

Formulation galénique d'une pommade antimicrobienne à base d'un extrait hydroalcoolique de *Bersama abyssinica* Fresen.



BENE K.^{1*}, CAMARA D.¹, SOUMAHORO I.A.², KANGA Y.¹, ZIRIHI G.N.¹

R
é
s
u
m
é

Dans le but de mettre au point une pommade antimicrobienne (médicament traditionnel amélioré), à moindre coût, efficace et accessible à tous, il a été entrepris une étude ethnobotanique des plantes médicinales du District du Zanzan (Côte d'Ivoire).

Bersama abyssinica, appelée localement *Samangya* par le peuple Brong du Département de Transua a été retenue pour ses divers usages en médecine traditionnelle dont le traitement des mycoses. La formulation galénique a permis la mise au point de *Bersamine*, une pommade antimicrobienne à base d'un extrait hydroéthanolique 70% de l'écorce de tige de *Bersama abyssinica* en utilisant le beurre de karité comme excipient.

Les paramètres étudiés de la pommade, les évaluations antimicrobiennes effectuées ainsi que des tests cliniques réalisés sur trente patients volontaires atteints de diverses dermatoses ont produit des résultats satisfaisants. *Bersamine*, phytomédicament amélioré a ainsi une efficacité prouvée et pourra être vendu à moindre coût par rapport aux antimicrobiens modernes et sera donc accessible à tous (environ 0,46 euros). Le kilogramme de beurre de karité étant vendu en moyenne à 900 FCFA (environ 1,4 euros).

Mots clés : *Bersama abyssinica*, peuple Brong, Côte d'Ivoire, extrait hydroéthanolique 70%, beurre de karité, pommade, antimicrobien

INTRODUCTION

Les antibiotiques largement utilisés pour le traitement des maladies infectieuses sont sous la menace constante en raison de l'émergence de pathogènes résistants et multirésistants aux antibiotiques (Cohen, 2000 ; Hancock, 2007 ; Guessennnd, 2013). Cette résistance aux antibiotiques chez les microorganismes pathogènes cause des décès prématurés et constitue un problème de santé publique de plus en plus important dans le monde (Ahmad et Beg, 2001). De nombreux cas de multirésistances ont été rapportés pour la Côte d'Ivoire et d'autres pays d'Afrique subsaharienne (Guessennnd *et al.*, 2009). *Staphylococcus aureus* est responsable des endocardites et des surinfections de plaies. Il est la cause d'infections bactériennes et l'une des trois premières causes d'infections nosocomiales (Verdier *et al.*, 2001). Ces souches provoquent également des infections cutanées : furoncle, folliculite, panaris, abcès mammaire chez les femmes et les animaux qui allaitent. Les infections des muqueuses sont fréquentes et peuvent atteindre les yeux (conjonctivite), les oreilles (otite), la sphère génitale (endométrite, salpingite) ou les voies respiratoires (pneumonie, pleurésie). Parmi ces staphylocoques, les souches catégorisées R (Résistantes) sont celles pour

lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée (Jehl, 2014).

Les maladies d'origine fongique ont quant à elles acquis une virulence particulière. Ces vingt dernières années ont vu une nette recrudescence des pathologies infectieuses, aggravées depuis 1980 par l'avènement des récives et des maladies telles que le cancer, les infections à VIH et leur concert d'infections opportunistes (Ackah *et al.*, 2008 ; Pierquin, 2010). Parmi les infections mycosiques, les candidoses, les cryptococcoses et les

Contact

1. Laboratoire de Botanique, UFR Biosciences, Université Félix Houphouët Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, 22 BP 582 Abidjan 22

2. Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, UFR Biosciences, Université Félix Houphouët Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, 22 BP 582 Abidjan 22

* Correspondance : kouadio777@gmail.com

trichophyties sont les plus fréquentes et constituent les causes principales de décès dans les populations des pays en développement, surtout chez celles vivant au Sud du Sahara. Les candidoses constituent des affections opportunistes très fréquentes et surtout chez des sujets vivant avec le VIH (Dieng *et al.*, 2005).

En Côte d'Ivoire, malgré l'essor de la médecine occidentale, la médecine traditionnelle occupe encore une place prépondérante dans le système de santé et demeure un recours incontournable pour les populations en matière de soins de santé primaires (Konan, 2012).

Dans un contexte de pauvreté grandissante, d'avancée des maladies, de non accessibilité aux thérapeutiques d'importation et de manque de médicaments dans les formations sanitaires, et pour venir en aide à nos populations, surtout aux immunodéprimés et pour tirer un réel avantage de l'usage des plantes médicinales, il devient impératif d'initier des travaux de recherches scientifiques pour l'exploitation rationnelle des vertus indiscutables des plantes de notre pharmacopée afin de parvenir à la production de nouvelles préparations à base de plantes (des phytomédicaments) qui seraient efficaces contre les infections fongiques et bactériennes, à moindre coût et accessibles à tous.

C'est dans ce souci que nous avons entrepris une étude ethnobotanique des plantes médicinales du District du Zanzan (Côte d'Ivoire) en 2015. L'enquête réalisée spécifiquement dans le Département de Transua a révélé divers usages de *Bersama*

abyssinica Fresen. (Melianthaceae) en médecine traditionnelle dont le traitement des mycoses. *Bersama abyssinica* (Figure 1) est appelée localement *Samangya* par le peuple brong du département. De nombreuses études scientifiques dont celles de Zekeya *et al.* (2012), Béné *et al.* (2016) et Camara *et al.* (2016) ont permis de confirmer les propriétés antimicrobiennes de différents extraits de *Bersama abyssinica* contre les germes responsables des infections de la peau. En effet, ces travaux ont révélé que plusieurs souches fongiques dont *Candida* et bactériennes multirésistantes dont *Staphylococcus* étaient sensibles aux extraits de *Bersama abyssinica*. En outre, les études de Béné et Camara (2016) ont révélé que l'extrait éthanolique 70% de *Bersama abyssinica* n'était pas toxique pour les cellules humaines HFF (Human Foreskin Fibroblast). Cet extrait était plutôt mitogénique.

