

Manuscrit reçu le 23 novembre 2010 et accepté le 3 novembre 2011

**ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE ET ESSAI DE
PURIFICATION DES PRINCIPES ACTIFS DES EXTRAITS DE *Terminalia
mantaly* (H.Perrier), UNE COMBRETACÉE, SUR LA CROISSANCE *IN
VITRO* DE *Candida albicans*.**

Yapi Guillaume YAYE*, Adou Koffi Mathieu KRA, Jacques Auguste Alfred Bognan ACKAH
et Allico Joseph DJAMAN

Laboratoire de pharmacodynamie biochimique, U. F. R. Biosciences, Université de Cocody-
Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

Résumé

Pour contribuer à la lutte contre les mycoses opportunistes à fortes recrudescences suite à l'avènement du VIH/SIDA, notre équipe de recherche a testé l'action de 10 extraits issus des écorces de *Terminalia mantaly* H.Perrier (TEKAM₁) : 2 extraits totaux (aqueux et hydro-alcoolique), six extraits issus de partition liquide/liquide et 2 extraits issus de dégraissage à l'hexane au soxhlet. Ces extraits ont été testés sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, une souche très impliquée dans les mycoses opportunistes. Ils ont été incorporés à la gélose Sabouraud selon la méthode de double dilution en tubes penchés.

Après 48 heures incubation à 30°C, la souche testée est sensible à tous les extraits selon une relation dose-réponse. Le résidu non soluble dans l'hexane T₄₋₂ (CMF = 24,37 µg/ml, CI₅₀ = 15 µg/ml) est l'extrait le plus actif. Par contre, l'extrait dichlorométhanique T₃₋₁ a montré l'activité antifongique la plus faible (CMF=780 µg/ml, CI₅₀=560 µg/ml).

Ainsi l'utilisation du solvant hydro-alcoolique (70% d'éthanol) suivie d'un dégraissage est la meilleure voie qui permet de mieux concentrer le principe actif de TEKAM₁.

Mots Clés : *Terminalia mantaly*, extraits végétaux, activités antifongiques, *Candida albicans*, opportunistes

**ASSESSMENT OF THE ANTIFUNGAL ACTIVITY AND TESTS OF ACTIVE PRINCIPLE
PURIFICATION OF EXCERPT OF *TERMINALIA MANTALY* H. PER.,
COMBRETACEAE ON THE *IN VITRO* GROWTH OF *CANDIDA ALBICANS***

Abstract

To support the fight against opportunist mycosis which are wildspread because of the advent of HIV, our research team tested the action of 10 *Terminalia mantaly* (TEKAM₁) extracts from stem bark: 2 crude extracts (aqueous and hydroalcoholic), 6 extracts from liquid/liquid partition and 2 extracts obtained by the removal of oil in the soxhlet. These extracts have been tested *in vitro*

against *Candida albicans*, a strain very often met in opportunist mycosis. These extracts have been incorporated to the Sabouraud gelose according to the method of double dilution in leaned tubes.

After a 48 hour-incubation at 30°C, the tested strain is sensitive to all extracts according to a measure and effect relationship. The residue of the removal of oil T₄₋₂ (FMC = 24,37 µg/ml, CI₅₀ = 15µg/ml) is the most active extract. On the contrary, dichloromethanic extract T₃₋₁ showed the lowest antifungal activity (FMC=780 µg/ml, CI₅₀ = 560 µg/ml).

Therefore, using the hydro-alcoholic solvent (70% ethanol) followed by removal of oil is the best way to obtain an optimally concentrated active ingredient from TEKAM₁.

KEY WORDS: *Terminalia mantaly*, plants extracts, antifungal activity, *Candida albicans*, opportunists.

I-INTRODUCTION

Depuis une trentaine d'années nombreuses sont les maladies infectieuses qui n'ont pas encore été totalement éradiqué(1). Cette situation s'est empirée avec l'avènement du VIH dans les années 1980 d'abord parce que l'infection à VIH constitue une pandémie difficile à contenir et à éradiquer, ensuite parce qu'elle entraîne à sa suite une multitude d'affections opportunistes d'un déficit immunitaire (2-18). Parmi ces affections opportunistes, on compte des viroses, des bactérioses et des mycoses. En ce qui concerne les mycoses, les candidoses constituent la tête de liste ces infections. De nos jours, ces infections opportunistes sont devenues un véritable problème de santé public.

