



HAL
open science

Évaluation et essai d'optimisation de l'activité antifongique des extraits de *Termanalia superba* sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*

Marcel Gnamien Ahon

► **To cite this version:**

Marcel Gnamien Ahon. Évaluation et essai d'optimisation de l'activité antifongique des extraits de *Termanalia superba* sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*. Mycologie. Université Félix Houphouët-Boigny Abidjan (Côte d'Ivoire), 2014. Français. NNT: . tel-02885084

HAL Id: tel-02885084

<https://hal.science/tel-02885084>

Submitted on 30 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement supérieur
et de la Recherche Scientifique



Laboratoire de
Pharmacodynamie-
Biochimique

Année Universitaire
2013-2014....

THESE

Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur en Biotechnologie de
L'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

Spécialité : Pharmacologie des Substances Naturelles

Option : Biochimie-Microbiologie

Numéro d'ordre :
861/2014

AHON Gnamien Marcel

**EVALUATION ET ESSAI D'OPTIMISATION DE
L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS DE
Terminalia superba Engl & Diels (Combretaceae) SUR LA
CROISSANCE *in vitro* DE *Aspergillus fumigatus*, *Candida
albicans* et *Cryptococcus neoformans***

Soutenu publiquement
Le, 11 Avril 2014

Commission du jury

M ZIRIHI Guédé Noel	Professeur Titulaire	UFHB	Président
M DJAMAN Allico Joseph	Professeur Titulaire	UFHB	Directeur
M SIAKA Sorho	Maître de Conférences	INP-HB	Co-directeur
M COULIBALY Adama	Maître de Conférences	UFHB	Rapporteur
Mme KOFFI-Nevry Rose	Maître de Conférences	UNA	Rapporteur
M YAPI Houphouët Félix	Maître de Conférences	UFHB	Examineur



DEDICACE

JE DEDIE CE MEMOIRE A L'ETERNEL DIEU DES ARMEES

« Sur le torrent, sur ses bords, de chaque côté, pousseront toutes sortes d'arbres fruitiers. Leur feuillage ne se flétrira pas, et leurs fruits ne s'épuiseront pas, ils donneront des primeurs tous les mois, parce que ses eaux sortiront du sanctuaire. Leurs fruits serviront de nourriture et leurs feuilles de remède. »

EZECHIEL 47: 12

Merci éternel mon Dieu de m'avoir donné la grâce pour la réalisation de ce merveilleux projet.

Bénis les laboratoires qui m'ont accueilli, leurs dirigeants et tous ceux qui y travaillent.

ET AUSSI A

Mon défunt père KOUAO Ahon Pascal

Paix à son âme. Merci pour ton éducation, le meilleur héritage que tu m'a légué. Que Dieu t'accorde son pardon et te garde dans sa félicité céleste.

Ma mère N'GOUAN Assandoua

Je te remercie de m'avoir supporté, de m'avoir enseigné les valeurs que sont la loyauté, l'honnêteté, le respect, l'amour du prochain et l'obéissance de l'autorité, de m'encourager à la persévérance ainsi que pour tes bénédictions. Que Dieu te bénisse, te comble de ses grâces et te donne une bonne santé.

Aux grandes familles GNAMIEN KOUAO ET SANHOU N'GOUAN

Mon oncle N'GOUAN Sanhou

Je te remercie pour tout ce que tu as pu faire dans la réalisation de ce projet. Que Dieu te bénisse, te comble de ses grâces et te donne une très bonne santé.

La défunte épouse de mon oncle N'GOUAN SANHOU Tantie ASSOUAMA Madeleine

J'aurais voulu que tu sois aussi témoin de ce bon moment de ma vie mais hélas Dieu a voulu autrement. Que le nom de Dieu soit béni. Surtout, paix à ton âme. Je prie pour que Dieu t'accorde son pardon et te garde dans son royaume céleste.

Mon oncle GNAMIEN Kouao et son épouse

Je vous remercie pour vos conseils, de votre soutien et de votre assistance.

Pr AMOIKON Kouakou Chunboa Ernest, son épouse et ses enfants

Grand frère AMOIKON, trouvez ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de ma profonde gratitude. Je ne pourrai jamais oublier tout ce que vous et toute votre famille, avez fait et continuent de faire pour moi. Chaque jour, je prie le seigneur Jésus pour qu'il vous donne une bonne santé pour bénéficier encore de vos conseils et encouragements. Que Dieu vous bénisse et vous comble de ses grâces.

Ma grande sœur AHON Akoua Madeleine

Merci pour ton soutien, ton assistance et tes encouragements. Que Dieu te le rende au centuple et réalise le désir de ton cœur.

Mon grand frère AHON Adjei et son épouse

Merci pour vos soutiens et vos encouragements.

Mes oncles ANO Boa Bernard, KOUAO Tiémélé et son épouse, APPIA Kouablan et son épouse, ATTA Appia Jacques et son épouse et ETTIEGNE Brou Kouadio je vous dis merci pour vos soutiens et conseils. Que Dieu vous donne une bonne santé.

Mes frères et amis : TIEMELE Emmanuel et son épouse, KPANGNI Arsène et son épouse, ASSALE Jean Charles et son épouse, Dr AHI Amedé Pascal et son épouse et ALLIKO Theodore ; SOSSAD Médard Didier MAURICE Amoa Urbain et ACHI Alain Roger. A travers vous, je voudrais remercier tous mes frères et amis pour leurs sollicitudes, leurs conseils et leur disponibilité. Que Dieu vous bénisse et vous le rende au centuple.

Mes cousins et cousines

Trouvez ici le témoignage de mon estime et de mon affection fraternelle.

Mes neveux et nièces

Trouvez ici mon sincère Amour pour vous tous.

Je tiens à remercier d'une manière spéciale ma chérie. Durant la dernière année, tu m'as donné le courage et la force nécessaire à l'aboutissement de ce projet de recherche.

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur KORE Diopoh Jacques

Professeur Titulaire de Biochimie. Professeur, trouvez ici l'expression de notre sentiment de gratitude et d'éternelle reconnaissance.

Au défunt Professeur Frédéric GUÉDÉ-GUINA

Ex Professeur titulaire de Biochimie et fondateur du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny qui malgré ses multiples tâches quotidiennes a su canaliser les membres du Laboratoire. Celui que j'appelais intérieurement le vétéran infatigable car Professeur GUEDE-GUINA était toujours à l'heure au travail de sorte qu'il m'arrivait de me poser la question s'il ne dormait pas au Laboratoire.

Professeur, que le bon Dieu vous accueille dans sa meilleure demeure et sachez que dans le domaine de la recherche vous avez eu du mérite, vous avez vécu dignement et vous resterez un modèle car vos poulains ont bien saisi vos conseils qu'ils essaient de pérenniser. Que ta famille trouve ici l'expression de toute notre reconnaissance eu égard au travail déjà abattu. Nous espérons que ce travail aura une place importante dans le domaine de la Recherche Scientifique.

J'adresse également mes remerciements aux Docteurs N'GUESSAN Jean David (Maître de conférences), YAPO Adou (Maître de conférences), BIDIE Alain dit Philippe (Maître de conférences), BAHI Calixe (Maître-assistant), DJYH Bernard Nazaire (Maître-assistant), TREBISSOU Noel Jonhson David (Maître-assistant), BLA Brice (Maître-assistant), YEO (Maître-assistant), SOUMAHORO Thès (Maître-assistant), BAGRE Issa (Maître-assistant), DOUMBIA (Maître-assistant), KIPRE (Assistant), AKAKPO (Assistant), et COULIBALY Founsegue (Maître-assistant), pour leur assistance matériel sans faille et pour les discussions enrichissantes qui ont contribuées à ce travail.

Docteur KRA Adou Koffi Mathieu

Docteur, les quelques mots ne peuvent pas traduire tout ce que vous avez fait pour moi. Vous m'avez accueilli dans votre équipe comme un petit frère. Merci pour cet accueil chaleureux et fraternel. Sachez que je suis très fier de vous. Disponible pour tout le monde, très dynamique, travailleur et un abonné au travail bien fait, très dévoué à transmettre ses connaissances à qui veut l'entendre.

Vous êtes pour moi un exemple. Encore merci et chaque jour, à chaque fois que vous entendrez le chant du coq sachez que c'est un autre merci de ma part. Je voudrais que vous

continuez sur cette même lancée. Que Dieu vous accorde une très bonne santé et vous comble de ses grâces.

Un remerciement spécial aux Docteurs Jacques Bognan ACKAH (Assistant), KPOROU Kouassi Elysée (Assistant), KOUSSE Clément (Assistant) et OUATTARA Karamoko (Maître-assistant). Les grand-frères, merci pour votre sollicitude, votre disponibilité et vos encouragements. Que Dieu vous rende au centuple tout l'effort que vous avez consenti lors de ce travail.

Un grand merci à tous les doctorants du laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique pour leur soutien sans faille lors de nos différentes manipulations. Je voudrais aussi dire merci à tous les Enseignants du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique pour avoir assuré ma formation en biochimie au cours de toutes ces années.

Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est, aussi bien pour les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux, que pour leurs suggestions ou contributions.

Merci à tous mes collègues et amis du Laboratoire

J'adresse mes remerciements aux Professeurs YAO Benjamin Directeur de LAPISEN (Laboratoire des Procédés Industriels et de Synthèses de l'Environnement et des l'Energies Nouvelles) et ASSIDJO Emmanuel de l'INP-HB de Yamoussoukro pour m'avoir accepté au sein de votre Laboratoire, pour vos conseils et votre disponibilité.

Un remerciement spécial aux Docteurs AW Sadat responsable du Laboratoire de Microbiologie de LAPISEN (Laboratoire des Procédés Industriels et de Synthèses de l'Environnement et des l'Energies Nouvelles) de l'INP-HB de Yamoussoukro et madame pour l'accueil chaleureux que vous nous avez toujours réservé dans votre Laboratoire. Je souhaite que cette collaboration naissante se poursuive. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Je veux adresser mes remerciements aux Docteurs de l'Institut National Polytechnique de Yamoussoukro ADIMA Amissa Augustin (Maître de conférences), AKAKI David (Maître de conférences), SORO Yaya (Maître de conférences), Adje Félix (Assistant), GUEU (Maître-assistant), FANOU Didier (Maître-assistant), NIAMKE Florence (Assistant), ACKMEL (Maître-assistant), SORO Doudjo (Maître-assistant) et DONGO Rémi (Assistant)

à de l'INP-HB de Yamoussoukro pour leur assistance matériel sans faille et pour les encouragements qui ont contribuées à la réalisation de ce travail.

A Messieurs TONOH Firmin, N'DA Philippe, KOUASSI Parfait, Modeste et Monsieur KOUASSI Brice, DIA et KANON aux demoiselles AKE Patricia et SILLA pour vos conseils et encouragement pendant les moments les plus difficiles.

Nous ne saurions oublier tous nos collègues doctorants et stagiaires de l'INP-HB de Yamoussoukro : COULIBALY Katinan Rémi, KAKOU Ernest, NOGBOU Arsène, KOUADIO Ama Agnès, KOFFI N'dri Emmanuel, OUATTARA Abou, ABOUHO Verdier, KOUAKOU Amoulaye, DIBI Diane Esther, ZRAN Van Eric, KONAN Leticia, KONAN Affouet Sylvie DIBI Seraphin et madame KOUAME né EKISSI Alice

Avec qui nous avons toujours su entretenir une ambiance chaleureuse, fraternelle et amicale.

Je remercie tout aussi particulièrement Monsieur N'GUESSAN AMANI ANTOINE le botaniste à l'INP-HB de Yamoussoukro pour sa sollicitude, ses conseils et sa disponibilité.

Je voudrais dire sincèrement merci à Monsieur et Madame AMOIKON KOUAME à Yamoussoukro pour ce qu'ils ont fait pour moi durant tout mon séjour à Yamoussoukro.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et par l'oubli nous n'avons pas pu citer leur nom.

Je remercie spécialement les doctorants, GOLLY Koffi Julien, ANOUHE Say Jean Baptise, Dr KASSI Amian Brise Benjamin et Mademoiselle SERY Dapéa Christelle pour l'apport considérable qu'ils n'ont sans cesse essayé d'apporter à la réalisation de ce travail, l'ambiance fraternelle, conviviale et chaleureuse dont j'ai bénéficié durant tout le temps que j'ai passé avec eux. Je ferai tout mon possible pour garder intact l'ardeur de l'amitié que nous avons initiée. Les frères merci et que Dieu vous comble de ses grâces au-delà de votre espérance.

A NOS MAITRES ET JURYS

Au Professeur ZIRIHI Guédé Noel

Professeur titulaire de Botanique au laboratoire de Botanique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny. Je vous exprime toute ma reconnaissance pour avoir accepté d'assurer la présidence de ce jury malgré vos nombreuses occupations.

Au Professeur DJAMAN Allico Joseph

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur Joseph Allico DJAMAN Professeur titulaire de Biochimie pharmacodynamique et de Parasitologie, Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny, Chef du département de Biochimie Clinique et fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Sous votre Direction, j'ai été recruté pour l'initiation à la recherche. J'ai été très heureux d'avoir accompli ce travail que vous m'aviez confié. Je voudrais à cet effet vous adresser mes sincères remerciements et ma profonde gratitude. Que DIEU vous donne une très bonne santé pour mieux apprendre auprès de vous.

Au Professeur SIAKA SORHO

Je tiens aussi à remercier Monsieur SIAKA Sorho Maître de conférences de Chimie à l'Institut National Polytechnique Houphouët-Boigny de Yamoussoukro. Durant ces quatre années Pr SIAKA Sorho a bien voulu diriger mes travaux de thèse. Professeur, je vous remercie d'avoir accepté d'être le co-directeur de cette thèse, pour vos judicieux conseils en tant que chimiste, de m'avoir fait bénéficier de votre expérience, vos compétences et vos encouragements. Que Dieu vous donne ce que vous lui demanderez au delà de votre espérance.

Au Professeur COULIBALY Adama

Maître de conférences à l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny, Président de l'Université Péléforo Gon Coulibaly de Korhogo et Responsable de l'unité de Mycologie au Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique. Je tiens à vous exprimer mon profond respect et ma gratitude pour avoir accepté de siéger à ce jury.

Au Professeur KOFFI-Nevry Rose

Maître de conférences au laboratoire de Biotechnologie et Microbiologie des Aliments à l'UFR-STA de l'Université Nangui-Abrogoua. Je vous adresse mes sincères remerciements pour avoir accepté de participer à ce jury.

Au Professeur YAPI Houphouët Félix

Maître de Conférences au Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'UFR Biosciences. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail tout au long de ces années. Ses conseils et ses commentaires mais aussi sa bienveillance m'ont été fort utiles.

AVANT- PROPOS

Le présent travail a été réalisé au sein de deux Laboratoires :

- le laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'Unité de Formation et de Recherche (UFR) Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny dirigé par Monsieur DJAMAN ALLICO JOSEPH Professeur titulaire de Biochimie pharmacodynamique et de Parasitologie ;

- Le laboratoire de microbiologie de l'Institut National Polytechnique Houphouët-Boigny de Yamoussoukro par dirigé Monsieur SIAKA SORHO Maître de Conférences de Chimie.

Ce travail s'inscrit dans le programme de la valorisation des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle en vue de développer des produits nouveaux, fiables et accessibles à tous. Cette étude a été initiée afin de vérifier le potentiel antifongique de *Terminalia superba*, une plante de la famille des Combretaceae déjà connue pour ses propriétés anti-infectieuses en milieu traditionnel Africain.

La confirmation ou infirmation du potentiel antifongique de *T. superba* serait d'une grande utilité dans la lutte contre les mycoses que sont les aspergilloses, les candidoses et les cryptococcoses au cours de l'infection à VIH/SIDA. Surtout que ces deux dernières décennies les mycoses ont causé beaucoup de dégâts.

TABLE DES MATIERES

	Pages
DEDICA	I
REMERCIEMENTS	V
AVANT PROPOS	X
INTRODUCTION	1
I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. Généralités sur les champignons microscopiques	4
1.1. Caractères généraux des champignons microscopiques	4
1.1.1. Caractères morphologiques	4
1.1.2. Nutrition	4
1.1.3. Reproduction	5
1.1.3.1. Reproduction asexuée	5
1.1.3.2. Reproduction sexuée	5
1.2. Classification des champignons	5
1.3. Diagnostic de laboratoire	6
1.3.1. Prélèvement	6
1.3.2. Examen direct	8
1.3.3. Culture	8
1.3.3.1. Milieux d'isolement	8
1.3.3.2. Techniques d'ensemencement	8
1.3.3.3. Incubation	9
1.3.3.4. Lecture	9

1.3.4. Identification	9
1.3.4.1. Examen macroscopique	9
1.3.4.2. Examen microscopique	10
1.4. Généralités sur les mycoses et les germes étudiés	10
1.4.1. Généralités sur les mycoses	10
1.4.2. Généralités sur les espèces étudiées	11
1.4.2.1. <i>Candida albicans</i>	11
1.4.2.2. <i>Cryptococcus neoformans</i>	16
1.4.2.3. <i>Aspergillus fumigatus</i>	20
2. Généralités sur les plantes médicinales	24
2.1. Métabolites secondaires	24
2.1.1. Alcaloïdes	24
2.1.2. Polyphénols	25
2.1.3. Terpènes et stéroïdes	25
2.2. Description de la plante étudiée	25
2.2.1. Présentation des <i>Combretaceae</i>	26
2.2.2. Description de <i>Terminalia superba</i> Engl et Diels	26
2.2.3. Position dans la systématique	29
2.2.4. Distribution de <i>T. superba</i>	29
2.2.5. Utilisation en milieu traditionnel	29
2.2.6. Etudes pharmacologiques de <i>Terminalia superba</i>	29
3. Méthodes et techniques chromatographiques	30
3.1. Chromatographie sur couche mince	32

3.2. Chromatographie sur colonne	33
3.3. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	33
3.4. Chromatographie sur gel de dextrane : Sephadex®LH20	34
3.5. Chromatographie d'exclusion	34
3.6. Recristallisation	35
4. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne	35
4.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé	35
4.2. Méthode des spots	36
4.3. Méthode en milieu liquide	37
4.4. Méthode de la double dilution en tubes inclinés	37
II. MATERIEL ET METHODES	38
1. Matériel	38
1.1. Matériel biologique	38
1.1.1. Matériel végétal	38
1.1.2. Microorganismes étudiés	38
1.2. Matériel technique	38
1.2.1. Milieu de culture	38
1.2.2 Molécule de référence testée	38
1.2.3. Produits chimiques	39
1.2.4. Appareillage et verrerie de laboratoire	39
2. Méthodes	40
2.1. Collecte de la plante	40

2.2. Extraction	40
2.2.1. Préparation des extraits totaux	40
2.2.2. Préparation des extraits par partition	43
2.3. Purification	45
2.3.1. Chromatographie sur colonne de X _{1,2}	45
2.3.2. Chromatographie sur couche mince de X _{1,2} et des fractions	45
2.3.3. Fractions issues de X _{1,2}	47
2.3.4. Identification de la nature des composés chimiques contenus dans le produit de la recristallisation de l'extrait G ₃	47
2.4. Evaluation de l'activité antifongique des différents extraits, fractions et le ketoconazole	48
2.4.1. Préparation de la gélose de Sabouraud	48
2.4.2. Incorporation des extraits végétaux et le ketoconazole à la gélose	49
2.4.3. Préparation de l'inoculum	49
2.4.4. Culture des micro-organismes en présence de l'extrait végétal et le ketoconazole	50
2.4.5. Dénombrement des espèces fongiques	52
2.4.6. Détermination des CMI et CMF	52
2.5. Détermination du pouvoir antifongique des extraits et du ketoconazole	53
2.5.1. Critères de comparaison des activités des extraits et le ketoconazole	53
2.5.2. Rapport d'activité	53
2.5.3. Classification des niveaux d'activité	53
2.6. Tri-phytochimiques	54
2.6.1. Recherche des saponosides	54

2.6.2. Recherche des alcaloïdes	54
2.6.3. Recherche des quinones	55
2.6.4. Recherche des polyphénols	55
2.6.5. Recherche des flavonoïdes	56
2.6.6. Recherche des stérols	56
2.7. Analyse statistique et traitement des résultats	57
III. RESULTATS ET COMMENTAIRES	58
1. Activité antifongique des extraits et le ketoconazole	58
1.1. Activité antifongique des extraits totaux	58
1.1.1. Activité antifongique de l'extrait total aqueux de <i>T. superba</i>	58
1.1.2. Extrait antifongique de l'extrait total hydroalcoolique	61
1.2. Activité antifongique des extraits issus des partitions	65
1.3. Activité antifongique des extraits issus du fractionnement de X _{1,2}	74
1.4. Activité antifongique du Ketoconazole	78
2. Tri-phytochimiques des extraits de <i>T. superba</i>	81
3. Profil Chromatographique de X_{1,2} et des fractions	83
4. Confirmation du profil chromatographique par flash chromatographie	85
5. Produit obtenu après recristallisation de la fraction G₃	87
IV.DISCUSSION	89
1. Activité antifongique des extraits de <i>T. superba</i>	89
1.1. Activité antifongique de l'extrait total aqueux	88
1.2. Activité antifongique de l'extrait hydroalcoolique	90
1.3. Activité antifongique des extraits issus des partitions	91

1.4. Activité antifongique des extraits issus de fractionnement	93
2. Etude tri-phytochimique des extraits de <i>T. superba</i>	95
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	97
IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	98
ANNEXES	A

LISTE DES ABREVIATIONS

AcOEt : Acétate d'éthyle

ADN : Acide Désoxyribonucléique :

ARN : Acide Ribonucléique

CMA : Corn- Meal-Agar

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice 50 %

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

EtOH : Ethanol

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

LAPISEN : Laboratoire des Procédés Industriels et de Synthèses de l'Environnement et des l'Energies Nouvelles

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

MVVR : Muqueuses Vulvo-Vaginites Récidivantes

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PC : Pomme de terre-Carotte

PCB : Pomme de terre Carotte Bile

PGA : Pomme de terre Glucose-Agar

PV : Prélèvement vaginal

RAT : Rice Agar Tween

Rf : Rapport frontal

SIDA : Syndrome Immunodéficience Acquise

SM : Spectroscopie de Masse

TFA : TriFluorofurane Acide

UFR : Unité de Formation et de Recherche

V.I.H.; Virus de l'Immunodéficience Humaine

UV : Ultra Violet

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1 : Photographie d'une candidose : le muguet ou stomatite aiguë	15
Figure 2 : Photographie d'une cryptococcose de la lésion cutanée	19
Figure 3 : Photographie de l'aspergillose pulmonaire	23
Figure 4 : Photographie du fût, houppier, des feuilles et fruits de <i>T. superba</i>	28
Figure 5 : schéma synoptique de l'extraction des extraits totaux aqueux et hydroalcoolique de <i>T. superba</i>	42
Figure 6 : Schéma synoptique de la préparation des extraits des partitions de <i>T. superba</i>	44
Figure 7 : Schéma de la préparation des fractions de <i>T. superba</i> sur gel de filtration de sephadex LH-20	46
Figure 8 : Schéma des méthodes d'incorporation des extraits à la gélose Sabouraud et de préparation de l'inoculum	51
Figure 9 : Courbes de sensibilité de <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> et <i>Aspergillus fumigatus</i> en fonction de l'extrait total aqueux	59
Figure 10 : Courbes de sensibilité de <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> et <i>Aspergillus fumigatus</i> en fonction de l'extrait total hydroalcoolique	62
Figure 11 : Rendement des extraits totaux de <i>T. superba</i>	64
Figure 12 : Courbes de sensibilité de <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> et <i>Aspergillus fumigatus</i> en fonction de la concentration des extraits issus de la partition hexane-eau	67
Figure 13 : Courbes de sensibilité de <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>	

et <i>Aspergillus fumigatus</i> en fonction de la concentration des extraits issus de la partition Acétate d'éthyle-eau	68
Figure 14 : Courbes de sensibilité de <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> et <i>Aspergillus fumigatus</i> en fonction de la concentration des extraits issus de la partition Butanol-eau	69
Figure 15 : Courbes de sensibilité de <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> et <i>Aspergillus fumigatus</i> en fonction de la concentration des extraits issus de la partition Dichlorométhane-eau	70
Figure 16 : Courbes de sensibilité de <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> et <i>Aspergillus fumigatus</i> en fonction de la concentration des extraits issus de la partition Chloroforme-eau	71
Figure 17 : Rendements des extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique	73
Figure 18 : Courbes de sensibilité de <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> et <i>Aspergillus fumigatus</i> en fonction de la concentration des extraits issus du fractionnement de l'extrait X _{1,2}	75
Figure 19 : Différents rendements obtenus à l'issu du fractionnement de l'extrait X _{1,2}	77
Figure 20 : Courbes de sensibilité de <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>A. fumigatus</i> en fonction de la concentration du Ketoconazole	79
Figure 21 : Quelques groupes chimiques dans les extraits de <i>T. superba</i>	82
Figure 22 : Chromatographie sur couche mince de X _{1,2} à 254 et 365 nm	84
Figure 23 : Courbes obtenues après analyse flash chromatographique de l'extrait X _{1,2}	86

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I : Valeurs des paramètres antifongiques de l'extrait total aqueux	60
Tableau II : Valeurs des paramètres antifongiques de l'extrait total hydroalcoolique	63
Tableau III : Valeurs des paramètres antifongiques des extraits issus des partitions	72
Tableau IV : Valeurs des paramètres antifongiques des extraits issus du fractionnement de $X_{1,2}$	76
Tableau V : Valeurs des paramètres antifongiques du ketoconazole	80

INTRODUCTION

De nombreuses données relatives aux peintures murales, aux recettes anciennes, aux vestiges archéologiques, aux traditions orales et écrites se rapportant à la médecine populaire, montrent que depuis longtemps l'Homme a toujours exploité les vertus médicinales de nombreuses plantes. En effet, la flore qui n'existe que depuis près de 120 millions d'années a largement servi de base à la découverte de nombreux médicaments modernes. Elle continue encore de nos jours à être sollicitée par la recherche scientifique à cause des vertus thérapeutiques de certaines plantes. Ainsi, les principes actifs d'un certain nombre de produits pharmaceutiques d'usage courant dérivent de métabolites secondaires ou de substances actives extraites des plantes médicinales (Cowan, 1999 ; Pousset, 2002 ; Diehl *et al.*, 2004). Cependant, sur les 250 000 à 300 000 espèces végétales recensées dans le monde, et en supposant qu'environ 35 000 possèdent des propriétés médicinales, seulement 5000 ont été étudiées jusqu'à présent, soit environ 14 à 15% (Anonyme 2, 2000). La plupart de ces études ont été menées depuis longtemps dans les pays occidentaux (Pousset, 2006).

Par contre en Afrique, c'est seulement ces dernières décennies que la recherche scientifique sur les activités biologiques des plantes commence à prendre un essor. Cependant, de tout temps, l'africain s'est soigné avec les produits naturels, notamment les plantes. Aujourd'hui encore, malgré l'existence de la médecine moderne, la plupart des populations africaines continuent de se soigner avec des produits à base de plantes. Selon le rapport annuel de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 80 % de cette population utilisent les plantes pour se soigner (OMS, 2003 ; Elujoba *et al.*, 2005). Le recours à la médecine traditionnelle s'explique par les habitudes traditionnelles et culturelles, la proximité des plantes et les coûts élevés des médicaments modernes qui sont hors de portée pour la plupart des populations africaines aux revenus modestes (Stevens, 1997).

Le recours aux plantes par les populations africaines pour les soins médicaux se fonde sur plusieurs raisons toutes essentielles :

- la médecine traditionnelle est plus accessible (proximité) à la majorité de la population des pays du tiers monde, ce qui n'est pas le cas des médicaments modernes ;
- la pauvreté dans la plupart des pays en développement est de plus en plus grandissante, et les coûts des médicaments dits modernes sont inaccessibles à la plupart des populations ;

- les maladies émergentes comme le SIDA et le cancer sont responsables de l'augmentation d'un certain nombre d'infections secondaires généralement causées par des champignons opportunistes (**Diamond, 1991 ; Rai et al., 2003**) ;
- l'apparition de nouveaux micro-organismes (champignons, bactéries et virus) très résistants devient une caractéristique préoccupante de l'évolution de la pathologie infectieuse depuis les deux dernières décennies ;
- les médicaments modernes existants sont souvent inefficaces sur les micro-organismes résistants;
- la manifestation d'effets secondaires voire même toxiques, dans certains cas, après l'usage des médicaments conventionnels.

Au regard du rôle très important que jouent les plantes médicinales dans le cas des soins, il apparaît clairement que les remèdes traditionnels à base de plantes constituent une alternative médicale importante ou un complément appréciable à la pharmacie classique du fait de leur grande richesse en composés chimiques bioactifs. Dès lors, il s'avère nécessaire d'évaluer les activités biologiques afin de confirmer l'efficacité, la sécurité et l'innocuité de ces plantes médicinales, l'usage empirique et sans contrôle pouvant exposer les usagers à divers accidents (intoxications, insuffisance rénale, etc....)

En Côte d'Ivoire, de nombreuses plantes ont fait l'objet d'études scientifiques pour leurs propriétés pharmacologiques et médicinales (**Zirihi et al., 1991 ; Bekro et al., 2007 ; Tra Bi et al., 2008 ; Soro et al., 2010 ; Kouassi et al., 2012**). Les études ethnobotaniques menées par **Zirihi** depuis (1991), ont révélé plusieurs plantes parmi lesquelles l'on compte des espèces à activités anti-infectieuses telles que *Mitracarpus scaber*, *Fagara macrophylla*, *Thoningia sanguinea* et *Terminalia superba* (**Guede- Guina et al., 1997 ; Kra et al., 2003**). Dans cette collection se trouve une espèce du genre *Terminalia* (*Terminalia superba*), retenue pour la présente étude. *Terminalia superba* est une espèce de forêt dense humide retrouvée en Afrique centrale et occidentale. Les feuilles de cette plante sont simples. Les inflorescences sont en épis et les fruits sont ailés. En médecine traditionnelle *T. superba* est utilisé dans le traitement de nombreuses affections d'origines bactériennes, fongiques et virales (**McGaw et al., 2001**). Cette plante renfermerait des composés phytochimiques qui justifieraient les activités biologiques.

Afin de confirmer les vertus antimicrobiennes accordées à *Terminalia superba*, la présente étude a été initiée pour évaluer l'activité antifongique des extraits de cette plante sur la croissance *in vitro* de trois espèces de champignons opportunistes (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*). Le fractionnement bioguidé réalisé

permettra de caractériser le ou les composé(s) actif(s) à la base de cette activité. Le choix de ces champignons est fondé sur le fait que ce sont des agents pathogènes qui prolifèrent sur des terrains immunologiquement fragilisés, en induisant des infections cutanées et systémiques.

L'objectif général de cette thèse est de vérifier puis d'améliorer l'activité antifongique des extraits de *T. superba*. Pour atteindre cet objectif, trois objectifs spécifiques ont été assignés à cette étude :

- 1- étudier le pouvoir antifongique des extraits totaux aqueux et hydroalcoolique sur la croissance *in vitro* de deux levures (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) et d'une moisissure (*Aspergillus fumigatus*) ;
- 2- améliorer l'activité antifongique de l'extrait total le plus actif par extraction bioguidée ;
- 3- mettre en évidence par screening phytochimique et chromatographie sur couche mince, la nature des principes actifs qui seraient dans les fractions les plus actives.

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur les champignons microscopiques

Les Champignons, encore appelés "Fungi" (contraction du latin "funus" qui signifie funérailles, et "ago" qui signifie produire) ou mycètes (du grec mukês, champignon), sont aujourd'hui érigés en règne autonome, au même titre que les Procaryotes (Archéobactéries, Bactéries, Cyanobactéries), les Protistes eucaryotes (algues et protozoaires), les Végétaux et les Animaux. Ce cinquième règne du monde vivant est appelé Fungi ou règne Fongique (**Bouchet *et al.*, 1999 ; 2005**).

Le Règne fongique comprend actuellement environ 70 000 espèces recensées parmi lesquelles 13500 sont lichénisées et font l'objet d'une science autonome : la lichénologie. Cependant, les estimations actuelles proposées par extrapolation, évaluent le nombre effectif de champignons à la surface de la planète, à plus d'un million d'espèces (**Bouchet *et al.*, 2005**).

1.1. Caractères généraux des champignons microscopiques

1.1.1. Caractères morphologiques

Le thalle est l'appareil végétatif. Il est constitué de cellules isolées juxtaposées que l'on appelle levures ou filaments ou hyphes ou mycéliums enchevêtrés. On distingue le thalle levuriforme du thalle filamenteux.

Le thalle levuriforme est constitué de cellules arrondies ou ovalaires qui croissent par bourgeonnement. Celles-ci se détachent de la cellule-mère pour bourgeonner à leur tour. Dans certaines conditions de vie, les bourgeons peuvent ne pas se détacher de la cellule-mère et s'allonger pour former un pseudo-mycélium distinct d'un mycélium vrai par un certain nombre de caractères (la paroi, la croissance, septa, les branches latérales et les cellules terminales).

Quant au thalle filamenteux, il est en forme de tube dont la paroi limite un protoplasme contenant les noyaux. Les tubes mycéliens peuvent être continus ou cloisonnés. Ce sont des tubes ramifiés de 2 à 15 μm de diamètre et 100 μm environ de longueur (**Therizol-ferly, 1990 ; Koenig, 1995**).

1.1.2. Nutrition

Les conditions nécessaires au développement des champignons sont fonction de la formation du mycélium. A la fois hétérotrophes pour le carbone et sans pouvoir de phagocytose (excepté les myxomycètes), les champignons sont réduits à absorber des substances organiques

et minérales à l'état dissout. Ils sont incapables de synthétiser leur substance à partir d'éléments simples. Ils ont besoin de matières organiques déjà synthétisées.

Quel que soit leur mode de vie, les champignons ont besoin de carbone, d'azote, d'hydrogène, d'oxygène, d'oligo-éléments, parfois des vitamines (**Therizol-ferly, 1990 ; Chabasse, 1994**). Ces besoins nutritionnels constituent parfois des caractères spécifiques utilisés pour les identifier (**Bouchet et al., 1989 ; Botton et al., 1990**).

1.1.3. Reproduction

La multiplication et la reproduction des champignons se font sous forme de spores selon deux mécanismes : sexué et asexué. Un champignon peut se reproduire :

- sous forme asexuée : c'est l'anamorphe ;
- sous forme sexuée : c'est la téléomorphe ;
- sous les deux formes en même temps : c'est l'holomorphe.

Il existe des espèces qui ne produisent pas de spores. Elles sont appelées "*mycelium serilum*" (**Koenig, 1995**).

1.1.3.1. Reproduction asexuée

La reproduction asexuée est la plus fréquente et la plus simple. Elle fait intervenir une division du noyau par simple mitose.

1.1.3.2. Reproduction sexuée

La reproduction sexuée fait intervenir la rencontre de filaments spécialisés, la conjugaison des noyaux et une réduction chromatique. Si la reproduction sexuée a lieu dans le thalle issu d'une seule spore, le champignon est dit homothallique et les dicaryons sont appelés homocaryons. Si elle nécessite la rencontre de deux thalles différents compatibles, le champignon est dit hétérothallique et les dicaryons sont des hétérocaryons (**Badillet et al., 1987 ; Therizol-ferly, 1990 ; Dupont et al., 1997**).

1.2. Classification des champignons

De très nombreuses classifications existent. Elles ont été modifiées avec l'évolution des connaissances et l'application récente à la mycologie des techniques de biologie moléculaire.

Pour des raisons de simplicité, il a été retenu deux types de classification dans lesquelles ne figurent que les genres ayant un intérêt en mycologie médicale.

La classification (partielle) proposée par **Hawksworth *et al.* (1983)** et **Kwon-Chung *et al.* (1992)**. La sous division des *Mastigomycotina* a été supprimée. En effet, les études ultrastructurales, biochimiques, génétiques ont montré des différences importantes avec les vrais champignons. Ces organismes sont actuellement transférés dans le règne des protistes, regroupant les protozoaires et d'autres organismes. Par ailleurs, dans le phylum des *Ascomycotina*, la classe des Ascomycètes tient compte, non seulement de la nature de l'ascocarpe, mais également du type d'asques, de la nature de sa paroi et du mécanisme d'éjection des ascospores.

1.3. Diagnostic de laboratoire

Le diagnostic d'une mycose suspectée par le médecin sera confirmé dans la mesure du possible, par l'isolement au laboratoire du champignon responsable. Le diagnostic mycologique comprend quatre étapes importantes :

- le prélèvement ;
- l'examen direct ;
- la culture sur milieux appropriés ;
- l'identification des champignons isolés.

1.3.1. Prélèvements

Le diagnostic d'une mycose dépend de la façon dont la récolte du matériel pathologique suspecté est effectuée. Il ne peut y avoir de bon diagnostic réalisé sur du mauvais matériel. Aussi les prélèvements doivent être faits au bon endroit de la lésion, en quantité suffisante et dans de bonnes conditions.

Pour des lésions suintantes, des bordures de lésion sont grattées ou un écouvillon est utilisé. En cas de suspicion de *Pityriasis versicolor* par exemple le scotch-test permet de faire le diagnostic dès l'examen direct (**Badillet, 1991 ; Baran *et al.*, 2001**).

Pour les teignes du cuir chevelu et des poils, il est préférable de faire un examen préalable des lésions sous une lampe de Wood pour ne prélever que les cheveux fluorescents à l'aide d'une pince à épiler. A défaut, les cheveux cassés sont recueillis. Les squames et les croûtes sont raclées avec une curette, le pus des lésions suppurées est prélevé avec un écouvillon (**Joffin, 2003**).

En cas d'onyxis, il est recommandé de couper avec des ciseaux ou une pince stérile, toute la partie de l'ongle atteinte jusqu'à la limite de la partie saine (**Therizol-ferly, 1990 ; Dupont *et al.*, 1996**).

Dans le cas des plaies cutanées, le prélèvement est réalisé par écouvillonnage des lésions ou par ponction à l'aide d'une aiguille stérile, après avoir désinfecté la surface avec un antiseptique (**Badillet, 1991**).

Pour les muqueuses et orifices naturels, on utilise un écouvillon stérile. On frotte bien les lésions apparentes. Si l'examen ne peut pas être réalisé immédiatement, on ajoute un peu d'eau physiologique stérile dans le tube. Il existe des cas particuliers :

- la bouche : si la lésion est végétante ou ulcéreuse, on réalise une biopsie ;
- l'anus : les lésions étant souvent squameuses, on racle les squames en périphérie ;
- le vagin : on fait le prélèvement sous spéculum ;
- l'oreille : s'il existe un bouchon noirâtre, on le prélève à la pince (**Koenig, 1995**).

Pour les prélèvements pulmonaires ; les expectorations sont recueillies dans un récipient stérile après rinçage de la bouche avec un antiseptique. Mais il est préférable de réaliser des aspirations trachéales ou bronchiques sous fibroscopie, ou des lavages broncho-alvéolaires (**Badillet *et al.*, 1987**). Les urines sont recueillies après désinfection soignée des organes. Les selles sont recueillies dans un récipient stérile. Les liquides céphalo-rachidiens et autres liquides sont recueillis dans un tube stérile.

En ce qui concerne le sang, 5 à 10 ml sont prélevés et mis dans des tubes contenant un anticoagulant. Ce prélèvement peut être incorporé directement à un milieu de culture approprié.

Pour les biopsies de tissus ou d'organes, pièces opératoires, les prélèvements sont séparés en deux parties dont l'une est fixée dans du liquide de Bouin ou dans du formol. Cette partie sert à l'examen anatomo-pathologique, tandis que l'autre est placée dans de l'eau physiologique stérile en vue de la culture (**Baran *et al.*, 2001 ; Joffin, 2003**).

1.3.2. L'examen direct

Tout matériel d'analyse (liquide céphalo-rachidien, expectoration, lavage broncho-alvéolaire, écouvillonnage des muqueuses, selles, urines, sondage gastrique et autres biopsies) transmis au laboratoire pour un diagnostic mycologique doit faire l'objet d'un examen microscopique direct. L'examen direct peut se faire à l'état frais, avec ou sans coloration, ou après préparation de l'échantillon. La coloration de Gram convient également à la plupart des types de matériel, et est positive pour tous les champignons en bon état physiologique (**Badillet et al., 1987 ; Therizol-ferly, 1990**).

1.3.3. Culture

La culture est absolument nécessaire pour l'isolement et l'identification des champignons.

1.3.3.1. Milieux d'isolement

Le milieu Sabouraud est le milieu universel et le plus simple. Il contient du glucose (2 à 4%), de la peptone et de l'agar. Il convient pratiquement à tous les champignons responsables de mycoses (**Badillet et al., 1987 ; Therizol-ferly, 1990**).

Le milieu Sabouraud-chloramphénicol et/ou gentamycine est utilisé de préférence en raison de la présence très fréquente des bactéries qui gênent l'isolement et l'identification (**Badillet, 1991 ; Koenig, 1995**).

Le milieu Sabouraud-chloramphénicol-actidione : l'actidione ou le cycloheximide est un inhibiteur des moisissures saprophytes. Il est conseillé d'associer ce milieu au précédent en particulier pour les prélèvements de la peau et des phanères. L'actidione inhibe également la croissance de certaines levures tout en laissant pousser la plupart des pathogènes (sauf *Cryptococcus neoformans* et le genre *Mucor*) et sert alors de caractère d'identification.

1.3.3.2. Techniques d'ensemencement

Dans les prélèvements, les champignons sont habituellement peu nombreux et poussent lentement. Il faut donc ensemer en abondance et stérilement. L'idéal est de disposer d'une hotte à flux laminaire. Dans le cas contraire, le travail doit être effectué entre deux bacs bunsen. L'ensemencement se fait d'abord sur le milieu Sabouraud-chloramphénicol puis sur milieu

Sabouraud-actidione. Ensuite, l'examen direct se fait avec le reste du produit (**Therizol-ferly, 1990**).

1.3.3.3. Incubation

A l'exception du sang et du liquide céphalo-rachidien (LCR) incubés à 37° C, il est préférable d'incuber tous les prélèvements dans une étuve à la température moyenne de 27° C (25 à 30° C). En effet, à 37° C, malgré la présence d'antibiotiques, les bactéries poussent plus vite que les champignons. Ce qui rend difficile l'isolement et l'identification des champignons (**Gentilini et al., 1993**).

1.3.3.4. Lecture

La lecture des cultures se fait après 24 heures et tous les jours pendant 8 jours pour le sang et le LCR. Pour les prélèvements sur la peau et les phanères, la lecture se fait après 5 jours voire 10 à 15 jours. Cependant, pour tous les autres prélèvements, la lecture se fait après 48 heures d'incubation. Ces colonies peuvent être crémeuses, lisses ou rugueuses, de couleur blanche, beige ou rouge pour les levures. Elles peuvent être des colonies duveteuses, cotonneuses ou poudreuses pour les champignons filamenteux (**Therizol-ferly, 1990 ; Joffin, 2003**).

1.3.4. Identifications

Les techniques d'identification dépendent des champignons isolés.

- S'il s'agit des levures, les critères d'identification sont d'une part morphologiques et d'autre part physiologiques. La première étape consiste en l'identification du genre. Elle est basée sur les caractères morphologiques. La deuxième consiste en l'identification de l'espèce basée sur les caractères physiologiques. Cette identification est principalement basée sur les caractères d'assimilation des sucres (auxanogramme) et de fermentation des sucres (zymogramme) et sur les tests enzymatiques.
- S'il s'agit des champignons filamenteux, le diagnostic est uniquement morphologique et est basé sur l'examen macroscopique et microscopique du champignon et la biologie moléculaire (**Therizol-ferly, 1990 ; Kullberg, 1997**).

1.3.4.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique concerne :

- la consistance de la colonie : glabre, duveteuse, poudreuse, plâtreuse, soyeuse, laineuse, floconneuse, etc. ;

- la surface : plane, en dôme, plissée, cérébriforme;
- la présence de rayons fins ou larges, courts ou longs, s'enfonçant dans la gélose, etc. ;
- la couleur du recto et du verso ;
- la présence d'un pigment diffusible dans la gélose (**Therizol-ferly, 1990 ; Koenig, 1995**).

1.3.4.2. Examen microscopique

L'examen microscopique permet d'observer les spores, leur taille, leur morphologie, mais surtout la façon dont elles sont rattachées aux filaments (conidiogénèse) : isolées, en chaînes ramifiées ou non, en amas portées par des conidiophores isolés ou ramifiés, produites par des phialides ou non etc. En cas de difficulté d'identification, un réensemencement sur milieu à l'extrait de malt ou sur milieu de Czapek (milieu de référence pour les champignons) ou sur milieux Pomme de terre-Carotte (PC), Pomme de terre-Glucose-Agar (PGA), Corn-Meal-Agar (CMA), etc. peut s'avérer nécessaire (**Koenig, 1995**).

1.4. Généralités sur les mycoses et les espèces étudiées

1.4.1. Généralités sur les mycoses

Les mycoses sont des maladies infectieuses causées par la présence et le développement dans l'organisme de champignons microscopiques (**Dupont, 2002 ; Develoux *et al.*, 2003 ; Develoux et Bretagne, 2005**).

Les allergies mycosiques sont décelables par l'exploration de l'immunité cellulaire, intradermo-réactions avec antigènes fongiques spécifiques ou tests *in vitro* tels que le test de dégranulation des basophiles, tests d'inhibition de la migration des macrophages et dosage des IgE spécifiques, etc. (**Koenig, 1995 ; Morand *et al.*, 1996 ; Midgley *et al.*, 1998**).

- Caractères cliniques des mycoses

Afin de mieux cerner les caractères spécifiques des mycoses, une classification médicale a été établie selon la localisation des lésions en même temps que selon le type de champignon en cause (**Larregue, 1980 ; Crouprie *et al.*, 1992 ; Normand, 1991 et 1993 ; Feuilhade de Chauvin, 1998**). Cette localisation des mycoses dans l'organisme dépend de leur voie de pénétration et de leur mode de propagation. Ainsi, on distingue :

- les mycoses superficielles ou cutanées qui sont des infections de l'épiderme, de l'épithélium, des muqueuses malpighiennes (cavité buccale, vagin, gland) et des phanères (cheveux, poils, ongles) sont induites par des champignons (**Maury, 1987 ; Badillet, 1991 ; Pierard *et al.*, 1993**) ;

- les mycoses semi-profondes ou sous-cutanées, rares dans les régions tempérées et rencontrées surtout dans les pays tropicaux (pathologie tropicale), ont un site d'inoculation souvent cutané. Leur extension et leur dissémination ne touchent habituellement pas les organes internes (**Chouvalova, 1984**) ;
- les mycoses profondes ou systémiques ont souvent une voie de contamination aérienne. Elles se caractérisent par des envahissements tissulaires et viscéraux divers aboutissant à des tableaux cliniques sévères et aux formes les plus graves (**Cromberg et al., 1988 ; Marty et al., 2000**). Les mycoses sont rencontrées au niveau de tous les grands plis (intertrigos), au niveau des ongles (onyxis), et dans des zones anatomiques sensibles à l'humidité et la macération (l'aîne, les aisselles, les zones interdigitales, et sur les tissus brûlés ou écorchés).

Dans cette étude, particulièrement trois cas de mycoses seront abordées. Il s'agit des candidoses, des cryptococcoses et des aspergilloses causées par *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* respectivement.

1.4.2. Généralités sur les espèces fongiques étudiées

1.4.2.1. *Candida albicans* et les candidoses

- Description

Candida a été décrit sous 111 synonymes différents, répertoriés dans le livre « The yeasts » publié en 1984. Le genre *Candia* comprend actuellement 166 espèces (**Develoux et Bretagne, 2005**). Ce genre regroupe des levures non pigmentées, non capsulées, à bourgeonnement multilatéral et productrices de filament.

L'espèce de levure du genre *Candida* se distinguent principalement par leur morphologie coloniale, leur capacité à utiliser différentes sources de carbone et le type de fermentation (**King et al., 1980 ; Shepherd et al., 1985**). Sept espèces du genre *Candida* ont une importance médicale. Ce sont *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida krusei*, *Candida kyfer* et *Candida albicans*. La dernière étant la plus importante et la plus fréquemment isolée (**Samaranayake et Macfarlane, 1990 ; El-ebiary et al., 1997 ; Laverdière, 2006 ; Tortorano et al., 2006 ; Pfaller et Diekema, 2007 ; Del Palacio et al., 2009 ; Garcia-Agudo et Garcia-Martos, 2009 ; Odds, 2010**). Le genre *Candida* pénètre dans l'organisme soit par contact direct, soit par voie digestive ou par voie génitale. Les infections qui en découlent sont dénommées candidoses.

- Epidémiologie.

Candida albicans est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida*. Il représente près de 75 % de toutes les levures isolées chez l'homme (**Abi-said et al., 1997 ; Agoumi et al., 2000 ; Odds, 2010;**). *Candida albicans* est un organisme vivant à l'état naturel sur la peau, dans la bouche et le tube digestif de l'être humain. C'est un organisme commensal saprophyte. Il existe chez l'homme sain dans les muqueuses de la cavité buccale, de l'intestin et du vagin. *Candida albicans* se retrouve chez 80% de la population, et il n'entraîne habituellement aucune maladie ou symptôme en particulier (**Macfarlane, 1990, Mccullough et al., 1996 ; Palacio et al., 2009**). Sa dissémination est généralement d'origine endogène et se fait à partir du tube digestif par contiguïté vers les voies génitales, respiratoires, la peau ou par voie hématogène vers tous les organes. Il a un tropisme particulier pour les reins et l'œil. La contamination peut également se faire par voie sexuelle (**Lee et al., 1975 ; Koenig, 1995**).

- Diagnostique mycologique
 - Examen macroscopique

Les Cultures de *Candida* sont réalisées sur milieu solide de Sabouraud additionné d'antibiotique (par exemple le chloramphénicol et l'actidione) à large spectre incubé à 30 et 37° C. Les cultures se développent rapidement et les colonies sont visibles de 24 à 72 heures. La culture en boîte de Pétri de *Candida albicans* au laboratoire donne des colonies qui sont grandes, rondes, de couleur blanche ou crème (*albicans* signifie 'blanchâtre'). Certaines souches sont plus rugueuses. Après quelques jours de culture, des filaments qui s'enfoncent dans la gélose sont observés (**Macdonald et Odds, 1980**).

- Examen microscopique

L'examen microscopique présente des levures ovoïdes à bourgeonnement multilatéral mesurant de (3-6) X (6-10) μm . Après 8 à 15 jours, il y a la présence de pseudo-filamentation et de vraie filamentation.

- Identifications

Sur le milieu Rice Agar Tween 80 (RAT) ou Pomme de terre Carotte Bile (PCB), il est observé de 24 à 48 heures la présence d'une pseudo-filamentation bien développée. L'identification est aussi basée sur les caractères d'assimilation des sucres (auxanogramme) et de fermentation des sucres (zymogramme) à l'aide de galeries commerciales.

- * Au niveau de l'assimilation des sucres, la réaction est positive pour le galactose, le saccharose, le maltose et le tréhalose. Elle est négative pour le cellobiose, le lactose et le raffinose.
- * Au niveau de la fermentation des sucres, la réaction est positive pour le galactose et le maltose. Elle est négative pour le saccharose et le lactose.
- * Au niveau du nitrate de potassium et de la réduction du tétrazolium, la réaction est négative (**Koenig, 1995 ; Friberg, 2004**).
- Facteurs favorisants

Les infections à *Candida* sont opportunistes. La levure devient pathogène quand certains facteurs favorisants sont réunis. Les facteurs favorisants sont de différentes origines : locales, médicamenteuses, générales et hématopathies.