MATÉRIEL

L'identification taxonomique de *Bersama abyssinica* a été réalisée à l'aide de la comparaison avec l'échantillon de l'herbier du Centre National de Floristique de l'Université F. Houphouët-Boigny sous la référence : Région de Bondoukou, 07 avril 1966, Aké Assi N° 8704.

Le matériel végétal est constitué des écorces de tige de *Bersama abyssinica* récoltées au cours de l'enquête ethnobotanique. Les organes ont été rincés à l'eau et séchés à l'abri du soleil. Ces drogues végétales ont été ensuite réduites en poudre fine grâce à un broyeur électrique IKA-MAG RTC.



Figure 1. Jeune plant de *Bersama abyssinica*. Toutes les parties de la plante sont toxiques et pour l'usage interne, le dosage est donc essentiel. Des décoctions d'écorce, de feuilles et de racines se prennent couramment pour leurs vertus purgatives dans le traitement de toutes sortes de troubles gastriques.

Propriétés antimicrobiennes de *Bersama abyssinica* Fresen.

Tableau 1. Caractéristiques des levures

Souches	Codes	Produits biologiques	Sensibilité aux antifongiques	Type	Services
<i>Candida albicans</i>	13-304	PV	5FC-(S) / AMB-(S) / FCZ-(R) / VRZ-(S) / ITZ-(S) KET-(R) / CAS-(S) / NYS-(S) / MCZ-(S)	Levure	SMI-CHU Treichville
<i>Candida tropicalis</i>	13-298	P	5FC-(R) / AMB-(R) / FCZ-(S) / NYS-(S) MCZ-(R) / KET-(S)	Levure	SMI-CHU Treichville

PV : Prélèvement Vaginal, P : Pus, SMI-CHU : Service des Maladies Infectieuses du Centre Hospitalier et Universitaire de Treichville
 5FC : 5-Fluorocytosine, AMB : Amphotéricine B, NYS : Nystatine, MCZ : Miconazole, KET : Kétoconazole, FCZ : Fluconazole,
 ITZ : Itraconazole, CAS : Caspofungine, VRZ : Voriconazole
 (R) : résistant, (S) : Sensible

Tableau 2. Caractéristiques de la souche bactérienne et de l'antibiotique

Souches	Produit biologique	Antibiotique	Sigle	Charge (μ g)	Diamètres critiques (mm)	
					S \geq	R <
<i>Staphylococcus aureus</i> 524YO/14	Suppuration	Cefoxitine-R (Céphalosporines)	FOX	30	25	22

Le matériel biologique est quant à lui constitué de trois lapins de l'espèce *Oryctolagus cuniculus* (Leporidae), ayant un poids compris entre 1 800 et 1 950 grammes (g) et qui ont été utilisés pour le test de tolérabilité cutanée. Ils ont été fournis par l'animalerie du Laboratoire Central de Nutrition Animale (LA.CE.N.A) de Bingerville.

Les souches microbiennes sont constituées de deux levures à savoir *Candida albicans* et *Candida tropicalis* (Tableau 1) et d'une bactérie multirésistante, *Staphylococcus aureus* (Tableau 2).

Pour la formulation de la pommade, le matériel utilisé est le suivant : un mortier et un pilon en porcelaine, une spatule, du papier pH (Universalindikator Merck), l'extrait hydroéthanolique 70% (Eeth) et l'excipient (beurre de karité). Un chauffage a été fait pour la fonte du beurre afin de décanter toute impureté qui pourrait s'y trouver.

MÉTHODES

1. Préparation de l'extrait végétal

L'extraction des principes actifs a été faite selon la deuxième variante de la méthode de Zirih *et al.* (2003) couplée à la méthode par épuisement qui consiste à macérer le marc à plusieurs reprises.

Cent grammes (100 g) de poudre de drogue sont homogénéisés dans un 1 litre d'une solution éthanol-eau (70/30) dans un Blender (Mixer) de marque Life's Superb (LS-317) pendant trois fois trois minutes à température ambiante. L'homogénat obtenu est filtré successivement sur un carré de tissu blanc, sur du coton hydrophile puis sur du papier Watman. Après trois cycles d'extraction (extraction par épuisement), le volume du filtrat final est mis à l'étuve réglée à 50°C pour éliminer le solvant d'extraction. L'évaporat sec est récupéré sous forme de poudre et constitue l'extrait hydroéthanolique 70% (Eeth70%).

2. Formulation galénique et contrôle de qualité de la pommade (médicament traditionnel amélioré)

2.1 Préparation de la pommade 5%

À l'aide d'un mortier en porcelaine, la quantité d'extrait correspondant à 5 g d'extrait éthanolique et la quantité suffisante pour (QSP) 95 g de l'excipient ont été triturés. L'excipient a été ajouté en petite quantité jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène (une répartition régulière du principe actif) (Figure 2). Pour obtenir une meilleure homogénéité, la pommade est fondue à faible température (40°C) et après solidification, elle est retriturée dans un mortier avant la mise en pots.

Toute la technique de préparation se fait manuellement.

2.2 Contrôle de qualité de la pommade

Les variables ou paramètres examinés à l'œil nu étaient notamment les caractères macroscopiques de la préparation, l'homogénéité, le pH et enfin le conditionnement.



Figure 2. Préparation de la pommade dermique

Caractères macroscopiques

Les caractères tels que la couleur, la consistance, la stabilité et l'odeur ont été notés. L'ajout de quelques gouttes de jus de citron permet d'améliorer l'odeur. L'étude de la stabilité a dans un premier temps consisté à étudier la température de fusion de la pommade et ensuite à suivre l'évolution dans le temps, d'un certain nombre de paramètres propres à cette préparation. Trois lots de deux pots ont été laissés au repos à la température du laboratoire et examinés après 0 jour, 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 2 mois et 3 mois de conservation :

- ☛ un lot ouvert en permanence
- ☛ un autre fermé en permanence jusqu'à la fin de l'expérience
- ☛ et le troisième lot était ouvert et tâté à chaque contrôle.