Compte tenu des difficultés financières et du coût de plus en plus élevé des médicaments modernes, les populations ivoiriennes n'ont pas toutes accès aux spécialités pharmaceutiques importées. Ces facteurs auxquels s'ajoutent la grande richesse de la pharmacopée ivoirienne et surtout les habitudes traditionnelles font que les populations ont de plus en plus recours aux plantes médicinales de la pharmacopée pour se soigner. (19-23).

Mais l'usage abusif de ces plantes les exposent à divers accidents parce que en plus des principes actifs, les médicaments traditionnels contiennent d'autres molécules dont certaines ont des effets adverses très prononcés voir toxiques. Sans compter que ces médicaments traditionnels sont souvent préparés dans des conditions d'hygiène très précaires. Tous ces facteurs rendent nécessaire la sécurisation de l'usage des plantes de la pharmacopée.

C'est dans ces objectifs que notre équipe à initier depuis une quinzaine d'années des études pour non seulement donner une assise scientifique aux médicaments de la pharmacopée mais aussi pour valoriser notre riche patrimoine floristique. Pour cela une enquête ethnobotanique a été menée en 1991 et a abouti à la sélection de plusieurs plantes à vertus médicinales avérées (24-29). Parmi celles auxquelles on accorde des propriétés anti-infectieuses, figure *Terminalia mantaly* H. Perrier, une plante de la famille des Combrétacées. Cette espèce compte parmi les plantes les plus sollicitées en milieu traditionnel. En effet, elle est notamment utilisée dans la pharmacopée contre les gastroentérites, l'hypertension artérielle, le diabète, les affections buccodentaires, les affections cutanées, les candidoses buccales et les candidoses génitales (30).

Dans le but de vérifier le bien fondé des vertus anti-infectieuses accordées à cette plante, notre équipe de recherche a initié la présente étude enfin d'évaluer le pouvoir antimycosique des extraits de *Terminalia mantaly* H. Perrier sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. Ce présent rapport livre ici les premiers résultats de ces investigations.

II-MATÉRIEL ET MÉTHODES

II-1- MATÉRIEL

II-1-1-Matériau végétal

Le matériau utilisé est une poudre de plante codifiée TEKAM₁ obtenue à partir de l'écorce de *Terminalia mantaly* H.Perrier.

II-1-2- Germe testé

La souche de champignon testée à savoir *Candida albicans* nous a été fournie par le laboratoire de mycologie de l'Unité de Formation et de recherche des Sciences Médicales de l'Université de Cocody-Abidjan (Côte d'Ivoire). Ce germe a été isolé de patients en provenance du service des maladies infectieuses du Centre Hospitalier Universitaire de Treichville-Abidjan (Côte d'Ivoire).

Candida albicans est un champignon levuriforme opportuniste qui est à l'origine de la plupart des candidoses cutanées, muqueuses, phanériennes, septicémiques ou viscérales. Ces infections sont souvent mortelles pour les sujets dont l'immunodéficience est très accentuée (25-27,29-31).

II-1-3- Milieu de culture

Nous avons utilisé la gélose sabouraud (Bio-RAD/Réf : 64449 ; Lot : 8B2212) à pH acide (5,7). Un milieu approprié et couramment utilisé pour la culture des champignons.

II- 2- MÉTHODES

II- 2- 1- Préparation des extraits

Des morceaux d'écorce du tronc de *Terminalia mantaly* H. Perrier ont été récoltés, découpés et séchés à l'ombre. Après séchage, les morceaux de ce végétal ont été finement broyés à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre obtenue a été codifiée TEKAM₁. Des extraits totaux aqueux et éthanolique ont été préparés de la manière suivante :

Cent (100) grammes de TEKAM₁ ont été extraits par homogénéisation dans un litre d'eau distillée blender (mixeur). Après six cycles de broyage, l'homogénat obtenu dans chaque cas a été d'abord essoré dans un carré de tissu propre puis filtré successivement deux fois sur coton hydrophile et sur papier filtre Wattman 3 mm. Le filtrat obtenu a été concentré grâce à un évaporateur rotatif de type Büchi à la température de 60°C. La poudre de couleur marron obtenue constitue l'extrait total aqueux codifié X_{Aq}

L'extrait hydro-alcoolique a été préparé selon le même procédé en utilisant un mélange de solvants comportant 70% d'éthanol et 30% d'eau distillée. L'extrait éthanolique obtenu a été codifié X₀. A partir cet extrait X₀, nous avons préparés huit autres extraits comme suit :