- * origines locales : humidité, chaleur, transpiration et mauvaise hygiène.
- * origines médicamenteuses : antibiothérapie, corticothérapie, traitements favorisant la sécheresse buccale comme les somnifères, les immunosuppresseurs, la chimiothérapie, prise de contraceptifs oraux en particulier les stéroïdes.
- * origines générales : état pathologique du patient (diabète, SIDA), grossesse. Les hémopathies concernant le polynucléaire neutrophile qui constitue la barrière de défense contre l'infection à *candida* (**Bennet et Johnson, 2003**).
- Différentes pathologies

Deux types principaux de candidoses sont connus :

- les candidoses superficielles, cutanées et muqueuses.
- les candidoses profondes qui surviennent toujours chez des sujets immunodéprimés, en particulier les malades du SIDA.

- Candidoses superficielles

- candidoses cutanées

Elles se développent dans les zones de transpiration comme l'aîne, les aisselles, les zones interdigitales et les endroits brûlés ou écorchés.

- candidoses des muqueuses

- * Les candidoses de la muqueuse de la cavité buccale se divisent en 4 types selon leur localisation (hyperplastiques, érythémateuses, pseudomembraneuses, candidoses de la

commissure labiale). Le muguet ou stomatite aiguë est fréquent chez le nourrisson et chez le sujet immunodéprimé, en particulier lorsqu'il est atteint du SIDA (Figure 1).

- * Les candidoses génitales ou vulvo-vaginite, elles sont la plupart du temps accidentelles, mais les cas de muqueuses vulvo-vaginites récidivantes (MVVR) sont de plus en plus fréquents. Elles sont dues à 80% à l'espèce *Candida albicans* (**Dieng et al., 2005 ; Fidel, 2005**). Elles peuvent être le signe d'un pré-diabète ou de l'infection par le virus du SIDA (**Garcia et Humbert, 2004**). Les causes de récurrences sont nombreuses et sont dues aux médicaments (cures répétées d'antibiotiques), aux œstrogènes, aux corticoïdes et immunosuppresseurs à la contraception par stérilet ou diaphragme. Pour la plupart des auteurs, la MVVR n'est pas une maladie sexuellement transmissible.
- * Les candidoses de l'œsophage accompagnent souvent l'infection par le VIH.
- o Les candidoses profondes
 - * Dans les candidoses systémiques, candida peut coloniser tous les organes, bien que les localisations rénales soient les plus fréquentes. Elles touchent les personnes souffrant de neutropénie et sont souvent mortelles.
 - * Les candidoses ostéoarticulaires sont dues au développement de *Candida albicans* dans les os, les articulations, le tissu périarticulaire (**Rello et al., 1998 ; Ketani et al., 2006**).

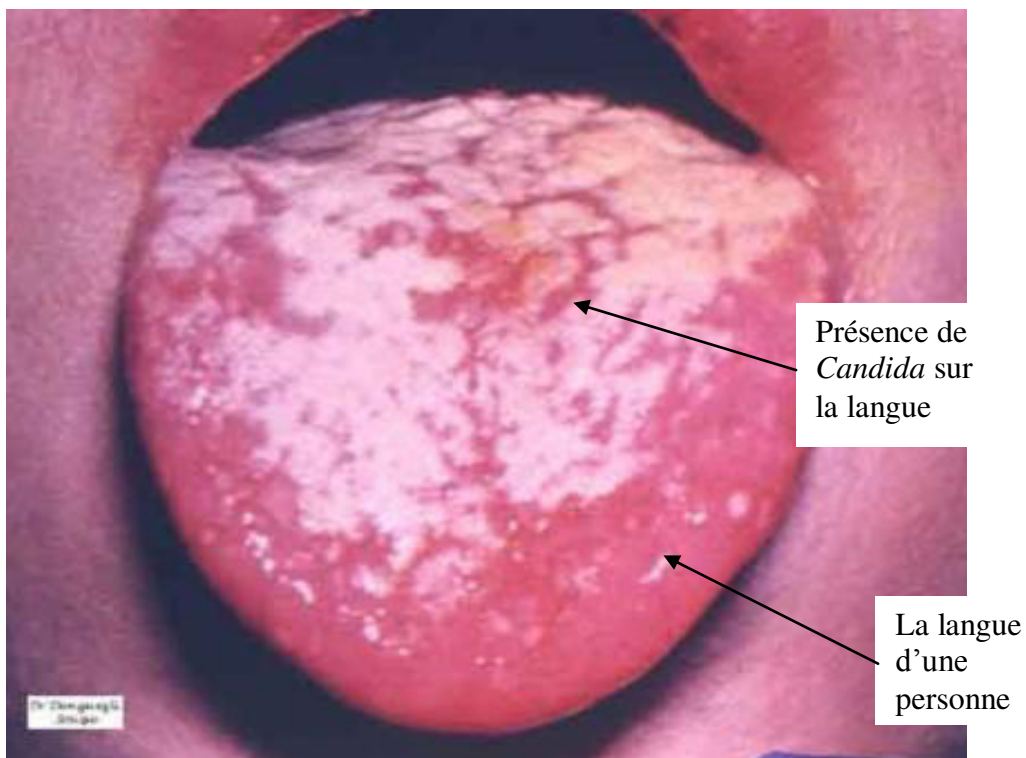


Figure 1 : Photographie d'une candidose : le muguet ou stomatite aiguë (Midoley *et al.*, 1998)

1.4.2.2. *Cryptococcus neoformans* et les cryptococcoses

- Description

Le genre *Cryptococcus* fait partie des levures et comprend neuf espèces. Ces levures en forme sphérique, ovoïde ou allongée se reproduisent par bourgeonnement unilatéral ou multilatéral. C'est une levure caractérisée par une capsule d'hydrate de carbone tant en culture qu'en milieu fluide. Il est responsable des cryptococcoses. Cette affection est d'actualité dans les pays en voie de développement. Par ailleurs, elle est devenue la troisième infection fongique (**Bovers *et al.*, 2008**). C'est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité chez les malades à VIH/SIDA (**Levitz et Boekhou, 2006 ; Seilmaier *et al.*, 2009**). Ce champignon se retrouve dans le sol, les fruits, le lait et dans les fientes sèches des pigeons qui en sont la principale réserve. Par conséquent, cette infection se rencontre aussi bien chez les animaux que chez les hommes. La transmission se fait d'animal à animal ou d'être humain à être humain. La transmission d'animal à être humain n'a pas encore été déterminée (**King et Meredith, 2009**) à l'exception de quelques cas rares (**Idnurm *et al.*, 2005**). Par ailleurs, elle n'affecte pas les oiseaux (**Idnurm *et al.*, 2005**).

- Epidémiologie

Cette levure pénètre par la voie pulmonaire (respiration : atteinte le plus souvent lente se traduisant par une image de pneumopathie localisée) et par la voie digestive dans l'organisme. Chez les immunodéprimés, l'infection peut être disséminée. Il existe également des infections cutanées (lésion de la peau). La cryptococose la plus fréquente est la méningo-encéphalite qui ressemble à une tumeur du cerveau. Elle présente des signes neurologiques divers, des signes centraux en foyer, de polyradiculonévrites et est d'évolution subaiguë. Elle est appelée septicémie cryptococcique chez les immunodéprimés (**Therizol-ferly, 1990 ; Gentilini *et al.*, 1993 ; Cheng *et al.*, 2001**). Tous les cas non traités sont fatals.

La recherche de *Cryptococcus neoformans* dans l'urine, les pus et dans le Liquide Céphalo-rachidien (LCR) est faite par un examen direct avec coloration à l'encre de chine après culture sur milieu Sabouraud. Le traitement en cas d'atteinte repose sur la flucytosine par voie orale à la dose de 150 mg/Kg/j. Elle s'avère efficace sur beaucoup de variétés, mais des mutants résistants peuvent se développer. Par contre, en association avec l'amphotéricine B à la dose 0,4 à 0,8 mg/kg/j, la flucytosine reste efficace. Ce traitement peut durer plusieurs mois. Il est également possible d'utiliser l'association 5-fluorocytosine et amphotéricine B dont l'administration se fait par voie intraveineuse et intrarachidienne pendant plusieurs semaines.

Cela semble plus efficace que la première association (**Therizol-ferly, 1990 ; Gentilini et al., 1993 ; Makadzange et al., 2010**). Pour éviter cette maladie, il faut contrôler la réduction de la population de pigeon et la décontamination des lieux avec les produits alcalins.

- Diagnostic mycologique
- Examen macroscopique

En culture, l'espèce donne des colonies en crème brillant naissant qui mesurent 4 à 12 μm . Elle appartient au groupe des basidiomycètes. Quatre groupes de cette espèce ont été identifiés.

- Examen microscopique

Les levures globuleuses et acapsulées sont observées à l'examen microscopique. Ces levures ont un diamètre de 2 à 12 μm avec la présence de rares bourgeons multilatéraux en "battant de cloche".

- Identification

La recherche de *Cryptococcus neoformans* dans l'urine, les pus et dans le Liquide Céphalo-rachidien (LCR) se fait par un examen direct avec coloration à l'encre de chine après culture sur milieu Sabouraud.

- Facteurs favorisants

La prédominance de cryptococcose a augmenté ces vingt dernières années pour plusieurs raisons. En plus de l'augmentation de l'infection à VIH/SIDA et l'usage prolongé des médicaments immunodépresseurs, les infections les plus sérieuses surviennent chez les malades dont le système immunitaire est faible (**King et Dasgupta, 2007 ; Bicanic et al., 2008 ; Barron et Madinger, 2008**). Les facteurs favorables sont dus :

- * à la transplantation d'organes : les infections surviennent en un ou deux ans après la transplantation, dans certains cas trente jours après ;
- * aux traitements de corticostéroïdes, mais pas chez ceux qui manquent de plaquettes sanguines ou souffrant de neutropénie (**King et al., 2009 ; Pongsai et al., 2010**) ;
- * à la chimiothérapie du cancer ;
- * à la maladie de Hodgkin (maladie cancéreuse) ;

- Différentes pathologies

Cryptococcus neoformans est responsable de diverses affections. Ce sont :

- Cryptococcose pulmonaire

C'est une infection potentiellement mortelle chez les immunodéprimés infectés par le VIH/SIDA. Elle cause de grandes lésions dans les poumons (**Kauffman, 2007 ; Pongsai et al., 2010**). Cette infection est due à la colonisation des voies respiratoires par le saprophyte (**Bekondi et al., 2006 ; King et al., 2009**).

- Cryptococcoses du système nerveux central (SNC)

La méningite et la méningo-encéphalite sont les manifestations les plus communes de cette cryptococcose. Elles sont fatales, sans une thérapie appropriée (la mort peut survenir en deux semaines voire plusieurs années (**Leite et al., 2004 ; Bekondi et al., 2006**)).

- Cryptococcoses de la peau et des os

D'autres organes tels que la peau et les os peuvent être impliqués dans les infections à cryptocoques (**Bekondi et al., 2006 ; Bartlett, 2010**) (Figure 2).

- Cryptococcose de la prostate

Chez les hommes, cette infection est souvent difficile à éradiquer. Les foyers d'infection peuvent persister après une thérapie chez les malades du système nerveux central et peuvent se comporter comme des réservoirs pour la rechute de l'infection systémique (**Idnurm et al., 2005 ; King et al., 2009**).

- Cryptococcose de la cavité médullaire

Cette cryptococcose est appelée ostéomyélite à cryptocoques. Elle est responsable de 5 à 10% des cas avec des lésions. Ces lésions peuvent être confondues à la tuberculose osseuse ou au néoplasme (**King et al., 2009 ; Bartlett, 2010**).

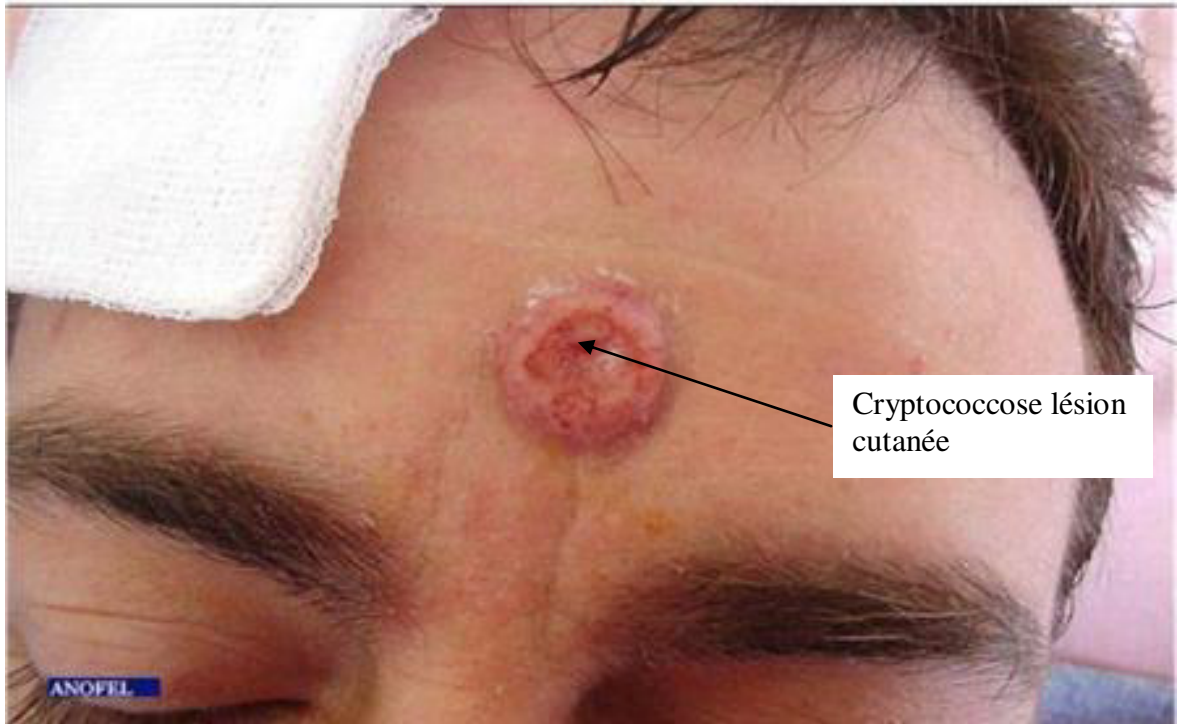


Figure 2 : Photographie d'une cryptococcose d'une lésion cutanée (Midoley *et al.*, 1998)

1.4.2.3. *Aspergillus fumigatus* et les aspergilloses

- Description

C'est en 1729 que MICHELI donne le nom de *Aspergillus* aux moisissures qu'il observe, par similitude de son aspect microscopique avec le goupillon (*Aspergillum* en grec) (**Leclercq et Sueur, 1969**). Les *Aspergillus* sont des champignons appartenant à la famille des Aspergillacées (ou Moniliacées). Ils sont cosmopolites, extrêmement répandus dans l'environnement. Ils vivent aux dépens de la matière organique en décomposition et se développent dans les silos, les composts, les balles de foin mais aussi dans les céréales et diverses plantes. Plusieurs antibiotiques ont été extraits de ce champignon dont la fumagilline qui aurait une réelle action amoebicide. *Aspergillus fumigatus* est plus fréquemment incriminé en pathologie humaine et animale. Il est responsable de près de 90 % des atteintes pulmonaires aspergillaires, parfois associé à *Aspergillus flavus* (**Koenig, 1995**).

- Epidémiologie

Les aspergilloses sont des mycoses cosmopolites, affectant plusieurs organes de l'homme et des animaux. Elles sont dues à la présence et au développement dans l'organisme de champignons filamenteux du genre *Aspergillus*.

Ces champignons sont essentiellement impliqués dans les mycoses respiratoires et surtout génitales, entraînant généralement l'avortement des femelles gestantes (**Koenig, 1995**). Chez l'homme, les affections les plus fréquentes sont celles de l'appareil respiratoire, au niveau du parenchyme pulmonaire (aspergillose diffuse), des bronches (bronchite aspergillaire simple ou obstructive avec ou sans manifestations allergiques), de la plèvre (aspergillose pleurale) ou d'une cavité néoformée (aspergillose intra-cavitaire ou aspergillome). Les atteintes des autres organes, bien que moins fréquentes, sont de plus en plus décelées dans des cas d'immunodépressions iatrogènes ou pathologiques et notamment au V.I.H. Chez les sujets immunodéprimés, l'évolution de l'aspergillose fait souvent penser à la tuberculose (**Therizol-ferly, 1990 ; Laurent et al., 1992**).

- Diagnostic mycologique

- Examen macroscopique

La croissance de *Aspergillus* est très rapide soit 24 à 48 heures à 37° C, soit 48 à 72 heures à 27° C. En culture sur milieu solide de Sabouraud, cette espèce donne des colonies planes, poudreuses, de couleur verte, devenant gris fumées en quelques jours. Le revers est de couleur très variable, d'incolore à rouge foncé en passant par jaune, vert ou brun (**Koenig, 1995**).

- Examen microscopique

L'examen microscopique de *Aspergillus* présente une tête aspergillaire en colonne longue. Des conidiophores longs, lisses, incolores ou colorés dans les tons de vert sont surtout à la partie terminale. Des vésicules hémisphériques sont aplaties au sommet. Une seule rangée de phialides très serrées et régulières est sur la moitié supérieure ou les 3/4 de la vésicule conidie globuleuse et rugueuse à échinulée. En principe, il n'y a pas de reproduction sexuée, mais celle-ci peut se voir chez quelques espèces du groupe *fumigatus*, en particulier dans les séries de *Aspergillus fisheri*. Des cleistothèces de couleur blanche deviennent jaune à orange avec le temps. Les ascospores sont incolores avec des crêtes équatoriales et à surface ornementée (**Koenig, 1995**).

- Identification

L'identification repose sur des critères tels que le type de milieu (composition, pH, antibiotique), la durée d'incubation, la température d'incubation, la vitesse de croissance, les aspects macroscopique et microscopique des colonies. Les *Aspergillus* croissent sur les milieux usuels tels que la gélose Sabouraud, le milieu Pomme de terre-Carotte (P.C.), le milieu Czapeck et le Lowenstein-Jensen. Au mieux, la culture sur milieu Sabouraud additionné d'antibiotique (0,5 g/ L de Chloramphénicol, ou 500 U/mL de Pénicilline, ou 5 µg/ mL de Streptomycine) permet l'obtention de culture homogène. Cependant, l'Actidione est à déconseiller, car le genre *Aspergillus* est un des rares champignons pathogènes sensibles à cet antibiotique.

- Facteurs favorisants

Plusieurs facteurs peuvent favoriser le développement de la l'aspergillose. Les principaux facteurs sont : l'hôte, le champignon et l'environnement.

- * La nature du terrain réceptif est un facteur décisif dans le développement de la maladie. Cette opportunité est le plus souvent liée à une défaillance du système de défenses de l'hôte. L'âge des animaux semble avoir peu d'influence sur la réceptivité ; mais certaines infections intercurrentes comme la rhino-trachéite infectieuse, la rage ou la tuberculose pourraient jouer un rôle favorisant du fait de la diminution des défenses de l'organisme qu'elles entraînent. Les traitements anti-inflammatoires, immunosuppresseurs et antibiotiques peuvent prédisposer les tissus à une invasion mycosique.
- * Au niveau du champignon lui-même, il faut noter quelques facteurs favorables à son développement qui sont : le tropisme vasculaire, la production de toxine nécrosante, la longueur des filaments, la faible taille des spores, et la thermophilie (**Bouchet et al., 1989** ; **Therizol-ferly, 1990** ; **Laurent et al., 1992**).

- * Les périodes pluvieuses augmentent la fréquence du développement de la maladie. Ce phénomène s'explique par le fait que le foin que l'on récolte essentiellement à cette période n'est pas toujours bien sec lorsqu'il est engrangé et qu'il moisit durant son stockage.
- Différentes pathologies
 - Aspergilloses des voies respiratoires

Les principales manifestations des Aspergilloses des voies respiratoires sont :

- * les processus de sensibilisation (Asthme, alvéolite allergique extrinsèque, aspergillose broncho-pulmonaire allergique) ;
- * l'aspergillome, "grain fongique", dans une cavité préformée ;
- * l'aspergillose invasive de pronostic redoutable ;

Elle atteint principalement les immunodéprimés en phase de neutropénie prolongée;

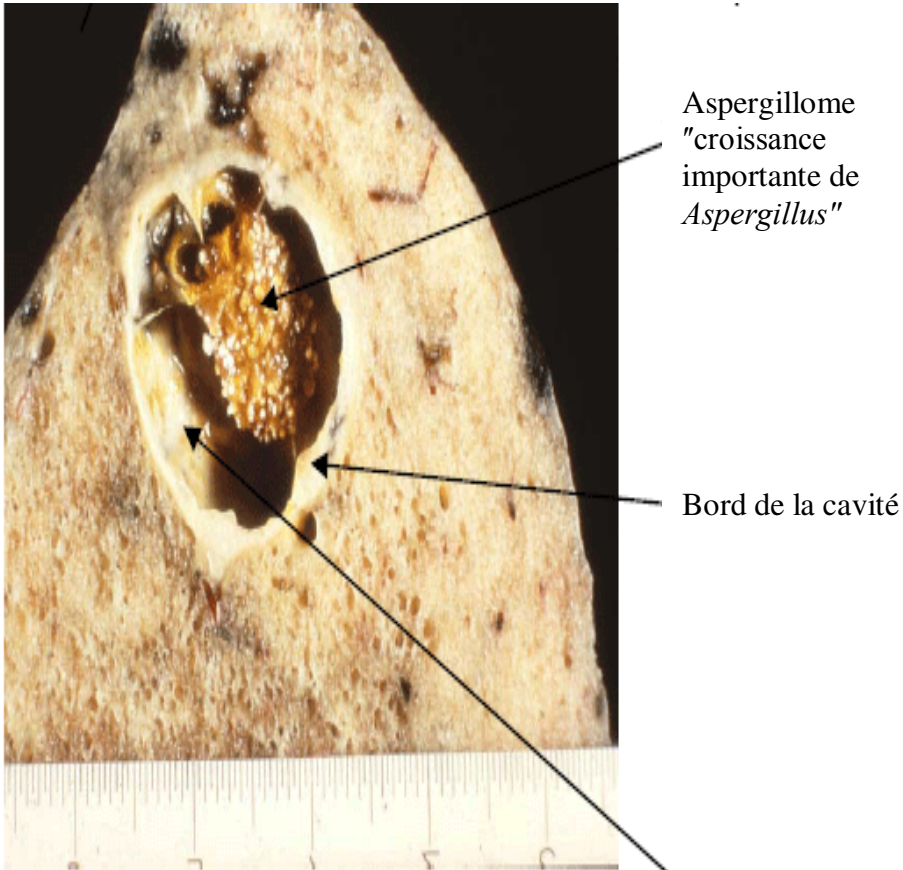
- * l'aspergillose semi-invasive ou nécrotique chronique survient chez des sujets débilisés non neutropéniques;
- * la bronchite aspergillaire muco-membraneuse;

La sinusite aspergillaire localisée ou invasive (souvent une étiologie dentaire).

- Autres Aspergilloses

D'autres Aspergilloses peuvent être distinguées:

- * les aspergilloses cornéennes rares, mais qui surviennent essentiellement après un traumatisme oculaire ;
- * les otomycoses aspergillaires qui se développent chez les personnes présentant une irritation ou une malformation du conduit auditif externe ;
- * l'aspergillose cutanée des grands brûlés ;
- * les péritonites liées aux dialyses péritonéales ;
- * les endocardites après intervention à cœur ouvert ;
- * les onyxis aspergillaires.



L'aspergillose a crée une cavité dans le poumon par destruction des tissus pulmonaires

Figure 3 : Photographie de l'aspergillose pulmonaire (Joffin, 2003)

2. Généralités sur les plantes médicinales

On appelle souvent « plante médicinale » une entité botanique dont au moins une de ses parties a des propriétés médicamenteuses. Elles peuvent avoir des usages alimentaires ou encore servir à la préparation de boisson hygiénique. Différentes parties d'une même plante médicinale peuvent avoir des utilisations différentes.

L'activité des plantes médicinales est souvent due aux métabolites primaires et surtout secondaires, fruits de la photosynthèse. Si les métabolites primaires sont souvent employés comme excipients dans la fabrication des formes médicamenteuses, un grand nombre des métabolites secondaires présentent des propriétés pharmacologiques intéressantes exploitées à des buts thérapeutiques (Mustofa *et al.*, 2000 ; Subu et Kuttan, 2002).

2.1. Métabolites secondaires des plantes médicinales

En fonction de leur nature biochimique et de leur origine biosynthétique, on distingue plusieurs catégories de métabolites secondaires. Il s'agit notamment des alcaloïdes, les polyphénols, les terpènes et stéroïdes.

2.1.1. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées d'origine végétale, à caractère alcalin, de structure complexe. Les alcaloïdes ont été trouvés dans plusieurs familles de plantes. Les principales molécules trouvées dans les alcaloïdes sont la morphine isolée en 1805, la strychnine en 1818, la caféine, la quinine, la colchicine, le curare et l'atropine. Les alcaloïdes sont des substances toxiques même à faibles doses avec des effets thérapeutiques connus. Bon nombre d'entre eux ont fait l'objet de modifications chimiques pour donner de nouvelles substances à activité modifiée (nalorphine, vinorelbine, etc.), ou ont donné naissance à des familles de médicaments synthétiques (Allain, 2000). Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité (action antispasmodique, et mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique).

Les alcaloïdes sont aujourd'hui nommés d'après la plante qui les a fournis, toujours avec une terminaison en "ine". D'une façon générale, les alcaloïdes sont amers et utilisés comme apéritifs (Anonyme 3, 2008).

2.1.2. Polyphénols

Les principaux composés phénoliques végétaux sont les phénols et acides phénoliques simples, les coumarines, les flavonoïdes et composés apparentés (anthocyanes), les tanins, les quinones, etc.

- Les phénols et acides phénoliques simples sont souvent fortement antioxydants, parfois antibactériens urinaires, analgésiques et anti-inflammatoires ou stimulants de la sécrétion biliaire ;
- Les coumarines ont des propriétés anti-œdémateuses ou photo-sensibilisantes qui servent à préparer des médicaments anti-tumoraux ;
- Les flavonoïdes et composés apparentés (anthocyanes) sont principalement responsables de nombreux pigments végétaux et en particulier les pigments jaunes et oranges. Les plantes riches en flavonoïdes ont souvent des propriétés antispasmodiques. Les anthocyanes sont des dérivés de l'acide cyanhydrique. A forte dose, ce sont des poisons apparentés au cyanure tandis qu'à dose modeste, ils ont des vertus antiseptiques (**Anonyme 3, 2008**) ;
- Les tanins (phénols associés à un sucre) ont généralement une activité bactériostatique qui permet de diminuer la fréquence des récurrences d'infection bactérienne (**Jepson et Craig, 2007**) ;
- Les quinones constituent une série de dicétones éthyléniques conjuguées cycliques qui peuvent comporter un noyau de benzène.

2.1.3. Terpènes et stéroïdes

Dérivés formellement de l'isoprène, les terpènes se différencient par le nombre d'unités isopréniques qui les constituent. Les principaux constituants terpéniques des végétaux sont : les mono-, les di-, les tri- et les sesquiterpènes.

2.2. Description de la plante étudiée

2.2.1. Présentation des *Combretaceae*

Terminalia superba est une espèce du genre *Terminalia*, appartenant à la famille des *Combretaceae*. Les *Combretaceae* sont des plantes ligneuses, des arbres, des arbustes ou des lianes. Les feuilles sont soit simples, entières, alternes, opposées, rarement verticillées non stipulées (**Moshi et Mbwambo, 2005 ; Thiombiano et al., 2006**). Les inflorescences sont des épis, des racèmes, des panicules ou des capitules. Les fleurs, grandes ou petites, sont généralement très colorées. Les *Combretaceae* sont hermaphrodites rarement unisexuées,

épigynes, actinomorphes légèrement zygomorphes, tétramères ou pentamères. Le calice est tubulaire et soudé à l'ovaire comportant quatre à huit lobes valvaires (**Adjanooun et al., 1982**). Les pétales au nombre de 4 à 5 ou quelquefois absents, grands ou petits, libres ou plus ou moins longuement coudés en tube, sont imbriqués ou valvaires. Les étamines de 4 à 10 sont généralement insérées sur la coupe calicinale. Les filets staminaux sont infléchis dans le bouton floral et portent des anthères medifixes à déhiscence longitudinale (**Ake-Assi et al., 1980 ; Adjanooun et al., 1982**).

Les ovaires sont infères, rarement semi infères, uniloculaires portant un à six ovules pendants. Le style est unique libre ou partiel et soudé au tube du calice. Les fruits drupés ou samaroides, ont une seule loge contenant une graine à cotylédons enroulés (**Ake-Assi, 1984 ; Vangah-Manda, 1986**).

La famille des *Combretaceae* comprend 20 genres et 400 espèces. Elle est représentée en Afrique par une centaine d'espèces réparties en 9 genres que sont : *Anogeissus*, *Combretum*, *Conocarpus*, *Guiera*, *Languncularia*, *Pteleopsis*, *Quisqualis*, *Strephonema* et *Terminalia* (**Aubréville, 1959**).

En Côte d'Ivoire, il existe 8 genres et 19 espèces de *Combretaceae* (**Adjanooun et al., 1984 ; Ake-Assi, 2001**).

2.2.2. Description de *Terminalia superba* Engl et Diels

Cette plante pousse dans les forêts denses humides, forêts caduques et aussi dans les forêts secondaires (**Burkill, 1985**). Elle préfère un climat caractérisé par des précipitations annuelles variant de 1400 à 2000 mm, une saison sèche, et une température moyenne comprise entre 23 et 26° C. Elle préfère les sols fertiles d'origine alluviale mais pousse également sur d'autres types de sols.

T. superba ou le Fraké peut atteindre 1m de diamètre au dessus des ailes, mais le fût est en général plus élevé. Sa croissance est très rapide en pleine lumière. Cette plante peut atteindre une hauteur de 50 m (Figures 4 A et B) (**Aubréville, 1959**)

En Côte d'Ivoire, *Terminalia superba* est appelé "Pai" chez les Abbey, chez les Bété de Soubré "Saro", en général chez les Bété "Solo", chez les Agni "Fra-in", chez les Attié "Fé", chez les Wobé "Sahan ou Sahain", chez les Yacouba "Kobaté", chez les Baoulé "Tra" et chez les Gouro "gbéhi".

- Fruits de *T. superba*

Les fruits sont ailés latéralement et sont plus larges que longs. Ils possèdent deux ailes seulement dans le plan. Mais, il se forme parfois une troisième et plus rarement une quatrième aile dans un autre plan. Les fruits sont transversalement oblongs d'environ 5 cm de large et 2 cm de long, glabres à maturité. Les fruits sont de petites samares qui sont regroupées en un axe commun. Leurs ailes permettent ainsi au Fraké de disséminer ses graines via la force du vent (**Aubréville, 1959**) (Figure 4 C).

- Fleurs de *T. superba*

Les fleurs du Fraké sont petites et groupées en épis terminaux. L'axe de l'inflorescence est pubescent. Les boutons floraux sont en tête de clou. Les fleurs pubescentes, jaunâtres ont une hauteur totale moyenne de huit millimètres. L'ovaire est sessile. Le calice a cinq lobes triangulaires. Le réceptacle pubescent est en dessus des étamines. Les étamines glabres sont au nombre de dix. Le filé est de deux 2,5 mm à 3 mm de hauteur (**Aubréville, 1959**).

- Feuilles de *T. superba*

Les pétioles sont longs et les feuilles atteignent 7 cm de long. Les feuilles sont groupées en touffes aux extrémités des rameaux, obovées, à sommet arrondi et brièvement acuminé, de 10 à 18 cm long, de 5 à 10 cm large (**Aubréville, 1959**) (Figure 4 D). Ces organes ont été utilisés pour l'identification de la plante.



A



B



C



D

Figure 4 : Photographie du fût, houppier, des feuilles et fruits de *T. superba* (PELE, 2007)

A : Photographie du fût de *T. superba*

B : Photographie du houppier de *T. superba*

C : Photographie des feuilles de *T. superba*

D : Photographie des fruits de *T. superba*

2.2.3. Position systématique

Terminalia superba fait partie du règne végétal. Son embranchement est le spermaphyte et de sous embranchement des angiospermes. La classe de *T. superba* est la classe des dicotyledones et de sous classe des Magnoliopsida (*Rosidaeae*). Son ordre est le myrtale. *T. superba* appartient à la famille des *Combretaceae*, du genre *Terminalia* et l'espèce est *superba* d'où sa dénomination *Terminalia superba*.

2.2.4. Distribution de *T. superba*

Cette plante a une large distribution en Afrique Occidentale et Centrale. Elle est retrouvée en Angola, au Bénin, au Cameroun, en Côte d'Ivoire, au Congo, au Gabon, au Ghana, en Guinée, en Guinée équatoriale, au Libéria, au Nigeria, en Centre Afrique, en République Démocratique du Congo, en Sierra Leone et au Togo (**Corbasson et Souvannavong, 1986**).

2.2.5. Utilisation en milieu traditionnel de *T. superba*

En médecine traditionnelle, *T. superba* est utilisé pour soigner de nombreuses affections grâce à ses diverses vertus thérapeutiques. Ainsi, au Cameroun, *T. superba* est utilisé pour soigner divers maux comme les douleurs abdominales, les gastroentérites, le diabète et les infertilités féminines (**Adjanooun et al., 1996 ; Gauthman et al., 2001 ; Moshi et Mbwambo, 2005**).

En Côte d'Ivoire, *T. superba* est utilisé pour soigner les douleurs abdominales, la fièvre, les céphalées, la malaria, les diarrhées, et les infections microbiennes (**Anonyme 1, 1978 ; Ake-Assi, 1984**). Les écorces du tronc sont les principales parties de la plante utilisées dans la préparation des médicaments traditionnels anti-diarrhéiques (décoction) (AKE-ASSI, 1984), mais aussi, en friction sur la peau comme antimicrobiens (**Ake-Assi, 1984 ; Zirihi, 1991**).

2.2.6. Etudes pharmacologiques de *T. superba*

Dans la littérature, de nombreuses études sur les activités pharmacologiques de *T. superba* sont disponibles. Cela dénote de l'importance de cette plante dans la médecine traditionnelle.

Ainsi **Kantchouing et al (2006)** ont montré l'activité antidiabétique des extraits méthanoliques et de chlorure de méthylène de l'écorce du tronc de *T. superba* sur des rats rendus diabétiques. En effet, leur résultat permet de dire que ces extraits font baisser le taux de glycémie chez les rats diabétiques.

L'activité analgésique de l'extrait de la fraction butanolique de l'écorce du tronc de *T. superba* a été étudiée par **Dongmo et al., 2006**.

Les travaux de **Dimo et al. (2007)** ont montré que l'extrait de méthanol de l'écorce du tronc induit la relaxation indépendante de l'endothélium de l'aorte thoracique de rat.

Wansi et al. (2007) ont isolé et élucidé la structure d'un inhibiteur de l'activité de l' α -glucosidase de l'écorce du tronc de *T. superba*.

Tobopda et al. (2008) ont rapporté dans leur étude l'isolement, l'élucidation de la structure de l' α -glucosidase et l'activité immuno-inductrice de deux nouveaux dérivés acides éllagique.

Padmashree et al. (2010) en revanche, ont observé les effets diabétiques avec l'extrait de chlorure de méthanol/méthylène mais avec des feuilles de *T. superba*. Les rats diabétiques traités par cet extrait dans cette étude ont vu leurs poids augmentés.

Une étude a été conçue par **Tom et al. (2010)** afin d'évaluer l'effet vasorelaxant de différents extraits totaux de l'écorce du tronc de *T. superba* et de comprendre les mécanismes impliqués dans les effets des extraits les plus efficaces. Cette étude a montré que tous les extraits de *T. superba* présentent une activité de vasodilatation sur les anneaux aortiques de rat.

Kuete et al. (2010) ont étudié l'activité antimycobactérienne, antibactérienne et antifongique de l'extrait de méthanol de l'écorce du tronc, des fractions (TSB1 à TSB7) et deux composés isolés (dérivés d'acide éllagique) par fractionnement bioguidé.

Tous ces travaux ainsi que les pratiques traditionnelles impliquant cette plante ont largement contribué à son choix pour cette étude. Elle vise à évaluer l'activité antifongique des extraits de *T. superba* sur la croissance *in vitro* de trois espèces fongiques (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*) régulièrement incriminés dans les pathologies humaines et animales. A terme, cette étude permettra d'identifier la ou les molécules responsables de cette activité afin de mieux orienter les nombreux utilisateurs de la plante aux doses à appliquer. Pour y parvenir diverses méthodes et techniques chromatographiques ont été utilisées.

3. Méthodes et techniques chromatographiques

Initialement, la chromatographie était une méthode de séparation. Aujourd'hui, elle est utilisée pour la séparation, l'identification et éventuellement le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes.

De façon générale, une chromatographie utilise une phase stationnaire et une phase mobile. Le produit à chromatographier sera, selon ses affinités, soit plutôt attiré par la phase stationnaire

(et ne migrera pas), soit par la phase mobile (et migrera). Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre la phase stationnaire et la phase mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers.

Les innovations technologiques permettent de différencier plusieurs types de chromatographie qui résultent du fait que l'on ait privilégié l'effet de l'un de ces facteurs par rapport à l'autre. Cependant, il faut noter que l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale au cours d'une séparation chromatographique (**Chaaib-Kouri, 2004 ; Diallo et Sanogo, 2005 ; Lagnika, 2005**).

A ce jour, on distingue:

- la chromatographie de partage (liquide – liquide), destinée à la séparation de soluté dans deux phases liquides ;
- la chromatographie d'exclusion (ou perméation de gel) permet de « filtrer » un mélange. Ici, les molécules sont plus ou moins retenues suivant leur taille et leur possibilité de pénétrer dans les pores de la résine (phase solide). Les grosses molécules qui ne peuvent pas rentrer dans les pores ne sont pas retenues et les solutés retenus sont élus dans l'ordre des masses molaires décroissantes ;
- la chromatographie d'adsorption qui est une chromatographie liquide-solide ou la phase stationnaire est un adsorbant solide polaire. Les solutés sont élus par polarité;
- la chromatographie d'adsorption en phase inverse est également une autre chromatographie liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire. les solutés sont élus par ordre inverse de la polarité;
- la chromatographie sur échangeurs d'ions (HPLC) qui consiste en un échange réversible d'ions entre la phase mobile et la phase stationnaire. Cette dernière est porteuse de groupements ionisés fixes et d'ions mobiles assurant l'électroneutralité. Ce type de chromatographie s'adresse aux produits ioniques ou ionisables;
- la chromatographie d'affinité ou la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte, sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique (bio-affinité) pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps) (**Rosset *et al.*, 1982 ; Diallo et Sanogo, 2005 ; Lafont, 2005**).

Malgré cette grande diversité les méthodes chromatographiques peuvent être regroupées en 3 grandes familles ; la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie sur couche mince (CCM).

3.1. Chromatographie sur couche mince

La Chromatographie sur Couche Mince est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexe de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction ainsi qu'un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées. Aussi permet-elle également de suivre la progression d'une réaction, étant donné qu'elle indique le nombre de composants dans un mélange réactionnel (**Diallo et Sanogo, 2005 ; Lafont, 2005; Lagnika, 2005**).

La mise en œuvre d'une CCM nécessite plusieurs matériels tels que :

- une cuve chromatographique : c'est un récipient en verre, de formes variables (selon les manipulations à effectuer) et fermé par un couvercle maintenu étanche ;
- une phase stationnaire : c'est une couche d'absorbant étalé uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimensions variables (généralement 20 x 20 cm, 10 x 10 cm ou 5 x 10 cm) avec une épaisseur comprise entre 0,5 et 2 mm ;
- la phase mobile : c'est l'éluant, il est composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants qui migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon déposé ;

Les échantillons à analyser sont appliqués en petits spots sous forme de points ou de bandes sur l'absorbant. La plaque est déposée verticalement dans la phase mobile constituée d'un ou de plusieurs solvants organiques.

A la fin du développement du chromatogramme, la révélation des constituants peut se faire à l'UV (longueurs d'ondes $\lambda = 254$ nm et 365 nm) ou à l'aide d'un révélateur spécifique (réactif). Le Rapport frontal permet de caractériser la substance considérée.

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le soluté (x)}}{\text{Distance parcourue par l'éluant (Y)}}$$

Le R_f est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant spécifique sur un support «phase stationnaire» donné. Il est le même que le constituant soit pur ou se trouve dans un mélange.

Le R_f ne dépend pas de la concentration du constituant dans le mélange (**Lafont, 2005 ; Lagnika, 2005**).

La chromatographie sur couche mince peut être analytique ou préparatoire. Lorsqu'elle est préparative, les zones du support correspondant aux substances d'intérêts sont récupérées, dispersées dans une petite quantité de solvant, filtrée pour la récupération des composés purs (Lafont, 2005).

3.2. Chromatographie sur colonne

Dans cette forme de chromatographie, la phase stationnaire est contenue dans une colonne. L'éluant qui peut être sous la pression d'une pompe ou non, entre par une extrémité et sort par l'autre. En pratique, la phase mobile est composée des mêmes solvants que ceux utilisés pour la chromatographie sur couche mince analytique. Toutefois, l'élution peut être accélérée grâce à l'addition progressive de solvant de plus en plus polaire par rapport à la phase initiale. Les différentes fractions sont collectées selon le profil chromatographique dans des erlenmeyers ou dans des piluliers (Lafont, 2005).

Lorsque la séparation sur colonne se fait à pression atmosphérique, on parle de chromatographie liquide à pression atmosphérique. Dans le cas contraire, on parle de flash chromatographie. Dans ce dernier cas la colonne est sous pression et permet d'accélérer le débit et la séparation par rapport au système équivalent à pression atmosphérique. Cette technique améliore la résolution de séparation et permet le traitement de quantités plus élevées d'échantillons.

Le système est composé d'une bouteille d'air comprimé qui alimente une pompe pneumatique, d'une vanne d'injection, de deux modules de compression utilisable selon les quantités d'échantillon et d'un régulateur de pression (manomètre).

3.3. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La chromatographie liquide à haute performance est une technique basée sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique sur colonne sans en présenter les inconvénients que sont: la lenteur des séparations, l'absence de détecteurs et la quantité considérable d'échantillons nécessaires.

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie (les « grains » sont de très petite taille). Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des

composants avec un seuil de détection plus bas. La combinaison de ces attributs - rapidité et résolution élevées - conduit à l'appellation « haute performance » et cela nécessite le choix des conditions expérimentales de la séparation (**Lafont, 2005**).

Au-delà des techniques sophistiquées de chromatographie solide – liquide, la filtration sur gel spécifique permet dans certaines conditions d'obtenir des résultats remarquables. C'est le cas de l'utilisation du gel Sephadex[®] LH20.

3.4. Filtration sur gel de dextrane: Sephadex[®] LH20

Le Sephadex LH20 est un gel de séparation qui possède des propriétés lipophiles et hydrophiles. Le caractère lipophile de ce gel réticulé de dextrane dérive de la présence des groupements isopropyles obtenus par hydroxypropylation du Sephadex G-25. Son caractère hydrophile est dû aux nombreuses fonctions hydroxyles présentes. En raison de cette nature, le Sephadex LH-20 gonfle non seulement dans les solvants de faible et moyenne polarité mais également dans les solvants très polaires. A ces deux propriétés s'ajoute la récupération presque totale des échantillons au cours des expériences de séparation (**Henke, 1995**). Selon la nature des composés à séparer et la nature de l'éluant utilisé, différents mécanismes sont susceptibles d'intervenir en même temps tout au long du processus de séparation (**Lafont, 2005**).

•Séparation par perméation selon le poids moléculaire

Les substances sont éluées par ordre décroissant par rapport à leur poids moléculaire. Les solvants les plus utilisés sont le méthanol et l'éthanol, associés ou non au dichlorométhane ou au chloroforme.

•Séparation par adsorption

Le Sephadex LH-20 présente une affinité pour les substances aromatiques et cycliques. Les effets d'adsorption réversibles peuvent être observés. Ils peuvent donc être mis à profit pour obtenir la séparation de ces composés en utilisant généralement le méthanol ou l'éthanol.

•Séparation par partition

Lorsqu'on utilise un éluant composé de deux solvants organiques de polarités différentes, le séphadex retient spécifiquement le solvant polaire provoquant ainsi une différence nette entre les deux phases (**Lafont, 2005**).

3.5. Chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion est aussi appelée filtration sur gel ou tamisage moléculaire. Cette technique est apparue en 1959 avec un produit nouveau, le Sephadex. Le Sephadex est un gel de dextrane (polymère de glucose α -1-6 produit par *Leuconostoc mesenteroides*) qui subit

une réticulation. Il se présente sous forme de billes poreuses, dont la porosité dépend du degré de réticulation. Ces billes sont très hydrophiles et gonflent dans l'eau. Il en existe différents types en fonction de la taille des billes et de leur porosité.

3.6. Recristallisation

La recristallisation est une méthode de purification utilisée pour les composés sous forme de cristal ou de poudre (état microcristallin).

Le principe est basé sur la solubilité des mélanges à séparer. En effet, lorsqu'on veut isoler ou purifier un composé présent dans un mélange par cette méthode, la première étape consiste à trouver le meilleur solvant de recristallisation.

Le meilleur solvant de recristallisation est le solvant dans lequel le produit à recristalliser est peu soluble à froid et très soluble à chaud alors que les impuretés sont insolubles à chaud.

Par chauffage suivi immédiatement de filtration, on élimine une partie des impuretés insolubles à chaud. Le refroidissement permet au produit de cristalliser. La filtration suivante permet d'éliminer le solvant et la partie des impuretés solubles à froid.

4. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antimicrobienne. Parmi ces méthodes l'on compte la méthode de diffusion en milieu gélosé, des spots, en milieu liquide et la double dilution en tubes inclinés.

4.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé

La méthode de diffusion en milieu gélosé est utilisée pour évaluer les activités antimicrobiennes des différents extraits (**Wiegand et al., 2007**). Elle consiste à déposer à l'intérieur d'un puits creusé dans une gélose inoculée dans la masse par une souche bactérienne cible, une quantité de substance antimicrobienne à évaluer. Après dépôt dans le puits, le composé diffuse dans la gélose et inhibe la formation d'un tapis bactérien selon le gradient de concentration qui se met en place. Cette diffusion est dépendante de la diffusibilité du composé dans la gélose, de la durée de migration, de la distance de migration et de la concentration du composé (**Cooper, 1955**).

En fonction du gradient de concentration établi par le composé dans la gélose, une inhibition de croissance microbienne est induite. Cette inhibition a pour conséquence la formation d'un halo autour du puits. Le diamètre de cette zone d'inhibition quantifie l'activité antimicrobienne de l'extrait ou du composé. Des gammes de concentrations des différents

extraits de la plante sont effectuées selon une série de dilutions au demi. Le mélange DMSO-Eau (7:3) est utilisé comme diluant pour les extraits obtenus avec les solvants organiques.

A partir d'une culture de 24 heures ou 48 heures d'incubation des différentes souches microbiennes cibles, une pré-culture d'une durée nécessaire est réalisée pour chaque souche afin d'atteindre la phase de croissance exponentielle. La valeur des DO à 600 nm de cette pré-culture permet de prélever une quantité correspondante à environ 2.10^7 UFC en fonction du rapport DO/UFC/mL de chaque souche cible.

Cette quantité de culture microbienne prélevée est homogénéisée dans une boîte de Pétri avec 20 ml de TSA maintenu liquide à 50°C. Une fois la gélose inoculée et solidifiée, 9 puits de 6 mm de diamètre y sont creusés. Ensuite, 70 µL de chaque concentration d'extrait de plante sont déposés dans les différents puits. Les boîtes sont ensuite mises à incuber pendant 24 ou 48 heures à la température de croissance optimale spécifique de chaque microorganisme.

Après 24 ou 48 heures d'incubation, le rayon d'inhibition à partir du bord du puits est mesuré. Les valeurs pour les différentes concentrations de chaque extrait permettent de tracer la droite de régression entre la dilution de la concentration initiale et le rayon d'inhibition. De cette droite, la dilution de la concentration initiale est déterminée, cette dilution entraîne 1 mm de rayon d'inhibition qui est une unité arbitraire (UA). Cette valeur permet de calculer l'activité spécifique de l'extrait qui est exprimée en UA/mg. Elle représente l'inverse de la quantité d'extrait (en mg) dans un puits qui induit 1 millimètre de rayon d'inhibition à partir du bord du puits (**Zouhir et al., 2011**). La comparaison des différentes valeurs d'activité spécifique de chaque extrait permet d'identifier l'organe qui concentre le plus le principe actif et aussi de connaître le solvant qui sélectionne mieux ce principe actif.

L'activité antimicrobienne des différents extraits est détectée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les rayons d'inhibition à partir du bord du puits de chaque concentration d'extrait sont mesurés puis représentés en fonction de l'inverse de la quantité (en milligramme) d'extrait déposée dans le puits. La valeur qui induit 1 millimètre d'inhibition par mg, ou encore l'activité spécifique exprimé en unité arbitraire par milligramme (UA/mg) d'extrait est représentée pour différents micro-organismes

4.2. Méthode des spots

Le test est non quantitatif et a pour objectif d'identifier rapidement les fractions d'intérêt issues de la séparation par chromatographie à de faibles concentrations. A partir d'une pré-culture de 3 heures d'une culture microbienne en bouillon de 24 heures d'incubation, un inoculum de 10^6 UFC/mL est préparé. Cet inoculum (1 mL) est étalé sur la surface d'une gélose tryptone-soja (TSA) puis séché à la température ambiante pendant 15 à 20 minutes sous une

hotte à flux laminaire. Au bout de ce temps, 5µl de chaque fraction lyophilisée et solubilisée dans du DMSO 70% sont déposés délicatement sur cette gélose inoculée pour former un spot, les géloses sont incubées à 30 ou 37°C pendant 24 ou 48 heures.

4.3. Méthode en milieu liquide

Le test en milieu liquide a pour objectif de déterminer pour les différents composés isolés, les valeurs des paramètres antimicrobiens dont la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) ou Fongicide (CMF).

Dans une microplaque de 96 puits, une gamme de concentrations de 100 µL de chaque composé est effectuée par des dilutions au demi dans une solution de DMSO 5%.

A partir d'une culture microbienne de 24 heures d'incubation, une pré-culture pour atteindre la phase exponentielle de croissance microbienne est préparée. Une fois sa densité optique à 600 nm obtenue, cette pré-culture est utilisée pour préparer un *inoculum* de 2.10^6 UFC/mL dans un Bouillon Tryptone-Soja (TSB) concentré 2 fois. Ensuite 100 µL de cet inoculum sont homogénéisés dans chaque puits de la gamme de concentrations préalablement préparée puis incubée à 30 ou 37° C pendant 24 ou 48 heures. Au bout de cette période, la turbidité de chaque puits est appréciée à l'œil nu à la lumière du jour et la plus petite concentration dans laquelle une absence de turbidité est observée représente la Concentration Minimale inhibitrice (CMI) du composé en question sur la souche de l'inoculum utilisé.

4.4. Méthode de la double dilution en tubes inclinés

Selon la méthode de la double dilution en tube incliné, les extraits sont incorporés à la gélose en surfusion répartie dans les tubes à essai en raison de 20 mL dans le tube (ayant la plus forte concentration) et 10 mL dans les autres tubes de la série. Cette méthode permet de préparer une gamme de concentrations avec une liaison géométrique de raison $\frac{1}{2}$. Après l'incorporation des extraits, les tubes sont stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 min puis inclinés à la température de la salle permettant la gélose de se solidifier. Les tests antifongiques sont faits en ensemençant 1000 cellules de l'espèce fongique prélevée grâce à une micropipette et étale en stries transversales. Les cultures de l'espèce fongiques ainsi réalisées sont été incubées à la température optimale de cette espèce et à son temps d'incubation. Cette opération est répétée 6 fois pour chaque espèce fongique. Après le temps d'incubation, les colonies de l'espèce fongique sont dénombrées. Le traitement des données expérimentales obtenues permet non seulement de tracer les courbes d'activité des extraits mais aussi de déterminer les paramètres antifongiques suivants que sont CMI, CMF et CI_{50} .

II. MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des écorces du tronc de *Terminalia superba* ou le "Fraké". Ces écorces du tronc ont été séchées et rendues en poudre pour la préparation des extraits de *Terminalia superba*. *Terminalia superba* est une espèce d'arbre pouvant atteindre 30 à 50 m de hauteur.

1.1.2. Micro-organismes étudiés

Les micro-organismes étudiés sont constitués de trois espèces de champignons pathogènes que sont *Aspergillus fumigatus* (référence 896/AB du 18. 01. 2000), *Candida albicans* (référence 3076/PV du 06. 04. 2000) et *Cryptococcus neoformans* (référence 13801/LCR du 19. 06. 1999). Ces micro-organismes ont été isolés chez des patients souffrant de diverses mycoses. Les espèces de champignons ont été identifiées par le laboratoire de Mycologie et de Parasitologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (I.P.C.I). La souche de *Candida albicans* est sensible à l'Amphotéricine B et au Miconazole mais résistante au Fluconazole et au Kétoconazole. La souche de *Aspergillus fumigatus* est sensible au Fluconazole et au kétoconazole mais résistante à l'Amphotéricine B et au Miconazole. La souche de *Cryptococcus neoformans* est sensible au Miconazole et au kétoconazole mais résistante à l'Amphotéricine B et au Fluconazole. Ces souches cliniques ont été choisies par notre équipe parce qu'elle voulait tester les extraits sur les espèces fongiques dont la pathogénicité est avérée et résistantes aux antifongiques usuels.

1.2. Matériel technique

1.2.1. Milieu de culture

La gélose de Sabouraud (Bio-rad 64494, lot 7A2211) (France) fournie par BIOMEDIS Abidjan a été utilisée comme milieu de culture pour tous les tests antifongiques.

1.2.2. Molécule de référence (ketoconazole) testée

La poudre pure du ketoconazole utilisée dans cette étude a été fournie par l'UFR Sciences pharmaceutiques et biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny (Côte d'Ivoire). Cette

poudre pure a servi pour les tests antifongiques de comparaison du ketoconazole avec les extraits végétaux.

1.2.3. Produits chimiques

Tous les réactifs et solvants utilisés au cours de cette étude sont de qualité analytique. L'eau distillée, l'éthanol, l'hexane, l'acétate d'éthyle, le n-butanol, le dichlorométhane et le chloroforme ont été utilisés pour les différentes extractions. Le méthanol a servi d'éluant pour la chromatographie sur colonne de gel de filtration sephadex LH-20 (LH20100-50G) SIGMA. Le mélange acétate d'éthyle- méthanol-eau (100 :12 :8) a servi d'éluant pour la chromatographie sur couche mince des fractions issues du fractionnement de l'extrait X_{1,2} et de l'extrait X₁₂, retenu parmi les extraits issus des partitions de l'extrait total éthanolique.

L'acétate de sodium, l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'anhydrique acétique, le chlorure ferrique, le chlorure mercurique, le chloroforme et les copeaux de magnésium ont servi à la préparation des réactifs de Stiasny, de Bouchardat, de Dragendorff, de Valser-Mayer dans le cadre du tri phytochimique.

Tous ces différents produits nous ont été fournis par PROLABO[®] (Toulouse, France).

1.2.4. Appareillage et verrerie de laboratoire

Les appareils utilisés pour cette étude sont constitués d'un évaporateur rotatif (BUCHI) (Swaziland) qui a permis de concentrer à sec les différents extraits préparés avec un solvant organique, un Lyophilisateur (TELSTAR LIOALFA-6) (France) qui a servi pour lyophiliser l'extrait total aqueux, l'utilisation d'un agitateur magnétique chauffant et non chauffant (AGIMATIC-N) (Espagne) qui ont permis la préparation du milieu de culture et la macération, l'autoclave (SANO CLAV) (Allemagne) a été utilisé pour la stérilisation des tubes contenant le milieu de culture incorporé des différents extraits de *T. superba*, et le Ketoconazole avant la culture des germes fongiques, les différentes pesées ont été réalisées à l'aide d'une balance électronique de précision (SARTORIUS AG GOTTINGEN) (Allemagne), la culture des espèces fongiques en présence des extraits de *T. superba* et le Ketoconazole a été faite sous une hotte à flux laminaire vertical (SUPCRIS numéro de série 8001-2) (France) et toutes les cultures réalisées ont été incubées dans un incubateur de type bactériologie (MEMMERT 30079) (Allemagne). Les analyses chromatographiques ont été faites à l'aide d'un certain nombre d'appareils. Un chromatographe Hewlett-Packard 6890 pour l'analyse chromatographique en phase gazeuse, l'analyse chromatographique liquide haute performance a été réalisée à l'aide d'un appareil de type Lichro CART[®] 150-4,6 mm. Un spectrophotomètre UV-visible JASCO V-

530 a permis l'analyse des spectres UV des composés et un appareil de type Shimadzu a été utilisé pour les analyses des spectres de masse des composés.

En plus de la verrerie courante de laboratoire, cette étude a nécessité l'utilisation de baguettes en verre, de tubes à essai ($l_1 = 20$ cm, $\Phi_1 = 3$ cm ; $l_2 = 15$ cm, $\Phi_2 = 1,5$ cm), de coton hydrophile, coton cardé et de micropipettes (1000 μ l, 100 μ l).

2. Méthodes

2.1. Collecte de la plante

Les écorces du tronc de *T. superba* ont été récoltées en Juin 2009 dans la région d'Abengourou à Abradinou (Côte d'Ivoire). Des échantillons de cette récolte et certains organes (les feuilles et les fruits ont été utilisés pour l'identification de la plante) ont été conditionnés dans les sacs. Ces échantillons ont été identifiés au Centre National Floristique (CNF) de l'Université Félix Houphouët-Boigny. Après cette identification, un tri a été réalisé pour éliminer les écorces pourries, brûlées par le feu ou contaminées par les moisissures ou tout autre parasite. Par la suite, les écorces du tronc de *T. superba* récoltées ont été découpées en petits morceaux et séchées à l'abri du soleil à la température ambiante de 27 ± 2 ° C pendant 14 jours dans une salle bien aérée. Après séchage, les écorces ont été finement broyées (diamètre inférieur à 0,40 μ m) grâce à un broyeur électrique de type IKA-MAG. Enfin la poudre végétale (diamètre inférieur à 0,40 μ m) obtenue a été répartie dans des sachets en polyéthylène hermétiquement fermés, étiquetés et stockés à l'abri de l'humidité et de la chaleur.

2.2. Extraction

2.2.1. Préparation des extraits totaux

Les extraits totaux aqueux et hydroalcoolique ont été préparés selon la méthode de **Zirihi et al. (2003)**. Selon ce procédé, l'extrait total aqueux a été préparé comme suit :

Une masse de 100 g de poudre de *T. superba* a été mélangée dans un litre d'eau distillée par homogénéisation pendant 5 min et répété six cycles dans un blender. L'homogénat obtenu a été tamisé. La solution obtenue a été filtrée successivement deux fois sur coton hydrophile et une fois sur papier filtre (Whatman 3 mm). Le filtrat ainsi obtenu avec l'eau distillée a été concentré au 2/3 à l'aide d'un évaporateur rotatif de type BUCHI à la température de 60° C. La solution concentrée correspondant au 1/3 de la solution initiale a été congelée puis lyophilisée. La poudre obtenue est l'extrait total aqueux. Cette poudre a été recueillie dans un bocal en verre et conservée au réfrigérateur à 4° C. L'extrait éthanolique a été préparé selon le même procédé comme décrit ci-dessus à la différence que le solvant utilisé est un mélange d'éthanol pur (70%),

eau distillée (30%) v/v. Le filtrat a été concentré à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif de type BUCHI à la température de 60 °C. La Figure 5 représente le schéma de la préparation des extraits totaux de *T. superba*.

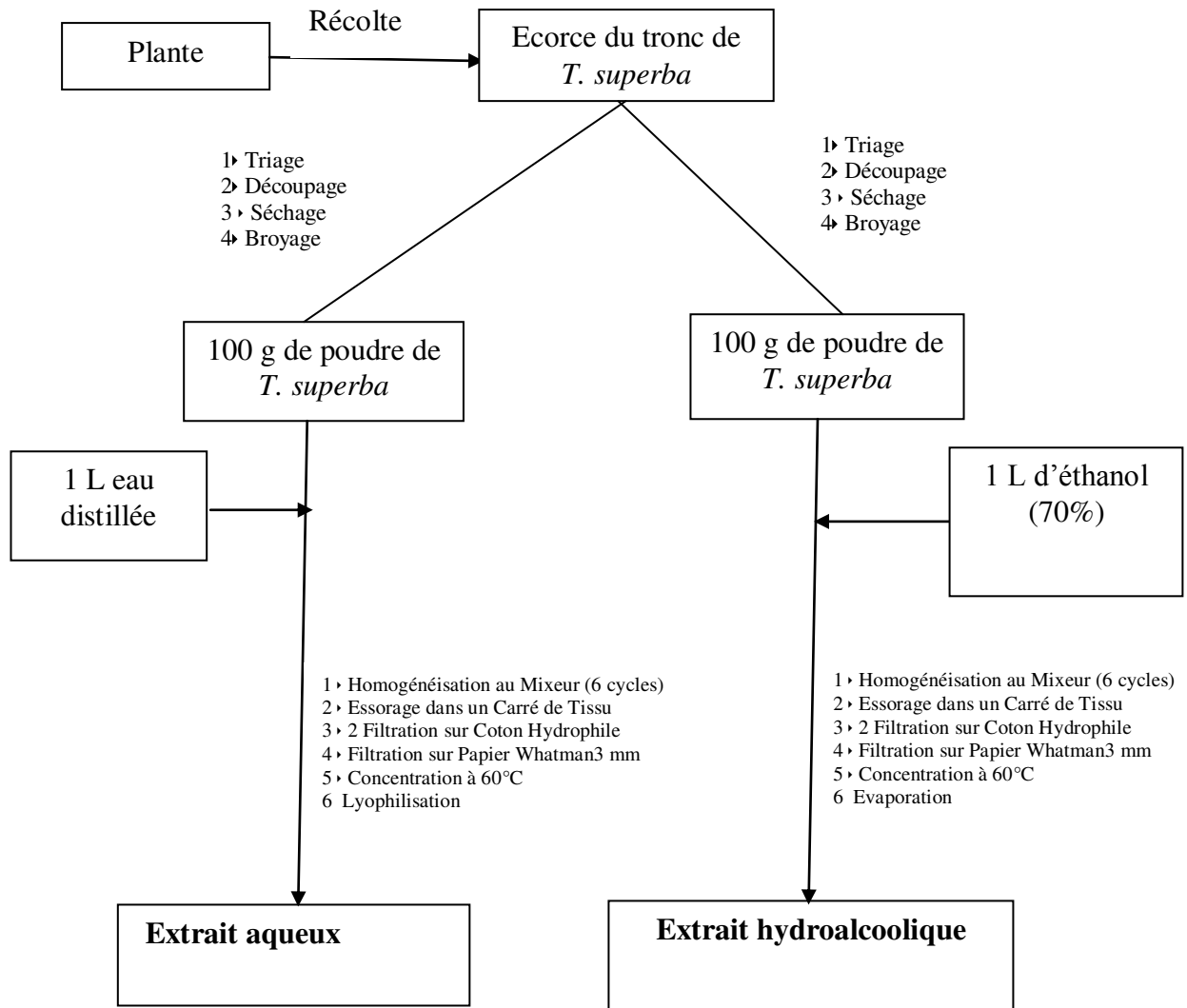


Figure 5 : Schéma synoptique de l'extraction de l'extrait total aqueux et hydroalcoolique de *T. superba*

2.2.2. Préparation des extraits par partition

Les extraits issus des partitions de l'extrait total hydroalcoolique ont été préparés selon la méthode de **Zirih** *et al.* (2003). Selon cette méthode, cinq portions de 10 grammes de l'extrait total hydroalcoolique ont été pesées séparément. Chaque portion a d'abord été dissoute dans 150 mL d'eau distillée dans un Erlenmeyer. Le mélange a été agité grâce à un agitateur, jusqu'à dissolution complète de la portion. A chaque homogénat obtenu, 150 mL d'un seul type de solvant organique y a été ajouté (l'hexane, l'acétate d'éthyle, le n-butanol, le dichlorométhane et le chloroforme). Chaque ensemble ayant un volume final de 300 mL a été placé sous agitation magnétique et a été homogénéisé pendant 24 heures à la température ambiante ($27\pm 2^\circ\text{C}$). Après le temps d'agitation, le mélange obtenu a été transvasé dans une ampoule à décanter puis laissé au repos (à la température de la salle) jusqu'à décantation complète (**Ackah et al., 2008**). Après cette étape, les deux phases liquides ont été séparées et concentrées séparément à l'aide d'un évaporateur rotatif. Tous les solvants ont été évaporés à sec (en fonction de leur température d'évaporation). Cette opération (figure 6) a permis d'obtenir dix extraits différents qui sont :

X_{1,1} : la phase hexanique.

X_{1,2} : la phase aqueuse issue de la partition hexane-eau.

X_{2,1} : la phase acétatique.

X_{2,2} : la phase aqueuse issue de la partition acétate d'éthyle-eau.

X_{3,1} : la phase butanolique.

X_{3,2} : la phase aqueuse issue de la partition butanol-eau.

X_{4,1} : la phase dichlorométhanique.

X_{4,2} : la phase aqueuse issue de la partition dichlorométhane-eau.

X_{5,1} : la phase chloroformique.

X_{5,2} : la phase aqueuse issue de la partition chloroforme-eau.

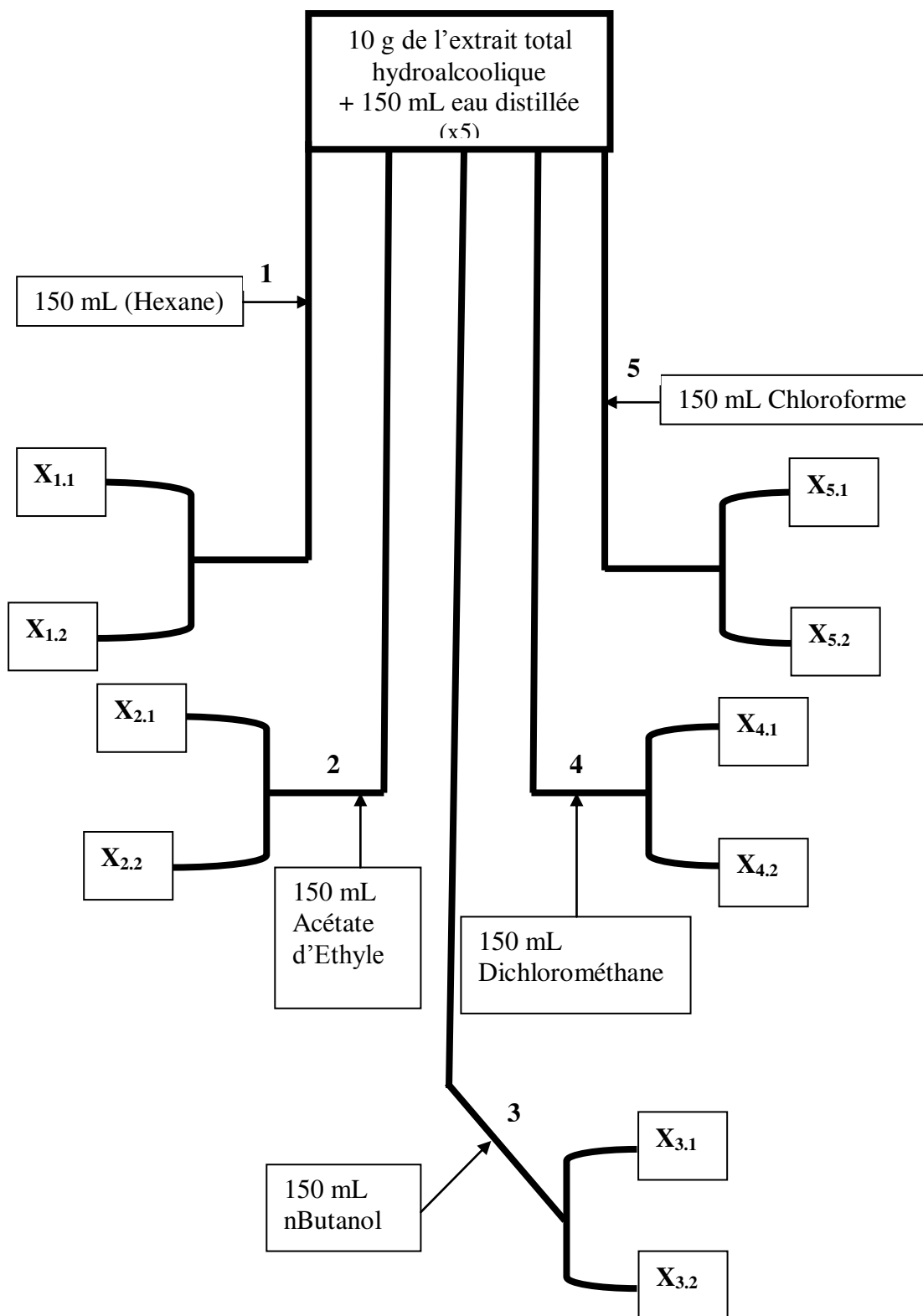


Figure 6 : Schéma synoptique de la préparation des extraits des partitions de *T. superba*

2.3. Purification

2.3.1. Chromatographie sur colonne de X_{1,2}

Après les premières évaluations de l'activité antifongique des extraits, la partition X_{1,2} s'est révélée être la plus active, c'est donc cette partition qui a été retenue pour la suite des travaux. Cet extrait X_{1,2} a été alors chromatographié sur colonne de gel de filtration séphadex LH20 dont la phase stationnaire de cette chromatographie a été le gel séphadex LH20. L'élution utilisée est le méthanol. Les conditions opératoires sont les suivantes : colonne en verre de diamètre 2 cm avec une hauteur de gel de 38 cm et le débit d'écoulement du solvant a été de 2 mL/min. Au total 40 fractions (F₁ à F₄₀) de 20 mL chacune ont été recueillies. Le schéma de cette purification est résumé par la figure 7.

2.3.2. Chromatographie sur couche mince de X_{1,2} et des fractions (G₁, G₂ et G₃)

La Chromatographie sur couche mince a été réalisée afin de séparer les constituants chimiques de l'extrait de X_{1,2} et de comparer les constituants de chaque fraction (issue du fractionnement de X_{1,2}) aux constituants de l'extrait de base X_{1,2}.

La cuve chromatographique a été remplie du mélange de solvants constitué d'acétate d'éthyle- méthanol-eau dans les proportions : 100 :12 :8 v/v à une hauteur de 0,5 cm. Elle a été recouverte avec le couvercle afin que l'atmosphère dans la cuve reste saturée en vapeur d'éluant. Sur la plaque chromatographique (6 cm sur 3 cm), un trait horizontal a été tracé à l'aide d'un crayon à papier à 1 cm environ du bord inférieur. Ce trait ne doit pas être trempé dans le solvant d'élution contenu dans la cuve. Sur le trait, 5 µL de l'extrait X_{1,2} et toutes ces fractions issues du fractionnement de X_{1,2} ont été déposées. Les microgouttes ont été séchées puis les plaques ont été déposées verticalement dans la cuve puis refermée. A la fin de la migration (5 min), lorsque le solvant a atteint les 3/4 environ de la hauteur de la plaque (1 cm du bord supérieur), les plaques ont été sorties de la cuve et le front du solvant a été marqué immédiatement (à cause de l'évaporation rapide du solvant). Les plaques ont été séchées à l'air libre. Les différentes plaques chromatographiques ont été portées à la lumière UV (longueurs d'ondes $\lambda = 254$ nm et 365 nm) afin de détecter les différentes couleurs des tâches et de leur Rf. Les différentes fractions ont été regroupées sur la base du profil chromatographique de l'extrait X_{1,2} qui a donné ces fractions en trois groupes de fractions (G₁, G₂ et G₃).

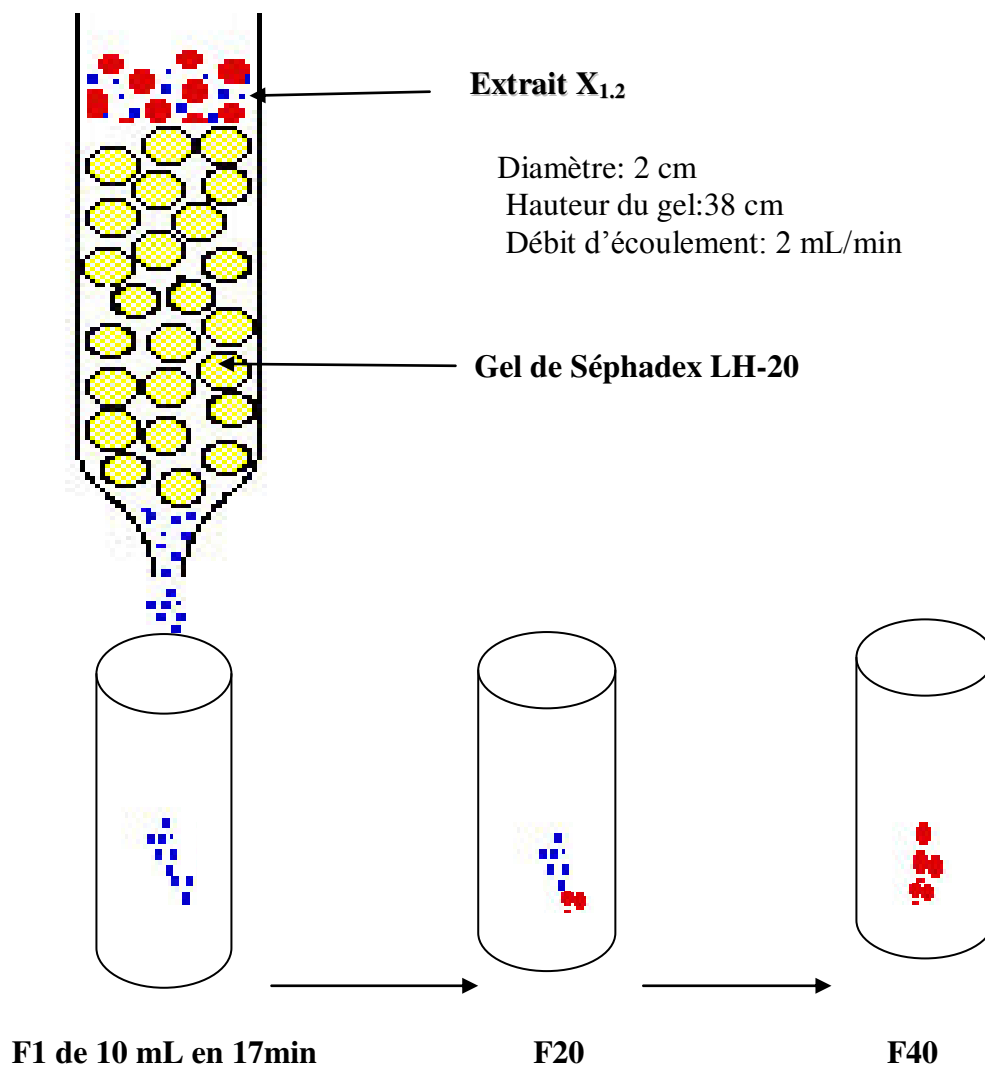


Figure 7 : Schéma de la préparation des fractions de *T. superba* sur gel de filtration de sephadex LH-20

2.3.3. Fractions issues de X_{1.2}

Les 40 fractions ont été analysées par chromatographie sur couche mince et regroupées en trois groupes de fractions en fonction de la nature des composés chimiques qu'elles renferment. Les groupes de fractions sont G₁, G₂ et G₃. Les fractions G₁, G₂ et G₃ ont été testées sur la croissance des espèces fongiques en vue de rechercher le groupe le plus actif. Le groupe de fractions (G₁) est constitué des fractions (F₁ à F₆). Le groupe de fractions G₂, est constitué des fractions (F₇ à F₁₈). Enfin, le groupe de fractions G₃ est constitué des fractions (F₁₉ à F₄₀). Le groupe de fractions G₃ ayant donné à l'issue des tests antifongiques les meilleurs résultats a été retenu pour la suite de l'étude (flash chromatographique et spectrométrie de masse) afin de déterminer la nature des composés chimiques qu'il renferme.

2.3.4. Identification de la nature des composés chimiques contenus dans le produit de la recristallisation de l'extrait G₃

L'identification de la nature des composés chimiques contenus dans le produit de la recristallisation de l'extrait G₃ a été faite grâce aux méthodes suivantes : la spectrométrie de masse, la spectrophotométrie UV-visible, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire et la chromatographie liquide haute performance.

- Spectrométrie de masse

Les spectres de masse en electro-spray (ESI-SM) ont été enregistrés en mode positif sur un spectromètre de masse SM-QP 2010 de type Shimadzu et rapportés dans les unités de la masse à la charge (m/z). Le mode de l'ionisation utilisé a été l'impact électronique (EI, 70 eV).

Les spectres de masse en mode "electro-spray" à haute résolution (HRESI-SM) ont été enregistrés en mode positif par un spectromètre quadripolaire hybride global de temps de vol "Time of Flight" ou Q-TOF Ultima (Waters-Micromass).

Pour les analyses, un spectromètre de masse de type Shimadzu (SM-QP 2010) en electro-spray (ESI-SM) a été utilisé. Le mode de l'ionisation utilisé a été l'impact électronique (EI, 70eV). Les spectres de masse ont été enregistrés en mode positif et rapportés dans les unités de la masse à la charge (m/z).

- Spectrophotométrie UV-visible

Les spectres UV des composés ont été mesurés lors des analyses HPLC/UV grâce au détecteur à barrettes de diodes du système HP 1100. Un spectrophotomètre UV-visible JASCO

V- 530, équipé d'un enregistreur de spectres est utilisé pour la quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux des extraits.

- Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été mesurés à 400 MHz et 100 MHz respectivement, avec des appareils de type Brüker Avance 400.

L'échantillon a été solubilisé dans les solvants deutérés CDCl_3 , DMSO- d_6 , MeOH- d_4 et D_2O . Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage sont exprimées en Hz. Les programmes de séquences impulsionnelles standards fournis par Brüker ont permis de réaliser les expériences bidimensionnelles COSY, HSQC et HMBC.

- Chromatographie liquide haute performance

Les analyses de la chromatographie liquide haute performance de cette étude, HPLC/UV(DAD) ont été réalisées en phase inverse avec une colonne HPLC de type RP-18 (5 μm) Lichro CART® 150-4,6 mm à 25° C. Les solvants A et B sont respectivement l'eau (0,2% TFA) et l'Acétonitrile. Le gradient utilisé est : 10 à 20% (B) en 40 min, 20 à 30% (B) en 5 min, 30 à 40% (B) en 5 min, 40 à 45% (B) en 5 min et l'initialisation à 10% (B) pendant 5 min. L'extrait a été injecté à une concentration de 0,1 mg avec comme éluant un mélange Acétonitrile/eau (TFA 0,2%) s'écoulant à un débit de 0,8 mL/min. Les détections ont été faites à 254, 280, 325 et 530 nm.

2.4. Evaluation de l'activité antifongique des différents extraits, fractions et le ketoconazole

2.4.1. Préparation de la gélose Sabouraud

Le milieu de Sabouraud sans antibiotique a été préparé en dissolvant 5,06 g de la gélose en poudre dans 120 mL d'eau distillée. Ce mélange est chauffé et agité sur un agitateur jusqu'à dissolution complète de la gélose. Le milieu de culture ainsi préparé a été reparti dans les tubes à essai. Tous les tubes contenant le milieu de culture n'ont été stérilisés qu'après incorporation des extraits végétaux et le ketoconazole.

Pour réaliser les tests *in vitro*, le milieu a été coulé dans différents tubes à essai auxquels ont été incorporés les différents extraits végétaux et le ketoconazole à chaud. C'est cela qui a permis la sélection des extraits les plus actifs.

2.4.2. Incorporation des extraits végétaux et le ketoconazole à la gélose.

L'incorporation des extraits végétaux et du Ketoconazole à la gélose a été faite selon la méthode de la double dilution en tubes inclinés (Ajello *et al.*, 1963 ; Holt, 1975 ; Guéde-Guina *et al.*, 1996 et 1997). Chaque série comporte douze tubes à essai numérotés de 1 à 12. Le milieu précédemment préparé a été reparti dans les douze tubes à raison de 20 mL dans le tube n° 1 et 10 mL dans les autres tubes allant du n° 2 au n° 12. La gamme de concentration a été préparée en homogénéisant 1,5626 g de poudre d'extrait total aqueux dans 20 mL de milieu de Sabouraud du tube n° 1. La moitié du volume de ce mélange homogène a été transférée dans le tube n° 2 contenant 10 mL de gélose et homogénéisée. Cette opération a été reprise pour le tube n° 3 et ainsi de suite par double dilution jusqu'au tube n° 10 pour lequel la moitié du volume du mélange homogène a été rejetée. Cela a donné ainsi une gamme de concentration allant de 3125 µg/mL à 6,09 µg/mL avec une liaison géométrique de raison 1/2 (Figure 8 A). Le tube n° 11 a permis le contrôle de croissance des germes en absence de l'extrait végétal et le tubes n° 12, pour le contrôle de stérilité de la gélose en absence du germe et de l'extrait. Les douze tubes de cette série ont été stérilisés dans un autoclave de marque (SANO CLAV), à 121° C pendant 15 min (Adeshina *et al.*, 2012) puis, inclinés (avec petit culot) à la température de la salle pour permettre à la gélose de se solidifier. Tous les autres extraits et le Ketoconazole ont été incorporés à la gélose selon la même méthode.

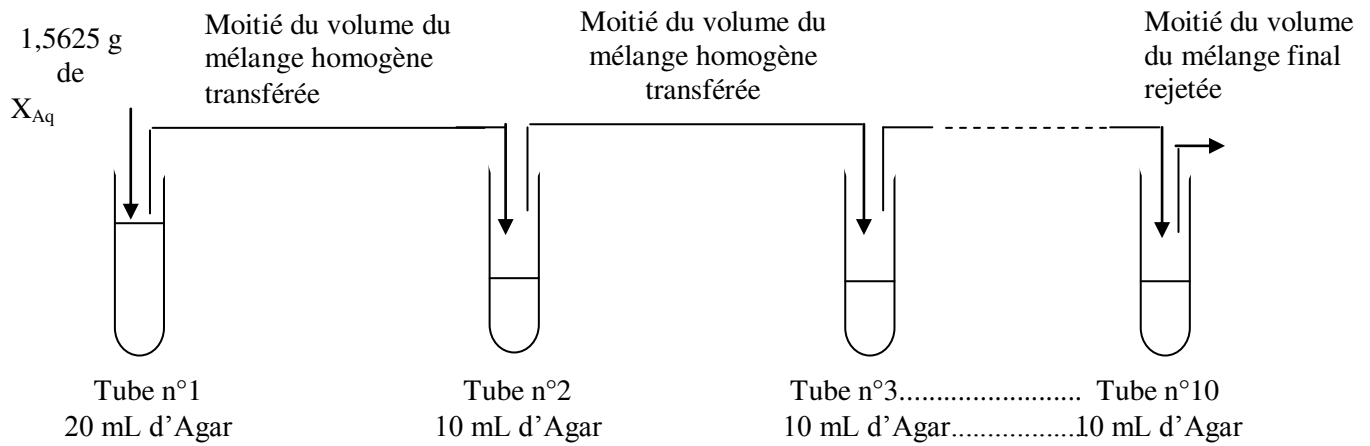
2.4.3. Préparation de l'inoculum

Pour les tests antifongiques, les inocula ont été préparés séparément à partir de cultures jeunes de 48 heures des trois espèces de champignons sur gélose en pente. Pour chaque espèce de champignon, une à deux colonies au moins bien isolées ont été prélevées à l'aide d'une anse de 2 mm de diamètre puis homogénéisées dans 10 mL d'eau distillée stérilisée. Cette suspension a donné une suspension mère notée 10⁰, dont la charge est de 10⁶ cellules/mL. A partir de la suspension 10⁰, a été préparée la suspension 10⁻¹ par dilution au 1/10^{ième} en transférant 1 mL de la suspension 10⁰ dans 9 mL d'eau distillée stérilisée pour avoir un volume final de 10 mL, contenant 10⁵ cellules par ml (Ajello *et al.*, 1963 ; Holt, 1975 ; Maury, 1987 ; Guéde-Guina *et al.*, 1997 ; Zirihi *et al.*, 2003) (Figure 8 B). Afin de vérifier la charge de l'inoculum, nous avons procédé secondairement à des dilutions de 10⁻², 10⁻³ et 10⁻⁴ de ce dernier. Toutes ces suspensions ont été ensemencées sur gélose en boîte de Pétri incubées en même temps que les cultures expérimentales. Après 48 heures d'incubation, le dénombrement des colonies de la dilution 10⁻⁴, rapporté au volume prélevé (10 µL) et au facteur de dilution (10000) a donné pour l'inoculum une charge de 10⁵ cellules/mL, ce qui est conforme aux normes standards de culture. Dans cette

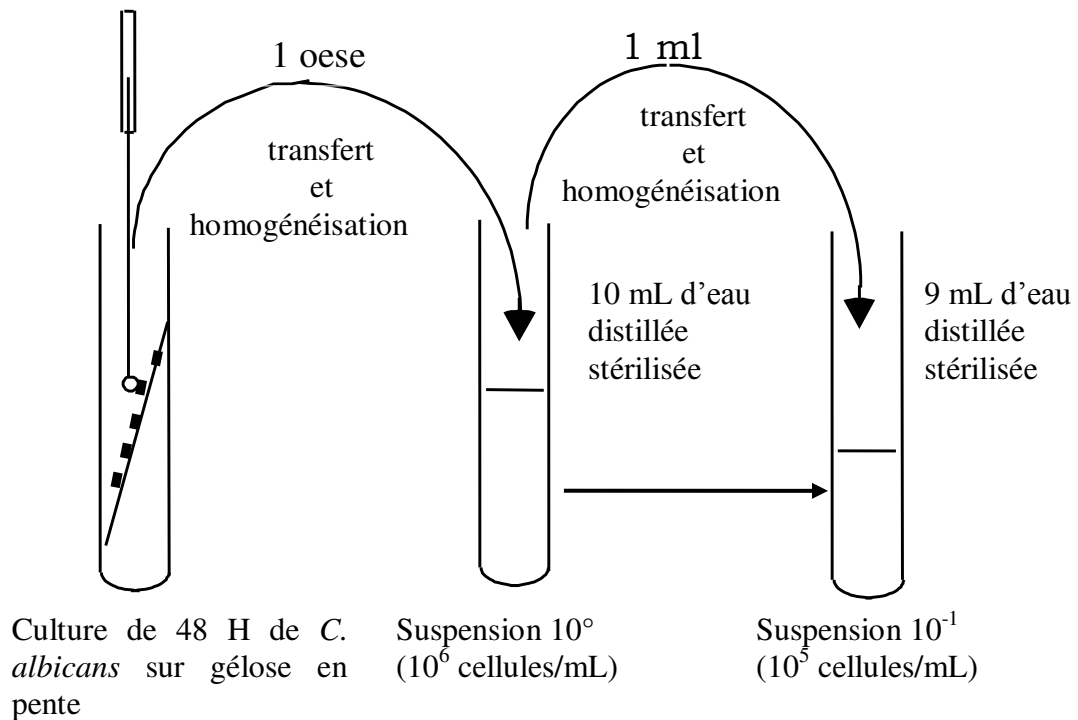
vérification, on tient aussi compte du nombre de colonies dénombré dans les suspensions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} .

2.4.4. Culture des micro-organismes en présence de l'extrait végétal et le ketoconazole

Pour chaque série, sauf le tube n° 12 de contrôle de stérilité, la culture des différentes espèces fongiques (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*) a été faite dans les autres tubes. L'ensemencement s'est fait en stries transversales (jusqu'à épuisement) de 10 μ L de la suspension 10^{-1} (de concentration 10^5 cellules/mL), ce qui donne 1000 cellulesensemencées. Les cultures ainsi réalisées ont été incubées à 30° C dans un incubateur de type bactériologie (MEMMERT 30079) (Allemagne) pendant 48 heures pour toutes les espèces de champignons pathogènes étudiées (Ajello *et al.*, 1963 ; Holt, 1975 ; Guéde-Guina *et al.*, 1997 ; Zirihi *et al.*, 2003 ; Dewanjee *et al.*, 2007).



A



B

Figure 8 : Schéma des méthodes d'incorporation des extraits à la gélose et de la préparation de l'inoculum (Guéde-Guina *et al.*, 1997 ; Zirihi *et al.*, 2003)

A : Schéma de la méthode d'incorporation des extraits et le ketoconazole à la gélose Sabouraud

B : Schéma de la méthode de préparation de l'inoculum

2.4.5. Dénombrement des espèces

Après 48 heures d'incubation, les colonies des différentes espèces fongiques ont été dénombrées par comptage direct grâce à un stylo compteur de colonies (CIENCEWARE). La croissance des espèces fongiques dans les tubes expérimentaux de chaque série a été évaluée en pourcentage de survivance, calculé par rapport à 100% de survivance dans le tube témoin de contrôle de croissance selon la formule suivante :

$$S = \frac{n}{N} \times 100$$

Avec :

S = Survivance des germes (exprimée en pourcentage)

N = Nombre de colonies dans le tube témoin

n = Nombre de colonies dans le tube expérimental.

Le traitement des données expérimentales a permis non seulement de tracer les courbes d'activité, mais aussi de déterminer les paramètres antifongiques suivants :

- la Concentration Minimale Fongicide (CMF) : c'est la plus petite concentration d'extrait qui tue 99,99% les espèces comparativement au témoin de contrôle de croissance ; inversement, c'est la concentration d'extrait qui laisse une survivance de 0,01% ;
- la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) : c'est la plus petite concentration d'extrait à partir de laquelle il n'y a aucune croissance visible à l'œil nu,
- la concentration pour 50% d'inhibition (CI₅₀). Elle représente la dose d'extrait pour laquelle 50% de la croissance des espèces fongiques ont été inhibés. Ce paramètre se détermine graphiquement à partir de la courbe de sensibilité.

2.4.6. Détermination des CMI et CMF

Les CMI ont été déterminées en comparaison des pourcentages des croissances des souches dans les tubes expérimentaux aux tubes témoins. La concentration du tube expérimental n'ayant pas de croissance visible (pas de colonies visibles) correspond à la CMI. La CMF est déterminée à la suite de la CMI. Une subculture du tube identifié comme portant la concentration minimale inhibitrice est réalisée dans une gélose neuve (pas d'extraits de plante). La surface de la gélose est raclée avec l'anse etensemencée dans cette gélose. Après 24 heures d'incubation la CMF est encore lue dans le tube ne comportant aucune croissance (**Maury, 1987 ; Guéde-Guina et al., 1996**).

2.5. Détermination du pouvoir antifongique des extraits et du ketoconazole

2.5.1. Critères de comparaison des activités des extraits et celles de ketoconazole

L'évaluation de l'activité des extraits est faite au regard des valeurs des paramètres antifongiques (CMI, CMF, CI₅₀) et de l'allure des courbes d'activité. Cette évaluation se fait surtout sur la base de la comparaison des valeurs des CMF, car la CMF est un paramètre quantitatif alors que la CMI est un paramètre qualitatif. Ainsi un extrait X₁ est considéré plus actif qu'un autre extrait X₂ si la valeur de CMF de X₁ est plus petite que celle de X₂. Lorsque deux extraits X₁ et X₂ ont la même valeur de CMF, le jugement est reporté sur la valeur de la CI₅₀. L'extrait le plus actif doit avoir la plus petite valeur de CI₅₀. Le dernier critère d'évaluation repose sur la courbe d'activité ou de sensibilité des espèces à l'extrait:

- son allure générale progressivement décroissante ou à évolution constante (forme de plateau) ;
- la valeur relative de sa pente (forte ou faible);
- sa position par rapport à l'axe des ordonnées (proche, éloignée ou médiane).

Ce sont des facteurs importants et révélateurs de l'activité (forte, moyenne et faible) intrinsèque (Ackah *et al.*, 2008 ; Yayé *et al.*, 2012).

2.5.2. Rapport d'activité

Pour juger si un extrait est 2 ; 3 ou N fois plus actif qu'un autre, un rapport d'activité est établi en divisant la valeur de la CMF la plus grande par la valeur de la CMF la plus petite. Par exemple $CMF_{X_1}/CMF_{X_2} = K$. Cela signifie que l'extrait ayant la plus petite valeur de CMF (X₂) est K fois plus actif que l'extrait ayant la plus grande valeur de CMF (X₁) (Ackah *et al.*, 2008 ; Yayé *et al.*, 2012).

2.5.3. Classification des niveaux d'activité

Les niveaux d'activité des extraits ont été classés en fonction des valeurs de CMF en trois catégories (Aligiannis *et al.*, 2001) :

- activité faible : $CMF > 1600 \mu\text{g/mL}$
- activité moyenne : $1500 \mu\text{g/mL} < CMF < 600 \mu\text{g/mL}$
- activité forte : $CMF < 500 \mu\text{g/mL}$.

2.6. Tri-phytochimique

Le tri-phytochimique a porté sur la mise en évidence des principaux groupes chimiques contenus dans tous les extraits testés (extrait total aqueux, extrait total hydroalcoolique, X₁₂ et G₃). Les essais ont été réalisés en tubes.

2.6.1. Recherche des saponosides

En solution aqueuse les saponosides ont un indice de mousse très élevé. Cette propriété est donc mise à profit dans ce test, par agitation d'un échantillon de volume d'extrait. Les saponosides sont des hétérosides à génine stéroïdique ou triterpénique, douées de propriétés tensioactives.

Dans un tube à essai contenant 4 mL d'eau distillée, 2 mL d'échantillon de l'extrait correspondant (extrait total aqueux, extrait total hydroalcoolique, X₁₂, et G₃) y ont été ajoutés. L'ensemble a été vigoureusement agité pendant 1 minute et laissé au repos pendant 1 à 2 minutes. La hauteur de la mousse a été mesurée. La présence de saponine est mise en évidence lorsque cette mesure est supérieure à 1cm, (**Lebeau *et al.*, 1956 ; Bonga *et al.*, 1996 ; Koudougou, 2004**).

2.6.2. Recherche des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été recherchés selon la méthode décrite par **Tiwari *et al.* (2011)**. Les alcaloïdes sont des composés azotés alcalins dérivés des acides aminés. La recherche de ces composés a été effectuée par des réactions de précipitation avec les réactifs généraux des alcaloïdes selon les méthodes de Bouchardat, Valser-Mayer et Dragendorff.

Les alcaloïdes sont relevés par la propriété à se combiner avec les métaux lourds (Bismuth, iode, mercure, tungstène...) et précipiter sous forme de sels colorés.

Les métaux lourds utilisés dans les réactifs sont :

- l'iode dans le réactif de Bouchardat qui entraîne la formation de précipité brunâtre;
- l'iode et bismuth dans le réactif de Dragendorff engendrent la formation de précipité orangé ;
- l'iode et mercure dans le réactif de Valser-Mayer permettent la formation d'un précipité blanc laiteux.

Dans une capsule en porcelaine 6 mL, d'extrait aqueux de *T. superba*, ont été évaporés à sec au bain de sable. Le résidu a été repris dans 6 mL d'éthanol. La solution ainsi obtenue a été répartie dans trois tubes à essai. Chaque tube à essai reçoit par la suite deux gouttes de réactif spécifique (Dragendorff, Valser-Mayer ou Bouchardat).

L'apparition de précipités spécifiques indique la présence d'alcaloïdes dans l'extrait.

2.6.3. Recherche des quinones

Les quinones existent sous deux formes (libres et combinées) dont les premières sont mises en évidence par le réactif de Borntraeger tandis que les secondes doivent être hydrolysées avant leur mise en évidence.

La caractérisation des quinones est fondée sur le fait qu'ils donnent, sous l'action d'une lessive alcaline (ammoniaque, soude, eau de chaux) ajoutée en faible quantité une coloration rouge cerise pourpre.

Dans une capsule en porcelaine, un échantillon de 2 mL d'extrait de *T. superba*, est évaporé à sec au bain de sable. Le résidu est trituré avec 5 mL d'acide chlorhydrique dilué au 1/5. L'ensemble a été porté au bain-marie bouillant dans un tube à essai pendant 30 minutes.

Après refroidissement, l'hydrolysât a été extrait avec 20 mL de chloroforme. L'extrait ainsi obtenu a été traité avec 0,5 mL d'ammoniaque dilué au demi. L'apparition de la coloration indique la présence de quinone (libre ou combiné) (Assam Assam *et al.*, 2010 ; Ashafa et Umebese, 2012).

2.6.4. Recherche des polyphénols

- Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques comprenant plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ils sont généralement connus sous le nom de tanins qui se subdivisent en deux groupes que sont les tanins galliques (hydrolysables) et les tanins cathéchiques (non hydrolysables).
- Mise en évidence des tanins galliques et cathéchiques : Réaction de Stiasny

En solution aqueuse, l'ensemble des tanins sont précipités par les sels de métaux lourds (Cu, Zn, Sn, Pb, Hg) en complexes colorés. Pour distinguer les tanins cathéchiques des tanins galliques on utilise le réactif de Stiasny.

- Tanins cathéchiques

Un échantillon de 5 mL d'extrait de *T. superba* a été évaporé à sec dans une capsule en porcelaine chauffé sur un bain de sable. A ce résidu, ont été ajoutés 15 mL du réactif de Stiasny et l'ensemble a été porté au bain-marie à 80° C pendant 30 minutes. L'apparition de précipités indique la présence de tanins cathéchiques.

- tanins galliques

Un échantillon de 5mL d'extrait de *T. superba*, a été évaporé à sec dans une capsule en porcelaine chauffé sur du sable. Trois gouttes de FeCl₃ à 2% ont été ajoutées à ce résidu. Le développement d'une teinte bleue - noire indique la présence de tanins galliques.

Parallèlement, un essai à blanc est réalisé avec l'acide gallique.

2.6.5. Recherche des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits et représentent une source importante d'antioxydants dans l'alimentation. Ils forment une sous-classe de polyphénols.

Les flavonoïdes sont caractérisés par la réaction à la cyanidine. Le principe de cette réaction est qu'en solution alcoolique et en présence d'hydrogène naissant, les hétérosides flavoniques donnent des dérivés diversement colorés en fonction de la structure chimique du flavonoïde. Ainsi,

Les flavones vont donner une coloration orange ;

Les flavonols vont donner une coloration rouge ;

Les flavonones vont donner une coloration rouge-violacée (**Nacoulma et Ouedraogo, 1996 ; Nikiema, 1997 ; Audu et al. 2007 ; Bekro et al., 2007**).

Dans une capsule en porcelaine 2 mL d'extrait de *T. superba* ont été évaporés à sec au bain de sable. Le résidu a été repris après refroidissement dans 5 mL d'alcool chlorhydrique dilué au demi. La solution obtenue a été renversée dans un tube à essai et quelques copeaux de magnésium y sont ajoutés. L'apparition d'une coloration spécifique permet de déduire la présence du flavonoïde correspondant.

2.6.6. Recherche des stérols et des terpènes

Les stérols et terpènes sont des composés ayant un squelette carboné basé sur six unités d'isoprène et qui sont dérivés de la biosynthèse d'un hydrocarbure acyclique en C₃₀. C'est la condensation des unités isopréniques qui aboutit, selon la voie de synthèse, soit à un dérivé terpénique soit à un stérol comme le cholestérol. L'unité isoprénique est lui-même construit dans une première étape, à partir d'un motif comportant deux carbones, fournis par l'acétylco-enzyme A (acétyl-CoA) (**Bowman et Rand, 1980**).

En milieu d'acide fort (acide sulfurique), les stérols et les terpènes d'un extrait végétal à l'anhydride acétique sont colorés en pourpre ou violet (**Obasi et al., 2010**).

Dans une capsule en porcelaine, 5 mL d'extrait de *T. superba* ont été évaporés à sec au bain de sable. Le résidu a été dissout à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique. L'ensemble a été renversé dans un tube à essai auquel 0,5 mL d'acide sulfurique concentré a été ajouté.

2.7. Analyse statistique et traitement des résultats

Les données expérimentales obtenues ont été traitées grâce au logiciel Graph Pad Prism version 5.0 (Microsoft U.S.A). L'analyse statistique des résultats a été réalisée en utilisant l'analyse des variances (ANOVA ONE-WAY) selon le test de comparaison multiple de Dunnett, $p < 0,05$ est considéré comme critère de significativité. La valeur moyenne est accompagnée de l'erreur standard sur la moyenne (Moyenne \pm SEM).

III. RESULTATS

1. Activité antifongique des extraits totaux, des extraits issus des partitions, des extraits issus du fractionnement de X_{1,2} et celle du ketoconazole

1.1 Activité antifongique des extraits totaux de *T. superba*

1.1.1. Activité antifongique de l'extrait total aqueux de *Terminalia superba* sur les espèces fongiques

Les résultats de l'activité antifongique de l'extrait total aqueux de *Terminalia superba* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* sont consignés dans les tableaux des annexes 1, 2 et 3. On observe comparativement au témoin de croissance ($p < 0,05$), une diminution du nombre de colonies des espèces fongiques au fur et à mesure que la concentration de l'extrait total aqueux augmente dans les tubes expérimentaux.

Les données expérimentales traduites sous forme de courbes de sensibilité de *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* vis-à-vis de l'extrait total aqueux de *T. superba* sont présentées sur la figure 9.

Dans l'ensemble, toutes les courbes obtenues présentent une allure progressivement décroissante, avec des pentes plus ou moins fortes selon la souche fongique.

Par ailleurs, les courbes coupent l'axe des abscisses à différents niveaux dont deux au même niveau.

- La courbe de l'activité antifongique de l'extrait total aqueux sur *Cryptococcus neoformans* possède une pente relativement forte. Cette courbe est plus proche de l'axe des ordonnées.
- Les courbes d'activité de l'extrait total aqueux sur *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* ont des pentes relativement faibles. Elles sont plus éloignées de l'axe des ordonnées que celle de *Cryptococcus neoformans*.

Les valeurs des CI₅₀ (concentration pour 50 % d'inhibition) déterminées graphiquement et des CMF (concentration minimale fongicide), sont consignées dans le tableau I.

Selon le tableau I, les valeurs de CI₅₀ ($32 \pm 1,40 \mu\text{g/mL}$) et de CMF ($97,50 \mu\text{g/mL}$), obtenues pour *Cryptococcus neoformans* sont les plus faibles. L'extrait total aqueux exerce une forte activité antifongique sur cette espèce fongique. Quant à *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* la valeur de la CMF est de $390 \mu\text{g/mL}$. Ces deux espèces sont moins sensibles à cet extrait.

