



**Évaluation et essais d'optimisation de l'activité
antifongique des extraits d'écorce de *Eucalyptus
torelliana* F. Muell. (Myrtaceae) sur la croissance in
vitro de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida
tropicalis***

Don Josette Agre

► **To cite this version:**

Don Josette Agre. Évaluation et essais d'optimisation de l'activité antifongique des extraits d'écorce de *Eucalyptus torelliana* F. Muell. (Myrtaceae) sur la croissance in vitro de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*. Pharmacologie. Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan (Côte d'Ivoire), 2015. Français. NNT : . tel-02500465

HAL Id: tel-02500465

<https://theses.hal.science/tel-02500465>

Submitted on 5 Mar 2020

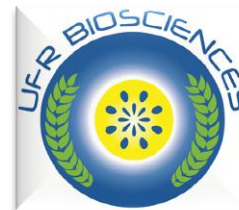
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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 CÔTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement supérieur
et de la Recherche Scientifique



Laboratoire de
Pharmacodynamie-
Biochimique

Année Universitaire
2014-2015

THESE

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

Spécialité: Pharmacologie des substances Naturelles

Numéro d'ordre
961/2015

AGRE Don Josette

EVALUATION ET ESSAIS D'OPTIMISATION DE L'ACTIVITE

ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS D'ECORCES DE

Eucalyptus torelliana F. Muell. (Myrtaceae)

SUR LA CROISSANCE *IN VITRO* DE

Candida albicans, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*.

Soutenue publiquement
le 20 Août 2015

Commission du jury

Mme SERI-KOUASSI B. Philomène	Professeur Titulaire	UFHB : Présidente
M. DJAMAN Allico Joseph	Professeur Titulaire	UFHB : Directeur
M. LOUKOU Yao Guillaume	Maître de Conférences	UFHB : Co-Directeur
Mme GUESSENND K. Nathalie	Maître de recherches	UFHB : Rapporteur
Mme KAMANZI Kagoyire	Professeur Titulaire	UFHB : Rapporteur
M. GONNETY Tia Jean	Maître de conférences	UNA : Examineur

***Je dédie cette
Thèse à.....***

A ma très chère mère AGRE Cécile.

Merci pour ton aide, ton encouragement et ton soutien. Merci d'avoir supporté mes caprices. Que le Roi de gloire, le Saint des Saints, Jésus-Christ bénisse l'œuvre de tes mains et te permette d'être le plus longtemps possible parmi nous tes enfants. Merci maman.

A mon époux KOUADIO N'GANDI Jean-Serge

Je tiens à te dire un sincère merci pour la motivation et tes conseils tout au long de la réalisation de ce travail. Cette phrase : « le bonheur, c'est savoir ce qu'on veut et le vouloir passionnément. », tu m'as permis d'en faire mienne. Que DIEU te comble au delà de tes attentes.

A ma Fille Mérénsa et à mon fils Georges-Marie

Merci pour la joie dont vous me comblez. Je prie DIEU qu'il vous fasse grandir en âge, en intelligence et que la santé soit votre partage. Amen!

Aux grandes familles DJOMO et AMAFOU

Merci pour vos encouragements et votre soutien tout au long de mon cursus scolaire et universitaire. Vous n'avez aménagé aucun effort pour être toujours à mes côtés chaque fois que j'ai eu besoin de vous. Merci à toutes et à tous. Que DIEU vous bénisse.

A mes frères et soeurs

Un grand merci pour vos prières et votre soutien. DIEU seul saura vous récompenser.

A Mr et Mme MELEDJE,

Merci pour votre aide et vos prières. Que le bonheur et la grâce de l'Eternel Dieu soient votre partage.

Un merci collectif à toutes les équipes du Laboratoire, en particulier aux membres de l'équipe de mycologie : **Dr KRA Adou Mathieu** (Unité Mycologique- Microbiologie), **Dr ACKAH Jacques** (Université de DALOA), **Dr YAYE Guillaume** (Université de DALOA).

A la mémoire de mon très cher Père **AGRE Sébastien**, Dieu a bien voulu te rappeler à lui en cette année 2015. Entre dans la maison de Dieu et que ton âme repose en paix. Merci pour tout.

A la mémoire de mon grand frère **AGRE Jacques Arthur**, toi qui m'avais toujours soutenue. Que DIEU te compte parmi ses élus.

REMERCIEMENTS

Je tiens particulièrement à remercier mon Directeur de thèse, Monsieur **DJAMAN Allico Joseph** Professeur titulaire de Biochimie-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 pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et permis de réaliser cette thèse. Son dynamisme a été pour moi une source de motivation.

Professeur, vous m'avez enseignée non seulement, la biochimie mais vous m'avez inculqué l'amour de la recherche et la persévérance, qualités indispensables dans le monde de l'investigation scientifique.

Votre disponibilité, votre sagesse, votre grandeur d'esprit, vos qualités intellectuelles, votre sens du devoir bien accompli et la rigueur m'ont orienté dans ce travail. Vous avez su, par votre savoir-faire, me donner une motivation supplémentaire à des moments difficiles de ce travail. Vous avez toujours été un modèle de réussite et de compétence. J'en suis très honorée.

J'ai ici l'honneur de vous exprimer ma profonde gratitude, pour avoir accepté de participer à ma formation.

Il est indéniable que votre empreinte m'aidera à promouvoir et à réussir ma vie professionnelle. Je vous dis sincèrement merci, pour avoir mis à ma disposition vos précieux conseils et un appréciable support moral dans le déroulement de cette étude.

Vous représentez, pour chacun des étudiants que nous sommes, un modèle à suivre. Merci très cher Maître. Puisse Jésus Christ vous fortifier.

Merci Monsieur **LOUKOU Yao Guillaume**, mon Co-Directeur de thèse, chef de service du Laboratoire de Biologie Médicale et de Microbiologie Industrielle et Alimentaire du LNSP, Maître de conférences agrégé de Microbiologie de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny.

Je tiens à vous remercier pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire pour la réalisation de mes travaux de thèse. Que le Tout Puissant, DIEU, vous comble au-delà de vos attentes et vous bénisse.

J'aimerais également remercier Monsieur **N'GUESSAN Jean David** Professeur Titulaire de Biochimie-Pharmacologie à l'Université Félix Houphouët-Boigny et Monsieur **COULIBALY Adama** Professeur Titulaire de Microbiologie à l'Université Félix Houphouët-Boigny, pour leurs conseils et leurs encouragements tout au long de mon travail de thèse.

A Monsieur **KOUAMELAN Essetchi Paul**, Professeur titulaire d'Hydrobiologie au Laboratoire d'Hydrobiologie-technologie des eaux de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny, Doyen de l'UFR Biosciences. Merci pour votre dynamisme et votre expertise au service de l'UFR Biosciences. Veuillez trouver ici l'assurance de notre sincère reconnaissance et de notre profonde admiration. Hommage respectueux.

A Monsieur **YAPI Houphouët Felix**, Monsieur **BIDIE Alain**, Monsieur **YAPO Adou Francis**, Monsieur **YEO Dodehe**, tous Maîtres de Conférences au Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny, trouvez ici toute ma gratitude pour le soutien moral, physique et surtout matériel, que vous n'avez ménagé aucun effort à le faire.

Je tiens particulièrement à exprimer ma gratitude à Monsieur **KRA Adou Mathieu** mon encadreur, Maître-assistant au Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët Boigny.

Votre passion pour le travail bien fait et vos qualités humaines dévouées m'ont donné l'impulsion nécessaire au goût du travail. J'ai bénéficié de vos connaissances scientifiques, de votre souci de la perfection et de vos qualités morales. Puisse ce travail que vous avez encadré avec amabilité et disponibilité satisfaire à vos souhaits.

Mes remerciements vont également à Monsieur **BAHI Calixte**, Maître-assistant au Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët Boigny, pour sa disponibilité et ses conseils tout au long de mon travail de thèse.

Un grand merci à Monsieur **DJYH Bernard Nazaire**, Maître-assistant au Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët Boigny, pour ses précieux conseils et son soutien moral au cours de la réalisation de mes travaux.

Je voudrais également remercier Messieurs **TREBISSOU Noël**, **COULIBALY Founsegue**, **BLA Brice**, **OUATTARA Sitafa**, **BAGRE Issa**, **MEITE Souleymane**, **AKAKPO Jöel** et **M'BOH Gervais**, tous Enseignants et Chercheurs au Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny et à l'institut Pasteur de Côte d'Ivoire, pour votre soutien moral et scientifique.

Un grand merci au Monsieur **MALAN Anglade** directeur du Laboratoire National de Santé Publique (LNSP), pour m'avoir accepté dans son institution afin d'achever mes manipulations.

Merci à Monsieur **ZINZINDORF Yessé Nanga**, Maître de conférences (Chef d'Unité de Microbiologie Industrielle et Alimentaire au LNSP) et au **Dr BONY Nicaise** (Chef de service du Laboratoire Contrôle des Médicaments du LNSP).

Un merci particulier à Monsieur **BOKAME Herman**, Monsieur **DIBY Sylvain** et Monsieur **YAO Jean Martial** tous deux techniciens au Laboratoire National de Santé Publique (LNSP).

Aux membres du jury :

- **Madame SERI-KOUASSI Badama Philomène**, Professeur Titulaire de Biologie Animale à l'Université Félix Houphouët Boigny, Présidente du jury,
- **Monsieur DJAMAN Allico Joseph**, Professeur Titulaire de Biochimie-Parasitologie à l'Université Félix Houphouët Boigny, Directeur de Thèse,
- **Monsieur LOUKOU Yao Guillaume**, Maître de Conférences agrégé de Microbiologie de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques à l'Université Félix Houphouët-Boigny, Co-Directeur de thèse,
- **Madame GUESSENND Kouadio Nathalie**, Maître de recherches à l'UFR des Sciences médicales à l'Université Félix Houphouët Boigny, Rapporteur,
- **Madame KAMANZI Kagoyire**, Professeur Titulaire de Botanique à l'Université Félix Houphouët Boigny, Rapporteur,
- **Monsieur GONNETY Tia Jean**, Maître de conférences de Biochimie-Enzymologie à l'Université Nangui Abrogoua, Examineur.

C'est avec un intérêt tout particulier que vous nous faites l'insigne honneur d'accepter de siéger dans notre jury de thèse malgré vos multiples occupations. Veuillez trouver ici l'expression de notre sincère gratitude et notre profond respect.

AVANT-PROPOS

Le présent travail a été réalisé dans le Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'Unité de Formation et de Recherche (UFR) Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny d'Abidjan et dans le Laboratoire de biologie Médicale et de Microbiologie Industrielle et Alimentaire du LNSP sous la direction de Monsieur **DJAMAN Allico Joseph** et la co-direction de Monsieur **LOUKOU Yao Guillaume**.

Il s'inscrit dans le programme de valorisation des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle en vue de développer des produits nouveaux, fiables et accessibles à tous.

Cette étude s'est intéressée à l'évaluation du pouvoir antifongique de *Eucalyptus torelliana* F. Muell., une plante de la famille des Myrtaceae connue pour ses propriétés anti-infectieuses.

Si ce pouvoir est acquis, nous convenons tous que cette plante sera considérée comme un anti-infectieux contre les infections surtout opportunistes que sont les candidoses au cours de l'infection à VIH. Surtout que nous savons tous les dégâts causés par ces mycoses qui se présentent le plus souvent sous formes asymptomatiques jusqu'au stade critique.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	XIV
LISTE DES FIGURES.....	XV
LISTE DES TABLEAUX.....	XVII
INTRDUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
LES CHAMPIGNONS	3
I- CARACTERES GENERAUX.....	3
I-1- Définition.....	3
I-2- Caractères morphologiques	3
I-3- Croissance.....	4
I-4- Nutrition.....	4
I-5- Reproduction.....	5
I-5-1- Reproduction asexuée	5
I-5-2-Reproduction sexuée.....	5
II- CLASSIFICATION	6
II-1- Classification Historique	6
II-2- Classification phylogénétique	7
II-3- Caractéristiques des cinq phyla fongiques	8
II-3-1- Chytridiomycota.....	8
II-3-2- Zygomycota.....	8
II-3-3- Glomeromycota	8
II-3-4- Dicaryotes (Ascomycota et Basidiomycota)	8
II-3-5- Deuteromycota	9
III- CHAMPIGNONS LEVURIFORMES DU GENRE CANDIDA	9
III-1- <i>Candida albicans</i>	12
III-1-1- Habitat.....	12
III-1-2- Description	12
III-1-3- pouvoir pathogène.....	12
III-1-4- Diagnostic	13

III-2- <i>Candida glabrata</i>	15
III-2-1- Habitat	15
III-2-2- Description	15
III-2-3- pouvoir pathogène.....	15
III-2-4- Diagnostic	15
III-3- <i>Candida tropicalis</i>	16
III-3-1- Habitat	16
III-3-2- Description	16
III-3-3- pouvoir pathogène.....	16
III-3-4- diagnostic	16
LES MYCOSES.....	17
I- DEFINITION GENERALE	17
II- CARACTERES CLINIQUES DES MYCOSES	17
III- CANDIDOSES.....	18
III-1- Etiologie	18
III-2- Epidémiologie	19
III-3- Physiopathologie	19
III-4- Clinique.....	19
III-4-1- Candidoses superficielles	19
III-4-1-1- Candidoses buccales	20
III-4-1-2- Candidoses digestives	20
III-4-1-3- Candidoses cutanées et des phanères	20
III-4-1-4- Candidoses génito-urinaires	21
III-4-2- Candidoses profondes ou candidémies	21
III-5- Diagnostic mycologique	24
III-5-1- Prélèvement.....	24
III-5-2- Examen direct	24
III-5-3- Culture.....	25
III-5-4- Identification	25
ANTIFONGIQUES	27
I- GENERALITES	27
II- DIFFERENTES CLASSES D'ANTIFONGIQUES	29
II-1- antifongiques polyéniques.....	29

II-1-1- Amphotéricine B (AmB)	29
II-1-2- Formulations lipidiques de l'Amphotéricine B	29
II-1-3-Formulation lipidique de Nystatine	29
II-2- Analogues nucléosidiques	29
II-3- Azolés.....	30
II-3-1- Imidazolés	30
II-3-2- Triazolés	31
II-4- Echinocandines.....	32
II-5- Autres classes d'antifongiques	32
PLANTES MEDECINALES	33
I- EFFETS PHARMACOLOGIQUES DE QUELQUES PLANTES MEDICINALES.....	33
II- METABOLITES SECONDAIRES DES PLANTES.....	34
II-1- Alcaloïdes.....	34
II-2- Dérivés glucidiques	34
II-2-1- Saponines ou saponosides	35
II-2-2- Flavonoïdes	35
II-2-3- Anthocyanes	35
II-2-4- Mucilages	36
II-2-5- Tanins	36
II-3- Coumarines.....	36
II-4- Phénols	36
II-5- Quinones.....	36
II-6- Terpènes et stérols ou stéroïdes.....	37
III- DESCRIPTION DE <i>EUCALYPTUS TORELLIANA</i> F.MUELL.....	37
III-1- <i>Myrtaceae</i>	37
III-2- Position systématique.....	37
III-3- Description	38
III-4- Répartition géographique	40
III-5- Utilisation thérapeutique traditionnelle.....	40
III-6- Phytochimie	40
CHROMATOGRAPHIE	42
I- CARACTERISTIQUES DE LA CHROMATOGRAPHIE	42
II- QUELQUES TYPES DE CHROMATOGRAPHIE	43

II-1- Chromatographie en Phase Gazeuse couplée au spectromètre de masse	43
II-2- Chromatographie d'exclusion.....	44
II-3- Chromatographie sur couche mince	44

MATERIEL ET METHODES

I- MATERIEL	46
I-1- Matériel biologique.....	46
I-1-1- Matériel végétal	46
I-1- 2- Germes testés	46
I-2- Milieu de culture.....	48
I-3- Produits chimiques.....	48
II- METHODES	48
II-1- Méthode de préparation des extraits.....	48
II-1-1- Préparation des extraits totaux	48
II-1-2- Préparation des extraits partitionnés	50
II-2- Méthode microbiologique	52
II-2-1- Préparation de la gélose Sabouraud.....	52
II-2-2- Incorporation des extraits végétaux à la gélose.....	52
II-2-3- Essai antimicrobien	54
II-2-3-1 Préparation de l'inoculum.....	54
II-2-3-2- Culture des germes.....	54
II-2-3-3- Dénombrement des colonies	54
II-3- Méthode Chimique	58
II-3-1-Tri phyto-chimique	58
II-3-1-1- Recherche des saponosides	58
II-3-1-2- Recherche des polyphénols.....	58
II-3-1-3- Recherche des stérols/terpènes.....	59
II-3-1-4- Recherche des flavonoïdes :.....	59
II-3-1-5- Recherche des quinones :.....	60
II-3-1-6- Recherche des alcaloïdes :	60
II-3-2- Chromatographie sur colonne	61
II-3-3- Chromatographie sur couche mince des sous fractions de X ₁₋₂	63
II-3-4- Analyse par chromatographie en phase gazeuse de la fraction F ₅	63
II-4- Méthode statistique.....	64

RESULTATS

I- TESTS ANTIFONGIQUES	65
I-1- Activités anticandidosiques des extraits totaux de EUCA	65
I-1-1- Activité anticandidosique de l'extrait aqueux (X_{Aq}).....	65
I-1-2- Activité anticandidosique de l'extrait hydro-éthanolique (X_0).....	69
I-2- Activités anticandidosiques des extraits partitionnés de EUCA.....	72
I-3- Activité anticandidosique des fractions chromatographiques de EUCA	79
I-4- Récapitulatif des résultats	85
II- ANALYSE STATISTIQUE DE L'ACTIVITE DES EXTRAITS DE EUCA.....	90
III- TRI PHYTO-CHIMIQUE DES EXTRAITS DE EUCA	92
IV- CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A UN SPECTROMETRE DE MASSE CPG/SM .	95

DISCUSSION ET CONCLUSION

I- DISCUSSION	99
II- CONCLUSION	108

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE	109
---------------------------------	-----

ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
BSTFA	: Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
CHU	: Centre Hospitalier Universitaire
CI₅₀	: Concentration Inhibitrice de 50%
CMF	: Concentration Minimale fongicide
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CPG/MS	: Chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse
DCA	: Dispositif Complémentaire Aléatoire
EUCA	: Nom de code de la poudre de <i>Eucalyptus torelliana</i> F. Muell.
HE	: Huile Essentielle
HPLC	: Chromatographie en phase Liquide à Haute Pression
IUFRO	: International Union Forest Research Organization
m/z	: rapport masse sur charge de molécules individuelles et ionisées
NIST	: National Institut of Standards and Technologie
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
SNC	: Système nerveux central
TMCS	: Triméthylchlorosilane
VIH	: Virus Immunodéficience Acquis
X_{Aq}	: Extrait aqueux
X₀	: Extrait hydro-éthanolique
X₁₋₁	: Extrait hexanique (huile végétale)
X₁₋₂	: Extrait aqueux de la partition Hexane-Eau
X₂₋₁	: Extrait acétatique
X₂₋₂	: Extrait aqueux de la partition Acétate d'éthyle-Eau
X₃₋₁	: Extrait butanolique
X₃₋₂	: Extrait aqueux de la partition Butanol-eau
X₄₋₁	: Extrait chloroformique
X₄₋₂	: Extrait aqueux de la partition chloroforme-Eau

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Morphologie de <i>Candida albicans</i> . Odds, 1988.....	11
Figure 2 : Aspect des chlamydoconidies de <i>C. albicans</i> vue en microscopie optique Martine, 2007	14
Figure 3 : Physiopathologie des candidémies. Eggimann <i>et al.</i> , 2003.....	22
Figure 4. Aspect macrosopique des colonies de <i>Candida sp.</i> sur milieu sabouraud. Fournier, 2011	26
Figure 5 : Cibles des différents antifongiques. Lortholary, 2004	28
Figure 6 : Photographie d'arbre, du tronc, des fruits et feuilles de <i>Eucalyptus torelliana</i> F.Muell. Agré, 2013.....	39
Figure 7 : Schéma de préparation des extraits totaux de EUCA.....	49
Figure 8 : Schéma de préparation des extraits partitionnés de EUCA.....	51
Figure 9 : Schéma de la méthode d'incorporation des extraits à la gélose sabouraud.....	53
Figure 10 : Schéma de la méthode de préparation de l'inoculum.....	56
Figure 11 : Schéma des tests de stérilité de tubes correspondant à la CMI	57
Figure 12: Schéma de la préparation des sous fractions de <i>Eucalyptus torelliana</i> F. Muell. sur gel de filtration de séphade-G ₅₀	62
Figure 13 : Effet de l'extrait X _{aq} de EUCA sur les levures du genre <i>Candida</i>	67
Figure 14 : Effetde l'extrait X ₀ de EUCA sur les levures du genre <i>Candida</i>	70
Figure 15 : Effet des extraits X ₁₋₁ et X ₁₋₂ de EUCA sur les levures du genre <i>Candida</i>	74
Figure 16 : Effet des extraits X ₂₋₁ et X ₂₋₂ de EUCA sur les levures du genre <i>Candida</i>	74
Figure 17 : Effet des extraits X ₃₋₁ et X ₃₋₂ de EUCA sur les levures du genre <i>Candida</i>	76
Figure 18 : Effet des extraits X ₄₋₁ et X ₄₋₂ de EUCA sur les levures du genre <i>Candida</i>	77
Figure 19 : Effet de la fraction F ₅ de EUCA sur les levures du genre <i>Candida</i>	83
Figure 20 : Effet des extraits X _{Aq} , X ₀ , X ₁₋₂ et F ₅ sur la croissance <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i>	86
Figure 21 : Effet des extraits X _{Aq} , X ₀ , X ₁₋₂ et F ₅ sur la croissance <i>in vitro</i> de <i>Candida glabrata</i>	87

Figure 22 : Effet des extraits X_{Aq} , X_0 , X_{1-2} et F_5 sur la croissance <i>in vitro</i> de <i>Candida tropicalis</i> ..	88
Figure 23 : Composés chimiques présents dans les extraits X_{Aq} , X_0 , X_{1-2} , F_5 de EUCA	94
Figure 24 : Profil chromatographique des composés phénoliques de la fraction F_5 de EUCA.	96
Figure 25 : Profil chromatographique des composés terpéniques de la fraction F_5 de EUCA	97

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : Descriptif des infections causées par <i>candida sp.</i>	23
TABLEAU II : Antifongigramme des levures du genre <i>candida</i> étudié	47
TABLEAU III : Valeurs des paramètres antifongiques comparées de X_{Aq}	68
TABLEAU IV: Valeurs des paramètres antifongiques comparées de X_0	71
TABLEAU V : Valeurs des paramètres antifongiques des extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique de <i>Eucalyptus torelliana</i> F. Meull.	78
TABLEAU VI : Valeurs des paramètres antifongiques comparées des fractions de X_{1-2}	80
TABLEAU VII : Valeurs des paramètres antifongiques comparées de la fraction F_5	84
TABLEAU VIII : Récapitulatif des valeurs des paramètres antifongiques comparées des extraits X_{Aq} , X_0 , X_{1-2} et F_5	89
TABLEAU IX : Statistiques descriptives des extraits de EUCA par groupes.....	91
TABLEAU X : Composés terpéniques et phénoliques présents dans la fraction F_5	98

INTRODUCTION

Utilisées depuis des siècles, les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs pour les hommes. En effet, selon les estimations de l'OMS, plus de 80% de la population africaine a recours à la médecine traditionnelle pour répondre à ses besoins de soins de santé (**Wood-Sheldon et al., 1997 ; Elujoba et al., 2005**). Cette utilisation des plantes médicinales a pris de l'ampleur à travers le monde et a gagné en popularité surtout dans la lutte contre les maladies infectieuses qui a elles seules enregistrent 14 millions de décès chaque année (**OMS, 2003**). De plus, la toxicité des produits chimiques, le coût élevé des médicaments chimiques, l'éloignement et/ou l'insuffisance des centres de santé en milieu rural, limitent une prise en charge véritable des problèmes de santé publique. A cela s'ajoute la complexité de la maîtrise des infections bactériennes et fongiques suite à un cancer solide ou une hémopathie maligne, à une chirurgie et une nutrition parentérale (**Talarmin et al., 2009**). Cette dernière situation s'est aggravée surtout avec l'avènement du VIH qui est une pandémie difficile à contenir; à éradiquer et qui engendre diverses infections opportunistes (**Schmutz et al., 1995; Denis & Lortholary, 2013**) dont les bactérioses, les viroses et les mycoses. Parmi ces infections, les mycoses ont pris des proportions considérables (**Hibbet et Donoghue, 2001 ; Poulain, 2013**) et celles à *Candida* dénommées candidoses sont les plus fréquentes en pathologie humaine et chez les personnes vivant avec le VIH (**Ann, 1982 ; Charles et al., 2007 ; Bonnin, 2012 ; Pihet & Agnès, 2013**). Par ailleurs, le traitement des candidoses reste difficile tant sur le plan chirurgical que sur le plan chimiothérapique car les molécules susceptibles de détruire les champignons pathogènes ou de ralentir leur croissance sont toxiques pour les cellules humaines (**Dromer & Dupont, 1996**). A cela, s'ajoute la résistance développée par ces champignons aux antifongiques usuels. Cette résistance est le plus souvent due à l'instabilité génétique des souches, aux limites d'outils de diagnostic en mycologie ainsi qu'à la capacité de certaines espèces à adhérer plus facilement aux muqueuses que d'autres, ce qui les rend plus virulentes (**Mccullough et al., 1996 ; Suarez, 1997 ; Dieng et al., 2005 ; Alanio & Bretagne, 2010 ; Dannaou, 2013**).

Pour faire face à ces préoccupations, les chercheurs utilisent des schémas thérapeutiques économiques et accessibles qui visent à détruire la résistance et l'émergence de ces mycoses sans toutefois entrainer des effets secondaires majeurs (**Benoit-Vical, 2005**). Certains chercheurs ont procédé par des modifications structurales en faisant des synthèses chimiques à partir de molécules préexistantes soit en changeant leur conformation soit en ajoutant des radicaux. Par contre, d'autres chercheurs ont envisagé de s'appuyer sur les vertus médicinales des plantes de la pharmacopée pour rechercher de nouvelles têtes de série de molécules ou principes actifs à activités biologiques prononcées. En effet, près de 74% des plantes à usage thérapeutique sont pharmacologiquement actives (**Wood-Sheldon et al., 1997**). Certaines parmi elles possèdent des activités

antimicrobiennes et sont considérées comme source potentielle de nouveaux composés anti-infectieux (**Press, 1996 ; Handa et al., 2006**).

A l'instar de nombreuses équipes de recherche orientées vers l'étude des plantes médicinales, notre laboratoire s'est inscrit dans cette logique depuis 1991. Il s'appuie sur les vertus thérapeutiques des plantes de la médecine traditionnelle ivoirienne pour donner une base scientifique aux médications à base de plantes et valoriser la richesse du patrimoine floristique. Pour y parvenir, une enquête ethnobotanique a été menée et a abouti à la sélection de plusieurs plantes à vertus thérapeutiques avérées, testées en culture *in vitro* sur des souches bactériennes et fongiques (**Guédé-Guina et al., 1997 ; Djaman et al., 1997, Ahon et al., 2012 ; Kokora et al., 2013 ; Ackah et al., 2014**). Ces plantes ont montré des vertus thérapeutiques avérées. Parmi celles auxquelles on accorde des propriétés anti-infectieuses, figure *Eucalyptus torelliana* F. Muell, une plante de la famille des Myrtaceae. Elle est utilisée dans les milieux traditionnels pour le traitement de nombreuses infections.

La présente étude a donc pour but de vérifier les propriétés anti-infectieuses accordées à cette plante. C'est une méthode de biovalorisation de *Eucalyptus torelliana* F. Muell. qui permet de rechercher l'extrait et/ou de la fraction qui aurait la meilleure activité antifongique par une méthode bioguidée.

L'objectif général de cette étude est de déterminer l'activité antifongique des extraits totaux et des fractions organiques de *Eucalyptus torelliana* F. Muell.

Pour atteindre cet objectif, trois objectifs spécifiques ont été fixés à cette étude :

- 1- Evaluer l'activité antifongique des extraits aqueux et hydro-alcoolique de cette plante sur la croissance *in vitro* de trois isolats fongiques (*Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida tropicalis*) à phénotype connu.
- 2- Optimiser l'activité antifongique par des partitions bioguidées suite à une chromatographie sur colonne.
- 3- Mettre en évidence par tri phyto-chimique et par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse (CPG/SM) la nature des principes actifs à la base de l'activité antifongique.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAMPIGNONS

I- CARACTERES GENERAUX

I-1- Définition

Les champignons représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes (**Mullër & Schmit, 2007**). Ce sont des organismes eucaryotes (pourvus de véritables noyaux) dont les divisions impliquent des séquences mitotiques régulières. Les champignons sont des cryptogames cellulaires à thalles (absence de fleurs et de graines), non chlorophylliens qui constituent le 5^{ème} règne fongique, le règne des mycètes (**Courtecuisse & Duhem, 2000 ; Bon, 2004**). Les champignons représentent un groupe d'eucaryotes anciens qui est constitué d'organismes très diversifiés (**Hawksworth, 2001**). Ils sont très nombreux et répandus dans tous les milieux. On recense environ 250.000 espèces parmi lesquels 3700 sont rencontrées couramment et environ 400 espèces sont indexés en mycologie médicale (**Chabasse, 1999 ; Kra, 2001**).

I-2- Caractères morphologiques

L'appareil végétatif des champignons est le thalle. Il est l'élément caractéristique de toute forme fongique et l'on ne distingue ni racine, ni tige, ni feuilles. Le thalle peut se présenter sous deux aspects différents (**Redecker, 2002**) :

- le thalle filamenteux qui constitue un mycélium, ramifié et tenu. On distingue ceux dont les filaments sont cloisonnés et qui se constituent en articles mono ou plurinucléés et prennent le nom d'hyphe. On dit que ces filaments sont septés d'où les septomycètes. Leur ramification de 3 à 5µm de diamètre est droite. Elles permettent des échanges cytoplasmiques d'une cellule à l'autre. Et ceux dont les filaments sont souvent non cloisonnés. Dans ce dernier cas, on remarque plusieurs noyaux dans un cytoplasme commun. Ces filaments sont dits siphonnés ou coenocytiques, on parle de siphomycète. Leur ramification de 5 à 15µm de diamètre est en angle droit et d'environ 100µm de longueur (**Koenig, 1995**) ;
- le thalle levuriforme (levure) constitué par des globules unicellulaires (arrondie ou ovale) forme souvent des pseudomycéliums lorsque le bourgeon ne se détache pas des autres et sont différents des mycéliums vrais. Leurs septes sont habituellement difficiles à reconnaître et sont incurvés. Leurs branches latérales sont rétrécies à leurs points d'origine et il y a un septum à l'origine de la branche (**Therizol Ferly, 1990**).

On rencontre souvent des thalles plasmodides chez les myxomycètes. Par ailleurs, quelques champignons ont une morphologie différente à l'état parasitaire et à l'état saprophytique. Ils sont

aits dimorphiques (**Jennings & Lysek, 1996**). Ainsi , à 25°C *in vitro*, ils ont une forme filamenteuse et à 37°C *in vivo* et en culture sur milieux enrichis, ils ont une forme levuriforme.

En outre, tous les champignons ont une paroi constituée de :

- polysaccharide très résistant constitué de résidus N-acétylglucosamine
 - polyosides simples (mannanes, glucanes, cellulose),
 - disaccharides (glucose, galactose),
 - polyosides aminés (chitine, chitosane)
 - de callose, d'hémicellulose.
- stérols : dont le plus important est l'ergostérol,
- Polyols (**David, 2003 ; Le Calvez, 2009**).

I-3- Croissance

La croissance des champignons levuriformes résulte d'un processus de bourgeonnement avec une striction au niveau de chaque bourgeon. Ceux-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'allonge pour former un pseudo-mycélium distinct d'un mycélium vrai (**Therizol-Ferly, 1990**).

Pour les champignons filamenteux, la croissance se déroule généralement de façon centrifuge dans toutes les directions, à partir d'un point central, donnant des colonies rondes (**Therizol-Ferly, 1990**). Cette croissance est assurée par des hyphes qui sont constitués de cellules hétérocaryotiques ou coenocytiques. Leur extension est restreinte à l'apex (**Le Calvez, 2009**). On observe à l'apex du filament une accumulation de vésicules dérivant du réticulum endoplasmique. Après division, l'article apical nouvellement formé peut se séparer du reste du mycélium par une cloison (mycélium siphonné). Les hyphes vont se brancher en réseau, déterminant en partie la morphologie macroscopique du thalle (**Jennings & Lysek, 1996 ; David, 2003**).