Trois portions de dix grammes de l'extrait X₀ ont été constituées et soumises séparément à une séparation liquide/liquide dans 400 ml de trois différents mélanges de solvants (hexane-eau ; acétate d'éthyle-eau et dichlorométhane-eau ; 50/50 ; v/v). Après décantation, les différentes phases ont été séparées et concentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif. Nous avons obtenu les extraits suivants :

X₁₋₁ : la phase hexanique (huile végétale) ; X₁₋₂ : la phase aqueuse de la partition hexane-eau

X₂₋₁ : la phase acétatique ; X₂₋₂ : la phase aqueuse de la partition acétate d'éthyle-eau

X₃₋₁ : la phase dichlorométhane X₃₋₂ : la phase aqueuse de la partition dichlorométhane-eau

En plus des séparations liquide-liquide, une autre portion de dix grammes a été dégraissée avec 350 ml d'hexane au soxhlet. Cela a permis d'obtenir les extraits suivants :

X₄₋₁ : la phase hexanique de l'extrait délipidé (huile végétale).

X₄₋₂ : l'extrait délipidé (résidu non hexanosoluble).

Ces dix extraits ont été testés séparément sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*.

II- 2- 2- Préparation des milieux de culture

L'incorporation des différents extraits végétaux à la gélose Sabouraud a été faite selon la méthode de la double dilution en tubes inclinés (24-27,29-33). Pour chaque extrait végétal, chaque série comporte dix tubes à essai. Huit de ces tubes tests contiennent les extraits végétaux. Et les deux autres tubes sont considérés comme des tubes témoins dont un sans extrait végétal sans germes sert de témoin pour le contrôle de la stérilité du milieu de culture et l'autre sans extrait végétal servant de témoin pour le contrôle de croissance des germes. Pour les huit tubes tests les concentrations varient de 780 à 6,17 µg/ml selon une liaison géométrique de raison ½.

Après incorporation des extraits dans les huit tubes tests, tous les dix tubes de chaque série ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes et ensuite inclinés avec petit culot à la température du laboratoire pour permettre leur refroidissement et la solidification de la gélose (24-27,29-33).

II- 2- 3- Essai antimicrobien

À partir de culture jeune de *Candida albicans* (48 heures d'incubation), l'inoculum a été préparé comme suit :

Une jeune colonie de *Candida albicans* prélevée à l'aide d'une anse a été homogénéisée dans 10 ml d'eau distillée stérilisée. On obtient ainsi la suspension mère (10^0) concentrée à 10^6 cellules/ml. A partir de cette suspension, une seconde suspension (10^{-1}) a été préparée par dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de la première. Elle est porte une charge de 10^5 cellules/ml.

Pour chacun des tubes à essais de chaque série des dix extraits (sauf le tube de contrôle de stérilité du milieu de culture), la culture des germes a été faite sur les milieux précédemment préparés par l'ensemencement de 10 μ l de la suspension 10^{-1} en stries transversales jusqu'à épuisement. Cela correspond à 1000 cellules ensemencées. Les cultures ainsi réalisées ont été incubées à 30°C pendant 48 heures.

Après 48 heures d'incubation, les colonies de *Candida albicans* ont été dénombrées par comptage direct à l'aide d'un stylo compteur de colonies (N° de série 23382 de marque Scinceware de Bel-Art). La croissance dans les huit tubes expérimentaux de chaque série à été évaluée en pourcentage de survivance calculé par rapport à 100% de survivance dans le tube témoin de contrôle de croissance (24-27,29-32). Le traitement de données expérimentales a permis de déterminer les paramètres antifongiques suivants :

- la concentration minimale inhibitrice (CMI) : c'est la concentration minimale pour laquelle il n'y a aucune croissance visible à l'œil nu.

- la concentration minimale fongique (CMF) : c'est la plus petite concentration d'extrait dans le tube qui donne 99,99% d'inhibition comparativement au tube témoin de contrôle de croissance ou inversement c'est le tube qui laisse une survivance de 0,01% par rapport au tube témoin de contrôle de croissance. Elle est déterminée par un test de stérilité du tube correspondant à la CMI en ensemençant un échantillon prélevé à la surface de la gélose de ce tube sur une gélose neuve.

- la concentration pour 50% d'inhibition (CI_{50}) : c'est la concentration qui donne 50% d'inhibition estimée par rapport au nombre de colonies dénombrées dans le tube témoin de contrôle de croissance. Ce paramètre est déterminé graphiquement.

