

## Potentiel antifongique de *Anogeissus leiocarpus* sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus flavus* et étude de sa cytotoxicité sur les cellules HFF

BENE Kouadio<sup>1,\*</sup>, ORSOT Bosson Arobia Marie Bernadine<sup>2</sup>, CAMARA Djeneb<sup>3</sup>, KANGA Yao<sup>2</sup>, ZIRIHI Guédé Noël<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> UFR Sciences de la Nature, Université Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire.

<sup>2</sup> UFR Sciences Biologiques, Université Péléforo Gon Coulibaly, Korhogo, Côte d'Ivoire.

<sup>3</sup> UFR Biosciences, Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY, Abidjan, Côte d'Ivoire.

Date de réception : 13 Mai 2022; Date de révision : 01 Juillet 2022; Date d'acceptation : 11 Juillet 2022

### Résumé :

*Aspergillus flavus* est un champignon qui cause la perte de nombreuses productions agricoles et est toxique pour l'homme. L'objectif de cette étude est de trouver de nouvelles substances bioactives antimicrobiennes d'origine végétale. Une enquête ethnobotanique menée dans le Département de Sandégué (Est de la Côte d'Ivoire) a révélé *Anogeissus leiocarpus* (Combretaceae), espèce médicinale très sollicitée dans le traitement des mycoses superficielles. La méthode de double dilution en tubes inclinés sur gélose Sabouraud a permis d'évaluer l'activité antifongique de l'extrait hydroéthanolique 70 % (Eeth70%) sur *Aspergillus flavus*. En vue de justifier un éventuel effet observé et de prouver l'innocuité de cet extrait, un tri phytochimique ainsi qu'une étude cytotoxique ont été effectués sur les cellules HFF. L'extrait Eeth70% testé possède un potentiel antifongique avec une CMI = 98±0 µg/mL, une CMF = 195±0 µg/mL et une CI<sub>50</sub> = 78±0 µg/mL. *Anogeissus leiocarpus* n'est pas toxique pour les cellules humaines HFF, au contraire, elle augmente leur prolifération (effet mitogénique). Le screening phytochimique a révélé la présence de métabolites secondaires tels que les polyphénols, les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes ainsi que les stérols et polyterpènes qui seraient à la base des activités observées. Ces résultats justifient bien l'usage traditionnel de *A. leiocarpus* dans le traitement des affections mycosiques. *Anogeissus leiocarpus* constitue une alternative dans la lutte biologique contre *Aspergillus flavus* productrice de l'aflatoxine B1, permettant ainsi de sécuriser la production agricole, de protéger l'environnement et de contrôler la santé des consommateurs.

**Mots clés:** *Anogeissus leiocarpus*, *Aspergillus flavus*, cellules HFF, potentiel antifongique.

### Antifungal potential of *Anogeissus leiocarpus* on *in vitro* growth of *Aspergillus flavus* and study of its cytotoxicity on HFF cells.

### Abstract:

*Aspergillus flavus* is a fungus that causes the loss of many agricultural productions and is toxic to humans. The aim is to find new antimicrobial bioactive substances of plant origin. An ethnobotanical survey conducted in the Department of Sandegue (Eastern Côte d'Ivoire) revealed *Anogeissus leiocarpus* (Combretaceae), a medicinal species in great demand in the treatment of superficial mycoses. The method of double dilution in inclined tubes on Sabouraud agar made it possible to evaluate the antifungal activity of the 70% hydroethanolic extract (Eeth70%) on *Aspergillus flavus*. In order to justify a possible observed effect and to prove the harmlessness of this extract, a phytochemical sorting as well as a cytotoxic study were carried out on the HFF cells. The Eeth70% extract tested has an antifungal potential with a MIC = 98±0 µg/mL, a CMF = 195±0 µg/mL and an IC<sub>50</sub> = 78±0 µg/mL. *Anogeissus leiocarpus* is not toxic for human HFF cells, on the contrary, it increases their proliferation (mitogenic effect). The phytochemical screening revealed the presence of secondary metabolites such as polyphenols, tannins, flavonoids, alkaloids as well as sterols and polyterpenes which would be the basis of the observed activities. These results clearly justify the traditional use of *A. leiocarpus* in the treatment of fungal diseases. *Anogeissus leiocarpus* constitutes an alternative in the biological fight against *Aspergillus flavus* producing aflatoxin B1, thus making it possible to secure agricultural production, protect the environment and control the health of consumers.