I-4- Nutrition

Dépourvus de chlorophylles, les champignons ne peuvent synthétiser leurs propres matières organiques. Ils puisent dans le milieu ambiant l'eau, les substances organiques et minérales nécessaires à leurs propres synthèses : ils sont dits hétérotrophes (**Jennings & Lysek, 1996 ; David, 2003**). Pour cela, ils dégradent la matière organique complexe grâce à l'excrétion d'enzymes et d'acides puis ils absorbent les composants digérés. Cette nutrition s'effectue à travers la paroi perméable de leur appareil végétatif et permet de qualifier les champignons d'absorbotrophes. Ce sont des êtres vivants qui se nourrissent donc par absorption (décomposition) et non par ingestion (**Courtecuisse & Duhem, 2000 ; Bon, 2004**). Quelque soit leur mode de vie, les champignons ont

besoin principalement de carbones pour lesquels ils sont dits hétérotrophes. Ils peuvent être autotrophes pour l'azote, le potassium, le calcium, le soufre et quelques ions métalliques : fer, cuivre, manganèse, zinc.

I-5- Reproduction

Les organes reproducteurs des champignons sont des spores. Ils se reproduisent selon 2 modes :

- le mode asexué appelé anamorphe,
- le mode sexué dit téléomorphe.

D'autres peuvent se multiplier par les 2 voies ils sont dits holomorphes. Par ailleurs, certaines espèces de champignons ne se reproduisent pas par des spores. Elles sont dites "mycélium serilum" (**Boiron, 1996**).

I-5-1- Reproduction asexuée

Cette reproduction est la plus fréquente et la plus simple, on l'appelle également multiplication végétative. Elle est responsable de l'expansion rapide des champignons. Elle se fait par la formation de spores mitotiques. Ces spores peuvent être formées de plusieurs façons. On distingue :

- les spores endogènes encore appelées endospores. Elles se forment à l'intérieur d'un sac (le sporocyste) porté par un filament appelé sporocystophore. Leur cytoplasme se divise en particules nucléées qui donnent plus tard des spores. Ainsi à maturité, la paroi du sporocyste s'ouvre et libère les spores dans l'environnement du champignon (les mucorales) ;
- les spores exogènes encore appelées conidies ou conidiospores. Elles sont formées librement sur des substrats à partir du mycélium lui-même.

I-5-2-Reproduction sexuée

Elle est à la base de la classification des champignons. Cette reproduction fait intervenir des filaments spécialisés par la rencontre de leurs noyaux suivie d'une méiose. Le cycle de reproduction sexuelle des champignons se déroule en 3 étapes successives (**Jennings & Lysek, 1996 ; Ackah, 2009 ; Le Calvez, 2009**) :

- la plasmogamie : fusion des protoplasmes (fusion cellulaire) ;
- la caryogamie : fusion des noyaux ;
- la méiose suivie de mitose.

Dans la plupart des reproductions sexuées, la plasmogamie et la caryogamie sont séparées dans le temps. La plasmogamie aboutit à une cellule appelée dicaryon car possédant 2 noyaux haploïdes. Cette reproduction peut avoir lieu dans le thalle d'une seule spore. Ainsi, le champignon est dit homothallique et les dicaryons obtenus sont dits homocaryons. Dans le cas où la reproduction a lieu

dans 2 thalles différents mais compatibles, le champignon est dit hétérothallique et les dicaryons sont appelés hétérocaryons (**Therizol-Ferly, 1990**).

Par la suite, les 2 noyaux haploïdes fusionnent c'est la caryogamie. On obtient alors des cellules diploïdes. Ces cellules diploïdes subiront la méiose et les convertissent en 4 cellules haploïdes (**David, 2003**).

Il existe 3 types de spores sexuées en fonction des champignons à savoir :

- les zygospores produites par des zygomycètes ;
- les ascospores produites par les ascomycètes ;
- les basidiospores produites par les basidiomycètes.

II- CLASSIFICATION

Le concept d'espèce chez les champignons est une notion qui alimente les débats. De très nombreuses classifications ont vu le jour. Elles sont modifiées avec l'évolution des connaissances et l'application des techniques de biologie moléculaire (**Taylor et al., 2000**). Les espèces peuvent être différenciées de différentes façons :

- historiquement (selon leurs habitats et leurs localisations géographiques) ;
- selon la phylogénie.

II-1- Classification Historique

Dans le passé, les champignons ont été classés comme faisant partie du règne végétal du fait de la présence d'une paroi cellulaire et de plusieurs similitudes entre leurs cycles de reproduction et ceux des algues.

En 1969, Robert H. Whittaker propose une division en cinq règnes : les procaryotes (ou bactéries, à cellules sans noyau), les protistes (eucaryotes unicellulaires), les végétaux *Plantae* (eucaryotes pluricellulaires photosynthétiques), les animaux *Animalia* (eucaryotes pluricellulaires hétérotrophes) et les champignons *Fungi* (eucaryotes pluricellulaires non-photosynthétiques).

L'une des classifications la plus rependue à cette époque est celle de Geoffrey Clough Ainsworth et Guy Richard Bisby dans "Dictionary of fungi" (1971) bien qu'elle soit aujourd'hui profondément remaniée (9^{ème} édition en 2001). Elle est basée sur la morphologie. Selon ce concept morphologique, la grande majorité des espèces décrites à ce jour reposent sur une analyse des traits phénotypiques (**Guarro et al., 1999 ; Taylor et al., 2000**).

Les champignons peuvent être également décrits selon leurs habitats, leurs localisations géographiques (écologie) (**Taylor et al., 2000**). Au milieu du XX^e siècle, les champignons sont individualisés pour la première fois dans un règne particulier, les *Fungi* (**Silar & Malagnac, 2013**). Ainsi le règne des fungi se divise en deux (**Courtecuisse & Duhem, 2000 ; Bon, 2004**) :

-
- les Myxomycota présentant des plasmodes se subdivisent en 3 sous-divisions que sont :
 - * les Acrasiomycotina
 - * les Myxomycotina
 - * les Plasmodiophoromycotina
 - les Eumycota ne présentant pas de plasmodes se subdivisent en cinq :
 - * les Mastigomycotina
 - * les Deuteromycotina
 - * les Zygomycotina
 - * les Ascomycotina
 - * les Basidiomycotina

II-2- Classification phylogénétique

Les premières études de portions d'ADN et de chromosomes tendent à proposer une nouvelle classification des champignons : la classification phylogénétique. En effet, l'application récente du concept phylogénétique qui décrit l'espèce comme un groupe monophylétique au sein duquel le taux d'homologie entre séquence est élevé, a été nécessaire grâce au progrès des techniques d'analyses moléculaires et tend à être massivement appliqué en mycologie (**Le Calvez, 2009**). Ainsi, l'organisation des champignons en phyla est actuellement revisitée sur des bases phylogénétiques. Les premières études moléculaires ont démontré dans un premier temps la monophylie du règne fungi sur la base de l'analyse du gène codant l'ARN ribosomal 18S (**Le Calvez, 2009**). Par ailleurs, des études ont montré que les champignons possédant des cellules flagellées représentent les organismes les plus anciens d'un point de vue phylogénétique et constituent un groupe "frère" des organismes non flagellés. L'analyse multigène menée au cours de cette même étude a de plus démontré à nouveau la monophylie des Ascomycota, Basidiomycota et Glomeromycota. Ainsi, ils sont regroupés en sous-règne appelé dikarya qui s'appuie sur la présence d'hyphes dicaryotes au cours du cycle sexuel de ces organismes. Si leur monophylie est confirmée, les Chytridiomycota et les Zygomycota sont polyphylétiques (**Bar-Hen et al., 2008 ; Le Calvez, 2009**). A l'heure actuelle, la taxonomie communément acceptée par la communauté mycologique est celle proposée par Hibbet (**Le Calvez, 2009**). Par conséquent 5 phyla sont aujourd'hui acceptés selon l'analyse phylogénétique reposant sur 6 gènes et plus de 200 organismes (**Le Calvez, 2009**).

II-3- Caractéristiques des cinq phyla fongiques

II-3-1- *Chytridiomycota*

C'est la plus ancienne lignée des champignons. Les champignons de ce phylum sont les seuls à posséder des spores uniflagellées. La présence de flagelle les restreint aux milieux aquatiques et dans les sols humides (**Jennings & Lysek, 1996 ; James et al., 2000**). Ce sont des organismes souvent microscopiques mais qui peuvent produire un mycélium. La plupart sont capables de dégrader un grand nombre de substrats (**Shearer et al., 2007**).

Dans ce phylum, 1000 espèces ont été décrites ce qui correspond à environ 1 % des espèces de champignons décrites (**Taylor et al., 2004**). Parmi elles, on recense de nombreuses espèces pathogènes, d'autres sont des parasites des algues (**Longcore et al., 1999 ; Küpper et al., 2006**).

II-3-2- *Zygomycota*

Il constitue l'un des groupes anciens des champignons qui a divergé après les Chytridiomycota (**Bar-Hen et al., 2008**). Ce phylum formé principalement de micro-organismes est polyphylétique (**Tanabe et al., 2000 ; Bar-Hen et al., 2008**). Les modes de vie les plus fréquemment rencontrés sont le saprophytisme et le parasitisme surtout chez les insectes. A ce jour plus de 600 espèces sont décrites et représentent moins de 1 % des champignons décrits (**Hawksworth & Rossman, 1997 ; Hawksworth, 2001 ; Le Calvez, 2009**).

II-3-3- *Glomeromycota*

Autrefois, les organismes de ce phylum étaient classés parmi les Zygomycota dans l'ordre des Glomérales, un groupe qui renfermait les champignons mycorhiziens à arbuscules. A la suite de l'analyse phylogénétique un nouveau phylum a été érigé pour ce groupe (**Schüßer et al., 2001**).

Actuellement 160 espèces ont été décrites (**Helgason et al., 1998 ; Vandenkoornhuyse et al., 2002 ; Opik et al., 2008**).

II-3-4- *Dicaryotes (Ascomycota et Basidiomycota)*

Ces 2 phyla forment le groupe des dicaryotes et représentent la majorité des espèces de champignons décrites; 67000 espèces sur les 100000 recensées (**Taylor et al., 2004**).

➤ *Ascomycota*

Les organismes du phylum Ascomycota compte à ce jour 45000 espèces (**Hawksworth, 2001 ; Taylor et al., 2004**). Cette classification a été et est toujours l'objet de nombreuses révisions. Certaines classifications des Ascomycota sont basées sur la morphologie de l'asque d'autres sur celle de l'ascocarpe (organe sur ou dans lequel se forment les asques).

La classification la plus récente définit 3 sous-embranchements d'Ascomycètes (**Le Calvez, 2009**) :

- les Taphrinomycotina ;
- les Saccharomycotina ;
- les Pezizomycotina.

Les Ascomycota constituent la quasi-totalité des champignons capables de former des associations licheniques. Certains de ces organismes sont utilisés en agro-alimentaire ou en pharmacologie.

➤ **Basidiomycota**

Dans le phylum des Basidiomycota, on retrouve 22000 espèces décrites (**Taylor et al., 2004**). Les organismes de ce phylum ont la capacité de dégrader le matériel ligno-cellulosique le plus élaboré (**Hibbet & Donoghue, 2001**). On les qualifie pour cela de "champignons des bois". Leur identification ne peut être que macroscopique.

II-3-5- Deuteromycota

Pour un nombre non négligeable de ce genre de champignon, on ne connaît que la reproduction asexuée. Pour situer ces organismes dans la classification générale, un groupe artificiel a été créé : les deuteromycota ou champignons anamorphes ou champignons imparfaits ou encore champignons conidiens ou champignons mitosporiques.

C'est un groupe hétérogène d'organismes microscopiques liés à une altération visible de biens de consommation et de l'habitat. Par ailleurs la plupart des moisissures rencontrées dans l'habitat sont des Deuteromycota. En effet, sur les 16000 espèces de Deuteromycota décrites à ce jour, une soixantaine est rencontrée fréquemment dans l'habitat (**Flannigan et al., 1996 ; Kirk et al., 2001 ; Samson et al., 2002 ; Nolard et al., 2003**).

III- CHAMPIGNONS LEVURIFORMES DU GENRE *CANDIDA*

Les souches du genre *Candida* sont des champignons levuriformes opportunistes à l'origine de la plupart des candidoses et fréquemment rencontrées en pathologie humaine (**Pfaller & Diekema, 2010 ; Pinel et al., 2012 ; Pihet & Agnès 2013 ; Poulain, 2013**). Elles représentent près de 83 % de toutes les levures isolées de l'homme (**Abi-Said et al., 1997 ; Agoumi et al., 2000**). Il comporte plus de 200 espèces, seules 10 % sont connues pour être responsables d'infections chez l'Homme (**Eggimann et al., 2003**).

Le genre *candida* est de la classe des Blastomycètes, de l'ordre des Cryptococcales puis de la famille des Deutéromycètes. Il regroupe l'ensemble des champignons imparfaits, c'est-à-dire n'ayant aucun cycle sexuel connu. Il est caractérisé par des levures blanches de type asporogène ayant la capacité de former des pseudohyphes. Ce sont des cellules, de forme variable: globuleuses, ovoïdes,

cylindriques et allongées qui se reproduisent par bourgeonnement multilatéral conduisant à la production des blastospores qui entame un nouveau cycle de bourgeonnement.

La forme hyphe (mycélienne) est caractérisée par la formation d'un tube microscopique (tube germinatif) à partir d'un site indéterminé situé sur le blastospore. Au fur et à mesure que l'hyphe s'allonge, des septa sont formés et séparent les unités cellulaires distinctes. De plus, un hyphe peut permettre la formation de blastospores et/ou d'hyphes secondaires situées latéralement au tube germinatif principal et à proximité des septa. Ainsi, un hyphe peut émerger à partir d'une blastospore ou d'un hyphe préexistant. (Figure 1).

Sous certaines conditions environnementales extrêmes en termes de milieu et de température, *Candida albicans* peut aussi former des chlamydospores, qui sont des formes de résistance de *Candida albicans* et participent à l'identification du champignon en laboratoire. Elles sont rarement mises en évidence *in vivo* (Cole et al 1991).

Les levures du genre *Candida* sont cultivées sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques (Par exemple le chloramphénicol et l'actidione) à large spectre incubé à 30 et 37 °C. Ces cultures se développent rapidement et sont visibles en 24 à 48 heures. Les espèces de ce genre se distinguent principalement par leur morphologie coloniale, leur capacité à utiliser différentes sources de carbone et leur type de fermentation (Shepherd et al., 1985). Sept espèces du genre *Candida* ont une importance médicale : *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *C. kyfer* et *C. albicans*. Cette dernière étant la plus fréquemment isolée des patients quelle que soit la zone géographique (Bergquist, 2006 ; Talarmin et al 2009 ; Toubas, 2013). Le *Candida* pénètre dans l'organisme soit par contact direct, soit par voie digestive ou par voie génitale, et les infections qui en découlent sont dénommées candidoses.

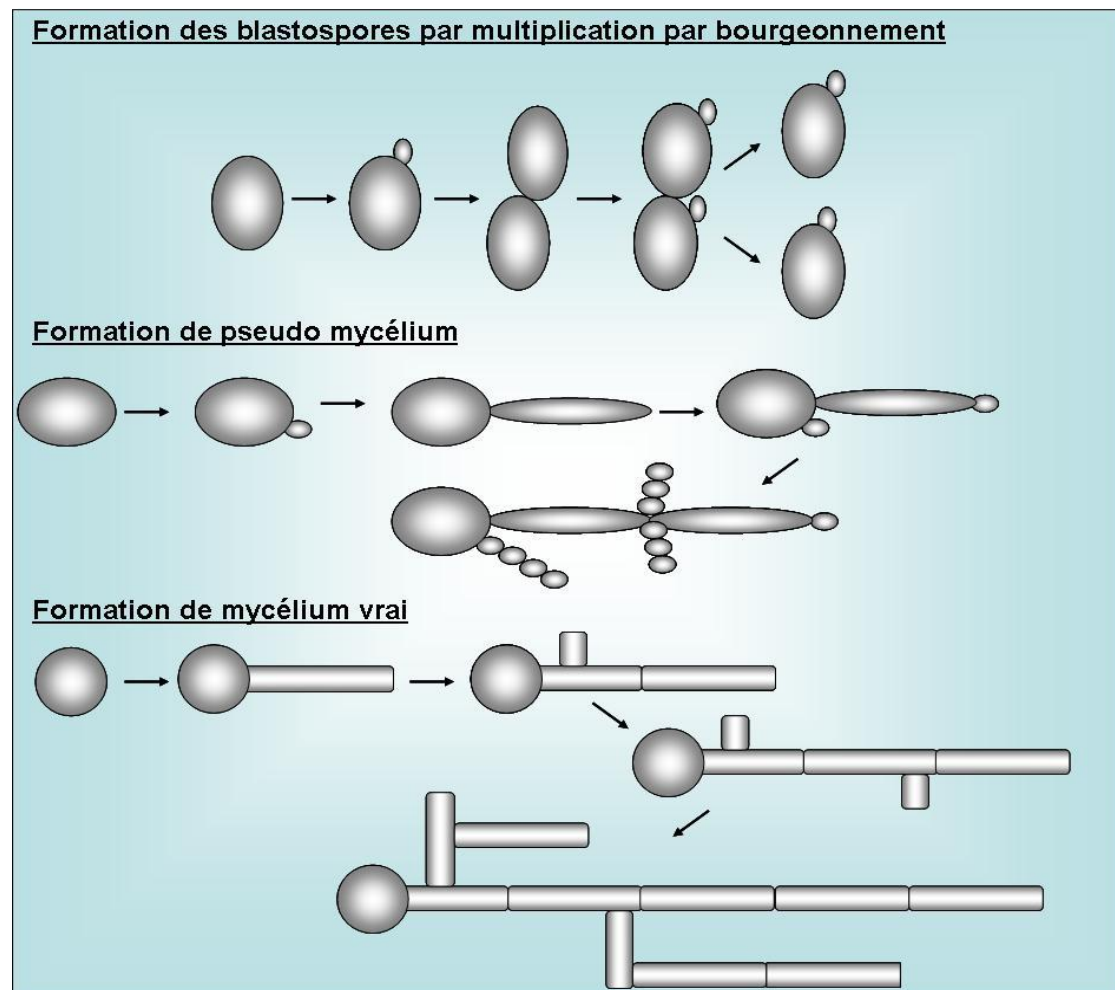


Figure 1 : Morphologie de *Candida albicans* (Odds, 1988)

III-1- *Candida albicans*

III-1-1- Habitat

C'est un champignon opportuniste faisant normalement partie de la flore commensale d'individus et d'animaux sains. On le retrouve associé à la muqueuse buccale chez environ 80% d'individus sains, où il ne cause aucune infection (**Mccullough et al., 1996**). Il est également présent dans l'appareil digestif, sur l'épiderme et dans l'appareil génital (**Mc Cullough et al., 1996**). Il prolifère surtout dans les localisations à tendance acide. Sa découverte dans l'environnement est due à une contamination par l'homme ou par un animal infecté.

III-1-2- Description

ROBIN décrit en 1853, un organisme responsable de muguet chez les nourrissons et les adultes et le dénomme *Oidium albicans*. Cette levure a été décrite sous 111 synonymes différents, répertoriés dans le livre "The yeasts" de 1984. *C. albicans* est un champignon levuriforme unicellulaire diploïde de forme ovale ou circulaire qui mesure environ 3 à 6 µm de long sur 6 à 10 µm de large et sa forme sexuée n'est pas connue. En l'espace de 1 ou 2 jour (s), le genre *Candida* peut se multiplier et donner des chlamydozoïdes. Cette reproduction se fait par bourgeonnement multilatéral. Le pseudomycélium peut être absent, rudimentaire ou abondant. On note souvent la présence de vrai mycélium. *C. albicans* présente un dimorphisme : une forme lévuriforme non pathogène et une forme filamenteuse pathogène (**Chabasse, 2009**).

III-1-3- pouvoir pathogène

Candida albicans est la plus fréquemment incriminée dans les infections humaines à *Candida* (**Plantefève et al., 2004 ; Warnock, 2007 ; Pfaller et al 2010 ; Bonnin, 2012 ; Pihet & Agnès, 2013**). Cette pathogénicité survient sous l'effet de facteurs favorisants. Sa dissémination est endogène et se déroule à partir du tube digestif par contiguïté vers les voies génitales, respiratoires, la peau ou par voie hématogène vers les autres organes. Les infections causées par cette espèce trouvent leur origine dans le mode de vie de chaque individu, dans la fréquence d'ingurgitation des différents médicaments (prise importante d'immunodépresseurs, d'oestroprogestatifs de synthèse ou de corticoïdes) qui diminuent l'immunité (**Neofytos et al., 2010 ; Bustamante et al., 2011 ; Taieb et al., 2011**).

III-1-4- Diagnostic

L'identification de l'espèce de *C. albicans* peut se faire de deux manières :

- par un examen direct après coloration de GRAM qui montre des levures bourgeonnantes souvent associées au pseudomycélium (Figure 2) ;
- par la culture sur milieu de Sabouraud pouvant être additionné d'antibiotiques qui poussent rapidement en 24 ou 48 heures à 30 °C ou 37 °C. Certains milieux sélectifs chromogènes peuvent être utilisés dès l'isolement et permet de distinguer à partir d'un substrat chromogène ou fluorescent *C. albicans* des autres levures en détectant des enzymes. L'identification est possible par différentes techniques dont l'électrosynérèse, l'immunofluorescence, l'immunoélectrophorèse, l'hémagglutination. La recherche de *C. albicans* se fait également par les techniques d'anatomo-pathologie et radiologie.

Cette identification peut être aussi basée sur les caractères d'assimilation des sucres (aux anogramme) et de fermentation des sucres (zymogramme) à l'aide de galeries commerciales.

Au niveau de l'assimilation des sucres, le galactose, le saccharose, le maltose et le tréhalose donnent une réaction positive. Quant au cellobiose, lactose et raffinose ils présentent une réaction négative. Concernant la fermentation des sucres, le maltose donne une réaction positive. Quant au galactose, il donne une réaction variable. Le saccharose et le lactose donnent une réaction négative

(Koenig, 1995).



**Figure 2 : Aspect des chlamydoconidies de *C. albicans* vue en microscopie optique
(Martine, 2007)**

III-2- *Candida glabrata*

III-2-1- Habitat

Rarement isolé dans la nature, c'est un commensal (saprophyte) des voies génito-urinaires, respiratoires, buccaux et du tube digestif. Il est connu auparavant sous le nom de *Torulopsis glabrata* et retrouvé dans 5 à 8 % des isolats (**Banerjee et al., 1991 ; Beck-Sague & Jarvis, 1993**).

III-2-2- Description

Le *candida glabrata* fait partie des champignons de la flore humaine. Cette levure fait partie des *candida* saprophytes (commensales) présents naturellement chez l'homme. Elle est haploïde, de forme variable (ronde à allongée) et de petite taille comprise entre 1 et 4 µm (**Calderone, 2002**). Elle se reproduit par bourgeonnement multilatéral et ne présente pas de dimorphisme. Le pseudomycélium peut être absent, rudimentaire ou abondant. On note parfois la présence de vrai mycélium. Contrairement aux autres espèces de *Candida*, *C. glabrata* n'a pas des forme filamenteuse (**Odds et al., 1990; 1997**). Aucun cycle sexuel n'est connu pour cette espèce (**Muller et al., 2008**).

III-2-3- pouvoir pathogène

De nature commensal, *C. glabrata* a toujours été considéré comme un saprophyte non pathogène pour l'être humain. Mais dans des conditions de faiblesse de l'immunité, il peut devenir pathogène et provoquer des candidoses urogénitales ou, en cas d'infestation généralisée, une candidémie. Après *C. albicans*, *C. glabrata* est la deuxième espèce de *Candida* impliquée dans les candidoses invasives. Il a causé 12 % des candidoses nosocomiales dans le monde en 2003 (**Pfaller & Diekema, 2007**).

III-2-4- Diagnostic

Le diagnostic repose sur l'examen direct montrant une présence de petites levures qui ne filamentent pas. Aussi en culture sur milieu Sabouraud sans Actidione, cette espèce pousse rapidement en présentant des colonies blanches, crémeuses, plates et brillantes. L'absence de pseudomycélium sur RAT ou PCB permet également de faire un diagnostic de cette espèce. Par ailleurs, la PCR est aussi utilisée comme méthode de diagnostic (**Ahmad et al., 2002 ; Avni et al., 2011**).

Concernant l'étude de la fermentation et de l'assimilation des sucres, elle ne fermente et n'assimile que le glucose et le tréhalose.

III-3- *Candida tropicalis*

III-3-1- Habitat

Présentant une virulence importante (Pfaller & Diekema, 2010), *C. tropicalis* est un Saprophyte de la nature (sol, eau, céréales), retrouvé dans le tube digestif et les voies urinaires de l'homme. Elle est aussi présente chez des patients ayant des tumeurs solides, des pathologies onco-hématologiques ou chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques (Horn *et al.*, 2009).

III-3-2- Description

Cette espèce de levure est diploïde, de forme variable ronde à allongée mesurant de 6 à 11 µm de long sur 5 à 7 µm de large. *Candida tropicalis* a été décrit en 1923 par BERKHOUT et sa forme excate n'est pas parfaitement connue. Il se reproduit par bourgeonnement multilatéral, le pseudomycélium peut être absent, rudimentaire ou abondant. On note parfois la présence de vrai mycélium. C'est une Levure non pigmentée, à fermentation (+) ou (-), uréase (-), et qui n'assimile pas l'inositol et la créatinine.

III-3-3- pouvoir pathogène

Certaines études ont montré que *C. tropicalis* est encore plus invasive que *C. albicans* dans l'intestin humain, en particulier chez les patients en oncologie (Goel *et al.*, 2009 ; Oberoi *et al.*, 2012). *C. tropicalis* provoque des infections avec une mortalité élevée chez les adultes et les enfants atteints de tumeurs malignes hématologiques ou chez les personnes immunodéprimées (Wingard, 1995 ; Roilides *et al.*, 2003). La capacité de cet organisme à produire des grappes est l'un de ses principaux facteurs de virulence. Une fois introduit dans l'hôte immunodéprimé, *C. tropicalis* peut être plus virulente que *C. albicans* et évoluer rapidement de la colonisation à l'invasion (Juyal *et al.*, 2013).

III-3-4- diagnostic

Le diagnostic repose sur l'examen direct avec présence de levures parfois associées à du pseudomycélium. La culture est rapide sur sabouraud et retardée ou inhibée sur sabouraud-actidione. Par ailleurs, l'étude de l'assimilation et de la fermentation des sucres : glucose, galactose, maltose, tréhalose permet de faire un diagnostic de cette espèce. En outre, des tests biochimiques (système de microtubes API 20 rapide) et des techniques moléculaires sont aussi réalisés pour l'identification des espèces des colonies isolées (Antonopoulou *et al.*, 2009 ; Krawczyk *et al.*, 2009).

MYCOSES

I- DEFINITION GENERALE

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 & Bretagne, 2005**). Les mycoses doivent être distinguées :

- des intoxications par les champignons vénéneux (champignons supérieurs) responsables de phénomènes toxiques ;
- des mycotoxicoses : pathologies dues à la présence dans l'organisme de toxines fongiques liées ou non à celle du champignon qui la produit ; contractées généralement par voie digestive (exemple l'aflatoxine libérée par *Aspergillus flavus* dans les céréales conservées à l'humidité et à la chaleur).
- et des allergies mycosiques qui sont des manifestations diverses d'hypersensibilités développées vis à vis de champignons microscopiques, que ceux-ci soient ou non présents dans l'organisme.

II- CARACTERES CLINIQUES DES MYCOSES

Les mycoses évoluant sur un mode subaigu ou chronique, ne produisent le plus souvent aucun symptôme clinique de maladie infectieuse tel qu'on en observe lorsque bactéries ou virus sont en cause, en particulier :

- absence de réaction fébrile, sauf lorsque l'envahissement est disséminé, systémique ou lorsque se surajoute au développement fongique l'action d'une mycotoxine ;
- absence de douleur, du fait de la rareté des phénomènes inflammatoires. Elle n'apparaît qu'en cas de destruction d'organes fonctionnels ou vitaux (les mycétomes) ;
- absence de manifestation d'altération de l'état général avant une dissémination viscérale ou systémique ;
- absence de modifications des constantes biologiques, qui n'apparaissent que très tardivement au cours d'une évolution fâcheuse ;
- et les formes inapparentes évolutives qui peuvent être mortelles, même traitées (**Pierard *et al.*, 1993 , Chabasse *et al.*, 2008**).

C'est donc, le plus souvent devant une affection très évoluée, lorsqu'apparaissent des symptômes cliniques de types infectieux n'ayant pas répondu à diverses thérapeutiques habituellement utilisées en infectiologie, à visée anti-bactérienne ou anti-inflammatoire que l'on soupçonne des mycoses. Afin de mieux cerner les caractères spécifiques des mycoses, une classification médicale en a été établie selon la localisation des lésions en même temps que selon le type de champignon en cause

(Feuilhade, 1998 ; Chabasse *et al.*, 2008). 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), induites par des champignons (Badillet, 1991) ;
- les mycoses semi profondes ou sous cutanées rares dans les régions tempérées, que l'on rencontre surtout dans les pays tropicaux ont un site d'inoculation qui est souvent cutané. Leur extension et leur dissémination ne touchent habituellement pas les organes internes (Chouvalova, 1984) ;
- et les mycoses profondes ou systémiques ont souvent une voie de contamination aérienne et se caractérisent par des envahissements tissulaires et viscéraux divers aboutissant à des tableaux cliniques sévères et aux formes les plus graves (Marty *et al.*, 2000).

Dans cette étude nous nous intéresserons particulièrement aux cas de candidoses.

III- CANDIDOSES

Les candidoses sont des mycoses cosmopolites, à développement localisé ou généralisé, dues à des espèces du genre *Candida* (Plantin, 1997 ; Perbet, 1999). Ce sont des maladies insidieuses, pratiquement inconnues il y a 50 ans, mais qui touchent actuellement des millions de personnes dans le monde (Dupont, 1992 ; Develoux *et al.*, 2005). Non traitée, cette affection peut s'étendre et détériorer progressivement et gravement la santé en contribuant à l'affaiblissement du système immunitaire. En termes de fréquence, parmi les mycoses, les candidoses prédominent de façon importante. Elles touchent 80 % à 85 % des personnes infectées par le VIH (Rangelfaustro *et al.*, 1999). Les localisations préférentielles sont relativement hiérarchisées en fonction de l'évolution de l'immunodépression. On voit d'abord des candidoses buccales et vaginales puis, à des stades plus avancés, des candidoses oesophagiennes (Yigit *et al.*, 2011). Des patients peuvent présenter des candidoses à localisations oesophagiennes sans en avoir dans la bouche.

III-1- Etiologie

Parmi les nombreuses espèces connues isolées, seules certaines peuvent présenter un pouvoir pathogène pour l'homme. *Candida albicans* est le plus fréquemment retrouvé à l'origine des manifestations pathologiques et les colonisations à *Candida sp* (Warnock, 2007 ; Pfaller *et al* 2010). Ensuite viennent *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*), *Candida zeylanoïdes*, *Candida rugosa* et *Candida norvegensis* (Pilly, 2004).

III-2- Epidémiologie

Les *Candida* sont des parasites humains ou animaux. L'homme constitue le principal "réservoir" de *Candida albicans*. Le champignon y végète à l'état saprophyte dans la cavité buccale ou le tube digestif, plus rarement les voies génitales. L'homme peut s'infecter par contact : contamination du nouveau-né lors de son passage dans le tractus génital dans une candidose génitale. L'infection est d'origine endogène à partir de la flore saprophyte dont le pouvoir pathogène se trouve exacerber :

- par des facteurs généraux dont l'âge (prématuré, nouveau-né, vieillard), la dépression immunitaire congénitale ou acquise (maladie de HODGKIN, chimiothérapie anticancéreuse et immunosuppressive, radiothérapie, SIDA (Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise)), la tare métabolique comme le diabète, la thérapeutique surtout antibiotique à large spectre, l'héroïnomanie, et les circonstances physiologiques comme la grossesse ou la contraception hormonale ;
- et par des facteurs locaux dont l'irritation toxique ou traumatique, la macération, les corps étrangers (cathéters) et les lésions pathologiques antérieures. **(Bouchet et al., 1989 ; Pilly, 2004).**

III-3- Physiopathologie

Candida fabrique de l'acétaldéhyde à partir des molécules d'alcool produites par le sucre. L'acétaldéhyde réagit sur un neurotransmetteur cérébral, la dopamine, et provoque des symptômes nerveux de type émotionnels tels que la dépression, l'anxiété, les peurs, l'irritabilité, l'humeur changeante, la faiblesse de la mémoire et le manque de concentration.