Homogénéité

La vérification de l'homogénéité de la pommade s'est faite en l'étalant en couche mince sur une surface plane à l'aide d'une spatule. La répartition régulière ou non des extraits dans l'excipient a été notée.

Mesure du pH

Pour la mesure du (pH) de la pommade, 10 g ont été fondus à 40°C puis, à froid, le pH a été déterminé. Dans les mêmes conditions le pH du beurre de karité a été mesuré. Le pH de l'extrait actif a été déterminé en mesurant celui d'une suspension obtenue par mélange d'environ 0,1 g de l'extrait dans 10 ml d'éthanol 70%. Le pH doit être proche de celui de la peau (4,2-5,8) (Eyang Esseng, 2007).

Conditionnement

Des pots d'une contenance de 25 ml ont été utilisés. La mise en pot se fait manuellement. Chaque pot est pesé pour vérifier le poids après remplissage.

Les étiquettes utilisées portent pour chaque pommade le nom de la forme pharmaceutique, la composition qualitative et quantitative, l'indication thérapeutique, la date de fabrication et de péremption et le numéro du lot.

Test de tolérabilité cutanée

Le test a été effectué sur les flancs de trois lapins (Rapisarda *et al.*, 1998 ; Dembélé, 2011) et le système de scores de Draize a été utilisé (Tableau 3).

Pour la tolérabilité cutanée de la pommade, le test de l'irritabilité primaire aiguë de Draize a été effectué. Pour se faire, les flancs droit et gauche de chaque lapin ont été rasés (environ quatre centimètres carrés) 24 heures avant l'expérience. L'application de la pommade a été faite sur un centimètre carré environ sur le flanc droit. De la même façon, l'excipient a été appliqué sur le flanc gauche pour servir de témoin. L'ensemble est ensuite recouvert à l'aide de compresses stériles (Figure 3). La lecture s'est faite après 24 et 72 heures de l'application. L'évaluation de la réaction cutanée est obtenue par la détermination de scores selon l'échelle de Draize. Le résultat a été donné par la valeur de l'indice de l'irritabilité primaire (IIP) selon le système de score de Draize en appliquant la formule suivante :

$$IIP = \text{valeur moyenne (Oedèmes + Erythèmes)}$$

L'indice d'irritation primaire (IIP) est donné par la somme de la valeur moyenne d'érythème et celle d'œdème avec IIP maximal égal à 8 (Feryel, 2005) :

- IIP < 0,5 : non irritant
- IIP 0,5 - 2 : légèrement irritant
- IIP 2,1 - 5 : réaction modérée
- IIP 5,1 - 8 : réaction sévère

Figure 3. Test de tolérabilité cutanée effectué sur les flancs d'un lapin :

- A. Pesée d'un lapin (1800 g) / B. Rasage des flancs d'un lapin (4 cm²) / C. Application de la pommade et de l'excipient de part et d'autre sur les flancs / D. Pose de compresses stériles

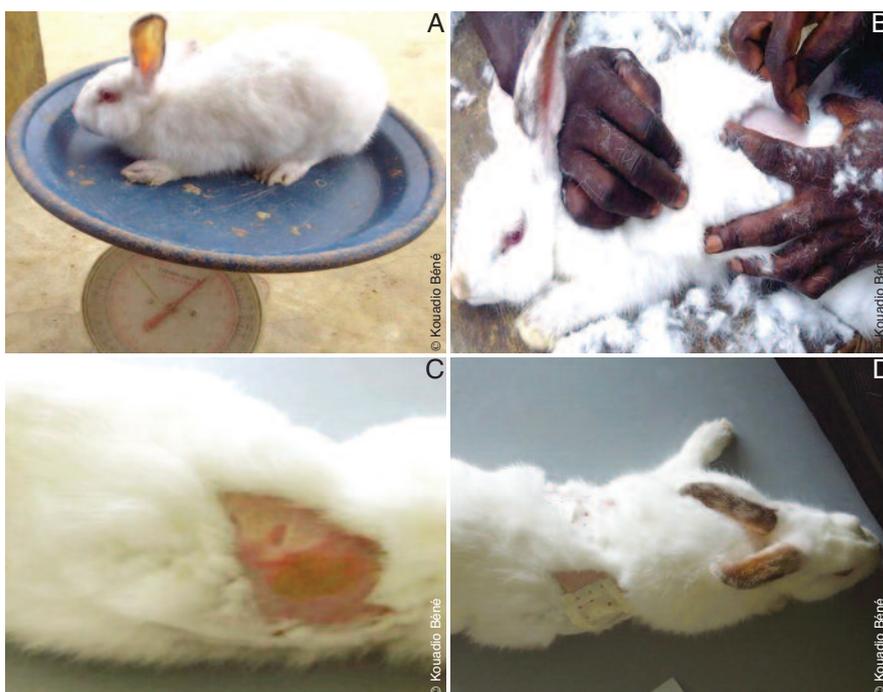


Tableau 3. Système de scores de Draize

Symptômes	Réaction d'irritation
Érythème et formation d'escarre	
Pas d'érythème	0
Érythème très léger	1
Érythème bien défini	2
Érythème modéré à sévère	3
Érythème sévère à formation d'escarre	4
Formation d'œdème	
Pas d'œdème	0
Œdème très léger	1
Œdème léger	2
Œdème modéré	3
Œdème sévère	4

3. Test de stérilité de l'extrait éthanolique et de la pommade

Ce test a permis de vérifier que l'extrait éthanolique de *Bersama abyssinica* et la pommade ne comportaient aucun germe. Pour cela, 0,1 g de chaque substance a été enrichi par ajout dans 10 ml de bouillon thioglycolate et incubé à 37°C pendant 24h (la pommade a été fondue et du Tween 80 a été ajouté pour faciliter le mélange). Après ce délai, chaque bouillon a étéensemencé sur une boîte de Pétri contenant la gélose ordinaire, puis incubé dans les mêmes conditions. La substance est déclarée stérile, si aucune colonie n'est visible sur la boîte gélosée (Guessennd, 2005 ; Konan, 2015).