**Key words:** *Anogeissus leiocarpus*, *Aspergillus flavus*, HFF cells, antifungal potential.

### Introduction

De nombreux produits agricoles sont sujets aux attaques d'un groupe de champignons qui produit des métabolites toxiques appelés mycotoxines. Parmi ces dernières, les aflatoxines sont les plus étudiées à cause de leurs effets nocifs sur la santé des humains et des animaux (Van Egmond *et al.*, 2007). Selon le CODEX (2013), les aflatoxines sont des toxines naturelles produites par certains champignons dont les plus répandues sont le genre *Aspergillus*. Ces

germes fongiques contaminent généralement les produits alimentaires, les céréales, les graines oléagineuses, les tourteaux destinés à l'alimentation animale, les fruits, les épices de toutes sortes, le café, les fèves de cacao, les produits laitiers (Anses, 2012 ; Carvajal-Campos *et al.*, 2017). La contamination et la croissance des moisissures productrices d'aflatoxines sont favorisées par la blessure des grains ou des fruits, à tous les stades de la production Anses

(\*) Correspondance : BENE K. ; e-mail : kouadio777@gmail.com ; Tel : (+225) 07 78 75 75 88 ; 02 BP 801 Abidjan 02.

(2012). Elles sont ainsi produites tant au cours de la production agricole, de la récolte, du transport, du stockage que de la transformation des aliments. Les pertes après récolte peuvent s'élever jusqu'à 40 % de la production potentielle. Les aflatoxines représentent donc des défis majeurs pour les systèmes mondiaux dans les domaines de la sécurité alimentaire, la santé, la nutrition et l'économie (Murphy *et al.*, 2006). L'aflatoxine B1 (AFB1), représentant majeur du groupe des aflatoxines, est la plus fréquente et la plus toxique (Afssa, 2009). Elle est considérée comme l'un des plus puissants cancérigènes génotoxiques naturels et son organe cible est le foie. *Aspergillus flavus* est la principale espèce fongique productrice d'aflatoxines, uniquement du groupe B (Anses, 2012). Ce champignon, en plus d'être nocif en contaminant les produits de consommation agricole et animal, sécrète une mycotoxine. L'intoxication se réalise généralement par la consommation de ces produits contaminés et quelques fois par inhalation ou absorption cutanée des spores de ce champignon qui sont facilement disséminés dans l'air (Wagacha et Muthomi, 2008). L'exposition à des niveaux élevés d'aflatoxine peut entraîner la mort par insuffisance hépatique (Chao *et al.*, 1991). Le plus grave cas d'intoxication par aflatoxines recensé dans le monde s'est produit au Kenya en 2004. Cette intoxication a été attribuée à la consommation de maïs indigène stocké dans un environnement humide (Lewis *et al.*, 2005 ; CDC, 2014). L'exposition prolongée à de faibles niveaux d'intoxication peut être chronique et suspectée de provoquer diverses

affections telles que le cancer du foie, un retard de croissance, le kwashiorkor (malnutrition protéique) chez les enfants (Okoth et Ohingo, 2004) et une baisse de l'immunité (Njeru, 2014). Pour parvenir à bout de ce champignon, la lutte chimique reste la méthode la plus efficace, malgré ses nombreux effets néfastes pour l'environnement, la conservation de la biodiversité et surtout la santé du consommateur (Orsot *et al.*, 2016). Une alternative de lutte s'avère donc plus que nécessaire ; et la lutte biologique, par l'utilisation des substances naturelles d'origine végétale est celle qui est de plus en plus recommandée.

Vue les pertes de rendement due par *Aspergillus flavus* dans l'agriculture et les multiples affections sévères liées à la production d'aflatoxines, surtout, du type B1 pouvant causer la mort, il convient de rechercher de nouvelles molécules bioactives permettant de lutter efficacement contre cette moisissure. Ainsi, dans le but de trouver de nouvelles substances bioactives d'origine végétale capables de lutter efficacement contre *Aspergillus flavus*, une étude ethnobotanique des plantes médicinales a été menée dans le Département de Sandégué (District du Zanzan, Côte d'Ivoire). L'enquête a permis de révéler divers usages de *Anogeissus leiocarpus* (DC.) Guill. & Perr. (Combretaceae) en médecine traditionnelle pour traitement des mycoses. L'extrait éthanolique 70% de cette espèce a servi à l'évaluation du potentiel antifongique contre *Aspergillus flavus* et à l'étude de la cytotoxicité sur les cellules HFF.

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* (Combretaceae). L'identification de l'espèce végétale a été faite selon Angiosperm Phylogeny Group (APG IV, 2016).

### 1.2. Germe fongique testé

Il s'agit d'un isolat fongique : *Aspergillus flavus*. Le germe codé MY1931714, provient du laboratoire de mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). Il a été prélevé le 05/07/2019 à partir d'une biopsie chez un patient de sexe féminin souffrant d'une otomycose résistante au traitement usuel.