L'apparition d'aldéhydes peut être responsable d'une baisse du taux des lymphocytes T. Cette baisse sensibilise le sujet aux infections en perturbant la réponse normale de son système immunitaire à celles-ci **(Edwards, 1991).**

III-4- Clinique

En clinique, les candidoses superficielles sont de loin les plus fréquemment rencontrées. A celles-ci s'ajoute les allergies dues à *Candida*. On y rencontre aussi bien les candidoses généralisées particulièrement graves qui ne s'observent que dans des circonstances très précises que des cas exceptionnels de granulomes à *Candida* **(Eggiman & Pittet, 2000).**

III-4-1- Candidoses superficielles

Les candidoses superficielles sont les manifestations les plus communes et sont très variées. Elles peuvent atteindre les surfaces épidermiques et les muqueuses des patients présentant un terrain favorisant le développement de la levure. Ces facteurs prédisposant à l'infection sont soit des facteurs physiologiques tel que l'âge **(Blot et al., 2001)**, soit des facteurs pathologiques tels que le diabète ou des déficits immunitaires **(Leon et al., 2002).**

III-4-1-1- Candidoses buccales

Les atteintes buccales sont les plus importantes; elles se traduisent par un muguet, souvent associées à une glossite. Les candidoses buccales apparaissent essentiellement chez les personnes souffrant d'une absence de salive (asialie), chez les individus immunodéprimés, comme ceux atteints par le VIH et chez les individus porteurs d'appareils dentaires (**Gentilini et al., 1993 ; Dupont et al., 1997 ; Herbaud et al., 2007**).

III-4-1-2- Candidoses digestives

Elles sont responsables d'indigestion, de mauvaise haleine, de gaz, de ballonnements, de diarrhée, de spasmes de l'intestin et de démangeaisons anales. Elles se manifestent par des douleurs, une dysphagie, des brûlures rétrosternales, le hoquet, l'anorexie, une diarrhée aqueuse, des douleurs abdominales à la palpation et un goût métallique. Il existe un risque de perforation et d'hémorragie, associée à une anite candidosique (prurit intense et sensation de brûlure anale), pouvant envahir le sillon interfessier et les plis génito-cruraux (**Talla, 2001 ; Develoux & Bretagne, 2005 ; Martine, 2007**). Ces signes sont regroupés en trois formes cliniques (**Joffin, 2003**) :

- la forme érythémateuse atrophique avec des lésions multifocales (palais, dos de la langue), muqueuse luisante, rouge et une langue décapillée ;
- la forme pseudomembraneuse avec des lésions blanc-jaunâtre, fermes, en placards ou confluentes et adhérent aux muqueuses qui saignent après grattage. Ces lésions envahissent la langue, les gencives et le palais ;
- et la forme hyperplasique qui siège au niveau de la muqueuse jugale et de la langue avec des plaques blanc-jaunâtre, une langue noire villositaire, une hypertrophie des papilles, une coloration de brun à noir ; une fissuration et une inflammation des commissures labiales.

L'infection à VIH. (Virus de l'Immunodéficience Humaine) est devenue un des principaux facteurs favorisants.

III-4-1-3- Candidoses cutanées et des phanères

Elles se localisent essentiellement au niveau des plis du corps et sont favorisés par la macération (excès d'humidité ou insuffisance d'assèchement de la peau). Les candidoses cutanées se traduisent par la présence des intertrigos c'est à dire des lésions qui débutent au fond des plis cutanés. Ces atteintes candidosiques intéressent aussi bien les grands plis : plis axillaires, sous mammaires, inguinaux, interfessier, que les petits plis : interdigitaux, inter-orteils. Les intertrigos deviennent érythémateux (coloration rouge), finissent par suinter et entraîner un prurit (démangeaisons). Ces intertrigos s'étendent symétriquement de part et d'autres du pli cutané et délimitent une petite collerette blanche (**Datry & Ingibjorg, 1993 ; Develoux & Bretagne, 2005**). Ces candidoses sont fréquemment rencontrées chez les sujets obèses ou ayant une peau séborrhéique, ainsi que chez les

diabétiques. Elles peuvent se rencontrer également au niveau des ongles, à leur base et provoquent ce qu'on appelle une tourniole, autrement dit un panaris superficiel : L'onyxis et le périonyxis à *Candida* qui sont des affections des ongles. Elles se rencontrent surtout chez la femme. Ce sont des affections tenaces et difficiles à guérir, souvent entretenues par une réinfestation massive à partir d'un foyer vaginal ou anal (**Martine, 2007**). Les ongles des mains sont beaucoup plus fréquemment atteints que les ongles des pieds (**Joffin, 2003**).

III-4-1-4- Candidoses génito-urinaires

Chez la femme, elles sont à l'origine de vulvo-vaginites et chez l'homme de balanite (Inflammation du prépuce). Elles sont surtout fréquentes chez la femme (vulvo-vaginite) en particulier lors de la grossesse ou lors d'utilisation d'anovulants (**Kinsman et al., 1988**). Elle se manifeste par un prurit, des brûlures et des leucorrhées. Ces vulvo-vaginites sont à distinguer des vulvo-vaginites gonococciques et parasitaires (**Guelzim et al., 2004**).

Chez l'homme, la mycose (balano-prostite) est sexuellement transmise sauf chez les diabétiques chez lesquels elle est spontanée. Les candidoses génitales masculines sont à l'origine d'un prurit et d'un écoulement urétral assez fréquent (**Therizol-Ferly, 1990 ; Perbet, 1999**). On peut aussi rencontrer chez l'homme comme chez la femme :

- les urétrites qui se limitent souvent à une méatite ;
- et des cystites chez les diabétiques et surtout chez les malades porteurs d'une sonde vésicale à demeure.

III-4-2- Candidoses profondes ou candidémies

Les levures appartiennent à la flore normale endogène des muqueuses du tractus gastrointestinal et génital, en portage transitoire ou permanent chez 40 à 50 % des hommes (**Eggimann et al, 2003**). Ce portage devient colonisation si certains facteurs de risques sont présents (principalement antibiothérapie et immunodépression). L'origine des candidoses invasives peut être exogène ou endogène (**Eggimann et al., 2003 ; Bouza & Munoz, 2008**) (figure 3). Dans l'immense majorité des cas, la souche colonisante devient la souche infectante. Comme cause endogènes on a : le faible poids à la naissance, l'âge extrême, l'insuffisance rénale, l'hémopathie maligne, le cancer, neutropénie, immunodépression et la Colonisation qui est le facteur de risque principal favorisé par une antibiothérapie à large spectre (**Pittet et al., 1994 ; Charles et al., 2005**). Concernant les causes exogènes elles sont liées à des chirurgies principalement digestives, à l'usage d'antifongique, de corticostéroïdes. En outre, les dispositifs implantables ou matériels et la durée d'hospitalisation sont des causes exogènes exposant les patients à une candidose invasive (**Kourkoumpetis et al., 2011**). Le tableau I résume les infections profondes et superficielles causées par *Candida sp*.

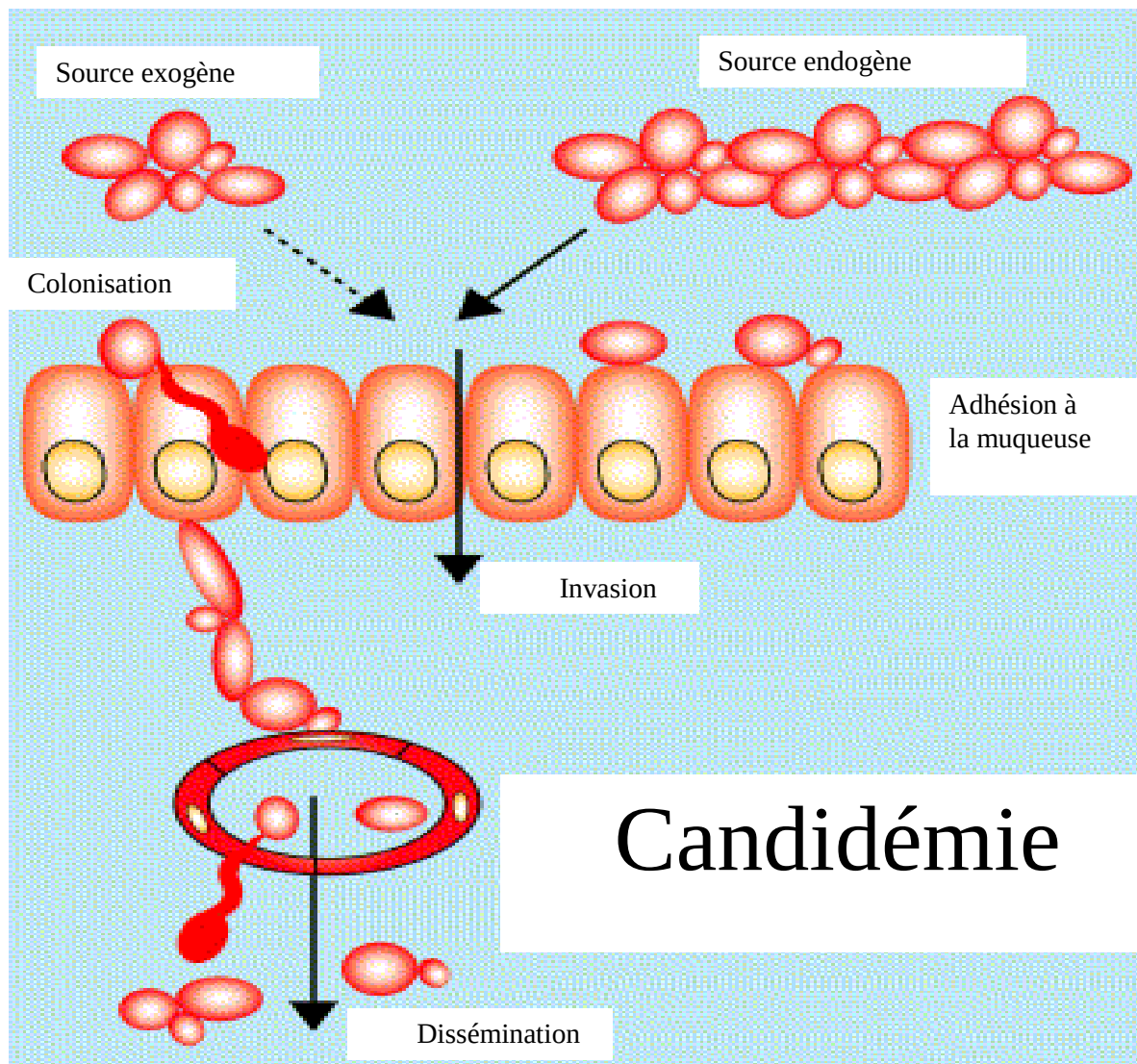


Figure 3 : Physiopathologie des candidémies (Eggimann *et al.*, 2003)

Tableau I : Descriptif des infections causées par *Candida sp.*

Infections profondes		Infections superficielles
Trachéite/bronchite	Endophtalmie	Candidose cutanée
Infection sur dispositif implantable	Ostéomyélite	Candidose oropharyngée
Thrombophlébite suppurée	Spondylodiscite	Candidose oesophagienne
Arthrite	Méningite	Vaginite
Candidose pulmonaire/hépatosplénique	Cystite/pyélonéphrite	

III-5- Diagnostic mycologique

Le diagnostic biologique des infections candidosiques est difficile et manque souvent de sensibilité. La stratégie diagnostic s'appuie d'une part sur la recherche directe d'éléments fongiques (examen direct, culture, antigénémie et PCR) et d'autre part sur la recherche indirecte (recherche d'anticorps). Néanmoins, la faible sensibilité des hémocultures, la faible spécificité de la sérologie, et le manque de standardisation de la Polymerase Chain Reaction (PCR) représentent de nombreuses contraintes qui font toute la complexité de ce diagnostic biologique. De plus, la distinction entre colonisation et infection est difficile sur le plan purement biologique. Le caractère commensal de ces levures rend la confrontation aux symptômes cliniques nécessaires.

III-5-1- Prélèvement

C'est une étape essentielle qui conditionne par sa qualité la valeur des résultats. Il faut toujours avoir à l'esprit que les espèces du genre *Candida* sont très sensibles à la dessiccation. Le prélèvement se fait toujours avec un matériel stérile (**Vigue-Vallanet, 1996**).

- pour les prélèvements de muqueuses, il faut :
 - frotter les lésions avec 2 écouvillons stériles humidifiés à l'eau distillée stérile (un pour l'examen direct, l'autre pour la culture) ;
 - et détacher avec une curette les membranes des lésions membraneuses de la muqueuse buccale;
- pour les prélèvements de la peau et des ongles, il faut :
 - gratter les lésions avec une curette tranchante ou un vaccinostyle. Pour les ongles en particulier, couper des fragments d'ongle pour la culture, puis prélever de la poudre au niveau du lit de l'ongle ;
 - périonyxis : presser le bourrelet érythémateux.

III-5-2- Examen direct

L'examen direct est le test de première ligne. Il permet une orientation diagnostique rapide de genre. Il est peu coûteux, spécifique mais reste peu sensible. Il donne donc une appréciation rapide du prélèvement, d'un point de vue qualitatif (présence ou non d'éléments levuriformes, de pseudofilaments mycéliens), mais surtout quantitatif, argument décisif d'interprétation biologique. Les levures apparaissent sous forme d'éléments ovalaires ou arrondies, de 6 à 8 μm , éventuellement bourgeonnantes.

En pratique, différentes techniques et colorations spécifiques peuvent être mise en oeuvre, rendant alors l'observation plus aisée. La lame ou lamelle est utilisée pour les biopsies oesophagiennes, gastriques, coliques et rectales ainsi que pour les prélèvements de la sphère génitale et urinaire. Les colorations non-spécifiques sont les suivantes :

- le noir chlorazole qui colore la paroi des éléments mycéliens en vert,

-
- le bleu de méthylène : colorant les éléments mycéliens en bleu.
 - le May-Grunwald-Giemsa (MGG) : coloration principalement utilisée en hématologie, permettant d'étudier la cytologie associée au champignon.
 - la coloration de Gram : coloration utilisée en bactériologie, les éléments mycéliens prennent une coloration bleu foncé.

III-5-3- Culture

La croissance peut se faire sur différents milieux de culture, commerciaux ou non, avec comme milieu de référence le milieu de Sabouraud. Les levures croissent en 24 à 48h, formant des colonies blanc-crème, lisses et crémeuses. Certains milieux commerciaux sont dits « chromogènes », car les colonies peuvent présenter une coloration particulière suivant une espèce donnée. L'identification de l'espèce est donc rapide et permet donc de s'abstenir des galeries d'assimilation biochimique.

La figure 4 montre l'aspect des colonies de *Candida sp* sur le milieu de Sabouraud.

Considérée comme test de référence, la culture a pour avantage un ensemencement possible de tous les types de localisation de prélèvements. Sa sensibilité est néanmoins faible (50%) contre une spécificité exemplaire de 100% (**Peman & Zaragoza, 2010**), avec comme principal point faible une durée d'incubation longue. C'est néanmoins le seul examen biologique qui permet à l'heure actuelle une détermination ultérieure de la sensibilité aux antifongiques.

III-5-4- Identification

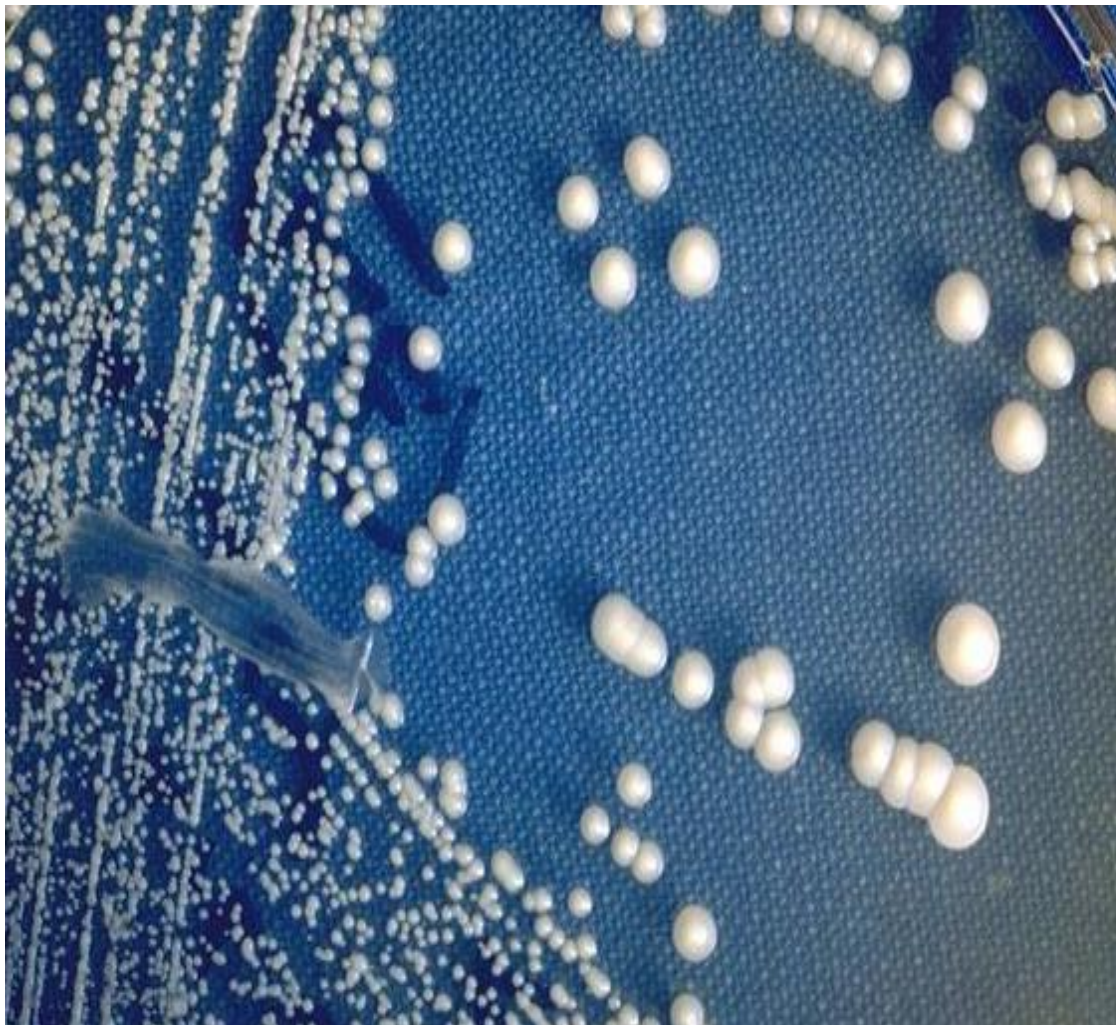
Le genre *Candida* se développe mieux sur le milieu Rice Agar Tween 80 (RAT), sur milieu Pomme de terre-Carotte-Bile (PCB) ou sur milieu Sabouraud additionné d'antibiotiques. Grâce à un substrat chromogène ou fluorescent, l'espèce *Candida albicans* est rapidement distinguée des autres levures en détectant des enzymes.

L'identification est aussi basée sur les caractères d'assimilation des sucres (auxanogramme) et de fermentation de ces sucres (zymogramme) à l'aide de galeries commerciales (**Koenig, 1995**):

- concernant l'assimilation des sucres, on a :
 - * une réaction positive pour le galactose, le saccharose, le maltose, le tréhalose.
 - * une réaction négative pour la cellulose, le lactose, le raffinose.
- au niveau de la fermentation des sucres, on remarque :
 - * une réaction positive pour le galactose, le maltose,
 - * une réaction négative pour le saccharose, le lactose.

Pour la réduction du nitrate de potassium et du tétrazolium, on a une réaction négative. On observe donc une résistance de *Candida albicans* à l'Actidione® (**koenig, 1995**).

Après le diagnostique, des traitements à base d'antifongiques (ATF) peuvent être appliqués.



**Figure 4. Aspect macrosopique des colonies de *Candida* sp. sur milieu Sabouraud
(Fournier, 2011)**

ANTIFONGIQUES

I- GENERALITES

Les antifongiques (ATF) sont des substances chimiques produites par des micro-organismes (ATF naturels) ou par synthèse chimique de molécules dérivantes de composés naturels. Ces médicaments sont utilisés pour lutter contre les mycoses qui sont des infections microscopiques. En effet, leur mécanisme est basé sur la connaissance de la composition de la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique des germes fongiques. Ces deux éléments cellulaires jouent un rôle important dans la perméabilité aux antifongiques. Ainsi dans la constitution des médicaments antifongiques, il faut tenir compte de l'hydrosolubilité et de la liposolubilité.

Par ailleurs, en fonction de la localisation et de la gravité de la mycose, on utilise des antifongiques à usage systémique sous forme de comprimés, d'ovules ou de perfusions intraveineuses (en milieu hospitalier exclusivement). Toutefois, il ne faut pas aussi sous-estimer les difficultés qui précèdent le développement d'une molécule antifongique. Ces difficultés sont liées aux champignons eux-mêmes, au terrain qu'ils envahissent et enfin aux agents antifongiques. Alors, la conception de la triade classique de l'infection : parasite-hôte-antifongiques est donc d'une importance particulière dans la chimiothérapie des mycoses. Par ailleurs, les antifongiques sont pour la plupart toxiques. En effet, la structure déjà évoluée de la cellule fongique la rapprochant de la cellule des mammifères explique la toxicité de nombreux antifongiques pour l'organisme de l'hôte. De plus, la plupart des germes fongiques font partie de la flore commensale de l'homme. C'est l'effondrement des mécanismes habituels de défense qui fait le "lit" de cette pathologie opportuniste et qui explique les fréquents échecs thérapeutiques surtout chez les immunodéprimés. Enfin, la plupart des antifongiques actuels ont une action aux doses thérapeutiques usuelles et fongistatique; phénomène qui implique des traitements de longue durée (**Enerst & Rogers, 2005 ; Playford *et al.*, 2006**). Malgré ces difficultés, il existe plusieurs classes d'antifongiques ; leurs mécanismes d'action sont variés et se résument comme suit :

- altération de la structure de la paroi fongique (Candines)
- troubles de la perméabilité membranaire (Amphotéricine B)
- inhibition des synthèses protéiques (Azolés)
- inhibition de la synthèse des acides nucléiques (ADN, ARN) (5-flourocytosine)

Ces mécanismes sont résumés à la figure 5 ci-dessous :

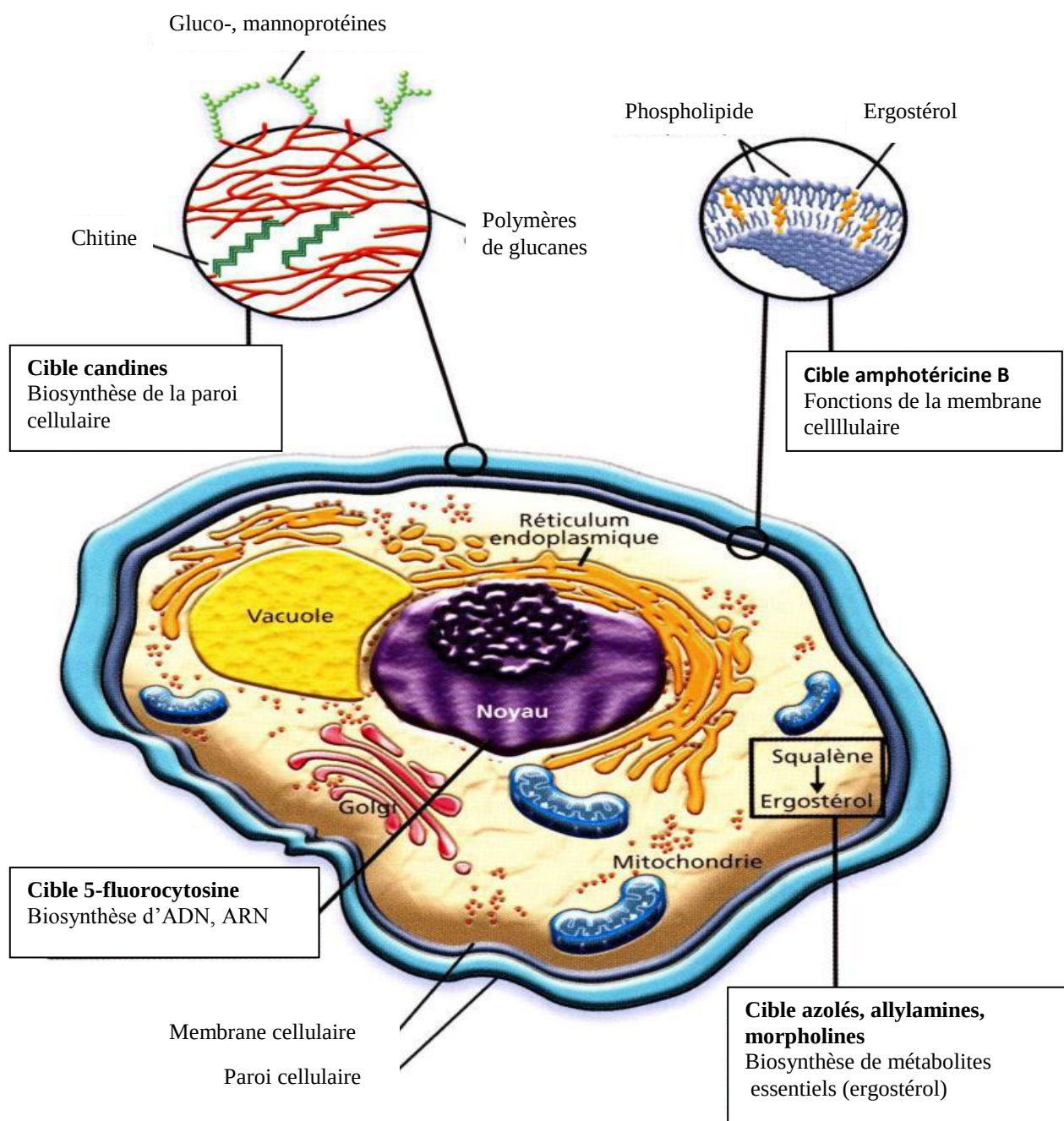


Figure 5 : Cibles des différents antifongiques (Lortholary, 2004)

II- DIFFERENTES CLASSES D'ANTIFONGIQUES

II-1- Antifongiques polyéniques

II-1-1- Amphotéricine B (AmB)

Isolée de *Streptomyces nodosus*, l'amphotéricine B (AmB, Fungizone®) est utilisée depuis 1955 dans le traitement des infections fongiques surtout systémiques. Il reste encore un antifongique majeur. Malgré sa toxicité il reste le plus efficace dans de nombreuses situations cliniques de mycoses systémiques (**Mogode, 2005 ; Millon, 2006**). Son spectre est le plus large de tous les médicaments antifongiques actuellement disponibles. Cependant, l'AmB est contre-indiqué chez la femme enceinte (**Millon, 2006**).

II-1-2- Formulations lipidiques de l'Amphotéricine B

Afin de tenter de diminuer les effets néphrotoxiques de l'AmB conventionnel de nouvelles formes galéniques ont été mises au point : Ampholiposomes, Ampholipides (**Stevens, 1997**). Elles servent de vecteur à l'AmB (**Moen et al., 2009**).

Trois formulations sont actuellement utilisables en clinique. Il s'agit de :

- l'AmB-Liposomal (AmBisome®) c'est un liposome de très petite taille à une seule couche ;
- l'AmB-Lipid-Complex (ABLC, Abelcet®) a des complexes lipidiques de structures en ruban ;
- l'AmB-Colloïdal-Dispersion (ABCD, Amphocil® ou Amphotec®) a une bicouche lipidique de forme discoïdale.

Le mécanisme d'action de cette forme lipidique est comparable à celle de l'AmB standard mais ses propriétés pharmacologiques et toxicologiques sont différentes. Cependant, les réactions compliquant leur administration ne sont pas diminuées par rapport à celles observées avec l'AmB conventionnelle et sont même plus fréquentes avec l'ABCD (**Mogode, 2005**).

II-1-3- Formulation lipidique de Nystatine

La forme liposomale de Nystatine (NyoTRAN®) est en essai clinique en phase 3 et son mécanisme d'action est semblable à celui de l'AmB. Il existe une forme associée à la tétracycline pour le traitement des vaginites de l'adulte. Elle possède une action antifongique (**Johnson et al., 1998**).

II-2- Analogues nucléosidiques

La Flucytosine ou la 5-Fluorocytosine (5-FC, Ancotil®) est un analogue de la cytosine synthétisée en 1957 pour le traitement des leucémies pour lesquelles elle était inefficace. C'est en 1963 que son activité antifongique a été découverte (**Bryskier, 1999**).

Son mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la synthèse protéique (**Georgopapadakou & Walsh, 1996 ; Mimoz & Bicêtre, 2000**). Par ailleurs, sa résistance primaire n'est pas rare et son utilisation en monothérapie conduit toujours à un échec thérapeutique par sélection rapide de

mutants résistants. Elle est toujours utilisée en association avec AmB ou le Fluconazole. Elles sont fongistatiques *in vitro* contre les infections candidosiques systémiques s'il y a une atteinte méningée ou ostéoarticulaire (Noss, 1999). Son association avec les azolés est également synergique *in vitro* sur les levures mais l'intérêt clinique de cette association reste à démontrer (Noss, 1999 ; Mimoz & Bicêtre, 2000).

II-3- Azolés

Leur mode d'action est commun et repose notamment sur l'inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol (composant essentiel de la membrane des cellules fongiques), par inhibition d'une enzyme du cytochrome P450 des cellules fongiques (stérol 14 α -D méthylase) responsable de la conversion du latostérol en ergostérol (Sanglard *et al.*, 1995 ; Stevens., 1997 ; Terrell, 1999). En outre, la synthèse du cholestérol chez le champignon peut être également bloquée par les azolés. L'activité *in vitro* des azolés est variable d'une molécule à l'autre et leur efficacité clinique peut ne pas exactement coïncider avec leur activité *in vitro*. Ces agents antifongiques comprennent les imidazolés et les triazolés.

II-3-1- Imidazolés

Ils sont subdivisés en deux groupes :

- Les azolés de première génération :

Le miconazole (Daktarin®) est le représentant le plus utilisées actuellement. Cet antifongique est utilisé par voie générale et présente des indications systémiques très limitées (Grillot & Lebeau, 1999 ; Millon, 2006).

Dans ce groupe, on note également l'econazole et le tioconazole qui sont employées pour le traitement des infections cutanées, vaginales et dermatophytes.

- Les azolés de deuxième génération

Le kétoconazole (Nizoral®), c'est le principal représentant des azolés de cette classe. Cet agent a révolutionné le traitement des mycoses profondes. C'est le premier azolé bien absorbé par voie orale mais son hépatotoxicité et ses interactions avec de nombreuses molécules limitent ses conditions d'utilisation (Mimoz & Bicêtre, 2000).

La toxicité et l'absence de forme intraveineuse ont amené à préciser ses conditions d'utilisation. De plus, sa faible pénétration dans le système nerveux central le contre-indique dans le traitement des méningites fongiques. Enfin, la variabilité de son absorption orale en fonction du pH gastrique le rend peu maniable d'utilisation notamment chez la patient sidéen ou polymédicamentée (Mimoz & Bicêtre, 2000 ; Millon, 2006).

II-3-2- Triazolés

Les triazolés constituent les azolés de troisième génération. Ils sont représentés par le fluconazole, l'itraconazole, le vorticonazole et les nouvelles formes d'azolés.

➤ Fluconazole

Le fluconazole (FCZ) (Triflucan®) a été synthétisé en 1981. Son absorption (90 %) n'est pas influencée de façon significative ni par l'activité gastrique ni par la prise de nourriture (**Martin, 1999 ; Mimoz & Bichère, 2000**). Il est faiblement tolérant mais, *Candida albicans* et *Candida glabrata* sont résistants à cette molécule. *Candida krusei* a une résistance naturelle à cet antifongique (**Morschhäuser, 2002**).