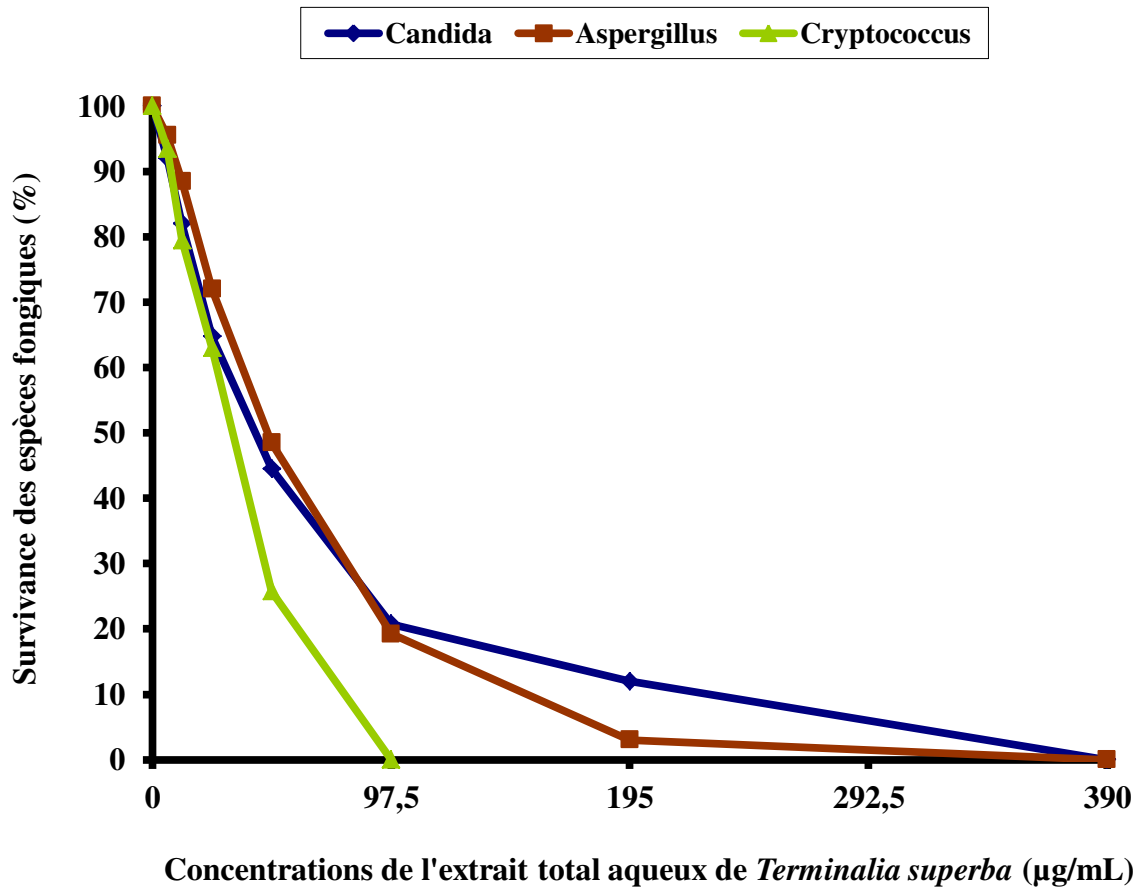


Figure 9 : Courbes de sensibilité de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* en fonction des concentrations de l'extrait total aqueux

Tableau I: Valeurs des paramètres antifongiques de l'extrait total aqueux de *Terminalia superba*

Extrait	Espèces fongiques	Paramètres antifongiques ($\mu\text{g/mL}$)	
		CMF	CI ₅₀
Extrait total aqueux de <i>T. superba</i>	<i>Candida albicans</i>	390	34 \pm 1,04
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	97,50	32 \pm 1,40
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	390	37,40 \pm 0,6

1.1.2. Activité de l'extrait total hydroalcoolique de *T. superba* sur les espèces fongiques

Après une incubation de 48 heures à 30° C, les résultats obtenus ($p < 0,05$) présentés dans les tableaux des annexes 1, 2 et 3 montrent que l'extrait total hydroalcoolique a inhibé la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* à différentes concentrations.

A partir des données du dénombrement des colonies dans les tubes expérimentaux de chaque espèce fongique, les courbes d'activité ont été tracées (Figure 10). Toutes les courbes présentent une allure décroissante. Ce qui traduit une nette activité antifongique de l'extrait total hydroalcoolique. Trois types de courbes peuvent être distingués :

- la courbe d'activité antifongique de l'extrait total hydroalcoolique sur *Cryptococcus neoformans* a présenté une pente relativement forte ;
- la courbe d'activité antifongique de l'extrait total éthanolique sur *Aspergillus fumigatus* a donné une pente moyenne ;
- la courbe d'activité de l'extrait total éthanolique sur *Candida albicans* a donné une pente faible.

Les valeurs des CMF ainsi que celles des CI_{50} , graphiquement déterminées sont résumées dans le tableau II. Ces valeurs permettent de comparer la sensibilité des espèces fongiques en présence de l'extrait total hydroalcoolique de *T. superba*

Les plus faibles valeurs de CI_{50} ($4,30 \pm 1,21 \mu\text{g/mL}$) et CMF ($24,37 \mu\text{g/mL}$) ont été obtenues sur *Cryptococcus neoformans*. Ces valeurs sont les plus faibles obtenues à l'issue des tests biologiques effectués. Cela signifie que l'extrait total hydroalcoolique présente une meilleure activité antifongique sur *Cryptococcus neoformans*.

La valeur de CMF de *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* est identique ($97,50 \mu\text{g/mL}$). Ces deux espèces fongiques sont moins sensibles à cet extrait que *Cryptococcus neoformans*. Par ailleurs, la valeur de CI_{50} de *Candida albicans* étant de $9,40 \pm 1,39 \mu\text{g/mL}$ est moins élevée que celle de *Aspergillus fumigatus* ($20,80 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$). *Aspergillus fumigatus* est moins sensible à l'extrait total éthanolique que *Candida albicans* (Tableau II).

Pour 100 g de poudre de *T. superba* 31 g d'extrait aqueux et 37 g d'extrait hydroalcoolique ont été obtenus soit 31 % et 37 % de rendement. La figure 11 montre les masses des extraits totaux de *Terminalia superba*.

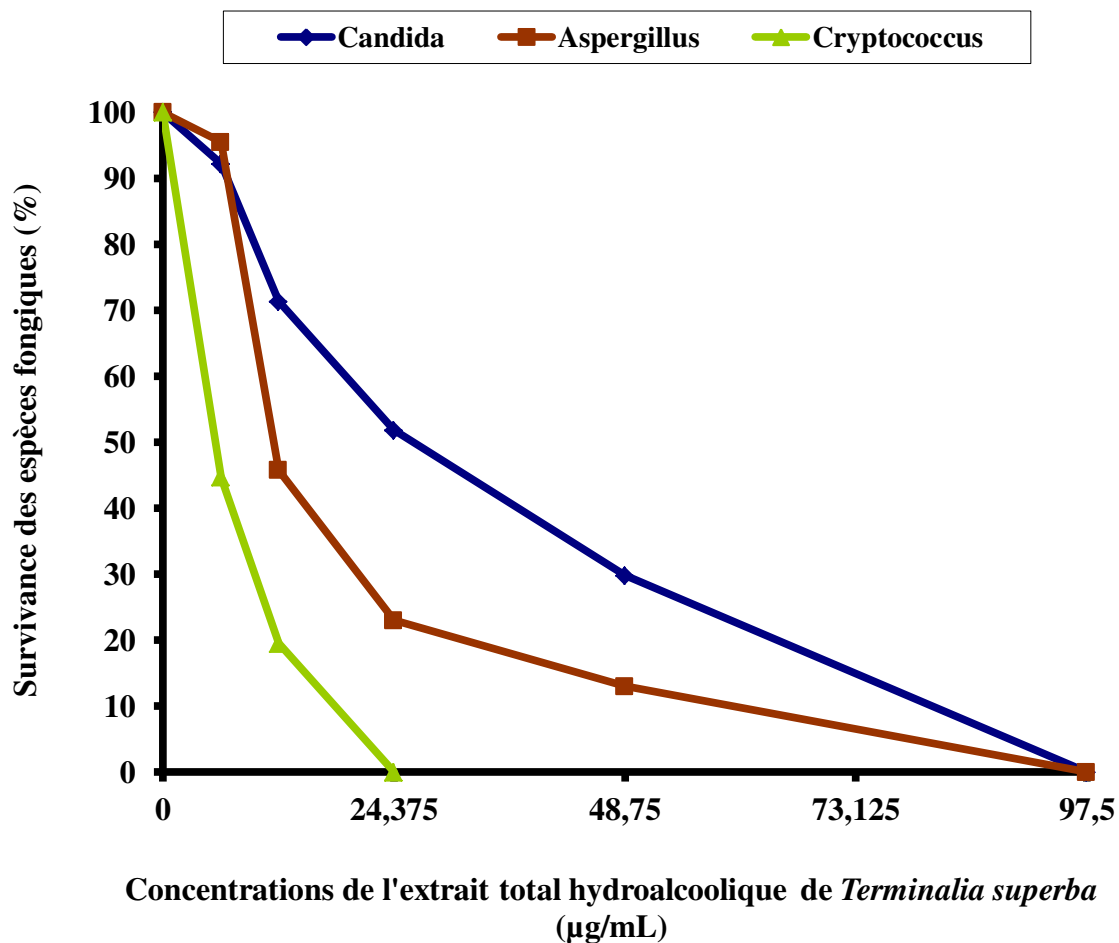


Figure 10: Courbes de sensibilité de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* en fonction des concentrations de l'extrait total hydroalcoolique

Tableau II : Valeurs des paramètres antifongiques de l'extrait total hydroalcoolique de *T. superba*

Extrait	Espèces fongiques	Paramètres antifongiques ($\mu\text{g/mL}$)	
		CMF	CI ₅₀
Extrait total hydroalcoolique de <i>T. superba</i>	<i>Candida albicans</i>	97,50	9,40 \pm 1,39
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	24,37	4,30 \pm 1,21
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	97,50	20,80 \pm 0,7

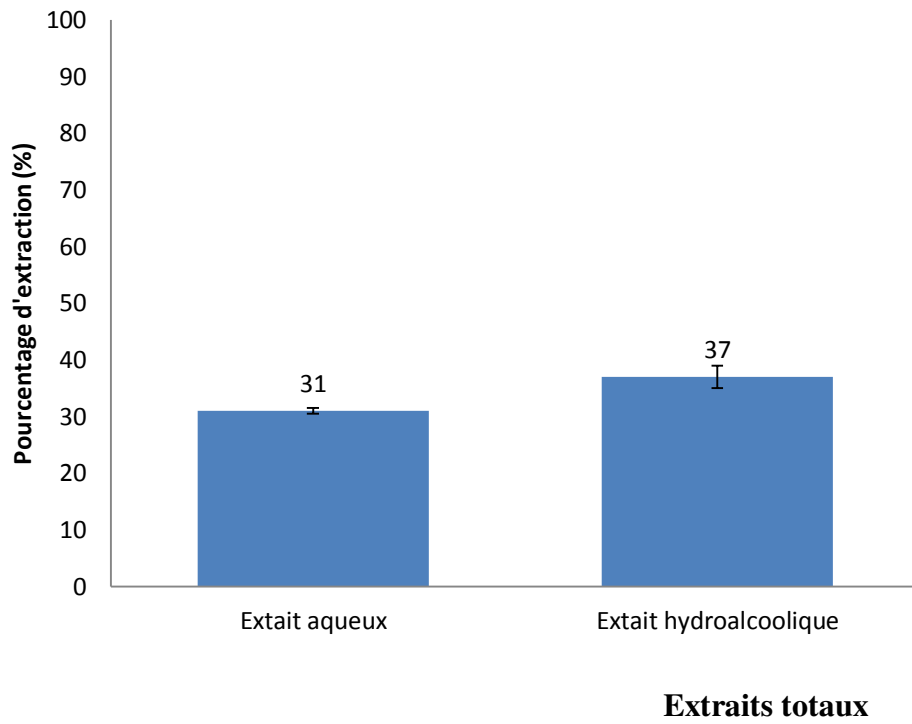


Figure 11 : Rendement des extraits totaux de *Terminalia superba*

1.2. Activité antifongique des extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique

Les résultats de l'étude de l'activité des différents extraits de *T. superba* sur la croissance de *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* sont consignés dans les tableaux des annexes 4, 5 et 6. On observe comparativement au témoin ($p < 0,05$), une diminution du nombre de colonies de *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* au fur et à mesure que la concentration des extraits augmente dans les tubes expérimentaux.

Les données expérimentales traduites sous forme de courbes de sensibilité de *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* vis-à-vis des extraits sont présentées sur les figures 12, 13, 14, 15 et 16.

Dans l'ensemble, toutes les courbes obtenues présentent une allure progressivement décroissante, avec des pentes plus ou moins fortes selon les extraits.

Par ailleurs, en fonction de ces extraits, les courbes coupent l'axe des abscisses à différents niveaux dont trois au même niveau.

Les valeurs des CI_{50} (concentration pour 50 % d'inhibition) déterminées graphiquement et des CMF (concentration minimale fongicide) sont consignées dans le tableau III

L'analyse de ce tableau montre que les extraits aqueux issus de cette partition ($X_{1,2}$, $X_{2,2}$, $X_{3,2}$, $X_{4,2}$ et $X_{5,2}$) présentant des valeurs des paramètres antifongiques les plus basses (12,178 $\mu\text{g/mL}$, 24,37 $\mu\text{g/mL}$, 48,75 $\mu\text{g/mL}$ et 97,50 $\mu\text{g/mL}$) sont plus actifs comparativement aux extraits des phases organiques ($X_{1,1}$, $X_{2,1}$, $X_{3,1}$, $X_{4,1}$ et $X_{5,1}$) dont les valeurs sont les élevées et comprises entre 195 $\mu\text{g/mL}$ et 1560 $\mu\text{g/mL}$.

En effet, sur *Candida albicans*, les extraits $X_{1,2}$ et $X_{5,2}$ ont donné les plus faibles valeurs de CMF (CMF = 48,75 $\mu\text{g/mL}$) et $X_{4,1}$ a présenté la plus forte valeur de paramètres antifongiques (CMF = 780 $\mu\text{g/mL}$). Cela signifie que les extraits $X_{1,2}$ et $X_{5,2}$ sont plus actifs sur cette espèce par rapport à $X_{4,1}$.

Sur *Cryptococcus neoformans*, les plus faibles valeurs des paramètres antifongiques ont été obtenues avec $X_{1,2}$ (CMF = 12,18 $\mu\text{g/mL}$). En revanche, sur la même espèce fongique (*Cryptococcus neoformans*) $X_{4,1}$ possède la plus forte valeur de CMF (195 $\mu\text{g/mL}$). L'extrait $X_{1,2}$ est plus actif sur *Cryptococcus neoformans* que $X_{4,1}$.

Sur *Aspergillus fumigatus* $X_{1,2}$ a donné la plus faible valeur des paramètres (CMF = 48,75 $\mu\text{g/mL}$) et c'est encore $X_{4,1}$ qui a donné la plus forte valeur de CMF (1560 $\mu\text{g/mL}$).

Il résulte de ce tableau que l'extrait X_{1,2} a donné les valeurs de CMF les plus faibles pour les trois espèces contrairement à X_{4,1} dont les valeurs sont les plus fortes (Tableau III). Au terme de cette étude l'extrait X_{1,2} s'est relevé le plus actif sur les trois espèces fongiques étudiées. Cet extrait a été choisi pour la suite des travaux. Par conséquent, cet extrait X_{1,2} a été fractionné sur le gel de séphadex LH20 pour donner trois groupes de générations.

Les rendements des extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique ont été présentés sous forme de figures. Les rendements les plus faibles ont été obtenus avec les extraits X_{4,1}, X_{5,1} et X_{1,1}. Les rendements relativement moyens ont été obtenus avec X_{2,2}, X_{3,2}, X_{3,1} et X_{2,1}. Les plus forts rendements ont été enregistrés avec les extraits X_{5,2}, X_{4,2} et X_{1,2} (figure 17).

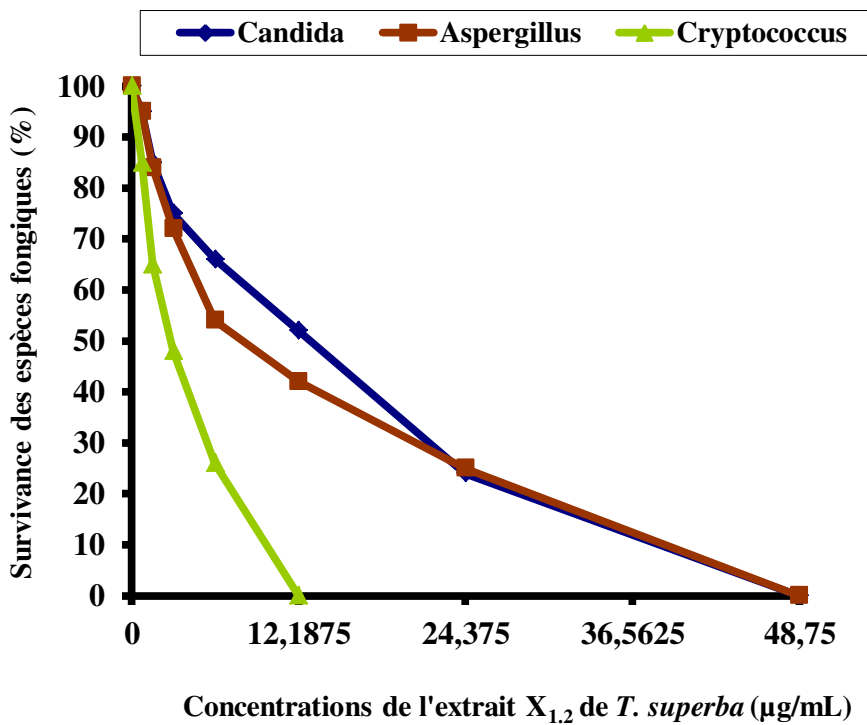
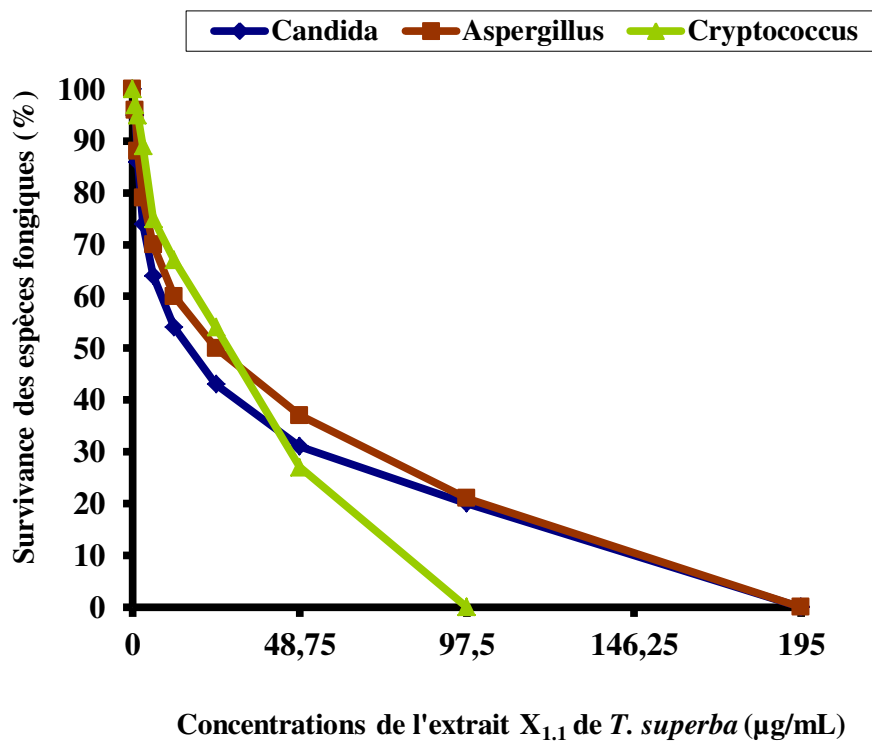


Figure 12 : Courbes de sensibilité de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* en fonction des concentrations des extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique dans le mélange de solvant hexane-eau

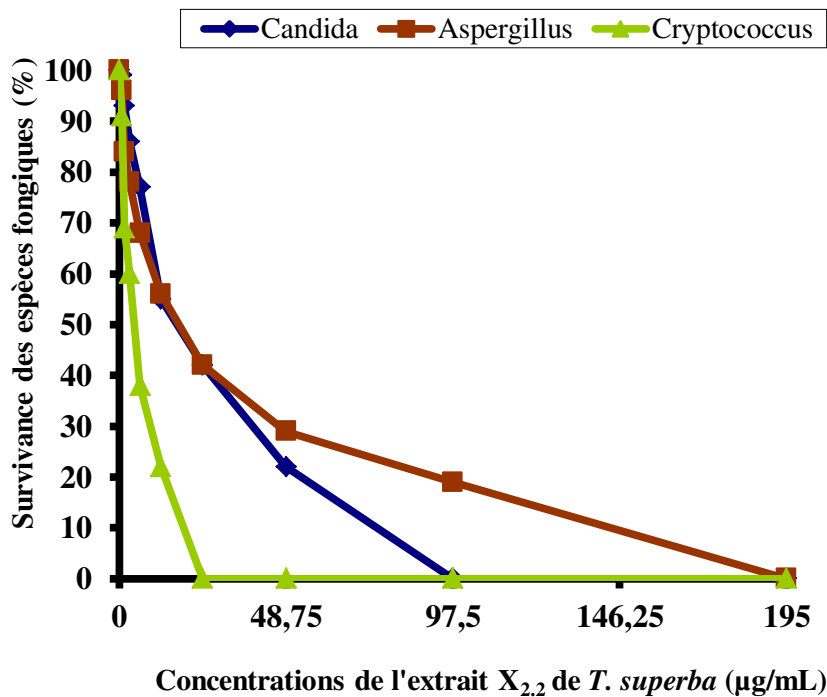
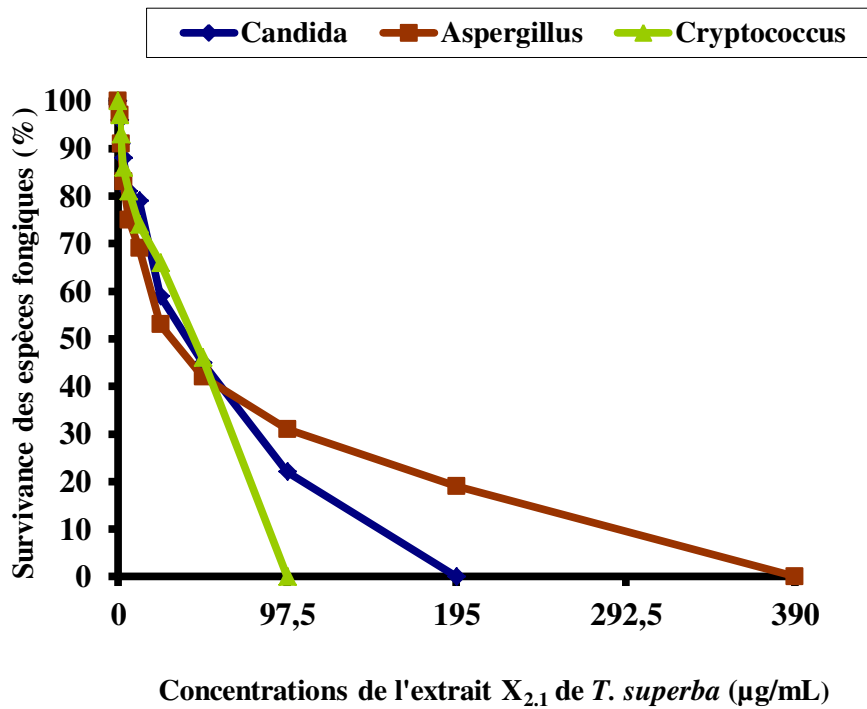


Figure 13 : Courbes de sensibilité de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* en fonction des concentrations des extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique dans le mélange de solvant Acétate d'éthyle-eau

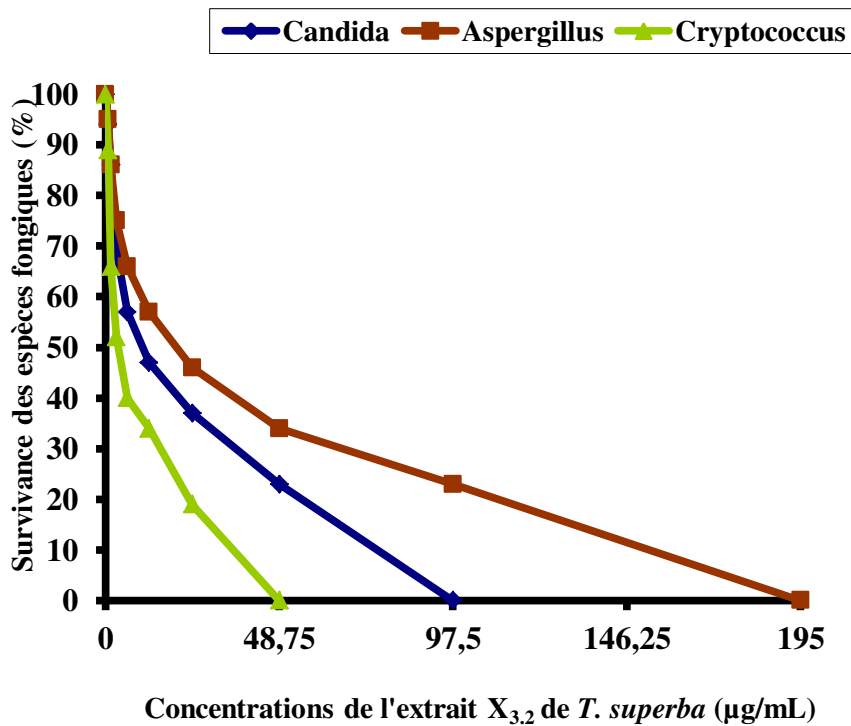
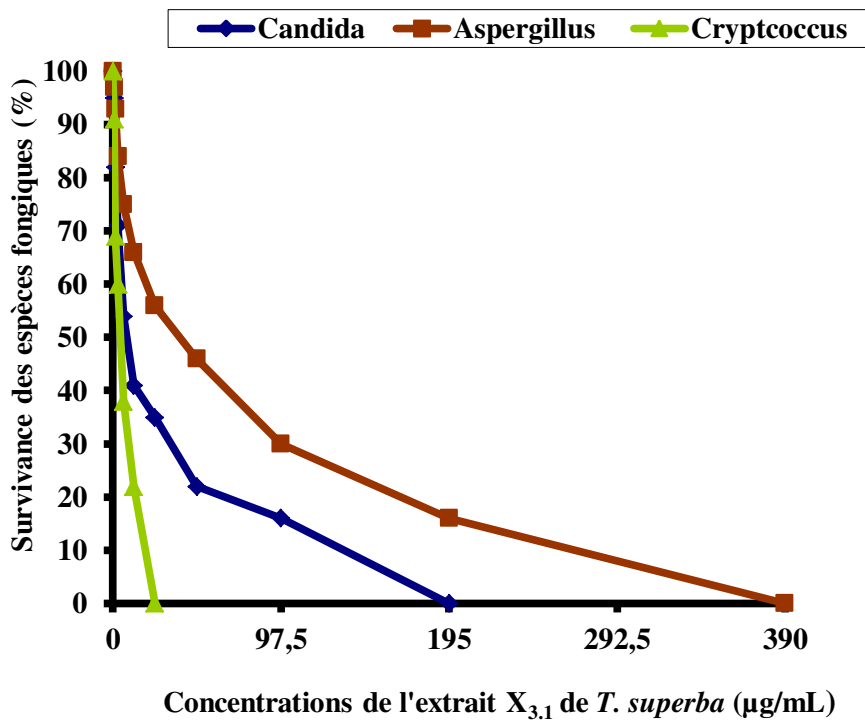


Figure 14 : Courbes de sensibilité de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* en fonction des concentrations des extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique dans le mélange de solvant n-Butanol-eau

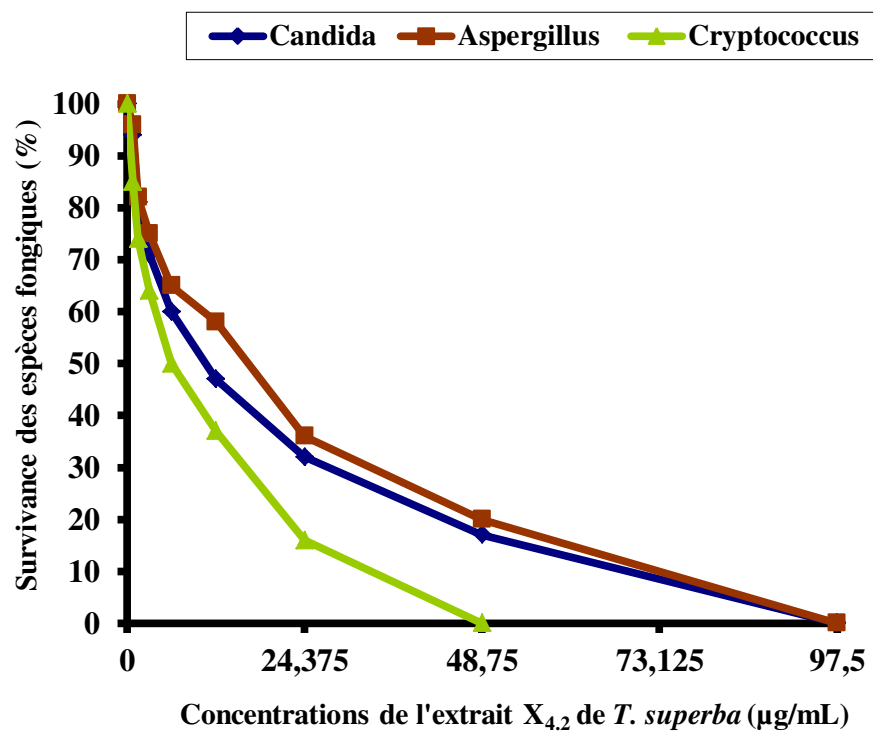
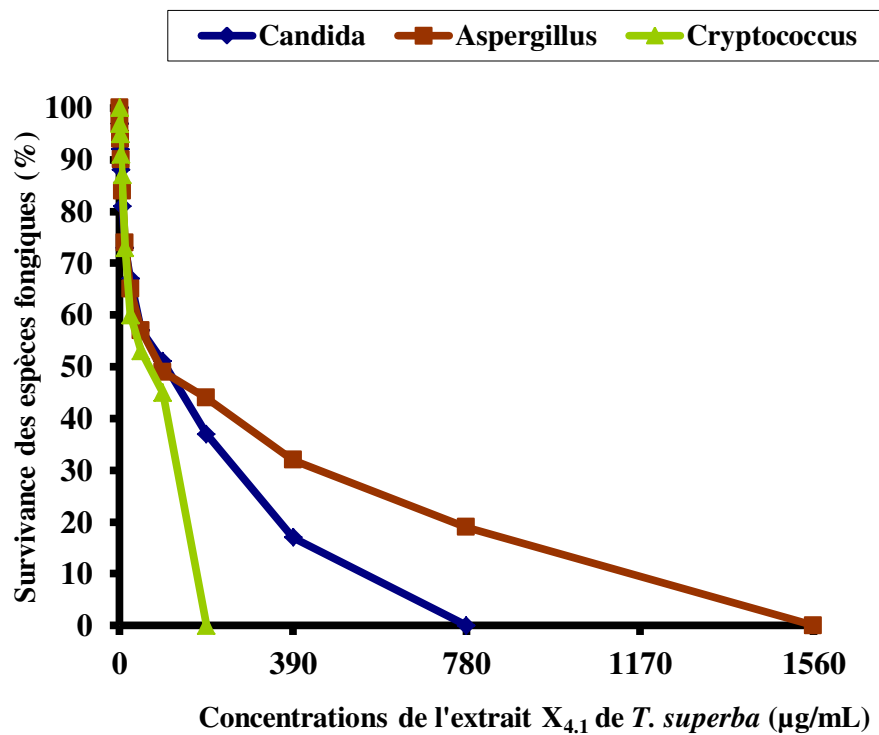


Figure 15 : Courbes de sensibilité de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* en fonction des concentrations des extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique dans le mélange de solvant Dichlorométhane-eau

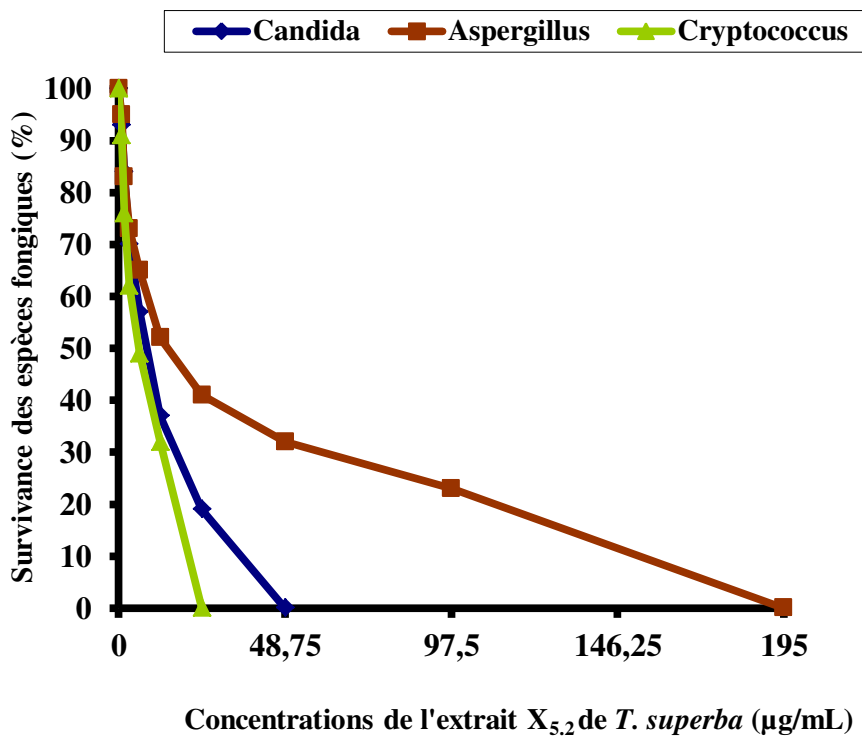
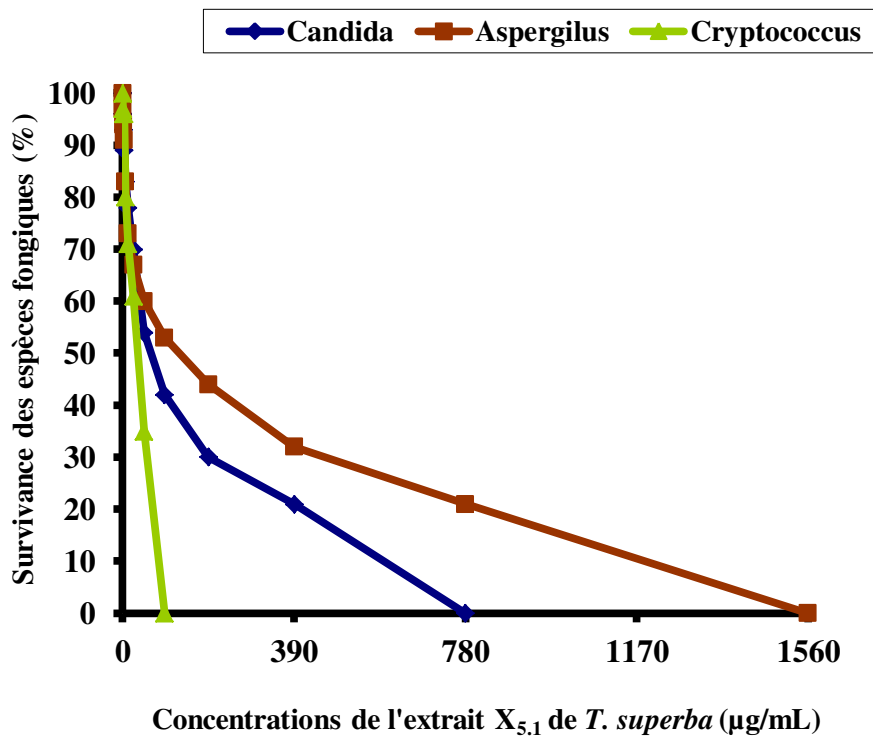


Figure 16 : Courbes de sensibilité de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* en fonction des concentrations des extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique dans le mélange de solvant Chloroforme-eau

Tableau III: Valeurs des paramètres antifongiques des extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique de *Terminalia superba*

Extraits	<i>Candida albicans</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Aspergillus fumigatus</i>	
	CI ₅₀	CMF	CI ₅₀	CMF	CI ₅₀	CMF
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
X_{1.1}	18±1,02	195	27±0,88	97,50	25±0,73	195
X_{1.2}	12±1,13	48,75	3±0,44	12,18	8±0,64	48,75
X_{2.1}	40±1,16	195	42±0,56	97,50	30±0,75	390
X_{2.2}	16±0,63	97,50	4,5±1,00	24,37	17±1,00	195
X_{3.1}	8±1,18	195	6±0,65	48,75	40±0,25	390
X_{3.2}	10±0,88	97,50	4±0,86	48,75	18±0,56	195
X_{4.1}	100±0,23	780	66±0,29	195	100±0,21	1560
X_{4.2}	10±1,07	97,50	6±0,18	48,75	6±0,48	97,50
X_{5.1}	60±0,18	195	34±0,28	97,50	125±1,12	1560
X_{5.2}	8±0,47	48,75	6±0,87	24,37	12±1,78	195

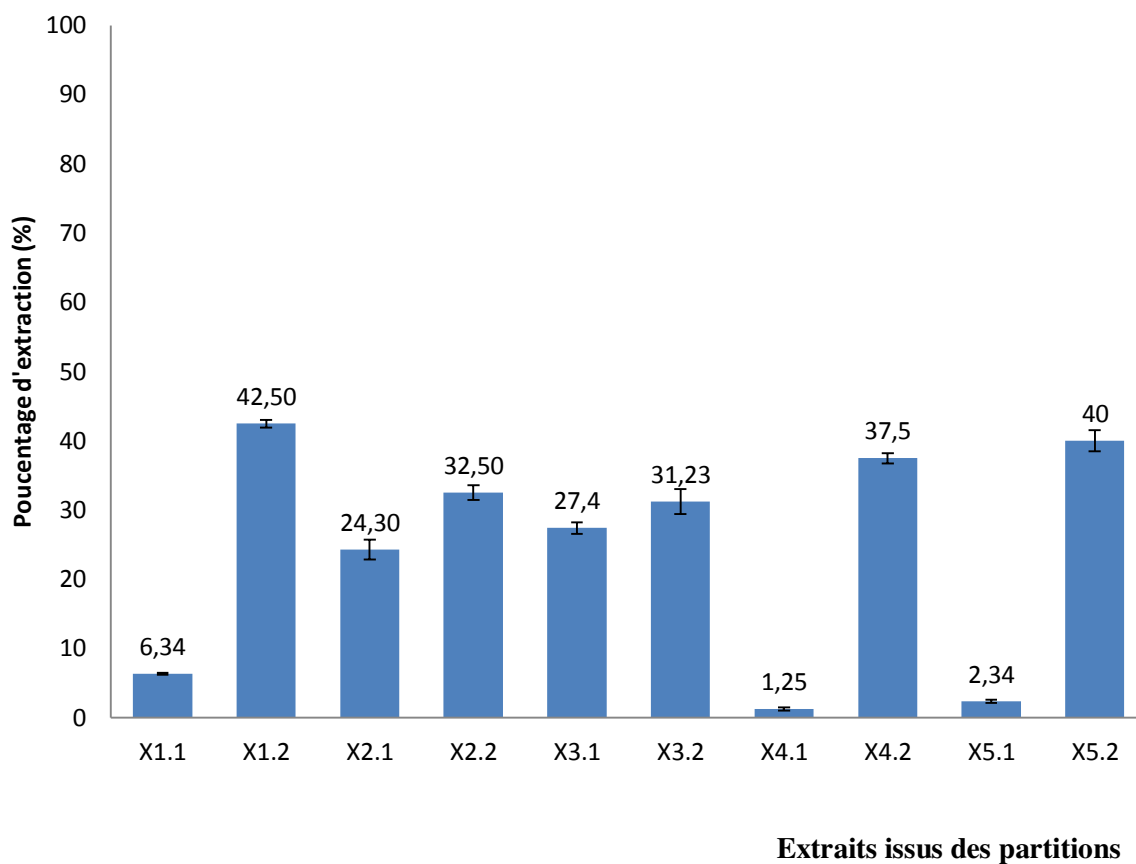


Figure 17: Rendements des extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique

1.3. Activité antifongique des extraits issus du fractionnement de X_{1,2}

Après une incubation de 48 heures à 30°C, les résultats obtenus ($p < 0,05$) présentés dans les tableaux des annexes 7, 8 et 9 montrent que les extraits issus du fractionnement de l'extrait X_{1,2} inhibent la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* à des degrés divers.

A partir des données du dénombrement des colonies, dans les tubes expérimentaux, les courbes de sensibilité des souches fongiques en fonction de la concentration des extraits ont été tracées (Figure 18). Toutes les courbes présentent une allure décroissante. Ce qui traduit une nette activité antifongique de chaque extrait.

Les extraits issus du fractionnement de X_{1,2} ont inhibé les trois espèces fongiques à différentes valeurs de CMF.

Sur *Cryptococcus neoformans* les valeurs de CMF obtenues avec les extraits sont les plus faibles (G₁: 48,75 µg/mL, G₂: 12,18 µg/mL et G₃: 6,09 µg/mL) (Tableau IV). *Cryptococcus neoformans* est plus sensible à tous les extraits issus du fractionnement que les deux espèces fongiques.

Sur *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*, les valeurs de CMF obtenues sont les mêmes. Ces valeurs sont : 97,50 µg/mL, 24,37 µg/mL et 12,18 µg/mL respectivement avec G₁, G₂ et G₃. Parmi ces deux espèces fongiques, *Aspergillus fumigatus* présentant les valeurs de CI₅₀ plus élevées (11 ± 0,9 µg/mL, 8 ± 0,75 µg/mL et 4 ± 1,45 µg/mL) est l'espèce la moins sensible aux extraits, car les valeurs de CMF obtenues sont les plus élevées (Tableau V). *Candida albicans* a une sensibilité intermédiaire aux trois extraits issus du fractionnement.

Parmi les extraits issus du fractionnement G₃ a exercé une activité antifongique forte sur les trois espèces fongiques car avec cet extrait les faibles valeurs de CMF ont été obtenues. G₃ a fait l'objet d'une analyse plus poussée afin de caractériser les composés responsables de cette très forte activité antifongique.

Différents rendements ont été obtenus au cours du fractionnement de l'extrait X_{1,2}. Avec de 2 g de l'extrait X_{1,2}, 455 mg (22,75 %) de l'extrait G₁ ont été obtenus contre 340 mg (17%) et 550 mg (27,5%) de G₂ et G₃ respectivement. Les différents rendements ont été présentés sous forme de figure. La figure 19 représente les rendements des groupes de fractions G₁, G₂ et G₃.

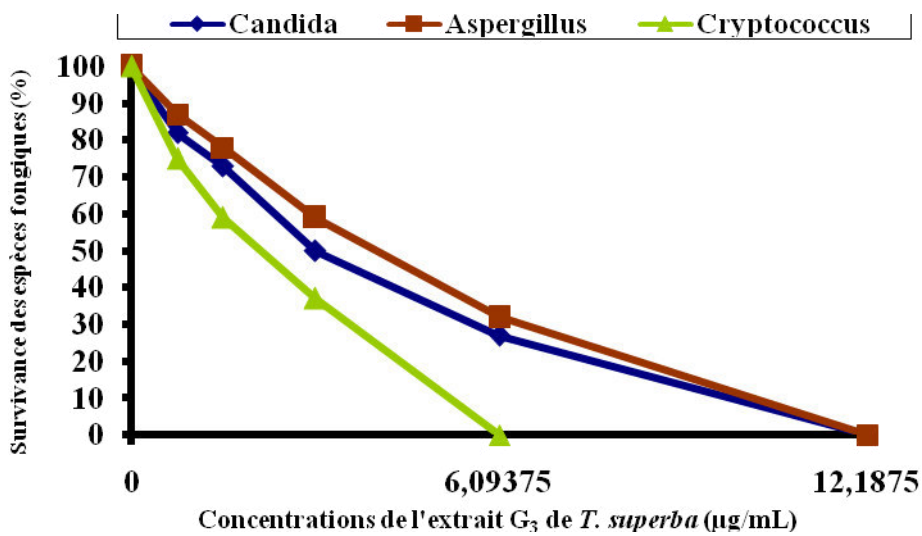
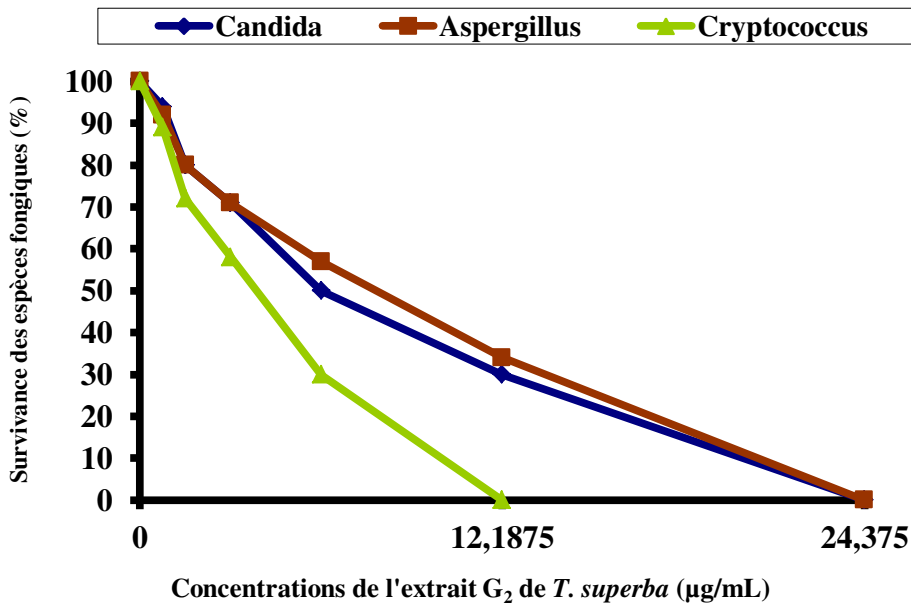
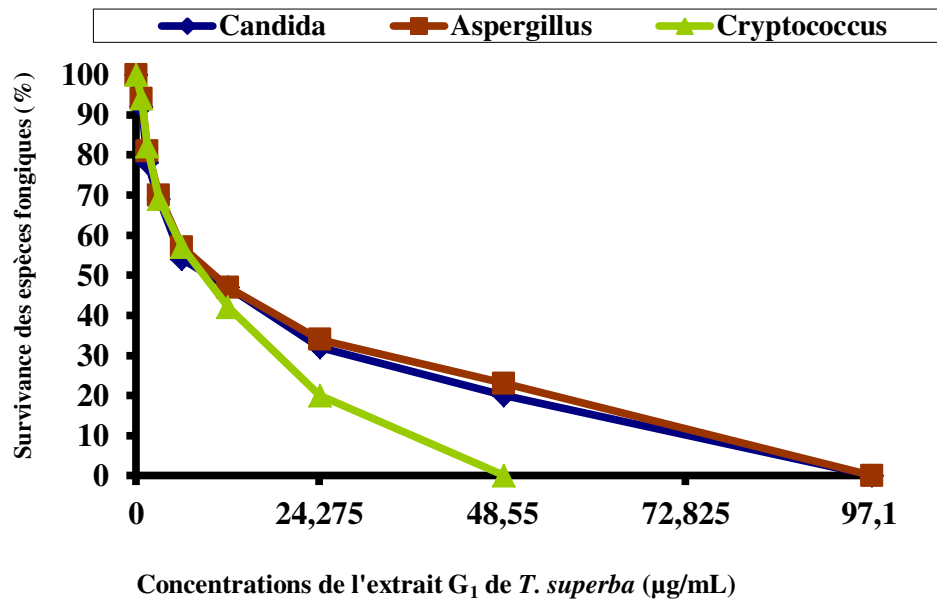


Figure 18 : Courbes de sensibilité de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* en fonction des concentrations de G₁, G₂ et G₃ issus du fractionnement de l'extrait X_{1,2}

Tableau IV: Valeurs des paramètres antifongiques des extraits issus du fractionnement de X_{1,2} de *T. superba*

Extraits	Espèces fongiques	Paramètres antifongiques (µg/mL)	
		CMF	CI ₅₀
G₁	<i>Candida albicans</i>	97,50	10 ± 1,02
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	48,75	9 ± 0,88
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	97,50	11 ± 0,9
G₂	<i>Candida albicans</i>	24,37	7 ± 1,18
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	12,18	4 ± 0,71
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	24,37	8 ± 0,75
G₃	<i>Candida albicans</i>	12,18	3 ± 1,12
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	6,09	2,3 ± 0,65
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	12,18	4 ± 1,45

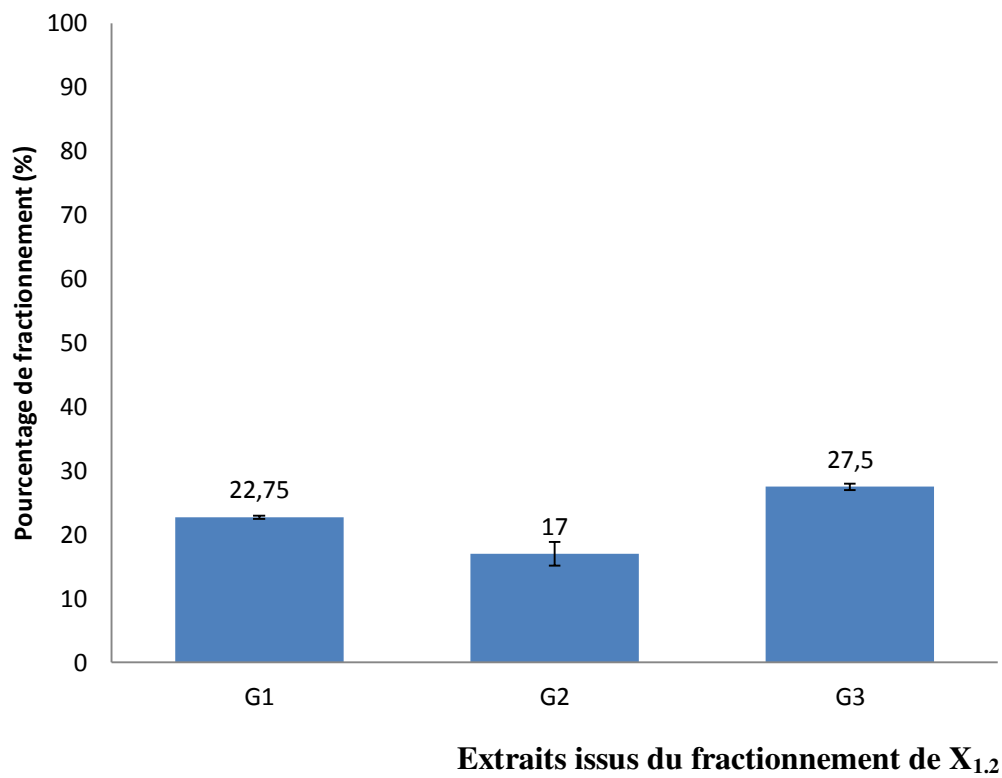


Figure 19 : Différents rendements des extraits issus du fractionnement de l'extrait X_{1.2}

1.4. Activité antifongique du Ketoconazole

Afin de mieux apprécier l'activité antifongique des extraits de *T. superba*, nous avons voulu comparer les activités antifongiques de ces extraits avec l'activité antifongique du Ketoconazole.

Après 48 heures d'incubation à 30°C, une inhibition effective des souches fongiques testées a été observée par le ketoconazole. Les résultats du comptage des colonies ($p < 0,05$) sont consignés dans le tableau de l'annexe 10. Les courbes de sensibilité obtenues à partir de ce tableau sont présentées par la figure 20.

Les courbes ont une allure progressivement décroissante. Par rapport à leur pente, ces courbes ont été bien distinctes l'une de l'autre.

- La courbe d'activité antifongique du Ketoconazole sur *Cryptococcus neoformans* a présenté une forte pente ;
- La courbe d'activité antifongique du Ketoconazole sur *Aspergillus fumigatus* a présenté une pente relativement moyenne comparativement aux deux courbes extrêmes.
- La courbe d'activité antifongique du Ketoconazole sur *Candida albicans* a possédé une pente relativement faible.