4. Détermination de l'activité antimicrobienne de la pommade

4.1 Activité antifongique de la pommade

Les tests antifongiques ont été réalisés sur deux souches cliniques de *Candida* (*C. albicans* et *C. tropicalis*) selon la méthode de Camara *et al.*, 2016. Cinq grammes de pommade 5% à base de beurre de karité ont été utilisés pour l'obtention d'une concentration initiale de 12,5 mg/ml. L'usage du Tween 80 a permis de faciliter le mélange de la pommade (fondue) à la gélose (20ml). Les concentrations variaient de 12,5 mg/ml à 0,006mg/ml sur un ensemble de douze tubes tests et selon une suite géométrique de raison ½. Les paramètres CMI, CMF et CI₅₀ ont été déterminés. Le choix des deux *Candida* s'est justifié par le fait qu'elles ont été les plus résistantes au kétoconazole (Camara *et al.*, 2016).

4.2 Test antibactérien de la pommade et comparaison de son activité à celle du céfoxitine (FOX)

Le test a été réalisé à l'aide de la souche de *Staphylococcus aureus* 524YO/14. La pommade a été fondue à 37°C dans une étuve. La méthode suit celle utilisée par Béné et ses collaborateurs (2016). Seulement, dans le but de comparer et ne retenir que le meilleur résultat, des disques de buvard neutres ont été imbibés de la pommade fondue puis posés sur la gélose déjàensemencée. Le céfoxitine a aussi été posé et la pommade déversée dans le puits (cupule).

4.3 Étude clinique préliminaire

La méthode de cette étude est inspirée de celles de Koffi *et al.* (2007) et de Akakpo-Akue *et al.* (2009). Trente (30) sujets volontaires atteints de diverses mycoses superficielles (Tableau 4) ont utilisé la pommade. Ils n'ont fait l'objet d'aucun traitement antérieur. Après un temps d'application et de suivi, les observations ont été notées et des photos ont été prises. Un consentement libre et éclairé a été obtenu soit du patient lui-même, soit du parent ou tuteur lorsqu'il s'agissait d'un mineur. Lorsque le malade est reçu (généralement chez le concerné) et avec l'aide d'un dermatologue, un diagnostic clinique est fait pour en identifier le type et une photo de la zone infectée est faite. Une fiche d'observation est ouverte et la pommade (un pot de 25 ml) est ensuite remise au malade (ou à un parent pour le cas des enfants), avec l'indication de l'appliquer

par de petits mouvements rotatifs avec un léger massage sur les lésions en débordant largement les zones saines pour un bon étalement et une meilleure pénétration de la pommade. La fréquence des traitements est de deux (02) applications par jour (matin et soir) après la douche. Pour le cas des teignes trichophytiques sur la tête, il était conseillé de se raser et d'appliquer la pommade sur toute la tête. Un premier contrôle est effectué 2 jours après la première visite. Trois autres contrôles sont effectués à différents jours d'intervalle. Une photo de la zone guérie a été prise. Une observation post guérison est faite 1 semaine après la guérison. Trois états peuvent être observés : un état stationnaire ou parfois aggravé, une amélioration et une guérison complète.

RÉSULTATS

1. Description de *Bersama abyssinica*

1.1. Phytogéographie

Bersama abyssinica fait partie de la famille des Melianthaceae ; le genre *Bersama* comprend huit espèces, toutes en Afrique. Il existe une grande variabilité chez *Bersama*, cela a entraîné la distinction de nombreuses espèces, sous-espèces et variétés.

C'est une plante très répandue en Afrique. Elle est retrouvée en Afrique de l'ouest (excepté au Bénin), dans la corne de l'Afrique et vers le sud du continent.

1.2. Morphologie externe de *Bersama abyssinica*

C'est un arbuste atteignant 6 m de hauteur, à tronc souvent tortueux. Les feuilles, composées imparipennées, mesurant jusqu'à 60 cm de longueur, comportent de six à neuf paires de folioles glabrescentes ; le rachis est ailé. Les inflorescences, en racèmes solitaires ou par petit nombre, sont axillaires près de l'extrémité des rameaux. Les fleurs, blanches ou jaunâtres, atteignent 2 cm de longueur. Les fruits, rougeâtres, atteignant 2 cm de longueur, sont déhiscents à maturité. Les graines sont entourées d'un arille rouge orangé (Aké-Assi, 2001).

2. Formulation galénique

Les paramètres suivants ont été déterminés :

Couleur et l'odeur

La pommade est de couleur kaki et d'odeur beurre de karité atténuée.

Consistance

La pommade a une consistance semi solide. Elle paraît moyennement dure au toucher, mais après l'avoir prise, elle ramollit aussitôt au contact de la peau (T°>30°C).

Stabilité

Conservée à la température du laboratoire (T° ambiante, 28°C), la pommade est stable. Mais à une température supérieure à 30°C, elle commence à fondre.

Pour l'évolution dans le temps, les observations suivantes ont été notées.

Trois lots de deux pots ont été laissés au repos à la température du laboratoire et examinés après 0 jour, 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 2 mois et 3 mois de conservation :

- ☛ lot ouvert en permanence : à la deuxième semaine, une légère modification à la surface de la pommade a été observée. Cela correspond à une légère oxydation des acides gras. L'un des pots de ce lot a été contaminé par une moisissure
- ☛ lot fermé en permanence jusqu'à la fin de l'expérience : la pommade a été conservée intacte
- ☛ lot ouvert et tâté à chaque contrôle : aucun changement n'a été observé.

Homogénéité

L'homogénéité de la pommade a été vérifiée en l'étalant en couche mince sur une surface plane et à l'aide d'une spatule. La méthode de préparation a permis d'obtenir une très bonne homogénéité (répartition régulière de l'extrait).

Mesure du pH

L'extrait éthanolique 70% a un pH compris entre 4 et 5. Le beurre de karité un pH compris entre 5 et 6. La pommade préparée a un potentiel d'hydrogène égal à cinq (pH= 5).

Conditionnement

Des pots d'une contenance de 25 ml ont été utilisés (Figure 4).