Hydrosoluble, il est administré par voie intraveineuse et présente une faible toxicité hépatique. Cependant, il est contre-indiqué chez l'enfant et chez la femme enceinte ou allaitante (**Mimoz & Bichère, 2000 ; Millon, 2006**).

➤ Itraconazole

Découverte en 1986, l'itraconazole (ITZ) (Sporanox®) a une absorption orale qui pourrait être erratique. Son administration devra être concomitante des repas surtout gras (90 %) pour augmenter la biodisponibilité. On observe une mauvaise absorption en cas d'hypochlorie gastrique. De plus, de nombreuses interférences sont rapportées entre l'Itraconazole et d'autres médicaments (**Martin, 1999 ; Mimoz & Bichère, 2000**).

➤ Vorticonazole

Le vorticonazole (VCZ) (VFend®) est proche structurellement du fluconazole ; cet antifongique est administré par les voies orale et intraveineuse. Son spectre d'activité plus large inclut les infections graves insensibles à l'AmB et au Fluconazole respectivement.

Le vorticonazole présente des interactions médicamenteuses élevées et élève le taux sérique de certains médicaments (**Mimoz & Bichère, 2000 ; Millon, 2006**).

➤ Nouvelles formes d'azolés

- la posaconazole (Noxafil®) est un antifongique qui présente des effets secondaires et une toxicité élevée (troubles hépatiques, hypotension, céphalées, troubles gastro-intestinaux) (**Millon, 2006**).

- la ravuconazole proche du Fluconazole présente un spectre large sur les levures y compris les espèces résistantes au Fluconazole (**Millon, 2006**).

II-4- Echinocandines

C'est le cas de la caspofungine (Cancidas®) une nouvelle classe d'antifongique (**Vicente et al., 2003**). Elle est administrée par voie intraveineuse. La caspofugine a un spectre d'activité très large (**Lacroix et al., 2003**). Mais elle présente des effets secondaires, une toxicité à réactions générales (fièvre, céphalée), des troubles digestifs, hépatiques et cutanés. Il existe d'autres échinocandines dont la micafungine, l'anidulafungine qui présentent le même spectre que la caspofungine et sont administrées par voie parentérale (**Millon, 2006**).

II-5- Autres classes d'antifongiques

- Les allylamines : Il s'agit essentiellement de la terbinafine. Elle inhibe la biosynthèse de l'ergostérol (inhibition de la squalène époxydase). Elle est administrée *per os*. La Terbinafine présente un large spectre d'activité (**Sayag et al., 1995 ; Vickers et al., 1999**).
- Les morpholines : L'antifongique de cette famille disponible et utilisée en clinique est l'Amorolfine. Son action est de bloquer la synthèse de l'ergostérol par inhibition des enzymes, la λ -4 réductase et la λ -7,8 isomérase. Son spectre s'étend sur les dermatophytes, sur les levures et certaines autres moisissures à l'exception de *Aspergillus* (**Zaug, 1995**).
- La ciclopiroxolamine : c'est un antifongique de la famille des pyridones. Elle est réservée à un usage local. Son action est fongistatique. Elle a une action fongicide en perturbant l'activité des chaînes respiratoires du champignon (en chélatant le fer en particulier).
- La griséofulvine : découverte en 1964 de *Penicillium griseofulvum* et d'autres *Penicillium*, elle a été le premier antifongique actif sur les dermatophytes. Son spectre d'action est très étroit (**Del Rosso, 1996**).
- Les sordarines : elle inhibe la synthèse des protéines par l'inhibition du facteur 2 d'élongation. Elle présente une forte activité antifongique sur le genre *Candida* mais n'a pas d'activité sur les autres levures (**Millon, 2006**).

Même si plusieurs classes d'antifongiques sont apparues, on utilise le plus souvent des combinaisons thérapeutiques (**Bartoli et al., 1998**). De ces nouvelles classes prometteuses, seules leurs utilisations à large échelle chez l'homme et leur comparaison au traitement de référence, l'AmB ou aux Azolés (kétoconazole) permettront de mieux définir leur place future. En effet, de nombreuses molécules prometteuses ont vu leur développement stopper devant l'apparition d'événements toxiques fréquents ou rares mais gravissimes (**Mimoz & Bicêtre, 2000**). Par ailleurs, cette recherche est toujours en évolution par l'identification de nouvelles classes chimiques. Mais seulement les combinaisons thérapeutiques donnent des résultats intéressants (**Barker, 2006 ; Segal & Steinbach, 2007**).

PLANTES MEDECINALES

I- EFFETS PHARMACOLOGIQUES DE QUELQUES PLANTES MEDICINALES

Comme le disait Hippocrate (vers 460-377 av.J.C) «la nature est le médecin des malades» **(Aquaron, 2005)**, les plantes et les vertus de leurs éléments naturels sont utilisées à des fins thérapeutiques. En Afrique, plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle ont été l'objet de nombreuses études sur le plan ethnobotanique, phytochimique et pharmacologique. Ces recherches ont permis d'exploiter certaines utilisations traditionnelles de ces plantes **(Guédé-Guina et al., 1996 ; Nikiema, 1997 ; Kanta, 2000)**. En effet :

- en République Démocratique du Congo, quelques plantes aromatiques telles que *Eucalyptus*, *Aframomum*, *Cymbopogon*, *Monodor* et le genre *Ocimum* sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies telles que la toux, les infections des étendues respiratoires supérieures et les maladies de la peau **(Cimanga et al., 2000)**;
- au Mali, le Département de la Médecine Traditionnelle (DMT) a à son actif sept Médicaments Traditionnellement Améliorés (MTA) dont la Psorospermine qui est utilisée dans le traitement des eczémas **(Diallo, 2000 ; Diallo, 2005 ; Modoge, 2005)**, l'écorce de *Syzygium guineense* Willd de la famille des Myrtacées est utilisée dans le traitement des maladies diarrhéiques. Son activité antibactérienne a été démontrée **(Fyhrquist, 2007)**;
- au Nigeria, une composition des graines de *Piper guineense*, les tiges de *Pterocarpus osun*, les fruits de *Eugenia caryophyllum* et les feuilles de *Sorghum bicolor* est utilisée pour atténuer les crises drépanocytaires **(Okunade et al., 1999 ; Pousset, 2004 et 2006)**;
- au Ghana, *Microglossa pyrifolia* est utilisée pour traiter les infections cutanées et les blessures **(Tessilimi, 2008)**. En Côte d'Ivoire, elle est également utilisée par certains peuples pour traiter les œdèmes testiculaires, les infections fébriles **(N'guessan, 1995)**, les candidoses **(Zirihi et al., 2003)**.
- En général en Afrique de l'Ouest, plusieurs plantes telles que *Euphorbia hirta* sont utilisées contre les troubles gastro-intestinaux.

Par ailleurs, plusieurs enquêtes ethnobotaniques ont permis de recenser dans la pharmacopée ivoirienne plusieurs plantes médicinales dont des anti-infectieuses.

Ainsi, la collaboration biologistes- chimistes a permis à la thérapie scientifique de se développer avec la découverte de principes actifs voire des molécules qui sont des composants naturels contenus dans les plantes médicinales.

II- METABOLITES SECONDAIRES DES PLANTES

Les plantes produisent une grande diversité de métabolites secondaires pour leur défense et leur survie dans l'écosystème. Ces métabolites secondaires sont recherchés pour leurs activités biologiques sur la santé de l'homme. Cette valeur pharmacologique est en plein essor en raison de la tendance vers les produits naturels. De plus, des découvertes continuent sur leur rôle potentiel en soins de santé et comme précurseurs chimiques pour le développement de nouveaux médicaments **(Ben, 2008)**.

Par ailleurs, les métabolites secondaires sont synthétisés dans des cellules spécialisées des plantes à des stades de développements distincts. Ils présentent des structures très complexes ; ce qui rend leur extraction difficile. Néanmoins, les substances identifiées dépassent actuellement 100.000 et appartiennent à trois classes principales de groupes chimiques **(Ben, 2008)** :

- les alcaloïdes qui sont des dérivés d'acides aminés ;
- les composés phénoliques ;
- et les composés terpéniques qui sont des corps gras.

II-1- Alcaloïdes

Ce sont des substances chimiques organiques azotées à caractère alcalin. On les trouve dans plusieurs familles de plantes et sont très nombreux : la morphine, la caféine, la quinine, le curare (effet toxique), la strychnine, la colchicine, l'atropine, la nicotine.

Les alcaloïdes traversent facilement la percolation et agissent directement sur le système nerveux entraînant des effets sur la conscience et la motricité. Ces actions peuvent être anesthésiques, analgésiques, narcotiques, antispasmodiques et mydriatiques.

D'une façon générale, les alcaloïdes sont amers et certains sont utilisés comme apéritifs. Par ailleurs, si dans les plantes, les alcaloïdes en tant que composés du métabolisme secondaire jouent un rôle écologique de défense contre des herbivores, ils trouvent cependant plusieurs applications pharmaceutiques chez l'homme : antitumoral, antalgiques, spasmolytiques, vasodilatateurs, émétiques, antitussifs, antiarythmiques, antipaludiques, agents de traitement de la maladie d'Alzheimer **(Mc Calley, 2002 ; Stöckigt et al., 2002)**.

II-2- Dérivés glucidiques

Encore appelées hétérosides, ce sont des molécules de sucres liées à des génines de nature variables qui confèrent des propriétés particulières à la molécule. On distingue : les saponines, les flavonoïdes, les anthocyanosides, les mucilages, les tanins.

II-2-1- Saponines ou saponosides

Ce sont des hétérosides naturels dont la matière est un composé hydrosoluble qui les rend moussant. Structuralement, les saponosides peuvent être classés en deux groupes selon la nature de leur génine, ainsi on a :

- les saponosides à génine stéroïdique, presque exclusivement chez les angiospermes monocotylédones;
- et les saponosides à génine triterpénique.

Ils modifient la tension superficielle de l'eau et sont employés dans la fabrication d'émulsions où une substance insoluble est mise en dispersion. Les saponines modifient la fonction aqueuse et augmentent la vitesse de pénétration de la substance dans la peau.

Les saponines ont plusieurs effets sur l'homme :

- elles facilitent la pénétration d'autres substances au niveau de la peau, de l'intestin et des muqueuses,
- par la dissolution des graisses, les saponines sont irritantes pour les muqueuses,
- elles affectent la stabilité des membranes et sont impliqués dans la résistance des pathogènes.

Les saponines sont employées comme expectorantes grâce à son action moussante sur les muqueuses des bronches. Ils manifestent également des propriétés hémolytiques, antimicrobiennes, insecticides, molluscicides (**Vincken et al., 2007**), anti-inflammatoires et antalgiques (**Speroni et al., 2005**).

II-2-2- Flavonoïdes

Ce sont des éléments essentiels qui entrent dans la composition de nombreux pigments. Les plantes contenant les flavonoïdes sont souvent liées à des fonctions antiplasmodiques (**Nowakowska, 2007 ; Portet et al., 2007**).

Chez les végétaux, ils représentent un système de défense contre les organismes micro pathogènes, protègent les plantes contre les radiations UV. Ils interviendraient également dans la fertilité des plantes et la germination du pollen. Chez l'espèce humaine, ils possèdent des propriétés anticancérigènes (**Hirata et al., 2009**), anti-ulcéreuses (**Gurbuz et al., 2009**), anti-inflammatoires (**Vafeiadou et al., 2009**), analgésiques (**Sutradhar et al., 2008**), antiparasitaires (**Ganapaty et al., 2008**), vasodilateurs (**Padilla et al., 2005**) et antivirales (**Choi et al., 2009**).

II-2-3- Anthocyanes

Ce sont des pigments naturels des feuilles, des pétales et des fruits. Comme tous les polyphénols, les anthocyanes ont aussi une puissante activité antioxydante et de ce fait ont un rôle bénéfique sur la santé humaine. Les anthocyanes sont reconnus pour leur prévention contre les maladies cardiovasculaires et le cancer (**Hayden, 2008; Pascual-Teresa et al., 2010 ; Wang et al., 2013**).

II-2-4- Mucilages

Les mucilages sont de grosses molécules qui se constituent en protecteur sur les tissus (protection des muqueuses de l'organisme). Ce sont des adoucissants, des calmants de l'inflammation du tube digestif et des voies respiratoires. Ils sont également utilisés sur la peau, sur les muqueuses et freinent l'absorption des produits. Ils sont antagonistes des saponines.

II-2-5- Tanins

Ce sont des Phénols associés à des sucres (**Cowan, 1999 ; Ignat et al., 2011**). Les Tanins sont utilisés en cas d'empoisonnement. Ils emprisonnent les sels des métaux lourds (plomb, mercure). Ils présentent des effets astringents très importants en cas de sécrétions bronchiques, diarrhéiques, leucorrhées, de plaies saignantes. Ce sont des antihémorragiques et antiseptiques (**Jepson & Craig, 2007**). Les plantes riches en tanins sont impliquées dans la protection contre les infections fongiques et bactériennes. Ils favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse et tonifient la peau dans le cas des rides.

II-3- Coumarines

Les coumarines sont parmi les composés phénoliques les plus connus. Ils sont présents dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles et peroxydes (**Igor, 2002**). Les coumarines sont aussi connues par leurs activités cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, hypotensives et sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées (**Gonzalez & Estevez, 1997**), ce sont des toniques veineux aux propriétés anticoagulantes (au niveau du cœur) (**Lucienne, 2010**).

II-4- Phénols

Ce sont des dérivés hydroxylés du benzène et des hydrocarbures aromatiques. Ils prennent une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, ils sont utilisés comme désinfectant (antiseptique) et possèdent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et cardiovasculaires (diminution de la pression sanguine au niveau du cœur en cas d'hypertension artérielle). Ils sont aussi utilisés comme additifs agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (**Sarni-Manchado & Cheynier, 2006**).

II-5- Quinones

Les quinones constituent une classe de composés dicarbonylés α , β insaturés qui possèdent des propriétés originales par rapport aux composés carbonylés ordinaires. Dans les plantes, les quinones sont des transporteurs d'électrons dans la membrane mitochondriale interne et dans la membrane des thylakoides (**Peter et al., 2003**). Ils possèdent également des activités pharmacologiques,

antitumorales, antimicrobiennes et cardiovasculaires (prévention les dommages cellulaires au cours de l'ischémie myocardique) (**Greenbergs & Frishman, 1990 ; Liu, 2011**).

II-6- Terpènes et stéroïdes

Ce sont des corps gras que l'on retrouve dans les végétaux supérieurs mais aussi dans les organismes tels que les animaux marins, les micro-organismes et chez certains champignons tels que les bolets. Certains de ces terpènes sont caractéristiques des odeurs végétales parce qu'ils forment une grande partie des essences et des résines. Actuellement, plus de 30000 terpènes sont isolés des sources végétales. La palette des activités biologiques des terpènes est large (**Mostafa et al., 2005**). Ils ont une activité antimicrobienne, antifidant, antimycotique, antivirale, anti-inflammatoire, anti-tumorale, anti-carie, anti-ulcérierne, antiallergique, hépatoprotectrice, tonifiante, anti-angiogénne (**Djoukeng, 2005**).

Par ailleurs, les composés stéroïdiens ont des effets contraceptifs. Ils sont également utilisés dans les traitements des infections cutanées, des arthrites rhumatoïdes, des asthmes, des allergies, des diverses pathologies oculaires, des cas d'insuffisance rénale, des maladies du cortex surrénal.

III- DESCRIPTION DE *Eucalyptus torrelliana* F. Muell

III-1- Myrtaceae

La famille des Myrtaceae possède environ 140 genres et 3000 espèces qu'on retrouve surtout dans les pays chauds (**Djoukeng, 2005**). Ce sont des végétaux ligneux (arbustes à grands arbres). Le feuillage est alterne, les feuilles sont simples à limbe entier et assez souvent coriaces (certaines feuilles sont recouvertes de cire). Beaucoup de plantes de cette famille sont utiles dans divers domaines: comme bois d'œuvre, certains fruits sont comestibles, certaines plantes sont aromatiques, avec une abondance en huile essentielle d'où l'usage condimentaire ou médicinal. Certaines plantes de cette famille sont traditionnellement utilisées pour la conservation des denrées post-récolte dans les pays en voie de développement (**Ho et al., 1994 ; Tapandjou et al., 2000 ; 2003**). Chimiquement cette famille est riche en composé phénoliques, en tanins et en huiles essentielles. Elle est aussi reconnue comme une des principales familles qui produit des flavonoïdes C-méthylés (**Huq et al., 1997 ; Wollenweber et al., 2000**).

III-2- Position systématique

La classification scientifique réalisée par Cronquist en 1981 sur le genre *Eucalyptus* a permis de déterminer la systématique suivante :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-Classe : Rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae

Genre : *Eucalyptus*

Espèce : *Eucalyptus torelliana* F. Muell.

III-3- Description

Introduits en Côte d'Ivoire en 1965 (**Adou et al., 2000**) et dénommés ridjanbrou en Dioula, les *Eucalyptus* sont de grands arbres dont certaines espèces peuvent atteindre 100 mètres de hauteur. Celle soumise à notre étude peut atteindre une taille de 30 à 40 mètres de hauteur. Son écorce écailleuse et subfibreuse à la base du tronc est de couleur grise sur la partie inférieure du tronc et lisse de couleur grise verte sur sa partie supérieure (**Rakotovao et al., 2012**) (figure 6).

Les feuilles de *E. torelliana*: sur les jeunes arbres, elles sont alternées, ovales et gardent toute leur vie le même type de feuilles jusqu' à l'arbre adulte. En ce qui concerne ses fleurs, elles forment une petite boîte s'ouvrant par un couvercle : les étamines sont enfermées dans un étui fermé par un opercule formé par la fusion des pétales et/ou des sépales. Elles ont de très nombreuses étamines qui sont de couleur blanche crèmeuse. Les fruits à maturité ont la forme d'un cône, ils sont secs, et de couleur brune. Ils ont également des valves qui se soulèvent pour laisser échapper les graines lors de leur chute sur le sol (**Rakotovao et al., 2012**).



A



B



C



D

**Figure 6 : Photographie d'arbre, du tronc, des fruits et feuilles de
Eucalyptus torelliana F. Muell.
(Cocody Université Félix Houphouët-Boigny)
(Photo prise par Agré en 2013)**

- A : Photographie de l'arbre de *E. torelliana*
 B : Photographie de l'écorce de *E. torelliana*
 C : Photographie des fruits de *E. torelliana*
 D : Photographie des feuilles de *E. torelliana*

III-4- Répartition géographique

Le genre *Eucalyptus* est originaire de Tasmanie en Australie. Son nom a pour origine les mots grecs: **eu** «bien» et **kaluptos** «couvert».

La surface des plantations d'*Eucalyptus* a considérablement augmenté depuis 20 ans, en particulier en Asie et en Amérique du Sud. Les statistiques de l'IUFRO réalisées en 1997 estimaient à 14 millions d'hectares la surface mondiale plantée. L'adaptabilité de telle ou telle essence d'*Eucalyptus* à un vaste éventail de climats (semi-désertique, froid, tempéré ou alpin) est une de raisons qui explique leur succès remarquable en tant qu'arbres exotiques (**Jacobs, 1982**). Le nombre d'espèces d'*Eucalyptus* introduit dans différents pays est supérieur à 150, moins d'une trentaine sont exploitées de façon significative en plantation et quatre espèces (*E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. tereticornis* et *E. grandis*) occupaient, à la fin des années 1985, plus de la moitié des surfaces plantées (**Eldridge et al., 1993**). L'espèce *E. torrelliana* communément appelée Cadaghi ou Cadaga en Australie, se rencontre dans les stations forestières et dans les chantiers de reboisements des hauts plateaux ainsi que dans la zone de la falaise orientale. En Côte d'Ivoire, *E. torrelliana* se rencontre dans la zone forestière et de savane et est utilisée pour la fabrication de pâte à papier et de charbon de bois. A Abidjan elle est utilisée comme plante ornementale (**Adou et al., 2000**).

III-5- Utilisation thérapeutique traditionnelle

En Côte d'Ivoire, la décoction des feuilles et des écorces de *E. torrelliana* est utilisée dans le traitement du paludisme, des affections respiratoires, digestives et urinaires. De plus, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) reconnaît l'usage traditionnel des feuilles d'*Eucalyptus* et des huiles essentielles (HE) d'*Eucalyptus* pour soulager la fièvre et les symptômes de l'asthme, pour traiter l'inflammation des voies respiratoires, de la gorge ou des muqueuses de la bouche (voie interne) ainsi que pour soulager les douleurs rhumatismales (voie externe) (**Daroui-Mokaddem, 2012**). En outre, au Bénin et au Nigéria de nombreuses maladies gastro-intestinales et l'ulcère sont soulagées par l'HE et la décoction des feuilles de *E. torrelliana* grâce à ses propriétés anti-infectieuses et antibactériennes (**Adeniyi et al., 2006 ; 2009 ; Lawal et al., 2011 ; Alain et al., 2012**). On lui prête aussi des propriétés balsamiques (pour préparer des baumes) antioxydante et hypoglycémiantes (**Fabre et al., 1992**).

III-6- Phytochimie

Des travaux antérieurs réalisés sur *Eucalyptus torelliana* F. Meull. ont permis de mettre en évidence les tanins, les alcaloïdes et les anthraquinones (**Harbone, 1991**). Par contre, **Adeniyi et al.** en **2009** ont mis en évidence les tanins et les saponosides à partir des écorces des racines de *E. torelliana*. Certains composés terpéniques tels que : α -pinène, β -pinène, trans- β -caryophyllène, limonène, lédane et aromadendrène ont été mise en évidence à partir des huiles essentielles de *E. torelliana* (**Alain et al., 2012 ; Coffi et al., 2012 ; Ololade & Olawore, 2013**).

CHROMATOGRAPHIE

I- CARACTERISTIQUES DE LA CHROMATOGRAPHIE

La chromatographie représente la méthode analytique la plus utilisée pour séparer, identifier et doser les constituants chimiques d'une solution complexe. Ainsi pour réaliser cette séparation, il faut tenir compte des facteurs intervenant dans le mélange entre 2 phases (la phase stationnaire et la phase mobile). Ce sont : la solubilité, la taille, la polarité, la charge électrique et la présence de groupe d'atomes avec des sites particuliers.

Par ailleurs, il existe différents types de chromatographies basées sur la préférence de l'un des facteurs par rapport aux autres. Mais, il faut retenir qu'aucune exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale au cours d'une réalisation chromatographique (**Chaaib-Kouri, 2004 ; Diallo 2005 ; Lagnika, 2005**). Ainsi on retiendra :

- la chromatographie d'exclusion : encore appelée chromatographie d'exclusion-diffusion, de tamisage moléculaire, de gel de filtration ou de perméation de gel. Sa phase stationnaire est un solide poreux. En effet, les particules les plus grosses sont exclues de la phase fixe et les plus petites incluses par cette phase diffusent plus lentement dans les pores du gel. Dans cette sorte de chromatographie, le facteur privilégié est la taille ou la forme.
- la chromatographie d'affinité : dans ce cas la phase stationnaire est un support macromoléculaire qui est chimiquement inerte. Sur ce support est greffé un effecteur qui a une affinité biologique pour l'une des particules du mélange à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps). Le facteur privilégié dans ce cas de chromatographie est la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers (**Henke, 1995 ; Diallo 2005 ; Lafont, 2005**).
- la chromatographie sur échangeurs d'ions : dans ce cas, la phase stationnaire est constituée d'une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement qui exercent des interactions de type électrostatique avec les particules ioniques du mélange à analyser. Le facteur pris en compte dans cette sorte de chromatographie est la charge électrique.
- la chromatographie de partage : c'est une chromatographie liquide-liquide. Elle permet le partage des solutés dans les 2 phases liquides. Dans ce cas, on privilégie la solubilité comme facteur dans l'un des solvants liquides.
- la chromatographie d'adsorption : c'est une chromatographie liquide-solide. On retrouve dans la phase stationnaire un adsorbant solide polaire. Le facteur impliqué dans ce cas est la polarité.
- la chromatographie d'adsorption en phase inverse : c'est une chromatographie liquide-solide. Sa phase stationnaire est apolaire et le facteur privilégié est la polarité.

II- QUELQUES TYPES DE CHROMATOGRAPHIE

II-1- Chromatographie en Phase Gazeuse couplée au spectromètre de masse

La Chromatographie en Phase Gazeuse couplée au spectromètre de masse CPG/SM permet de séparer des mélanges de composés volatiles ou susceptibles d'être vaporisés par suite d'équilibres entre une phase gazeuse mobile et une phase stationnaire. Sur colonne capillaire, elle constitue une excellente méthode d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse. En effet, la colonne est directement couplée à la source d'ions permettant l'ionisation des constituants.

Il existe 2 modes d'ionisations : l'ionisation chimique (IC) et l'ionisation électronique (IE). Ce dernier est le plus répandu, le seul qui permet une étude systématique de la structure des ions moléculaires et des fragments formés.

Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/ charge (m/z).

A la sortie de la colonne, les molécules arrivant au niveau de la source d'ionisation, entrent en collision avec un flux d'électrons obtenu par effet thermoélectronique à partir d'un filament en rhénium. Ces électrons leur arrachent un autre électron générant des cations radicalaires appelés aussi ions moléculaires M^+ .



Ces ions moléculaires peuvent évoluer pour donner des ions fils, dont l'énergie interne est suffisamment élevée pour qu'ils puissent se fragmenter, ainsi de suite. On obtient ainsi dans la chambre d'ionisation un plasma d'ions dont le plus faible est H^+ et le plus lourd est M^+ .

Ces cations sont focalisés et accélérés grâce aux plaques de focalisations, ils entrent dans l'analyseur (quadripôle) avec la même vitesse, à ce niveau ils sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). A la sortie du quadripôle, les cations séparés sont accélérés par les plaques de post-accélération et déviés pour entrer en collision avec le channeltron où ils sont convertis en électron. Ces électrons sont multipliés tout au long du channeltron. Le cation qui arrive ainsi avec une énergie de quelque eV, va générer quelques dizaine d'électrons de beaucoup plus faible énergie.

L'ordinateur enregistre les données provenant du spectromètre de masse et les convertit en valeurs de masses et d'intensités de pics et en courant ionique total. L'ordinateur permet également l'examen des données enregistrées et leurs manipulations, à savoir :

- l'analyse des spectres de masse;
- la reconstitution des chromatogrammes,

-
- la soustraction d'un spectre par rapport à un autre;
 - et le calcul d'une moyenne sur plusieurs spectres.

Les spectres de masses ainsi obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de références contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles [NIST/EPA/NIH Mass spectral library; Wiley Registry of Mass spectral Data, Adams] (**Cavalli, 2002 ; Nait, 2012**).

II-2- Chromatographie d'exclusion

Dans ce cas, l'éluant (solvant unique ou mélange de solvant) utilisé entre par l'extrémité et sort par l'autre extrémité beaucoup plus fine. Ainsi lors de l'élution, les composés se déplacent différemment dans la colonne. En effet, d'une façon générale :

- d'abord les molécules de grandes tailles (supérieure à celle des pores des billes du gel) sont exclues totalement des billes et sortent en premier;
- ensuite viennent celles de taille moyenne qui pénètrent partiellement dans les pores des billes du gel en fonction de leur taille et de leur forme. Elles pénètrent d'autant moins vite qu'elles sont plus grosses et sont élués dans l'ordre décroissant de leur masse moléculaire.
- et enfin sortent les molécules de petites tailles qui pénètrent librement dans les pores des billes et se répartissent dans l'ensemble du liquide de la colonne.

Cette méthode de chromatographie se déroule en 4 phases dans l'ordre suivant :

- la réticulation du gel dans de l'eau distillée pour obtenir des billes poreuses que l'on renverse dans une colonne;
- le dépôt du mélange de substance sur la colonne contenant le gel;
- l'élution des molécules par rapport à leur taille incluant la vitesse (la distance à parcourir);
- et le recueil des fractions dans des tubes ou des piluliers (5 à 10 mL).

II-3- Chromatographie sur couche mince

La Chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple qui est utilisée pour séparer et identifier des composés. Elle est basée sur le phénomène d'adsorption. Cette technique permet d'avoir une idée globale sur l'ensemble des composés présents dans une solution (mélange) ou dans une fraction et sur la pureté d'un composé. Elle permet également de suivre la progression d'une réaction étant donnée qu'elle permet d'évaluer différents composés d'un mélange (**Diallo, 2005 ; Lafont, 2005 ; Lagnika, 2005**). Pour réaliser une CCM, on utilise le matériel suivant :

- une cuve chromatographique : c'est un récipient en verre de forme variable fermé par un couvercle maintenu étanche.

- une phase stationnaire : c'est une couche d'adsorbant étalé uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimension variable (20 x 20 cm ; 10 x 10 cm ; 5 x 10 cm) et d'épaisseur comprise entre 0,5 et 2 mm.

- une phase mobile : c'est l'éluant qui migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants contenus dans l'échantillon à analyser.

- l'échantillon à analyser est solubilisé dans un solvant volatil qui peut être différent de l'éluant. Cet échantillon est déposé sous forme de point ou de bandes sur la plaque. Cette plaque est déposée de manière verticale dans la phase mobile.

Ainsi pour une bonne élution, la cuve contenant l'éluant doit être saturée. En outre à la fin du développement du chromatogramme, la plaque est retirée et séchée à l'air ambiant. Après séchage, la plaque est examinée à l'Ultraviolet (UV) à longueurs d'onde λ (254nm et 365nm) ou les plaques sont révélées par pulvérisation avec des réactifs adéquats (**Levine, 1990**). On détermine par la suite pour chaque constituant le rapport frontal : Rf

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par le front de l'éluant}}$$

MATERIEL
ET
METHODES

I- MATERIEL

I-1- Matériel biologique

I-1-1- Matériel végétal

La matière végétale utilisée, pour cette étude, est une poudre obtenue à partir des écorces séchées de *Eucalyptus torelliana* F. Meull. Les écorces ont été récoltées dans la matinée, au mois de Mars 2013 à l'Université Félix Houphouët-Boigny (Côte d'Ivoire) puis identifiées par le Centre National de Floristique (CNF) de la dite Université. Cette poudre d'écorce a été codifiée EUCA.

I-1- 2- Germes testés

Le support microbien est composé de trois levures du genre *Candida* à savoir :

- *Candida albicans* My 03812 417/P et *Candida tropicalis* My 1952 307/P prélevés chez des patients souffrant de mycoses profondes;
- *Candida glabrata* My 0284 20/D isolées chez des patients atteints de mycoses superficielles.

Ces isolats fongiques ont été prélevés, identifiés et leurs antifongigrammes en milieu gélosé établis par l'unité de Mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (Tableau II).

Tableau II : Profil de sensibilité des levures du genre *Candida* étudié vis-à-vis de 5FC, AMB, FCA, NYS, MCZ et du KET

	ANTIFONGIQUES						
	5 FC (1 µg)	5 FC (10 µg)	AMB	FCA	NYS	MCZ	KET
<i>C.albicans</i>	S	S	S	R	S	S	R
<i>C.tropicalis</i>	S	S	R	S	S	R	S
<i>C. glabrata</i>	S	S	R	R	S	S	S

5-FC : 5 Fluorocytosine

NYS : Nystatine

R : résistant

S : Sensible

AMB : Amphotéricine B

MCZ : Miconazole

FCA : Fluconazole ;

KET : Kétoconazole.

I-2- Milieu de culture

La culture des germes a été réalisée sur la gélose Sabouraud (BIO-RAD/Réf : 64449 ; Lot : 8B2212). La composition chimique de ce milieu est donnée en annexe I :

I-3- Produits chimiques

Divers produits ont été utilisés au cours de cette étude pour réaliser :

- les extractions : l'eau distillée (fourni par LNSP); l'acétate d'éthyle, l'hexane, l'éthanol, le butanol, le chloroforme (fourni par CARLO ERBA) ont été utilisés comme solvants,
- le tri phyto-chimique : l'acétate de sodium, l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'anhydride acétique, le chlorure ferrique, le chlorure mercurique, le chloroforme, les copeaux de magnésium, le perchlorure de fer, l'iode, le nitrate de Bismuth, l'ammoniac,
- la chromatographie : le Gel de Sephadex[®]G₅₀ (SIGMA-ALDRICH), la plaque de silice (60F254), l'acétate d'éthyle, le méthanol, le dichlorométhane, BSTFA (Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide), TMCS (Triméthylchlorosilane),
- l'asepsie : l'eau de Javel (12°), l'eau savonneuse, l'éthanol.