Le Ketoconazole inhibe les espèces fongiques (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*) à différentes concentrations. Sur *Candida albicans*, la valeur de CMF (390 µg/mL) est la plus élevée. *Candida albicans* a été l'espèce fongique la moins sensible à l'action inhibitrice du Ketoconazole. En revanche, l'espèce fongique *Cryptococcus neoformans* a donné une sensibilité plus forte au Ketoconazole avec la valeur de CMF égale à 48,75 µg/mL. La sensibilité de *Aspergillus fumigatus* au Ketoconazole se situe entre les deux extrêmes (97,50 µg/mL) (Tableau V).

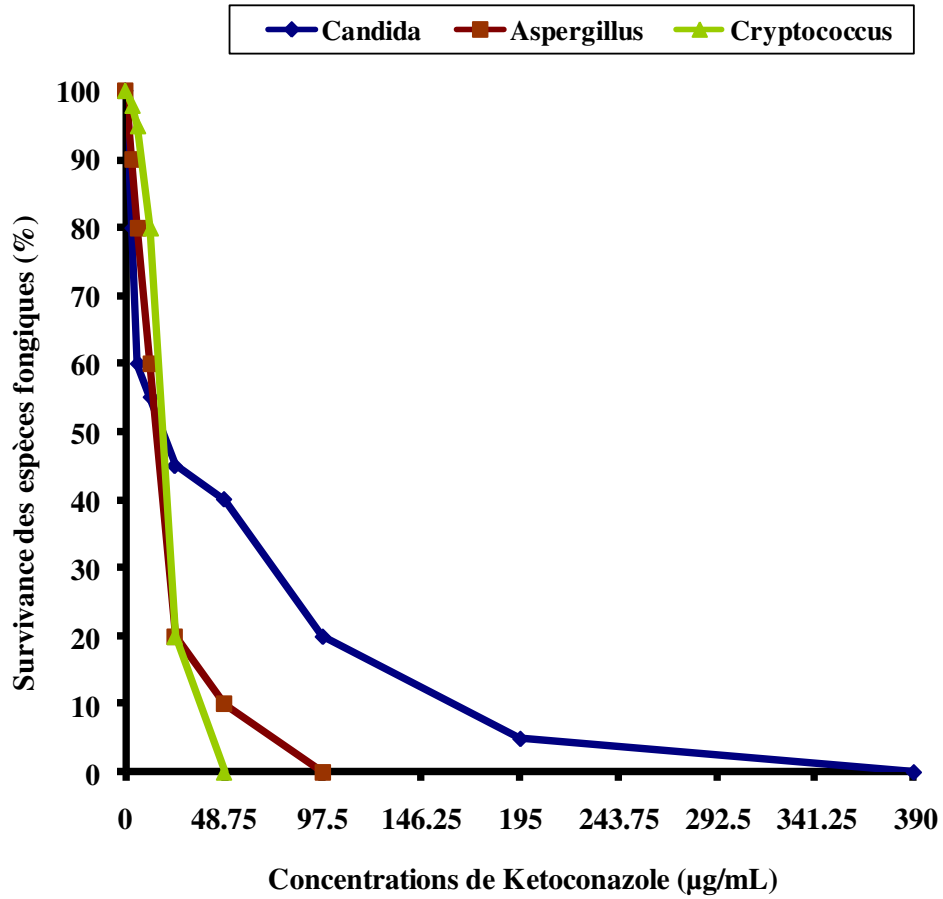


Figure 20: Courbes de sensibilité de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* en fonction des concentrations du Ketoconazole

Tableau V : Valeurs des paramètres antifongiques du Ketoconazole

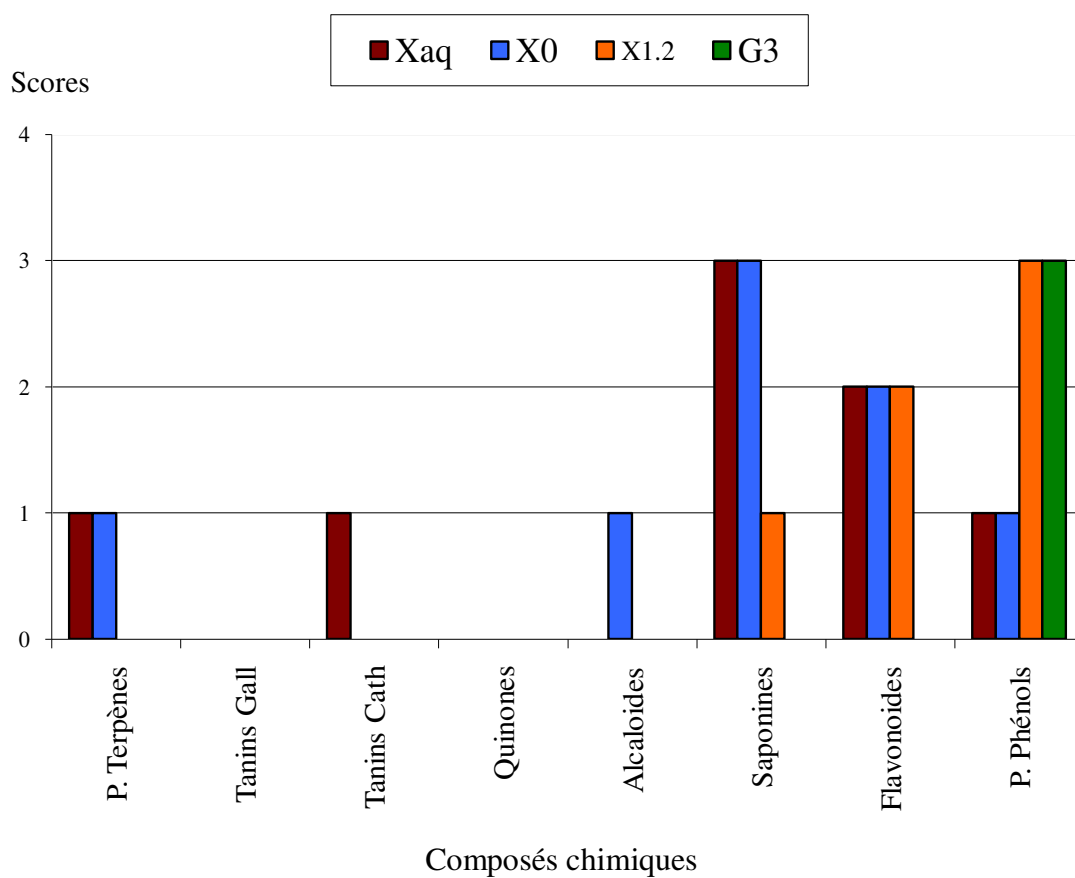
Extrait	Espèces fongiques	Paramètres antifongiques ($\mu\text{g/mL}$)	
		CMF	CI ₅₀
	<i>Candida albicans</i>	390	18,28 \pm 1,32
Ketoconazole	<i>Cryptococcus neoformans</i>	48,75	18 \pm 1,24
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	97,50	15 \pm 0,8

2. Etude Triphytochimique des extraits de *T. superba*

Le résultat du tri phytochimique des extraits de *T. superba* a montré que:

- L'extrait total aqueux renferme 5 grands groupes chimiques : les polyterpènes, les tanins cathéchiques, les polyphénols, les flavonoïdes et les saponosides ;
- L'extrait total hydroalcoolique contient aussi 5 grands groupes chimiques (les alcaloïdes, les polyterpènes, les polyphénols, les flavonoïdes et les saponosides) ;
- L'extrait X_{1,2} renferme 3 grands groupes chimiques que sont les polyphénols, les flavonoïdes et les saponosides ;
- Le groupe de fractions G₃ est constituée d'un seul grand groupe chimique : les polyphénols.

En partant de l'extrait total aqueux à l'extrait G₃ via l'extrait X_{1,2}, le nombre de grands groupes chimiques recherchés dans les extraits de *T. superba* a diminué (5 à 1). Le grand groupe chimique que sont les polyphénols a été le seul qui est présent dans tous les extraits de *T. superba* non seulement mais, le seul constituant ou composé chimique de G₃ (Figure 21).



Score 1 = faible quantité

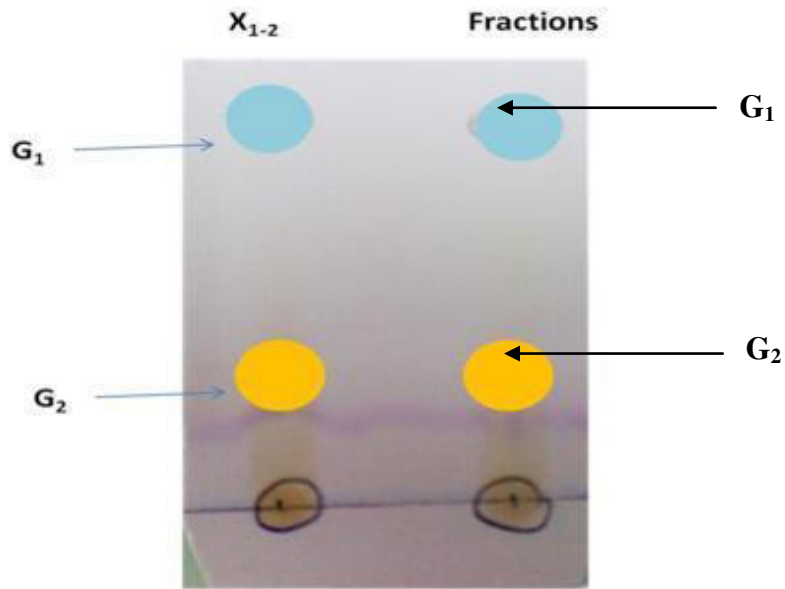
Score 3 = abondante quantité

Score 2 = quantité moyenne

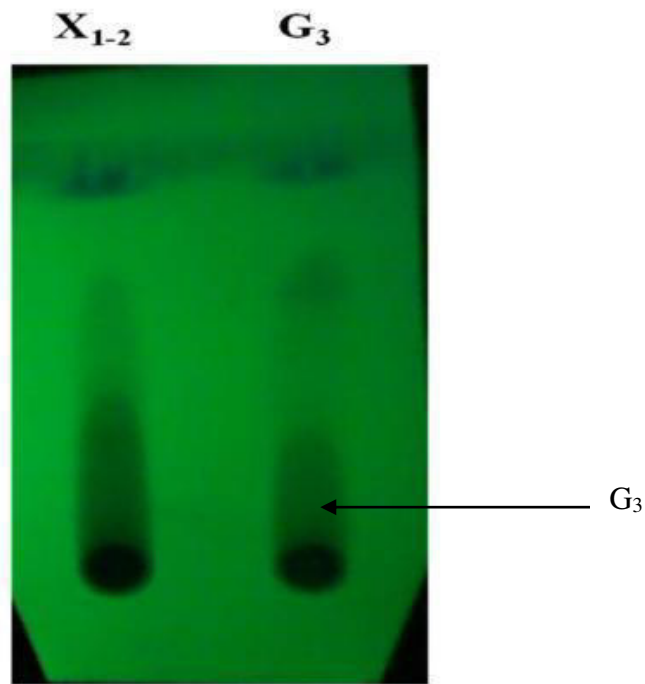
Figure 21 : Groupes chimiques mis en évidence dans les extraits (extrait total aqueux, extrait total hydroalcoolique, X_{1,2} et G₃) de *Terminalia superba*

3. Profil chromatographique de l'extrait X_{1,2} et des fractions G₁, G₂ et G₃

Les figures 22 A et 22 B montrent le profil chromatographique de l'extrait X_{1,2} et les fractions issues du fractionnement de X_{1,2}. La figure 22 A montre que le groupe G₁ (F₁ à F₆) a présenté à l'UV 365 nm, une fluorescence bleue avec un Rf égal à 0,8. Quant à l'extrait G₂ (F₇ à F₁₈), il a présenté une fluorescence jaune à l'UV 365 nm avec un Rf égal à 0,45. En revanche, l'extrait G₃ (F₁₉ à F₄₀) non fluorescent, ne se présente que sous forme de flamme de bougie à l'UV 254 nm (Fig 22 B). La présence des trois groupes de fractions issus du fractionnement de X_{1,2} a été prouvée par flash chromatographie.



A cOEt/MeOH/Eau (100/12/8)



B AcOEt/MeOH/Eau (100/12/8)

Figure 22 : Chromatographie sur couche mince de $X_{1.2}$ à 254 et 365 nm

A : Chromatographie sur couche mince de $X_{1.2}$ à 365 nm

B : Chromatographie sur couche mince de $X_{1.2}$ à 254 nm

4. Confirmation du profil chromatographique par flash chromatographique

La figure 23 se présente sous deux couleurs. La couleur bleue présente le gradient de solvant montrant le pourcentage de mélange de deux solvants (le méthanol et le Dichlorométhane). La couleur rouge présente les pics montrant les molécules présentes dans l'extrait X_{1,2}. Trois principaux pics sont alors observés sur cette figure. Ce sont le pic A qui pourrait correspondre au groupe de fraction G₁. Ce pic pourrait contenir un peu d'impureté. Le deuxième pic, le pic B qui pourrait aussi correspondre au groupe de fractions G₂. Ce pic semble être pur. Enfin, le pic C qui est le pic le plus important. Le pic C correspond au groupe de fractions G₃. L'importance de l'absorbance de pic fait penser à plusieurs molécules. Il y avait trois groupes de molécules dans l'extrait X_{1,2} et le pic C correspond au groupe de fractions G₃.

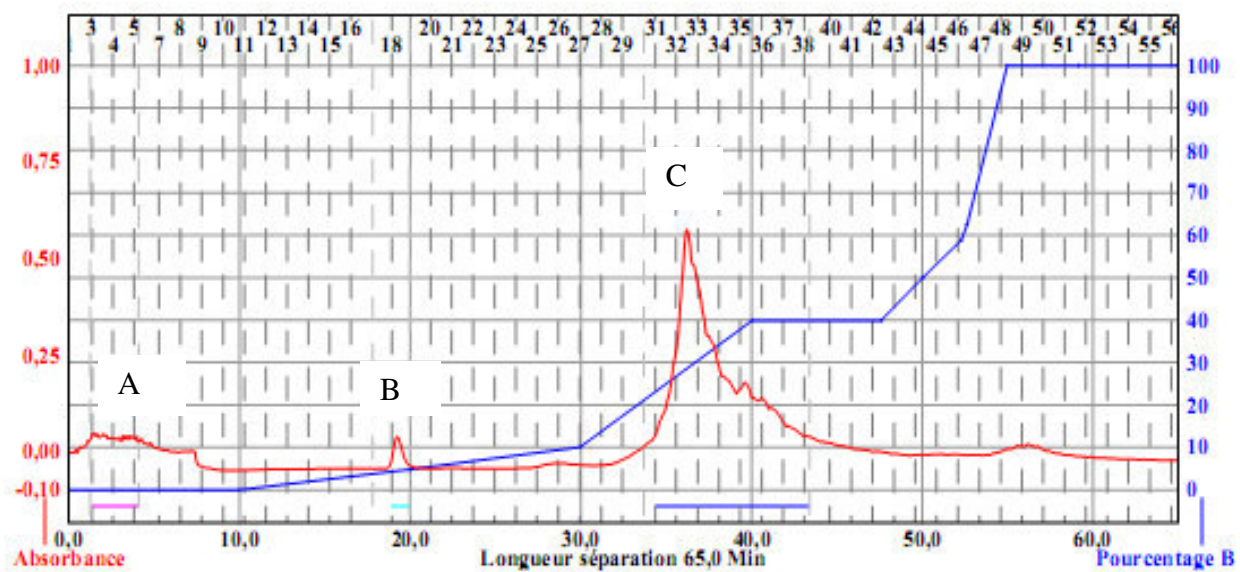


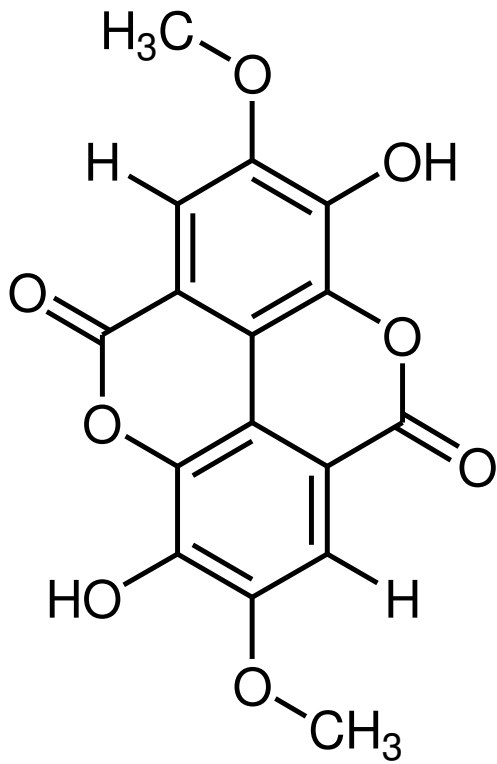
Figure 23 : Courbes obtenues après analyse flash chromatographique de l'extrait X_{1,2}

5. Produit obtenu après recristallisation de la fraction G₃

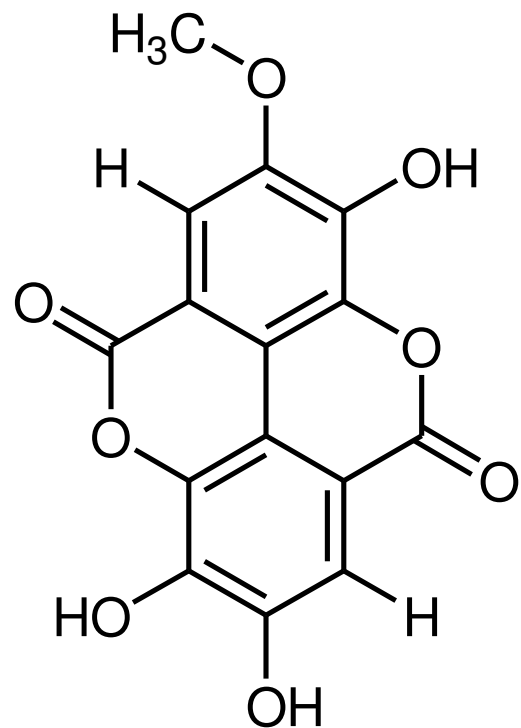
La purification par recristallisation de l'extrait du groupe de fractions G₃ dans du méthanol a donné un produit de couleur jaune. Ce dernier a été soumis à une série d'analyses chromatographique et spectrale qui ont abouti à l'établissement de la structure de deux composés AH₁ et AH₂ (figure 24).

▪ Composés mis en évidence dans la fraction G₃

Le résultat a révélé la masse de deux composés AH₁ et AH₂. Ainsi dans le composé AH₁, la masse est donnée par le pic de valeur $m/z = 316$ correspondant à l'ion $[M-H]^-$, ce qui revient à $M(AH_1)$ égale 330 dalton (figure 24) (le spectre de masse voir annexe 12).



AH₁



AH₂

Figure 24 : Structure des composés mis en évidence dans la fraction G₃

IV DISCUSSION

1. Activité antifongique des extraits de *Terminalia superba*

1.1. Activité de l'extrait total aqueux

Le choix de l'eau distillée comme premier solvant d'extraction pour l'évaluation des propriétés antifongiques des extraits de *T. superba* a été motivé par le fait que l'eau est le principal solvant des préparations médicinales en milieu traditionnel.

Les tests antifongiques effectués sur *Candida albicans* ont montré que la croissance (nombre de colonies) dans les tubes expérimentaux diminuait au fur et à mesure que la concentration de l'extrait total aqueux augmentait jusqu'à s'annuler à 390 µg/mL. L'extrait total aqueux est actif sur la croissance de *Candida albicans* selon une relation dose-dépendante. De plus, l'activité de l'extrait total aqueux de *T. superba* est fongicide.

Ces résultats sont proches de ceux des travaux antérieurs réalisés par d'autres auteurs (**Ackah et al., 2008 ; Ouattara et al., 2008**). En effet, ces auteurs au cours de leurs travaux portant sur l'évaluation des propriétés antifongiques de *Terminalia catappa* et de *Terminalia ivorensis* (espèces voisines de *T. superba*) sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans* ont enregistré des CMF de 780 µg/mL et de 390 µg/mL respectivement. Par ailleurs, l'extrait total aqueux de *T. superba* est 2 fois plus actif que l'extrait aqueux de *T. catappa*.

De même, l'activité antifongique de l'extrait total aqueux de *T. superba* sur *Cryptococcus neoformans* est aussi dose-dépendante. L'activité de l'extrait est fongicide à la concentration de 97,50 µg/mL. L'extrait total aqueux de *T. superba* (CMF = 97,50 µg/mL) est 82 fois plus actif que celui de *Mitracarpus scaber* (CMF= 8 000 µg/mL). IL est aussi 3077 fois plus actif que celui de *Morinda morindoides* (CMF = 300 000 µg/mL). Ces études ont été réalisées respectivement par **Guéde-Guina et al. (1997)** et **Bagre et al. (2006)** sur *Cryptococcus neoformans*.

L'extrait total aqueux de *T. superba* est aussi actif sur *Aspergillus fumigatus*. De même son activité est dose-dépendante. Sa CMF est de 390 µg/mL. L'extrait total aqueux est donc fongicide sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*.

En référence des CMF des extraits totaux aqueux de *Thonningia sanguinea* (12 500 µg/mL) (**Kouakou et al., 2007**), de *Spermacoce verticillata* (75 000 µg/mL) (**Zirihi et al., 2007**) et de *Mitracarpus villosus* (150 000 µg/mL) (**Zirihi et al., 2007**), l'extrait total aqueux de *T. superba* est respectivement 32 ; 192 et 384 plus actif que ceux des trois espèces végétales sur *A. fumigatus*.

Par ailleurs, l'activité antifongique de l'extrait total aqueux de *T. superba* est similaire à celle de l'extrait total aqueux de *Terminalia catappa* déterminée par **Ackah et al. (2008)**. Les deux extraits totaux aqueux ont les mêmes CMF (390 µg/mL) sur *Aspergillus fumigatus*.

Cryptococcus neoformans (CMF= 97,50 µg/mL et CI₅₀ =32 µg/mL) est la souche la plus sensible suivi de *Candida albicans* (CMF= 390 µg/mL et CI₅₀ = 34 µg/mL) et enfin *Aspergillus fumigatus* (CMF= 390 µg/mL et CI₅₀ = 37,40 µg/mL) à l'extrait total aqueux.

La différence de sensibilité des espèces fongiques pourrait être due à plusieurs facteurs.

Le premier facteur est la structure de la membrane plasmique. La membrane plasmique du *Cryptococcus neoformans* serait plus mince que celle des autres espèces fongiques ; ce qui facilite le passage des principes actifs d'où sa forte sensibilité à tous les extraits de *T. superba* testés.

Le deuxième facteur est lié à la nature de la paroi. En effet, une paroi riche en lipides est plus soluble aux composés de nature lipidiques (Ergostérol) que les composés non lipidiques. La paroi de *Cryptococcus neoformans* serait plus riche en composés lipidiques ; ce qui facilite le passage des principes actifs à travers cette paroi. Ces différentes raisons expliqueraient la plus grande sensibilité de *Cryptococcus neoformans* aux extraits de *T. superba*.

Outre l'extrait total aqueux de *T. superba*, un second extrait total hydroalcoolique (éthanolique) a été testé sur la croissance *in vitro* des espèces fongiques précitées.

1.2. Activité antifongique de l'extrait total hydroalcoolique

Toutes les espèces fongiques étudiées sont sensibles à l'extrait total hydroalcoolique. Les CMF sont comprises entre 48,75 µg/mL et 390 µg/mL. Cet extrait agit sur la croissance *in vitro* des espèces fongiques selon une relation dose-réponse. De plus, l'extrait total hydroalcoolique exerce une activité fongicide sur ces trois espèces.

Plusieurs auteurs ont testé des extraits végétaux hydroalcoolique sur la croissance *in vitro* de souches fongiques (**Duarte et al., 2005 ; Moussaid et al., 2012**). En référence à d'autres travaux antérieurs réalisés sur les mêmes souches avec les extraits totaux hydroalcoolique, l'activité de l'extrait total hydroalcoolique de *T. superba* est 2 fois plus forte que celle de l'extrait total hydroalcoolique de *T. catappa* déterminée par **Ackah et al. (2008)** sur *Aspergillus fumigatus*, 256 fois plus forte que celle de *Morinda morindoides* déterminée par **Bagre et al. (2006)** sur *Cryptococcus neoformans* et 277 fois plus forte que celle de *Microglossa pyrifolia* obtenue par **Zirihhi et al. (2003)** sur *Candida albicans*.

L'activité antifongique de l'extrait total hydroalcoolique est plus élevée que celle de l'extrait total aqueux cela montre que les principes actifs contenus dans cet extrait ont un plus grand potentiel antifongiques. En effet, les solvants de cet extrait ont la capacité à extraire les composés de nature lipidiques. En plus, le solvant de l'extrait total hydroalcoolique étant constitué de l'eau et de l'éthanol permet d'extraire que des composés lipidiques de faibles et moyennes tailles, polaires, renfermant un ou plusieurs atomes d'oxygène. Par contre, l'eau seul n'extrait que de faibles quantités de composés lipidiques, des sucres de grandes et moyennes tailles plus ou moins complexes. Cette différence de composition des deux extraits expliquerait la différence de l'activité antifongique des deux extraits totaux.

Par ailleurs, l'activité fongicide de l'extrait total hydroalcoolique de *T. superba* est similaire à celle obtenue par **Ouattara et al. (2008)** avec l'extrait total hydroalcoolique de *T. ivorensis* sur *Candida albicans* (CMF = 97,50 µg/mL).

L'activité de *T. superba* sur *Cryptococcus neoformans* (CMF = 48,75 µg/mL) est 164 fois plus actif que l'extrait total hydroalcoolique de *Mitracarpus scaber* (CMF = 8 000 µg/mL), travaux réalisés par **Guède-Guina et al. (1997)** sur la même souche de *Cryptococcus neoformans*.

De même, l'activité de l'extrait total hydroalcoolique de *T. superba* sur la croissance de *Aspergillus fumigatus* (CMF= 97,50 µg/mL) est 1025 fois plus actif que l'extrait total hydroalcoolique de *Mitracarpus villosus* (CMF = 100 000 µg/mL) et 512 fois plus actif que l'extrait hydroalcoolique de *Spermacoce verticillata* (CMF = 50 000 µg/mL), deux plantes étudiées par **Zirihi et al en 2007**.

Par ailleurs, l'activité antifongique (CMF = 97,50 µg/mL) de l'extrait total hydroalcoolique de *T. superba* est similaire à celle obtenue par **Ouattara et al. (2009)** (CMF = 97,50 µg/mL) avec l'extrait total hydroalcoolique de *Terminalia ivorensis* sur *Aspergillus fumigatus*.

Au vu des performances des extraits totaux et en référence aux CMF, l'extrait total hydroalcoolique est 4 fois plus actif que l'extrait total aqueux sur *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* et 2 fois plus actif que l'extrait total aqueux sur *Cryptococcus neoformans*. Cependant, les deux types d'extraits ont des niveaux d'activités classés dans la catégorie "activité forte". Ces résultats corroborent les études antérieures réalisées par d'autres auteurs (**Khan et al., 2002; Bonjar, 2004 ; Kloucek et al., 2005 ; Eldeen et al., 2006 ; Steenkamp et al., 2007 ; Magassouba et al., 2007**). En effet, ces auteurs ont révélé que les extraits des espèces telles que *Terminalia complanata* (**Khan et al., 2002**), *Terminalia chebula* (**Bonjar, 2004**), *Terminalia catappa* (**Kloucek et al., 2005**), *Terminalia sericea* (**Eldeen et al., 2006 ;**

Stenkamp et al., 2007), *Terminalia glaucescens* (**Magassouba et al., 2007**) ont non seulement de larges spectres antibactériens et antifongiques mais aussi leurs activités sont de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$. Toutes ces données confirment les vertus antimicrobiennes accordées à *T. superba* en médecine traditionnelle.

Le potentiel antifongique de l'extrait total hydroalcoolique est nettement élevé à celui de l'extrait total aqueux. Pour améliorer ce potentiel antifongique, d'autres extraits (bioguidés) issus de l'extrait total hydroalcoolique ont été évalué sur la croissance des souches fongiques.

1.3. Activité antifongique des extraits issus des partitions de l'extrait total hydroalcoolique

Les dix extraits issus de l'extrait total hydroalcoolique sont tous actifs sur toutes les espèces fongiques étudiées. Les CMF enregistrées sont plus faibles que celles de l'extrait brut et cela pour toutes les souches. *Cryptococcus neoformans* a été la souche la plus sensible à tous les extraits. Les CMF de cette souche sont comprises entre 97,50 et 12,39 $\mu\text{g/mL}$. *Aspergillus fumigatus* ($48,75 \leq \text{CMF} \leq 1560 \mu\text{g/mL}$) et *Candida albicans* ($48,75 \leq \text{CMF} \leq 780 \mu\text{g/mL}$) sont les souches les moins sensibles à ces extraits.

Les deux extraits $X_{1,2}$ et $X_{5,2}$ ont la même performance antifongique sur *Candida albicans* (48,75 $\mu\text{g/mL}$). Cependant sur l'ensemble des souches étudiées $X_{1,2}$ a les plus faibles CMF (*Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* : 48,75 $\mu\text{g/mL}$, *Cryptococcus neoformans* : 12,19 $\mu\text{g/mL}$). Par conséquent l'extrait $X_{1,2}$ a été le plus actif sur les souches fongiques.

La forte activité de l'extrait $X_{1,2}$ pourrait être liée à la purification de l'extrait total hydroalcoolique par l'hexane. L'hexane est reconnu pour ses capacités à extraire les composés lipidiques principalement les triglycérides et les insaponifiables. Au niveau chimique, l'hexane a été le solvant organique qui a permis un meilleur tri moléculaire permettant donc de débarrasser les principes actifs des masses importantes non actives rendant ainsi cet extrait plus accessibles aux cellules des souches fongiques. Il en est résulté aussi que les principes actifs sont plus concentrés dans l'extrait $X_{1,2}$.

Contrairement, l'extrait $X_{4,1}$ purifié avec le chloroforme a induit les plus fortes CMF (195 $\mu\text{g/mL}$ à 1560 $\mu\text{g/mL}$) sur toutes les espèces. Le chloroforme n'a donc pas permis une bonne extraction des principes actifs antifongiques contenus dans l'extrait total hydroalcoolique de *T. superba*.

Les résultats ont aussi révélé qu'au niveau de chaque pool de partition, les extraits issus des phases aqueuses sont 2 à 16 fois plus actifs que leurs équivalents issus des phases organiques

(Ackah *et al.*, 2008 ; Yayé *et al.*, 2012). En référence aux extraits totaux, l'extrait X_{1,2} est 2 fois plus actif que l'extrait total éthanolique et 8 fois plus actif que l'extrait total aqueux sur *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*. Il est aussi 4 fois plus actif que l'extrait total aqueux et 8 fois plus actif que l'extrait total hydroalcoolique sur *Cryptococcus neoformans*. L'activité antifongique des extraits totaux a été nettement améliorée.

Par ailleurs, les activités des différents extraits sont classées dans la catégorie "forte activité", (CMF inférieures à 1600 µg/mL) (Aligiannis *et al.*, 2001). Même la fraction X_{4,1}, (moins active des différentes fractions) a une CMF plus faible que celles des extraits hydroalcoolique de *Mitracarpus villosus* (CMF = 75 000 µg/mL) et de *Spermacoce verticillata* (CMF = 150 000 µg/mL) préparés par Zirihi *et al.* (2007). La comparaison des performances de X_{1,2} de *T. superba* à celles de l'extrait X_{1,2} de *Mitracarpus scarber* (CMF = 3125 µg/mL) testé par Kporou *et al.* (2010) a montré que l'extrait X_{1,2} de *T. superba* est 64 fois plus actif que ce dernier sur *Candida albicans*. Cela est certainement dû aux types de molécules qui constituent les principes actifs des deux extraits et la réaction de défense de *Candida albicans* vis-à-vis des molécules en présence.

L'activité antifongique de X_{1,2} a été améliorée, cependant, les CMF (48,75 µg/mL) enregistrées sont nettement supérieures aux CMF (24,38 µg/mL) enregistrées avec une partition similaire de *Terminalia ivorensis* (espèce voisine) de *T. superba* (Ouattara *et al.*, 2008). L'activité de l'extrait de *Terminalia ivorensis* est 2 fois plus élevée que celle de *T. superba*.

Pour optimiser l'activité antifongique, des fractions chromatographiées issues de l'extrait X_{1,2} ont été aussi évaluées sur les souches fongiques.

1.4. Activités antifongiques des fractions (G₁, G₂ et G₃)

Trois groupes d'extraits issus du fractionnement sur colonne ont fait l'objet des tests antifongiques. Il s'agit des extraits G₁, G₂ et G₃. Ces différents extraits ont une nette activité antifongique. Cependant, cette activité varie d'une fraction à l'autre et d'une souche fongique à une autre. *Cryptococcus neoformans* a été la souche la plus sensible aux trois fractions suivie de *Candida albicans* puis *Aspergillus fumigatus* qui en est l'espèce la moins sensible.

L'analyse de l'ensemble des données recueillies sur les trois fractions (G₁, G₂ et G₃), révèle que G₃ a les plus faibles CMF et CI₅₀ sur les souches fongiques. La fraction G₃ est 2 fois plus active que la fraction G₂ et 8 fois plus active que la fraction G₁ sur toutes les souches. La fraction G₃ est plus active que les deux autres et G₃ contiendrait plus de composés actifs notamment les composés antifongiques de *T. superba*. L'étude chromatographique a permis d'affiner la

recherche des composés antimicrobiens comme l'ont relevés certains auteurs (**Eldeen et al., 2006; Tabopda et al., 2008**). Ces auteurs ont montré que l'activité antimicrobienne se potentialise avec le grand affinement des composés issus de la chromatographie. Ces effets sont aussi observés dans cette étude. La chromatographie a permis de sélectionner et de concentrer les composés responsables de l'activité antifongique de *T. superba* dans la fraction G₃.

L'analyse comparative des CMF de l'extrait X_{1,2} et la fraction G₃ a montré que cette dernière est 4 fois plus active sur *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* et 2 fois plus active sur *Cryptococcus neoformans* que l'extrait X_{1,2}. De même, la fraction G₃ est 8 fois plus active que l'extrait total éthanolique sur toutes les espèces fongiques étudiées, 32 fois plus active sur *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* et 16 fois plus active sur *Cryptococcus neoformans* que l'extrait total aqueux. L'optimisation de l'activité antifongique de l'extrait total éthanolique est atteinte. La fraction G₃ est 8 fois plus active que l'extrait total éthanolique.

La chromatographie sur gel de sephadex LH20 a été donc un moyen efficace de concentration des molécules actives dans G₃ qui est la fraction la plus active. La technique de chromatographie sur gel de sephadex LH20 permet indirectement de se faire une idée de la taille des molécules présentes dans le groupe de fractions. Ainsi, G₁ contiendrait des molécules de grosses tailles à poids moléculaires élevés. G₂ contiendrait des molécules de taille moyenne à poids moléculaires moyens. G₃ contiendrait des molécules de petite taille et de faible poids moléculaire. Le diamètre des réticules étant de l'ordre de 25 à 100 µm, les molécules présentes dans G₃ ont des tailles qui tendent vers la limite inférieure de cet intervalle.

Les CMF obtenues avec la fraction G₃ sont très faibles (6 – 12 µg/mL). Les niveaux d'activités antifongiques de cette fraction pourraient être classés dans la catégorie « activité très forte ». Pour mieux apprécier, l'activité antifongique de la fraction G₃, l'activité de cette fraction a été comparée à celle du Ketoconazole. Le ketoconazole est un antifongique à large spectre très accessible et très vulgarisé en Afrique subsaharienne notamment en Côte d'Ivoire sur le marché des antifongiques de Côte d'Ivoire (**Doughari et Obidah, 2008**). L'activité de la fraction G₃ a été 8 fois plus élevée que celle du Ketoconazole sur *Aspergillus fumigatus* et *Cryptococcus neoformans* et 32 fois plus élevée sur *Candida albicans*.

En vue de connaître la composition des extraits ayant les plus fortes activités antifongiques, une étude triphytochimique a été réalisée sur les extraits : l'extrait total aqueux, l'extrait total éthanolique, l'extrait X_{1,2} et la fraction G₃.

2. Etude tri-phytochimique des extraits de *T. superba*

Les résultats de l'étude tri-phytochimique ont montré que le principe actif n'est ni des alcaloïdes, ni des tanins cathéchiques parce que d'emblée l'extrait total aqueux ne contient pas d'alcaloïdes et l'extrait total éthanolique aussi ne contient pas de tanins cathéchiques.

Les différences entre la composition chimique des extraits totaux, l'extrait X_{1,2} et la fraction G₃ expliqueraient probablement les différences observées au niveau de leurs activités antifongiques (**Baba-Moussa *et al.*, 1999**). Les principes actifs sont très certainement de nature polyphénolique ou flavonoïde ou terpénoïde. Les résultats ont montré aussi qu'en passant de l'extrait total aqueux à l'extrait G₃ via l'extrait X_{1,2}, la teneur en polyphénols a régulièrement augmenté pour atteindre sa plus forte teneur dans les extraits X_{1,2} et G₃. Le fait que G₃ soit la fraction la plus active sur les souches fongiques et qu'elle ne contient que des polyphénols. La fraction G₃ serait constituée de polyphénols. En effet, selon **Cowan, 1999**, les composés polyphénoliques possèdent effectivement une activité antimicrobienne dont les mécanismes peuvent être expliqués selon trois axes. Les polyphénols oxydés provoquent une inhibition de certaines enzymes de la cellule et cela entraîne la mort. Les groupes sulfuryles sont des analogues de substrats. Lorsque les substrats des groupes sulfuryles sont utilisés, ils bloquent les réactions métaboliques essentielles à la survie des cellules fongiques et les cellules fongiques meurent.

Par ailleurs, l'analyse des compositions phytochimiques des fractions et extraits actifs a révélé la présence des molécules telles que les alcaloïdes (présent uniquement dans extrait total éthanolique), les terpènes (présents que dans l'extrait total hydroalcoolique et l'extrait total aqueux) et les tanins cathéchiques (uniquement dans l'extrait total aqueux). Ces molécules constitueraient des poids morts dans les extraits et augmenterait ainsi les CMF. L'activité observée pourrait être donc due aux saponines, flavonoïdes et autres polyphénols.

La fraction G₃ étant composée uniquement d'autres polyphénols alors que les principaux composés actifs ayant des propriétés antifongiques seraient de type polyphénolique.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature concernant l'activité antimicrobienne et antifongique des saponines (**Iwu *et al.*, 1999 ; Ionela et Ion, 2007**), des flavonoïdes (**Fyhrquist *et al.*, 2002**) et des polyphénols (**Burapadaja et Bunchoo, 1995 ; Cimanga *et al.*, 2006 ; Semwal *et al.*, 2009 ; Gidwani *et al.*, 2010 ; Singh *et al.*, 2012**). Les flavonoïdes, des polyphénols et des saponosides sont capables de complexer les protéines extracellulaires. Cela expliquerait leurs propriétés antimicrobiennes notamment leurs propriétés antifongiques. Particulièrement, les composés polyphénols sont connus pour leurs propriétés

antimicrobiennes. Les composés polyphénols provoquent la toxicité des micro-organismes et dans certains cas, ils inhibent leur croissance (**Brantner et al., 1996**). Ils agissent également en inhibant et en interagissant avec les enzymes microbiennes (**Mason et Wasserman, 1987**). Ces composés sont solubles à la membrane cellulaire mais aussi sont capables de rompre les membranes microbiennes entraînant la mort de la cellule. D'ailleurs, **Lambert et al. (2001)** ont montré que les composés phénoliques provoquent une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique qui entraîne une modification de pH et une libération des ions organiques. Cette modification de pH et la libération des ions organiques ont pour conséquence, d'une part, une altération de la membrane qui provoque la mort de la cellule. Elles peuvent entraîner d'autre part, la perturbation du contrôle chimio-osmotique qui est à l'origine de la mort cellulaire (**Cox et al., 2001**).

Pour confirmer la structure polyphénolique du principal principe actif, la fraction G₃ a fait l'objet de recristallisation puis d'analyse chromatographique. A l'issue de ces analyses chromatographiques, deux composés de poids moléculaires différents ont été obtenus. Il s'agit de deux composés dérivés de l'acide éllagique de poids moléculaire (PM) d'environ 330 daltons pour l'un et de 316 daltons pour l'autre. Dans la littérature, les dérivés de l'acide éllagique sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes (**Brunner et al., 2000 ; Basile et al., 2000 ; Thiem et Goslinska, 2004**). Cette étude confirme aussi l'activité antimicrobienne des dérivés de l'acide éllagique contenus dans la fraction G₃ de *Terminalia superba*. Cette activité des dérivés de l'acide éllagique de la fraction G₃ de *T. superba* est une activité antifongique.

V. CONCLUSION ET PRESPECTIVES

L'objectif de cette étude était non seulement de valoriser les plantes médicinales de la pharmacopée africaine, mais aussi, de rechercher de nouvelles molécules d'origine naturelle pouvant servir de médicaments.

La plante utilisée dans cette étude *Terminalia superba* est une espèce à laquelle on accorde des vertus anti-infectieuses en milieu traditionnel. Les résultats obtenus au cours de cette étude confirment le bien-fondé de cette assertion. Ces investigations ont permis de comprendre que:

- les trois espèces fongiques étudiées sont sensibles aux extraits de *T. superba* selon une relation dose-effet ;
- tous les extraits testés (extraits totaux, extraits issus de partitions et les groupes de fractions) ont une activité antifongique effective sur la croissance *in vitro* des trois espèces étudiées ;
- *Cryptococcus neoformans* apparaît comme étant l'espèce fongique la plus sensible à tous les extraits de *Terminalia superba* contrairement à *Aspergillus fumigatus* qui reste l'espèce fongique la moins sensible à ces extraits ;
- au niveau des extraits totaux, l'extrait total hydroalcoolique est 2 à 4 fois plus actif que l'extrait total aqueux;
- X_{1,2} est l'extrait le plus actif parmi les dix fractions obtenues après partition de l'extrait total éthanolique et son activité antifongique est 4 fois plus élevée que celle de l'extrait total hydroalcoolique;
- G₃, un des trois groupes de fractions issues de la chromatographie de X_{1,2}, est l'extrait possédant le potentiel antifongique le plus élevé. Il est surtout 4 fois plus actif que X_{1,2} et 8 fois plus actif que l'extrait total éthanolique, l'extrait de base. Enfin, il est 32 fois plus actif que l'extrait total aqueux et le Ketoconazole ;
- la combinaison d'analyse phytochimique, d'analyse chromatographique et d'analyse spectrale de masse a montré que G₃ est constitué de deux molécules dérivées de l'acide éllagique.

En perspective, il serait souhaitable d'approfondir cette étude dans le sens de l'évaluation de l'activité antifongique des deux dérivés d'acide éllagique de *Terminalia superba*. Il faudrait aussi initier des études permettant d'évaluer la toxicité Biotolérance des composés issus de G₃ ainsi que son mécanisme d'action sur les champignons. Enfin, réaliser des études *in vivo* pour éventuellement envisager la mise sur pied d'un médicament.

IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABI-SAID D., ANAISSIE E., UZUN O., RAAD I., PINZCOWSKI H. ET VARTIVARIAN S., 1997.** The epidemiology of hematogenous *Candidiasis* by different *Candida* species. *Clin Infect Dis*, **24**: 1122 – 1128.
- ACKAH J.A.A.B., KRA A.K.M., ZIRIHI G.N ET GUEDE-GUINA F., 2008.** Evaluation et essais d'optimisation de l'activité anticandidosique de *Terminalia catappa* Linn (TEKAM₃) un extrait de *Combretaceae* de la pharmacopée Ivoirienne. *Bull Soc Roy Sci*, **77**: 120 - 136.
- ADEGOKE A A.1 ET ADEBAYO-TAYO B., 2009.** Antibacterial activity and phytochemical analysis of leaf extracts of *Lasienthera africanum*. *Afr J Biotec* **8** . 077-80.
- ADESHINA G. O., KUNLE O. F., ONAOLAPO J. A., EHINMIDU J. O. ET ODAMA L. E., 2012.** Phytochemical and antibacterial studies of hexane extract of *Alchornea cordifolia* Leaf, Phytochemicals as nutraceuticals global approaches to their role in nutrition and health, Dr Venketeswar Rao (Ed.), ISBN : 978-953-51-0203-8, 278 p.
- AJANOHOON E.J., AKE ASSI E., FLORET, T., GUINKO S., KOUMARE M., AHYI A.M.R. ET RAYNAL J., 1980.** Médecine traditionnelle et Pharmacopée, contribution aux études ethnobotaniques et floristique du Mali 64–65.
- ADJANOHOON E., AKE-ASSI L., AHMED A., EYMÊ J., GUINKO S., KAYONGA A., KEITA A. ET LEBRAS M., 1982.** Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques aux Comores. A.C.C.T, Paris, France. 216 p.
- ADJANOHOON E., AKE ASSI L., CHIBON P., DE VECCHY H., DUBOZE E., EYMÊ J., GASSITA J. N., GUINKO S., MENGOME E., NGUÊMA M. G., OLLOME J. B., POSP S. O. ET SITA P., 1984.** Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Gabon. A.C.C.T, Paris, France. 294 p.
- ADJANOHOON J.E., ABOUBAKAR N., DRAMANE K., EBOT M.E., EKPERE J.A., ENOW-OROCK E.G., FOCHO D., GBILE Z.E., KAMANYI A., KAMSU KOM J., KEITA, A., MBENKUM T., MBI C.N., MBIELE, A.L., MBOME I.L., MIBURU N.K., NANCY W.L., NKONGMENECK B., SATABIE B., SOFOWARA A., TAMZE V. ET WIRMUM C.K., 1996.** Traditional Medicine and Pharmacopoeia: Contribution to Ethno pharmacological and Floristic Studies in Cameroon. OAU/STRC, Lagos. 133 p.

- AGOUMI A., EI-MELLOUKI W., CHABAA L., TLIGUI H., BELMEKKI A., LOUZI L., LIMIMOUNI B. ET BENJELLOUN L., 2000.** Etude de la prévalence des infections fongiques systémiques dans les services hospitaliers à risque. *Esp Med*, **7**:1 – 6.
- AHON G.M., AKAPO-AKUE M.J., KRA A.M., ACKAH B.J., ZIRIHI G.N. ET DJAMAN A.J., 2011.** Antifungal activity of the aqueous and hydro alcoholic extracts of *Terminalia superba* (Engl & Diels) on the *in vitro* growth of clinical isolates of pathogenic fungi. *Agric Biol J N Am*, **2**: 250-257.
- AHON G.M., KRA A.K.M., AW S., ZIRIHI G.N., ACKAH B.A.A.J., SIAKA S., KPOROU K.E., AKAKPO-AKUE M.J ET DJAMAN AJ., 2012.** Improvement of the antifungal activity of the hydro-alcoholic extract of *Terminalia superba* on the *in vitro* growth of three pathogenic fungi. *Int. J Biol. Phar. Allied. Sci*, **10**: 1434-1442.
- AJELLO L., GEORG L. K., KAPLAN W. ET KAUFMAN L., 1963.** Laboratory manual for Medical Mycology. 2nd Ed. John Wiley and sons, New York, USA. 158 p.
- AKE-ASSI L., ABEYE J., GUINKO S., GIGUET R. ET BANGAVOU X., 1980.** Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Centrafricaine. ACCT, Paris, France. 139 p.
- AKE-ASSI L., 1984.** Flore de la Côte d'Ivoire: Etude descriptive et biogéographique avec quelques notes ethnobotaniques. Thèse Faculté des Sciences, 3 Tomes, 6 volumes, Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire. 1206 p.
- AKE-ASSI L., 2001.** Flore de la Côte d'Ivoire : Catalogue systématique, biogéographie et écologie. *Boissiera*, **57**: 146 – 200.
- ALLAIN, P. 2000.** Pharmacorama - Connaissance du médicament [archive], (site), consulté le 10 novembre 2009.
- ANONYME 1., 1978.** www.parc.national.de-tai.org/fr/ arbre fr.htm
- ANONYME 2., 2000.** Les plantes au centre Mampuya. Arbonnier-CIRAD MNHN, 2000.
- ANONYME 3 (vie et écologie), 2008.** Les principes actifs des plantes médicinales. <http://www.medecinesnaturelles.com/index>. Consulté le 26 Février 2007

ALIGIANNIS N., KALPOTZAKIS E., MITAKU S. ET CHINOUE I.B., 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem*, **40**, 4168–4170.

ASHAFA A. O. T. ET UMEBESE C., 2012. Phytochemical screening, antibacterial and antifungal activity of *Garuleum woodii* schinz. Root extracts against human pathogenic microbes. *J Med Plant Res*, **42**: 5513-5518.

ASSAM ASSAM J. P., DZOYEM J. P., PIEME C. A. ET PENLAP V. B., 2010. *In vitro* antibacterial activity and acute toxicity studies of aqueous-methanol extract of *Sida rhombifolia* Linn. (Malvaceae). *BMC Compl Altern Med*, 10 : 40.

ATTA-UR-RAHMAN., SEEMA ZAREEN., IQBAL CHOUDHARY M., NGOUNOU F. N., AMSHA YASIN ET MASOOD PARVEZ., 2002. Terminalin A, a novel triterpenoids from *Terminalia glaucescens* *Tetrahedron Lett*, **43**: 6233-6236.

AUBRÉVILLE A., 1959. Flore forestière de la Côte d'Ivoire. 2^{ème} Ed. CTFT, Nogent- Sur-Marne, France. I, 372 p., II, 343 p, III, 335 p.

AUDU S. A., MOHAMED I. ET KAITA H. A., 2007. Phytochemical screening of the leaves of *Lophira lanceolata* (Ochanaceae). *Lif Sci J*. 4(4) : 75-79.

BABA-MOUSSA-MOUSSA F., AKPAGANA K ET BOUCHET P., 1999. Activités antifongiques de sept *Combretaceae* africain occidental utilisé dans la médecine traditionnelle. *J Ethnopharmacol*, **66**, 335-338.

BADILLET G., DE BIEVRE C. ET GUEHO E., 1987. Champignons contaminants des cultures : champignons opportunistes. Ed. Varia, Amsterdam, Hollande..I, 132 p, II, 216 p.

BADILLET G., 1991. Dermatophyties et dermatophytes. 3^{ème} Ed. Varia, Amsterdam, Hollande. 303 p.

BAGRE I., BAHU C., MEITE S., DJAMAN A.J., ET GUEDE-GUINA F., 2006. Evaluation et amélioration *in vitro* de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* (BAKER) Milne-redhead (Rubiaceae) sur *Cryptococcus neoformans*, un champignon responsable de mycose humaine. *J Sci. pharm Bio*, **7** :37-46.

BARAN R.; HANECKE H. ET RICHERT B., 2001. Pincernails: Definition and Surgical Treatment. *Dermatol Surg*, **27**: 261 – 266.

BARRON M.A. ET MADINGER N.E., 2008: "Opportunistic Fungal Infections, Part 3: Cryptococcosis, Histoplasmosis, Coccidioidomycosis, and Emerging Mould Infections". Infect Med. www.consultantlive.com/infection/article/1145625/14043671 p

BARTLETT J. G., 2010. *Cryptococcus neoformans*. In Bartlett J. G., Auwaeter P.G., Pham P.A. (eds). The Johns Hopkins ABX guide: diagnosis and treatment of infectious diseases. 2nd ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, LLC, 360-361 p.

West African Combretaceae used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol* **66** 335–338.

BASILE A., SORBO S., GIORDANO S., RICCIARDI L., FERRARA S., MONTESANO D., COBIANCHI R.C., VUOTTO M.L ET FERRARA L., 2000. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia* **71**, 110–116.