### 1.3. Matériel technique

Il était constitué entre autres d'appareil (Balance de précision, étuve, spectrophotomètre, blender, ...), de verrerie et petits matériels (Erlenmeyer,

bécher, tubes à essai, éprouvettes, pipettes, spatule, papiers filtre watchman...) ainsi que de solvants et réactifs (Eau distillée, éthanol pur, révélateurs comme chlorure d'aluminium, Borntrager, Liebermann, Dragendoff, Bouchardat et Chlorure de fer III).

## 2. Méthodes

### 2.1. Préparation de l'extrait éthanolique 70%

Les écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* ont été récoltées, rincées à l'eau puis découpées et séchées à l'abri du soleil. Ces écorces séchées ont été pulvérisées en poudre fine grâce à un broyeur électrique IKA-MAG RTC. L'extraction des principes actifs a été faite selon la méthode de Zirihi *et al.* (2003) couplée à la méthode par épuisement qui a consisté à faire passer plusieurs fois le mac dans le solvant d'extraction.

Ainsi, 100 g de poudre de drogues ont été homogénéisés dans un (1) litre d'un mélange éthanol/eau dans les proportions 70/30 dans un Blender (Mixer) de marque Life's Superb (LS-317) à température ambiante. L'homogénat obtenu a été filtré successivement sur un carré de tissu blanc, sur du coton hydrophile puis sur du papier Wattman. À l'aide d'une étuve réglée à 40 °C, le mélange de solvant d'extraction a été éliminé et l'évaporat sec a été récupéré sous forme de poudre puis codifié extrait éthanolique 70% (Eeth70%).

## 2.2. Tri phytochimique

Pour justifier les activités pharmacologiques éventuelles de *Anogeissus leiocarpus*, un tri phytochimique a été effectué afin de déceler quelques grands groupes de métabolites secondaires contenus dans l'extrait hydroéthanolique de cette plante. Les groupes chimiques, ont été caractérisés avec les différents réactifs selon les méthodes par réactions colorées classiques.

### - Stéroïdes et polyterpènes

Le réactif de Liebermann a été utilisé pour mettre en évidence les stéroïdes et polyterpènes. En effet, cinq mL d'extrait de plante ont été évaporés à sec dans une capsule sur bain de sable. Le résidu est dissout à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique. Au triturat obtenu, ajouter 0,5 mL d'acide sulfurique concentré. L'apparition à l'interphase d'un anneau pourpre et violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive.

### - Polyphénols

La mise en évidence des polyphénols a été effectuée par l'utilisation du chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ). Pour ce faire, à 2 mL de solution d'extrait végétal, ajouter une goutte de solution alcoolique de chlorure de ferrique à 2 %. L'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée indique la présence des polyphénols.

### - Flavonoïdes

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à tester, ajouter 1ml d'acide chlorhydrique (HCl) et 3 copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rouge ou jaune révèle la présence des flavonoïdes.

### - Tanins catéchiques et galliques

Les tanins catéchiques ont été identifiés à l'aide du réactif de Stiasny (Formol 30 %, HCL concentré : 1/0,5). A 0,1 mg d'extrait végétal, 15 mL de réactif de Stiasny ont été ajoutés. Le mélange est maintenu au bain marie à 80 °C pendant 30 minutes. L'observation d'un précipité en gros flocons caractérise la présence de tanins catéchiques.

Les tanins galliques ont été confirmés par l'utilisation de chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ). En effet, le filtrat obtenu en mélangeant 0,1 mg d'extrait végétal et 15 mL de réactif de Stiasny a été saturé d'acétate de sodium, puis additionné de 3 gouttes d'une solution alcoolique de  $\text{FeCl}_3$  à 2 %. L'apparition d'une coloration bleu-noir intense dénote la présence de tanins galliques.

### - Alcaloïdes

Pour mettre en évidence les alcaloïdes, les réactifs de Dragendoff (réactif de l'iodobismuthate) et de Bouchardat (réactif iodoioduré) ont été utilisés. En effet, 6 mL de l'extrait ont été évaporés à sec. Le résidu est repris dans 6 mL d'alcool à 60 °C. L'addition de 2 gouttes du réactif de Dragendoff à la solution alcoolique provoque un précipité ou une coloration orangée. L'ajout de 2 gouttes du réactif de Bouchardat à la solution alcoolique provoque un précipité de coloration brun-rougeâtre et indique une réaction positive.

### - Saponosides

Pour mettre en évidence les saponosides, 10 mL de l'extrait ont été introduits dans un tube à essai. Le tube a été agité vigoureusement pendant 15 secondes et laissé au repos pendant 15 minutes. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides.