II- METHODES

II-1- Méthode de préparation des extraits

II-1-1- Préparation des extraits totaux

Des morceaux de l'écorce de *E. torelliana* récoltés ont été découpés en petits morceaux et séchés à l'ombre. Après séchage, ces petits morceaux ont été finement broyés à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre de couleur marron codifiée EUCA.

Deux extraits totaux (aqueux et hydro-éthanolique) ont été préparés à partir de EUCA de la manière suivante :

Pour l'extrait aqueux, 100 grammes poudre de EUCA ont été extraits par homogénéisation dans un litre d'eau distillée à l'aide d'un blender (mixer). Après 6 cycles de broyage, l'homogénat obtenu a été d'abord essoré dans un carré de tissu propre puis filtré successivement 2 fois sur coton hydrophile et une fois sur papier filtre whatman 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}.

Concernant l'extrait hydro-alcoolique, il a été préparé selon le même procédé que précédemment en utilisant un mélange de solvants comportant 70 % d'éthanol absolu et 30 % d'eau distillée. Après évaporation à 40°C, l'extrait hydro-alcoolique obtenu est codifié X₀ (Figure 7).

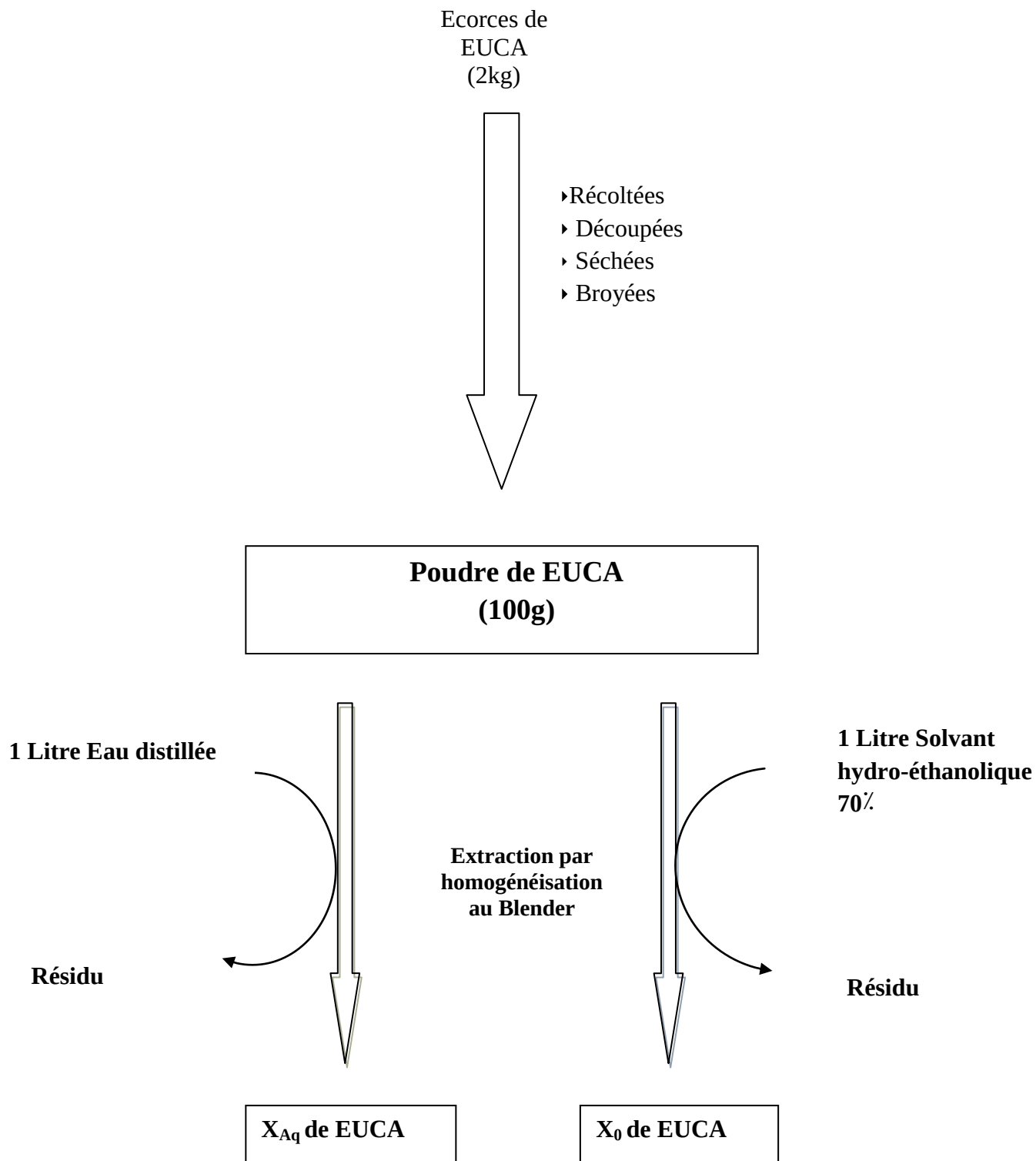


Figure 7 : Schéma de préparation des extraits totaux de EUCA

II-1-2- Préparation des extraits partitionnés

L'extrait X_0 , a servi à préparer 8 autres extraits parce que l'activité antifongique de cet extrait a été supérieure à celle de l'extrait X_{Aq} :

Quatre portions de 10 grammes de l'extrait hydro-alcoolique ont été constituées et soumises séparément à une séparation liquide/liquide dans 300 mL de 4 différents mélanges de solvants à raison d'un volume de 150 mL par solvant (Hexane-Eau, Acétate d'éthyle-Eau, Butanol-eau et chloroforme-Eau; v/v). Après décantation, les différentes phases ont été séparées et concentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif. Ceci a permis d'obtenir respectivement les extraits suivants :

- X_{1-1} : phase hexanique (huile végétale);
- X_{1-2} : phase aqueuse de la partition Hexane-Eau;
- X_{2-1} : phase acétatique;
- X_{2-2} : phase aqueuse de la partition Acétate d'éthyle-Eau;
- X_{3-1} : phase butanolique;
- X_{3-2} : phase aqueuse de la partition Butanol-eau;
- X_{4-1} : phase chloroformique;
- X_{4-2} : phase aqueuse de la partition chloroforme-Eau (Figure 8).

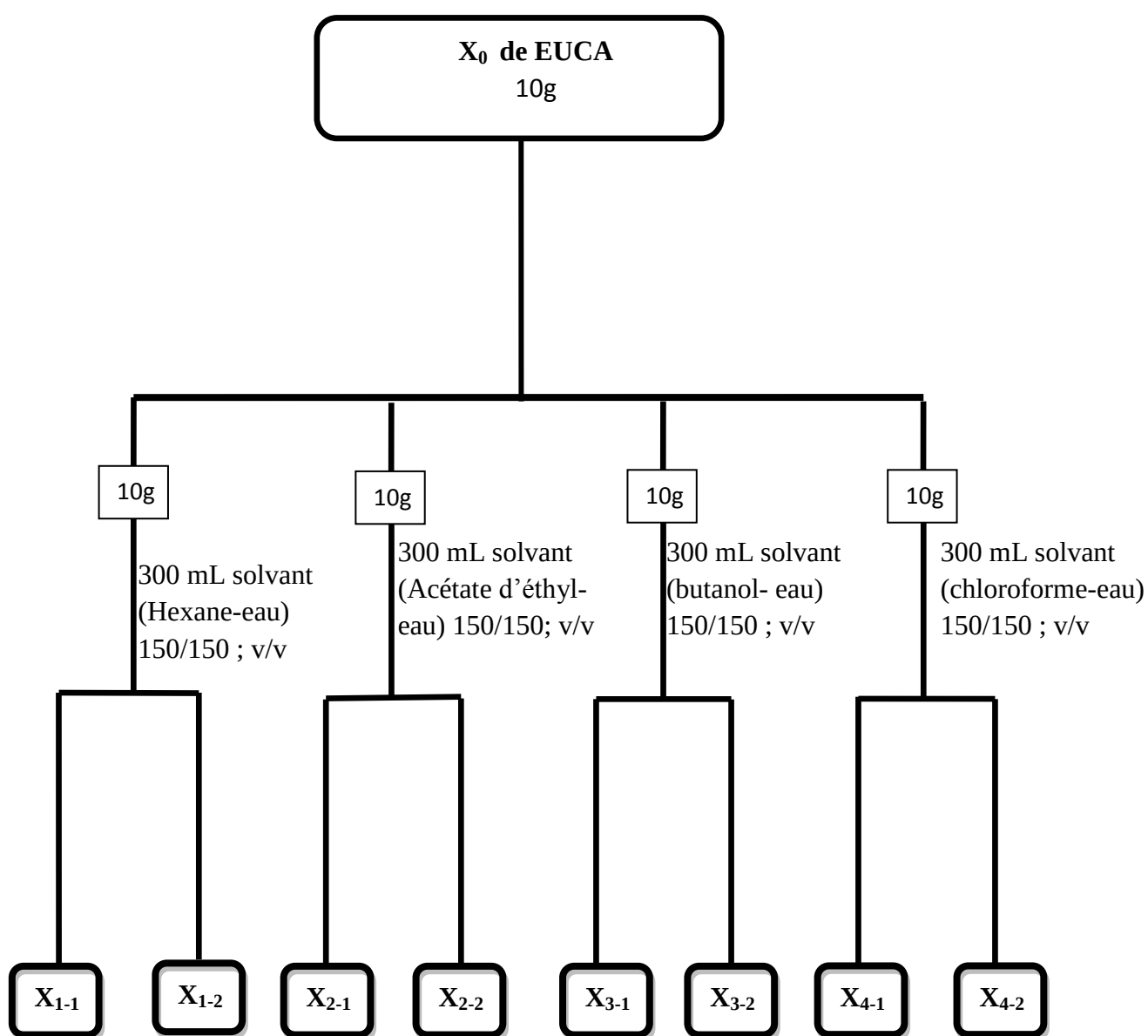


Figure 8 : Schéma de préparation des extraits partitionnés de EUCA

II-2- Méthode microbiologique

II-2-1- Préparation de la gélose Sabouraud

Le milieu Sabouraud a été préparé selon les indications du fournisseur. Ainsi, une quantité de 5,04 g de gélose sabouraud a été homogénéisée dans 120 mL d'eau distillée. Ce mélange a été agité et chauffé sur un agitateur magnétique chauffant (IKA-MAG-RCT).

II-2-2- Incorporation des extraits végétaux à la gélose

Pour réaliser les tests *in vitro*, le milieu a été coulé dans des tubes à essai auxquels ont été incorporés les différents extraits de EUCA. Cette incorporation a été faite selon la méthode de la double dilution en tubes inclinés.

Pour chaque extrait végétal, chaque série comporte 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10. Le milieu précédemment préparé a été reparti dans les 10 tubes à raison de 20 mL dans le tube n°1 et 10 mL dans les autres tubes de chaque série. L'ensemble de ces tubes est maintenu au bain-marie à une température de 40°C afin d'éviter la solidification des milieux lors de l'incorporation de l'extrait.

La quantité d'extrait utilisée a été définie après plusieurs essais. Ainsi, 40 mg ont été retenus pour toutes les séries de tous les extraits. Cette quantité a été homogénéisée dans le tube n°1 contenant 20 mL de gélose. La moitié du volume de ce mélange homogène a été transférée dans le tube n°2 contenant 10 mL de gélose puis homogénéisée. Cette opération a été reprise pour le tube n°3 et ainsi de suite par double dilution jusqu'au tube n°8 (Figure 9).

Ainsi la gamme de concentration dans ces tubes varie de 2000 à 15,625 µg/mL selon une liaison géométrique de raison ½.

Par ailleurs, les tubes à essai n°9 et n°10 contenant 10 mL de gélose sont utilisés comme des tubes témoins. Le tube n°9 sans extrait végétal sert de témoin pour le contrôle de croissance des germes et le tube n°10 sans extrait végétal sans germes sert de témoin pour le contrôle de la stérilité du milieu de culture et des conditions de travail.

Après incorporation des extraits dans les 8 tubes tests, tous les 10 tubes à essai de chaque série ont été stérilisés à l'autoclave (marque UNICLAVE 88) à 121 °C pendant 15 minutes et ensuite inclinés avec petit culot à la température de la salle du laboratoire pour faciliter le refroidissement et la solidification de la gélose (Kra, 1997; Kra, 2001; Kouakou *et al.*, 2007).

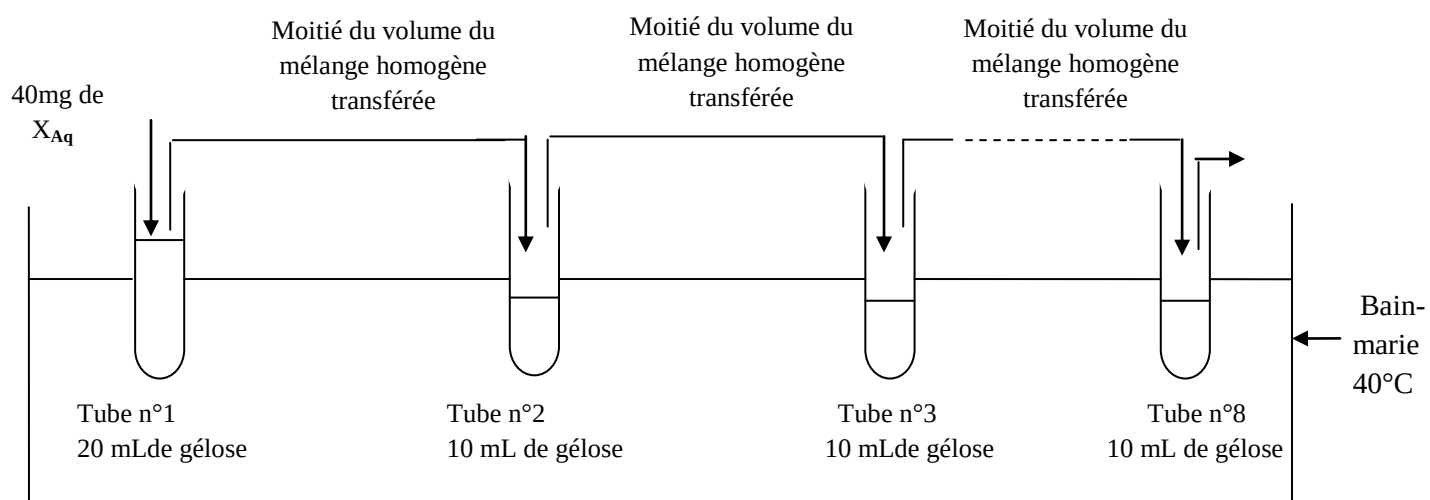


Figure 9 : Schéma de la méthode d'incorporation des extraits à la gélose Sabouraud

II-2-3- Essai antifongique

II-2-3-1 Préparation de l'inoculum

Pour les tests antifongiques, les inocula sont préparés séparément à partir de cultures de 48 heures des 3 levures du genre *Candida* sur gélose en pente. Pour chaque germe, une colonie bien isolée est prélevée à l'aide d'une anse de 2 mm de diamètre puis homogénéisée dans 10 mL d'eau distillée stérilisée. Cette suspension a donné une solution mère notée 10^0 , dont la charge est de 10^6 cellules/mL. A partir de la suspension 10^0 , il a été préparée la suspension 10^{-1} , par dilution au 1/10ème en transférant 1 mL de la suspension 10^0 dans 9 mL d'eau distillée stérilisée pour avoir un volume final de 10 mL, contenant 10^5 cellules/mL (Guédé-Guina *et al.*, 1996 et 1997; Kra, 2001; Zirihi *et al.*, 2003) (Figure 10). 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 μ L) et au facteur de dilution (10^4) a donné pour l'inoculum une charge de 10^5 cellules/mL. Dans cette vérification, on tient aussi compte du nombre de colonies dénombré dans les suspensions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} .

II-2-3-2- Culture des germes

Pour chacun des tubes à essai de chaque série des 20 extraits (sauf le tube témoin 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 total des 10 μ L de suspension. Ces 10 μ L correspondent à 1000 cellules ensemencées. Les cultures ainsi réalisées ont été incubées à l'étuve (de type MEMMERT 30079) à 30 °C pendant 48 heures pour tous les germes de *Candida*. Cette expérience a été répétée 5 fois pour tous les germes testés.

II-2-3-3- Dénombrement des colonies

A la fin du temps d'incubation, les colonies des germes fongiques de chaque espèce de *Candida* ont été dénombrées par comptage direct à l'aide d'un stylo compteur de colonies (SCIENCEWARE DE BEL-ART n°23382). Par la suite, la croissance dans les 8 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. La méthode de calcul du pourcentage de survivance des germes dans les tubes expérimentaux se résume comme suit :

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

S : Survivance des germes (en %), N : Nombre de colonies dans le tube témoin,

n : Nombre de colonies dans le tube expérimental.

Le traitement des données expérimentales a permis de tracer les antifongigrammes qui ont aidé à déterminer les paramètres antifongiques suivants :

- La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) : c'est la plus petite concentration de l'extrait dans le tube où il n'y a aucune croissance visible à l'œil nu,
- La Concentration Minimale Fongicide (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. Inversement, c'est la concentration qui laisse une survivance de 0,01 % par rapport au tube témoin de contrôle de croissance. Ce paramètre est déterminé en réalisant un test de stérilité du tube correspondant à la CMI par ensemencement d'un échantillon de gélose prélevée dans ce tube sur une gélose neuve. Ainsi, une absence de croissance prouve que le milieu de culture de ce tube ne contient aucun germe en dormance et aucune forme revivifiable du champignon testé. Cela est donc la preuve que la CMI a permis de détruire de façon irréversible le champignon. De ce fait, la CMI est égale à la CMF et l'activité exercée par l'extrait est donc fongicide. En outre, une croissance de germe prouve que le milieu de culture de ce tube contient des germes en dormance. De ce fait la CMI est différente et inférieure à la CMF. L'extrait exerce donc une action fongistatique (figure 11),
- La Concentration pour 50 % d'Inhibition (CI₅₀) : c'est la concentration qui donne 50 % d'inhibition estimée par rapport au nombre de colonies ayant été dénombré dans le tube témoin de contrôle de croissance (**Guédé-Guina *et al.*, 1997; Kra, 1997; Ackah, 2004**).

Ce dernier paramètre est déterminé graphiquement à partir de la courbe de survivance.

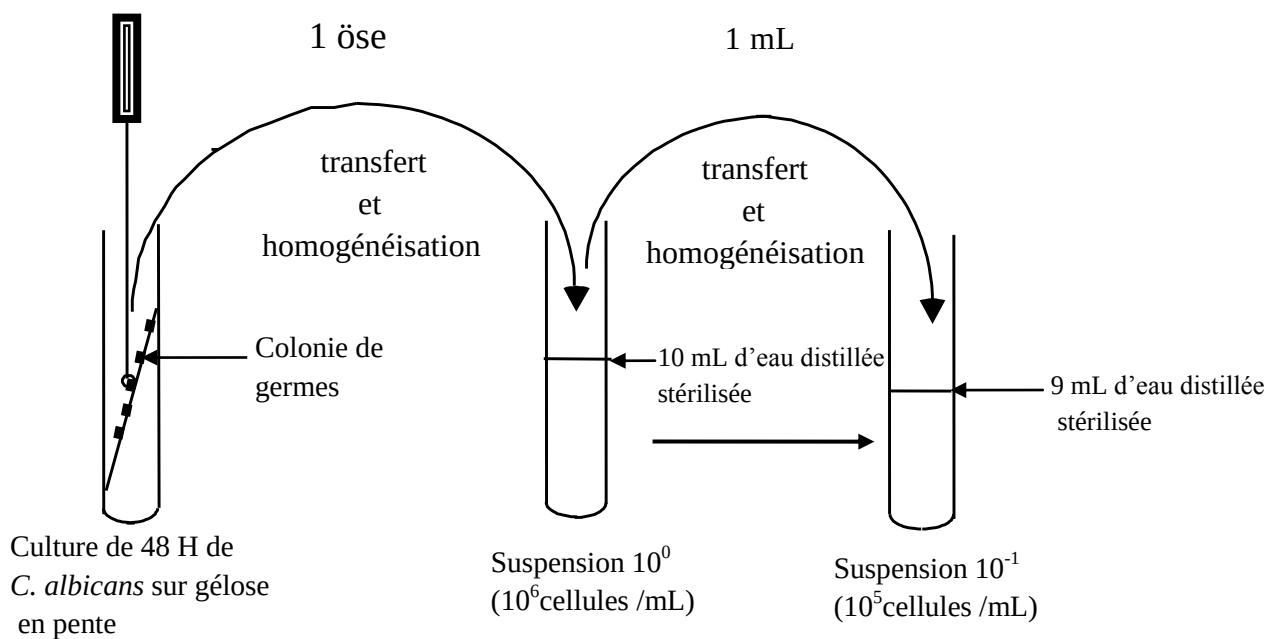


Figure 10 : Schéma de la méthode de préparation de l'inoculum

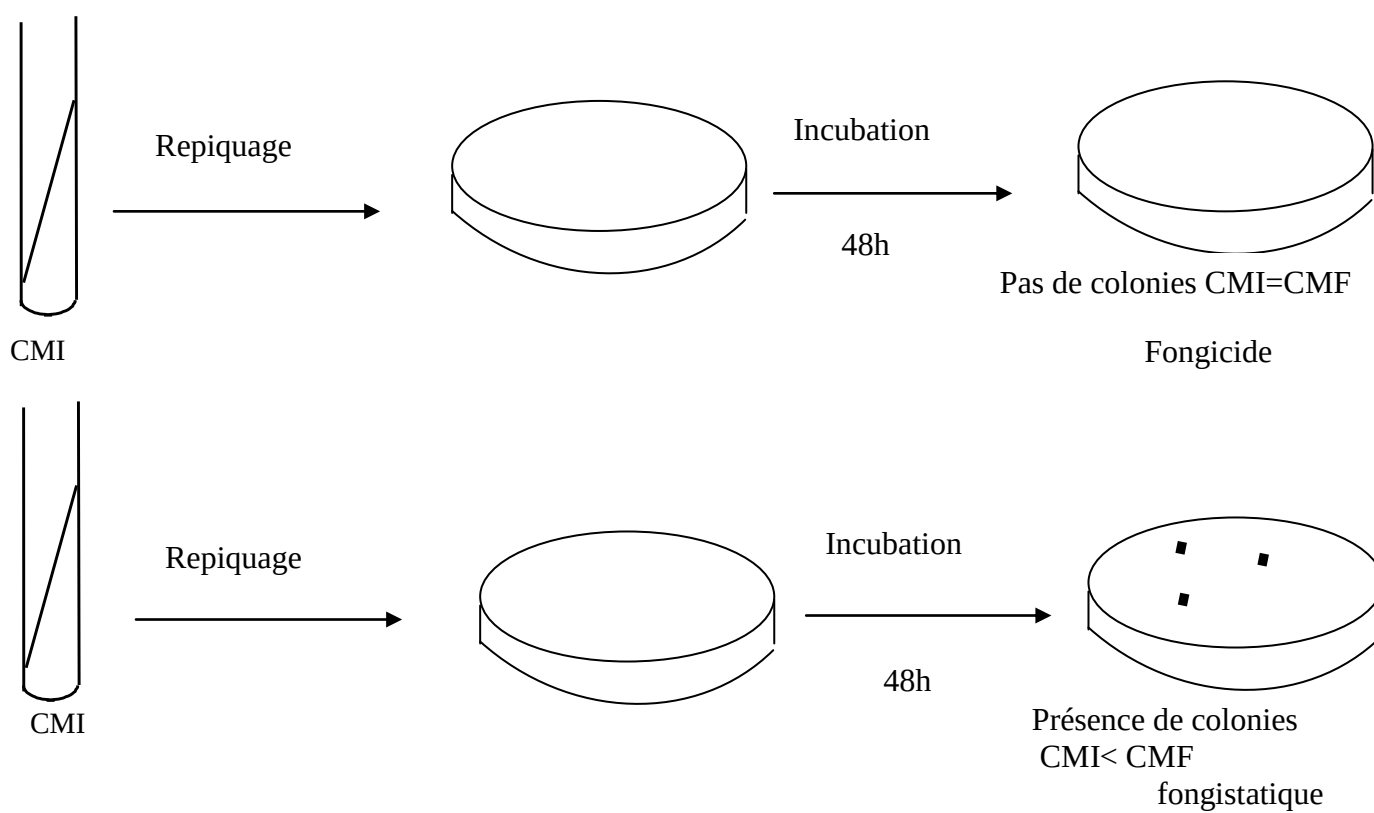


Figure 11 : Schema des tests de stérilité de tubes correspondant à la CMI

II-3- Méthodes Chimiques

II-3-1-Tri phyto-chimique

Afin de mettre en évidence les principaux groupes chimiques contenus dans les extraits plus actifs par groupe d'extraction, différents essais de caractérisations ont été réalisés sur 4 extraits : X_{Aq} , X_0 (les extraits totaux); X_{1-2} , (extrait partitionné) et F_5 (extrait chromatographique).

II-3-1-1- Recherche des saponosides

Principe : 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 volume d'échantillon d'extrait. La hauteur de la mousse formée est mesurée et doit être supérieure ou égale à 3 cm. Cela indique la présence de saponines (**Bouquet & Debray, 1974; Bonga et al., 1996; Koudougou, 2004**).

- **Recherche des saponines dans EUCA**

Un échantillon de 2 mL d'extrait de EUCA (X_{Aq} , X_0 , X_{1-2} , F_5) est repris à l'eau bouillante, refroidi et filtré. Dix millilitres (10 mL) du filtrat sont ensuite introduits dans un tube à essai. Le tube est ensuite agité verticalement pendant environ 15 secondes et laissé au repos pendant 15 minutes.

II-3-1-2- Recherche des polyphénols

Principe : La colorimétrie des phénols met à profit la formation de précipité coloré avec une solution de chlorure ferrique ($FeCl_3$). L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte, indique la présence de composés polyphénoliques. L'appréciation de cette coloration est faite par rapport à un essai témoin avec une solution de phénol.

- **Mise en évidence des polyphénols de EUCA :**

A 2 mL d'extrait de EUCA (X_{Aq} , X_0 , X_{1-2} , F_5) est ajoutée une goutte d'une solution alcoolique de chlorure ferrique à 2 % (**Bouquet & Debray, 1974; Bonga et al., 1996**).

- **Mise en évidence des tanins cathéchiques de EUCA**

Principe : En solution aqueuse, les tanins (qui sont des phénols associés à un sucre) sont précipités par les sels de métaux lourds (Cu, Zn, Sn, Pb, Hg). Les tanins cathéchiques sont mis en évidence par le réactif de Stiasny qui met en oeuvre une réaction au formol chlorhydrique. Les tanins cathéchiques se présentant sous forme condensée (non hydrolysable) sont précipités par chauffage au bain-marie à 80°C, et forment de gros flocons après refroidissement.

Ainsi, un échantillon de 5 mL d'extrait de EUCA (X_{Aq} , X_0 , X_{1-2} , F_5), est évaporé à sec dans une capsule en porcelaine chauffée sur du sable. A ce résidu sont ajoutés 15 mL du réactif de Stiasny. L'ensemble a été porté au bain-marie à 80 °C pendant 30 minutes.

- **Mise en évidence des tanins galliques de EUCA**

Principe : En solution aqueuse, les tanins (qui sont des phénols associés à un sucre) sont précipités par les sels de métaux lourds (Cu, Zn, Sn, Pb, Hg). Les tanins galliques qui sont sous forme d'hétérosides hydrolysables sont hydrolysés après addition d'acétate de sodium. L'addition de quelques gouttes de perchlorure de fer va donner une coloration bleu-noire (spécifique) indiquant la présence des tanins galliques.

Ainsi, un échantillon de 5 mL d'extrait de EUCA, a été filtré, saturé à l'acétate de sodium. Puis additionné de 3 gouttes de FeCl_3 à 2 %.

II-3-1-3- Recherche des stérols/terpènes

La recherche des stéroïdes et terpénoïdes a été faite par la réaction de LIEBERMAN-BUCHARD.

Principe : L'apport de l'anhydride acétique acidifie l'homogénat de l'extrait végétal. Les stérols et les terpènes sont mis en évidence par l'addition de l'acide sulfurique. L'apparition d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive. La lecture est faite comparativement à un essai témoin avec le cholestérol ou le sitostérol.

- **Recherche des stérols dans les extraits de EUCA**

Un échantillon de 5 mL d'extrait de EUCA est évaporé à sec dans une capsule en porcelaine au bain de sable. Le résidu est dissout à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique. L'ensemble est renversé dans un tube à essai auquel on ajoute 0,5 mL d'acide sulfurique concentré.

II-3-1-4- Recherche des flavonoïdes

Principe : Les flavonoïdes sont caractérisés par la réaction à la cyanidine dont le principe est que les hétérosides flavoniques en solution alcoolique et en présence d'hydrogène naissant donnent des dérivés diversement colorés en fonction de la structure chimique du flavonoïde (**Bouquet & Debray, 1974; Bowman et al., 1980 ; Nacoulma, 1996; Nikiema, 1997**).

Ainsi,

Les flavones vont donner une coloration orange ;

Les flavonols vont donner une coloration rouge ;

Les flavonones vont donner une coloration rouge-violacée.

- **Recherche des flavonoïdes dans EUCA**

Un échantillon de 2 mL d'extrait de EUCA, est évaporé à sec dans une capsule en porcelaine au bain de sable. Le résidu est repris après refroidissement dans 5 mL d'alcool chlorhydrique au demi. La solution obtenue est renversée dans un tube à essai.

II-3-1-5- Recherche des quinones

Les quinones sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques. Ils 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.

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

- **Recherche des quinones dans EUCA**

Dans une capsule en porcelaine, un échantillon de 2 mL d'extrait de EUCA, est évaporé à sec au bain de sable puis trituré avec 5 mL d'acide chlorhydrique dilué au 1/5. L'ensemble est porté au bain-marie bouillant dans un tube à essai pendant 30 minutes. Après refroidissement, l'hydrolysât est extrait avec 20 mL de chloroforme dans un tube à essai. Il est ensuite saturé avec 0,5 mL d'ammoniac dilué de moitié.

II-3-1-6- Recherche des alcaloïdes

Ce sont des composés azotés alcalins dérivés des acides aminés. Les méthodes classiques d'extraction des alcaloïdes qui précipitent avec les réactifs de Mayer et de Dragendorff, ont été utilisées pour mettre en évidence ces composés.

Principe : Les alcaloïdes sont caractérisés par le fait qu'ils ont la propriété de se combiner avec les métaux lourds (Bismuth, iode, mercure, tungstène...) et de précipiter sous forme de sels (**Bowman et al., 1980**). Les métaux lourds utilisés dans les réactifs sont :

- Iode dans le Réactif de Bouchardat qui entraîne la formation de précipité brunâtre;
- Iode et Bismuth dans le Réactif de Dragendorff engendrent la formation de précipité orangé ;
- Iode et Mercure dans le Réactif de Valser-Mayer permettent la formation d'un précipité blanc laiteux.

- **Recherche des alcaloïdes dans les extraits de EUCA**

Un échantillon de 6 mL d'extrait de EUCA est évaporé à sec dans une capsule en porcelaine au bain de sable. Le résidu est repris dans 6 mL d'éthanol (60°). La solution ainsi obtenue est répartie dans trois tubes à essai.

Dans le premier tube, deux gouttes de réactif de Dragendorff sont ajoutées.

Dans le deuxième tube, deux gouttes de réactif de Valser-Mayer sont additionnées.

Dans le troisième tube, deux gouttes de réactif de Bouchardat sont aussi additionnées.

II-3-2- La chromatographie sur colonne

Des extraits précédents, l'extrait X_{1-2} a été retenu pour son optimisation dans la suite des travaux. Une quantité de 3 mg de cet extrait a été prélevée, diluée à l'eau distillée puis chromatographiée sur une colonne de filtration sur gel de Séphadex G_{50} . L'éluant utilisé est l'eau distillée.