III – RÉSULTATS

Après 48 heures d'incubation à 30°C, on observe comparativement au témoin, une diminution progressive du nombre de colonies de *Candida albicans* au fur et à mesure que les concentrations des extraits végétaux augmentent dans les tubes expérimentaux. Cela est observé pour toutes les séries des dix(10) extraits. Ces résultats sont des moyennes statistiques de 6 expérimentations pour chaque extrait.

Des inhibitions nettes et effectives ont été obtenues à différentes concentrations selon les extraits. Les données expérimentales traduites sous forme de courbes de sensibilité sont présentées à la figure 1 pour les extraits totaux (X_{Aq} et X_0) et à la figure 2 pour les autres extraits.

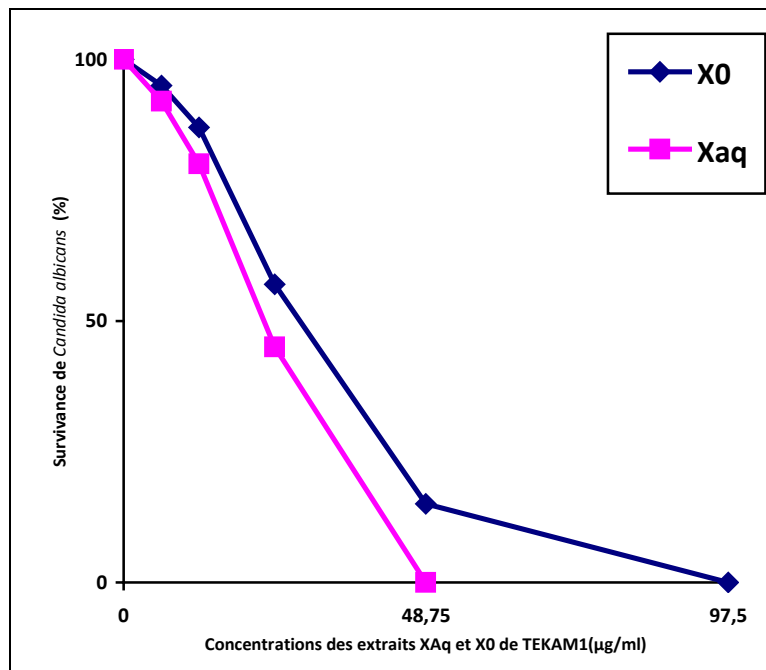


Figure 1 : Courbes de sensibilité de *Candida albicans* aux extraits totaux de TEKAM₁ (X_{Aq} et X₀)

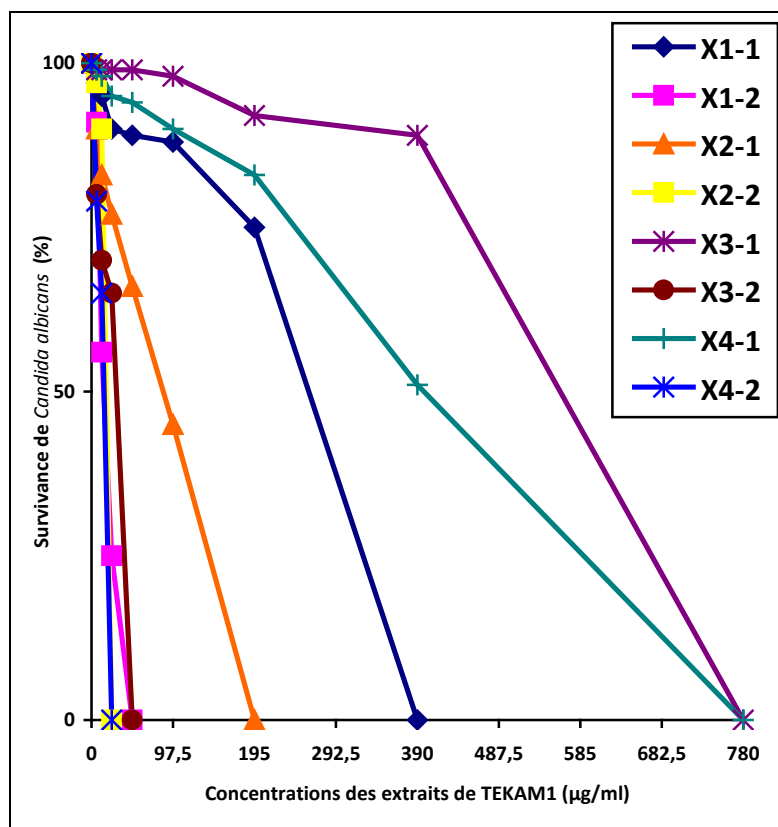


Figure 2 : Courbes de sensibilité de *Candida albicans* aux extraits partitionnés de TEKAM₁