### - Coumarines

A 5 ml d'extrait éthanolique contenu dans un tube à essai, ajouter 0,5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 10 %, mélanger et observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

## 2.3. Activité antifongique

### 2.3.1. Préparation des gammes de concentrations

L'incorporation de l'extrait Eeth70% à la gélose Sabouraud a été faite selon la méthode de la double dilution en tubes inclinés utilisée par Coulibaly (2012). Chaque série comporte 14 tubes à essai dont 12 tubes tests (contenant l'extrait végétal) et 2 tubes témoins (un sans extrait végétal, sert de témoin de contrôle de croissance du germe ; l'autre sans germe et sans extrait sert de témoin de contrôle de stérilité du milieu de culture). Le test a été fait en triplicate.

Pour les douze tubes tests, les concentrations de l'extrait de 50 à 0,024 mg/mL ont été préparées selon une suite géométrique de raison  $\frac{1}{2}$ . Pour ce faire, un gramme d'extrait a été dissout et homogénéisé dans le premier tube contenant 20 mL de gélose Sabouraud ; les autres tubes n'en contenant que 10 mL chacun. Après homogénéisation, la moitié du premier tube a été déversé dans le second et ainsi de suite jusqu'au

dernier tube pour lequel la moitié du tube à été récupéré dans un bécher.

### 2.3.2. Stérilisation

Les 14 tubes de chaque série ont été stérilisés à l'autoclave (PBI STEOMATIC III) à 121°C pendant 15 minutes et ensuite inclinés dans une étuve à 37°C pour permettre le refroidissement et la solidification de la gélose (Kporou *et al.*, 2009).

### 2.3.3. Préparation de l'inoculum et tests antifongiques

Parallèlement, l'inoculum a été préparé à partir de cultures de *Aspergillus flavus* de 48 heures sur gélose en pente. Ces germes sont prélevés à l'aide d'une anse de platine, puis homogénéisés dans 10 mL d'eau distillée stérilisée permettant d'obtenir une suspension 100. A partir de cette suspension, la suspension 10<sup>-1</sup> a été préparée par dilution au dixième, en transférant 1 mL de la suspension 100 dans 9 mL. L'inoculum a été ensemencé en stries transversales jusqu'à épuisement de 10 µl de la suspension 10<sup>-1</sup> (1000 cellules).

Les cultures ainsi réalisées ont été incubées dans une étuve à 37°C pendant 72 heures.

### 2.3.4. Dénombrement des colonies

Les colonies formées ont été dénombrées de la 36e à la 48e heure d'incubation, par comptage direct grâce à un stylo compteur de colonies de type Geiger.

La croissance des germes dans les 12 tubes expérimentaux a été évaluée en pourcentage de survivance, calculé par rapport à 100% de survivance dans le tube témoin de contrôle de croissance. La méthode de calcul du pourcentage de survivance s'est faite selon la formule :

$$\%S = (n/N) \times 100$$

(%S = Survivance de *Aspergillus flavus* en pourcentage, N = Nombre de colonies dans le tube témoin, n = nombre de colonies dans le tube expérimental).

### 2.3.5. Paramètres antifongiques recherchés

Le traitement des données a permis de déterminer les paramètres antifongiques suivants les travaux de Kra (2016) :

- Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) : concentration d'extrait dans le tube pour lequel il n'y a aucune croissance visible du germe, à l'œil nu.
- Fongicide (CMF ou CFS) : après le temps d'incubation, la surface de la gélose contenue dans les tubes tests où aucune croissance fongique n'a été observée est prélevée, ensemencée à l'aide d'une anse de platine sur gélose neuve puis incubée pendant 72 h à 10

jours à la température de la salle. Ainsi, deux cas se présentent :

- présence de colonies, l'extrait est dit fongistatique. On détermine dans ce cas la Concentration Fongistatique (CFS) ;
  - absence de colonie, l'extrait est dit fongicide. Cette dernière observation permet de déterminer la Concentration Minimale Fongicide (CMF) qui correspond 99,99% d'inhibition comparativement au tube témoin de contrôle de croissance ;
- Concentration pour cinquante pour cent d'inhibition (CI<sub>50</sub>) : concentration qui correspond 50% d'inhibition. Elle est déterminée graphiquement à partir du tracé de la courbe de sensibilité de *Aspergillus flavus* à l'extrait.

La courbe de sensibilité représentant l'évolution de la sensibilité de *Aspergillus flavus* en fonction des variations de la concentration de l'extrait a été tracée.