Les caractéristiques de la colonne sont :

- diamètre : 2 cm
- hauteur du gel : 37 cm
- débit : 0,24 mL/min

Cent dix sous fractions de 10 mL ont été recueillies, ainsi à l'aide du profil chromatographique sur couche mince des sous fractions de l'extrait X_{1-2} , différentes fractions ont été constituées (F_1 , F_2 , F_3 , F_4 , F_5 , F_6 , F_7 , F_8 , F_9 , F_{10}). Le schéma de cette purification est résumé par la figure 12. Ces extraits ont été par la suite testés séparément sur la croissance *in vitro* des 3 souches de *Candida* : *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida tropicalis*.

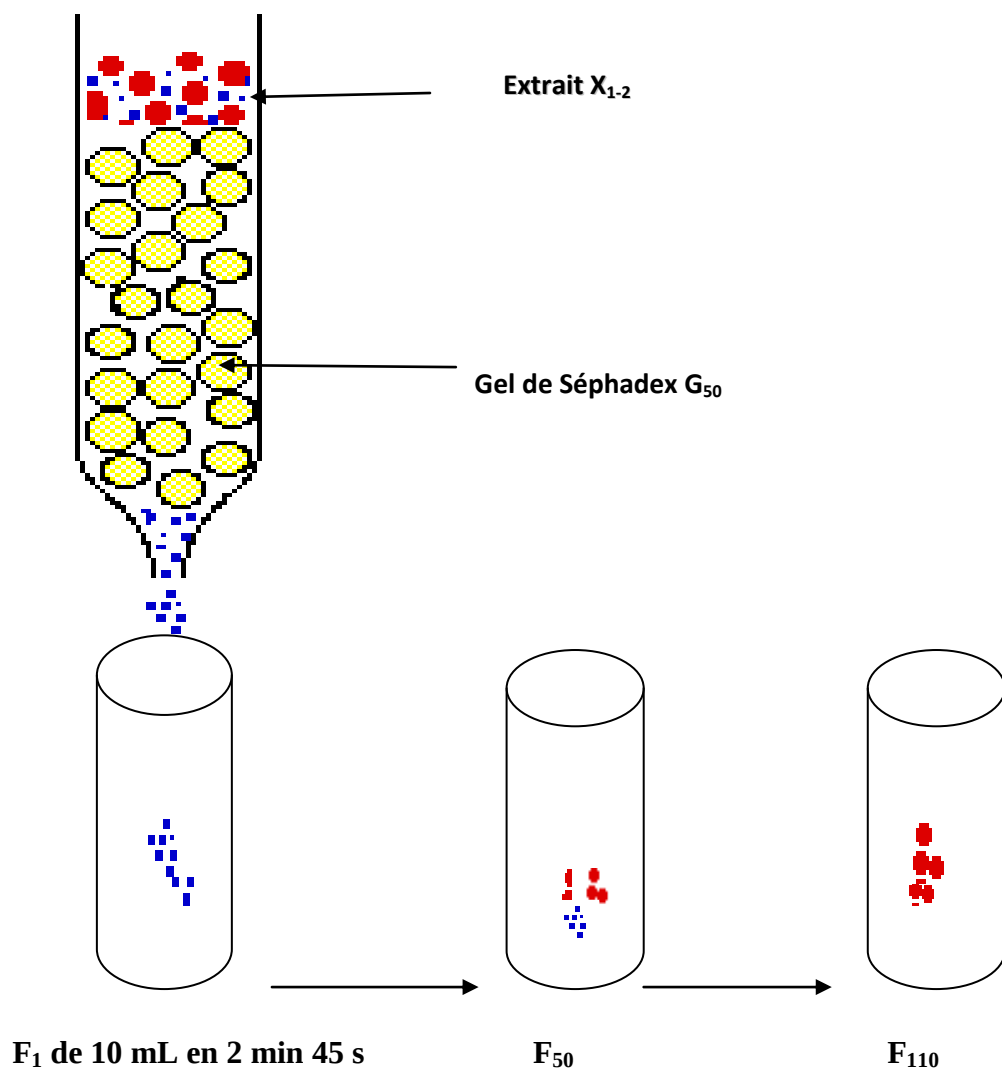


Figure 12: Schéma de la préparation des sous fractions d'ecores de *Eucalyptus torelliana* F. Muell. par filtration sur gel de séphadex-G₅₀

II-3-3- Chromatographie sur couche mince des sous fractions de X₁₋₂

La Chromatographie sur couche mince a été réalisée sur gel de silice (60F254) afin de séparer les constituants chimiques des sous fractions l'extrait de X₁₋₂ et de comparer les constituants de chaque sous fraction (issue du fractionnement de X₁₋₂) puis les regrouper.

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/v à une hauteur de 0,5 cm. La plaque chromatographique est portée dans la cuve pendant 45 minutes afin de permettre la migration des différents dépôts. 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). Par la suite, les plaques ont été séchées à l'air libre puis portées à la lumière UV (longueurs d'ondes $\lambda = 254$ nm et 365 nm) afin d'observer le profil de chaque sous fraction. Les différentes sous fractions ont donc été regroupées sur la base de leur profil chromatographique ce qui a permis d'obtenir dix grands groupes de fractions (F₁ à F₁₀) constitués comme suit :

F₁ : sous fractions 1 à 3, F₂ : sous fractions 4 à 9, F₃ : sous fractions 10 à 22, F₄ : sous fractions 23 à 35

F₅ : sous fractions 36 à 48, F₆ : sous fractions 49 à 60, F₇ : sous fractions 61 à 74, F₈ : sous fractions 75 à 87, F₉ : sous fractions 88 à 100, F₁₀ : sous fractions 101 à 110.

II-3-4- Analyse par chromatographie en phase gazeuse de la fraction F₅

➤ Dosage des terpènes

- Préparation de l'échantillon

Seize milligramme sept cent de la fraction F₅ sont dissouts dans un mélange de dichlorométhane (16,7mL) et de méthanol (3mL). L'ensemble du mélange est porté à l'ultra son pendant 15 min pour une bonne solubilisation.

- Purification et extraction des terpènes sur cartouche d'extraction

(HLB OASIS, 1cc, 30 mg)

L'activation de la cartouche se fait par passage de 1 mL de méthanol à une pression de 5 mm/Hg suivi du passage de 1 mL d'eau ultrapure à la même pression. Un millilitre de l'échantillon est introduit dans la cartouche sous la même pression. La cartouche est ensuite lavée par 1 mL d'eau ultrapure jusqu'au séchage complet sous une pression de 10 mm/Hg pendant 5 min.

Après cette purification de l'échantillon, les terpènes sont élués dans 1mL de méthanol directement dans un vial pour dosage au CPG/SM.

Les terpènes ont été déterminés par CPG (Agilent 6890N, WATERS), équipé d'un injecteur automatique modèle 7683B series. En outre, une colonne capillaire en silice fondue a été utilisée

(DB5-MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) avec une phase non-polaire stationnaire de 5 % phenyl methylpolysiloxane. Concernant la température de l'injecteur, elle a été de 250 °C avec un rapport de split de 1 : 10. Quand à la température de la source et de l'interface GC, elle a été de 230 °C. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec un débit constant de 1 mL/min. De plus, Le gradient de température a été programmé comme suit : température initiale 40 °C, température finale 240 °C à raison de 20 °C/min. L'identification des terpènes a été faite sur les bases de données NIST 2002 et 2008.

➤ **Dosage des polyphénols**

- Préparation de l'échantillon

Un milligramme de la fraction F₅ a été dissout dans 1 mL de méthanol puis évaporé à sec à l'évaporateur rotatif à 160 mb (millibar) et à une température de 60 °C. Au résidu sec, on a ajouté 50 μ L de BSTFA (Bis trimethylsilyl trifluoroacetamide) additionné de 1 % TMCS (Trimethylchlorosilane). Le tout a été incubé à 70 °C pendant 25 min. Une nouvelle évaporation à sec a été réalisée, et le résidu obtenu est repri avec 1,3 mL de méthanol et ensuite injecté dans la colonne ci-dessus indiqué du CPG pour le dosage.

- Détermination des composés phénoliques au CPG/SM

La détermination des composés phénoliques a été faite dans les mêmes conditions que celle des composés terpéniques à la seule différence que avec les composés phénoliques la température de l'injecteur a été de 280 °C. Le gradient de température a été fait sur une programmation de 60 °C à 270°C à raison de 20 °C/ min. L'identification des composés phénoliques a été faite sur les bases de données NIST 2002 et 2008.

II-4- Méthodes statistiques

Les données expérimentales obtenues ont été traitées grâce au logiciel STATISTICA 7.1. L'analyse statistique des résultats a été réalisée en utilisant l'analyse des variances (ANOVA). Selon le test de comparaison multiple de Duncan, $p < 0,05$ est considéré comme critère de significativité.

RESULTATS

I- Tests antifongiques

I-1- Activités anticandidosiques des extraits totaux de EUCA

I-1-1- Activité anticandidosique de l'extrait aqueux (X_{Aq})

L'étude de l'action de X_{Aq} sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* a montré que après 48 heures d'incubation il y a eu comparativement au tube témoin de croissance, une diminution progressive du nombre de colonies dans les tubes expérimentaux, au fur et à mesure que la concentration de X_{Aq} augmentait dans les tubes. Les résultats ont montré que X_{Aq} inhibe la croissance *in vitro* des trois isolats fongiques, selon une relation dose-reponse permettant de déterminer les concentrations minimales fongicides (CMF) et la concentration minimale inhibitrice (CMI).

CMI = CMF = 500 μ g/mL contre *Candida albicans*.

CMI = CMF = 500 μ g/mL contre *Candida glabrata*.

CMI = CMF = 500 μ g/mL contre *Candida tropicalis*.

Il ressort donc clairement que pour tous ces trois germes, la CMI = CMF = 500 μ g/mL. En effet, après repiquage sur gélose neuve des tubes expérimentaux correspondant aux CMI, aucune croissance n'a été observée après 48h d'incubation. Aussi à 5 jours, il a été observé dans les tubes à concentrations inférieures à celle de la CMI que le nombre de colonies a augmenté mais celui du tube de la CMI est resté stable. L'extrait X_{Aq} exerce donc un effet fongicide à 500 μ g/mL.

La figure 13 présente les trois courbes d'activités obtenues à partir des données du dénombrement des colonies dans les 10 tubes expérimentaux pour lesquels la croissance des germes fongiques a été évaluée en pourcentage de survivance calculé par rapport à 100 % de survivance dans le tube témoin de contrôle de croissance. Elle permet de comparer l'activité de X_{Aq} sur les trois germes. Plus la pente d'une courbe de sensibilité est forte plus l'extrait est actif et plus la souche est sensible. Sur cette figure, on constate de façon générale que toutes les courbes ont une allure décroissante avec des pentes plus ou moins fortes. La courbe d'activité de l'extrait X_{Aq} sur *C. tropicalis* possède une forte pente. Par contre celle illustrant l'activité de l'extrait X_{Aq} sur *C. albicans* possède une faible pente. Enfin celle de *C. glabrata* présente une pente moyenne.

Ces trois courbes d'activités ont permis de déterminer les concentrations inhibitrices pour 50 % de survivance des germes (CI_{50}).

CI_{50} = 48,54 μ g/mL contre *Candida albicans*.

CI_{50} = 24,14 μ g/mL contre *Candida glabrata*.

CI_{50} = 21,30 μ g/mL contre *Candida tropicalis*.

Les valeurs de concentrations minimales fongicides ainsi que celles des CI_{50} sont résumées dans le tableau III.

Concernant la performance de l'extrait X_{Aq} sur les germes testés, il ressort que les valeurs de CMF pour les trois isolats fongiques sont identiques (CMF= 500 $\mu\text{g/mL}$). Cependant la différence d'activité s'est faite au niveau de la CI_{50} . Ainsi le classement des germes du plus sensible au moins sensible donne l'ordre suivant : *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*.

L'extrait X_{Aq} est actif sur les 3 espèces testées. Au vu de ces résultats, l'optimisation de l'activité antifongique a été faite en utilisant d'autres solvants notamment des solvants organiques. Au regard des travaux de ZIRIHI et KRA en 2003, le mélange éthanol-eau comme solvant d'extraction a été choisi. C'est à partir de ce solvant que l'extrait hydro-alcoolique X_0 a été préparé.

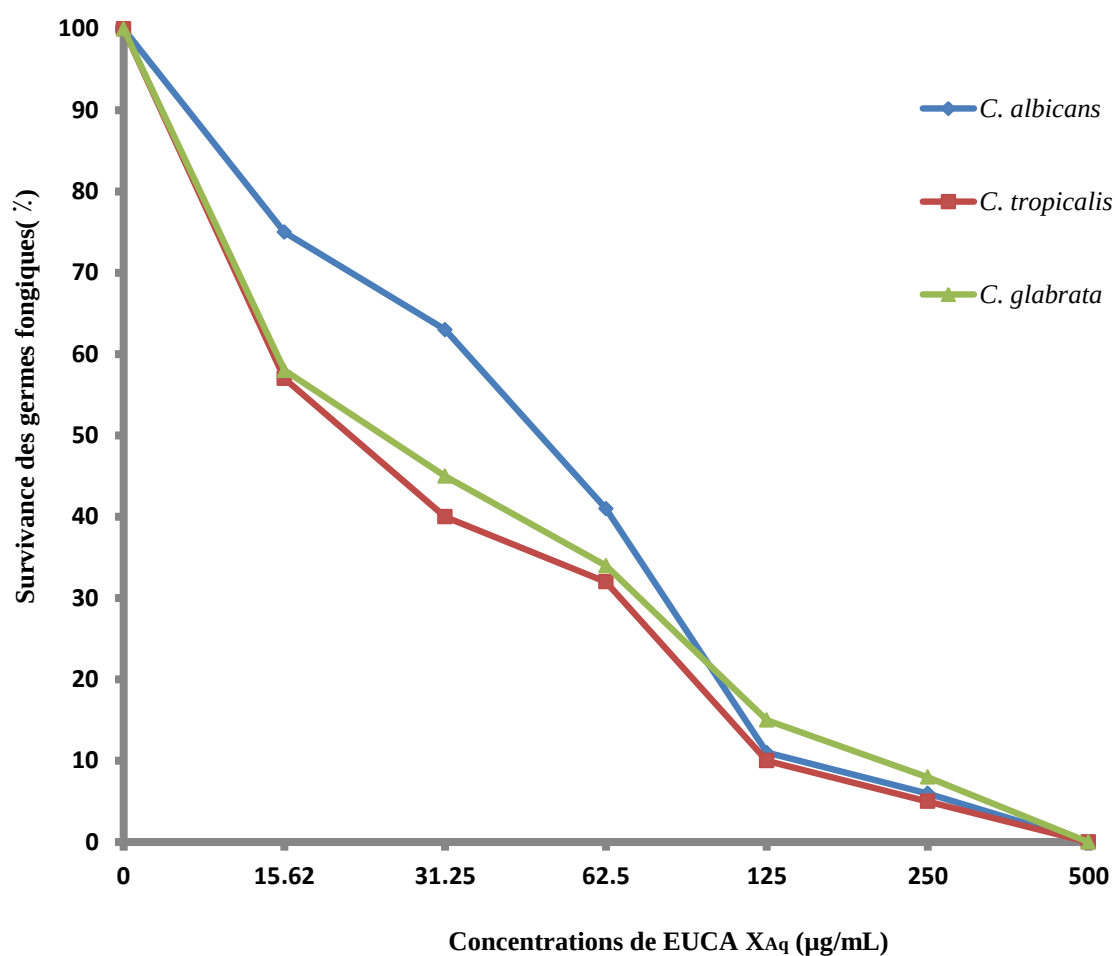


Figure 13 : Effet de l'extrait X_{Aq} de EUCA sur les levures du genre *Candida*

X_{Aq} : extrait total aqueux

EUCA : *E. torelliana*

Tableau III : Valeurs des paramètres antifongiques comparés de X_{Aq}

Extrait	Germes fongiques	Paramètres antifongiques (µg/mL)	
		CMF	CI ₅₀
X _{Aq}	<i>Candida albicans</i>	500	48,54
	<i>Candida glabrata</i>	500	24,14
	<i>Candida tropicalis</i>	500	21,30

I-1-2- Activité anticandidosique de l'extrait hydro-éthanolique (X_0)

L'étude de l'activité antifongique de X_0 sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*; *Candida glabrata* et *Candida tropicalis* a montré une activité anticandidosique sur les germes testés. Comparativement au témoin, il y a une diminution progressive du nombre de colonies dans les tubes expérimentaux, au fur et à mesure que la concentration de X_0 augmente dans les tubes. Cette inhibition de la croissance des germes de *Candida* se fait selon une relation dose-effet permettant de déterminer les valeurs des concentrations minimales inhibitrices qui sont égales à celles des concentrations minimales fongicides. De plus après repiquage de la gélose de la CMI sur gélose neuve, on remarque qu'il n'y a pas de colonies après le temps d'incubation. Aussi à 5 jours, il a été observé dans les tubes à concentrations inférieures à celle de la CMI que le nombre de colonies a augmenté mais celui du tube de la CMI est resté stable. L'extrait exerce donc un effet fongicide.

La figure 14 présente l'activité de l'extrait X_0 aux 3 germes fongiques. De façon générale l'on constate que toutes les courbes ont une allure décroissante avec des pentes plus ou moins fortes. Ainsi plus la pente d'une courbe d'activité est forte plus la souche est sensible et plus l'extrait est actif. En conséquence, la courbe de *Candida tropicalis* présente la pente la plus forte. C'est donc la souche la plus sensible ensuite vient respectivement *Candida glabrata* puis *Candida albicans*.

Comme le montre le tableau IV, les CMF déterminées pour cet extrait sur chaque germe sont identiques (CMF = 250 $\mu\text{g/mL}$). La valeur de la concentration inhibitrice à 50 % (CI_{50} = 14,57 $\mu\text{g/mL}$) pour *C. albicans* est la plus élevée tandis que celle de *C. glabrata* (CI_{50} = 11,90 $\mu\text{g/mL}$) et *C. tropicalis* (CI_{50} = 11,15 $\mu\text{g/mL}$) sont approximativement égales.

En définitive, en tenant compte des CI_{50} , l'extrait est plus actif sur *C. tropicalis* tandis qu'il est moins actif sur *C. albicans*. Aussi, l'extrait X_0 agit selon une relation dose-effet.

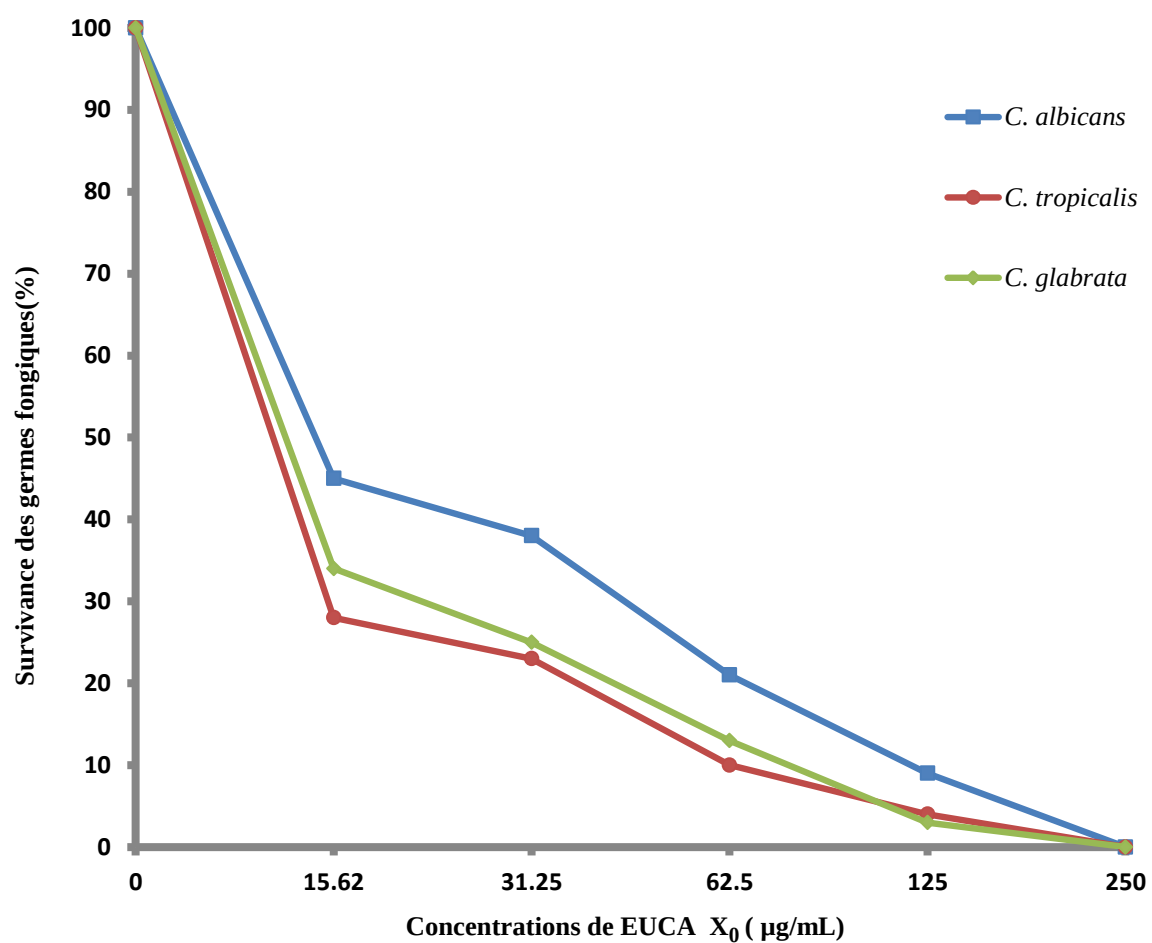


Figure 14 : Effet de l'extrait X_0 de EUCA sur les levures du genre *Candida*

X_0 : extrait total hydro-éthanolique

EUCA : *E. torelliana*

Tableau IV: Valeurs des paramètres antifongiques comparés de X₀

Extrait	Germes fongiques	Paramètres antifongiques (µg/mL)	
		CMF	CI ₅₀
X ₀	<i>Candida albicans</i>	250	14,57
	<i>Candida glabrata</i>	250	11,90
	<i>Candida tropicalis</i>	250	11,15

En Conclusion à cette première partie concernant les extraits totaux, il a été observé que le rapport des valeurs de CMF des extraits aqueux et hydro-éthanolique donne pour tous ces germes testés :

$$\text{CMF } X_{\text{Aq}} / \text{CMF } X_0 = 500/250 = 2$$

En effet, il ressort de ces rapports que l'extrait hydro-éthanolique (X_0) est 2 fois plus actif que l'extrait aqueux (X_{Aq}). L'activité antifongique de l'extrait X_0 est amélioré de 2 fois par rapport à l'extrait X_{Aq} . Par conséquent, l'extrait hydro-alcoolique a été retenu pour la suite des travaux afin d'optimiser son activité. Cet extrait a été partitionné dans 4 différents mélanges de solvants (Hexane-eau, Acétate d'éthyle-eau, butanol-eau et chloroforme-eau).

I-2- Activités anticandidosiques des extraits partitionnés de EUCA

L'étude de l'activité des extraits partitionnés sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, et *Candida tropicalis* a montré qu'après 48 heures d'incubation, il y a eu par rapport au témoin, une diminution progressive du nombre de colonies dans les tubes expérimentaux au fur et à mesure que la concentration des extraits augmente dans les tubes.

Par ailleurs, chaque extrait inhibe la croissance *in vitro* des trois germes de *Candida* selon une relation dose-effet permettant de déterminer les valeurs de CMF qui sont soit variables soit identiques d'un extrait à l'autre sur les souches de *Candida*.

Les données expérimentales traduites sous forme de courbes d'activité des extraits partitionnés sont présentées sur les figures 15, 16, 17 et 18. Dans l'ensemble, toutes les courbes obtenues présentent une allure progressivement décroissante, avec des pentes plus ou moins fortes selon les extraits.

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

L'analyse de ce tableau montre que les extraits aqueux issus de cette partition (X_{1-2} , X_{2-2} , X_{3-2} et X_{4-2}) présentant des valeurs des paramètres antifongiques les plus faibles, comprise entre 125µg/mL et 500µg/mL. Ces extraits sont donc plus actifs comparativement aux extraits des phases organiques (X_{1-1} , X_{2-1} , X_{3-1} et X_{4-1}) dont les valeurs sont les plus élevées et comprises entre 500 µg/mL et 2000 µg/mL. De plus, pour les extraits aqueux comme organiques, les CMF déterminés pour chaque extrait contre *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida tropicalis* sont identiques. En outre, parmi les extraits aqueux actifs, les extraits X_{1-2} , X_{3-2} et X_{4-2} ont la même activité sur les germes de *Candida* testés vu que pour ces extraits, les CMF sont identiques. Cependant, en ce rapportant à leur différentes CI_{50} , l'extrait X_{1-2} présente la meilleure activité sur *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida tropicalis* alors que l'extrait X_{1-1} a la plus faible activité.

En effet, sur *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida tropicalis*, les plus faibles valeurs des paramètres antifongiques ont été obtenues avec X_{1-2} (CMF = 125 µg/mL). En revanche, sur ces mêmes espèces fongiques X_{1-1} possède la plus forte valeur de CMF (2000 µg/mL).

Au vu de ces résultats, il est à retenir que la meilleure performance est observée avec l'extrait X_{1-2} . De plus, cet extrait a une action fongicide. Il y a donc eu amélioration de l'activité antifongique de l'extrait total hydro-éthanolique ($CMF X_0 / CMF X_{1-2} = 250 / 125 = 2$ contre *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*). L'extrait X_{1-2} a donc été retenu pour la suite des travaux.

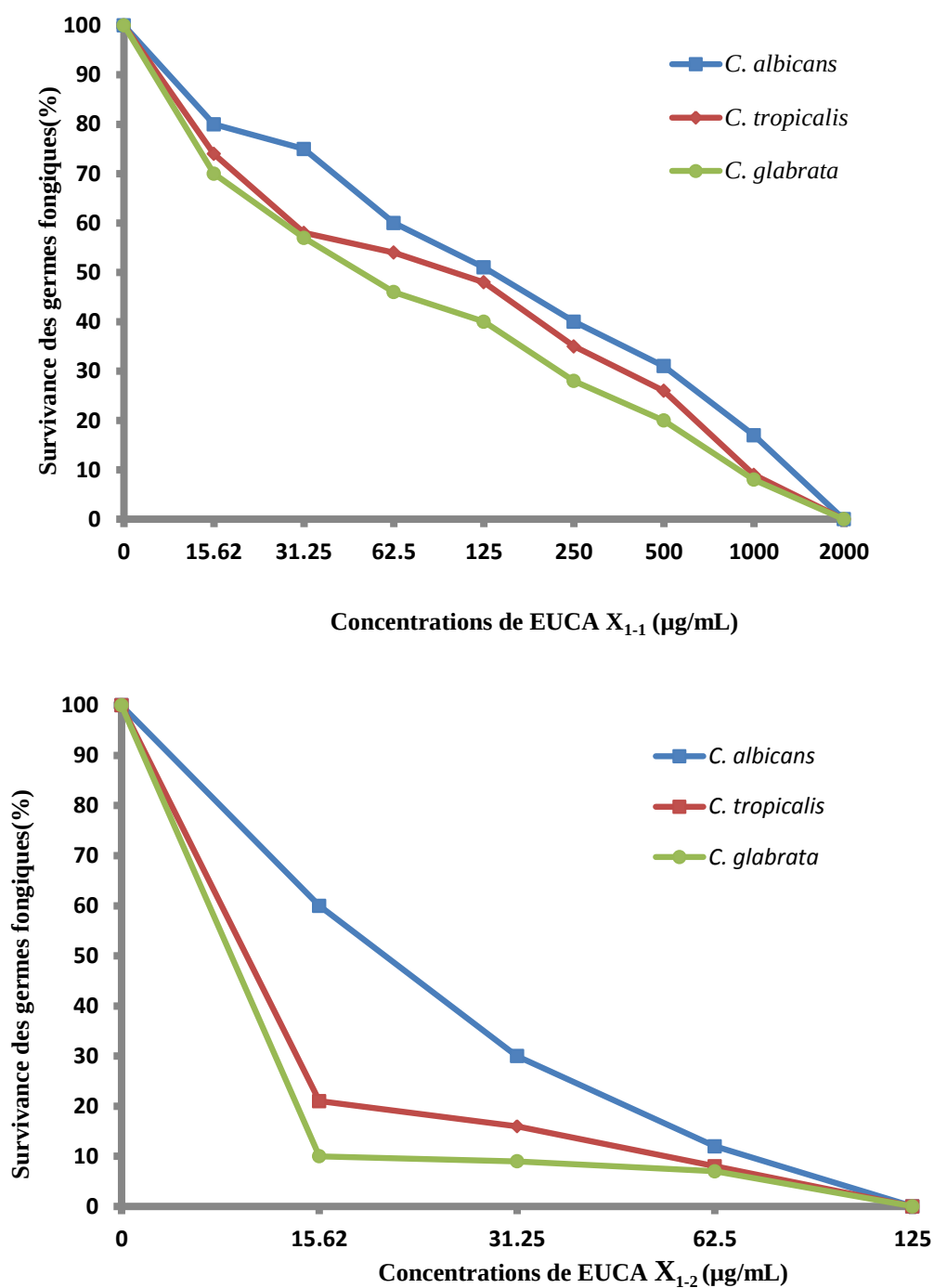


Figure 15 : Effet des extraits X₁₋₁ et X₁₋₂ de EUCA sur les levures du genre *Candida*

X₁₋₁ : phase hexanique

X₁₋₂ : phase aqueuse issu de la partition hexane /eau

EUCA : *E. torelliana*

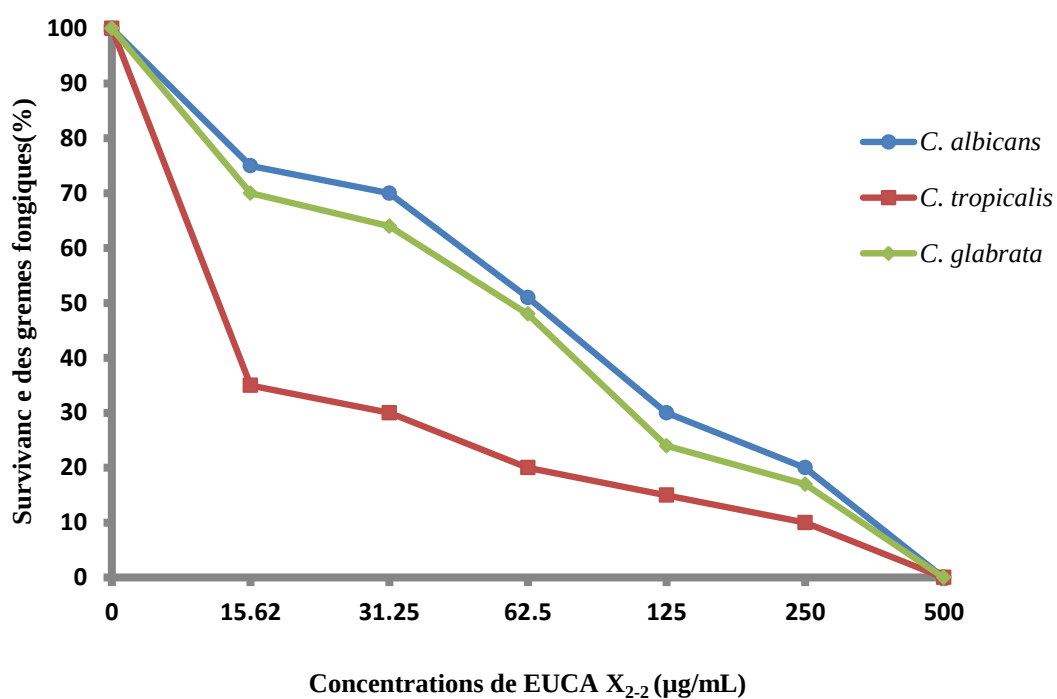
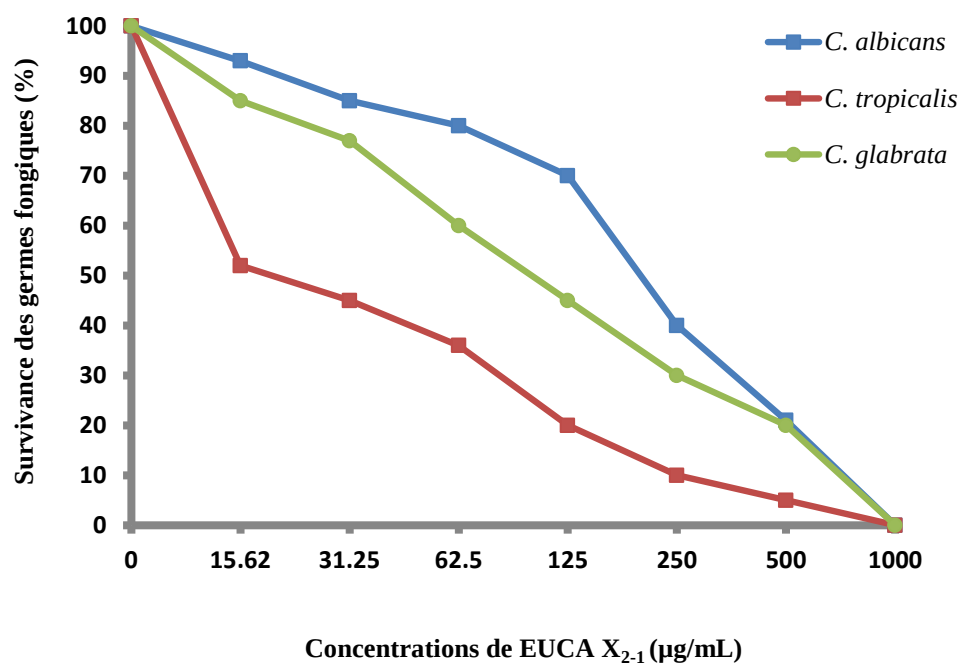