Les étiquettes utilisées portent pour chaque pot les indications suivantes :

- ☛ nom de la forme pharmaceutique : *Bersamine*
- ☛ composition qualitative et quantitative : au beurre de karité et à l'extrait de *Bersama abyssinica* 5%
- ☛ indication : nettoie, purifie la peau et le cuir chevelu. Soigne les infections de la peau (furoncles, panaris, teignes, pieds d'athlète...)
- ☛ date de fabrication et de péremption : septembre 2016 à septembre 2018
- ☛ n° de lot pour cette étude est noté : Lot n° 0001.

3. Test de tolérabilité de la pommade

La figure 5 présente le flanc d'un lapin albinos avec absence de réaction cutanée. L'indice d'irritation primaire (IIP) est nul après 24 et 72 heures de l'application de la pommade et de l'excipient sur les flancs du lapin.

4. Test de stérilité des substances

Les tests de stérilité de l'extrait éthanolique 70% et de *Bersamine* ont permis de vérifier leur stérilité comme l'indique la figure 6. En effet, l'extrait éthanolique 70% et la pommade *Bersamine* ne présentent aucune contamination après 24 heures d'incubation à 37°C.



Figure 4. Présentation de la *Bersamine* dans les pots de 25 ml



Figure 5. Présentation du lapin : aucune réaction cutanée observée sur le flanc après 75h (partie circonscrite en vert)

Tableau 4. Récapitulatif de l'expérience clinique

Mycoses	Nbr de cas	Résultats	Durée du traitement		Observations
			Courte	Longue	
Dermatophytie de la peau glabre	11	100% de guérison	J 17	J 22	Aucune récurrence notée chez les malades guéris
Intertrigo interdigito-plantaire (pied d'athlète)	4		J 19	J 23	
Furonculose	2		J 20	J 26	
Teignes tondantes microsporiques	8		J 25	J 28	
Teignes tondantes trichophytiques	4		J 25	J 27	
Pityriasis versicolor	1		J 23	J 23	

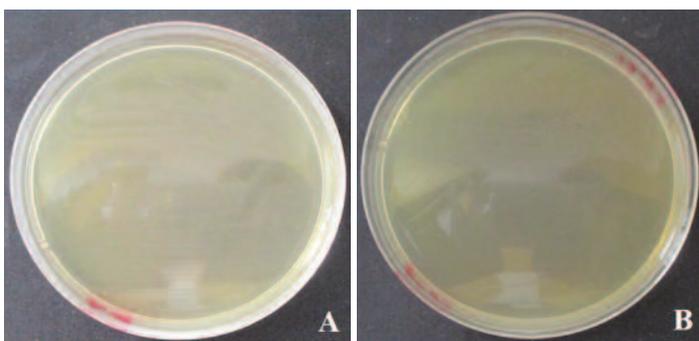


Figure 6. Boîtes de Pétri montrant l'extrait éthanolique 70% stérile (A) et la pommade stérile (B)

5. Activité antifongique de la pommade *Bersamine*

Les résultats montrent un effet dose-dépendant sur *Candida albicans* (Figure 7) et *Candida tropicalis* aux différentes concentrations de la pommade *Bersamine*. Les paramètres antifongiques obtenus sont consignés dans le tableau 5.

6. Activité du phytomédicament comparée à celle du kétoconazole

La figure 8 et le tableau 5 présentent les résultats comparés des différents paramètres antifongiques de la pommade *Bersamine* à ceux du kétoconazole sur *Candida albicans* et *Candida tropicalis*. Il ressort que l'extrait éthanolique brut de l'écorce de tige de *Bersama abyssinica* présente des résultats meilleurs que ceux du kétoconazole (CMI et Cl₅₀). Les paramètres antifongiques de *Bersamine* hormis la CMF sont comparables ou proches de ceux du kétoconazole. Ce qui est très intéressant pour une substance brute (non encore purifiée).

7. Test de sensibilité de la pommade *Bersamine* sur *Staphylococcus aureus* 524YO/14 et comparaison de son activité avec le céfoxitine, un antibiotique de référence

Le test a été réalisé à l'aide de la souche de *Staphylococcus aureus* 524YO/14.

La figure 9 présente le test sensibilité de *Bersamine* et la comparaison de son activité à celle du céfoxitine (FOX). En

comparant les zones d'inhibition, le disque buvard a donné un diamètre d'inhibition difficilement perceptible. Par contre avec le puits (cupule) fait dans la gélose, un meilleur résultat a été obtenu avec un diamètre de 8,5 mm. Le céfoxitine a produit une zone d'inhibition d'un diamètre de 15 mm ce qui prouve bien la résistance de cette souche au céfoxitine.

8. Résultats obtenus avec les sujets atteints de diverses dermatoses

Les sujets ayant appliqué la pommade *Bersamine* ont tous obtenu la guérison. Deux jours après l'application, la plupart des sujets (Tableau 4) ont remarqué une variation de l'infection allant d'un arrêt de progression à un séchage. La figure 10 montre l'évolution de quelques dermatoses dès l'application jusqu'à la guérison. Selon les infections dermatologiques, le temps de guérison était variable. Ainsi la guérison s'observait de dix-sept à vingt-huit jours. Les teignes tondantes ont pris le plus de temps à guérir (vingt-huit jours).

DISCUSSION

L'usage de la deuxième variante de la méthode de Zirihi *et al.* (2003) combiné à la méthode d'extraction par épuisement a permis d'obtenir un extrait éthanolique avec un très bon rendement (44% d'extrait hydroéthanolique) et donc une plus grande quantité d'extrait pour la formulation galénique de la pommade antimicrobienne.