BÉKONDI C., BERNEDE C., PASSONE N., MINSSART P., KAMALO C., MBOLIDI D. ET GERMANI Y., 2006. Primary and opportunistic pathogens associated with meningitis in adults in Bangui, Central African Republic, in relation to human immunodeficiency virus serostatus, **10**: 387-95.

BEKRO Y-A., BEKRO J. A. M., BOUA-BI B., TRA-BI F. ET EHILE E. E., 2007. Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sci Nat*, **2** : 217-225.

BENNET R.J ET JOHNSON A.D., 2003. Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *Emb J*, **22**: 2505-2515.

BERCHES P., GAILLARD J. L. ET SIMONET M., 1989. Bactériologie, les bactéries des infections humaines. Ed. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, France. 385 p.

BERHAUT J., 1967. Flore du Sénégal. 2^{ème} Ed. Clairafrique, Dakar, Sénégal, 485 p.

BICANIC T., WOOD R., MEINTJES G., REBE K., BROUWER A ET AL., 2008. High-dose amphotericin B with flucytosine for the treatment of cryptococcal meningitis in HIV-infected patients: a randomized trial. *Clin Infect Dis*, **47**: 123–130.

BOGNON G., 1991. Notes ethnobotaniques sur la médecine traditionnelle en pays Wé (Côte d'Ivoire). Quelques problèmes méthodologiques. *Rev Med Pharma Afr*, **5** : 55 – 67.

- BONGA G. M.; VANGAH-MANDA M.; DE SOUZA C. ET GUEDE- GUINA F., 1996.** Mise en évidence de phytostéroïdes antifongiques contre *Cryptococcus neoformans*. *Rev Med Pharma Afr*, **9** : 21 – 28.
- BONJAR, S.G.H., 2004.**Antibacterial screening of plants used in Iranian folkoric medicine. *Fitoterapia*, **78**: 231–235.
- BORDAIS P ET BOURRAT E., 1999.** Candidose de l'enfant : Ce qu'il faut savoir sur les stomatites érythémateuses de l'enfant.Quotidien du Médecin, Hôpital Robert-Debré Paris, France.N° 6422 du 27 janvier 1999.<http://www.quotimed.com>. Consulté le 20 Avril 2006.
- BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GUY P. H., LARPENT J. P., REYMOND P., SANGLIER J., VASYSSIER Y. ET VEAU P., 1990.** Moisissures utiles et nuisibles. 2^{ème} Ed. Masson, Paris, France. 250 p.
- BOUCHET P., REGIS P., CRUGNARD J. L. ET MADULO-LEBLOND G., 1989.** Mycologie générale et médicale. Ed. Masson, Paris, France. 180 p.
- BOUCHET P., GUIGNARD J. L ET VILLARD J., 1999.** Les champignons : mycologie fondamentale et appliquée. Ed Masson, Paris, France. 208 p.
- BOUCHET P., GUIGNARD J.L., POUCHUS Y.F ET VILLARD J., 2005.** Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. Ed. Masson. 2^{ème} édition Paris, France. 191 p.
- BOVERS M., HAGEN F., KURAMAE E.E., HOOGVELD H.L ET DROMER F., 2008.** AIDS Patient Death Caused By Novel *Cryptococcus neoformans* X *C. Gattii* Hybrid. *Emerg Infect Dis*, **14**: 1105-1108.
- BOWMAN W. C. ET RAND M. J., 1980.** "Textbook of pharmacology". Sd Editions. blackwell scientfic publication . 1- 36.
- BURAPADAJA S. ET BUNCHOO A., 1995.** Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrina* *Planta Medica*, **61**: 365–366.
- BURKILL H. M., 1985.** The useful plants of West Tropical Africa.2nd Ed. Royal Botanic.Garden Kew, Ibadan, Nigeria.565 p.
- BRUNNER G., BURGER U., CASTIONI P., KAPETANIDIS I ET CHRISTEN P., 2000.** A novel acylated flavonol glycoside isolated from *Brunfelsia grandiflora* ssp. *grandiflora*.

Structure elucidation by gradient accelerated NMR spectroscopy at 14T. *Phytochemical Analysis* **11**, 29–33.

CADET DE FONTANAYG., LAVIELLE B., LINAS M. D ET SEGUELA J. P., 1996. Comparaison statistique de deux méthodes d'évaluation de l'activité antifongique. *J Mycol Med*, **6**: 129-132.

CHAAIB-KOURI. F., 2004. Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) (*Rutaceae*). Thèse de Doctorat en pharmacie. Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, Suisse. 211 p.

CHABASSE D., 1994. Les nouveaux champignons opportunistes apparus en médecine. *J Mycol Med*, **4** : 9 – 28.

CHABASSE D., GUIGUEN C. ET CONTET A., 1999. Mycologie médicale. Ed. Masson, Paris, France. 324 p.

CHENEI J. ET AKE-ASSI., 1987. Les Plantes Médicinales Tropicales et Ivoiriennes. Ed. Daremi, Tome II Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire. 106 p.

CHENG M.F., CHIOU C.C., LIU Y.C., WANG H. Z. ET HSIEH K.S., 2001. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. *J Clin Microbiol*, **39**: 1608-1611.

CHOUVALOVA E., 1984. Les maladies tropicales. Ed. Mir-Moscou, Russie. 194 p.

CIMANGA K., KAMBU K., TONA L., HERMANS N., APERS S., TOTTE J., PIETERS L. ET VLIETINCK A.J., 2006. Cytotoxicity and in vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents. *J Ethnopharmacol*, **107**: 83-90.

COOPER K. E., 1955. "Theory of antibiotic inhibition zones in agar media." *Nature* **176**: 510-511.

COUPRIE B., MACAIGNE F. ET LEAUTE A. G., 1992. Traité de mycologie médicale. Ed. DOINS, Bordeaux, France. 148 p.

CORBASSON, M ET SOUVANNAVONG O., 1986. *Terminalia superba* Engl & Diels
Recherches engagées concernant la biologie, la physiologie et l'amélioration génétique des arbres forestiers. *Revue forestière Française* **38**. Limba. 184 p.

- COWAN M. M., 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, **12**: 564 – 582.
- COX S.D., MANN C.M., MARKHAM J.L., GUSTAFSON J.E., WARMINGTON J.R. ET WYLLIE S.G., 2001.** Determining the antimicrobial actions of Tea tree oil. *Molecules* **6**: 87-91.
- CROMBERG S., BEYLOUT J. ET RAY M., 1988.** Maladies infectieuses. Ed. Masson, Paris, France. 625 p.
- DEL PALACIO A., VILLAR J ET ALHAMBRA A., 2009.** Epidemiology of invasive candidiasis in pediatric and adult populations. *Rev Iberoam Micol* **26**: 2-7.
- DEVELOUX M., DIENG M.T., KANE A. ET NDIAYE B., 2003.** Prise en charge des mycétomes en Afrique de l'ouest. *Bull Soc Path Exot*, **9**: 376-382.
- DEVELOUX M. ET BRETAGNE S., 2005.** Candidoses et levures diverses. *Elsevier Masson Consulte*, Paris France, 8-062-A-10, 5 p.
- DEWANJEE S., KUNDU M., MAITI A., MAJUMDAR R., MAJUMDAR A. ET MANDAL S. C., 2007.** *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of crude extract from plants *Diospyros peregrine*, *Coccinia grandis* and *Swietenia macrophylla*. *Trop J Pharm Research*. **3** : 773-778.
- DIALLO D ET SANOGO R., 2005.** Rapport de l'atelier sur les technologies de culture, de récoltes et de transformation des plantes médicinales et aromatiques dans les pays en développement. 25 - 29 Juillet, Bamako, Mali. 27 p.
- DIAMOND R. D., 1991.** The growing problem of mycoses in patients infected with the Human Immunodeficiency Virus. *Rev Infect Dis*; **13** : 480-486.
- DIEHL M.S., KAMANZI ATINDEHOU K., TERE H ET BETSCHART B., 2004.** Prospect for antihelminthic plants in the Ivory Coast using ethnobotanical criteria. *J Ethnopharmacol*, **95**, 277–284.
- DIENG Y., FAYE-NIANG M. A., NDOUR-DIOP A., SOW P.S, DIENG T., SOUMARE M., BAH I. B., FAYE O., DIOP B.M., GAYE O., NDIR O ET DIALLO S., 2005.** Sensibilité aux antifongiques des souches de *Candida* responsables de candidoses oropharyngées chez des sujets vivant avec le VIH. *Sidanet*, **2** : 835 – 838.

- DIMO T., LAURENT F., RAKOTONIRINA S.V., TAN P.V., KAMTCHOUING P., DONGO E. ET CROS G., 2006.** Methanol extract of *Terminalia superba* induces endothelium-independent relaxation of rat thoracic aorta. *Pharmazie*, **61**: 470–473.
- DONGMO A.B., BEPPE J.G., NOLE T. ET KAMANYI A., 2006.** Analgesic activities of the stem bark extract of *Terminalia superba* Engl & Diels (Combretaceae). *Pharmacologyonline*, **2**: 171-177.
- DOUGHARI J.H ET OBIDAH J.S.,2008.** In vitro antifungal activity of stem bark extracts of *Leptademia lancifolia*. *Intern J Integ Biol*; **3** 2 -12.
- DROMER F. ET DUPONT B.,1996.** The increasing problem of fungal infections in the immunocompromised host. *J. Mycol. Med*, **6**: 1 – 6.
- DUARTE M. C. T., FIGUEIRA G.M., SARTORATTO A., REHDER V. U. G, CAMILA ET DELARMELINA C., 2005.** Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants *J Ethnopharmacol* **97**: 305–311.
- DUPONT B., 1987.** Mycoses et SIDA. Résumé des rapports, communications affichées. Institut Pasteur, Paris, France. 10 p.
- DUPONT B., 1992.** Les candidoses. *lett infect*, **3**: 20 – 28.
- DUPONT B., DROMER F. ET IMPROVISI L., 1996.** The probleme of azole resistance in *Candida*. *J Mycol Med*, **6**: 12 – 19.
- DUPONT B., IMPROVISI L. ET DROMER I., 1997.** Facteurs d'échec clinique du traitement des candidoses oropharyngées au cours du SIDA. *lett infect*, **8** : 23 – 30.
- DUPONT B., 2002.** Maladies infectieuses. *ElsevierMasson Consulte*, Paris, France, 8-607-A-15.5 p.
- ELDEEN I.M S., ELGORASHI E.E., MULHOLLAND A.D. ET STADEN V.J. 2006.** Anolignan B: A bioactive compound from the roots of *Terminalia sericea*. *J Ethnopharmacol*, **103**:135–138.
- EI-EBIARY M., TORRES A., FABREGAS N., De La BELLACASA J. P., GONZALEZ J. ET RAMIREZ J., 1997.** Significance of the isolation of *Candida* species from respiratory samples in critically ill, non-neutropenic patients.An immediate post mortem histologic study. *Am J Resp infect*; **156**: 583 – 590.

- ELUJOBA A. A., ODELEYE O. M. ET OGUNYEMI C. M., 2005.** Traditional medicine development for medical and dental primary health care delivery system in Africa. *AJTCAM* **2**: 46 - 61.
- FEUILHADE DE CHAUVIN M., 1998.** Mycoses métropolitaines. *Elsevier Masson Consulte*, Paris, France, 12-320-A-10. 5 p.
- FIDEL P.L, JR., 2005.** Immunity in vaginal candidiasis. *Curr Opin Infect Dis* **18**: 107-111.
- FRIBERG N., 2004.** Candidoses systémiques et techniques d'antifongogrammes. *Biochimie magazine*, **16** : 32 – 35.
- FYHRQUIST P., MWASUMBI L., HAEGGSTROM C.A., VUORELA H., HILTUNEN R. ET VUORELA P., 2002.** Ethnobotanical et recherche antimicrobienne sur quelques espèces de Terminalia et de Combretum (*Combretaceae*) accroissant dans Tanzania. *J Ethnopharmacol*, **79** : 169-177.
- GARCIA-AGUDO R ET GARCIA-MARTOS P., 2009.** Clinical and microbiological aspects of fungal peritonitis in peritoneal dialysis. *Nefrologia* **29**: 506-517 .
- GARCIA G ET HUMBERT M., 2004:** Traitement de l'Aspergillose (ABPA). *Rev fr d'Allergol*, **44**: 89-91
- GAUTHAMAN K., MAULIK M., KUMARI R., MANCHANDA S.C., DINDA A.K. ET MAULIK S.K., 2001.** Effect of chronic treatment with bark of *Terminalia arjuna*: a study on the isolated ischemic-reperfused rat heart. *J Ethnopharmacol*, **75**: 197–201.
- GENTILINI M., CAUMES E., DANIS M., MOUCHET J., DUFLO B., LAGARDIERE B., DOMINIQUE R. L. ET BRUCKER G., 1993.** Médecine tropicale. Ed. Flammarion Médecine Sciences, Paris, France. 928 p.
- GUEDE- GUINA F., VANGAH-MANDA M., BONGA G. M. ET DE SOUZA C., 1996.** Activité antimicrobienne d'un extrait végétal contre les germes opportunistes au cours du SIDA. *Rev Med Pharm Afr*, **9** : 13 – 19.
- GUEDE-GUINA F., KRA A. K. M., VANGAH-MANDA M., BONGA G. M. ET DE SOUZA C., 1997.** Inhibition par MISCA-F₂ de la croissance de *Aspergillus fumigatus*; *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*, 3 germes fongiques opportunistes du SIDA. *J Afr Biomed*, **2**: 11 - 16.

GIDWANI B., ALASPURE R. N. AND DURAGKAR N. J., 2010. Anti-inflammatory and antimicrobial activity of hexane extract of seed of *Psoralea corylifolia* Linn. *Inter J Pharm Res Develop*, **9**: 129-137.

HENKE H., 1995. Preparative gel chromatography on sephadex LH-20., in: Chromatography methods (HEIDELBERG & HUTHIG), 3rd Ed Blackwell, Oxford, England. 125 - 205 p.

HOLT R. J., 1975. Laboratory test of antifungal drugs. *J Clin Path*, **18**: 767 – 774.

HOSTETTMAN K. ET POTTERAT O., 1995. Plant sources of natural drugs and compounds. *Encyclo environ Biol* **3**: 139 – 153.

IDNURM A., YONG-SUN BAHN., KIRSTEN NIELSEN., XIAORONG LIN., JAMES A. FRASER ET JOSEPH HEITMAN., 2005. Deciphering the Model Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *Rev Microbiol*, **3**: 753-764.

IONELA C.D. ET ION B.I., 2007. Plant products as antimicrobial agents. *Analele Științifice ale Universității Alexandru Ioan Cuza*’ Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară VIII: 151-156.

IWU, M.M., DUNCAN, R.A. ET OKUNJI O.C., 1999. New antimicrobials of plant origin. Reprinted from: perspectives on new crops and new uses. J. Janick (ed.), ASHS Press, Alexandria, VA. 457- 462.

JEPSON R.G ET CRAIG J.C., 2007. A systematic review of the evidence for cranberries and blueberries in UTI prevention, [archive] *Mol Nutr Fd Res*, **51**, 738-745.

JOFFIN J. N., 2003. Cours de mycologie. 1^{ère} année BTS ABM, Lycée Paul Eluard St Denis, France. 109 p.

KAMTCHOUING P., KAHPUI S.M., DJOMEN DZEUFLET P.D., T’EDONG L., ASONGALEM E.A. ET DIMO T., 2006. Anti-diabetic activity of methanol/methylene chloride stem bark extracts of *Terminalia superba* and *Canarium schweinfurthii* on streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, **104**: 306–309.

KAUFFMAN C.A., 2007. Cryptococcosis. In: Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Medicine. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier: chap 357.

KETANI A., BELKHADIR Z. H., MOSADIK A., FAROUDY M., ABABOU A. ET LAZREQ C., 2006. Traitement antifongique des candidoses systémiques en réanimation. *J Mycol Med*, **16**: 16 - 25.

KERNBAUM S., 1985. Eléments de pathologie infectieuse. 3^{ème} édition. Chap XII, Villebranne, Paris. Specia, 201-202.

KHAN M.R., KIHARA M., A.D ET OMOLOSO A.D., 2002. Antimicrobial activity of *Terminalia complanata* and *Flacourtia zippelii* Fitoterapia: **73** 737–740.

KING J. W., ET DASGUPTA A., 2007."Cryptococcosis". *eMedicine*. www.emedicine.medscape.com/article/215354-overview

KING J. ET MEREDITH L. DE WITT, 2009."Cryptococcosis." *Medicine.com*. Oct. 30, 2009. www.emedicine.medscape.com/article/215354-overview.

KING R. D., LEE J. C. AND MORIS A. L., 1980. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infect Immunol*, **27**: 667 – 674.

KLOUCEK P., POLESNY Z., SVOBODOVA B., VLKOVA E. ET KOKOSKA L., 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Caller'ia District. *J Ethnopharmacol*, **99**: 309–312.

KOENIG H., 1995. Guide de mycologie médicale. Ed. Ellipses, Paris, France. 284 p.

KOUAKOU A. V., N'GUESSAN J. D., KRA A. K. M. ET GUEDE-GUINA F. 2007. Activité antifongique et screening phytochimique de THOS (extrait aqueux de *Thonningia sanguinea*). *Rev Med Pharm Afr*, **20** : 45 – 52.

KOUASSI C.K., KOFFI-NEVRY R., LOUKOU Y.G., NANGA. Y.Z., KOUSSEMON M., KABLAN T ET KOUASSI K.A., 2012. Profiles of bioactive compounds of some pepper fruit (*Capsicum L.*) varieties grown in Côte d'Ivoire. *In R F Biotech* **11**: 23-31

KOUDOUGOU K., 2004. Etude de l'activité antipyrétique du phytomédicament FACA en comparaison avec celle de ses composantes : *Fagara zanthoxyloïdes* Lam. (Rutaceae) et *Calotropis pocera* Ait. (Asclepiadaceae). Thèse de Doctorat en pharmacie, UFR/SDS, Université de Ouagadougou, Burkina Faso. 80 p.

KPOROU K.E., KRA A.K.M., OUATTARA S., GUEDE-GUINA. ET DJAMAN A.J., 2010. Amélioration par fractionnement chromatographique de l'activité anticandidosique d'un

extrait hexanique de *Mitracarpus scaber* Zucc sur la croissance *invitro* de *Candida albicans* et *Candida tropicalis*. *Phytotheurapie*, **8** : 290-294.

KRA A. K. M., 2001. Evaluation et amélioration par séquençage chromatographique d'une action antifongique de MISCA contre *Aspergillus fumigatus*. Thèse de Doctorat 3^e cycle. UFR Biosciences, Université de Cocody, Côte d'Ivoire. 126 p.

KRA A. K. M., ZIRIHI G. N. ET GUEDE-GUINA F., 2003. Evaluation et comparaison des activités antifongiques de *Fagara macrophylla* et de *Strychnospinosa* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Rev Afr Biomed*, **4**: 17 – 22.

KUETE V., TAPBODA T.K., NGAMENI B., NANA F., TSHIKALANGE T.E. ET NGADJUI B.T., 2010. Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of *Terminalia superba* (*Combretaceae*) South African. *J Botany*, **76**: 125–131.

KULLBERG B.J., 1997. Trends in immunotherapy of fungus infections. *European J. Clin Microbiol. Infect. Dis*, **16** : 51–55.

LAFONT R., 2005. Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules. Biologie et Multimédia, Université Pierre et Marie Curie, UFR de Biologie, France. 39 p.

LAGNIKA L., 2005. Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de Doctorat en pharmacie, Université Louis Pasteur de Strasbourg/Université d'Abomey-calavi, Bénin. 268 p.

LAMBERT R.J., SKANDAMIS P.N., COOTE P.J. ET NYCHAS G.J., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of *Oregano* essential oil, thymol and carvacrol. *J Applied Microbiol* **91**: 453-62.

LARREGUE M., 1980. Dermatologie-Vénérologie. Cahier de l'infirmière. 2^{ème} Ed. Masson, Paris, France. 135 p.

LAURENT F., SAPIN V., VINCENT M.C. ET CAMPAGNI P. H., 1992. Les aspergilloses. Lyon Pharmaceutique, **43** : 339-349.

LAVERDIÈRE, M., 2006. Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. *J Antimicrob Chemother*, **57**: 705-708

LEBEAU R., 1995. Les candidoses cutanées, muqueuses et profondes. Corpus médical de la Faculté de Médecine de Grenoble, 2ème cycle médical, Université Joseph Fourier, France.
<http://www-sante.ujf-grenoble.fr/sante/corpmcd/Corpus/corpus/question/infc153.htm>. Consulté le 21 Mai 2008.

LECLERCQ R. ET SUEUR T., 1969. Les professions médicales et sociales. Edition Foucher, Vannes, France. 616 p.

LEE K., BUCKIEY H. R ET CAMPBELL H. R., 1975. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, **13**: 148 – 153.

LEITE A.G., VIDAL J.E., BONASSER FILHO F., NOGUEIRA R.S ET OLIVEIRA A.C., 2004. Cerebral infarction related to cryptococcal meningitis in an HIV-infected patient: case report and literature rev. *J Infect Dis*, **8**:175-179.

LEVITZ S. M. ET BOEKHOUT T., 2006: *Cryptococcus*: The Once-Sleeping Giant Is Fully Awake. *FEMS Yeast Research*, **6**: 461-462.

MACDONALD F. ET ODDS F. C., 1980. Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. *J Med Microbiol*, **13**: 423 – 435.

MACFARLANE T. W., 1990. Ecology and epidemiology of *Candida*. CRC Press, Florida, USA.133 p.

MAGASSOUBA F.B., DIALLO A., KOUYATÉ M., MARA F., MARA O., BANGOURA O., CAMARA A., TRAORÉ S., DIALLO A.K., ZAORO M., LAMAH K., DIALLO S., CAMARA G., TRAORÉ S., KÉITA A., CAMARA M.K., BARRY R., KÉITA S., OULARÉ S. ET BARRY M.S., 2007. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. *J Ethnopharmacol*, **114**: 44–53.

MAKADZANGE A.T., NDHLOVU C.E., TAKARINDA K., REID M., KURANGWA M., GONA P. ET HAKIM JG., 2010. Early versus delayed initiation of antiretroviral therapy for concurrent HIV infection and cryptococcal meningitis in sub-saharan Africa. *Clin Infect Dis*, **50**: 1532 - 1538.

MAURY M., 1987. Milieux et réactifs de laboratoire PASTEUR. Microbiologie-immunologie. 3^{ème} Ed. onaphi, Paris, France. 115 p.

- MCCULLOUGH M. J., ROSS B. C. ET READE P. C., 1996.** *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillar*, **25**: 136 - 144.
- MCGAW L.J., RABE T., SPARG S.G., JÄGER A.K., ELOFF J.N. ET VAN STADEN J., 2001.** An investigation of the biological activity of Combretum species. *J Ethnopharmacol*, **75**: 45–50.
- MIDGLEY G., RODERICK J. H. ET CLAYTON Y. M., 1998.** Atlas de poche de mycologie Paris, France. *Flamm Méd*, 190 p.
- MIDOLEY G., CLAYTON Y. M. ET HAY R. J., 1998.** Mycoses superficielles. In : Atlas de poche de mycologie. Paris : *Flamm Med Sci*. 17-86 p.
- MOORE R.D. ET CHAISSON R.E., 1996.** Natural history of opportunistic diseases in an HIV-infected urban clinical cohort. *An Internal Med*, **124**, 633–642.
- MOSHI M.J. ET MBWAMBO Z.H., 2005.** Some pharmacological properties of extracts of *Terminalia sericea* roots. *J Ethnopharmacol*, **97**, 43–47.
- MORAND J. J., KOEPEL M. C., SAYAG J., MARROT F., NORMAND P ET SAINT-ANDREP., 1996.** Manifestations cutanéomuqueuses des affections tropicales en Guide illustré de diagnostic en Dermatologie et vénéréologie. Ed. Sandoz Ellipses, Paris, France. Tome II, 358 p.
- MOUSSAID M., ELAMRANI A.A., BOURHIM N. ET BENAÏSSA M., 2012.** *Androcymbium gramineum* (Cav.) J.F. Macbr (Colchicaceae): Phytochemical composition, pharmacological and toxicological studies in mice. *Bull Soc Roy Sci Liège*. **81**: 90 – 100.
- MUSTOFA A.V., BENOIT-VICAL F., PE'LISSIER Y., KONE'-BAMBA D. ET MALLIE M., 2000.** Antiplasmodial activity of plant extracts used in west african traditional medicine. *J Ethnopharmacol*, **73**: 145 – 151.
- NACOUUMA née OUEDRAOGO G. O., 1996.** Plantes médicinales et pratiques médicinales traditionnelles au Burkina Faso. Cas du plateau central. Thèse de Doctorat ès Sciences naturelles, FAST Ouagadougou, Burkina Faso. Tome I et II, 605 p.

- NIKIEMA J. B. ; 1997.** Contribution à l'étude phytochimique et pharmacologique de *Leptadenia hastata* (Asclepiadaceae).Thèse de pharmacie, Université libre de Bruxelles, Belgique. 125 p.
- NJOROGE G. N ET BUSSMANN R. W., 2007.** Ethnotherapeutic management of skin diseases among the Kikuyus of Central Kenya. *J Ethnopharmacol*, **111** : 303 – 307.
- NORMAND P. H., 1991.** Affections dermatologiques contractées sur les tropiques. *Elsevier Masson Consulte*, Paris, France. 12-935-A-10, 9 p.
- NORMAND P. H., 1993.** Aspects actuels de dermatologie sur peau noire.*Elsevier Masson Consulte*. Paris, France. 12-945-A-10, 8 p.
- OBASI N. L., EGBUONU A. C. C., UKOHA P. O. ET EJKEME P. M., 2010.** Comparative phytochemical and antimicrobial screening of some solvent extract of *Samanea saman* Pods. *Afr J Appl Chem*. **9**: 206-212.
- ODDS F.C., 2010.** Molecular phylogenetics and epidemiology of *Candida albicans*. *Future Microbiol* **5**: 67-79.
- OMS., 2003.** Médicaments essentiels et politiques pharmaceutiques: donner un soutien aux pays pour réduire le manque d'accès aux médicaments. Genève : OMS (Rapport annuel 2002) 2003; 20 p.
- OUTTARA S., KRA K.A.M., KPOROU K.E ET GUEDE-GUINA F., 2008.** Evaluation de l'activité antifongique des extraits de *Terminalia ivorensis* (TEKAM₂) sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Rev I Sci Technol*, **12** 1813 – 3290.
- OUTTARA S., KRA K.A.M., KPOROU K.E ET GUEDE-GUINA F., 2009.** Evaluation de l'activité antifongique des extraits de *Terminalia ivorensis* (TEKAM₂) sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*. *Bull Soc Roy Sci liège*, **78** : 302-310.
- PADMASHREE., PRABHU P.P. ET PANDEY S., 2010.** Anti diabetic activity of methanol/methylene chloride extract of *Terminalia superba* leaves on streptozotocin induced diabetes in rats *Int. J Pharm Tech Res*, **2**: 2415 – 2419.
- PFALLER M.A ET DIEKEMA D.J., 2007.** Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163.

- PIERARD G., CAUMES E., FRANCHIMONT C. ET ESTRADA J. A., 1993.** Dermatologie Tropicale UREF Université de Bruxelles; Belgique. 350 p.
- PELE V., 2007.** FRAKE : Fiche essence et photos. PALLISCO : Avril à Octobre 2007 ; Ref : P-CE-E-04 ' version 01.
- PONGSAI P., ATAMASIRIKUL K ET SUNGKANUPARPH S., 2010.** The role of serum Cryptococcus antigen screening for the early diagnosis of cryptococcosis in HIV-infected patients with different ranges of CD4 cell counts. *J Infect*, **60**: 474 - 477.
- POUSSET J.L., 2002.** Nouveaux médicaments. Savoir discerner le véritable progrès thérapeutique. *Rés Med Dev*, **26** : 11-13.
- POUSSET J. L., 2006.** Place des médicaments traditionnels en Afrique. *Med Trop*, **66**: 606 – 609.
- RAI M. K., ACHARYA D. ET WADEGAONKAR P., 2003.** *Plant-derived antimycotics : potential of Asteraceous plants.* In *Plant-derived antimycotics: Current Trends and Future prospects.* N-York, Londin, Oxford : Haworth Press ; 165-185 p.
- RANGEL-FRAUSTO M. S., WIBLIN T., BLUMBERG H.M., SAIMAN L., PATTERSON J. ET RINALDI M. G., 1999.** National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin Infect Dis*; **29**: 253 – 258.
- RELLO J., ESANDI M. E., DIAZ E., MARISCAL D., GALLEGRO M. ET VALLES J., 1998.** The role of *Candida spp* isolated from bronchoscopic samples in non-neutropenic patients. *Chest*, **114**: 146 – 149.
- ROSENHEIM M. ET ITOUA N. A., 1989.** SIDA Infections à VIH. Aspects en zone tropicale. Ed. Ellipse/ Aupelf, Paris, France. 336 p.
- ROSSET R., CANDE M. ET JARDY A. 1982.** Manuel pratique de chromatographie en phase liquide. Ed. Masson, Paris, France. 137 p.
- RUHNKE M., 2004.** Mucosal and systemic fungal infections in patients with AIDS prophylaxis and treatment. *Drugs*, **64**: 1163–1180.
- SABU M.C, ET KUTTAN R., 2002.** Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *J Ethnopharmacol*, **81**: 155–160.

- SAMARANAYAKE L.P ET MACFARLANE T.W., 1990.** Oral candidosis Ed. Wright, London, England.265 p.
- SCHALLER F., 1999.** Composés antifongiques nouveaux issus de l'investigation phytochimique d'une plante africaine *Bobgunniamadagascariensis* Desv. (Luguminosae). Thèse de Doctorat en pharmacie, Lausanne, Suisse. 299 p.
- SCHWAB D., 1995.** Candidiasis : candidose et HIV. Project Inform Facts Sheet, San Francisco. <http://www.projinf.org/fs/candida.htm>. Consulté le 05 septembre 2007.
- SCHERER S. ET MAGEE P. T., 1990.** Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol Rev*, **54**: 226 – 241.
- SEILMAIER M., HECHT A., GUGGEMOS W. ET RÜDISSER K., 2009.** Cryptococcal meningo-encephalitis related to HIV infection with resistance to fluconazole, relapse, and IRIS *Epub*. **104**: 58-62.
- SEMWAL D. K., RAWAT U., BAMOLA A. ET SEMWAL R., 2009.** Antimicrobial activity of *Phoebe lanceolata* and *Stephania glabra* : preliminary screening studies. *J Sci Res.*, **1**: 662-666.
- SHEPHERD M. G. ET SULLIVAN P. A., 1984.** The control of morphogenesis in *Candida albicans*. *J Dent Res*, **63**: 435 – 440.
- SHEPHERD M.G., POULTER R.T.M. ET SULLIVAN P.A., 1985.** *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity. *An Rev Microbiol*, **39**: 579 – 614.
- SILVA O., DUARTE A., CABRITA J., PIMENTEL M., DINIZ A. ET GOMES E., 1996.** Antimicrobial activity of Guinea-Bissau traditional remedies. *J Ethnopharmacol*, **59**, 55–59.
- SINGH R., DAR S. A. ET SHARMA P., 2012.** Antibacterial activity and toxicological evaluation of semi purified hexane extract of *Urtica dioica* leaves. *Res J Med Plant*, **2**: 123-135.
- SORO D., KONE M.W ET KAMANZI K., 2010.** Evaluation des activités antimicrobiennes et anti-radicaux libres de quelques taxons bioactifs de Côte D'ivoire. *Eur J Sci Res* **40**: 307-317.
- STEENKAMP V., FERNANDES C.A., ET RENSBURG C.E.J., 2007.** Antibacterial activity of Venda medicinal plant. *Fitoterapia*, **78**, 561–564.

- STEVENS D. A., 1997.** Oral Amphotericin B as antifungal agent. *J Mycol Med*, **7**: 241 – 242.
- SUAREZ S., 1997.** New antifungal therapy for children. *Adv Dermatolol*, **12**: 195 – 208.
- TAPBODA T.K., NGOUPAYO J., LIU J., SHAIQ ALI M., KHAN N.S., TCHALEU NGADJUI B.T. ET LUU B., 2008.** α -Glucosidase inhibitors ellagic acid derivatives with immunoinhibitory properties from *Terminalia superba*. *Chem Pharm Bull*, **56**: 847–850.
- THIEM B ET GOSLINSKA O., 2004.** Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves. *Fitoterapia* **75**, 93–95.
- THERIZOL-FERLY M., 1990.** Cours de mycologie médicale et de parasitologie. Faculté de Médecine d'Abidjan, 169 p.
- THIOMBIANO A., SCHMIDTM., KREFT H ET GUINKOS., 2006.** Influence du gradient climatique sur la distribution des espèces de *Combretaceae* au Burkina Faso (Afrique de l'Ouest). *Candollea*: 189-213.
- TIWARI P., KUMAR B., KAUR M., KAUR G. ET KAUR H., 2011.** Phytochemical screening and extraction: A review. *Inter Pharm Sci*. **1**: 98-106.
- TOM N.L.E., GIRARD C., DIMOT., MBAFORT.J., BERTHELOT A. ET DEMOUGEOTC., 2010.** Vasorelaxant effects of extracts of the stem bark of *Terminalia superba* Engler & Diels (*Combretaceae*) *J Ethnopharmacol*, **127**: 335–340.
- TORTORANO A.M., KIBBLER C., PEMAN J., BERNHARDT H., KLINGSPOR L ET GRILLOT R., 2006.** Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* **27**: 359-366.
- TRA BI F.H., KONÉ M.W. ET KOUAMÉ N.F., 2008.** Antifungal activity of *Erigeron floribundus* (Asteraceae) from Côte d'Ivoire, West Africa. *Trop J Pharmaceutical Res* **7**: 975-979.
- VALSARAJ R., PUSHPANGADAN P., SMITT U.W., ADERSEN A., CHRISTENSEN S.B., SITTE A., NYMAN U., NIELSEN C. ET OLSEN C.E., 1997.** New anti-HIV-1 anti malarial and anti fungal Compounds from *Terminalia berllerca*. *J Nat Prod*, **60**:739-742.
- VANBREUSEGHEN R.; DEUROEY C. H. ET TAKASHIO M., 1979.** Guide pratique de mycologie médicale et vétérinaire. 2^{ème} Ed. Masson, Paris, France. 265 p.

- VANDEN B. D. A. ET VLIETINCK A. J., 1991.** Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants.in: Methods in plant biochemistry, (HOSTETTMANN U. K), Ed.Academic Press, London, England, 47 – 69 p.
- VANGAH-MANDA M., 1986.** Contribution à la connaissance des plantes médicinales utilisées par les ethnies Akans dans la région littorale de la C.I.Thèsede Doctorat 3^{ème}Cycle, FAST, Université de Abidjan Cocody, Côte d’Ivoire. 257 p.
- WANSI J.P., LALLEMAND M.C., CHIOZEM D.D., TOZE F.A.A., MBAZE L.M., NAHARKHAN S., IQBAL M.C., TILLEQUIN S., WANDJI J. ET FOMUM Z.T., 2007.** α -Glucosidase inhibitory constituents from stem bark of *Terminalia superba* (Combretaceae). *Phytochemistry*, **68** : 2096-2100.
- WICHTL M. ET ANTON R., 2003.** Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, Science et thérapeutique. Éd. Techniques et Documentations, Paris, France. 100 p.
- WIEGAN I., HILPERT K. ET HANCOCK R.E.W., 2007.** "Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances." *Nature protocols*, **3**: 163-175.
- YAYE Y.G., KRA A.K.M., ACKAH B.A.A.J. ET DJAMAN A.J., 2012.** Evaluation de l’activité antifongique et essai de purification des principes actifs des extraits de *Terminalia mantaly* (H.Perreir), une combrétacée, sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Bull Soc Roy Sci liège*, **80**: 953 – 964.
- ZIRIHI G.N., 1991.** Contribution au recensement à l’identification et à la connaissance de quelques espèces végétales utilisées en médecine traditionnelles chez les bété du département d’Issia, Côte d’Ivoire. Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle, Université de Cocody- Abidjan, FAST, Côte d’Ivoire. 253 p.
- ZIRIHI G.N., KRA A. K.M. ET GUEDE-GUINA F., 2003.** Evaluation de l’activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Larmarck) O. kuntze (Asteraceae) “PYMI” sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Rev Med Pharm Afr*, **17** : 11 – 18.
- ZIRIHI G.N., KRA A.K. M. ET ETIEN D.T., 2007.** Etude botanique et évaluation des activités antifongiques de *Mitracarpus villosus* (MV) (*Rubiaceae*) et *Spermacoce verticillata* (SV) (*Rubiaceae*) sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*. *Rev Med Pharm Afr*, **20**: 9 – 18.

ZOUHIR A., KHEADR E., FLISS I. ET HAMIDA J.B., 2011. "Partial purification and characterization of two bacteriocin-like inhibitory substances produced by bifidobacteria." *Afr J Microbiol Res*, **5**: 411-418.

Annexe 1 : Résultats du comptage des colonies issues de l'action dose- réponse des extraits totaux de *Terminalia superba* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*

Concentrations des extraits (µg/mL)	Extraits totaux de <i>T. superba</i>	
	Extrait total aqueux	Extrait total hydroalcoolique
0	100± 1,16	100± 1,73
6,09	87±1,45**	61±0,88**
12,18	73±0,33**	55±1,16**
24,37	65±1,20**	43±0,60
48,75	60±0,58**	31±1,12
97,50	43±1,53	0±0,00
195	30±0,76	0±0,00
390	0±0,00	0±0,00

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type (n = 3).

**il y a une différence significative à **p < 0,05 par rapport à la moyenne du tube témoin.

Annexe 2 : Résultats du comptage des colonies issues de l'action dose- réponse des extraits totaux de *Terminalia superba* sur la croissance *in vitro* de *Cryptococcus neoformans*

Concentrations des extraits (µg/mL)	Extraits totaux de <i>T. superba</i>	
	Extrait total aqueux	Extrait total hydroalcoolique
0	100± 1,61	100± 1,03
6,09	93±1,5**	44±0,88**
12,18	79±0,36**	19±0,16**
24,37	63±1,06**	0±0,00
48,75	25±1,58**	0±0,00
97,50	00±0,00	0±0,00
195	30±0,76	0±0,00
390	0±0,00	0±0,00

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type (n = 3).

**il y a une différence significative à **p < 0,05 par rapport à la moyenne du tube témoin.

Annexe 3 : Résultats du comptage des colonies issues de l'action dose- réponse des extraits totaux de *Terminalia superba* sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*

Concentrations des extraits (µg/mL)	Extraits totaux de <i>T. superba</i>	
	Extrait total aqueux	Extrait total hydroalcoolique
0	100± 1,23	100± 0,73
6,09	95,5±0,45**	95±0,68**
12,18	88,5±0,33**	45±1,16**
24,37	72±1,02**	23±0,65
48,75	48±0,58**	13±1,12
97,50	19±1,35	0±0,00
195	3±0,76	0±0,00
390	0±0,00	0±0,00

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 3).

**il y a une différence significative à **p < 0,05 par rapport à la moyenne du tube témoin.

Annexe 4 : Résultats du comptage des colonies issues de l'action dose- réponse des extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique de *Terminalia superba* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*

Concentrations des extraits (µg/mL)	Extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique									
	X _{1.1}	X _{1.2}	X _{2.1}	X _{2.2}	X _{3.1}	X _{3.2}	X _{4.1}	X _{4.2}	X _{5.1}	X _{5.2}
0	100±1,02	100± 0,53	100± 0,63	100± 1,73	100± 0,73	100± 0,44	100± 1,13	100± 1,03	100± 0,73	100± 0,83
6,09	64±0,88**	66±0,58**	81±0,45	77±1,06**	54±0,88	57±1,23	81±0,76**	60±1,12**	83±0,58**	57±1,00**
12,18	54±1,16	52±1,33	79±0,87**	56±1,45	41±1,04**	47±0,58**	73±0,77	47±1,00	78±1,06**	37±0,28
24,37	43±0,58**	24±1,06**	59±0,82**	42±0,16**	35±0,54	33±1,14	67±1,26**	32±1,26**	70±1,13	19±1,16**
48,75	31±1,23	0±0,00	45±0,21	22±1,12	22±1,16**	21±1,76**	57±0,19	17±0,45	54±1,01	0±0,00
97,50	20±0,33	0±0,00	22±1,34	0±0,00	16±1,09	0±0,00	51±1,00	0±0,00	42±1,23	0±0,00
195	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	37±0,88	0±0,00	30±1,05	0±0,00
390	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	15±0,26	0±0,00	0±0,00	0±0,00
780	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 3).

**il y a une différence significative à **p < 0,05 par rapport à la moyenne du tube témoin.

Annexe 5 : Résultats du comptage des colonies issues de l'action dose- réponse des extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique de *Terminalia superba* sur la croissance *in vitro* de *Cryptococcus neoformans*

Concentrations des extraits (µg/mL)	Extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique									
	X _{1.1}	X _{1.2}	X _{2.1}	X _{2.2}	X _{3.1}	X _{3.2}	X _{4.1}	X _{4.2}	X _{5.1}	X _{5.2}
0	100±0,82	100±1,53	100±0,21	100±1,28	100±0,72	100±0,67	100±1,09	100±2,01	100±1,00	100±1,08
6,09	75±0,67	26±1,00**	81±1,12**	38±0,82	45±1,65**	40±0,16**	87±1,88**	46±0,86**	80±1,28**	49±0,78**
12,18	67±1,16**	0±0,00	74±0,61	22±1,06**	25±0,56	34±0,88	73±1,56**	30±0,56	71±0,53	32±1,00
24,37	54±1,16	0±0,00	66±0,88**	0±0,00	0±0,00	19±1,08	60±1,16	17±1,16**	61±1,06**	0±0,00
48,75	27±1,76	0±0,00	46±1,56	0±0,00	0±0,00	0±0,00	53±1,21	0±0,00	35±1,00	0±0,00
97,50	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	45±0,21	0±0,00	0±0,00	0±0,00
195	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 3).

**il y a une différence significative à **p < 0,05 par rapport à la moyenne du tube témoin.

Annexe 6 : Résultats du comptage des colonies issues de l'action dose- réponse des extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique de *Terminalia superba* sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*

Concentrations des extraits (µg/mL)	Extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique									
	X _{1.1}	X _{1.2}	X _{2.1}	X _{2.2}	X _{3.1}	X _{3.2}	X _{4.1}	X _{4.2}	X _{5.1}	X _{5.2}
0	100±1,02	100± 0,53	100± 0,63	100± 1,73	100± 0,73	100± 0,44	100± 1,13	100± 1,03	100± 0,73	100± 0,83
6,09	70±0,58**	54±1,20	75±0,23**	68±0,33**	77±1,13	66±1,00	84±1,09**	49±0,43**	83±0,88**	65±1,53
12,18	60±0,48**	42±0,66	69±1,22**	56±1,20	65±1,06**	57±0,55**	73±0,88	32±0,48	73±1,04**	52±0,14**
24,37	50±0,67	25±1,07**	53±1,39	42±1,07**	56±0,23	46±1,43**	65±1,16**	18±1,02**	67±0,87	41±0 77
48,75	37±0,87**	0±0,00	42±0,77**	29±0,63**	44±0,75	34±0,41	57±1,04	0±0,00	60±1,13	32±0,56**
97,50	21±0,45	0±0,00	31±1,13	161,00	30±0,44	231,16**	49±0,88	0±0,00	53±0,76**	23±1,02
195	0±0,00	0±0,00	19±1,16**	0±0,00	16±1,18	0±0,00	44±1,67	0±0,00	44±0,55	0±0,00
390	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	32±1,06**	0±0,00	32±1,02	0±0,00
780	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	19±0,67	0±0,00	21±1,26**	0±0,00
1560	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 3).

**il y a une différence significative à **p < 0,05 par rapport à la moyenne du tube témoin.

Annexe 7 : Résultats du comptage des colonies issues de l'action dose- réponse des extraits issus du fractionnement de X_{1,2} de *Terminalia superba* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*

Concentrations des extraits (µg/mL)	Extraits issus du fractionnement de X _{1,2}		
	G₁	G₂	G₃
0	100±1,17	100±0,88	1000±1,02
6,09	54±1,56**	55±1,53	27±1,55**
12,18	47±1,23**	30±0,67**	0±0,00
24,37	32±0,45	0±0,00	0±0,00
48,75	0±0,00	0±0,00	0±0,00

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 3).

**il y a une différence significative à **p < 0,05 par rapport à la moyenne du tube témoin.

Annexe 8 : Résultats du comptage des colonies issues de l'action dose- réponse des extraits issus du fractionnement de X_{1,2} de *Terminalia superba* sur la croissance *in vitro* de *Cryptococcus neoformans*

Concentrations des extraits (µg/mL)	Extraits issus du fractionnement de X _{1,2}		
	G ₁	G ₂	G ₃
0	100±1,20	100±1,16	100±0,88
6,09	57±0,67**	30±0,56**	0±0,00
12,18	42±1,00**	0±0,00	0±0,00
24,37	20±1,67	0±0,00	0±0,00
48,75	0±0,00	0±0,00	0±0,00

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 3).

**il y a une différence significative à **p < 0,05 par rapport à la moyenne du tube témoin.

Annexe 9 : Résultats du comptage des colonies issues de l'action dose- réponse des extraits issus du fractionnement de X_{1,2} de *Terminalia superba* sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*

Concentrations des extraits (µg/mL)	Extraits issus du fractionnement de X _{1,2}		
	G ₁	G ₂	G ₃
0	100±1,02	100±1,16	100±0,56
6,09	57±0,28**	50±1,53**	31±0,76**
12,18	46±0,67**	32±1,28	0±0,00
24,37	34±1,00	0±0,00	0±0,00
48,75	0±0,00	0±0,00	0±0,00

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 3).

**il y a une différence significative à **p < 0,05 par rapport à la moyenne du tube témoin.

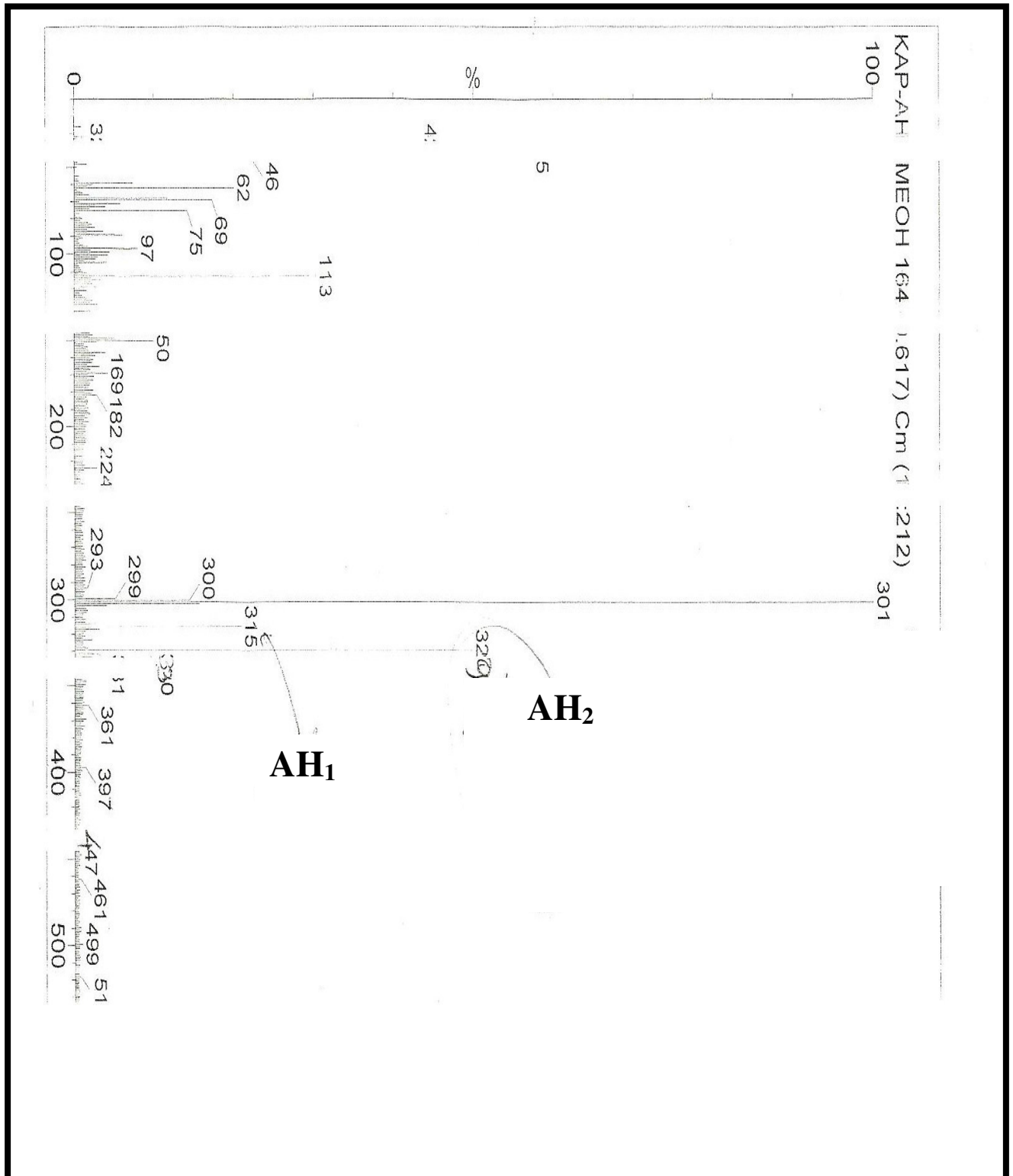
Annexe 10 : Résultats du comptage des colonies issues de l'action dose- réponse du ketoconazole sur la croissance *in vitro* des espèces fongiques étudiées

Concentrations du ketoconazole (µg/mL)	Les souches fongiques étudiées		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>A. fumigatus</i>
0	100±1,02	100±1,16	100±0,56
6,09	77±0,28**	50±1,53**	61±0,76**
12,18	66±0,67**	32±1,28	31±0,70
24,37	52±1,00	25±1,08	21±1,09
48,75	41±0,33	0±0,00	15±2,01
97,50	34±1,17	00±0,00	0±0,00
195	24±2,02	0±0,00	0±0,00
390	0±0,00	0±0,00	0±0,00

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type (n = 3).

**il y a une différence significative à **p < 0,05 par rapport à la moyenne du tube témoin.

Annexe : 11 Spectre de masse du produit de recristallisation de G₃



Antifungal activity of the aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Terminalia superba* Engl. on the *in vitro* growth of clinical isolates of pathogenic fungi

Marcel G. Ahon¹, Joel M. Akapo-Akue¹, Mathieu A. Kra¹, Jacques B. Ackah¹,
Noel G. Zirih², Joseph A. Djaman^{1,3*}

¹ Laboratoire de Pharmacodynamie, UFR Biosciences, Université de Cocody, 22 BP 582
Abidjan 22

² Laboratoire de Botanique, UFR Biosciences, Université de Cocody, 22 BP 582 Abidjan 22

³ Département de Biochimie, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, 01 BP 490 Abidjan 01

* Prof Dr. Joseph DJAMAN, 01 BP 490 Abidjan 01, Tel/Fax 225 22 44 44 73,

E-mail: djamani@yahoo.fr

ABSTRACT

In Côte d'Ivoire as elsewhere in Africa, *Terminalia superba* is generally used in traditional medicine to treat bacterial, fungal and viral infections. Given the importance of this plant, in this study, the antifungal activity of two extracts (aqueous and hydro-alcoholic) of *Terminalia superba* was evaluated on the *in vitro* growth of four clinical isolates of pathogenic fungi (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, and *Trichophyton mentagrophytes*). The antifungal tests were performed by seeding 1,000 cells of each isolate on Sabouraud agar medium by the method of double dilution in inclined tube. Both extracts were active on different strains tested in a dose-response relationship. However, the hydroalcoholic extract (X0) was four to eight times more effective than the aqueous extract (Xaq) (4 times effective against *A. fumigatus* and *C. neoformans*, but 8 times against *T. mentagrophytes*). The phytochemical screening revealed the presence of polyterpens, polyphenols, flavonoids, tannins catechic, alkaloids and saponins.