Figure 16 : Effet des extraits X₂₋₁ et X₂₋₂ de EUCA sur les levures du genre *Candida*

X₂₋₁ : phase acétatique

X₂₋₂ : phase aqueuse issu de la partition acétate d'éthyl /eau

EUCA : *E. torelliana*

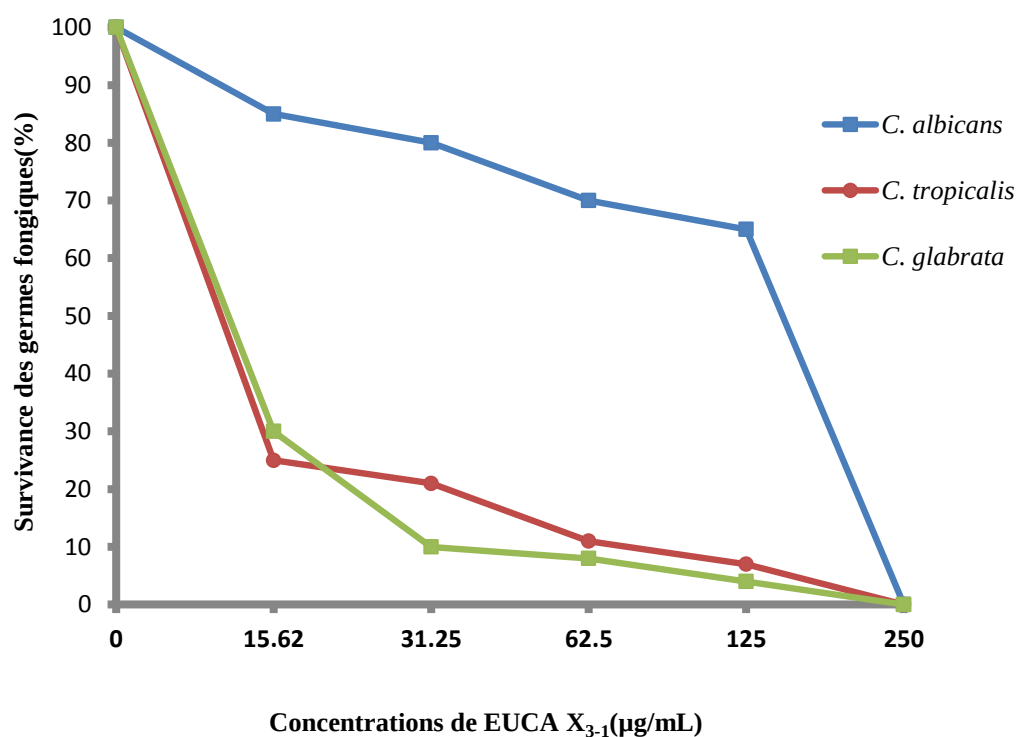
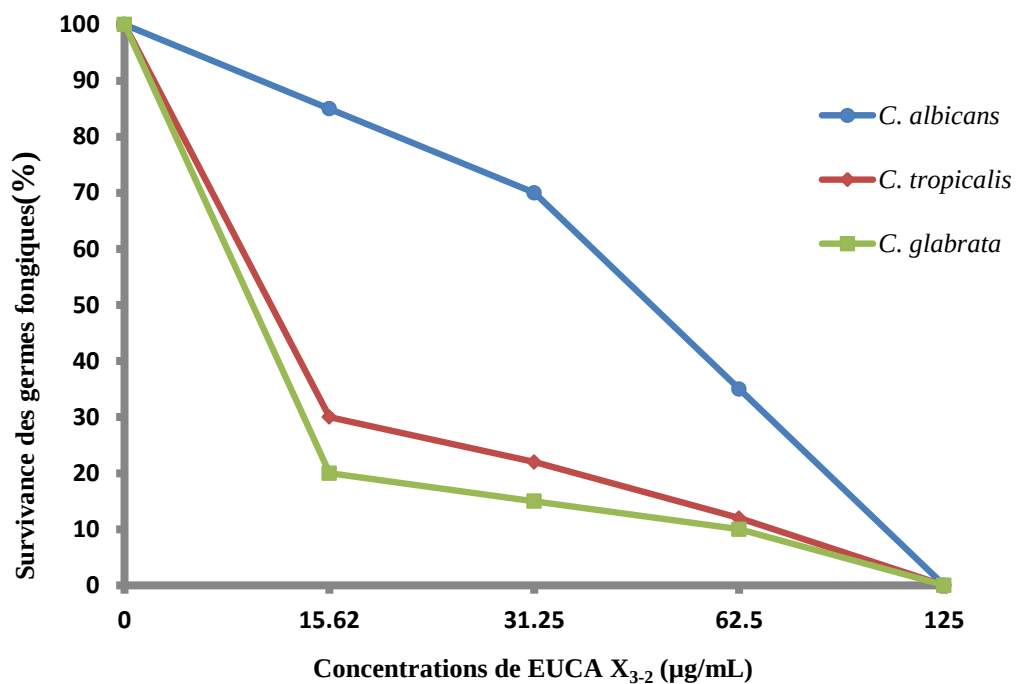


Figure 17 : Effet des extraits X₃₋₁ et X₃₋₂ de EUCA sur des levures du genre *Candida*

X₃₋₁ : phase butanolique

X₃₋₂ : phase aqueuse issu de la partition butanol /eau

EUCA : *E. torelliana*

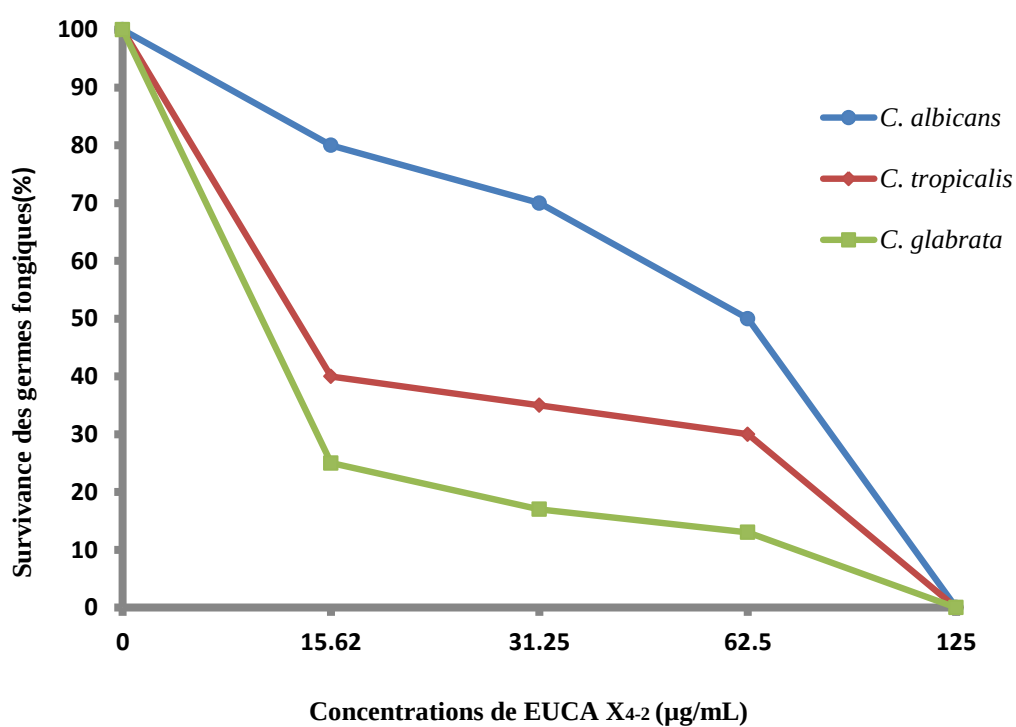
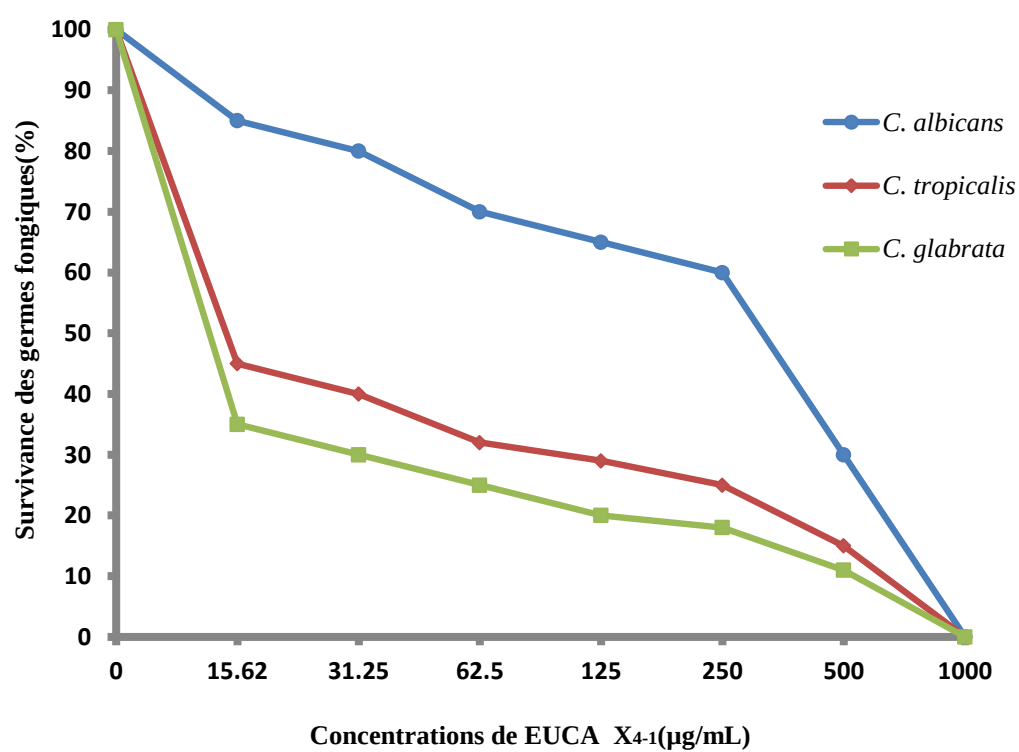


Figure 18 : Effet des extraits X₄₋₁ et X₄₋₂ de EUCA sur des levures du genre *Candida*

X₄₋₁ : phase chloroformique

X₄₋₂ : phase aqueuse issu de la partition chloroforme /eau

EUCA : *E. torelliana*

Tableau V : Valeurs des paramètres antifongiques des extraits issus de la partition de l'extrait total hydroalcoolique de *Eucalyptus torelliana* F.Muell.

Extraits de EUCA	Paramètres antifongiques					
	(µg/mL)					
	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	CMF	CI ₅₀	CMF	CI ₅₀	CMF	CI ₅₀
X ₀	250	14,57	250	11,90	250	11,15
X ₁₋₁	2000	142,85	2000	51,33	2000	98,21
X ₁₋₂	125	21,19	125	08,62	125	09,91
X ₂₋₁	1000	204,68	1000	101,56	1000	19,52
X ₂₋₂	500	62,50	500	58,23	500	12,35
X ₃₋₁	250	150	250	11,87	250	10,62
X ₃₋₂	125	47,99	125	09,76	125	11,51
X ₄₋₁	1000	328,12	1000	12,14	1000	14,75
X ₄₋₂	125	62,50	125	09,37	125	11,71

X₀ : extrait total hydro-éthanolique

X₁₋₁ : phase hexanique (huile végétale)

X₁₋₂ : phase aqueuse de la partition Hexane-Eau

X₂₋₁ : phase acétatique

X₂₋₂ : phase aqueuse de la partition Acétate d'éthyle-Eau

X₃₋₁ : phase butanolique

X₃₋₂ : phase aqueuse de la partition Butanol-eau

X₄₋₁ : phase chloroformique

X₄₋₂ : phase aqueuse de la partition chloroforme-Eau

I-3- Activité anticandidosique des fractions chromatographiques de EUCA

La chromatographie sur colonne a permis d'obtenir 10 fractions testées séparément sur chacun des germes de *Candida* avec une gamme de concentration variant de 500 à 3,906 µg/mL.

Par ailleurs pour apprécier la performance des différentes fractions, les objectifs suivants ont été assignés:

- la détermination du nombre de germes fongiques inhibés par chaque fraction,
- la détermination des valeurs des paramètres antifongiques des différentes fractions,
- la recherche des meilleures valeurs de CMF et de CI_{50} au vu de celles de l'extrait de base X_{1-2} ,
- la détermination de l'ordre de sensibilité des souches de *Candida* par rapport à la fraction la plus active,
- la détermination de l'action fongistatique ou fongicide de la ou des fraction(s) active(s).

Ainsi à la suite de ces tests, la valeur de CMF de chaque fraction a été relevée ainsi que les valeurs de CI_{50} (déterminée graphiquement). Ces paramètres antifongiques sont consignés dans le tableau VI :

Tableau VI : Valeurs des paramètres antifongiques en µg/mL comparées des Fractions de X₁₋₂

	Germes fongiques					
	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	CMF	CI ₅₀	CMF	CI ₅₀	CMF	CI ₅₀
X₁₋₂	125	21,19	125	08,62	125	09,91
F ₁	> 500	Ind	> 500	Ind	>500	Ind
F ₂	> 500	203,12	> 500	5,85	> 500	93,75
F ₃	125	29,30	125	13,66	125	09,23
F ₄	125	14,50	125	11,71	125	06,87
F₅	62,5	06,45	62,5	01,73	62,5	02,70
F ₆	250	86,80	250	19,95	250	28,63
F ₇	250	117	250	21,47	250	41,01
F ₈	250	145,83	250	26,03	250	36,45
F ₉	250	55,55	250	14,75	250	22,76
F ₁₀	500	164	500	14,64	500	21,86

Ind : Indéterminé

X₁₋₂ : phase aqueuse issu de la partiton hexane/eau

F₁ : fraction 1

F₂ : fraction2

F₃ : fraction3

F₄ : fraction 4

F₅ : fraction 5

F₆ : fraction 6

F₇ : fraction 7

F₈ : fraction 8

F₉ : fraction9

F₁₀ : fraction10

La concentration maximale a été fixée à 500 µg/mL et les valeurs de CMF ou de CI₅₀ supérieures à 500 µg/mL sont indéterminées en rapport avec les performances de l'extrait de base X₁₋₂. L'analyse des résultats de l'activité antifongique de ces fractions sur la croissance *in vitro* des 3 germes testés montre que ces différentes fractions peuvent être regroupées selon la valeur de leur CMF comparativement à celle de l'extrait de base X₁₋₂. Ainsi, on a :

- les fractions qui n'ont aucune activité antifongique à la concentration maximale de 500 µg/mL. Ce sont les fractions F₁ et F₂;
- Les fractions qui inhibent la croissance des 3 germes fongiques mais dont les valeurs de CMF sont égales à celle de l'extrait de base ayant servi à la chromatographie. Il s'agit des fractions F₃ et F₄. Ces fractions possèdent une activité fongicide sur la croissance *in vitro* des germes étudiés. En effet, après repiquage sur gélose neuve des tubes correspondant aux CMI, on n'observe aucune croissance après 48h d'incubation. De plus à 5 jours, une augmentation du nombre de colonies est observée dans les tubes à concentrations inférieures à celle de la CMI mais celui du tube de la CMI est resté stable. La CMI = CMF = 125µg/mL;
- Les fractions qui inhibent la croissance des 3 germes fongiques mais dont les valeurs de CMF sont supérieures à celle de l'extrait de base ayant servi à la chromatographie. Il s'agit des fractions F₆, F₇, F₈, F₉ et F₁₀. Ces fractions possèdent une activité fongistatique sur la croissance *in vitro* des germes étudiés. En effet, après repiquage sur gélose neuve des tubes correspondant aux CMI de ces fractions, on observe une croissance après 48h d'incubation. De plus à 5 jours, il est observé dans les tubes à concentrations inférieures à celle de la CMI que le nombre de colonies a augmenté ainsi que dans les tubes des différentes CMI. Pour ces fractions les CMF ont été déterminés après repiquage sur gélose neuve des tubes à concentration supérieure à la CMI,
- La fraction qui inhibe effectivement la croissance *in vitro* des 3 germes fongiques avec une valeur de CMF inférieure à celle de l'extrait de base sur chacun des germes fongiques testés. Il s'agit de la fraction F₅ (CMF = CMI = 62,5 µg/mL). La fraction F₅ tout comme les fractions F₃ et F₄ exerce aussi une action fongicide.

Au regard des performances de la fraction F₅ sur les trois germes fongiques (tableau VII), on a noté que les valeurs des CMF pour cet extrait sont identiques pour les germes de *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis* tandis que les valeurs des CI₅₀ sont différentes les unes des autres. A partir des valeurs des CI₅₀, on note que la fraction F₅ est plus active sur *C. glabrata* (CI₅₀ = 01,73 µg/mL) et moins actif sur la souche de *C. albicans* (CI₅₀ = 06,45 µg/mL).

La figure 19 présente toutes les courbes d'activité antifongique de cet extrait. Elles ont permis de déterminer les valeurs de CI₅₀ et de comparer l'activité de F₅ sur ces trois isolats. Sur cette figure, on constate que de façon générale toutes les courbes ont une allure décroissante avec des pentes

plus ou moins fortes. Cela illustre l'effet dose-dépendant entre la sensibilité des isolats et l'activité de l'extrait. La courbe présentant la sensibilité de *C. glabrata* à l'extrait F₅ possède une forte pente. Par contre celle qui illustre l'activité de la fraction F₅ sur de *C. albicans* possède une faible pente. Enfin celle de *C. tropicalis* présente une pente à valeur moyenne.

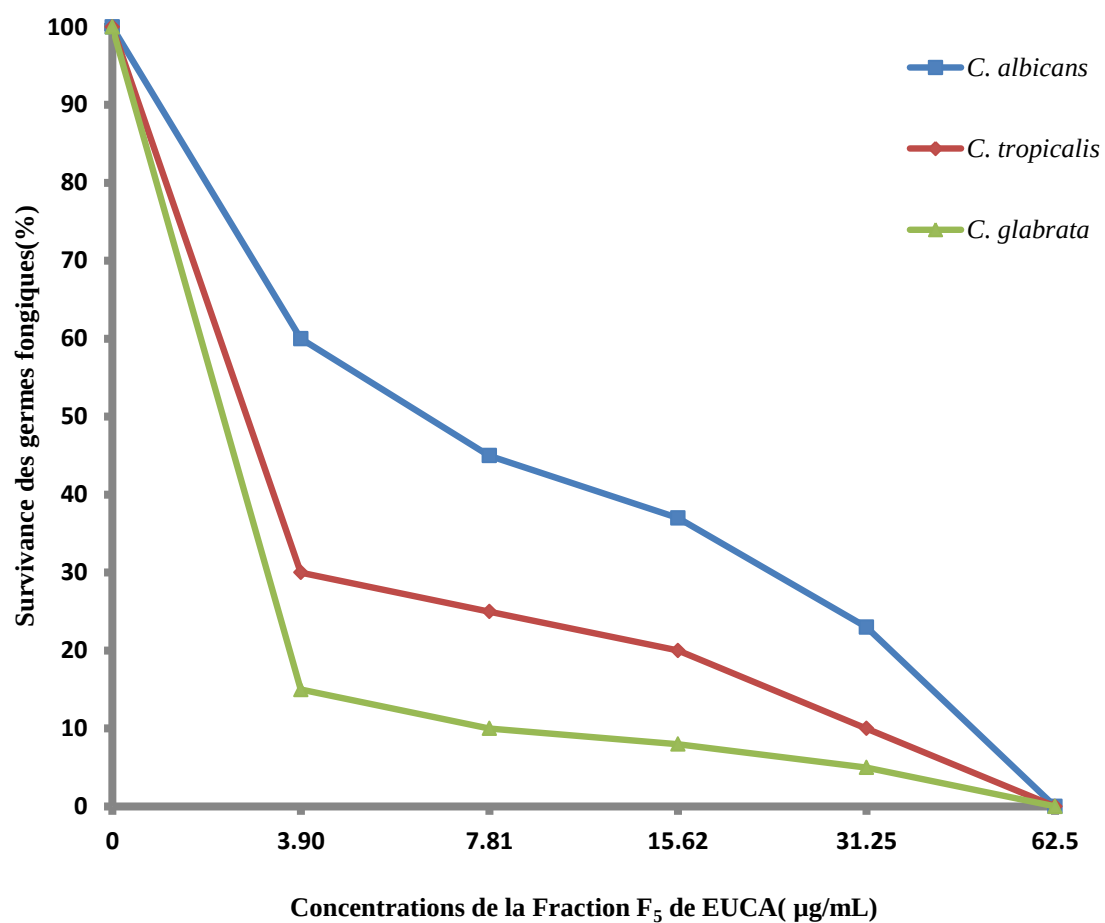


Figure 19 : Effet de la Fraction F₅ de EUCA sur les levures du genre *Candida*

F₅ : fraction 5

EUCA : *E. torelliana*

Tableau VII : Valeurs des paramètres antifongiques comparées de la Fraction F₅

Fraction	Germe fongique	Paramètres antifongiques (µg/mL)	
		CMF	CI ₅₀
F ₅	<i>Candida albicans</i>	62,50	06,45
	<i>Candida glabrata</i>	62,50	01,73
	<i>Candida tropicalis</i>	62,50	02,70

I-4- Récapitulatif des résultats

Les figures 20, 21 et 22 présentent les courbes d'activité obtenus à partir des données du dénombrement des colonies dans les 10 tubes expérimentaux pour lesquels la croissance des germes a été évaluée en pourcentage de survivance calculé par rapport à 100 % de survivance dans le tube témoin de contrôle de croissance. En outre, ces courbes permettent de comparer l'activité antifongique des extraits X_{Aq} , X_0 , X_{1-2} et F_5 sur les trois germes. Pour chaque germe testé, toutes les courbes d'activité ont une allure décroissante avec des pentes variables. Ainsi, la courbe d'activité de l'extrait F_5 présente la pente la plus forte, ensuite suit la pente de l'extrait X_{1-2} puis celle de X_0 et enfin vient la pente de l'extrait X_{Aq} .

Les valeurs des concentrations minimales fongicides ainsi que celles des CI_{50} sont résumées dans le tableau VIII.

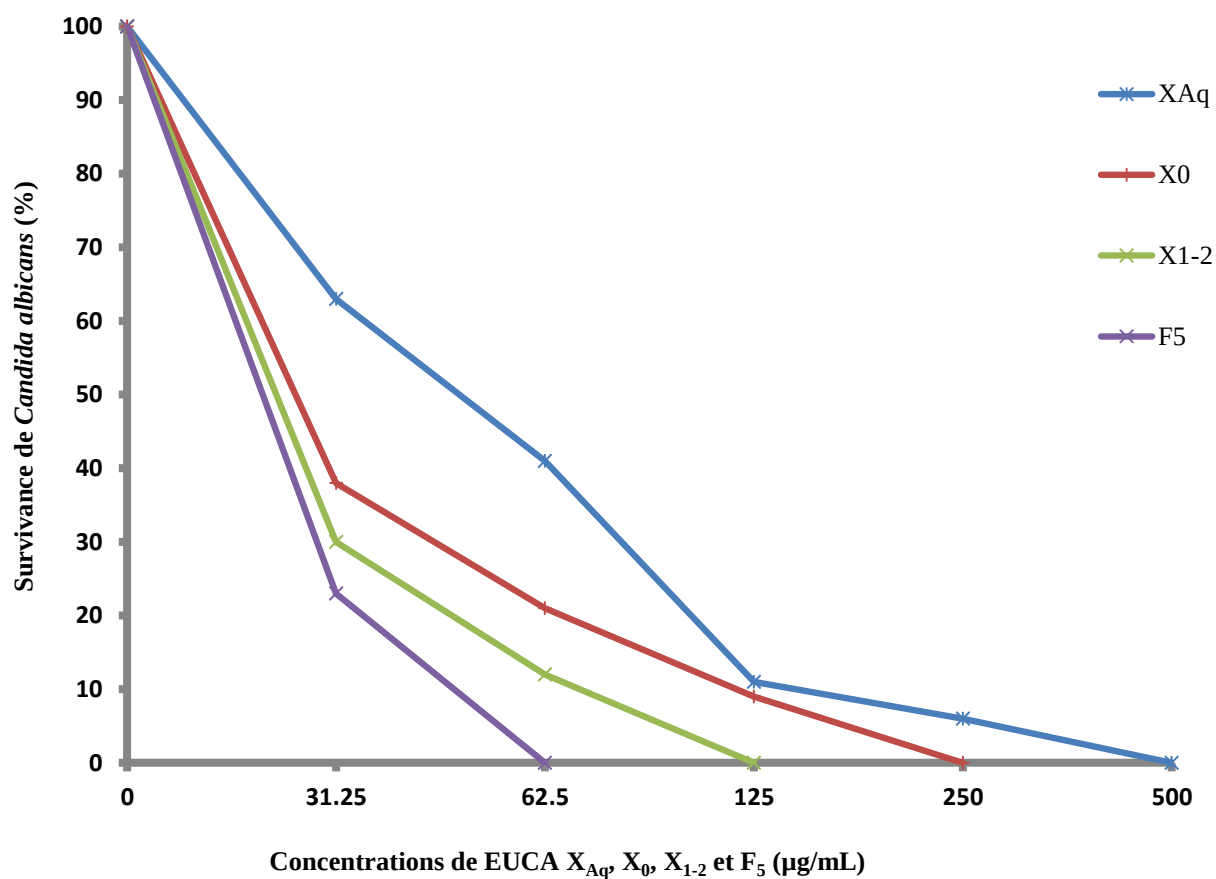


Figure 20 : Effet des extraits X_{Aq} , X_0 , X_{1-2} et F_5 sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*

X_{Aq} : extrait total aqueux

X_0 : extrait total hydro-éthanolique

X_{1-2} : phase aqueuse issu de la partition hexane/eau

F_5 : fraction 5

EUCA : *E. torelliana*

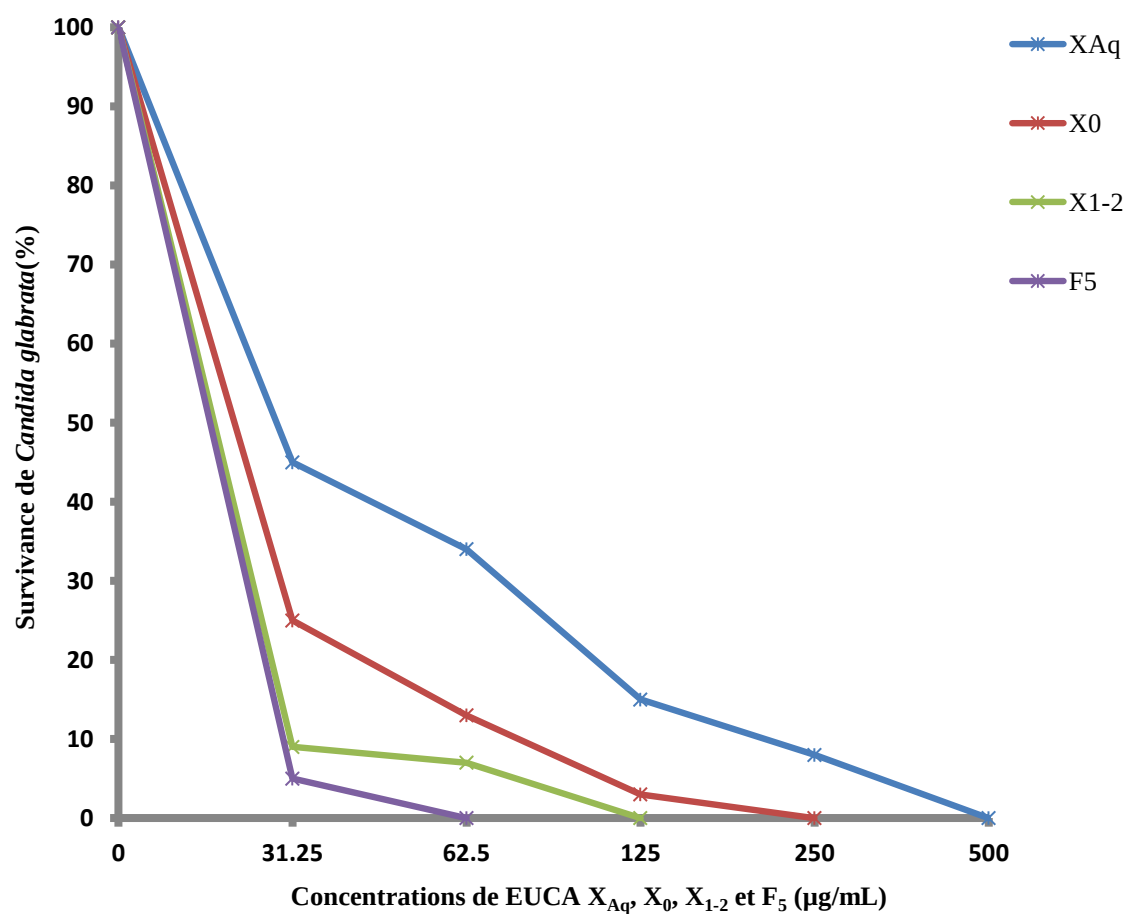


Figure 21 : Effet des extraits X_{Aq} , X_0 , X_{1-2} et F_5 sur la croissance *in vitro* de *Candida glabrata*