### 2.4. Réalisation des tests de cytotoxicité

L'étude de la toxicité a été inspirée de la méthode de Mossman (1983). Les cellules HFF (Human Foreskin Fibroblasts) ont été utilisées lors de ce travail. Les deux types de cellules HFF (confluentes et en division) ont été cultivés à 37 °C, sous 5 % de CO<sub>2</sub> dans un milieu D10 (Dulbecco Minimum Essential Medium, Gibco) additionné de sérum de veau fœtal 10 % ; glutamine 1 % ; pénicilline 50 U.ml<sup>-1</sup> et streptomycine 50 µg.µl<sup>-1</sup>.

Pour mesurer la cytotoxicité de l'extrait éthanolique, les cellules HFF ont été ensemencées dans des plaques de 96 puits (CellStar) à raison de 3000 à 5000 cellules par puits dans 100 µl de milieu D10. Par la suite elles ont été exposées pendant 24 heures à différentes concentration (0 - 1000 µg/ml) en extrait de plante solubilisé dans du tampon PBS. Cela a été fait en triplicate. La viabilité a été déterminée à l'aide du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules métaboliquement actives, qui précipite et donne une coloration violette. La quantité du précipité formé est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Dans chaque puits, le MTT est ajouté à une concentration de 500 µg/ml et incubé pendant 3 h à 37 °C. Les cristaux de formazan sont solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) 10 mM. La mesure de la densité optique à 544 nm a été faite à l'aide d'un

spectrophotomètre Safir (Tecan). Cette mesure de l'absorbance 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 contrôle sans extrait de plante à l'aide de la formule suivante :

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

### 3. Resultats

#### 3.1. Tri phytochimique

Le tri-phytochimique a permis la mise en évidence de composés chimiques suivant : polyphénols, tanins (catéchiques et galliques),

flavonoïdes, stérols et triterpènes ainsi que les alcaloïdes (Tableau I).

Tableau I : Composition chimique de l'extrait hydroéthanolique de *Anogeissus leiocarpus*

Composés	Extrait (Eeth 70%)
Polyphénols	+
Tanins catéchiques	+
Tanins galliques	+
Saponosides	-
Flavonoïdes	+
Stérols et triterpènes	+
Alcaloïdes	+
Coumarines	-

- (Absent) ; + (Présence).

#### 3.2. Effet de l'extrait Eeth 70% sur *Aspergillus flavus*

Après 72 heures d'incubation, on observe comparativement au tube témoin, une baisse progressive du nombre de colonies au fur et à mesure que les concentrations de l'extrait Eeth70% augmentent dans les tubes expérimentaux.

La courbe de sensibilité à l'extrait présente une allure décroissante avec une forte pente (Figure 1) en coupant l'axe des abscisses à la concentration de 98 µg/mL. Cette valeur représente le potentiel d'inhibition (CMI). Cela

illustre bien la sensibilité dose dépendante de *Aspergillus flavus* à Eeth70%.

À partir de cette courbe, la CI<sub>50</sub> a été déterminée. La CMF d'une valeur de 195 mg/mL a été obtenue par observation des tubesensemencés après détermination de la CMI.

En effet, après ensemencement de la surface des tubes tests, le premier tube dans lequel aucune croissance visible n'est observée correspond à la CMF.

Les valeurs des paramètres sont résumées dans le tableau II.

