

Activité Antifongique Et Flavonoïdes Issus De Sclerocarya Birrea Subsp. Caffra (A. Rich) Hochst (Anacardiaceae)

[Antifungal Activity And Flavonoïdes From Sclerocarya Birrea Subsp. Caffra (A. Rich) Hochst (Anacardiaceae)]

Bernard Anselme Ravelonjato¹, Antsatiana Vatosoa Ratsimbazafy¹, Dimbiniala Andriamamonjisoa¹, Aina Raharilavitra¹, Maminiaina Chritian. Randriamboangivonisoa¹, Stéphan Rakotonandrasana¹, Mamy Andriantsoa¹, Mahefarivo Andrianjaniaina¹.

1. Centre National d'Application de Recherches Pharmacétiques Ambodivoanjo-Ambohitato, Rue RP, Rahajarizafy Antoine de Padoue, BP 702, 101 Antananarivo, Madagascar



Résumé – Ce travail est consacré à la recherche de molécules antifongiques des rameaux feuillés du *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae). Le screening phytochimique de l'extrait hydroéthanolique a révélé la présence dans la plante de stéroïdes, flavonoïdes, tanins catéchiques et leucoanthocyanes. L'évaluation *in vitro* de l'activité des extraits bruts contre *Candida albicans* sous forme hyphale par la méthode de microdilution en milieu liquide a montré que les extraits hexanique (CMI= 125 µg.ml⁻¹) et hydroéthanolique (CMI = 62,5 µg.ml⁻¹) possèdent une activité antifongique intéressante. Le test de toxicité aiguë de l'extrait hydroéthanolique effectué sur des souris SWISS a montré que pour les doses testées allant de 50 à 250 mg.kg⁻¹, les symptômes observés pendant la période précédant la mort sont : l'hypoactivité de tous les animaux, l'apparition du phénomène de STRAUB indiquant la présence dans l'extrait à tester de composé (s) qui agirai(en)t comme la morphine. La valeur de la DL₅₀ calculée est de 75 mg.kg⁻¹ chez la souris.

Le fractionnement bioguidé de l'extrait hexanique a fourni des fractions potentiellement intéressantes pour leurs propriétés antifongiques (CMI<2 µg.ml⁻¹). L'analyse LC – MS en mode positif de la fraction V₁₀ (CMI<2 µg.ml⁻¹) a permis de suggérer la présence d'un hydroxycaffeoyl hexoside.

Le processus de fractionnement bioguidé de l'extrait dichlorométhanique a donné, entre autres, une sous fraction E₉ possédant une activité antifongique importante (CMI < 2 µg.ml⁻¹). Une analyse par LC-MS en mode positif de la sous fraction F₁ issue de la sous fraction E₉ a montré la présence de trois composés du type flavonols glycosylés : quercétine-*O*-pentoside, quercétine-*O*-rhamnoside et Kaempférol-*O*- rhamnoside.

Mots clés – *Sclerocarya birrea*, *Candida albicans*, LC-MS, antifongique, microdilution

Abstract – This work is devoted to the search for antifungal molecules of the leafy branches of *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae). The phytochemical screening of the hydroethanolic extract revealed the presence in the plant of steroids, flavonoids, catechin tannins and leucoanthocyanins. The *in vitro* evaluation of the activity of the crude extracts against *Candida albicans* in hyphal form by the method of microdilution in liquid medium showed that the hexane (CMI= 125 µg.ml⁻¹) and hydroethanolic (CMI = 62.5 µg.ml⁻¹) extracts possess interesting antifungal activity. The acute toxicity test of the hydroethanolic extract carried out on SWISS mice showed that for the doses tested ranging from 250 to 50 mg.kg⁻¹, the symptoms observed during the period preceding death are: hypoactivity in all the animals, the appearance of the STRAUB phenomenon indicating the presence in the test extract of compound(s) which would act like morphine. The calculated LD₅₀ value is 75 mg.kg⁻¹ in mice.

The bioguided fractionation of the hexane extract provided potentially interesting fractions for their antifungal properties (MIC<2 µg.ml⁻¹). The fractionation process LC – MS analysis in positive mode of the V₁₀ fraction (MIC<2 µg.ml⁻¹) allowed to suggest the presence of hydroxycaffeoyl hexoside. The bioguided fractionation of the dichloromethane extract gave, among other things, a E₉ sub-fraction with significant antifungal activity (MIC < 2 µg.ml⁻¹). LC-MS analysis of the sub-fraction F₁ from E₉ has showed the presence of three compounds of the glycosylated flavonol type: Quercetin-*O*-pentoside, quercetin-*O*-rhamnoside and Kaempferol-*O*-rhamnoside.

Keywords – *Sclerocarya birrea*, *Candida albicans*, LC-MS, antifungal, microdilution.

I. INTRODUCTION

Parmi les mycoses, la candidose causée par *Candida albicans* constitue un problème majeur de santé publique [1], [2].

Avec l'émergence des maladies qui affaiblissent le système de défense immunitaire, tel que le SIDA, ainsi que l'apparition du phénomène de résistance de souches de microorganismes aux traitements connus, les médicaments distribués sur le marché restent insuffisants face à l'incidence croissante des infections d'origine fongique. Une telle situation renforce le besoin urgent de découvrir de nouvelles molécules antifongiques présentant une meilleure sélectivité sur de nouvelles cibles biologiques et ayant les moindres effets secondaires.