De façon générale, toutes les courbes de sensibilités présentent une allure décroissante avec des pentes plus ou moins fortes selon les extraits. Elles coupent toutes l'axe des abscisses à différents niveaux selon les extraits. Concernant les extraits totaux, la courbe de sensibilité de l'extrait X_0 présente une pente plus forte que celle de l'extrait X_{Aq} (Figure 1). Les extraits X_{1-2} , X_{2-2} , X_{3-2} et X_{4-2} présentent des courbes dont les pentes sont fortes particulièrement celle de X_{4-2} . On note aussi que l'extrait X_{2-1} a une courbe à pente moyenne. Tandis que les pentes les plus faibles sont observées avec X_{1-1} , X_{3-1} et X_{4-1} . (Figure 2). Les valeurs des CMF et des CI_{50} pour tous les extraits sont consignées dans le tableau I.

Tableau I : Valeurs des paramètres antifongiques des différents de $TEKAM_1$ à 30°C et à 48 heures d'incubation sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*.

Extrait de <i>Terminalia mantaly</i>	Paramètres antifongiques	
	CMF ($\mu\text{g/ml}$)	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
X_{Aq}	97.5	20
X_0	48.75	25
X_{1-1}	390	260
X_{1-2}	48.75	15
X_{2-1}	195	85
X_{2-2}	24.37	17.5
X_{3-1}	780	560
X_{3-2}	48.75	30
X_{4-1}	780	395
X_{4-2}	24.37	15

IV- DISCUSSION

L'eau étant le solvant le plus utilisé en milieu traditionnel nous avons donc préparé de prime abord l'extrait aqueux pour vérifier les vertus antimicrobiennes accordées à *Terminalia mantaly* H. Perrier.

L'analyse des résultats obtenus avec ces différents extraits de $TEKAM_1$ montre que la souche testée est sensible à tous ces extraits. Aucune résistance n'a été observée (voir tableau I). Toute fois, les performances des extraits varient selon les solvants et la méthode d'extraction. Les valeurs des concentrations fongicides obtenues révèlent que les extraits ont des activités antifongiques plus ou

accentuées. Pour ces différents extraits, les résultats obtenus prouvent qu'il y a une diminution progressive du nombre de colonies au fur et à mesure qu'on augmente les concentrations des extraits dans les tubes expérimentaux. Nous en déduisons que la souche étudiée est sensible aux extraits selon une relation dose-réponse.

Les valeurs des paramètres antifongiques consignées dans le tableau I et les figures 1 et 2 récapitulant toutes les courbes de sensibilité de *Candida albicans* aux dix extraits confirment ces résultats. Ces figures permettent de comparer les performances de ces extraits. Notons que plus la pente d'une courbe est forte c'est-à-dire plus la pente se rapproche de l'axe des ordonnées plus l'extrait est actif.

Sur la figure 1, nous remarquons que la courbe de sensibilité de l'extrait X_0 possède la pente la plus forte. De plus, l'analyse des résultats de ces deux extraits totaux (X_{Aq} et X_0) révèlent que l'extrait X_0 (CMF = 48,75 μ g/ml, CI_{50} = 25 μ g/ml) est deux fois plus actif que l'extrait X_{Aq} (CMF = 97,5 μ g/ml, CI_{50} = 20 μ g/ml). (Tableau I). Ces résultats confirment l'utilisation de cette plante en milieu traditionnel comme un anti-infectieux.

Lorsque nous comparons les performances des extraits totaux (X_{Aq} et X_0) de TEKAM₁ avec des extraits totaux aqueux et hydro-alcoolique d'autres travaux, il ressort que les extraits de TEKAM₁ ont les meilleures activités anticandidosiques. En effet, l'analyse révèle que X_{Aq} et X_0 de TEKAM₁ sont respectivement 3076,92 fois et 512 fois plus actifs que les extraits totaux de *Morinda morindoides* (extrait aqueux, E_{aq} =300000 μ g/ml et extrait hydro-alcoolique, E_{th} =25000 μ g) (34) et ceux des extraits totaux de *Microglossa pyrifolia* PYMI (extrait aqueux, $PYMI_0$ =50000 μ g/ml et extrait hydro-alcoolique, $PYMI_1$ =25000 μ g/ml) (27). Nous notons aussi qu'ils sont respectivement 1,8 et 8 fois plus actifs que les extraits totaux aqueux et hydro-alcoolique: E_{Aq} (CMF= 390 μ g/ml) et E_0 (CMF= 90 μ g/ml) de *Terminalia ivorensis* (TEKAM₂) (35). Et respectivement 4 et 8 fois plus actifs que les extraits totaux aqueux et hydro-alcoolique: S_{Aq} (CMF= 780 μ g/ml) et S_0 (CMF=195 μ g/ml) de *Terminalia catappa* (TEKAM₃) (36).