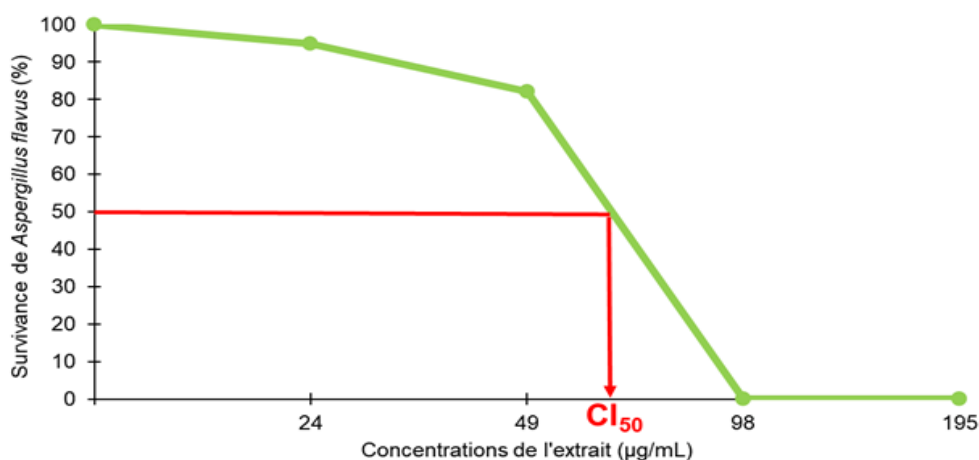


Figure 1 : Courbe de sensibilité de *Aspergillus flavus* à l'extrait Eeth70%

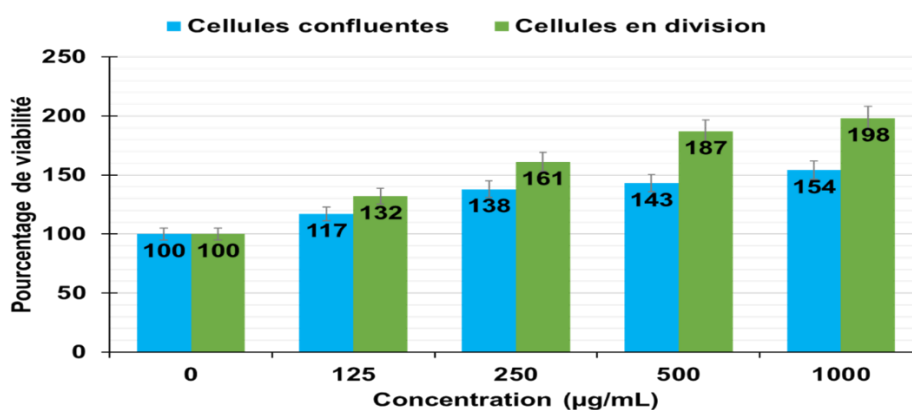
**Tableau II :** Valeurs des paramètres antifongiques

Extrait de <i>Anogeissus leiocarpus</i>	Paramètres antifongiques		
	CMI (µg/mL)	CMF (µg/mL)	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
Eeth70%	98±0	195±0	78±0

### 3.3. Cytotoxicité

Les résultats de l'activité cytotoxique de l'extrait éthanolique 70% sont exprimés en pourcentage de viabilité des cellules HFF vivantes. L'analyse a montré un effet dose plus ou moins remarquable avec des concentrations allant de 125 à 1000 µg/mL. Qu'ils s'agissent des cellules confluentes comme celle en division, on observe un

pourcentage de viabilité des cellules largement supérieures à 100%. À 1000 µg/mL, on a un pourcentage de viabilité de 198% pour les cellules en division et de 154% pour les cellules confluentes ou en arrêt de division.



**Figure 2 :** Taux de viabilité des cellules HFF en présence de l'extrait Eeth70%

### 4. Discussion

L'analyse des résultats montre que *Aspergillus flavus* est sensible à l'extrait éthanolique 70% (Eeth70%) de *Anogeissus leiocarpus*, selon une relation dose-réponse. Les valeurs des concentrations minimales inhibitrice (CMI = 98±0 µg/mL) et fongicide (CMF = 195 µg/mL) obtenues, attestent que l'extrait a une activité antifongique accentuée. En effet, selon Kra (2016), l'activité d'un extrait est dite très forte, lorsque la valeur de la CMF est comprise entre 1,53 et 780 µg/mL.

Le criblage par réactions colorées a révélé la présence de polyphénols, de tanins catéchiques et tanins galliques, de flavonoïdes, de stérols et triterpènes et d'alcaloïdes possédant diverses activités biologiques. Ces phytoconstitués pourraient justifier l'effet antifongique observé. Parmi ces composés, nombreux sont reconnus pour leurs effets antimicrobiens en général et antifongiques en particulier. Ce qui a été démontré par plusieurs auteurs dont Coulibaly (2012) et Konan (2015). En outre, Sanogo *et al.*

(2016) ont mis en évidence par CCM, la présence de saponosides, de tanins catéchique et gallique, de polyphénols, de polyterpènes, d'anthocyanes, de flavonoïdes et d'alcaloïdes dans les extraits aqueux et méthanoliques des écorces de tiges de *Anogeissus leiocarpus*. L'activité antimicrobienne des flavonoïdes a été démontré par Yenjai *et al.* (2004) lors de leurs travaux sur les flavonoïdes bioactifs de *Kaempferia Parviflora*. Quant aux terpènes et aux polyphénols, Roby *et al.* (2013) et Zaiter (2017) ont montré une bonne activité antimicrobienne de ces composés dans leur étude portant sur les activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles extraites de *Foeniculum vulgare* et *Matricaria chamomilla*. Par ailleurs, les travaux de Bagré *et al.* (2011) ont montré que les extraits hydroalcooliques présentaient les meilleures activités antimicrobiennes et concentraient mieux les principes actifs. Ainsi, l'Eeth70% étant un extrait hydroéthanolique, concentrerait donc les principes actifs de faibles et de moyennes tailles

(terpénoïdes, les phénols, les polyphénols, les quinones etc.) d'où la bonne l'activité observée. D'autres travaux dont ceux de Shimada (2006) portant sur les protéines salivaires comme défense contre les tanins alimentaires, ont révélé que les tanins se fixeraient aux protéines riches en proline et interfèrent avec la synthèse protéique des champignons.