Figure 7. Action dose-réponse de *Bersamine* sur *Candida albicans*

Tableau 5. Paramètres antifongiques du phytomédicament et du kétoconazole sur *Candida albicans* et sur *Candida tropicalis*

Substances	Souches fongiques		Paramètres antifongiques (µg/ml)							
				<i>Candida albicans</i>			<i>Candida tropicalis</i>			
	CMI	CMF	Cl ₅₀	CMI	CMF	Cl ₅₀	CMI	CMF	Cl ₅₀	
Extrait hydroéthanolique 70% (Eeth70%)	24,4	25000	3,6	24,4	12500	4,4				
<i>Bersamine</i>	781,0	50000	73,0	781,0	50000	90,0				
Kétoconazole	390,6	390,6	18,5	390,6	390,6	54,8				

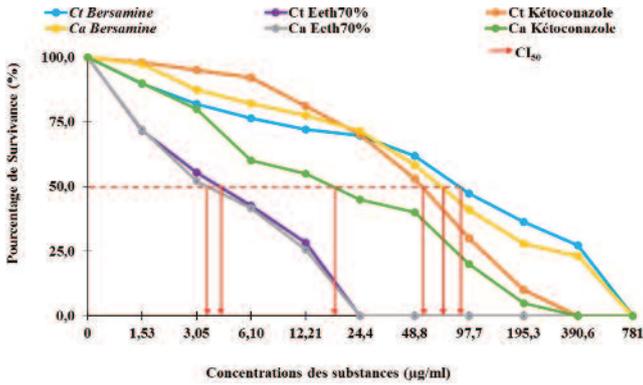


Figure 8. Courbes de sensibilité comparée de *Candida albicans* et *Candida tropicalis* à la pommade *Bersamine* et au kétoconazole

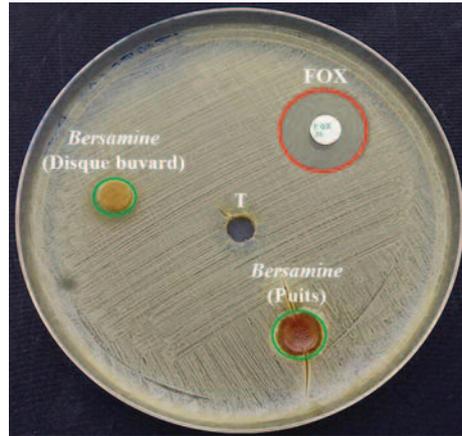


Figure 9. Test de sensibilité de *Bersamine* sur la souche de *Staphylococcus aureus* 524YO/14



Figure 10. Evolution des différentes affections cutanées jusqu'à la guérison

Les résultats du contrôle de la qualité obtenus avec la pommade *Bersamine* sont fort encourageants. Elle présente de bons paramètres macroscopiques avec une très bonne homogénéité. L'odeur s'est trouvée améliorée par l'ajout de quelques gouttes de jus de citron. Le pH a été déterminé à l'aide de papier pH. Le papier pH est un papier absorbant imbibé d'un indicateur coloré universel

qui permet de déterminer le pH d'une solution instantanément en fonction de sa couleur. Les valeurs proches du pH de l'extrait éthanolique 70%, de l'excipient et de *Bersamine* de celles de la peau (4,2-5,8) (Eyang Esseng, 2007), seraient en faveur d'une compatibilité chimique entre les différents constituants de la pommade et la peau des utilisateurs, ce qui est à leur avantage.

Selon Eyang Esseng, (2007), le beurre de karité est préféré à d'autres excipients tels que la vaseline et l'huile de palmiste parce qu'il libère mieux les principes actifs, il est « bio » par rapport à la vaseline, moins salissant et d'une odeur plus agréable ou acceptable que l'huile de palmiste dont l'usage externe est plus fréquent (Mboui Ondo, 2003).

À une température supérieure à 30°C, on observe un début de fonte de la pommade d'où sa conservation recommandée dans un lieu frais en évitant l'humidité. En effet, la présence de moisissures dans un pot du lot 1 serait due à la présence d'eau qui aurait pu créer les conditions d'humidité favorables à la multiplication des microorganismes.

Le résultat du test de tolérabilité cutanée a indiqué une tolérance cutanée sur les lapins albinos. Depuis toujours, les chercheurs se sont plus intéressés aux lagomorphes pour leurs travaux. En effet, cet animal convient relativement bien, car il est phylogénétiquement plus proche de l'homme et sa manipulation est aisée (Houdebine, 1998). Pour cette étude, le choix a été particulièrement porté sur des lapins

albinos pour la sensibilité plus grande de la peau albinos. Par ailleurs, pour des raisons d'éthique, les essais *in vivo* ne peuvent pas être pratiqués directement sur des humains. Il faut passer par des essais sur des rongeurs tels les souris, les rats ou sur d'autres animaux (Kamanzi, 2002) comme le lapin dans ce cas-ci, dont le métabolisme est loin de ressembler à celui de l'homme.

Propriétés antimicrobiennes de *Bersama abyssinica* Fresen.

Le test a consisté à la recherche d'une éventuelle réaction d'irritation cutanée due à la pommade par la détermination de l'indice d'irritation primaire selon le système de scores de Draize. Aucune réaction d'irritation cutanée n'a été observée. Ainsi donc, selon l'échelle de Draize, *Bersamine* est considérée comme un produit à action non irritante pour la peau. Cela s'expliquerait par le fait que le beurre de karité (excipient) n'est pas agressif pour la peau d'une part étant donné qu'il s'applique depuis des lustres. D'autre part, les travaux de Camara *et al.* (2016) réalisés sur la toxicité des cellules HFF ont montré que l'extrait éthanolique de *Bersama abyssinica* n'était pas toxique pour les cellules humaines, mais favorise plutôt une multiplication cellulaire. Les deux composés agissent ainsi en parfaite synergie. Sur les 30 malades traités, aucun n'a manifesté des signes d'allergie ou de récurrence, donc 100% de bonne tolérance.

Les tests antifongiques de la pommade sur deux souches de *Candida*, ont révélé des effets doses-dépendants.

Une étude menée par Zekeya *et al.* (2014) sur la composition phytochimique des feuilles, écorces de tige et écorces de racine de *Bersama abyssinica* a révélé la présence de 21 composés chimiques dans les écorces de tige dotés d'activités pharmacologiques. Il s'agit entre autres de :

- ☛ l'acide 2,3-diméthylfumarique (acide gras) : antibactérien
- ☛ le 5-méthyl-2-furanocarboxaldéhyde (aldéhyde) : antimicrobien
- ☛ le pyrogallol : antiseptique, antibactérien, antidermatique et fongicide
- ☛ l'iso-allocholate d'éthyle (stéroïde) : anti-inflammatoire et antimicrobien.