Vu les résultats intéressants des extraits aqueux et hydro-alcoolique et dans le but d'améliorer l'activité antimycosique de cette plante, nous avons procédé à la préparation d'autres extraits à partir de l'extrait total le plus actif (X_0). Cet extrait a été soumis à une partition et au dégraissage au soxhelet. Ces procédés ont permis d'obtenir par la séparation liquide/liquide six(6) extraits et deux(2) extraits après le dégraissage au soxhelet.

Les résultats de ces extraits traduits sous forme de courbes montrent que la courbe d'activité de $X_{4.2}$ possède la pente la plus forte se rapprochant plus de l'axe des ordonnées (figure 2) et les valeurs des paramètres antifongiques sont aussi les plus faibles (tableau I). De l'analyse de l'ensemble des résultats, il ressort que cet extrait $X_{4.2}$ (CMF=24,37 μ g/ml, CI_{50} =15 μ g/ml) issu du dégraissage au soxhelet est le plus actif.

En effet, la comparaison de ces extraits sur la base des rapports des valeurs des CMF relève que $X_{4.2}$ (CMF=24,37 μ g/ml) est deux fois plus actif que les extraits $X_{1.2}$ et $X_{3.2}$ (CMF=48,75 μ g/ml). Il est aussi huit(8) fois plus actif que l'extrait $X_{2.1}$ (CMF=97,5 μ g/ml). Nous notons aussi qu'il est seize (16) fois plus actif que $X_{1.1}$ (CMF=390 μ g/ml) et trente-deux fois plus actif que $X_{4.1}$ et

X₃₋₁ (CMF=780µg/ml). Pour ce qui est de l'extrait X₂₋₂, il présente la même valeur de CMF (24,37µg/ml). Mais la comparaison faite sur la base des valeurs de CI₅₀ (X₂₋₂ : CI₅₀=17,5µg/ml et X₄₋₂ : CI₅₀ = 15µg/ml) montre que l'extrait X₄₋₂ est le plus actif.

De plus, la comparaison des activités sur la base des valeurs des CMF de l'extrait le plus actif, X₄₋₂ et des extraits totaux X_{Aq} et X₀ montrent que l'extrait X₄₋₂ est deux fois plus actif que l'extrait X₀ qui a servi de base à sa préparation et huit fois plus actif que l'extrait X_{Aq}. L'analyse de tous les résultats des différentes partitions liquide/liquide montre aussi que de façon générale, les valeurs des CMF des extraits des phases aqueuses sont les plus faibles. Des lors, on conclut que les extraits des phases aqueuses sont meilleurs que ceux des phases organiques.

De l'analyse de l'ensemble des résultats ; il se dégage quatre aspects :

- La souche *Candida albicans* est sensible à tous les extraits testés selon une relation dose-réponse.
- les extraits testés possèdent des effets fongicides nets et effectifs sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*.
- Des meilleures performances ont été obtenues à partir du solvant comportant 70% d'éthanol et 30% d'eau. La méthode de partition (mélange éthanol-eau 70/30 ; v/v) initiée par ZIHIRI et KRA (2003) est une bonne voie qui permet de mieux concentrer les principes actifs.
- Par ailleurs, la meilleure performance a été obtenue avec l'extrait X₄₋₂ issu du dégraissage de X₀. Ce qui permet de dire que l'extraction hydro-alcoolique suivi d'un dégraissage à l'hexane au Soxhlet est la meilleure voie de concentration des principes actifs car cette méthode a permis d'obtenir l'extrait le plus performant.

V - CONCLUSION

Cette étude nous situe sur les vertus thérapeutiques anti-infectieuses accordées à cette espèce de plante en milieu traditionnel. Elle confirme le réel potentiel anticandidosique de *Terminalia mantaly* H.Perrier.