Keywords: Antifungal activity, clinical pathogenic fungi, *Terminalia superba*, Côte d'Ivoire

INTRODUCTION

Plants still play a major role in the lives of people in different regions of sub-Saharan Africa, both in food and therapeutic (Hutchings *et al.*, 1996; Kameswara *et al.*, 2000; Kamtchouing, 2006). For example, the fruit of *Thaumatococcus daniellii*, used in traditional medicine contains a protein substance five thousand times sweeter than sugar cane. The rainforest is still undoubtedly a "genetical granary" in which the potential for both natural science research and in medicine (Anonyme, 1978) is not fully explored. Among the many families and species of plants used for their therapeutic properties include the family Combretaceae. It exists in the form of trees, shrubs, or lianas Their leaves are simple, without stipules, alternate, and opposite, sub opposite or verticillate. Their inflorescences are spikes or umbels and flowers are variable in size. Finally, their fruits are often vane (Adjanohoun et Aké-Assi, 1979).

Several taxa of this family are widely used for medicinal purposes in sub-Saharan Africa in general

and especially in Côte d'Ivoire in the treatment of various diseases (Ionela and Ion, 2007). The Ivorian forest contains about 49 species of Combretaceae of which *Terminalia superba*, is found in thick rainforest zone. It is used in traditional medicine to treat many bacterial infections, fungal and viral (Van Wyk *et al.*, 1997; McGaw *et al.*, 2001). In Côte d'Ivoire, the bark of this plant is used to eradicate intestinal worms and treat gastrointestinal disorders such as enteritis, abdominal pain, diarrhea, fever, headache, conjunctivitis (Adjanohoun et Aké-Assi, 1979). In the Southwest, the bark of *T. Superba*, called "tree of malaria" is used by "Kroumen" (ethnic group in this region) in the treatment of malaria (Anonyme, 1978).

Given the many excellent anti-infective results obtained with this plant, this study was to evaluate the antifungal activity of aqueous and the hydro alcoholic extracts on *in vitro* growth of four "strains" pathogenic fungal and to determine the chemical composition of each extract of *T. superba*.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of extracts of *Terminalia superba*: The bark of *T. superba* has been collected, cut and dried. After drying, the plant materials were finely ground in an electric grinder (IKA Labortechnik). One hundred grams of powdered bark were added to one liter (1L) of solvent (distilled water or ethanol-water, v/v 70/30) and then mixed in a blender. The homogenate obtained was first centrifuged in a square of fabric, and then respectively filtered twice through cotton wool and once on Whatman paper 3MM. The filtrate obtained was concentrated using a rotary evaporator Büchi type at a temperature of 60°C. The hydro alcoholic extract was evaporated to dryness, while the aqueous extract was concentrated and lyophilized (Burkill, 1985). The aqueous extract was called X_{aq} and the hydroalcoholic extract X₀. Both extracts were tested separately on the *in vitro* growth of four isolates of fungi.

Fungi tested: The strains of fungi (*C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. neoformans* and *T. mentagrophytes*) used in this study were provided by the Laboratory of Mycology of the Faculty of Medical Sciences of the University of Cocody-Abidjan (Côte d'Ivoire). These germs have been isolated from patients from the infectious Diseases Department of Hospital of Treichville (Abidjan).

C. albicans is part of the normal flora (gastrointestinal and reproductive tract of women). However, it becomes pathogenic when the immune system fails. The generalized infection caused by this yeast in individuals severely immuno-compromised often lead to death (Ahmadi *et al.*, 2009). As *C. neoformans*, it is responsible for most of human cryptococcosis, the most common is the meningo-encephalitis. This species also causes serious bloodstream infections in sub acute evolution where untreated cases could be fatal (Gentilini *et al.*, 1993).

A. fumigatus is a ubiquitous filamentous fungus always present found everywhere in nature (Bouchet, 1984; Chouvala, 1984; Gentilini *et al.*, 1993). It is responsible for 80-90% of humans aspergillosis, the most common are bronchopulmonary aspergillosis. This species is known to be particularly pernicious and "rebel" to therapy. Finally *T. mentagrophytes* is a cosmopolitan filamentous fungus (Chouvala, 1984; Gentilini *et al.*, 1993) whose growth is favored by many factors including heat, humidity, poor hygiene, exaggerated taking of corticosteroids, and co-morbidity. *T. mentagrophytes* causes ringworm.

Antimicrobial Test: The cultures of different "strains" of fungi have been carried out on Sabouraud agar (Biomérieux, 51078 Ref: 777666501). The inclusion of plant extracts in the agar was made using the method of the double dilution agar slopes (Ajello *et al.*, 1963; Guédé-Guina *et al.*, 1995; Zirihi *et al.*, 2003). Both extracts (aqueous and ethanol) were tested separately. Each test series consisted of eight tubes containing the plant extract and two control tubes in which one is without a plant extract used to monitor the growth of germs, and the other germ-free tube and without plant extract was used as sterility controls to the culture medium. For the eight test tubes, concentrations of plant extract ranged from 780 to 6.09 µg/mL binding by a geometrical reason of 1/2.

After incorporation of the extract to the agar, all ten tubes of each series were sterilized in an autoclave at 121°C for 15 minutes and then inclined to room temperature to allow cooling and solidification of the agar (Holt, 1975).

The inoculum was prepared from young cultures of *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. neoformans* (aged 48 hours of incubation) and *T. mentagrophytes* (aged 5 days of incubation). The stock suspension concentrated to 10⁶ cells/mL (corresponding to a dilution 10⁰) was first prepared by homogenizing a colony of each fungal strain in 10 mL of sterilized distilled water. One milliliter of the suspension 10⁰ was transferred to 9 mL of sterilized distilled water to give a second suspension concentrated to 10⁵ cells/mL. For each test tube of the two series of extracts (aqueous and hydro-alcoholic), the culture was made on medium previously prepared by seeding in transverse striations (till exhausted) of 10 mL of the suspension 10⁻¹. This corresponded to 1,000 cells seeded.

After incubation (at 30°C for 48 hours for *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. neoformans* and for 5 days for *T. mentagrophytes*), the colonies of each isolate were numbered by direct counting with a pen colony counter (Serial number 23382, Scinceware Bel-Art). Growth in the eight tubes of each experimental series was assessed as a percentage of survival compared to 100% survival in the control tube growth control (Pechere, 1970; Laurent *et al.*, 1992). Treatment of experimental data was used to determine the antifungal parameters (MFC, IC₅₀).

Phytochemical screening: This section of the study is to highlight the presence of chemical compounds in aqueous extracts and hydro-alcoholic extract of the bark of *T. superba*. The methods used for revealing the presence of chemical constituents are those

conventionally used in the phytochemical screening of medicinal plants. To search for polyterpens, reagent used is that of Liebermann. Polyphenols have been detected by the reaction to ferric chloride. The reaction to cyanidin helped to highlight the flavonoids. For tannins, their presence have been detected by the Stiasny reagent. Quinone groups free or combined were highlighted through the reagent Borntraegen. The alkaloids were detected by the Dragendorff reagents or Bouchardat Valsen-Mayer. Finally, the saponins have been identified by measuring the height of foam after shaking.

Analysis results: The MFC (minimal fungicidal concentration) and IC_{50} (concentration for 50% inhibition) were used to evaluate the antifungal activity of different extracts. In practice, the MFC is the extract concentration in the tube, which gave 99.99% inhibition compared to the control tube growth control. As for the IC_{50} , it is determined graphically.

To better estimate the quantity of chemical constituents in the extracts, scores ranging from 0-3

Table 1: Antifungal parameters of the extracts of Terminalia superba

	Antifungal parameters			
Pathogenic fungi	MFC ($\mu\text{g/mL}$)		IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	
	Xaq	X0	Xaq	X0
C. albicans	390.0	97.5	44.0	21.0
C. neoformans	97.5	24.37	31.0	5.6
A. fumigatus	390.0	97.5	37.5	12.0
T. mentagrophytes	48.75	12.0	10.0	1.0

In general, all sensitivity curves showed a decreasing pace with slopes more or less strong according to the extract. The IC_{50} values (*T. mentagrophytes*: $IC_{50}=10 \mu\text{g/mL}$ for X_{aq} and $IC_{50} = 1.0 \mu\text{g/mL}$ for X_0 ; *A. fumigatus*: $IC_{50} = 37.5 \mu\text{g/mL}$ X_{aq} and $IC_{50} = 12 \mu\text{g/mL}$ for X_0 , *C. neoformans*: $IC_{50} = 31 \mu\text{g/mL}$ X_{aq} and $IC_{50} = 5.6 \mu\text{g/mL}$ for X_0) defined on the curves are shown in Table 1. All curves intersect the horizontal axis at different levels according to the effectiveness of each extract. With a sample X_0 , the curves have slopes relatively strong, but low with the extract X_{aq} .

(absent or present) have been allocated. Thus, the absence was symbolized by a score of 0, the presence in small quantities by a score of 1, the presence in average quantity score 2 and finally, the abundance by a score of 3.

RESULTS AND DISCUSSION

Antifungal activity of extracts: At the end of the incubation time it was observed compared with controls, a progressive decrease in the number of colonies gradually as the concentration of extracts increased in the experimental tubes. This is observed for all series of each extract. Effective inhibitions were obtained at different concentrations of the extracts. The values of MFC (*A. Fumigatus*: MFC = $390 \mu\text{g/mL}$ and $97.5 \mu\text{g/mL}$; *C. neoformans*: MFC = $97.5 \mu\text{g/mL}$ and $24.37 \mu\text{g/mL}$) for both extracts (X_{aq} and X_0) are shown in Table 1. The experimental data (average of six tests) were drawn into forms of activity curves shown in Figure 1a, 1b.

Phytochemical screening: The phytochemical screening has enable to highlight in the extract X_{aq} the presence of polyterpens, polyphenols, flavonoids, and especially of saponins. With X_0 , four chemical constituents (polyterpens, polyphenols, alkaloids and saponins mainly) have been determined. No quinone compound (score 0) was detected in these two extracts. The presence of these constituents varied from one sample to another. Figure 2 shows the results of various chemical compounds in the extracts based on their quantity.

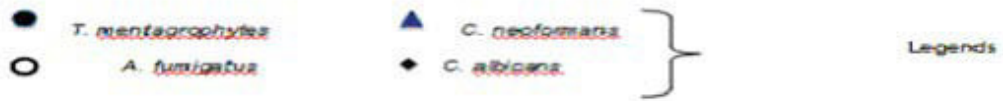
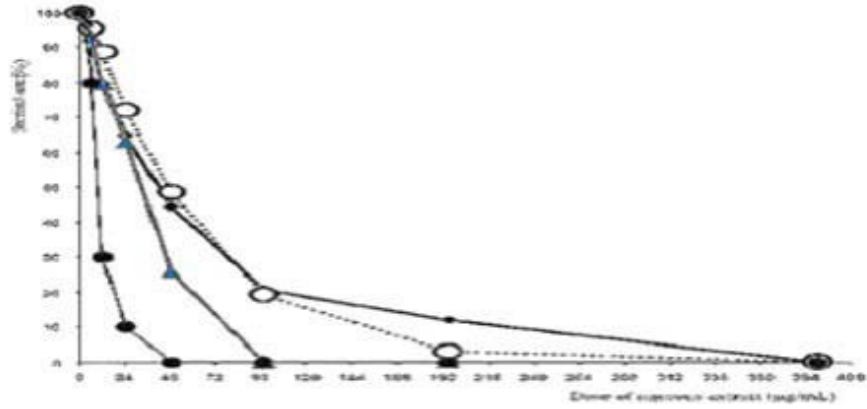


Fig 1a: Antifungal activity of the aqueous extract of *Terminalia superba*

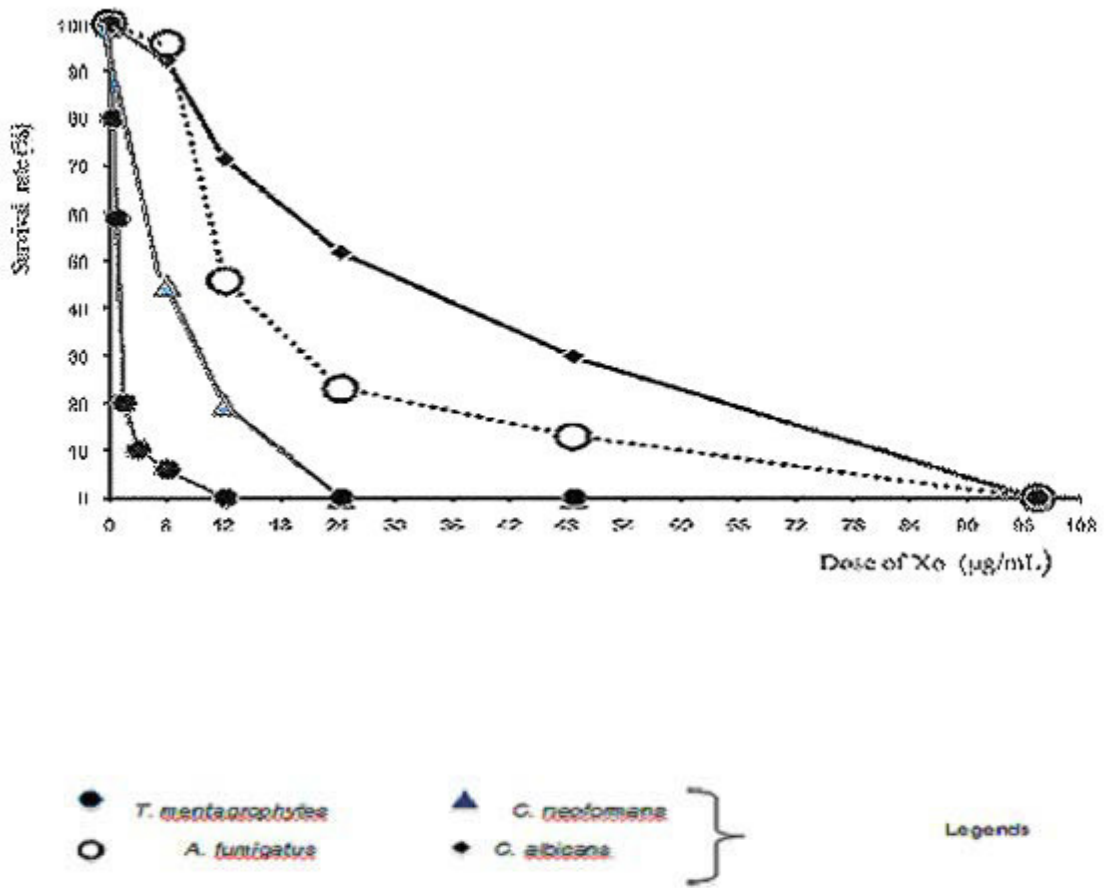


Fig 1b: Antifungal activity of the hydro-alcoholic extract of *Terminalia superba* Compounds

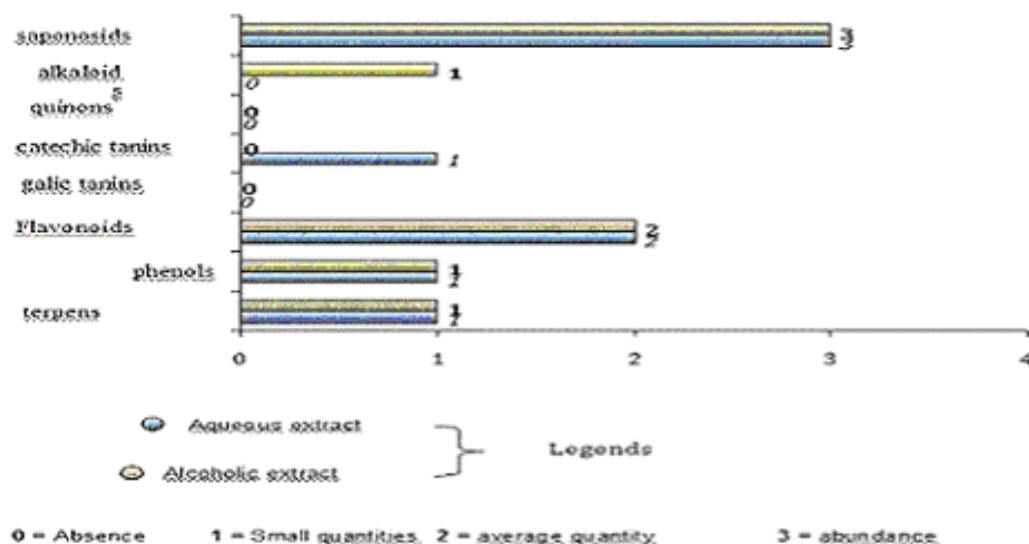


Fig 2: Chemical compounds contained in the extracts of *Terminalia superba*

DISCUSSION

Analysis of the antifungal activity of extracts: To verify the excellent anti-infective properties of *T. superba* in traditional medicine for which water is the solvent of choice used for the preparation of traditional recipes, the activity of aqueous total extract of this plant was first evaluated. The first results obtained with the aqueous extract guided research into the use of a second type of solvent that can better concentrate active ingredients in order to improve *in vitro* antifungal activity. The results obtained with both extracts showed a progressive decrease in the number of colonies depending on increase of the concentration of the extract in the tubes. X_{aq} and X_0 have antifungal activity against the four fungi tested in a dose-response relationship. Figures 1a and 1b are used to compare the performance of these extracts. Thus, more the curve approaches the axis more the extract is considered active on this strain. But in general, all curves have a decreasing pace with slopes more or less strong. Depending on the slope, curves were grouped into three categories for each sample:

The curves whose slopes are very low, show a weak activity of the extract on the growth of strains.

♦ The curves whose slopes are moderate, illustrate an average activity of the extract on the growth of strains.

♦ The curves with steep slopes, show a strong activity of the extract on the growth of the strains.

Thus, for extract X_{aq} , the antifungal activity against *A. fumigatus* is low whereas on *T. mentagrophytes* this activity is strong. However, against *C. albicans* and *C. Neoformans*, antifungal activity determined is average. The aqueous extract of *T. superba* has a better antifungal activity compared to *microglossia pyrifolia* (MFC = 50.10^3 mg/mL) and *Terminalia. catappa* (MCF = 780 μ g/mL) tested by Zirihi *et al.*, 2003 and Ackah *et al.*, 2008 on *C. albicans*. Regarding the sensitivity of strains to extract X_0 of *T. superba*, the results are similar to those of X_{aq} . The steepest slope is that obtained with *T. mentagrophytes* followed by *C. neoformans* and *A. fumigatus*. The weakest slope is the one obtained with *C. albicans*. Indeed, the report based on the values of MFC shows that X_0 of *Terminalia superba* is 277 more active than X_0 of *microglossia pyrifolia* and 2 times more active than the hydroalcoholic extract of *Terminalia catappa*. Finally, the analysis of all the results showed that the extract X_0 of *T. superba* is 4 times more active than the aqueous extract X_{aq} against *C. albicans*, *C. neoformans* and *A. fumigatus*, and 8 times more active against *T. mentagrophytes*. The mixture of water and ethanol is the right combination that has allowed a greater concentration of active principles in extracts of *T. superba*. The

results of this study can therefore justify the validity of the virtues attributed to antimicrobial plant. However, in the traditional use of plants, several different aqueous extracts of different plants are used and can achieve better results in the treatment of diseases (Kamtchouing *et al.*, 2006). The extracts may act synergistically with either one of the molecules contained in an extract potentiates the activity of another. The relevance of the study phytochemical-sorting is done about the possible compounds in the extracts to have an idea of those able to confer antimicrobial activity.

Analysis of the Phytochemical screening: Thus, considering the results of the phytochemical screening analysis, it is possible to affirm that there is an abundance of saponins in both extracts and an average proportion of flavonoids. It has been found that extract X_{aq} contains 6 elements (terpens, sterols, phenols, flavonoids, tannins, saponins), while the extract X_0 contains only 5. Although not containing tannins, this extract concentrates a small proportion of alkaloids (Burkill, 1985). It is possible that the antifungal activity is not related to catechin tannins present in X_{aq} (X_0 does not contain). However, given that X_0 is more active than X_{aq} , it is possible that the activity is linked to different types of chemical formula or identical in nature but different in conformation in the extracts. X_{Aq} and X_0 then would contain different properties of polyphenols, polyterpens, flavonoids and saponins. According to the work of Cowan in 1999 and those of Iwu *et al.* (1999), and of Ionela and Ion (2007), the antimicrobial activity of flavonoids, polyphenols, polyterpens, alkaloids and saponins can be explained by the fact that they are not only capable of complexing extracellular proteins but also to break the microbial membranes causing cell death.

CONCLUSION

This study has enabled us to locate the true potential anti-microbial in general, but especially anti-fungal extracts of *T. superba* on the *in vitro* growth of *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. neoformans* and *T. mentagrophytes*. The results of these study have shown that aqueous extracts and hydro-alcoholic extract of *T. superba* have a dose-dependent fungicidal activity against clinical fungal isolates used and that this activity is improved with the hydroalcoholic extract, which has helped to concentrate the active ingredients. Out of the four fungal isolates tested *T. mentagrophytes* is the most sensitive to extract and the less sensitive is *C. albicans*.

In rural traditional, the use of *T. superba* as antimicrobial therapy is justified. The therapeutic qualities of this plant are related to many chemical compounds including terpens, phenols, saponins etc. that it contains. It would be desirable by a bio-guided fractionation to isolate each compound or group of compounds to identify the one, which is responsible for *T. superba's* antifungal activity.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Laboratory of Parasitology and Mycology of the Faculty of Medical Sciences of the University of Cocody-Abidjan for having provided the strains of fungi used in this study.

REFERENCES

- Ackah, A.J., Kra, M.A.K., Zirihi, N.G., Guédé-Guina, F. (2008). Evaluation et essai d'optimisation de l'activité antifongique de *Terminalia catappa* (TEKAM3), un extrait de Combrétacée de la pharmacopée Ivoirienne. Bull. de la Soc. R. Sci. (Liège) 77: 120-136.
- Adjanohoun, J.E., Aké-Assi, L (1979). Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire. Centre National et floristique, Abidjan, Côte d'Ivoire, pp 40-219.
- Ahmadi, F., Ahmadi, M., Yaghmaei, B., Nejat, F., Rezaei, N., Mamishi, S (2009). *Candida albicans* meningitis in an infant with Noonan syndrome. Braz. J. Infect. Dis. 13: 452-453.
- Ajello, L., Georg, L.K., Kaplan, W., Kaufman, L. (1963). Laboratory manual for medical mycology. 2nd Ed. John Wiley and Sons, Inc. New-York, pp20-35.
- Anonyme (1978). www.parc.national.de-tai.org/fr/arbre_fr.htm.
- Bouchet, P (1984). Les plantes d'usage traditionnel à propriété antifongiques. Pharm. Afr. Noire 20: 10-14.
- Burkill, H.M (1985). The Useful plants of West Tropical Africa, Vol.1 (second Ed) Royal Botanic Gardens, Kew, Great Britain, pp 425-426.
- Chouvala, S (1984). Les maladies tropicales .Ed. Mir. Moscou 194 p.
- Cowan, M.M (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12: 564-582.
- Gentilini, M., Caumes, E., Danis, M., Mouchet, J., Duflo, B., Lagarderr, B., Richard-Lenoble, D., Brucker, G (1993). Nématodes intestinales. In : Médecine-Science (Ed) Médecine tropicale. Flammarion, pp 180-195.
- Guédé-Guina, F., Kra, M.A.K., Bonga, M. De Souza, C (1995). Activité antimicrobienne d'un extrait végétal contre les germes opportunistes au cours du SIDA. Rev. Med. Pharm. Afr 9 : 13-19.

- Holt, R (1975). Laboratory test of antifungal drug. *J. Clin. Pathol.* 28: 767-774.
- Hutchings, A., Scott, A.H., Lewis, G., Cunningham, A.B (1996). *Zulu Medicinal Plants, An Inventory*. University of Natal Press, Pietermaritzburg, South Africa. 450 pp.
- Ionela, C.D., Ion, B.I (2007). Plant products as antimicrobial agents. *Analele Științifice ale Universității Alexandru Ioan Cuza" Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară VIII*: 151-156.
- Iwu, M.M., Duncan, R.A., Okunji, O.C (1999). New antimicrobials of plant origin. Reprinted from: perspectives on new crops and new uses. J. Janick (ed.), ASHS Press, Alexandria, VA. 457- 462.
- Kameswara Rao, B., Giri, R., Kesavulu, M.M., Apparao, Ch (2000). Effect of oral administration of bark extracts of *Pterocarpus santalinus* L. on blood glucose level in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.* 74: 69-74.
- Kamtchouing, P., Kahpui, S.M., Dzeufiet, P.D., T'edong, L., Asongalem, E.A., Dimoa, T (2006). Anti-diabetic activity of methanol/methylene chloride stem bark extracts of *Terminalia superba* and *Canarium schweinfurthii* on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 104: 306-309.
- Laurent, F., Sapin, V., Vincent, C.M., Campagni, H.P (1992). *Les Aspergilloses*. Lyon pharmaceutique 43: 339-349.
- McGaw, J. L., Rabe, T., Sparg, S.G., Jäger, A.K., Eloff, J.N., Van Staden, J (2001). An investigation of the biological activity of *Combretum* species. *J. Ethnopharmacol.* 75: 45-50.
- Pechere, J. C. (1970). *Reconnaître, comprendre, traiter les infections Edisem.Inc*. Ed. Maloine 37: 446-448.
- Van Wyk, B.E., Van Oudtshoorn, B., Gericke, N (1997). *Medicinal Plants of South Africa* Briza Publications, Pretoria, South Africa, 304 p.
- Zirih, G.N., Kra, M.A.K., Guédé-Guina, F (2003). Evaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (LAMARCK) O. KUNZE (Asteraceae) PYMI sur la croissance in vitro de *Candida albicans*. *Rev. Med. Pharm. Afr.* 17: 11-18.



**International Journal of Biology, Pharmacy
and Allied Sciences (IJBPAS)**

'A Bridge Between Laboratory and Reader'

www.ijbpas.com

**IMPROVEMENT OF THE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE HYDRO-ALCOHOLIC
EXTRACT OF *Terminalia superba* On THE *IN VITRO* GROWTH OF THREE
PATHOGENIC FUNGI**

**AHON GM¹, KRA AKM¹, AW S², ZIRIHI GN³, ACKAH BAAJ¹, SIAKA S², KPOROU
KE¹ AKAKPO-AKUE MJ¹, DJAMAN AJ^{1,4*}**

1: Laboratory of Biochemistry-Pharmacodynamic, UFR Biosciences, University of Cocody
Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22 Côte d'Ivoire

2: Laboratory of Industrial Process Synthesis, Environment and Energy News, Institut National
Polytechnique Felix H. B

3: Laboratory of Botany, UFR Biosciences, University of Cocody-Abidjan, 22 BP 582 Abidjan
22, Côte d'Ivoire

4: Department of Medical & fundamental Biochemistry, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire 01 BP
490 Abidjan 01 Côte d'Ivoire

***Corresponding Author : E Mail : djamanj@yahoo.fr; joseph.djaman@pasteur.ci**

ABSTRACT

This study was initiated to find new molecules of natural origin effective against fungal infections. Its purpose is to evaluate and seek to optimize the antifungal activity of the hydroalcoholic extract X₀. This optimization was achieved by partitioning extract in different organic solvents (hexane, ethyl-acetate, butanol, dichloromethane, chloroform).

Subsequently, the antifungal activity of the extracts was evaluated on the *in vitro* growth of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*, three species of pathogenic fungi. The extracts were separately incorporated in Sabouraud agar using the method of double dilution in inclined test tubes. The antifungal tests were performed by seeding 1,000 cells of each species of fungi on a previously prepared medium culture. The results show that all the extracts tested have an inhibitory activity according a dose-response relationship. Thus, X1.2

which is an aqueous extract obtained from the hexane-water partition offers the best antifungal activity. X_{1.2} totally inhibits the growth of *C. albicans*, *A. fumigatus* and *C. neoformans* with a MFC value of 48.7µg/mL, 48.7µg/mL and 12.3µg/mL, respectively; X_{1.2} extract has improved the activity of *T. superba*.

Keywords: Antifungal Activity, Optimization, Plant Extracts, *Terminalia superba*

INTRODUCTION

In Africa, plants are widely used to treat many ailments and they serve as first-aid treatment for about 80% of the population [1]. People derive a lot of advantages from the abundant use of medicinal plants, however it also exposes them to a lot of dangers. This last concern makes it urgent the need to give a scientific basis for the uses of medicinal plants by the isolation of active molecules and the study of their real medicinal potentialities [2]. Knowing the limit of their utilization (toxicity, effective doses) will enable us to make the best use of these plants and also help to confirm or disprove the validity of their therapeutic properties attributed to them. After a thorough ethnobotanical research among traditional healers in search of plants having anti-infectious, *Terminalia superba* was selected. This specie belongs to the Combretaceae family and widespread in the West African sub region, in Central Africa (Democratic Congo) and South Africa [3]. In Côte d'Ivoire, *T. superba* is highly used by traditional healers for its many uses, such as

the treatment of diarrhea, skin infections etc [4].

In a previous study conducted, anti-infectious properties attributed to the plant have been verified by evaluating the antifungal activity of aqueous and hydro-alcoholic extract. Considering the results obtained with the highly interesting hydroalcoholic extract (X₀), the antifungal activity could be improved through an advanced biological extraction. The microorganisms selected for this experiment are opportunistic pathogenic fungi strain (two yeasts and one mold) involved in various skin disorders, and systemic diseases of the skin appendages [4].

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Extracts

The stem bark of *T. superba* was removed, cut and dried. After drying, the plant materials were finely ground in an electric grinder (IKA Labortechnik). One hundred grams of the plant powder were extracted through homogenization in one liter of alcohol-water mixture (containing 70% pure ethanol and

distilled water 30% v/v) using a blender (mixer). After six rounds of homogenization, the homogenate obtained was first purified in a square of clean cloth, and then filtered twice on cotton wool and Whatman paper (3mm) successively. The filtrate obtained was evaporated to dryness using a rotary evaporator Büchi type at a temperature of 60°C [5]. The hydro alcoholic extract obtained is referred to as X₀. Five portions of 15 grams each of X₀ were subjected to liquid/liquid partition in 300 mL of solvent mixtures (hexane-water, ethyl acetate-water, butanol-water, dichloromethane-water, chloroform-water: 50/50 v/v). After settling, different phases were separated and concentrated. The following extracts were obtained:

X_{1,1}: the hexane phase; X_{1,2}: the aqueous phase from the partition hexane-water

X_{2,1}: the acetate phase; X_{2,2}: the aqueous phase of the partition ethyl acetate-water

X_{3,1}: the butanol phase; X_{3,2}: the aqueous phase from the butanol-water partition

X_{4,1}: dichloromethane phase; X_{4,2}: the aqueous phase of the partition dichloromethane-water

X_{5,1}: chloroform phase; X_{5,2}: the aqueous phase of the partition chloroform - water

All ten extracts were tested separately on the *in vitro* growth of three fungal species

Fungi Used For The *In Vitro* Test

Aspergillus fumigatus (No.896/AB. of 18. 01. 2000), *Candida albicans* (No.3076/PV. of 06 04. 2000), and *Cryptococcus neoformans* (No. 13801/LCR of 19. 06. 1999) are the fungal species used in this study. They were obtained from the Laboratory of Mycology of UFR of Medical Sciences (University of Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire). These pathogenic fungi were isolated from patients from the infectious diseases Department at the University Teaching Hospital Treichville. These germs are involved in many diseases currently affecting humans, animals and plants. In particular, they have a very high frequency in human pathology among fungi.

Preparation of Culture Medium

Cultures of different strains of fungi were performed on Sabouraud agar (Biomérieux, Ref 51078 : 777666501). The incorporation of plant extracts in Sabouraud agar was made using the method of double dilution inclined test tubes [5, 6, 7]. The ten extracts were tested separately. Each series consisted of eight test tubes containing plant extract and two control tubes in which one without plant extract used to control growth of germs, and the other tubes germfree and without plant extract was used for sterility testing of the culture medium. For the eight test tubes, concentrations of plant extract (X_{1,1}, to X_{5,2})

varied from 1560 to 6.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ according to a geometrical reason of $\frac{1}{2}$.

After the incorporation of the extract into the agar, all ten tubes of each series were sterilized by autoclaving at 121°C for 15 minutes and then inclined to the room temperature to allow it to cool and solidification of the agar [8].

Antimicrobial Test

For antimicrobial testing, inocula were prepared separately from cultures of three species in slant agar for 48-72 hours. For each strain, a well-isolated colony was picked up with a loop of 2 mm diameter and then homogenized in 10 mL of sterilized distilled water. This suspension gave a stock solution marked 10^0 , with a charge of 10^6 cells /mL. Out of the stock solution 10^0 , the solution 10^{-1} was prepared, by 1/10 dilution by transferring 1 mL of the suspension 10^0 into 9mL of sterilized distilled water to a final volume of 10 mL, containing 10^5 cells per mL [5, 7, 9, 10].

To check the charge of the inoculum, a secondary dilutions of the inoculum was performed (10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4}). All these suspensions were seeded on agar in Petri dishes incubated at the same time as the test cultures. After 48 to 72 hours of incubation, the colony count of 10^{-4} dilution, based on the sampled volume ($10\mu\text{L}$) and the dilution

factor, give an inoculum charge of 10^5 cells/mL, which is consistent with normal standard for culture. In this verification, the number of colonies counted in suspensions (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1}) are taken into consideration.

For each of the test tubes in the series of ten extracts, fungal culture was made on previously prepared medium by cross-streaking $10\mu\text{L}$ of the suspension 10^{-1} . This corresponds to 1000 cells seeded. The cultures so produced were incubated at 30°C for 48H to 72H. After the incubation time, colonies of each strain were counted using a colony counter pen (Serial No. 23382, Scinceware Bel-Art). Growth in the eight experimental tubes of each series was evaluated as a percentage of survival compared to 100% survival in the growth control tube [5, 7, 8]. The processing of experimental data has enabled the drawing of sensitivity curves and to determine the antifungals parameters (MFC and IC_{50}). Thus, the MFC (minimal fungicidal concentration) and the IC_{50} (concentration for 50% inhibition) were used to evaluate the antifungal activity of different extracts. In practice, the MFC is the concentration of extract in the tube which enable 99.99% inhibition. This concentration allows a survival of 0.01% compared to the growth

control tube. As for the IC50, it is determined graphically.

RESULTS

At the end of the incubation period, we observed a gradual decrease in the number of colonies as concentration of extracts in test tubes increases progressively, compared to control tube. This is observed in all series of culture of each extract (X1.1, X1.2, X5.2 etc.). Actual inhibitions were observed at different concentrations level of each extract. The X1.2 extract has the lowest concentration value (*C. albicans*: MFC = 48.7 µg/mL; *A. fumigatus*: MFC = 48.7 µg/mL and *C. neoformans*: MFC = 12.2 µg/mL). All antifungals parameter values (MFC and IC50) are shown in **Table 1**. Experimental data

obtained for X₀ and X_{1,2} extracts were used to plot sensitivity curve.

In order to present a simplified diagram, only the activity curves of the basic X₀ extract, and the most active extract X_{1,2} are shown in **Figures 1 and 2**. These results arise from the statistical average of six experiments for each tested strain. In general, all activity curves showed a decreasing pace with slopes more or less strong according to the extract and depending on the fungus. The curves intersect the x-axis at different levels depending on the efficiency of each extract and the sensitivity of the fungus. With X_{1,2} extract from the partition hexane-water, the curves have slopes relatively strong, while they are weak with X₀ extract.

Table 1 : Antifungal Parameters Values of the *Terminalia superba* Extracts

<i>T. superba</i> Extracts	<i>Candida albicans</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Aspergillus fumigatus</i>	
	CMF (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)	CMF (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)	CMF (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)
X ₀	97.5	20.8	24.3	4.3	97.5	9.4
X _{1,1}	195	18	97.5	27	195	25
X _{1,2}	48.7	12	12.3	3	48.7	8
X _{2,1}	195	40	195	42	390	30
X _{2,2}	97.5	16	24.3	4.5	195	17
X _{3,1}	195	08	48.7	6	390	40
X _{3,2}	97.5	10	48.7	4	195	18
X _{4,1}	780	100	780	66	1560	100
X _{4,2}	97.5	10	48.7	6	97.5	6
X _{5,1}	780	60	390	34	1560	125
X _{5,2}	48.7	8	48.7	6	195	12

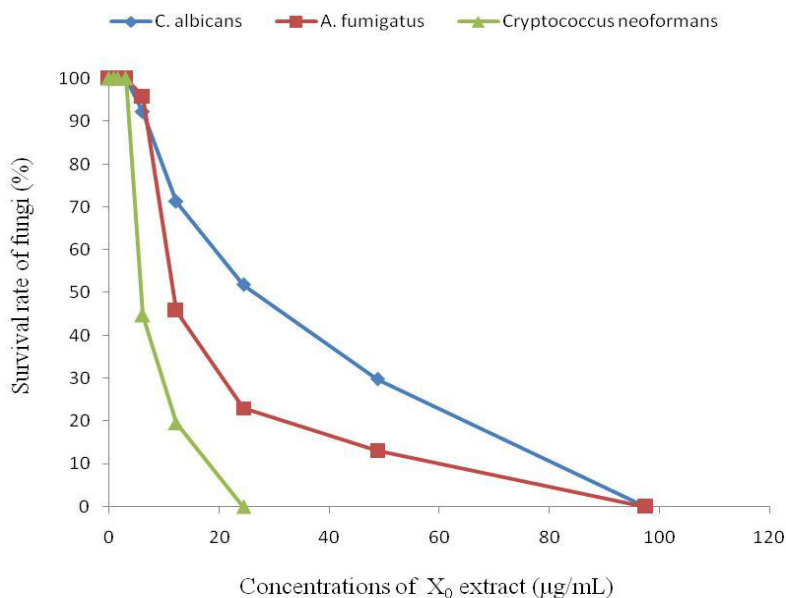


Figure 1: Antifungal Activity of X₀ (the Basic Extract) on the *In Vitro* Growth of Pathogenic Fungi

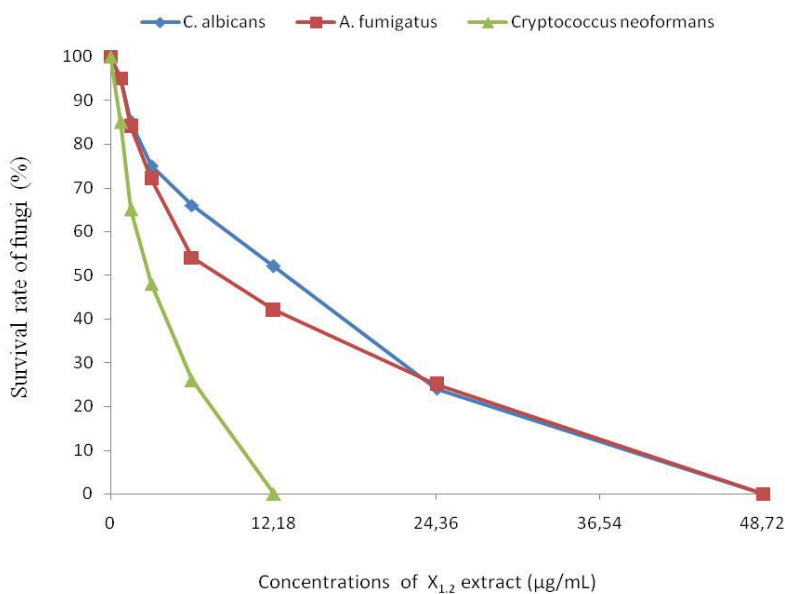


Figure 2: Antifungal Activity of X_{1,2} (the Most Active Extract) on the *In Vitro* Growth of Pathogenic Fungi

DISCUSSION

The analysis of the antifungal tests result shows that the three fungal species studied were sensitive to all extracts tested in a dose-response relationship. The various extracts of

T. superba from the five partion exert antifungal activities more or less strong, and the performance of the activities varies depending on the species tested. Of all the extracts from the partion, X_{5,2} and X_{1,2}

extracts have the lowest antifungal parameter values against *Candida albicans*. But on all three fungal species studied, X_{1,2} extract has the lowest antifungal parameter values (48.75 µg/mL on *A. fumigatus* and *C. albicans* and 12.2 µg/mL against *C. neoformans*) compared to X_{5, 2}, thus X_{1,2} is the most active extract among all the extracts tested. The obtained results is similar to those of [11] showed that aqueous extract from the hexane-water partition of *Terminalia catappa* has the best activity against *Candida albicans*.

Moreover, our results show that X_{1,2} is 2 times more active than X₀ (extract that constituted the basis for its preparation) based on the values of MFC for all fungal species. So, X_{1,2} extract has improved the antifungal activity of the X₀ extract. In addition this extract has the best inhibitory activity than other extracts from the different partitions since all values of antifungal parameters of X_{1,2} extract are always lower than those of other extracts, whatever the species of fungus.

Contrary to X_{1,2} extract, X_{4,1} results extract which combines the highest values of MFC (1560µg/mL to 195µg/mL) on all the three fungal species tested is therefore the least active extract among those tested. But, this result is still acceptable compared to those of other authors such as [12] who have obtained for *Spermacoce verticillata* (SV₀) and

Mitracarpus villosus (MV₀) extracts values of MFC = 150,000 µg/mL for MV₀ and 75,000 µg/mL for SV₀ on *Aspergillus fumigatus*. These results are consistent with those of other authors who have shown that extracts of *Terminalia* have similar antimicrobial properties [11, 13, 14, 15].

CONCLUSION

At the end of that study, it is possible to say that all the extracts tested against the three fungal species have inhibitory activity more or less strong. Therefore, the traditional use of this plant as an antimicrobial agent is well.

Among all the extracts, X_{1,2} is the most active. It is twice more active than the basic X₀ extract, and 2-64 times more active than other extracts from the partitions (X_{1,1}, X_{2,1} to X_{5,2}). X_{1,2} optimize the antifungal activity. Preparation of extract from aqueous-alcoholic solvent producing X₀ followed by partitioning in hexane-water is the best way to obtain the most active performance. Unfortunately, traditional healers use only two types of solvents in the preparation of herbal medicines, water (solvent commonly used) and sometimes alcohol.

Finally, the results of this study allow us to determine the chemical compound at the base of the antifungal activity.

REFERENCES

- [1] Sofowora A, Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa Spectrum Books Limited, Ibadan, 1993, 9-25.
- [2] Wondimu T, Asfaw Z and Kelbessa E, Ethnobotanical study of medicinal plants around Dheeraa' town, Arsi Zone, Ethiopia Journal of Ethnopharmacology, 112, 2007, 152–161.
- [3] Hutchings A, Scott AH, Lewis G and Cunningham AB, Zulu Medicinal Plants, An Inventory, University of Natal Press, Pietermaritzburg, South Africa, 1996, 450.
- [4] Ahon GM, Akapo-Akue MJ, Kra AM, Ackah BJ, Zirihi GN and Djaman AJ, Antifungal activity of the aqueous and hydro alcoholic extracts of *Terminalia superba* Engl. on the *in vitro* growth of clinical isolates of pathogenic fungi, Agric. Biol. J. N. Am., 2(2), 2011, 250-257.
- [5] Zirihi GN, Kra AKM and Guede-Guina F, Evaluation of antifungal activity of *Microglossa pyrifolia* (Lamarck) O. Kuntze (Asteraceae) "PYMI" sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, Revue de Médecine et de Pharmacopées Africaines, 17, 2003, 11-18.
- [6] Ajello L, Georg LK, Kaplan W and Kaufman L, Laboratory manual for Medical Mycology, 2nd Edition, John Wiley and sons, New York, USA 1963, 158.
- [7] Guede-Guina F, Vangah-Manda M, Bonga GM and De Souza C, Activité antimicrobienne d'un extrait végétal contre les germes opportunistes au cours du SIDA. Revue de Médecine et de Pharmacopées Africaines, 9, 1996, 13-19.
- [8] Holt RJ, Laboratory test of antifungal drugs, J. Clinical Pathology, 18, 1975, 767-774.
- [9] Guede-Guina F, Kra AKM, Vangah-Manda M, Bonga GM and De Souza C, Inhibition par MISCA-F₂ de la croissance de *Aspergillus fumigatus*; *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*, 3 germes fongiques opportunistes du SIDA, Afrique Biomédicale, 2, 1997, 11-16.
- [10] Kra AKM, Zirihi GN and Guede-Guina F, Evaluation et comparaison des activités antifongiques de *Fagara macrophylla* et de *Strychnos spinosa* sur la croissance *in vitro* de *Candida*

- albicans*, Revue Afrique Biomédicale, 4, 2002, 17-22.
- [11] Ackah JAAB, Kra AKM, Zirihi GN and Guede-Guina F, Evaluation et essais d'optimisation de l'activité anticandidosique de *Terminalia catappa* Linn (TEKAM₃) un extrait de Combretaceae de la pharmacopée Ivoirienne, Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 77, 2008, 120-136.
- [12] Zirihi GN, Kra AKM and Etien DT, Etude botanique et évaluation des activités antifongiques de *Mitracarpus villosus* (MV) (*Rubiaceae*) et *Spermacoce verticillata* (SV) (*Rubiaceae*) sur la croissance in vitro de *Aspergillus fumigatus*, Revue Médecine et de Pharmacologie d'Afrique, 20, 2007, 9-18.
- [13] Eldeen IMS, Elgorashi EE, Mulholland AD, Staden VJ, Anolignan B: A bioactive compound from the roots of *Terminalia sericea*, J. Ethnopharmacology, 103, 2006, 135-138.
- [14] Ouattara S., Kra KAM, Kporou KE and Guede-Guina F, Evaluation de l'activité antifongique des extraits de *Terminalia ivorensis* (TEKAM₂) sur la croissance in vitro de *Candida albicans*, Rev. I voir. Sci Technol., 12, 2008, 205-214.
- [15] Kuete V, Kabopda TK, Ngameni B, Nana F, Tshikalange TE and Ngadjui BT, Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of *Terminalia superba* (Combretaceae), South African J. Botany, 76, 2012, 125-131.



ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *Terminalia superba* (COMBRETACEAE)

Kra Adou Koffi Mathieu^{1,*}, SIAKA Sohro², Ahon Gnamien Marcel¹, KASSI Amian Brise Benjamin³, OUATTARA Sitapha¹, AW Sadat², COULIBALY Adama^{1,4}, SORO Yaya² and DJAMAN Allico Joseph^{1,5}

¹Laboratory of Pharmacodynamics Biochemistry, UFR of Biosciences, Université Felix Houphouët Boigny/ 22 B.P. 582 Abidjan 22 Côte d'Ivoire

²Laboratory of Industrial Process Synthesis, Environment and Energy News, Institut National Polytechnique Felix H. B

³Laboratory Structural Organic Chemistry of UFR SSMT University Felix Houphouët Boigny/22 B.P 582 Abidjan 22 Côte d'Ivoire

⁴Université Péléforo Gon Coulibaly, Korhogo

⁵Department of Clinical and Fundamental Biochemistry, Pasteur Institute, Abidjan, Côte d'Ivoire

Received – January 22, 2015; Revision – February 15, 2015; Accepted – April 05, 2015

Available Online – April 25, 2015

DOI: [http://dx.doi.org/10.18006/2015.3\(2\).162.173](http://dx.doi.org/10.18006/2015.3(2).162.173)

KEYWORDS

Terminalia superba

Anticandidotic

Ellagic acid derivative

ABSTRACT

The aim of the present study was to optimize the anticandidotic activities of *Terminalia superba* (TEKAM₄) and the identification of major compounds present in the most active chromatographic fraction. The hydroethanolic extract TEKAM₄-X₀ was prepared by homogenization employing a blender. Two derivatives extracts of TEKAM₄-X₀ (X₁₋₁ and X₁₋₂) were obtained by a liquid/liquid partition of TEKAM₄-X₀ in a mixture of hexane and water (v/v). Three chromatographic fractions (F₁, F₂ and F₃) from X₁₋₂ were separated by means of Sephadex-LH₂₀ gel filtration chromatography. All the extracts were incorporated to Sabouraud according to the agar slanted double dilution method. Ketoconazole was used as standards for antifungal assay. The entire fractions were tested on the previously prepared medium culture containing 1000 cells of *C. albicans*. Antifungal activity was determined by evaluating antifungal parameters values (MFC and IC₅₀). Lastly, the structures of 2 isolated compounds were elucidated by combination of Flash chromatography and spectroscopic methods, including MS, and multiple stage RMN experiments.

All the article published by Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License Based on a work at www.jebas.org.

* Corresponding author

E-mail: mattykra@yahoo.fr (KraAdouKoffi Mathieu)

Peer review under responsibility of Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences.

The results of the antifungal assays showed that TEKAM₄-X₀, X_{1.1}, X_{1.2} and fractions were capable to inhibit the *in vitro* growth of *C. albicans*. The results of the MFC determination indicated that all extracts shows an inhibition ranging from 97.5 µg/mL to 12.1875 µg/mL on *C. albicans*. Furthermore, all extracts as well as fractions F₁, F₂ and F₃ exhibited a very high level of anticandidosic activity. Among these extracts, fraction F₃ was the most active and it was reported 32 times more active than Ketoconazole. The physicochemical investigations (Flash chromatography, MS, UV, MNR) of F₃, leaded to isolate 2 compounds namely 4,4'-di-*O*-methyllellagic acid and 4-*O*-methyllellagic acid that are the antifungal active principles of this fraction.

1 Introduction

Terminalia superba Engl.& Diels (Combretaceae) used by various traditional healers for the treatment of bacterial, fungal and viral infections in Côte d'Ivoire (Ahon et al., 2012). Furthermore, Kra et al. (2014) reported the antifungal activities and established the antimicrobial virtues of this plant. Results of various investigations have proved that hydro-ethanolic crude extract of *T. superba* stem bark shows strong *in vitro* antifungal activity against *C. albicans*. The present study was leaded to optimize the antifungal activities of the isolated and identified active ingredients of *T. superba* against *C. albicans*.

2 Materials and Methods

2.1 Plant Material

The Plant material was a powder of the stem bark of *T. superba*. The pieces of barks were collected from the Mopri forest (Côte d'Ivoire) during ethnobotanical investigations of 2014. In the first step of the study some samples of *T. superba* were identified and taxonomically authenticated at the Herbarium of the floristic national center of the Felix Houphouët Boigny University (Abidjan, Côte d'Ivoire) by comparison with available specimens (Harvested from Tonkouï mountain on 26th February 1969, L. Aké Assi Number 10477). Furthermore large amount of stem bark were collected and carefully checked to single out all undesired specimen parts. The barks were then cut to small fragments and carefully shade dried during two weeks at ambient temperature under laboratory condition with continuous ventilation away from sunlight and dust. After drying all the vegetal pieces were crushed to fine powder with an electrical grinder. At last, powders were hermetically sealed in polyethylene bags and stored away from light and moisture until used for extraction (Yaye et al., 2012; Ouattara et al., 2013a; Kra et al., 2014).

2.2 Extraction

The hydro-ethanolic crude extract was prepared from the stem bark powder of *T. superba*. For this hundred grams (100g) of bark powder were extracted in one liter solvent with a mixture of ethanol (70%) and water (30%) by homogenization in a

blender. The homogenates obtained were first wrung out in a fabric square and then filtered twice successively with absorbent cotton and once with Whatman 3mm filter paper. The resulting filtrate was concentrated under vacuum by using a Büchi rotary evaporator at 60°C (Zirihhi et al., 2003). Obtained dark powder is the hydro-ethanolic crude extract (35 g) which was codified TEKAM₄-X₀.