Ces substances actives agiraient certainement en synergie, ce qui expliquerait l'activité comparable de *Bersamine* à celle de la molécule de référence.

La coloration blanchâtre observée à la surface des géloses correspond à la solidification de la pommade ; l'incubation ayant été faite à la température de la salle (environ 28°C). Cette température est favorable à la solidification de la pommade.

Au niveau des tests cliniques, les trente malades inclus dans cette étude présentaient différents types de mycoses superficielles réparties comme indiquées dans le tableau 5. Au vu des résultats obtenus, nous pouvons affirmer que *Bersamine* est active *in vivo* sur tous les cas de mycoses traitées. Les durées de traitement les plus courtes ont été observées chez les patients souffrant d'une dermatophytie de la peau glabre (17 jours), d'Intertrigo interdigitoplantaire (19 jours) et de furonculose (20 jours). Les cas de teignes tondantes microsporiques et de teignes tondantes trichophytiques ont présenté les plus longues durées de traitement. Le seul cas présentant un *Pityriasis versicolor* a été guéri au bout du 23ème jour de traitement.

L'un des cas souffrant de teigne tondante trichophytique avait été traité par ses parents sans succès avec divers médicaments antifongiques pharmaceutiques. En effet dans la thérapeutique actuelle, il faut procéder nécessairement à une association de molécules actives (antifongique et antiseptique) et cela pendant

une durée assez longue pour obtenir une éradication complète de l'agent pathogène (Akakpo-Akue *et al.*, 2009).

La pommade *Bersamine* à base d'extrait éthanolique de *Bersama abyssinica* a des effets comparables à ceux des molécules antimycosiques existantes. Cependant, une étude clinique plus complète et plus importante incluant un grand nombre de malades devrait être menée comparativement à des molécules de synthèse pour mieux apprécier leur efficacité et leur spectre d'action dans des conditions identiques.

Cependant avec les molécules de synthèse d'usage courant des études ont montré qu'elles entraînent toujours des effets indésirables gênants chez certains malades occasionnant un arrêt du traitement (Koffi *et al.*, 2007). Dans une étude sur 60 patients dont quarante-sept présentaient des dermatophytoses et 13 des candidoses cutanées et traités par le kétoconazole et le flutrimazole, 3% des patients ont arrêté prématurément le traitement à cause d'effets secondaires (Del Palacio *et al.*, 1999 ; Koffi *et al.*, 2007).

Aucune rechute n'a été observée chez les trente sujets dans les limites de l'étude. Ce qui n'est pas le cas avec les molécules de synthèse antimycosiques. En effet, Del Palacio *et al.* (2001) ont montré qu'après six semaines de traitement, l'eberconazole a été jugé efficace chez 72% de malades présentant une dermatophytose, tandis que le clotrimazole était efficace chez 61% des malades. Il y avait 4% de rechutes dans le groupe clotrimazole-traité et 1% de rechute dans le groupe eberconazole-traité. D'autres molécules telles que le kétoconazole et le flutrimazole ont présenté respectivement une efficacité chez 70% et 53% de malades présentant des dermatophytoses et des candidoses cutanées (Del Palacio *et al.*, 1999). Il y avait 3,3 % de rechute dans le groupe de kétoconazole et 13,3% de rechute dans le groupe de flutrimazole.

L'activité antibactérienne réalisée avec *Bersamine* offre de bons espoirs face à la souche multirésistante. En effet, la souche 524YO/14 (extrait d'une suppuration) testée a donné un diamètre d'inhibition de 8,5 mm. Étant formulée à base d'un extrait total éthanolique, la purification de cet extrait pourrait produire de meilleurs résultats. Alors que l'antibiotique de référence, le céfoxitine (FOX) a produit un diamètre d'inhibition de 15 mm. Cette valeur est largement inférieure à celle préconisée par le CA-SFM 2014 qui devrait être supérieure à 25 mm de diamètre pour que la souche soit dite sensible à cet antibiotique (Jehl, 2014).

CONCLUSION

La formulation galénique a permis la mise au point de *Bersamine*, une pommade antimicrobienne à base de l'extrait hydroéthanolique 70% de l'écorce de tige de *Bersama abyssinica* et du beurre de karité comme excipient. Trente sujets atteints de diverses infections cutanées (dermatophytie de la peau glabre, Intertrigo interdigitoplantaire, furonculose, teignes tondantes microsporiques, teignes tondantes trichophytiques et *Pityriasis versicolor*) ont appliqué ce Médicament Traditionnel Amélioré

(MTA) et ont tous retrouvé la guérison avec succès. Ces tests cliniques ont confirmé les activités antimicrobiennes observées *in vitro*. *Bersamine*, phytomédicament amélioré a ainsi une efficacité prouvée et pourra être vendu à moindre coût par rapport aux antimicrobiens modernes et sera donc accessible à tous. Le kilo de beurre de karité étant vendu en moyenne à 900 FCFA (environ 1,4 euros), le coût d'un pot de la pommade pourra être évalué en moyenne à 300 FCFA (environ 0,46 euros).