La grande diversité floristique de Madagascar [3] représente une source potentielle de diversité moléculaire pour la recherche de substances fongitoxiques. Les métabolites secondaires actifs contre les champignons phytopathogènes pourraient devenir de bons candidats pour le développement de composés antimycosiques.

Sclerocarya birrea subsp. caffra (A. Rich) Hochst de la famille des Anacardiaceae est une plante autochtone non endémique de Madagascar. Des études pharmacologiques ont permis de mettre en évidence les propriétés antidiabétiques des extraits des feuilles de la plante [4], [5] [6]. Elle est utilisée en médecine traditionnelle malagasy comme antiseptique et antibiotique [7].

Les propriétés antidiarrhéique [8], anti-inflammatoire et antalgique [4],[9] ont été également démontrées.

Ce travail vise à rechercher les substances naturelles dotées d'une activité antifongique dans les rameaux feuillés de *Sclerocarya birrea*.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1.- Matériel végétal

Les rameaux feuillés de *Sclerocarya birrea*. ont été collectés dans la forêt sèche du Tsingy d'Analamangily Antsisikala avec des coordonnées géographiques 12°10'04'' de latitude sud, 049°13'00'' de longitude est et 112 m d'altitude (GPS), District Antsiranana II Région DIANA Madagascar au mois de mai 2015. La plante a été identifiée par Dr HDR RAKOTONANDRASANA Stéphane du Département Botanique et Ethnobotanique du CNARP et un spécimen d'herbier de référence GTR 115 a été déposé au Centre d'herbier de plantes médicinales de Madagascar du Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques (CNARP) et au Centre d'herbier TAN du Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza Antananarivo Madagascar.

Après la récolte, la plante a été séchée, puis broyée à l'aide d'un broyeur mécanique à hélice modèle 02, marque WILEY MILL, jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. La poudre a été conservée dans des sachets scellés et poreux à la température ambiante.

2.2 – Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique, suivant les méthodes adoptées par Fong et *al.* [10], Houghton et Raman [11], et Koffi [12] ont servi pour la détection des familles chimiques présentes dans la plante. Elles utilisent des réactifs spécifiques pour chaque famille chimique à détecter.

Les réactions de caractérisation des classes de métabolites secondaires sont menées sur un extrait hydro éthanolique EHET, préparé par chauffage au reflux de 50 g de poudre de plante pendant 1h dans le mélange éthanol / eau (80 :20) suivi d'une filtration et d'une évaporation sous pression réduite du solvant.

2.3.- Extraction et fractionnement

De poudres sèches (300 g) de rameaux feuillés de *Sclerocarya birrea* ont été extraits successivement par macération à température ambiante pendant 24h avec hexane, CH₂Cl₂ et EtOH pour donner respectivement, après filtration et évaporation des solvants sous pression réduite, les extraits hexanique EHex (5,3 g), dichlorométhanique EDCM (1,93g) et éthanolique EEtOH (5,83 g).

L'extrait hexanique EHex (3g) a subi une chromatographie sur colonne de silice éluée avec le mélange Hexane/ Acétate d'éthyle (en gradient d'éluant 10 : 0 jusqu'à 5 :5) puis avec EtOAc / MeOH/ H₂O (5 :5 :1) en mode isocratique pour donner 15 fractions notées V₁ à V₁₅.

L'extrait au dichlorométhane EDCM (1,5g) a été fractionné par chromatographie d'adsorption sur colonne ouverte de silice éluée en gradient d'éluant avec le mélange Hexane / Acétate d'éthyle (11 :1 à 5 :5) puis avec AcOEt / MeOH / H₂O (5:5:1) en mode isocratique pour donner 14 fractions notées E₁ à E₁₄. La fraction E₉ (170 mg) a été soumise à une CCM préparative de silice éluée avec le mélange AcOEt / MeOH / H₂O (15 :1 ; 15 : 0,5) pour donner trois sous fractions notées F₁ à F₃.

2.4.- Identification par LC-MS

L'analyse LC-MS a été effectuée sur l'appareillage constitué d'une chaîne Alliance Waters2695 munie d'un détecteur à barrette de diode (190-600 nm, Waters 2996) contrôlé par le logiciel Mass Lynx couplée à un spectromètre de masse TOF (Time-of-Flight) LCT-Premier Waters, équipé d'une source ESI. Les échantillons ont été injectés manuellement à la tête d'une colonne HPLC C18 X Select (Waters) (3,5 µm, 2,1 x 150 mm). Les séparations ont été menées à température ambiante avec une phase mobile constituée de deux solvants eau-acide formique 0,1 % (A) et acétonitrile (B) dans les conditions de temps et de solvants : de 0 à 20 min, 5 % à 100 % de B, puis 100 % B pendant de 20 à 30 mn, enfin, retour aux conditions initiales (5 % B) pendant une minute pour rééquilibrer la colonne avant une nouvelle injection. Pour toutes les analyses, les solvants utilisés sont de qualité HPLC (SDS, Peypin), le débit est réglé à 0,25 ml.min⁻¹, et la longueur d'onde de mesure fixée à 280 nm. Le volume d'injection varie entre 20 et 100 µl en fonction du composé ou de l'extrait injecté.

L'identification de chaque composé a été faite par comparaison avec les données de la littérature en combinant le temps de rétention et les différentes fragmentations obtenues.

