aqueux. Ceci pourrait expliquer la différence entre les résultats obtenus. Somchit et al. (2003) ont par contre montré que les extraits aqueux et éthanolique des feuilles de la même plante se sont révélés inactifs sur *C. albicans*. Villaseñor et al. (2002) ont rapporté que d'autres extraits de feuilles de *C. alata* sont actifs sur *C. albicans*. D'autres organes de cette plante ont fait objet d'études antifongiques et c'est le cas de Abubacker et al. (2012) qui ont montré que l'extrait aqueux des fleurs de *C. alata* inhibe à 75% la croissance de *C. albicans* à la concentration de 10 mg/ml ; et Yusuf et al. (2012) ont montré que les extraits aqueux, éthanoliques et méthanoliques des écorces de racine de *C. alata* sont inactifs sur *C. albicans*. Selon Okooboh and Gambo (2013), les feuilles de *C. alata* constituent une source potentielle d'antibiotiques à large spectre.

C. albicans a été inhibé à 100% par l'extrait dichlorométhanique, à 97,21% par l'extrait aqueux et à 82,40% par l'extrait éthanolique des feuilles de *P. thonningii*. Ighodaro et al. (2012) ont évalué l'activité antifongique de *P. thonningii* contre *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporium* et ont trouvé que les extraits aqueux et éthanolique des feuilles de *P. thonningii* ont une faible activité inhibitrice sur ces trois souches. Daniyan et Alabaka

(2012) ont par contre trouvé que les extraits aqueux, méthanolique, et hexanolique des feuilles de *P. thonningii* sont inactifs sur *C. albicans*, mais ont prouvé que ces extraits contiennent des saponines, des tanins, et des alcaloïdes qui sont des composés reconnus pour leurs propriétés antimicrobiennes. L'activité inhibitrice trouvée ici pour ces deux plantes serait due à des composés polaires extraits notamment par le dichlorométhane, l'éthanol et l'eau qui sont des solvants polaires. Au vu de ces résultats, d'autres investigations telles que l'évaluation de la toxicité et l'isolement du principe actif restent nécessaires pour ces deux plantes lorsqu'il s'agirait de produire des médicaments traditionnellement améliorés.

Conclusion

Les substances extraites à l'eau, à l'éthanol et au dichlorométhane, des feuilles des deux plantes de la famille des *Fabaceae*, ont une activité antifongique remarquable. Les extraits testés ont inhibé fortement la croissance de *C. albicans* et les CMI ont été déterminées pour les extraits éthanolique des feuilles de *C. alata* et dichlorométhane des feuilles de *P. thonningii*. Ces résultats permettent de valider l'utilisation traditionnelle de *C. alata* et *P. thonningii* contre les candidoses par les tradithérapeutes.

REFERENCES

- Abubacker MN, Ramanathan R, Senthil Kumar T. 2008. *In vitro* antifungal activity of *Cassia alata* Linn. flower extract. *Natural Product Radiance*, **7**(1): 6-9.
- Akharaiyi FC, Boboye B. 2010. Antibacterial and phytochemical evaluation of three medicinal plants. *Journal of Natural Products*, **3**: 27-34.
- Bossokpi IPL. 2002. Études des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (*Rutaceae*). Thèse de pharmacie, Université de Bamako, Bamako, p.3.
- Daniyan SY, Abalaka ME. 2012. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Piliostigma thonningii*. *Journal of Science & Multidisciplinary Research*, **1**(2): 8-13.
- de Souza C, Ameganvi KK, Koumaglo K, Gbeassor M. 1993. Étude de l'activité antimicrobienne des extraits aqueux totaux de dix plantes médicinales. *Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines*, **2**(7): 107-115.
- Hoekou YP, Batawila K, Gbogbo KA, Karou DS, Améyapoh Y, de Souza C. 2012. Evaluation des propriétés antimicrobiennes de quatre plantes de la flore togolaise utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement des diarrhées infantiles. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **6**(6): 3089-3097.
- Ighodaro OM, Agunbiade SO, Omole JO, Kuti OA. 2012. Evaluation of the chemical, nutritional, antimicrobial and antioxidant-vitamin profiles of *Piliostigma thonningii* leaves (Nigerian species). *Res. J. Med. Plant*, **6**(7): 537-543.
- Kaouadji M, Agban A, Mariotte AM, Tissut M. 1986. Lonchocarpene, a stilbene and Lonchocarpusone, an isoflavone : two new pyranopolyphenols from *Lonchocarpus nicou* roots. *Journal of Natural Products*, **49**(2): 281-285.
- Lagane C. 2007. Rôle de l'IL-13 et des ligands de PPAR- γ dans la réponse anti-inflammatoire des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *Candida albicans*. Implication de PPAR- γ . Thèse de U.F.R. des Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse, p.6-14.
- Okooboh AM, Gambo NN. 2013. Phytochemical and antimicrobial activity of the leaf extract of *Cassia alata* Linn. *Chemistry and Materials Research*, **3**(3): 96-101.

- Pousset JL. 2006. Politiques nationales : place des médicaments traditionnels en Afrique. *Méd. Trop.*, **66**: 606-609.
- Somchit MN, Reezal I, Nur IE, Mutalib AR. 2003. *In vitro* antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. *J Ethnopharmacol*, **84**(1): 1-4.
- Timothy SY, Wazis CH, Adati RG, Maspalma ID. 2012a. Antifungal activity of aqueous and ethanolic leaf extracts of *Cassia alata* Linn. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **02**(07): 182-185.
- Timothy SY, Lamu FW, Rhoda AS, Adati RG, Maspalma ID, Askira M. 2012b. Acute toxicity, phytochemistry and antibacterial activity of aqueous and ethanolic leaf extracts of *Cassia alata* Linn. *International Research Journal of Pharmacy*, **3**(6): 73-76.
- Villasenor IM, Canlas AP, Pascua MP, Sabando MN, Soliven LA. 2002. Bioactivity studies on *Cassia alata* Linn. leaf extracts. *Phytother Res.*, **1**: 93-96.
- WHO. 2009. Traditional medicine; Available online from http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/ Accessed on December 2012.
- Yusuf D, Odiba PA, Abraham OJ, Yusuf MI. 2012. Phytochemical screening and antimicrobial properties of aqueous, ethanolic and methanolic extracts of *Senna alata* root bark. *J. Appl. Sci. Environ.*, **3**: 35-41.