En ce qui concerne le test MTT, il a permis de vérifier l'activité d'une enzyme mitochondriale : la succinate déshydrogénase (SDH) des cellules métaboliquement actives. La SDH est une enzyme qui intervient dans la respiration mitochondriale. Lorsque dans une cellule, la SDH est très active, cela implique que la cellule est métaboliquement très active (Béné, 2017). L'extrait hydroéthanolique de l'écorce de tige de *Anogeissus leiocarpus* n'est pas toxique pour les cellules humaines HFF comparativement au témoin qui ont un pourcentage de viabilité de 100 %. En effet, selon les travaux de Coularie (2012), lorsque la viabilité cellulaire est supérieure à 30 %, la substance testée n'est pas toxique. Or, les résultats obtenus montrent un

### Conclusion

Ce travail a permis de mettre en évidence le potentiel antifongique de l'extrait hydroéthanolique 70 % des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus flavus* productrice d'aflatoxine B1. Ces activités sont justifiées par la présence de composés chimiques tels que les polyphénols, les tanins et les flavonoïdes. Ces résultats

pourcentage de viabilité supérieur à 100% aussi bien pour les cellules en division que pour celles en arrêt de division. On en déduit une innocuité de l'extrait éthanolique 70% de *A. leiocarpus* sur les cellules HFF. Dans le test MTT, lorsqu'un taux de viabilité est élevé, cela suggère que soit la succinate déshydrogénase (SDH) est activée, soit un facteur de croissance a stimulé la mitose (Camara *et al.*, 2016). En effet, lorsque les cellules sont en arrêt de division, une augmentation de viabilité est observée. Ceci pourrait être dû à l'activation de la SDH mitochondriale. Cet extrait pourrait donc être mitogène, par l'activation de la succinate déshydrogénase mitochondriale pour les deux types de cellules et par l'activation d'un facteur de croissance pour les cellules en division.

Ce dernier fait, pourrait expliquer la supériorité du pourcentage de viabilité pour les cellules HFF en division. En somme, le potentiel mitogénique serait dû à l'action combinée de la succinate déshydrogénase mitochondriale (SDH) et à celle d'un facteur de croissance surtout pour les cellules en division.

justifieraient certains usages traditionnels de la plante dans le traitement des mycoses. Cette espèce végétale pourrait constituer une alternative dans la lutte biologique contre *Aspergillus flavus* productrice de l'aflatoxine B1. Ce qui permettrait de sécuriser la production agricole, de protéger l'environnement et de contrôler la santé des consommateurs.

### Références

**Afssa, 2009.** Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Agence française de sécurité sanitaire des aliments, France 308p.

**Anses, 2012.** *Aspergillus flavus* et autres moisissures productrices d'aflatoxines. Agence nationale de sécurité sanitaire, France, 3p.

**APG IV, 2016.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **181** : 1-20.

**Bagré I., Bahi C., Ouattara K., Zirihi G.N., Djaman A.J., Coulibaly A. & N'Guessan J.D., 2011.** Étude botanique et exploration de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh. sur la croissance *in vitro* de *Cryptococcus neoformans*. *Phytothérapie*, **9** : 136-141.

**Béné K., 2017.** Plantes médicinales du Gontougo (District du Zanzan, Côte d'Ivoire) : inventaire, évaluation des activités pharmacologiques de deux plantes et formulation d'une pommade

dermatologique à partir de l'extrait hydroalcoolique de *Bersama abyssinica* Fresen. (Melianthaceae). Thèse unique de Doctorat, Université Félix Houphouët-Boigny, UFR Biosciences, Abidjan, Côte d'Ivoire, 198p.

**Camara D., Bene K., Gnahou G., Fofie N'g.B.Y. & Zirihi G.N., 2016.** Étude ethnobotanique, évaluation de l'activité antifongique sur *Candida albicans* et de la toxicité sur des cellules HFF de *Bersama abyssinica* (Fresen.), une plante de la pharmacopée ivoirienne. *European Scientific Journal*, **12**(3) : 171-185.

**Carvajal-Campos A., Manizan AL, Tadriss S, Akaki K, Koffi-Nevry R, Moore GG, Fapohunda SO, Bailly S, Montet D, Oswald IP, Lorber S, Brabet C & Puel O, 2017.** *Aspergillus korhogoensis*, a Novel Aflatoxin Producing Species from the Côte d'Ivoire. *Toxins*, **9**(353): 1-22.

**CDC, 2004.** Centers for Disease Control and Prevention, Outbreak of aflatoxin poisoning - Eastern and Central provinces (Kenya), **53**(34) : 790-793.