2.5.- Activités biologiques

2.5.1.- Toxicité aigüe

La toxicité aigüe est l'évaluation de la concentration de l'extrait provoquant une mortalité chez l'animal par l'administration d'une dose unique Dix-huit souris swiss femelles, pesant entre 25 et 30g, sont réparties en 6 lots de 3 souris chacun. Les souris sont mises à jeun pendant 24h. Des solutions de concentration 0 mg.kg⁻¹ (S₀), 50 mg.kg⁻¹ (S₁), 100 mg.kg⁻¹ (S₂), 150 mg.kg⁻¹ (S₃), 200 mg.kg⁻¹ (S₄) et 250 mg.kg⁻¹ (S₅) d'extraits dissouts dans le DMSO à 50% ont été préparées.

Les animaux du premier lot, qui servent de témoins, reçoivent chacun 0,5 ml d'une solution aqueuse de DMSO à 50 % (S₀). Pour les cinq autres lots, 0,5 ml de la solution S_i avec i ∈ [1 ; 6] a été administrée par voie intrapéritonéale [13] à chaque animal du loti

L'heure de l'administration, les comportements des animaux traités comparés à ceux des témoins immédiatement après administration puis après 10 mn, 20mn, 24 h et 48 h ainsi que le nombre de souris mortes sont notés sur la fiche technique d'expérimentation.

2.5.1.1- Méthode de Dragstedt et Lang

La DL₅₀ est déterminée en utilisant l'équation 1, le nombre de souris mortes sont observés et notés. Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer la DL₅₀ (dose qui tue 50% des animaux traités) : la méthode de DRAGSTEDT et LANG [14] et la méthode de REED et MUENCH [15].

$$DL_{50} = \frac{50(X_2 - X_1) + X_1 Y_2 - Y_1 X_2}{Y_2 - Y_1} \quad (\text{Equation 1})$$

X₂ : la dose supérieure encadrant la DL₅₀,

X₁ : la dose inférieure encadrant la DL₅₀,

Y₁ : le pourcentage de mortalité correspondant à X₁,

Y₂ : le pourcentage de mortalité correspondant à X₂.

2.5.1.2- Méthode graphique de REED et MUENCH

La DL₅₀ est déterminée par l'intersection de deux courbes de la variation du nombre des souris survivantes en fonction de la dose injectée et de la variation du nombre des souris mortes en fonction de la dose injectée.

La classe de toxicité d'un produit est résumée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Classe de toxicité suivant Échelle de Hodge et Sterner

DL ₅₀	Indice de toxicité
Jusqu'à 1mg/kg	1 = extrêmement toxique
De 1 à 50 mg/kg	2 = hautement toxique
De 50 à 500 mg/kg	3 = modérément toxique
De 500 à 5 000 mg/kg	4 = légèrement toxique
De 5 000 à 15 000 mg/kg	5 = presque pas toxique
Plus de 15 000 mg/kg	6 = relativement inoffensif

2.5.2.- Test antifongique

L'étude vise à évaluer la sensibilité *in vitro* de souche de *Candida albicans* utilisée sous la forme hyphale. La sensibilité des souches a été évaluée par la technique de microdilution en milieu liquide pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice ou CMI (la plus faible concentration qui inhibe la croissance des souches inoculées).

La méthode de microdilution en milieu liquide utilisée est inspirée du protocole de référence décrit par le Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) et portant la référence M27-A3 [16]. L'appréciation de la croissance du germe test se fait par spectrophotométrie avec le spectrophotomètre UV – Visible, lecteur microplaque Opsys MR de marque DYNEX Technology.

La technique consiste à faire croître dans les puits d'une microplaque à 96 puits une quantité connue du germe-test dans un milieu de culture liquide et en présence ou non d'une série de concentrations du produit à tester avec leurs témoins.

Le milieu de culture utilisé est dénommé SLGG et la composition est rapportée dans le tableau 2. Un autre milieu dénommé SSGG est aussi utilisé dont la composition est consignée dans le tableau 3.

La croissance des germes se traduit par une modification de la turbidité du milieu qui est mesurée à la longueur d'onde 525 nm par un spectrophotomètre. Chaque test est réalisé en triple pour permettre le traitement statistique des résultats.

Tous les matériels qui doivent être utilisés sont stérilisés au préalable à l'autoclave et chaque manipulation est effectuée autour de la flamme d'un bec Bunsen.

Tableau 2 : Composition du milieu SLGG

	Composition	
Eau distillée	1 L	200mL
Peptone bactériologique	10g	2g
Glucose	5g	1g
Acide glutamique	0,15g	0,03g

Tableau 3 : Composition du milieu SSGG

	Composition	
Eau distillée	1 L	200mL
Peptone bactériologique	10g	2g
Glucose	5g	1g
Acide glutamique	0,15g	0,03g
Agar	17 g	0,34 g

Le test est réalisé en 4 étapes : la préparation de l'inoculum, la préparation de l'extrait à tester, le remplissage des puits de la microplaque et l'ensemencement puis le traitement des résultats.

▪ 1^{ère} étape : **préparation de l'inoculum**

Le microorganisme utilisé comme germe-test est une souche de *Candida albicans* provenant de l'American Type Culture Collection ATCC 10231 et modifiée par une méthode dite de « carbonstarvation » pour induire la transition vers la morphologie hyphale [17].

Cinq colonies bien isolées sont prélevées sur une culture préalablement effectuée en boîte de pétri sur le milieu SSGG et transférées dans 20 ml de milieu SLGG. La suspension est mise à incuber à 35 °C pendant 48 h. Avant l'utilisation, la préculture est diluée à 10⁻¹.