De cette étude, il se dégage les points suivants :

- La souche testée est sensible à tous les extraits selon une relation dose-réponse.
- L'extrait hydro-alcoolique est l'extrait de base le plus actif. Son activité anticandidosique est deux(2) fois plus meilleure que celle de l'extrait total aqueux.
- Le dégraissage au Soxhlet de l'extrait total hydro-alcoolique (extrait de base le plus actif) permet d'améliorer nettement les performances de cet extrait. Il est deux fois plus actif que l'extrait hydro-alcoolique X₀ et huit fois plus actif que l'extrait aqueux. C'est donc une meilleure voie de purification des principes actifs.
- La méthode d'extraction utilisée a donc permis de vérifier et d'améliorer l'activité anticandidosique des extraits de *Terminalia mantaly* H.Perrier.

- Les phases aqueuses des différentes partitions détiennent toujours les meilleures performances.
- La meilleure voie de préparation de la fraction active est l'extraction hydro-alcoolique suivie d'un dégraissage au Soxhlet.

Il serait donc souhaitable de poursuivre ces travaux en engageant une série de chromatographies qui nous permettra certainement d'optimiser l'activité des principes actifs.

REMERCIEMENTS

Nous adressons nos remerciements :

- Aux tradipraticiens qui nous ont permis de recenser un certain nombre de plantes et de pouvoir choisir parmi celles-ci cette plante non pas encore explorée véritablement pour ces propriétés anti-infectieuses.
- Tous les membres du laboratoire pharmacodynamie-biochimique pour leur participation active à ce présent travail.
- Au centre national de floristique de Côte d'Ivoire pour l'identification de cette espèce de Combrétacée.

VI- RÉFÉRENCES

- 1- OMS W.Ho.1994 World malarial situation in 1992. *Wkly Epidem Rec.*42:309, 14.
- 2- J. Callot et J. Helluy. *Parasitologies médicales*. Éd. Méd. Flam., 4(1970) 557-600.
- 3- S. Kernbaum. *Eléments de pathologie infectieuse*. Éd. Méd. Chap. XII Villebranne. Paris. Spécia. 3 (1980) 1-185.
- 4- O. Ann. *Maladies parasitaires et fongiques*. Éd. C et R, (1982) 246-285.
- 5- P. Leclerc, C. Artigou, S. Gagnebien, O. De Fenoyl et J. Rochemaure, *Aspergilloses broncho-pulmonaires*. *Revue générale poumon-cœur*, Masson Paris, 5 (1982) 25-33.
- 6- E. Chouvalova. *Les maladies tropicales*, Éd. Mir, Moscou, 3 (1984).
- 7- B. Dupont, *Mycoses et SIDA. Résumé des rapports, communications affichées*, Institut Pasteur, Paris. 16 (1987) 4-9.
- 8- S. Cromberg, J. Beylout et M. Ray. *Maladies infectieuses*, Éd. Masson, (1988) 232-625.
- 9- P. Bouchet, P. Regis, J. L. Crugnard et G. Modulo-Leblond, *Mycologie générale et médicale*, Vd. Masson, Paris, (1989) 325-378.
- 10- Theriwol-Ferly, *Cours de mycologie médicale pour le CES de parasitologies*, Fac. Méd., Univ. Cocody, Abidjan (1990) 169pp.