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le Laboratoire de Biochimie et de microbiologie de l'École Normale Supérieure (ENS) pour l'extraction et l'évaluation de l'activité antifongique et le Département de Virologie et de Bactériologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ackah B.A.A.J., Kra A.M.K., Zirihi G.N., Guédé-Guina F. (2008) Évaluation de l'activité antifongique de TEKAM 3, un extrait de plante, sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Rev. Ivoir. Sci. Technol.*, 11, 119-129.
- Ahmad I. & Beg A.Z. (2001) Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens, *J. Ethnopharmacol.*, 74, 113-123.
- Akakpo-Akue M., Gbery I.P., Kra A.K.M., Zirihi G.N., Yapi F.H., Djaman A.J. (2009) Évaluation de l'activité antifongique et essai clinique d'une crème formulée à base de l'extrait X₁₂ de *Terminalia catappa*, sur quelques mycoses superficielles, *Rev. Ivoir. Sci. Technol.*, 13, 175-190.
- Aké-Assi L. (2001) *Flore de la Côte d'Ivoire : catalogue systématique, biogéographie et écologie*, Genève, Conservatoire et Jardin Botanique, 396 p. (Collection Boissiera. Mémoires de botanique systématique, 57).
- Béné K. & Camara D. (2016) Optimizing Mitogenic Potential of HFF Cells by Ethanol Extracts of Leaves of *Bersama abyssinica* Fresen. (Melianthaceae) and *Harrisonia abyssinica* Oliv. (Simaroubaceae), *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 5:1, 773-776.
- Béné K., Guessennnd N.K., Camara D., Zirihi G.N. & Dosso M. (2016) Botanical Study and *in vitro* Antibacterial Activity of *Bersama abyssinica* Fresen. (Melianthaceae) on Multi-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains, *International Journal of Science and Research*, 5:1, 375-379.
- Camara D., Bene K., Gnahoue 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.
- Cohen M.L. (2000) Changing patterns of infectious disease, *Nature*, 17, 762-767.
- Del Palacio A., Cuétara S., Pérez A., Garau M., Calvo M., Calvo T., Sanchez-Alor G. (1999) Topical treatment of dermatophytosis and cutaneous Candidosis with Flutrimazole 1% cream : double-blind, randomized comparative trial with Ketoconazole 2% cream, *Mycoses*, 42, 11-12, 649-655.
- Del Palacio A., Ortiz F.J., Pérez A., Pazos C., Garau M., & Font E. (2001) A double-blind randomized comparative trial : Eberconazole 1% cream versus Clotrimazole 1% twice daily in *Candida* and dermatophyte skin infections, *Mycoses*, 44:5, 173-180.
- Dembélé D.L. (2011) *Formulation de pommade antalgique et anti-inflammatoire à base de Securidaca longipedunculata Fresen (Polygalaceae)*, Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Bamako, Mali, 176 p.
- Dieng Y., Faye-Niang M.A., Ndour-Diop A. (2005) Sensibilité aux antifongiques des souches de *Candida* responsables de candidoses oropharyngées chez des sujets vivants avec le VIH, *Sidanet*, 2:3, 835-838.
- Eyang Esseng M. (2007) *Étude de la phytochimie et des activités antibactériennes et antifongiques de cinq plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel des dermatoses au Mali*, Thèse de Doctorat de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie, Université de Bamako, Mali, 175 p.
- Feryel D. (2005) *Extraction et analyse de l'huile essentielle de cumin, formulation d'une pommade décongestionnante*, Mémoire de Magister de chimie appliquée, Université M'Hamed Bouguerre Boumerdes, Facultés des sciences, Algérie, 148 p.
- Guessennnd N.K. (2013) Résistance bactérienne aux antibiotiques en Afrique, Observatoire de la résistance des microorganismes aux anti Infectieux en Côte d'Ivoire : ORMICI, 41p.
- Guessennnd N.K. (2013) Étude des bactéries multirésistantes des effluents hospitaliers d'un centre hospitalier et universitaire (CHU) de la ville d'Abidjan (Côte d'Ivoire), *Journal of Applied Biosciences*, 69, 5456 – 5464.
- Guessennnd N.K., Gbonon V.C., Tiékoura K.B., Kakou-N'douba A., Ouattara D.N., Boni-Cissé C., Dosso M., le GER-BMR (2009) Évolution de la résistance bactérienne à l'imipénème en Côte d'Ivoire de 2005 à 2009, *Colloque scientifique de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire : pathologies émergentes et biologie intégrative*, 17 p.
- Hancock R.E.W. (2007) The end of an era, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 6, 28.
- Houdebine L.M. (1998) Les animaux transgéniques permettent-ils de faire progresser la recherche médicale ? <http://www.inra.fr/actualites/dossiers/ogm.htm>, vu le 05/06/2015.
- Jehl F. (ed) (2014) *Recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*, Paris, SFM, 120 p.
- Kamanzi A.K. (2002) *Plantes médicinales de Côte d'Ivoire : investigations phytochimiques guidées par des essais biologiques*, Doctorat d'État ès Sciences, Biologie Végétale, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 176 p.
- Koffi A., Dally I., Aka B., Coulibaly S., Guédé-Guina F. (2007) Développement galénique d'une pommade à base d'huile de *Mitracarpus scaber* pour le traitement de cinq types de mycoses superficielles, *J. sci. pharm. biol.*, 8:2, 18-24.
- Konon A. (2012) *Place de la médecine traditionnelle dans les soins de santé primaires à Abidjan (Côte d'Ivoire)*, Thèse de Doctorat d'État de médecine, Université Toulouse III Paul Sabatier et Université Henri Poincaré Nancy 1, 96 p.
- Mboui Ondo S.E. (2003) *Huile de palmiste traditionnelle*, Thèse de Doctorat d'État, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie, Université Cheikh Anta-Diop, Dakar, 93 p.
- Pierquin A-L. (2010) *Mycoses opportunistes et immunodépression*, Thèse de Doctorat de Pharmacie, Université Henri Poincaré Nancy 1, 96 p.
- Rapisarda A., Germano M.P., Iauk L., La Rosa M., Sanogo R., Ragusa S. (1998) *Daphne gnidium* L. Bark and leaf extracts: Skin damage by tropical application, *Phytotherapy Research*, 12, 49-55.
- Verdier T., Lina G., Gillet Y., Vandenesch F. (2001) *Staphylococcus*, *Cours de Bactériologie Médicale*. <http://www.microbes-edu.org/> vu le 14/01/2014.
- Zekeya N., Chacha M., Shahada F., Kidukuli A. (2014) Analysis of phytochemical composition of *Bersama abyssinica* by gas chromatography - mass spectrometry, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3:4, 246-252.
- 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.