▪ 2^{nde} étape : **préparation de l'extrait de matériel végétal à tester**

Une solution-mère est préparée en solubilisant 5 mg de l'extrait à tester dans 1 ml du mélange DMSO/H₂O (V/V) (solution mère), la solution ainsi obtenue est bien mélangée au vortex puis stérilisée par filtration sur un filtre Millipore (diamètre des pores : 0,45 µm).

▪ 3^{ème} étape : **remplissage des puits de la microplaque et ensemencement**

La microplaque comporte 96 puits disposés en 12 colonnes numérotées de 1 à 12 et 8 lignes notées de A à H.

🧪 Les puits de la colonne 1 sont laissés vides (blanc pour le spectrophotomètre)

Les puits des lignes A, B, C et D sont remplis avec une solution mère d'un extrait E1 sous un volume de 20 µl, tandis que les puits des lignes E, F, G, et H remplis par une autre solution mère d'un extrait noté E2 avec le même volume précédent.

🧪 Les extraits sont dilués de moitié en passant d'une colonne à une autre. Ainsi les puits de la colonne 2 et de la ligne A, B, C, D, et E, F, H contiennent respectivement 20 µl de l'extrait E1 et E2.

Les puits de la colonne 3 contiennent chacun 20 µl de l'extrait E1 et E2 dilué de moitié. Une dilution de moitié en cascade de la solution mère est ainsi réalisée jusqu'à la colonne 11 ;

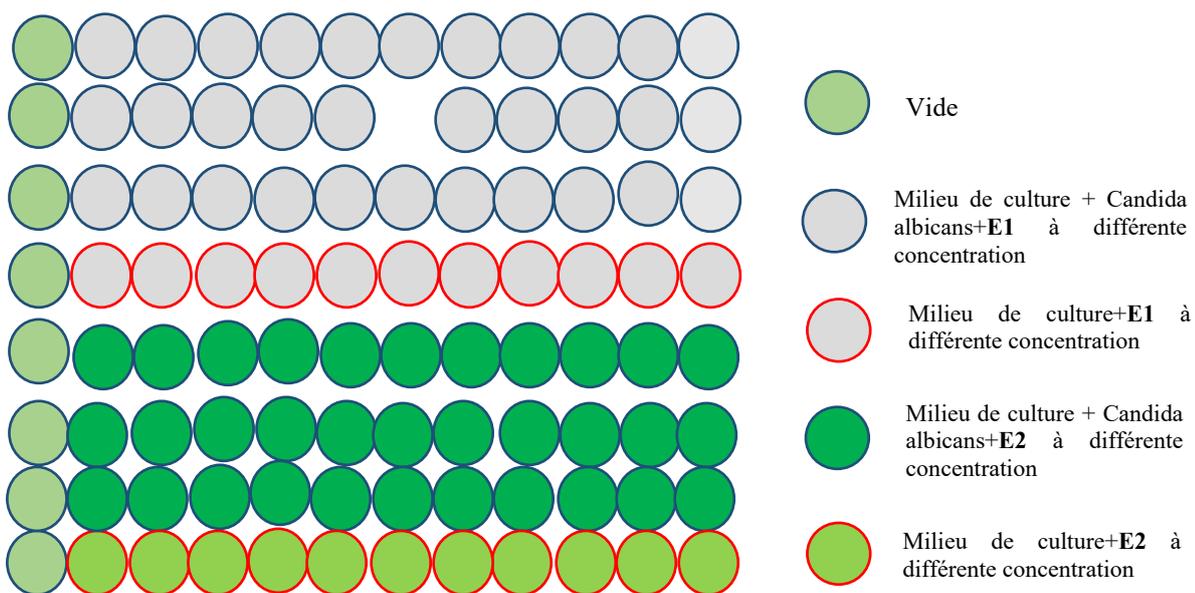
🧪 Les puits de la colonne 12 recevront uniquement 20 µl du solvant de dilution de l'extrait.

🧪 100 µl de milieu de culture ensemencé sont ajoutés dans chaque puits de la ligne ABC et EFG en partant de la colonne 2 vers la colonne 12 après une nuit de séchage de la plaque à l'étuve à 35°C.

🧪 100 µl de milieu de culture non ensemencé sont ajoutés dans chaque puits de la ligne D et H de la colonne 2 à 12. Le tout est mis en incubation à 35°C pendant 48 h.

Le remplissage des puits pour la technique de microdilution est résumé sur dans le tableau 4.

Tableau 4 : Remplissage des puits pour la technique de microdilution



▪ 4^{ème} étape : traitement des résultats (calcul de la CMI)

Les densités optiques (DO) de la culture dans chaque puits sont mesurées à l'aide d'un Photomètre lecteur de microplaque. Chaque valeur de DO obtenue en triple est comparée à celle du témoin de culture. La CMI est déterminée par la comparaison de la DO dans chaque milieu d'essai à celle du témoin de culture en utilisant le test de Student appliqué au faible effectif.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le criblage phytochimique sur un extrait hydroalcoolique a révélé la présence d'alcaloïdes à l'état de trace, de stéroïdes, flavonoïdes du type flavonol, de tanins catéchiques, leucoanthocyanes et des polyphénols.