**Chao T.C., Maxwell S.M. & Wong S.Y., 1991.** An outbreak of aflatoxicosis and boric acid poisoning in

- Malaysia: a clinicopathological study. *Journal of Pathology*, **164** : 225-233.
- CODEX, 2013.** CODEX general standards for contaminants and toxins in food and feed. [http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/17/CXS\\_193e](http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/17/CXS_193e). Consulté le 13 septembre 2014.
- Coularie M.P., 2012.** Étude phytochimique et pharmacologique de plantes de Nouvelle-Calédonie à potentialités anti-dengue. Thèse en chimie des substances naturelles, Université de la Nouvelle-Calédoine, Nouméa (Nouvelle-Calédoine), 290 p.
- Coulibaly K., 2012.** Études botanique, pharmacologique et explorations phytochimiques des extraits de *Terminalia ivorensis* et *Terminalia superba*, deux espèces ligneuses commerciales, médicinales antimicrobiennes de la forêt de Mopri, Tiassalé (Sud de la Côte d'Ivoire). Thèse de Doctorat de botanique, Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan (Côte d'Ivoire), 200p.
- Konan K.F., 2015.** Activités antibactériennes (sur les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi) et antioxydantes in vitro de *Terminalia glaucescens* Planch. (Combretaceae), une plante médicinale ouest-africaine. Thèse Unique de Doctorat, Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan (Côte d'Ivoire), 144p.
- Kporou K.E., Kra A.K.M., Ouattara S., Guédé-Guina F. & Djaman A.J., 2009.** Évaluation de l'activité antifongique de *Mitracarpus scaber* sur *Candida tropicalis*. *Journal des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques*, **10**(1) : 13-20.
- Kra A.K.M., 2016.** Recherche bioguidée de composés antifongiques à partir de plantes médicinales de Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat d'État, Pharmacologie des substances naturelles, Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan (Côte d'Ivoire), 242p.
- Lewis L., Onsongo M., Njapau H., Schurz-Rogers H., Lubber G. & Kieszak S., 2005.** The Kenya aflatoxicosis investigation group. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspectives*, **113** : 1763-1767.
- Murphy P.A., Hendrich S. & Bryant C.M., 2006.** Food mycotoxins: an update. *Journal of Food Science*, **71**(5) : 51-65.
- Njeru R.W., 2014.** Défis en matière de sécurité alimentaire : l'exemple de l'aflatoxine. Agro-Innovations International, Nairobi, Kenya, 8p.
- Okoth S.A. & Ohingo M., 2004.** Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Kisumu, Kenya: Cross sectional study. *African Journal of Health Sciences*, **11** : 43-54.
- Orsot B.A.M.B., Soro S., Konkon N'D.G., Koné D. & Zirihi G.N., 2016.** Étude ethnobotanique et évaluation *in vitro* de l'activité antifongique des extraits de l'écorce de *Zanthoxylum gillettii* (de Wild Waterman) sur deux souches phytopathogènes de *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Applied Biosciences*, **98** : 9309-9322.
- Roby M.H.H., Sarhan, M.A., Selim K.A.H. & Khalel K.I., 2013.** Antioxydant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*, **44** : 437-445.
- Sanogo Y., Guessennd N.K., Tra Bi H.F., Kouadio N.J., Konan F.K., Bamba M., Danho N., Bakayoko A., Yao K., Dosso M., 2016.** Evaluation *in vitro* de l'activité des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* (DC) Guill. et Perr. (Combretaceae) sur des bactéries responsables de maladies courantes en Afrique et criblage phytochimique. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **10**(3) : 1139-1152.
- Shimada T, 2006.** Salivary proteins as a defence against dietary tannins. *Journal of Chemical Ecology*, **32**(6) : 1149-1163.
- Van Egmond H.P., Ronald C.S. & Marco A.J., 2007.** Regulations relating to mycotoxins in food. Perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **389** : 147-157.
- Wagacha J.M. & Muthomi J.W., 2008.** Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, **124** : 1-12.
- Yenjai C., Prasanphen K., Daodee S., Wongpanich V., KIttakooop P., 2004.** Bioactive Flavonoids from *Kaempferia Parviflora*. *Fitoterapia*, **75** : 89-92.
- Zaiter A., 2017.** Etude de la phytochimie de 12 plantes de la région Lorraine en fonction de la granulométrie de poudres super fines. Agronomie, Université de Lorraine, France, 152p.
- Zirihi G.N., Kra A.K.M. & Guédé-Guina F., 2003.** Évaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Lamarck) O. Kuntze (Asteraceae) « PYMI » sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Revue de Médecine et de Pharmacopées Africaines*, **17** : 11-18.