- 11- S.P. Eholié, Étude des infections opportunistes au cours du SIDA à propos de 262 cas diagnostiqués. Thèse Dipl. D'Etat. Med. Abj. N° 1517 (1993) p.81.
- 12- M. Gentilini, E. Caumes, M. Danis, J. Mouchet, B. Duflo, B. Lagardère, R. L. Dominique et G. Bruckner, Médecine tropicale, Ed. Flam. Med. Sciences, 5 (1993) 955pp.
- 13- D. Chabasse, Les nouveaux champignons opportunistes apparus en médecine. Revue générale, J. Mycol. Méd., 4 (1994) 9-28.
- 14- B. F. Dupont, F. Dromer, and L. Improvisi, The problem of awole resistance in Candida, J. Mycol. Méd., 6 suppl. 2. (1996) 12-19.
- 15- M. Develoux et S. Bretagne, Candidoses et levures diverses. Encycl. Méd. Chir., Maladies infectieuses.8-62-A-10, (2005), 10p.
- 16- A. Ketani, Z. H. Berlkhadir, Q. Mosadik, M. Faroudy, A. Ababou et C. Lazreq, Traitement antifongique des candidoses systémiques en réanimation, J. Mycol. Méd. 16 (2005) 16-25.
- 17- D. Charles, P. Loulerque, J.P. Viard, F. Drauer et O. Lorthlary, Infections fongiques au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. Encycl. Méd. Chir., Maladies infectieuses, 8-002 – C-10, (2007). 8p.
- 18- S. J. Vouriot, M. Berle et E. Paillaud, Candidoses orales chez les personnes âgées hospitalisées : fréquence, facteurs de risque et prévention, Encycl. Méd. Hygiènes, 15 (2007) 385-390.
- 19- F. Guédé-Guina, Étude de quelques effets physiologiques et biologiques de « Glow » un poison extrait du bois Bété : *Mansonia altissima* (Sterculiacée), Thèse 3^{ème} cycle FAST. Uni. Abi. (1975).
- 20- E. J. Adjanohoun et L. Aké-Assi, Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire, CRES. Université Côte-d'Ivoire, Centre National de Floristique, (1979) 40-219.
- 21- E. J. Adjanohoun, Vtat d'évolution de l'éthnopharmacopée africaine. Bull. Med. Trad. Pharm., 4(1) :59-63.
- 22- Aké-Assi, Médecine traditionnelle et pharmacopée. Rapport sur le colloque international sur la médecine traditionnelle africaine à Abidjan, Cote d'Ivoire. Bull. Med. Trad. Pharm., ACCT, 4(2) : 203.
- 23- L. Aké -Assi. et S. Guindo. Plantes utilisées dans la médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest. Éd : Roche(1991). 151pp.
- 24- A. K. M. Kra, Evaluation et amélioration par séquençage chromatographique d'une action fongique de MISCA contre *Aspergillus fumigatus*, Thèse, Pharma., Bioch. Univ. Abidjan, (2001) 126p.
- 25- P.M Thès, Contribution à l'élaboration d'un savon antimicrobien à des fins cosmétiques et médicales .Thèse n°548/2008 de Doctorat d'Université. UFR Biosciences. Univ. Cocody.Abidjan. Cote d'Ivoire (2008)200pp.

- 26- F. Guédé- Guina, A. K. M. Kra, M. Vangah Manda et G. M. Bonga, Inhibition par MISCA-F2 de la croissance de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* trois germes opportunistes du SIDA. J. Afrique Bioméd., 2(1997) 11-16.
- 27- G. N. Zihiri, A. M. Kra et F. Guédé-Guina, Evaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (LAMARCK) O. KUNZE (ASTERACEAE) <<PYMI>> sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, Revue de Méd. et Pharma. Afr., 17(2003) 11-18.
- 28- A. A. Diafouka et J. Lejoly, Plantes hypotensives utilisées en médecine traditionnelle à Brazzaville(Congo).BARAB Actes du 2^{ème} Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 2^{ème} Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg (1993) 24-27 mars 1993 5p.
- 29- P. M. Thès, Recherche du profil antimicrobien des huiles de G243 et MISCA sur quelques agents de mycose de la peau, Mémoire de DEA de biotechnologies, option pharmacologie-microbiologie. Univ. Cocody, Abidjan, Côte-d'Ivoire (2001) 34p.
- 30- C. Rivière, les plantes de la région Nord de Madagascar : une approche ethnopharmacologique.
- 31- J. A. Ackah. Spectre anti-infectieux de MISCA-F₃ sur la croissance *in-vitro* de *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton rubrum*. Mémoire de DEA de biotechnologies, option pharmacologie-microbiologie. Univ. Cocody, Abidjan, Cote d'Ivoire. (2004) 34p.
- 32- M. Vangah-Manda, A. M. Kra, G. M. Bonga et F. Guédé-Guina, Amélioration de l'action antifongique de MISCA, un extrait végétal contre *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*, trois germes opportunistes du SIDA, J.B.NA. 2 (1996) 11-16.
- 33- R. Holt, Laboratory test of antifungal drug, J. Clin. Path. , 18 (1975) 767-777.
- 34- I. Bagré, Identification de substances antifongiques de *Morinda morindoïdes* (Baker) Milne-Redhead (Rubiaceae), Activité anti-infectieuse sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*, trois germes de grande contagiosité. Thèse Unique N° 598/2009 de Biotech. Option pharmacologie-microbiologie. Univ. Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire. (2009) 168pp.
- 35- S. Ouattara, K. A. Mathieu, K. E. Kporou et F. Guédé-Guina, Evaluation de l'activité antifongique des extraits de *Terminalia ivorensis* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. Rev. Ivoir. Sci. Technol., 12 (2008).205-214.
- 36- J. J. Ackah, A. M. Kra, G. N. Zihiri et F. Guédé-Guina, Evaluation de l'activité anticandidosique de TEKAM. Rev. Ivoir.Sci.Technol. (2008).