Les rameaux feuillés de *Sclerocarya birrea* ont été extraits successivement par macération à température ambiante avec l'hexane, le dichlorométhane et l'éthanol. L'extrait hexanique a subi un fractionnement sur colonne de silice avec le mélange Hexane/ Acétate d'éthyle en gradient d'éluant puis avec EtOAc / MeOH/ H₂O (5 :5 :1) en mode isocratique pour donner 15 fractions notées V1 à V15.

3.1- Identification par LC – MS

3.1.1. Identification du composé C1

L'analyse LC-MS de la fraction V₁₀ a révélé la présence du composé C1

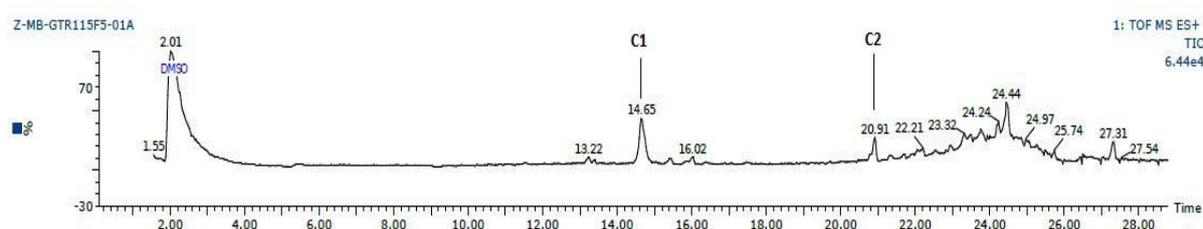


Figure 1. Chromatogramme de la fraction V10

Sur le spectre de masse en électrospray en mode positif (ESI⁺) du composé C1 relatif au pic à t_R= 14,65 min du chromatogramme de la fraction V10 (Fig 1.), un pic de base correspondant à un ion quasi-moléculaire à m/z 361[M+H]⁺ est observé suggérant une masse moléculaire de 360 uma. Le fragment à m/z 343[M+H- 18]⁺ correspond à la perte d'une molécule de H₂O. La présence du fragment à m/z 181, caractéristique d'un caféoyl, indique la perte de 162 uma correspondant à la perte d'un hexose. Le fragment à m/z 163 indique la perte d'une molécule de H₂O. L'ensemble de ces informations conduit à supposer la présence d'un hydroxycafféoyl hexoside [18],[19] du type 3,4,5-trihydroxy-6- (hydroxyméthyl) tetrahydro-2H-pyran-2-yl-3-(3,4-dihydroxyphényl)-3-hydroxypropanoate ou 3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxyméthyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl-3-(3,4-dihydroxyphényl)-2- hydroxypropanoate.(Fig 2 et Fig. 3).

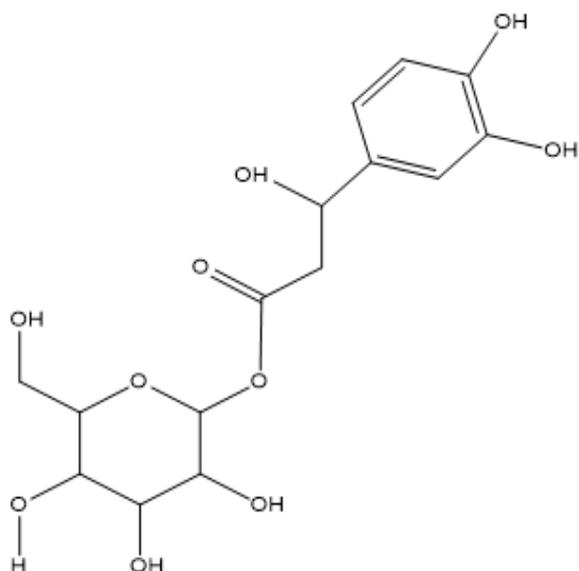


Figure 2. 3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxyméthyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl-3-(3,4-dihydroxyphényl)-3-hydroxypropanoate

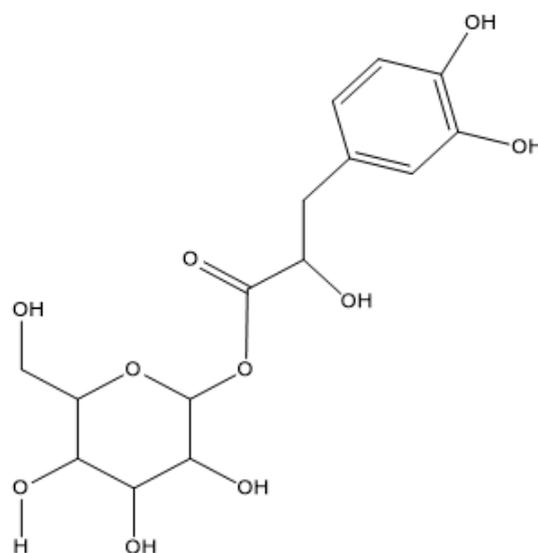


Figure 3. 3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxyméthyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl-3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-hydroxypropanoate

Tableau 5 : Identification par LC – MS du composé C1 issue de la fraction V10

Pic	t _R (min)	Masse molaire	[M+H] ⁺	Ion fils	Composé identifié
C1	14,65	360	361	343[M+H-H ₂ O] ⁺ , 181[M+H- H ₂ O- Hexose] ⁺ , 165 [M+H- H ₂ O- Hexose -H ₂ O] ⁺	Hydroxycafféoyl hexoside

3.1.2. Identification des composés issus de F1

L'analyse LC-MS de la sous fraction F₁ obtenue à l'issue d'un processus de purification de EDCM, dont le chromatogramme est présenté sur la Fig 4, a montré la présence de quatre produits notés A₁ à A₄.