After this step, 10g of TEKAM₄-X₀ were submitted to liquid/liquid partition in 400 mL of a hexane/water mixture (v/v, 50/50). After decantation, these two phases were separated and concentrated under vacuum using a Büchi rotary evaporator at 60h°C which gave two extracts: X_{1.1} (hexane phase) and X_{1.2} (aqueous phase) (Ackah et al., 2008; Yaye et al., 2012; Ouattara et al., 2013c).

On the basis of the antimicrobial investigations of the above extracts, 2 g of X_{1.2} were subjected to column chromatography on Sephadex-LH₂₀ gel and eluted with a MeOH gradient system. The flow velocity was 0.125 mL/min. Forty sub-fractions (SF₁ to SF₄₀) of 20 mL each were collected separately. All these fractions were then pooled following analytic TLC investigations in three new major fractions: F₁ (sub-fractions 1 to 6: 120 mL), F₂ (sub-fractions 7 to 18: 240 mL) and F₃ (sub-fractions 19 to 40: 440 mL). TLC plates (Mcherey-Nagel, ALUGRAM[®] SILG/UV₂₅₄ 0.2mm silca gel 60 Å) were visualized under UV light at 254-365 nm and/or spraying them with appropriated reagents (Meyer, Dragendorff, Liebermann Burchard, NEU, Vanilline sulfuric). The antifungal activity of the 3 fractions was evaluated against *C. albicans*.

2.3 Fungal germs tested

The tested fungus was the clinical and identified strain of *C. albicans* (n° 896/AB of 10.01.2000). This strain was provided by the Laboratory of Mycology Medical Sciences Faculty Felix Houphouët Boigny University (Abidjan, Côte d'Ivoire). *C. albicans* is an opportunistic fungus (Abi-Said et al., 1997; Agoumi, 2000). It is a normal human commensalist but it becomes pathogenic when the immune system fails (Chabasse, 1994) and caused about 83% of infections (Agoumi, 2000; Develoux and Bretagne, 2005).

2.4 Antimicrobial Test

The antifungal activities were assessed by determining antifungal parameters values which are MFC (minimal fungicidal concentration; concentration that inhibit 99.99% of growth in the experimental tube compared to the witness tube of growth control) and IC₅₀ (Concentration for 50% of inhibition; graphically determined) around each assay. For each extract six replicate trials were conducted against *C. albicans* and Ketoconazole was used as standards for antifungal assay. The antifungal tests were carried out on culture medium Sabouraud (Biomérieux, 51078 Ref: 777666501).

The incorporation of plant extracts in to the agar was made using the agar slanted double dilution method (Ajello et al., 1963; Holt, 1975; Zirihi et al., 2003). After that, all ten tubes of each series were sterilized in an autoclave at 121°C for 15 minutes and then inclined with small base at room temperature to allow their cooling and solidification of the agar. All extracts and Ketoconazole were tested separately and their concentrations ranged from 390 µg/mL to 0.19043 µg/mL with a geometrical connection of reason ½.

Fungal germs culture on previously prepared slants agar was made by inoculating 1000 cells of *C. albicans* (Holt, 1975). These cultures were incubated at 30°C for 48 hours. At the end of the incubation period, colonies were counted with the help of colony counter pen (Ceinceware number 23382). The growth in the 10 experimental tubes was expressed as survival percentage, calculated compared to 100% of growth in the witness tube of growth control. The formula of this calculation has been mentioned below. The processing of these data permitted to calculate the minimal fungicidal concentrations (MFC) values. It also made it possible to plot the curves of activity of the extracts and the graphically determination of the concentrations for 50% of Inhibition (IC₅₀) values. Formula to calculate the survival percentage -

$$S = \frac{n}{N} \times 100$$

Where:

S - The survival (%)

N - Number of colony in one experimental tube and

N - Number of colony in the witness tube of growth control

2.5 Spectral analysis

The F₃ fraction was purified by the flash chromatography GRACE Reveleris Flash System device by using MeOH-CH₂Cl₂ as eluents (RediSep column: Silica 12g ; flow rate : 20 mL/min). This procedure resulted in the isolation of 2 aromatic polyphenolic compounds A and B. Finally these A and B were submitted to SM, and NMR spectral analysis. The 1D and 2D NMR spectra (¹H and ¹³C NMR, COSY, HSQC and HMBC) were performed using a Bruker 400MHz spectrometer. Spectra are recorded in DMSO-d₆. The carbon type (CH₃, CH₂ and CH) was determined by DEPT-135 experiments. ESIMS (negative-ion mode) was carried out on a SM-QP 2010 of type Shimadzu spectrometer. UV spectra were recorded on a Varian Cary 300 Bio spectrophotometer.

3 Results and Discussion

The results were summarized in the form of curves of sensitivity, tables, MS and MNR spectra. The curves illustrate the evolution of the survival of *C. albicans* depending on the variation of the concentrations of the extracts (figure 1). Table 1 summarizes all the values of the antifungal parameters (MFC and the IC₅₀). Figures 2 and 3 illustrate the NMR spectra, while table 2 summarizes all the values of the chemical shifts. The structures of compounds A and B are shown at figure 2. The chromatogram of flash chromatography GRACE shows a peak at 36 minutes with a shoulder at 40 minutes indicating the compound A and B.

Table 1 Values of antifungal parameters of the *T. superba* extracts and Ketoconazole.

Tested Substances	Values of antifungal parameters against <i>Candida albicans</i>		Ratio CMF X _N /X _{F3}
	CI ₅₀ (µg/mL)	CMF (µg/mL)	
TEKAM ₄ -X ₀	30.08	97.5	8
TEKAM ₄ -X ₁₋₁	18	195	16
TEKAM ₄ -X ₁₋₂	10.225	48.75	4
TEKAM ₄ -F ₁	10	97.5	8
TEKAM ₄ -F ₂	7	24.375	2
TEKAM ₄ -F ₃	3	12.1875	1
Ketoconazole	18.455	390	32

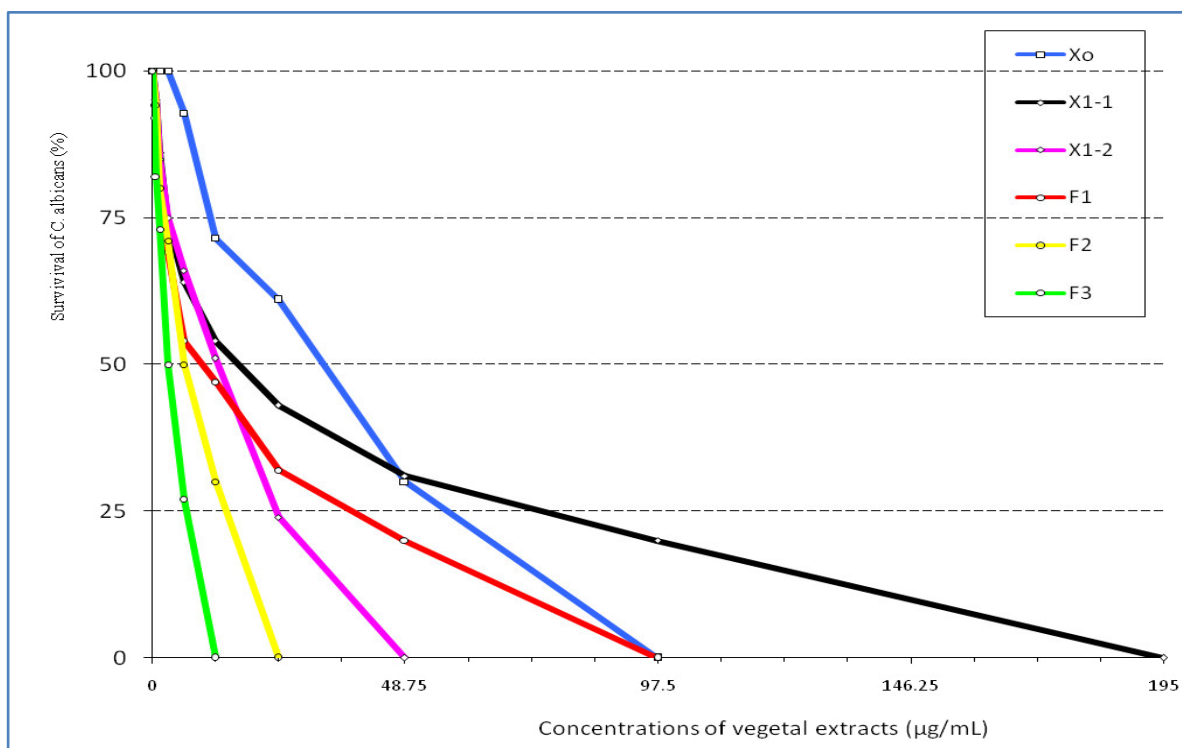
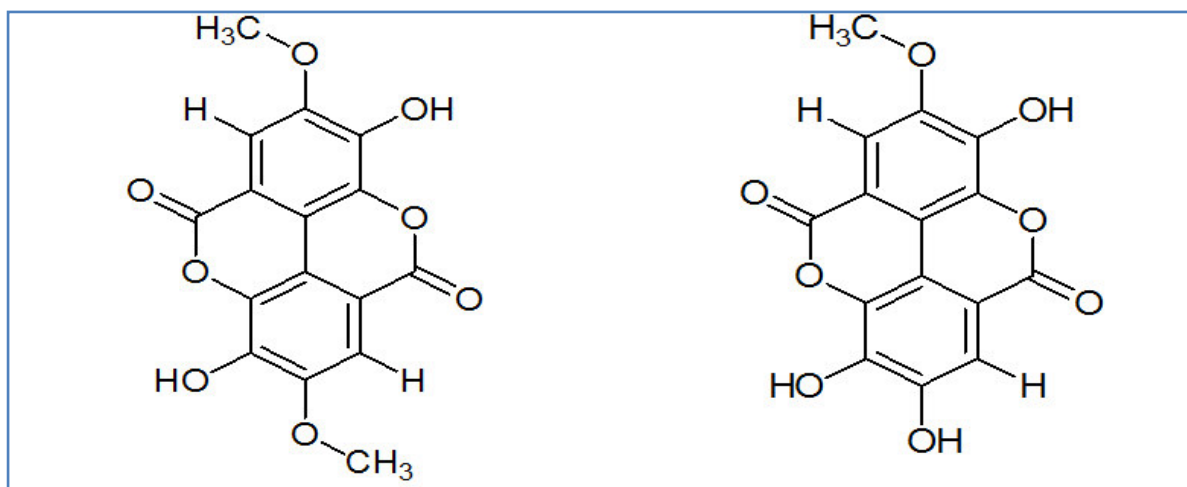


Figure 1 Sensitivity of *C. albicans* against the extracts (X₀, X_{1,1}, X_{1,2}, F₁, F₂ and F₃) from *T. superba*.

Table 2 ¹H and ¹³C-NMR data of active ingredient compounds A and B.

Compound A			Compound B		
Position	¹ H-NMR δ H (ppm)	¹³ C-NMR δ C (ppm)	Position	¹ H-NMR δ H (ppm)	¹³ C-NMR δ C (ppm)
1/1'	—	111.62	1	—	111.60
2/2'	—	141.19	2	—	141.16
3/3'	—	152.19	3	—	152.16
4/4'	—	140.19	4	—	140.17
5/5'	7.51 s (2H)	111.42	5	7.55 s (1H)	111.40
6/6'	—	112.09	6	—	112.07
7/7'	—	158.46	7	—	158.44
3 OH	10.77 s (2H)	152.19	3 OH	10.77 s (1H)	152.16
4/4' OMe-	4.04 s (6H)	60.94	4 OMe-	4.09 s (3H)	60.93
			1'	—	112.27
			2'	—	136.32
			3'	—	148.07
			4'	—	139.59
			5'	7.50 s (1H)	110.15
			6'	—	107.53
			7'	—	159.09
			3'OH	10.76 s (1H)	148.07



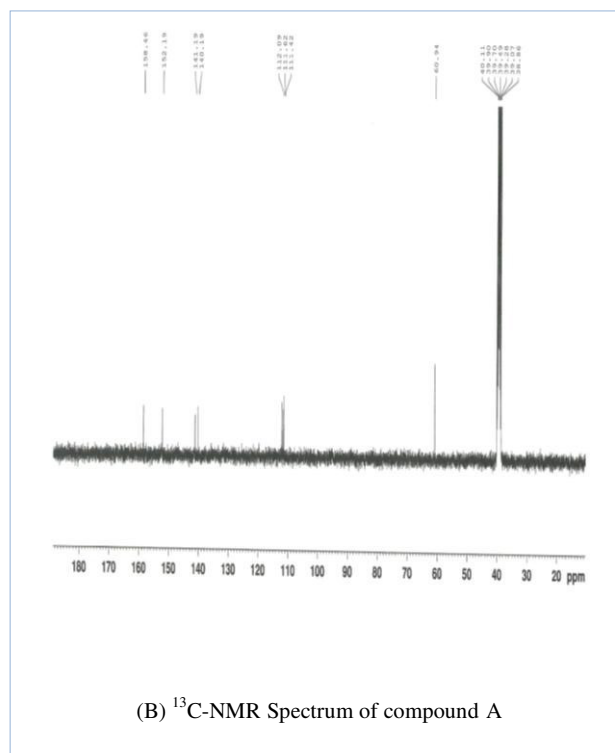
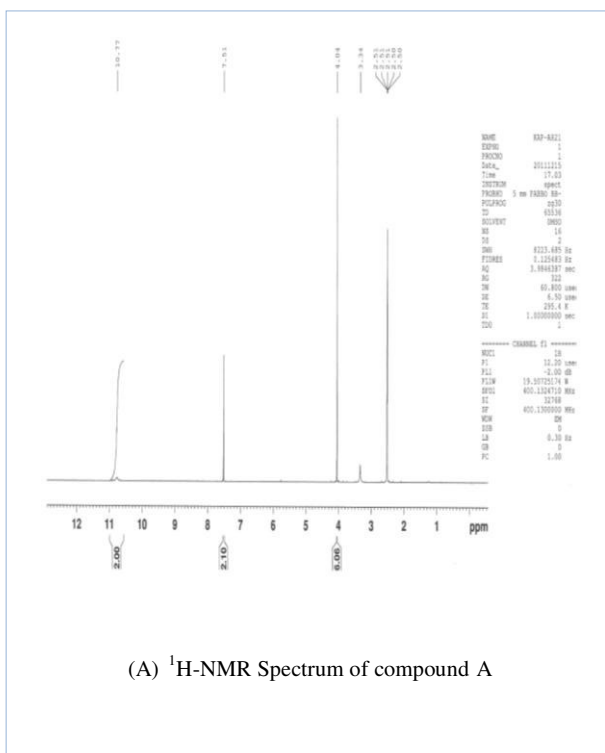
Compound A

4,4'-di-*O*-methylellagic acid
 ESIMS m/z 329 $[M-H]^-$; $C_{16}H_{10}O_8$;
 yellow crystals; UV λ_{max} 245.93 nm, 369 nm;
 1H -NMR and ^{13}C -NMR: see Table 2

Compound B

4-*O*-methylellagic acid
 ESIMS m/z 315 $[M-H]^-$; $C_{15}H_8O_8$;
 yellow crystals; UV λ_{max} 245.93 nm, 369 nm;
 1H -NMR and ^{13}C -NMR: see Table 2.

Figure 2 Structures of compounds A and B.



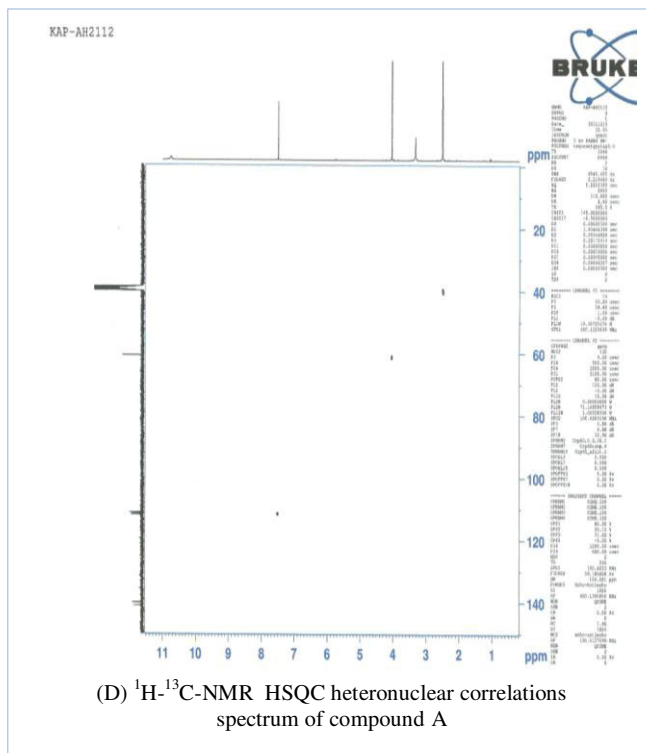
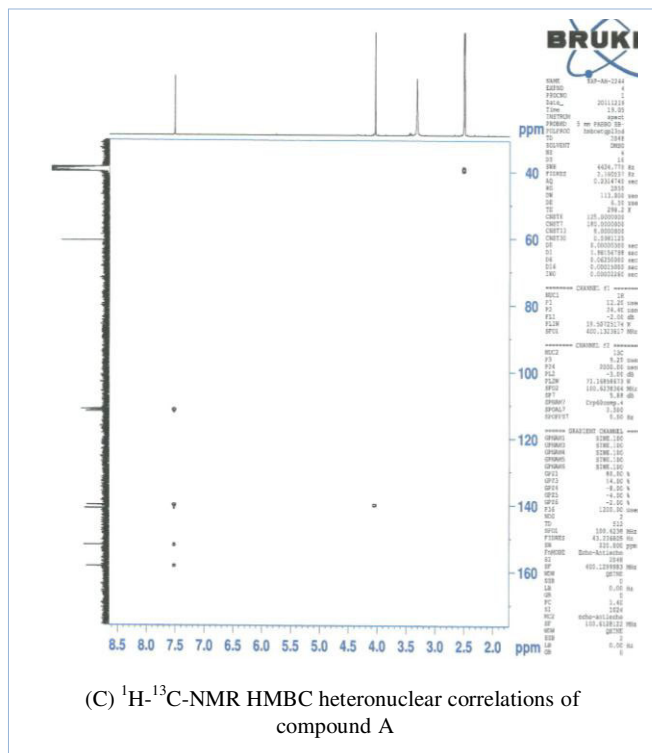
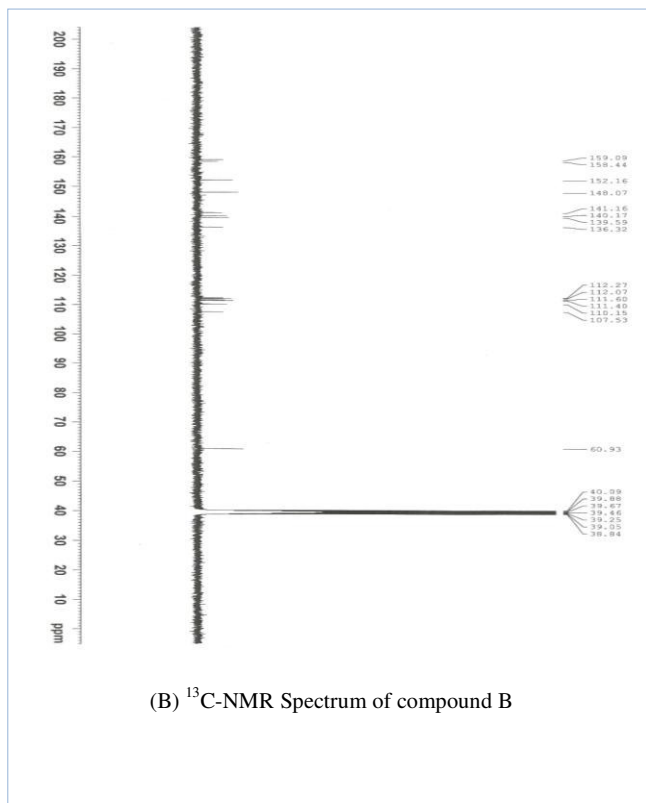
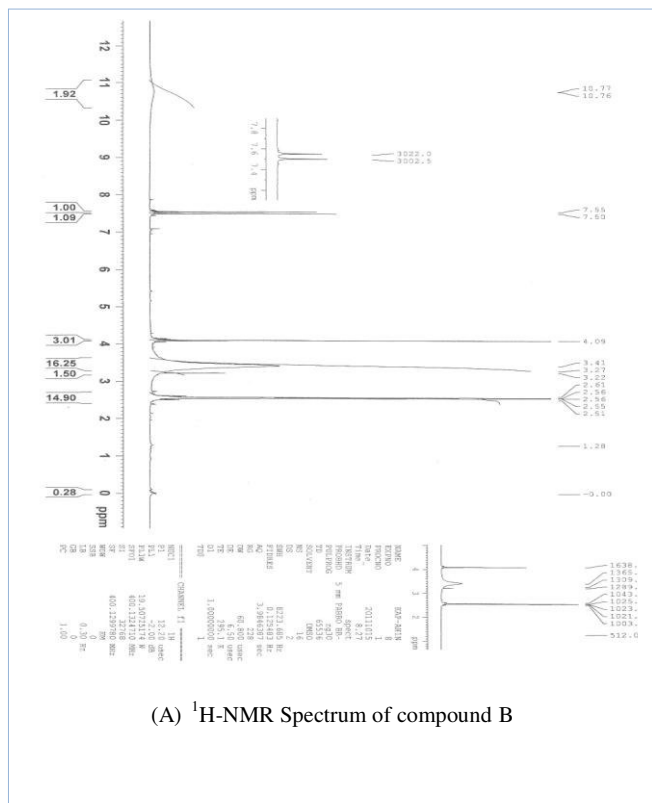


Figure 3 NMR, HSQC and HMBC spectral data of compound A.



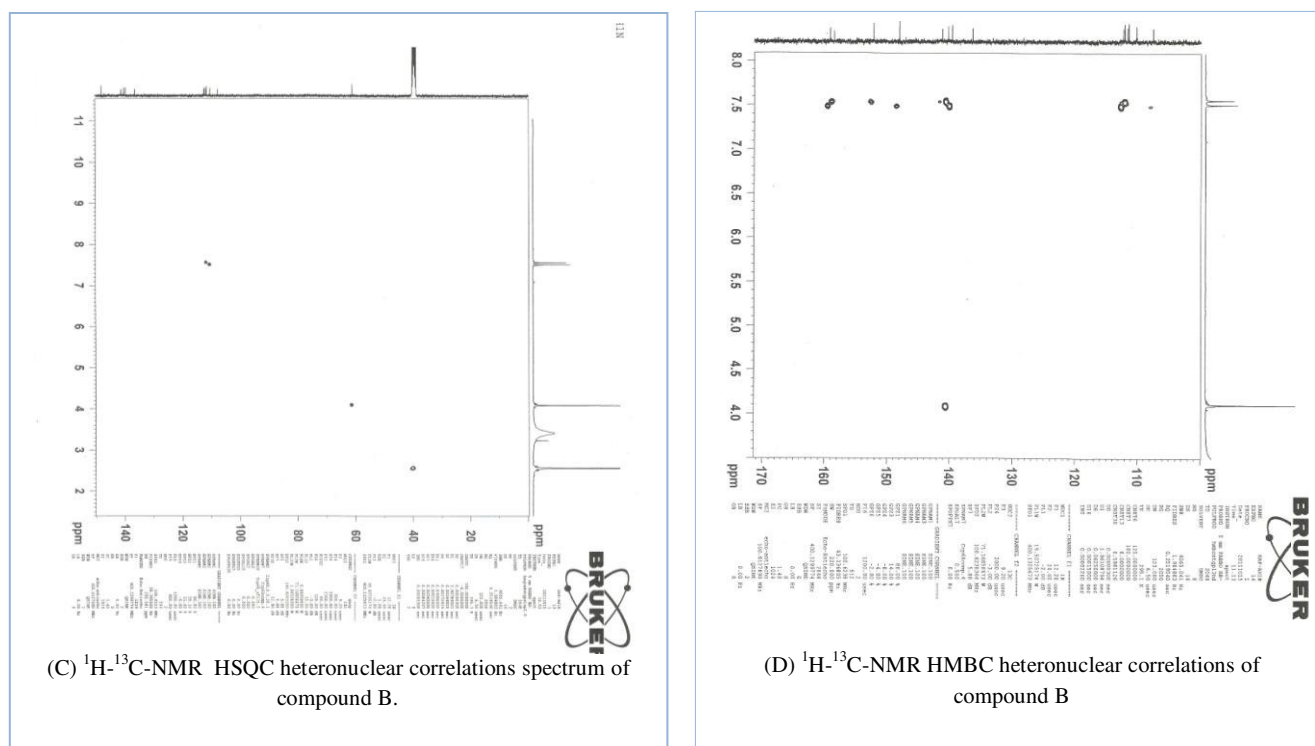


Figure 4 NMR, HSQC and HMBC spectral data of compound B.

This study was conducted to optimize the antifungal activity of a hydro-ethanolic extract of *T. superba* against *C. albicans*. Analysis of results revealed that *C. albicans* is sensitive to all the tested extracts and shows a significant *in vitro* inhibition (figure 1, table 1). The results showed that the sensitivity of *C. albicans* to the extracts is concentration dependent. However the levels of these antifungal activities are variable from one extract to another, revealing that they do not have the same content of active principles. Analysis of MFC values (table 1) reveals that among the extracts obtained from partition of X_0 (the crude extract), X_{1-1} was the less active because it generated the highest MFC values (195 $\mu\text{g}/\text{mL}$). This weak antifungal potency of X_{1-1} is noticeable in figure 1. Conversely, X_{1-2} produced the lowest MFC values (48.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) meaning the strongest anticandidosic activity. According to the activity classification scale of Kra et al. (2014), both extracts exhibited a very high level of antifungal activity.

Moreover, on the basis of MFC values, the comparison of the antifungal activities shows that X_{1-2} was respectively 4 times more active than X_{1-1} and 2 times more active than X_0 (MFC=97.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). So results revealed that the liquid-liquid partition permitted to optimize the anticandidosic activity of X_0 . Similar type of finding was reported by Zeidan et al. (2013) while working on *C. albicans* they also reported that ethanolic extract of *Ficus platyphylla* had an interesting anticandidosic activity (0.5 mg/mL). However comparison of its performance with that of $\text{TEKAM}_4\text{-X}_0$ shows that X_0 is 5

times more active. $\text{TEKAM}_4\text{-X}_0$ is also 3.8 times more active than the methanol leaf extract (0.37 mg/mL) from *Rubus sanguineus* recorded against *C. albicans* by Zeidan et al. (2013).

Research carried out on *Terminalia* species also showed that alcoholic extracts exhibited excellent antifungal activities against fungal strains including *C. albicans* (Ahon et al., 2012; Ouattara et al., 2013a, Ouattara et al., 2013b; Ouattara et al., 2013c; Majgaine & Verma, 2013; Kra et al., 2014). Furthermore, Ackah (2009) has been reported that hydroethanolic extract of *T. catappa* trunk bark inhibit the *in vitro* growth of *C. albicans*. However comparison of the anticandidosic activity of this extract (MFC=190 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with that of $\text{TEKAM}_4\text{-X}_0$, reveals that the hydro-ethanolic extract (MFC=97.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) from *T. superba* is 1.9 times more active. $\text{TEKAM}_4\text{-X}_{1-2}$ is also 2.5 to 41 times more active than extracts from *Terminalia avicennioides* tested by Baba-Moussa et al. (1999) on *C. albicans*.

Analysis of data related to fractions obtained by chromatography shows that F_3 (MFC=12.1875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and IC_{50} =3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) is singularly the most active, because it produced the lowest MFC value against *C. albicans* compared with the other extracts. On the basis of MFC values, it is respectively 2 times more active than F_2 (MFC=24.375 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 4 times more active than X_{1-2} , 8 times more active than F_1 and X_0 (MFC=97.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and, 16 times more active

than X₁₋₁. Finally F₃ was reported 32 times more active than ketoconazole the reference antifungal drug. So this extractive method including successively a hydro-ethanolic extraction of the crude extract, a liquid-liquid partition (hexane/water) and a gel filtration chromatography on Sephadex-LH₂₀ gel, is a good process to optimize the antifungal activity of extracts from *T. superba*. This method permitted us to achieve the F₃ fraction which is the extract that contains the active principles.

Moreover, from the comparison of the whole data indicated that all the six extracts of *T. superba* are noticeably more active than ketoconazole. As a matter of fact, ketoconazole (MFC=390 µg/mL) was respectively two times less active than X₁₋₁, four times less active than X₀ and F₁, eight times less active than X₁₋₂ and sixteen times less active than F₂. In addition all the 6 extracts of *T. superba* exerted a very high level of antifungal activity. These obtained data highlighted the significant antifungal potency of extract from *T. superba*. The elucidation of the relatively high MFC value (390 µg/mL) of ketoconazole against *C. albicans* was revealed by results of works carried out on the mechanism of its weak sensitivity to azole. This resistance to azole is characterized by several stratagems including activation of multiple efflux pumps repressing the antifungal drug (Hitchcock, 1993; Sanglard et al., 1995; White et al., 2002), a modification of the target (such as the alteration of the enzyme 1.4- α -demethylase) and overproduction of the target (Hitchcock, 1993; Kelly et al., 1995; Albertson et al., 1996).

Furthermore, on the basis of the MFC values, the comparison with the anticandidosic activity of fraction MISCA-F₈ (MFC=781 µg/mL) from *M. scaber* prepared by Kporou et al. (2010), shows that TEKAM₄-F₃ (MFC=12.1875 µg/mL) is 64 times more active. The comparison also shows that TEKAM₄-F₃ has an antifungal activity potency 1.79 times greater than that of fraction TEKAM₁-F₉ (CMF=12.1875 µg/mL; IC₅₀=5.37 µg/mL) prepared by Yayé et al. (2012) from *T. mantaly*. On the same basis of comparison, the anticandidosic activity of TEKAM₄-F₃ is 2020 times greater than that of flavonoids (MFC=25000µg/mL) isolated from the *Olea cuspidata* dichloromethane extract tested by Majgaine & Verma (2013).

On the other hand, TEKAM₄-F₃ is 2.4 times less active than TEKAM₃-F₁₂ (MFC=5 µg/mL) prepared by Ackah et al. (2008) from a trunk bark extract of *T. catappa*. Fraction F₈ (MFC=6.09 µg/mL, IC₅₀=1.8 µg/mL) prepared by Ouattara et al. (2013b) from the stem bark of *T. ivorensis* is 2 times more active than TEKAM₄-F₃. In the chemical aspect, fractions F₈ of *T. ivorensis* (triterpenes and flavonoids) are different from that of TEKAM₄-F₃. Ultimately, the F₃ fraction shows the highest antifungal activity of TEKAM₄-X₀. Furthermore, the activities of X₀, X₁₋₁, X₁₋₂ and the three fractions (F₁, F₂, F₃) tested could be considered as very important since the *C. albicans* strain tested was resistant to commonly used antifungal drugs (Kah, 2011 ; Hope et al., 2012).

With respect to the physico-chemical aspect, after extraction and purification analysis, two compounds A and B were isolated. Compound A was obtained as yellow crystals and was soluble in methanol. The ESIMS spectrum (Annex 6) of compound A revealed a quasi-molecular ion peaks [M-H]⁻ at *m/z* 329 indicating a molecular weight of 330 Da. Its ultraviolet (UV) spectrum revealed the presence of α and β -unsaturated Ketones (λ_{\max} 245.93 nm) and phenolic ring (λ_{\max} 369 nm). This spectrum (λ_{\max} 245.93 nm, 369 nm) was similar to that of ellagic acid derivatives (Khac et al., 1990), suggesting that compound A has an ellagic acid skeleton. These data suggested a molecular formula of C₁₆H₁₀O₈.

The ¹H-NMR spectrum (figure 3a) of compound A revealed two protons as singlet at δ_H 7.51 ppm, assignable to aromatic protons H-5 and H-5' respectively, by comparing with the ¹H-NMR data of ellagic acid (Nduji & Okwute, 1988; Khac et al., 1990; Adigun et al., 2000 ; Serafin et al., 2007; Thitilertdecha et al., 2010). The ¹H-NMR spectrum of compound A also showed methoxy protons at δ_H 4.04 ppm (6H, s), which gave correlations, in the HSQC spectrum (figure 3d), with carbon signal δ_C 60.94ppm. The HMBC (figure 3c) correlation between methyl group at δ_H 4.04 ppm (O-CH₃) and carbon δ_C 140.19ppm (C-4) confirmed the position of methoxy groups. So, cross analysis of spectra of HMBC and HSQC clearly confirmed the linkage of the methoxy groups to carbons C-4 and C-4'. The ¹³C-NMR spectrum (figure 3b) of compound A showed two signal at δ_C 158.46 and 152.19ppm assignable to carbonyl carbons C-7 and C-7' respectively. Finally, analysis of the whole data indicates unequivocally that A is 4,4'-di-O-methylellagic acid (figure 2).

Compound B was also obtained as yellow crystals and was soluble in methanol. The ESIMS spectrum of compound B revealed a quasi-molecular ion peaks [M-H]⁻ at *m/z* 315 indicating a molecular weight of 316. Analysis of its spectral data reveals that A and B showed almost identical ¹³C-NMR and ¹H-NMR data, suggesting that compound B also has an ellagic acid skeleton. These data showed that the corresponding molecular formula of B is C₁₅H₈O₈.

The ¹H-NMR spectrum (figure 4a) of compound B revealed two protons as singlets at δ_H 7.55 and 7.50 ppm, assignable to aromatic protons H-5 and H-5' respectively. The ¹H-NMR spectrum of compound B showed also methoxy protons at δ_H 4.09ppm (3H, s), which gave correlations, in the HSQC spectrum, with carbon signal δ_C 60.93ppm. The HMBC spectrum showed the correlation between methyl group at δ_H 4.09 ppm (O-CH₃) and carbon δ_C 140.17ppm (C-4) confirmed the position of methoxy group. So, HMBC (figure 4d) and HSQC (figure 4c) experiments clearly showed it to be linked to C4 of the ellagic skeleton.

The ¹³C-NMR spectrum of compound B showed two signal at δ_C 159.09 and 158.44ppm assignable to carbonyl carbons C-7 and C-7' respectively. From the analysis of the whole NMR

and MS data, it result that compound B is 4-*O*-methyllellagic acid (C₁₅H₈O₈) and has molecular weight of 316 Da (figure 2).

Finally the active principles of fraction F₃ are 4,4'-*di-O*-methyllellagic acid (compound A) and 4-*O*-methyllellagic acid (B). Compounds A and B are reported here for the first time from the Ivorian *T. superba* species. These A and B compounds were identified as other active principles of plants from the genus *Terminalia* by the present study. A number of ellagic acid derivatives close to A and B were also isolated from the stem bark of *T. superba* by some authors (Kamtchouing et al., 2006 ; Tabopda et al., 2008 ; Kueté et al., 2010).

In addition, antimicrobial properties of *O*-methyllellagic acid derivatives were already proved by previous reports such as works of Adigun et al. (2000) and Kueté et al. (2010) whose investigations proved 3,4'-*di-O*-methyllellagic acid, 3'-*O*-β-D-xylopyranoside and 4'-*O*-galloyl-3,3'-*di-O*-methyllellagic acid 4-*O*-β-D-xylopyranoside isolated from a *T. superba* stem bark methanolic extract to have a large spectrum of both antibacterial and antifungal activities. As regard their antimicrobial properties the results from this study are in accordance with works of Kueté et al. (2010).

The antimicrobial activity has also been revealed for a number of *Terminalia* species such as *T. catappa* (Kloucek et al. 2005 ; Ackah et al., 2008), *T. chebula* (Bonjar 2004), *T. glaucescens* (Magassouba et al., 2007), *T. ivorensis* (Ouattara et al., 2009; Ouattara et al., 2013a; Ouattara et al., 2013b ; Ouattara et al., 2013c), *T. mantaly* (Yayé et al., 2011; Yayé et al., 2012 ; Ackah et al., 2014), *T. macroptera* (Conrad et al., 1998 ; Silva et al., 2000), *T. sericea* (Eldeen et al., 2006 ; Steenkamp et al., 2007), *T. superba* (Ahon et al., 2011 ; Ahon et al., 2012 ; Kra et al., 2014).

Concerning their mode of action, ellagic acid and its derivatives have been found to complex proteins (Scalbert, 1991 ; Haslam, 1996 ; Stern et al., 1996), inactivate microbial adhesions (Haslam, 1996) enzymes and cell envelope transport proteins (Scalbert, 1991 ; Haslam, 1996 ; Stern et al., 1996).

Conclusion

In this study, it has been demonstrated that it is possible to obtain extracts with high levels of anticandidosic activity and to optimize this activity by means of partitions followed by column chromatography separation. This study also showed that *C. albicans* is sensitive to all the extracts in dose-response relationship. All the 6 extracts exerted anticandidosic activity with more or less raised performance levels. All extracts from *T. superba* produced very high antifungal activity levels. It proves and allows the understanding of the foundation of the use of several organs of *T. superba* in traditional recipes against infections. Among these extracts, fraction F₃ was not only the most active but it also contains the active principles that are 4,4'-*di-O*-methyllellagic acid (compound A) and 4-*O*-

methyllellagic acid (B). These compounds allow fraction F₃ to be 32 times more active than Ketoconazole. These molecules could expand the therapeutic arsenal and make it more effective. They could also serve as templates for synthesizing more active molecules. The overall results provide promising baseline information for the potential use of fractions F₃ as well as the two isolated compounds in the treatment of candidiasis, fungal and other bacterial infections. However, this will further be confirmed by pharmacological and toxicological studies.

Acknowledgements

The authors are grateful to:

- Professor Ouhon Jean and members of the Laboratory of Parasitology and Mycology of the Faculty of Medical Sciences of the Felix Houphouët-Boigny University for having provided the germs used in this study.
- Members of the Laboratory of Biochemistry-Pharmacodynamic for their valuable contribution.

The authors acknowledge the technical support of the Herbarium of the floristic national center of the Felix Houphouët-Boigny University (Abidjan, Côte d'Ivoire), that of Professor Laurent Aké-Assi of the Botany Laboratory (Abidjan, F H B University).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S (1997) The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clinical Infectious Diseases* 24 : 1122-1128.
- Ackah JAAB (2009) Evaluation et essai d'optimisation de l'activité antifongique de *Terminalia catappa* Lin., une combretacée de la pharmacopée ivoirienne sur la croissance in vitro de *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* et *Trichophyton mentagrophytes*. Thèse de Doctorat d'Université. UFR Biosciences, Université de Cocody Abidjan p. 241
- Ackah JAAB, Kokora AP, Yaye YG, Bahi C, Loukou YG, Coulibaly A, Djaman AJ (2014) Action Spectrum of *Terminalia mantaly* on the in vitro Growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars* 3: 795-800.
- Ackah JAAB, Kra AKM, Zirih GN, Guédé-Guina F (2008) Evaluation et essais d'optimisations de l'activité anticandidosique de *Terminalia catappa* Linn. (TEKAM3), un extrait de combretacée de la pharmacopée Ivoirienne. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 77:120-36.

- Adigun JO, Amupitan JO, Kelly DR (2000) Isolation and investigation of antimicrobial effect of 3,4,3'-Tri-O-methylflavellagic acid and its glucoside from *Anogeissus leocarpus*. Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia 14: 169-74.
- Agoumi A, El-Mellouki W, Chabaa L, Tligui H, Belmekki A, Louzi L, Limimouni B, Benjelloun L (2000) Etude de la prévalence des infections fongiques systémiques dans les services hospitaliers à risque. Espérance Médicale 7 : 1-6.
- Ahon GM, Kra AKM, Aw S, Zirihi GN, Ackah BAAJ, Siaka S, Kporou KE, Akakpo-Akue MJ, Djaman AJ (2012) Improvement of the antifungal activity of the hydro-alcoholic extract of *Terminalia superba* on the *in vitro* growth of three pathogenic fungi. International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences 1: 1434-1442.
- Ahon MG, Akapo-Akue JM, Kra MA, Ackah JB, Zirihi NG, Djaman JA (2011) Antifungal activity of the aqueous and hydro alcoholic extracts of *Terminalia superba* Engl. on the *in vitro* growth of clinical isolates of pathogenic fungi. Agriculture and Biology Journal of North America 2: 250-257.
- Ajello L, George Lk, Kaplan W, Kaufman L (1963) Laboratory Manual for Medical Mycology 2nd ed. New York, USA: John Wiley and Sons, Inc 20-35.
- Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF (1996) Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40: 2835-2841.
- Baba-Moussa F, Akpagana K, Bouchet P (1999) Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology 66 : 335-338.
- Bonjar GH (2004) Inhibition of clotrimazole-resistant *Candida albicans* by plants used in Iranian folkloric medicine. Fitoterapia 75:74-6.
- Chabasse D (1994) Les nouveaux champignons opportunistes apparus en médecine. Revue générale. Journal de Mycologie Médicale 4 : 9-28.
- Conrad J, Vogler B, Klaiber I, Roos G, Walter U, Kraus W (1998) Two triterpene ester from *Terminalia macroptera* bark. Phytochemistry 48: 647-650.
- Develoux M, Bretagne S (2005) Candidoses et levures diverses. Encyclopédie médico-chirurgicale. Maladies infectieuses 2:318-27.
- Eldeen IM, Elgorashi EE, Mulholland DA, Van SJ (2006) Anolignan B: A bioactive compound from the roots of *Terminalia sericea*. Journal of Ethnopharmacology 103:135-138.
- Haslam E (1996) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. Journal of Natural Products 59: 205-215.
- Hitchcock CA (1993) Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents. Biochemical Society Transactions 21: 1039-1047.
- Holt RJ (1975) Laboratory tests of antifungal drug. Journal of Clinical Pathology 28: 767-774.
- Hope WW, Castagnola E, Groll AH, Roilides E, Akova M, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bassetti M, Bille J, Cornely OA, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Garbino J, Herbrecht R, Jensen HE, Kullberg BJ, Lass-Flörl C, Lortholary O, Meersseman W, Petrikos G, Richardson MD, Verweij PE, Viscoli C, Ullmann AJ (2012) ESCMID Guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by *Candida* spp. Clinical Microbiology and Infections 18: 9-18 doi: 10.1111/1469-0691.12040.
- Kah N (2011) Dermatophyties, candidoses et autres mycoses superficielles : rôles du pharmacien d'officine. Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy Pp 1-134.
- Kamtchouing P, Kahpui SM, Dzeufiet PD, Tédong L, Asongalem EA, Dimo T (2006) Anti-diabetic activity of methanol/methylene chloride stem bark extracts of *Terminalia superba* and *Canarium schweinfurthii* on streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 104: 306-309.
- Kelly SL, Lamb DC, Corran AJ, Baldwin BC, Kelly DE (1995) Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 1,4-alpha-methylergosta-8,24(28)-dien-3-beta,6-alpha-diol. Biochemical and Biophysical Research Communications 207: 910-915.
- Khac DD, Tran-Van S, Campos AM, Lallemand JY, Fetizon M (1990) Ellagic compounds from *Diplopanax stachyanthus*. Phytochemistry 29: 251-56.
- Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlckova E, Kokoska L. (2005) Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. Journal of Ethnopharmacology 99 : 309-312.
- Kporou KE, Kra AKM, Ouattara S, Guédé-Guina F, Djaman AJ (2010) Amélioration par fractionnement chromatographique de l'activité anticandidosique d'un extrait hexanique de *Mitracarpus scaber* Zucc. sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans* et *Candida tropicalis*. Phytothérapie 8: 290-294.

- Kra AKM, Ahon GM, Djo-Bi D, Ouattara S, Coulibaly A, Djaman AJ (2014) Antifungal activities of medicinal plants extracts of Ivorian pharmacopoeia. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* 3: 159-166.
- Kuete V, Tabopda TK, Ngameni B, Nana F, Tshikalange TE, Ngadjui BT (2010) Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of *Terminalia superba* (Combretaceae). *South African Journal of Botany* 76: 125-131.
- Magassouba FB1, Diallo A, Kouyaté M, Mara F, Mara O, Bangoura O, Camara A, Traoré S, Diallo AK, Zaoro M, Lamah K, Diallo S, Camara G, Traoré S, Kéita A, Camara MK, Barry R, Kéita S, Oularé K, Barry MS, Donzo M, Camara K, Toté K, Berghe DV, Totté J, Pieters L, Vlietinck AJ, Baldé AM (2007) Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 114: 44-53.
- Majgaine P, Verma LD (2013) Antifungal Activity of *Olea cuspidata* and *Olea gladiifera* Linn. *IOSR Journal of Pharmacy* 3: 20-23.
- Nduji AA, Okwute SK (1988) Co-occurrence of 3,3',4'-tri-O-methylflavellagic acid and 3,3'-di-Omethyllellagic acid in the bark of *Anogeissus schimperi*. *Phytochemistry* 27: 1548-50.
- Ouattara S, Kporou KE, Kra AKM, Yapi HF, Zirihi GN, N'guessan JD, Bidié AP, Djaman AJ (2013b) Optimization of the in vitro antifungal activity of hydroalcoholic extract of *Terminalia ivorensis* A. Chev. *Journal of Natural Products and Plants Resources* 3: 29-33.
- Ouattara S, Kporou KE, Kra AKM, Zirihi GN, N'guessan JD., Coulibaly A, Djaman AJ (2013a) Antifungal activities of *Terminalia ivorensis* A. Chev. bark extracts against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* 2: 49-52.
- Ouattara S, Kra AKM, Kporou KE, Guédé-Guina F (2009) Evaluation de l'activité antifongique des extraits de *Terminalia ivorensis* (TEKAM 2) sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 78:302-10.
- Ouattara S, Kra AKM, Kporou KE, Zirihi GN, Yapi HF, N'guessan JD, Djaman AJ (2013c) Comparative study chromatographic fractions activities from *Terminalia ivorensis* and ketoconazole as standard antifungal on *in vitro* growth of *trichophyton mentagrophytes var. interdigitale*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 3: 18-21
- Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J (1995) Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* isolates from AIDS Patients Involve Specific Multidrug Transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 2378-2386.
- Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30 : 3875-3883.
- Serafin C, Nart V, Malheiros A, de Souza MM, Fischer L, Delle Monache G, Della Monache F, Cechinel Filho V (2007) Bioactive Phenolic Compounds from Aerial Parts of *Plinia glomerata*. *Zeitschrift für Naturforschung* 62:196-200.
- Silva O, Gomes ET, Wolfender JL, Marston A, Hostettmann K (2000) Application of High Performance Liquid Chromatography Coupled with Ultraviolet Spectroscopy and Electrospray Mass Spectrometry to the Characterisation of Ellagitannins from *Terminalia macroptera* Roots. *Pharmaceutical Research* 17: 1396-1401.
- Steenkamp V, Fernandes AC, Van Rensburg CEJ (2007) Antibacterial activity of Venda medicinal plant. *Fitoterapia* 78: 561-564.
- Stern JL, Hagerman AE, Steinberg PD, Mason PK (1996) Phorotannin-protein interactions. *Journal of Chemical Ecology* 22: 1887-1899.
- Tabopda TK, Ngoupayo J, Liu J, Ali MS, Khan SN, Ngadjui BT, Luu B (2008) Alpha-Glucosidase inhibitors ellagic acid derivatives with immunoinhibitory properties from *Terminalia superba*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 56: 847-850.
- Thitilertdecha N, Teerawutgulrag A, Kilburn JD, Rakariyatham N (2010) Identification of Major Phenolic Compounds from *Nephelium lappaceum* L. and Their Antioxidant Activities. *Molecules* 15: 1453-1465.
- White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA (2002) Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 1704-1713.
- Yayé YG, Ackah JAAB, Kra AKM, Djaman AJ (2012) Antifungal activity of different extracts of *Terminalia mantaly* H. Perrier on the *in vitro* growth of *Aspergillus fumigatus*. *European Journal of Sciences Resources* 82: 132-138.
- Yayé YG, Kra AKM, Ackah JBAA, Djaman AJ (2011) Evaluation de l'activité antifongique et essais de purification des principes actifs des extraits de *Terminalia mantaly* (H. Perrier), une combretacée sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 80:953-64.
- Zeidan R, Oran S, Khleifat K, Matar S (2013) Antimicrobial activity of leaf and fruit extracts of Jordanian *Rubus sanguineus* Friv. (Rosaceae). *African Journal of Microbiology Research* 7: 5114-5118 DOI: 10.5897/AJMR2013.5770.

Zirihi GN, Kra AKM, Guédé-Guina F (2003) Evaluation de l'activité Antifongique de *Microglossa pyrifolia* (LAMARCK) O.KUNTZE (Asteraceae) "PYMI" sur la croissance *in vitro* de

Candida albicans. Revue de Médecine et. Pharmacopées Africaines 17 : 11-18.



22 BP : 582 Abidjan 22

PERMIS D'IMPRIMER DE LA VERSION CORRIGEE DE LA THESE

Doctorat de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

Présenté par Monsieur AHON Gnamien Marcel

THEME : Evaluation et essai d'optimisation de l'activité antifongique des extraits de *Terminalia superba* Engl & Diels (Combretaceae) sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*.

Vu et approuvé

Abidjan, 07 mai 2014

Le Doyen de l'UFR Biosciences



Prof. KOUAMELAN Essetchi Paul
Professeur Titulaire

Vu et Permis d'Imprimer

Abidjan, 07 mai 2014

Le Vice-Président de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

Prof. AFFIAN Kouadio
Professeur Titulaire



Résumé

En Afrique subsaharienne, les écorces de *Terminalia superba* (Combretaceae), communément appelé "fraké", sont utilisées dans le traitement de nombreuses affections cutanées. Afin de justifier cette utilisation traditionnelle, la présente étude a été entreprise avec pour objectif de caractériser le principe actif de cette plante. Des extraits totaux aqueux (X_{Aq}) et éthanolique (X_0) des écorces de *Terminalia superba* ont été testés sur la croissance "in vitro" de trois germes fongiques que sont *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*. L'extrait éthanolique (X_0) s'est avéré plus efficace sur la croissance des germes fongiques. De la partition de X_0 la fraction $X_{1.2}$ a donné les meilleurs paramètres antifongiques. Cette dernière fraction a subi à son tour un fractionnement plus fin pour donner G_1 , G_2 et G_3 . La fraction G_3 la plus active d'entre elle inhibe totalement la croissance de *Candida albicans*, de *Aspergillus fumigatus* avec une valeur de concentration minimale fongicide (CMF) de 12,18 μ g/mL, et de *Cryptococcus neoformans*, avec une valeur de CMF de 6,09 μ g/mL. L'analyse chromatographique et spectrométrique (GC/MS et RMN) a révélé la présence de deux dérivés d'acide éllagique dans l'extrait G_3 . Ces résultats justifient l'utilisation traditionnelle de cette plante contre les affections cutanées.

Mots clés : *Terminalia superba*, germes fongiques, croissance "in vitro", activité antifongique, acide éllagique.

Abstract

In sub-Saharan Africa, the bark of *Terminalia superba* (Combretaceae), commonly called "fraké" are used in the treatment of many skin diseases. To justify such of traditional use the present study was undertaken with the aim to characterize the active principle of this plant. Aqueous (X_{Aq}) and ethanol (X_0) extracts of bark of *Terminalia superba* were tested on "in vitro" growth of three fungal organisms as *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. The ethanol extract (X_0) was more effective on the growth of the fungal germs. From X_0 the fraction $X_{1.2}$ gave the best antifungals activities. This last fraction undergoes a finesplit to give G_1 , G_2 and G_3 . The most active fraction (G_3) completely inhibits the growth of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* with a value of minimum fungicidal concentration (MFC) of 12, 18 mcg / mL, and *Cryptococcus neoformans*, with a value of CMF 6.09 mcg / mL. The chromatographic and spectrometric analysis (GC / MS and NMR) revealed the presence of two derivatives of ellagic acid in G_3 . These results support the traditional use of this plant against skin diseases.

Keywords: *Terminalia superba*, fungal organisms, "in vitro" growth, antifungal activity, ellagic acid.