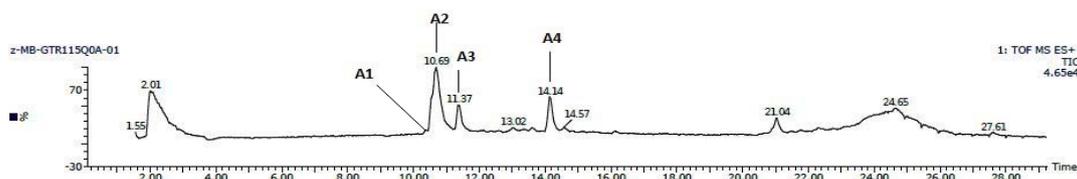


Figure 4. Chromatogramme LC – MS de la sous fraction F1

Identification du composé A1

Sur le spectre de masse en électrospray en mode positif (ESI⁺) du composé A1 correspondant au pic à t_R= 10,56 min (Fig 4.), un ion quasi-moléculaire à m/z 435[M+H]⁺ est observé suggérant une masse moléculaire de 434 uma. Le fragment à m/z 303 [M+H

– pentose] indique la présence de la génine quercétine et une perte de 132 uma. Le fragment à m/z 869 correspond à $[2M+H]^+$. Le composé A1 est identifié à un Quercétine-O-pentoside [18].

Identification du composé A2

Le pic à $t_R=10,69$ mn du composé A2 montrant un ion parent à m/z 449 $[M+H]^+$ a été identifié comme étant un Quercétine-3-O-rhamnoside au regard de l'ion fils m/z 303 $[M+H - 142]^+$ correspondant à la quercétine et indiquant la perte d'une unité rhamnose [20]. L'ion à m/z 897 correspond à $[2M + H]$.

Identification du composé A3

Le spectre de masse du composé A3 correspondant au pic à $t_R=11,37$ min exhibe un ion pseudo-moléculaire à m/z 433 $[M+H]^+$ indiquant une masse moléculaire de 432 uma. L'ion fils à m/z 287 $[M+H-Rhamnose]$ indique la présence d'un aglycone Kaempférol et d'un rhamnose. Le composé A3 est un Kaempférol-3-O-rhamnoside [20]

Tableau 6. Identification des flavonoïdes extraits de l'extrait dichlorométhane EDCM

Pic	t_R (min)	Masse molaire	$[M+H]^+$	Ion fils	Formule brute	Composé identifié
A1	10,56	434	435	303		Quercétine-pentoside
A2	10,69	448	449	303	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Quercétine-3-O-rhamnoside
A3	11,37	432	433	287	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Kaempférol-3-O-rhamnoside

3.2- Tests biologiques

3.2.1- Toxicité aiguë de l'extrait hydro éthanolique

Les extraits EHex, EDCM, EEt et EHET ont été soumis à un test préliminaire de toxicité aiguë effectué sur la dose de 250 mg.kg⁻¹ et administrés par voie intrapéritonéale sur 5 souris par extrait. Ce test a révélé que l'extrait hydroéthanolique EHETOH provoque une mortalité de 100%, tandis qu'une mortalité de 20% pour les extraits E Et et E DCM ; celle de E Hex est de 0%. Un test de toxicité approfondi est effectué sur l'extrait hydroéthanolique. L'extrait est solubilisé dans le mélange DMSO/H2O et administré chez la souris par voie intrapéritonéale (IP) sous un volume de 0,5 ml Après l'administration de l'extrait à la dose de 250 mg.kg⁻¹, une diminution progressive de l'activité motrice de l'animal a été observée dès la 10ème minute, aucun animal ne réagit au bruit et ils ne bougent que de temps en temps. L'érection de la queue (la queue est levée) ou phénomène de STRAUB) est observée pour certains animaux ; pour d'autres, lorsqu'on l'aide pour la relever, la queue adopte une position en S au-dessus du dos et reste ainsi quand on retire l'appui. L'extension des pattes postérieures pour certaines souris a été observée ; toutefois il n'y a pas de paralysie car lorsque l'animal est déposé sur une grille et qu'il est retourné, il s'accroche avec les pattes antérieures et postérieures pour ne pas tomber. L'évaluation de la DL₅₀ ou la dose qui tue 50% des animaux a mis à profit la méthode de Dragstedt et Lang ainsi que la méthode graphique de REED et MUENCH.

3.2.1.1- Méthode de DRAGSTEDT et LANG

Les effets observés sont rapportés dans le tableau 7

Tableau 7. Effets observés

Lot n°	Nombre de souris	Poids moyen	Sexe	Dose administrée (mg.kg ⁻¹)	Mortalité					
					Immédiat	10	20	24h	48h	%
1	03	30	Femelle	250				2/3	3/3	100
2	03	21,3	Femelle	200				3/3	3/3	100

3	03	20	Femelle	150				3/3	3/3	100
4	03	20	Femelle	100				2/3	2/3	66,66
5	03	18	Femelle	50				1/3	1/3	33,33
6	03	20	Femelle	0				0/3	0/3	0

X2 : dose supérieure encadrant la $DL_{50} = 100 \text{ mg.kg}^{-1}$

X1 : dose inférieure encadrant la $DL_{50} = 50 \text{ mg.kg}^{-1}$

Y1 : pourcentage de mortalité correspondant à X1 = 33,33%

Y2 : pourcentage de mortalité correspondant à X2 = 66,66%

Le calcul utilisant l'équation 1 a permis d'obtenir la valeur de DL_{50} égale à 75 mg.kg^{-1}

3.2.1.2. Méthode graphique de REED et MUENCH

La variation de la mortalité des souris est résumée dans le tableau 9 et la courbe correspondante est présentée à la Figure 5.

Tableau 9 : Variation de la mortalité des souris

Dose (mg.kg^{-1})	50	100	150	200	250
Nombre de souris testée	3	3	3	3	3
Nombre de Souris survivante	2	1	0	0	0
Nombre de Souris morte	1	2	3	3	3

La DL_{50} est évaluée à 75 mg.kg^{-1} après la projection de l'intersection des deux courbes., Les deux méthodes ont donné la même valeur de DL_{50} . D'après l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (tableau 1). EHET est classé modérément toxique ($50 \text{ mg} \leq DL_{50} \leq 500 \text{ mg}$). Les autres extraits sont moins toxiques de par leur DL_{50} supérieure à 250 mg.kg^{-1} .

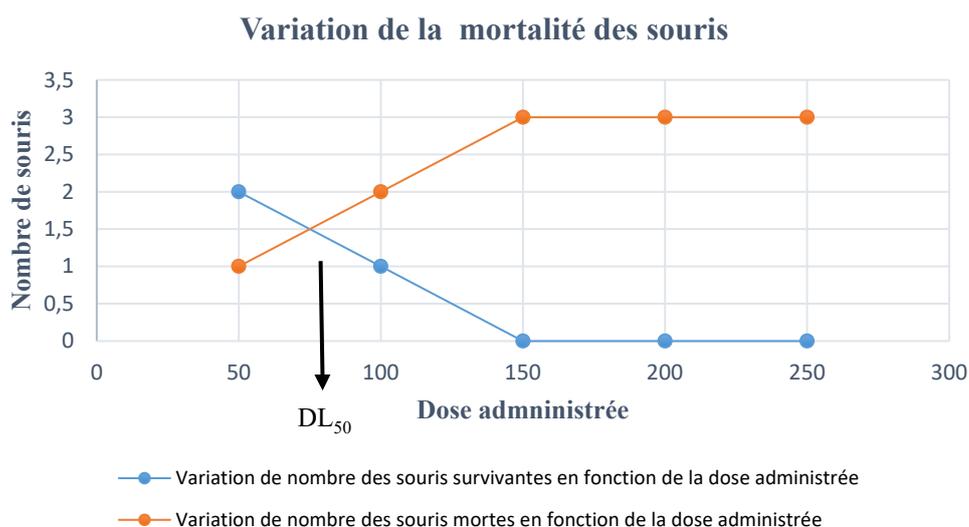


Figure 5. Détermination graphique de la DL_{50}

3.2.2 - Activité antifongique

L'évaluation *in vitro* de l'activité antifongique sur *Candida albicans* des extraits bruts a démontré que EHex (CMI= 125 µg.ml⁻¹) et EHET (CMI = 62,5 µg.ml⁻¹) présentent une activité modérée mais encourageante pour les principes actifs qu'il contient, d'autant plus qu'ils sont dilués parmi de nombreuses autres molécules inactives. EDCM (CMI= 500 µg.ml⁻¹) et EEtOH (CMI= 500 µg.ml⁻¹) sont dotés d'activité antifongique faible.

Le fractionnement bioguidé de EHex a fourni 15 fractions notées V1 à V15. La CMI des fractions V1, V2, V5, V10 et V11 est chacune inférieure à 2 µg.ml⁻¹ indiquant une forte activité antifongique. Les fractions E1, E3, E6, E9, E10 et E11 issues du fractionnement de EDCM présentent chacune une CMI inférieure à 2 µg.ml⁻¹. Il en est de même de la sous fraction F1 (CMI < 2 µg.ml⁻¹) issue de E9.

IV. CONCLUSION

Le criblage phytochimique effectué sur l'extrait hydroéthanolique a révélé la présence des métabolites secondaires de différentes polarités tels que les composés polyphénoliques comme les flavonoïdes et les tanins ainsi que les triterpénoïdes, qui sont des familles chimiques caractéristiques de la famille des Anacardiaceae. L'évaluation *in vitro* sur *Candida albicans* des quatre extraits bruts a montré que l'extrait hydroéthanolique EHET est le plus actif mais son activité est modérée (CMI = 62,5 µg.ml⁻¹). Un test de toxicité aiguë de l'extrait hydroéthanolique effectué sur souris swiss a permis d'observer l'érection de la queue chez la souris accompagnée de rigidité d'extension des membres postérieurs conduisant à avancer que l'extrait contiendrait un produit qui agirait comme la morphine, et de déterminer la valeur 75 mg.kg⁻¹ de la DL₅₀ chez la souris. L'analyse LC-MS de la sous fraction F1 issue de E9 (CMI < 2 µg.ml⁻¹) et de la fraction V10 (CMI < 2 µg.ml⁻¹) a révélé la présence de trois composés du type flavonols glycosylés : la quercétine-pentoside, la quercétine -rhamnoside et le kaempférol-rhamnoside ainsi qu'un hydroxycaffeoyl hexoside.

V. REMERCIEMENT

Nous remercions Monsieur le Pr Erwan POUPON et Monsieur Le Pr Mehdi A. Beniddir du Groupe scientifique BIOCIS de l'Université Paris –Saclay pour l'enregistrement des spectres de masse ainsi que le Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques de Madagascar.

RÉFÉRENCES

- [1] **Sk. Fridkin., Wr. Javis**, Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* vol 9 N°4, pp 499-51, 1996.
- [2] **M. A. Pfaller. and D.J. Diekema.**, Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, vol 20, pp 133-163, 2007.
- [3] **C. Rajeriarison**, Aperçu bibliographique sur l'origine et les affinités de la flore malgache. In Biogéographie de Madagascar. Lourenço W.R. Ed. ORSTOM. Paris. pp 195-203, 1996.
- [4] **JA. Ojewole.**, Evaluation of the analgesic, anti-inflammatory and anti-diabetic properties of *Sclerocarya birrea* (A. Rich.) Hochst. stem-bark aqueous extract in mice and rats *Phytotherapy Research*. pp 500- 502, 2004.
- [5] **S. Sanogo**, Etude de la phytochimie et de l'effet hypoglycémiant de trois plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle au Mali, Thèse Pharmacie, FMPOS, Université de Bamako, Mali. pp 118, 2007.
- [6] **S., Dagnoko**, Etude de la qualité des feuilles de *Sclerocarya birrea* utilisées dans le traitement du Diabète. Thèse de Pharmacie, FMPOS, Université de Bamako, Mali, pp 118, 2009.
- [7] **M. Randriamahefa, A. Rakotozafy**, Tari-dalana ahafantarana ny raokandro Malagasy (Recherche bibliographiques sur les utilisations empiriques des plantes médicinales malagasy), Boky voalohany 1ère Eds., S.N (S.l) éditeurs, pp. 213, 1979.

- [8] **J.N., Eloff**, Antibacterial activity of *Marula Sclerocarya birrea* (A. Rich.) Hochst. Subsp. *caffra* (Sond.) Kokwaro) (Anacardiaceae) bark and leaves, *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 76, N° 3, pp 305–308, 2001.
- [9] **JA. Ojewole**, Hypoglycemic effect of *Sclerocarya birrea* [(A. Rich.) Hochst.] [Anacardiaceae] stem-bark aqueous extract in rats, *Phytomedicine*, vol 10, pp 675-681, 2003.
- [10] **Fong and Farnsworth**, Phytochemical Screening, Department of Pharmacognosy and Pharmacology, Rewiev, University of Illinois, Chicago, pp 218-220, 1977.
- P. J Houghton, A. Raman, Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extracts. *Chapman et Hall, London, 1st ed*, pp 66 – 81, 1998.
- [11] **Houghton P.J. et Raman A.** Laboratory Handbook for the Fractionation of Naturals Extracts. Editions Chapman and Hall first collection, New York, NY USA, 1998.
- [12] **Koffi N'Guessan, Beugré Kadja, Guédé N. Zirihi, Dossahoua Traoré et Laurent AkéAssi**, Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire), *Sciences & Nature*, Vol 6 N°1, pp 1 – 15, 2009.
- [13] **J. Lautier**, Manuel de travaux pratiques en analyse biologiques et biochimiques en Pharmacodynamie. Université de Montpellier Département de Biologie Appliquée. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, pp 74, 1998.
- [14] **A. Dragsted, B. Lang**, Etude de la toxicité par administration unique d'un nouveau médicament, *Annales Pharmaceutiques Français*, pp11, 1957.
- [15] **M. B. Gomé, K. Kouakou, A. Touré, F. Traoré**, Etude de la toxicité aigüe et subchronique de l'extrait aqueux de *Passiflora foetida* (Passifloraceae) chez les rats et les souris, *Int. J. Biol. Chem.Sci.*, Vol 5 N°5, pp 1777 – 1789, 2011.
- [16] **H. J. Rex, D. Barbara, D. Alexander, Andes, S. Beth Arthington, D. B. Steven, Vishni Chaturvedi, A. G. Mahmoud., Ana Espinel-In Groff, Cynthia C. Knapp, Luis Ostrosky-Zeichner, Michael A. Pfaller, Daniel J Sheehan, J. W Thomas.**, CLSI Reference Method for Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts ; approved Standard-third edition. CLSI document M27-A3. Clinical and laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2008.
- [17] **A. J. P. Brown.**, Expression of growth form-specific factors during morphogenesis in *Candida albicans*, i, R.A Calderone (ed), *Candida and candidiasis*. ASM Press, Washington, D.C. pp 87-93, 2002.
- [18] **Hung-Ju Chen , Baskaran Stephen Inbaraj and Bing-Huei Chen**, Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* kitam by liquid chromatography tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique, *Int. J. Mol. Sci.*, Vol 13, pp 260-285, 2012
- [19] **M. Kajdžanoska , V. Gjamovski , M. Stefova**, HPLC-DAD-ESI-MSⁿ, Identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia, *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. Vol. 29 No. 2, pp. 181–194, 2010
- [20] **R. Kabran, J. A. Mamyrbekova-Bekro, JL. Pirat , YA. Bekro , N. Sommerer , A. Verbaere , E. Meudec**, Identification de composés phénoliques extraits de deux plantes de la pharmacopée ivoirienne, *J. Soc. Ouest-Afr. Chim*. Vol 38, pp 57 – 63, 2014