X_{Aq} : extrait total aqueux

X_0 : extrait total hydro-éthanolique

X_{1-2} : phase aqueuse issu de la partition hexane/eau

F_5 : fraction 5

EUCA : *E. torelliana*

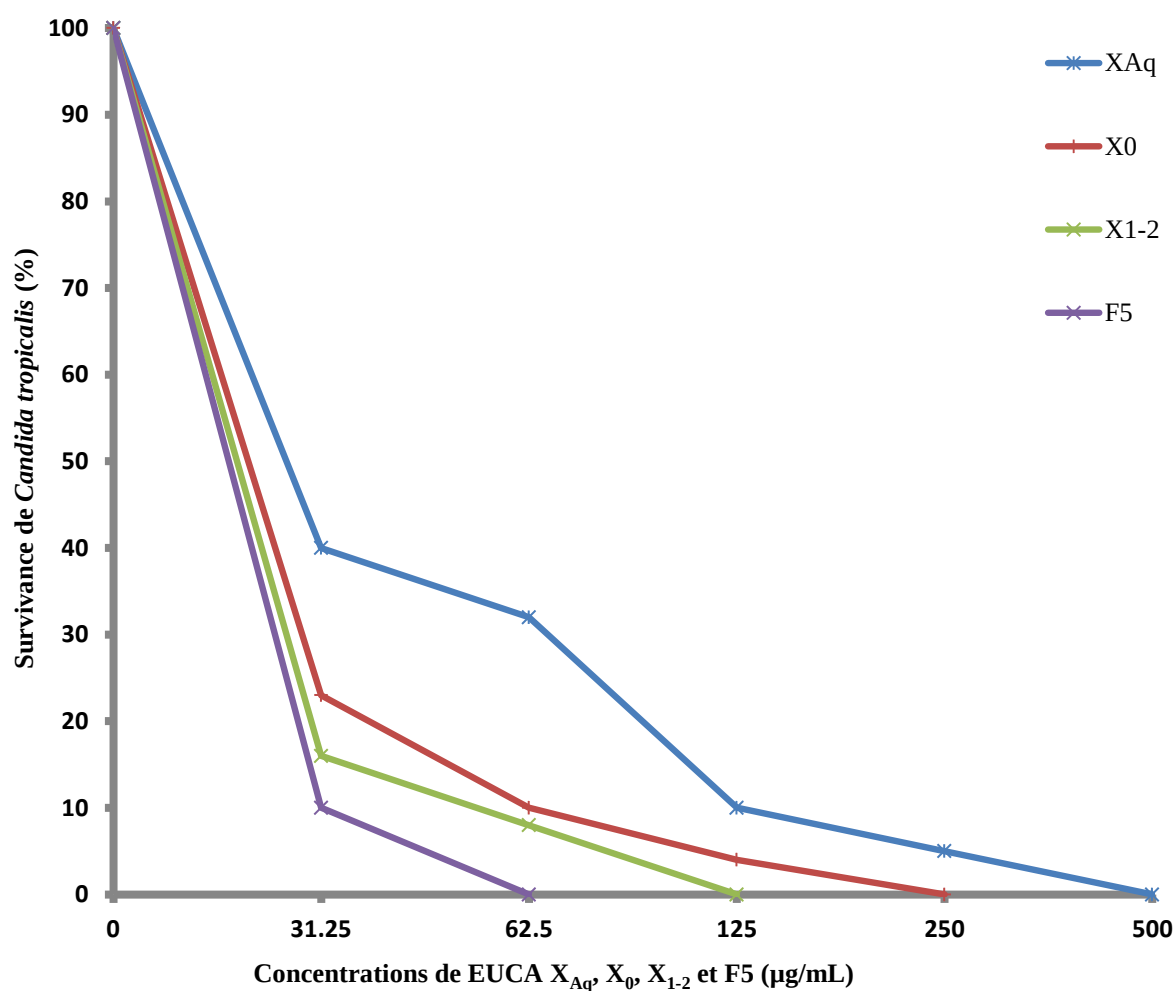


Figure 22 : Effet des extraits X_{Aq} , X_0 , X_{1-2} et F_5 sur la croissance *in vitro* de *Candida tropicalis*

X_{Aq} : extrait total aqueux

X_0 : extrait total hydro-éthanolique

X_{1-2} : phase aqueuse issu de la partition hexane/eau

F_5 : fraction 5

EUCA : *E. torelliana*

Tableau VIII : Récapitulatif des valeurs des paramètres antifongiques comparées des extraits X_{Aq}, X₀, X₁₋₂ et F₅

Extraits	Germes fongiques	Paramètres antifongiques (µg/mL)	
		CMF	CI ₅₀
X _{Aq}	<i>C. albicans</i>	500	48,54
	<i>C. glabrata</i>	500	24,14
	<i>C. tropicalis</i>	500	21,30
X ₀	<i>C. albicans</i>	250	14,57
	<i>C. glabrata</i>	250	11,90
	<i>C. tropicalis</i>	250	11,15
X ₁₋₂	<i>C. albicans</i>	125	21,19
	<i>C. glabrata</i>	125	08,62
	<i>C. tropicalis</i>	125	09,91
F ₅	<i>C. albicans</i>	62,50	06,45
	<i>C. glabrata</i>	62,50	01,73
	<i>C. tropicalis</i>	62,50	02,70

Conclusion partielle

De la comparaison de la fraction F_5 sur la base des rapports de sa valeur de CMF, il ressort que la fraction F_5 est 2 à 8 fois plus active que les fractions des autres groupes. De plus lorsqu'on compare cette valeur de CMF à celle de l'extrait ayant servi de base à sa préparation (X_{1-2}), on remarque qu'il est 2 fois plus actif que ce dernier sur chacun des germes étudiés :

- $CMF X_{1-2} / CMF F_5 = 125 / 62,5 = 2$ pour *Candida albicans*
- $CMF X_{1-2} / CMF F_5 = 125 / 62,5 = 2$ pour *Candida glabrata*
- $CMF X_{1-2} / CMF F_5 = 125 / 62,5 = 2$ pour *Candida tropicalis*

En outre, le rapport établi sur la base des valeurs de CMF avec celles des extraits totaux X_{Aq} et X_0 montre que :

* Pour X_0 , elle est 4 fois plus active :

- $CMF X_0 / CMF F_5 = 250 / 62,5 = 4$ pour *Candida albicans*
- $CMF X_0 / CMF F_5 = 250 / 62,5 = 4$ pour *Candida glabrata*
- $CMF X_0 / CMF F_5 = 250 / 62,5 = 4$ pour *Candida tropicalis*

* Pour X_{Aq} , elle est 8 fois plus active :

- $CMF X_{Aq} / CMF F_5 = 500 / 62,5 = 8$ pour *Candida albicans*
- $CMF X_{Aq} / CMF F_5 = 500 / 62,5 = 8$ pour *Candida glabrata*
- $CMF X_{Aq} / CMF F_5 = 500 / 62,5 = 8$ pour *Candida tropicalis*

Au vu de ces rapports, il ressort que l'activité antifongique de *Eucalyptus torelliana* F. Muell. est améliorée considérablement.

II- Analyses statistiques de l'activité des extraits de EUCA

Le traitement des données expérimentales par le logiciel Statistica 7.1 montre que pour chacun des isolats testés avec les différents extraits, $p > 0,05$. Ce qui signifie que pour une concentration donnée, il n'y a pas de différence significative entre les différents tests. Tableau IX.

Tableau IX : Statistiques descriptives des extraits de EUCA par groupes

EXTRAITS	<i>Candida albicans</i>			<i>Candida glabrata</i>			<i>Candida tropicalis</i>		
	Moyenne	N	Ecart type	Moyenne	N	Ecart type	Moyenne	N	Ecart type
X_{Aq}	500	5	0,00	500	5	0,00	500	5	0,00
X_0	250	5	0,00	250	5	0,00	250	5	0,00
X_{1-1}	2000	5	0,00	2000	5	0,00	2000	5	0,00
X_{1-2}	125	5	0,00	125	5	0,00	125	5	0,00
X_{2-1}	1000	5	0,00	1000	5	0,00	1000	5	0,00
X_{2-2}	500	5	0,00	500	5	0,00	500	5	0,00
X_{3-1}	250	5	0,00	250	5	0,00	250	5	0,00
X_{3-2}	125	5	0,00	125	5	0,00	125	5	0,00
X_{4-1}	1000	5	0,00	1000	5	0,00	1000	5	0,00
X_{4-2}	125	5	0,00	125	5	0,00	125	5	0,00
F_5	62,5	5	0,00	62,5	5	0,00	62,5	5	0,00

N= nombre de répétitions

III- Tri phyto-chimique des extraits de EUCA

Le tri phyto-chimique a été effectué sur 8 groupes chimiques (les plus couramment rencontrés) à savoir les alcaloïdes, les polyphénols, les tanins galliques, les tanins catéchiques, les flavonoïdes, les quinones, les saponosides, et enfin les composés terpéniques. Ces différents groupes chimiques ont été recherchés dans 4 extraits (X_{Aq} , X_0 , X_{1-2} et F_5). Par ailleurs pour mieux qualifier l'abondance des constituants chimiques recherchés dans ces extraits, des scores variant de 0 à 3 (absence ou présence) ont été attribués. Ainsi, l'absence est symbolisée par un score 0, la présence en faible quantité par un score 1, la présence en quantité moyenne par un score 2 et enfin l'abondance par un score 3.

Il ressort de ces tests que :

- L'extrait total (X_{Aq}) renfermerait 6 groupes chimiques dont les polyphénols, les tanins galliques, les flavonoïdes, les quinones, les saponosides et les composés terpéniques avec un score 1;
- L'extrait total X_0 renfermerait les polyphénols (score 3), les tanins galliques, les composés terpéniques et les flavonoïdes (score 2), les quinones et les saponosides avec un score 1;
- L'extrait X_{1-2} renfermerait les polyphénols, les tanins galliques et les composés terpéniques avec un score 2, les saponosides et les flavonoïdes avec un score 1 et les quinones avec un score 0;
- La fraction F_5 renfermerait les polyphénols, les tanins galliques avec un score 1, les composés terpéniques avec un score 1, puis les quinones, les saponosides, et les flavonoïdes avec un score 0.

Les alcaloïdes, et les tanins catéchiques seraient tous absents dans les 4 échantillons.

Ces résultats obtenus avec le tri-phytochimique, présentés à la figure 23 nécessitent une confirmation par d'autres méthodes plus poussées telles que la CPG /SM ou le HPLC. L'analyse de cette figure traduit la présence ou non des composés chimiques dans les extraits les plus actifs par catégories d'extraction (extraits totaux, extraits partitionnés et extraits chromatographiques).

De cette analyse, il ressort que des extraits aqueux (X_{Aq}) et hydro-éthanolique (X_0) à l'extrait F_5 il y aurait diminution du nombre de composés de 6 à 2 :

6 groupes chimiques seraient présents dans l'extrait total aqueux;

6 groupes chimiques seraient également présents dans l'extrait total hydro-éthanolique;

5 groupes chimiques seraient présents dans l'extrait X_{1-2}

et 2 groupes chimiques seraient présents dans la fraction F_5 . En effet, les tanins galliques présents dans cette fraction font partie du groupe des polyphénols.

L'extrait le plus actif F₅ contiendrait des polyphénols et des composés terpéniques. Ces résultats confirmeraient que les méthodes d'extractions et de chromatographie par gel de filtration sur séphadex G₅₀ permettraient de faire une sélection des groupes chimiques les plus actifs.

Groupes chimiques

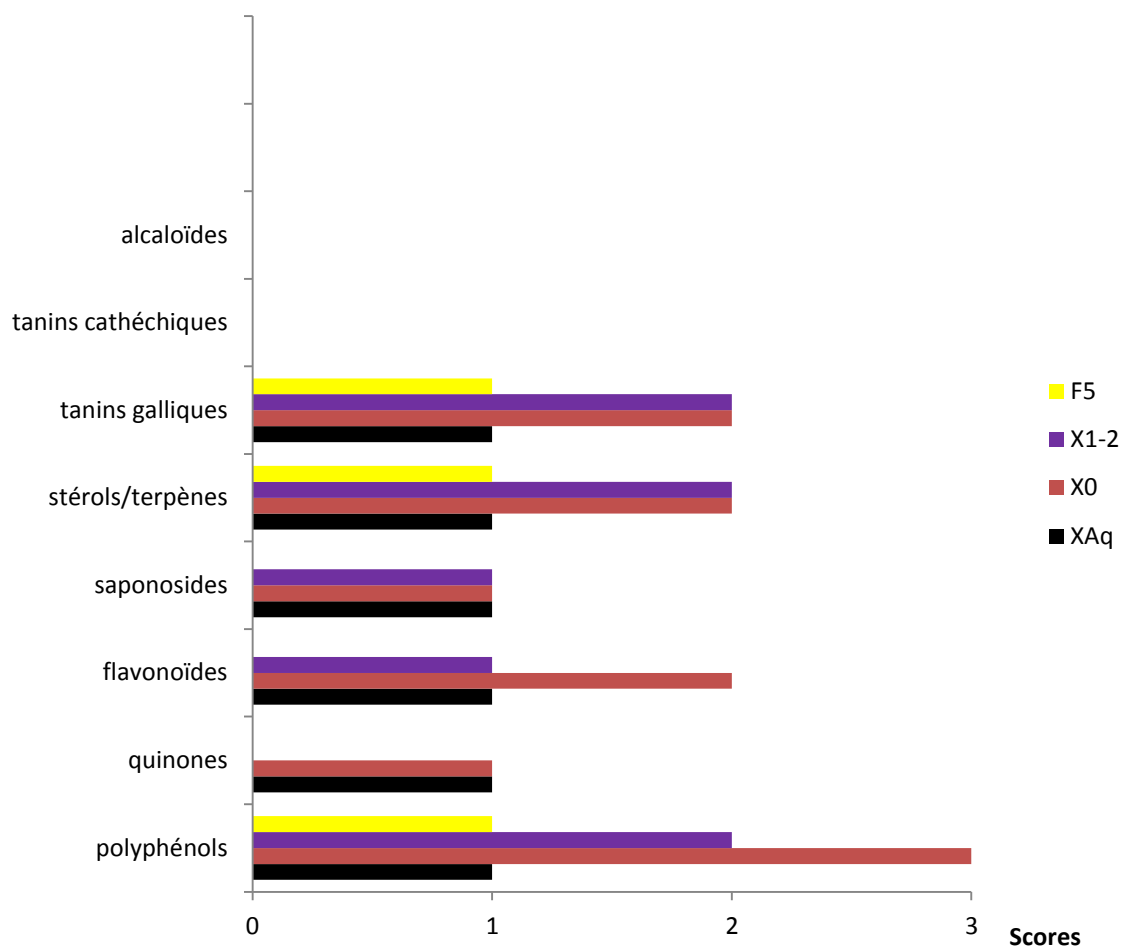


Figure 23 : Composés chimiques présents dans les extraits X_{Aq}, X₀, X₁₋₂, F₅ de EUCA

IV- Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG/SM)

La CPG/SM a permis d'identifier 13 molécules sur la base de données NIST 2002 et 2008 :

- des composés dérivant de l'hydrolyse des tanins galliques à savoir : l'acide gallique, l'acide syringique, l'acide bêta resorcylique, l'acide para hydroxyphénylacétique, le D-xylose et le D-acide 2, 3, 4 trihydroxy delta-lactone xylonique;
- certains hydrocarbures tels que le 2,3 dihydroxybutane, 2,6 diméthyl-octane ainsi que le 7,8 dihydroxybicyclo [4.2.0] octa-3.7- diène et l'acide 4-phényl-4hydroxy-3-butanoïque qui sont tous deux, des terpènes ont été révélés;
- les composés alcooliques identifiés sont le glycérol et le 3,5-diméthyl-3-hexanol.

Concernant le cyclométhicone identifié, il s'agit du détergent qui a servi au nettoyage du tube capillaire contenant l'échantillon analysé, il ne fait donc pas partie des molécules présentes dans la fraction F₅ (figure 24).

Par ailleurs, la présence de pics non identifiés pourrait être de nouvelles molécules ou des molécules dont les étalons ne figurent pas dans la base de données utilisées.

Concernant la CPG/SM des terpènes, elle a permis d'identifier deux molécules qui sont : le 9,10-dihydroxy-cis-décalin et le ledane qui sont tous deux des terpènes (figure 25).

Le tableau XI résume les molécules terpéniques et phénoliques dérivés des tanins galliques identifiées dans la fraction F₅.

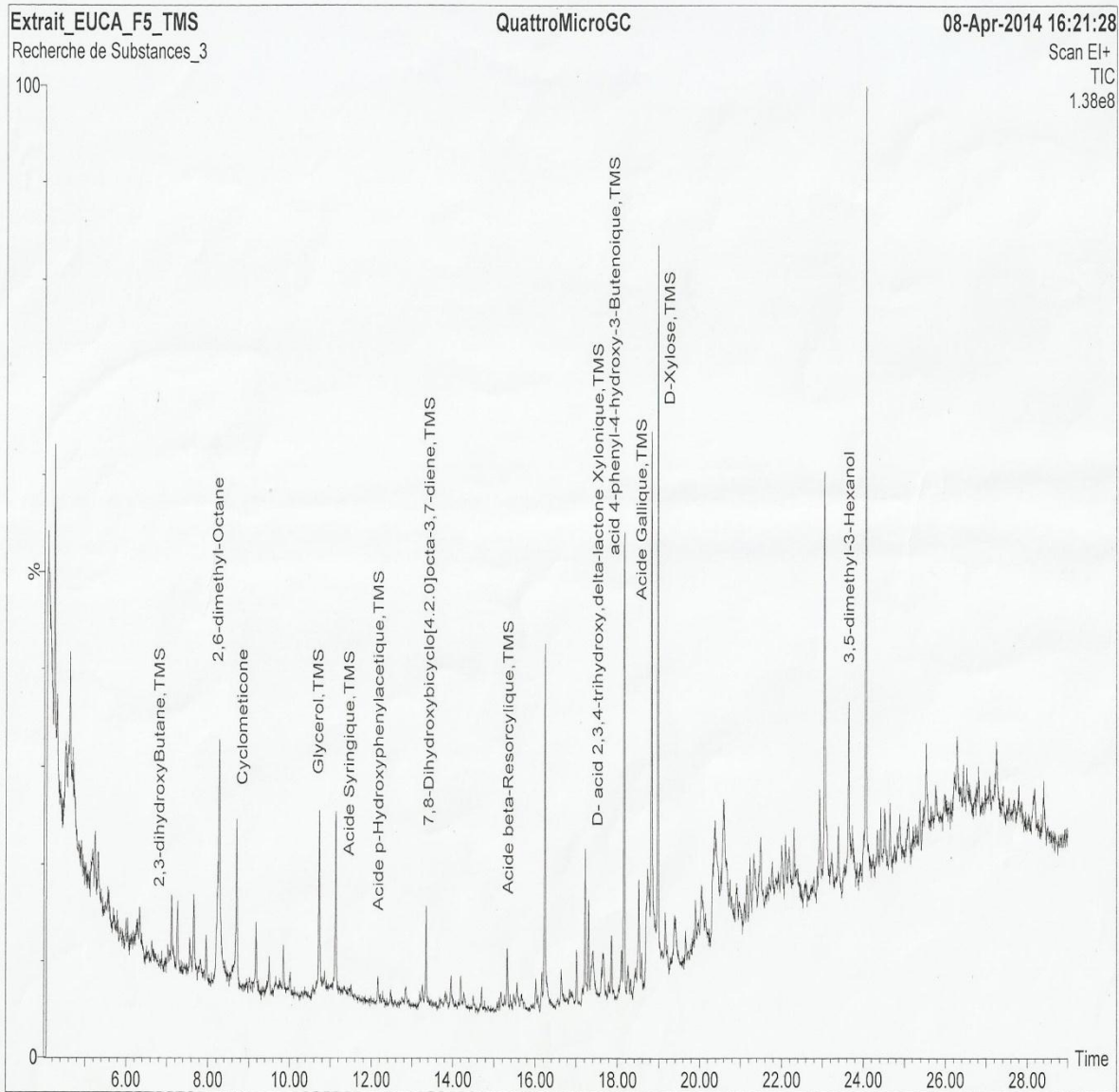


Figure 24 : Profil chromatographique des composés phénoliques de la fraction F₅ de EUCA.

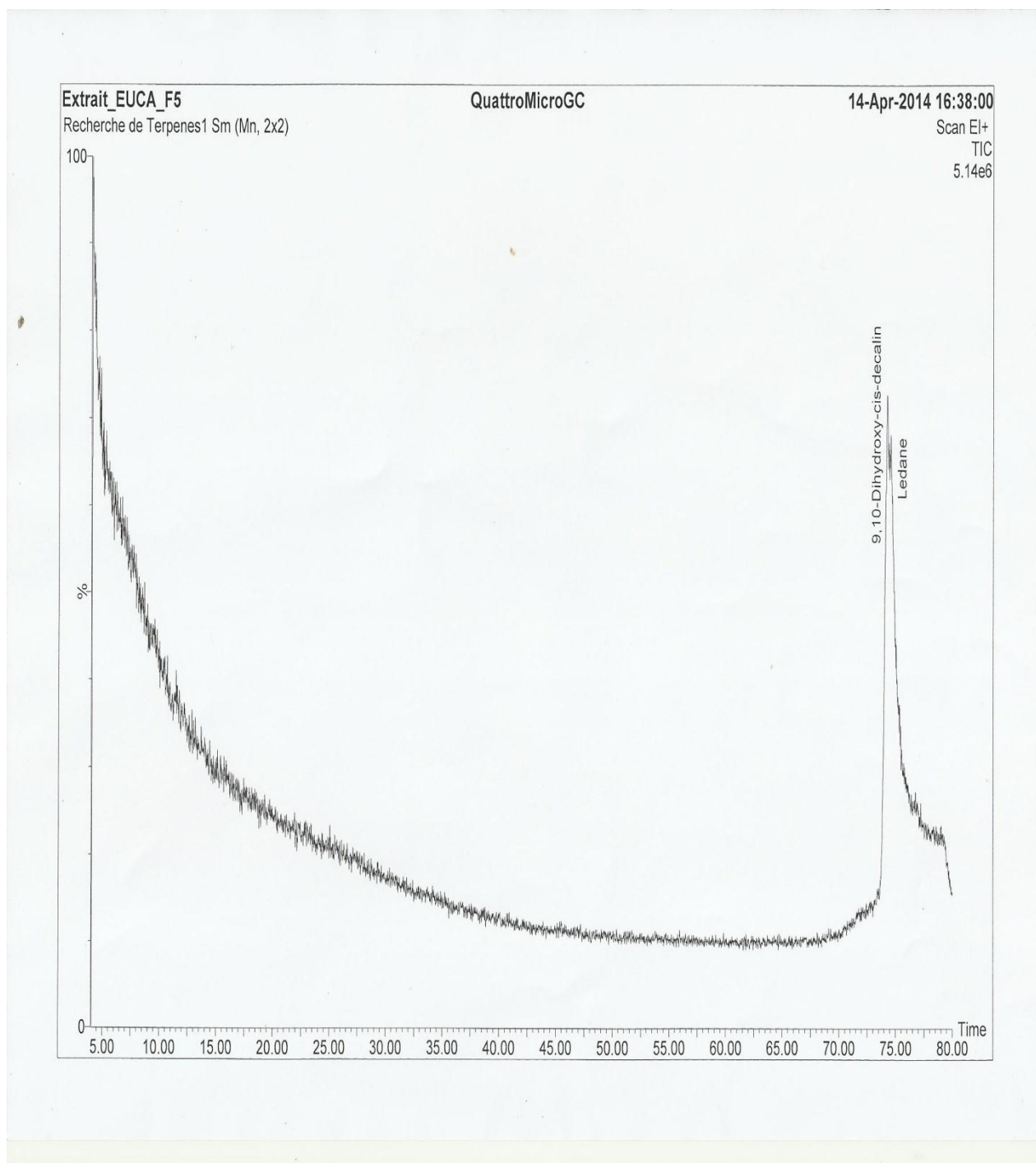


Figure 25 : Profil chromatographique des composés terpéniques de la fraction F₅ de EUCA

Tableau X: Composés terpéniques et phénoliques présents dans la fraction F₅

	Fraction F ₅
Composés phénoliques	Acide beta resorcylique; Acide para hydroxyphenylacétique ; acide gallique, acide syringique
Composés terpéniques	7,8Dihydroxybicyclo [4.2.0] octa-3.7- diène; 9,10-Dihydroxy-cis-décalin ; Ledane, Acide 4-phényl-4hydroxy-3butanoïque
Tanins cathéchiques	-
Tanins galliques	-
Flavonoïdes	-
Alcaloïdes	-
Saponoside	-
Quinones	-

(-) : absent

DISCUSSION
ET
CONCLUSION

I- DISCUSSION

Les dégâts causés par la forte progression des maladies infectieuses ces dernières années ont atteint une ampleur telle que la plupart des auteurs s'accordent sur le fait que le développement de nouveaux agents thérapeutiques antimicrobiens s'avère indispensable pour lutter contre les mycoses en général et particulièrement contre les candidoses qui sont récurrentes dans les cas d'infection à VIH. Des approches utilisées, l'investigation à partir des plantes à vertus antimicrobiennes représente un apport important et indispensable pour la découverte de nouvelles substances antifongiques (**Schaller, 1999**). Parmi les plantes sélectionnées et étudiées (ou en cours d'étude), *Eucalyptus torelliana* F. Muell. fait partie de celles qui sont les plus sollicitées en milieu traditionnel. Il lui est accordé des vertus antifongiques, antibactériennes, antioxydantes, antiseptiques, cicatrisantes, insecticides, et pesticides (**Fabre et al., 1992 ; Grassmann & Hippeli, 2000; Alain et al., 2012**).

Cette étude a été conduite non seulement pour vérifier les vertus anti-infectieuses accordées à cette plante, mais aussi pour rechercher un extrait amélioré et performant (très actif) à partir duquel il serait possible de mettre au point un médicament traditionnel amélioré, qui puisse aider à lutter contre les formes de candidoses les plus récurrentes et récidivantes en pathologie humaine.

Notre approche a d'abord été de préparer les extraits totaux et d'évaluer leurs activités anticandidosiques. Par la suite, la stratégie adoptée est d'améliorer l'activité de l'extrait total le plus actif par des partitions bio-guidées couplées à des tris phyto-chimiques. Enfin l'extrait qui s'est avéré être le plus actif a été chromatographié sur gel de sephadex G₅₀ afin d'en isoler la fraction la plus active. La comparaison de l'activité des différents extraits a été faite sur la base des valeurs de CMF, au cas échéant sur la base des valeurs de CI₅₀ et l'allure des courbes d'activité. Dans cette étude, on peut retenir ce qui suit :

- **Au niveau de l'extrait total aqueux (X_{Aq})**

Etant donné que l'eau est le solvant le plus utilisé pour la préparation des recettes traditionnelles nous avons, de prime abord, préparé l'extrait aqueux. Nos données expérimentales obtenues montrent que pour l'extrait aqueux (X_{Aq}) comparativement aux témoins, il y a une diminution progressive du nombre de colonies de ces trois isolats fongiques en fonction de l'augmentation de la concentration de X_{Aq} dans les tubes.

L'extrait est donc actif sur ces isolats selon une relation dose-effet (Figure 13 et le tableau III).

Dans toutes ces séries d'expériences, des inhibitions nettes et effectives de la croissance des trois isolats de champignons ont été observées à partir des concentrations de 500 µg/mL pour *C. albicans*; pour *C. glabrata* et pour *C. tropicalis*.

Sur la base des valeurs des CMF, la comparaison révèle que *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis* ont la même sensibilité. L'appréciation de cette activité a été faite en se référant aux valeurs de CI_{50} . Ainsi, entre ces trois isolats fongiques; l'extrait X_{Aq} est 2 fois plus actif sur *C. glabrata* ($CI_{50} = 24,14 \mu\text{g/mL}$) et *C. tropicalis* ($CI_{50} = 21,30 \mu\text{g/mL}$) par rapport à *C. albicans* avec une $CI_{50} = 48,54 \mu\text{g/mL}$.

Par ailleurs, l'allure décroissante de toutes les courbes d'activité de l'extrait X_{Aq} illustre bien que cet extrait est actif sur les trois germes selon une relation dose-effet.

Le rapprochement de ces résultats avec ceux d'autres travaux, antérieurement effectués sur *C. albicans* avec des extraits végétaux tels que les extraits aqueux issus de *Morinda morindoides* (BGG) (**Bagre, 2004**), de *Abrus precatorius* (**Sanogo, 2007**), de *Fagara macrophylla* (**Kra et al., 2003**) et de *Thonningia sanguinea* (**Kouakou et al., 2007**) montre que X_{Aq} de EUCA est respectivement 3 fois plus actif que l'extrait aqueux *Thonningia sanguinea* (CMF = $1560 \mu\text{g/mL}$); 300 fois plus actif que l'extrait aqueux de *Abrus precatorius* (CMF = $150000 \mu\text{g/mL}$); 400 et 600 fois plus actif que l'extrait aqueux de *Fagara macrophylla* (CMF = $200000 \mu\text{g/mL}$) et *Morinda morindoides* (CMF = $300000 \mu\text{g/mL}$). Les travaux effectués par **Ali-Emmanuel et al. (2002)** sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans* révèlent que l'extrait X_{Aq} de EUCA est 1000 fois plus actif que les extraits aqueux de *Cassia alata*, *Lantana camara* et *Mitracarpus scaber* (CMF = $500000 \mu\text{g/mL}$). Il en est de même pour les travaux de **Kporou et al. (2010)** qui a trouvé une valeur de CMF = $100000 \mu\text{g/mL}$ avec l'extrait aqueux de *Mitracarpus scaber* montrant ainsi l'extrait X_{Aq} de EUCA est 200 fois plus actif.

Les travaux de **Zirihi et al. (2003)** qui ont porté sur l'évaluation de l'activité antifongique de l'extrait aqueux de *Microglossa pyrifolia* (PYMI₀) sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, ont montré une inhibition nette et effective avec une valeur de CMF = $50000 \mu\text{g/mL}$. En comparant cette donnée à ceux de l'extrait, il ressort que la meilleure activité antifongique (CMF= $500 \mu\text{g/mL}$) est observée avec l'extrait X_{Aq} de EUCA. Le rapport établi sur la base des CMF, montre que $PYMI_0 / X_{Aq} = 50000/500 = 100$ en faveur de X_{Aq} . Ceci signifie que X_{Aq} de EUCA est donc 100 fois plus actif que PYMI₀.

De plus, la comparaison des performances de l'extrait aqueux de *Eucalyptus torelliana* F. Muell. (X_{Aq}) avec celles des extraits aqueux de *Mitracarpus scaber* (CMF = $100000 \mu\text{g/mL}$) sur *Candida glabrata* (**Kporou et al., 2010**) montre que X_{Aq} est le plus actif.

Les résultats de X_{Aq} sont meilleurs que ceux de **Fézan et al. (2007)** qui ont obtenu avec les extraits totaux aqueux de *Erigeron floribundus*, *Borreria latifolia*, *Borreria verticillata*, *Euphorbia hirta*, *Turraea heterophylla* et *Vernonia colorata* des CMF > $2000 \mu\text{g/mL}$ sur *Candida tropicalis*. Il faut remarqué que l'activité de X_{Aq} est au moins 4 supérieures à celle de ces extraits.

En outre, la comparaison de nos résultats avec ceux de **Yayé et al. (2011)** qui ont obtenus avec les extraits aqueux de *Terminalia mantaly* (H.Perrier) une CMF égale 97,5 µg/mL montre que ces auteurs ont obtenus de meilleurs résultats sur *Candida albicans* par rapport à l'extrait X_{Aq} de EUCA. Il en est de même pour les travaux de **Ouattara et al. (2008)** qui ont travaillé sur les extraits aqueux de *Terminalia ivorensis* (TEKAM 2) et ont obtenu une CMF de 390 µg/mL.

Cependant, vu les performances obtenues avec l'extrait aqueux de EUCA, on peut donc retenir que l'utilisation en milieu traditionnel de cette plante comme antimicrobien est fondée.

En plus de ces premières investigations, nous avons voulu savoir si des extraits préparés avec des solvants organiques pourraient être plus actifs. Au regard des travaux de Zirihi et Kra en 2003, nous avons choisi de préparer un extrait hydro-alcoolique X_0 .

- **Au niveau de l'extrait hydro-éthanolique (X_0)**

Au regard des résultats des tests antifongiques avec X_0 de EUCA, il ressort que l'extrait X_0 est actif sur les trois germes fongiques testés et cette activité est dose dépendante. Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices obtenues révèlent que X_0 a des activités antifongiques plus ou moins accentuées. Cet extrait a inhibé effectivement la croissance de chacun des trois germes de *Candida* à une concentration de 250 µg/mL, valeur correspondant à la CMF de cet extrait.

Sur la base des valeurs des CI_{50} , X_0 est moins actif sur *C. albicans* ($CI_{50} = 14,57$ µg/mL, par rapport aux autres CI_{50}). Par contre, il est plus actif sur les germes de *C. glabrata* et *C. tropicalis* avec des valeurs respectives de $CI_{50} = 11,90$ µg/mL et $CI_{50} = 11,15$ µg/mL qui sont sensiblement proches.

A partir de ces valeurs de CI_{50} , on en déduit que comparativement à l'activité de X_0 sur *C. albicans*, l'extrait est 1,22 fois plus actif sur *C. glabrata* et 1,30 fois plus actif sur *C. tropicalis*. Ces résultats obtenus sont similaires à ceux de X_{Aq} et confirment que l'extrait est moins actif sur *C. albicans* comparativement à *C. glabrata* et *C. tropicalis*.

Sur la base des valeurs des CMF, la comparaison des activités de l'extrait aqueux (X_{Aq}) et de l'extrait hydro-alcoolique (X_0), montre que X_0 (CMF = 250 µg/mL) est 2 fois plus actif que X_{Aq} sur *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis* (CMF = 500 µg/mL).

La comparaison de ces résultats avec ceux d'autres travaux révèle que l'extrait X_0 est 1000 fois plus actif que l'extrait hydro-éthanolique de *Morinda morindoides* (CMF de 250000 µg/mL) sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans* (**Bagré, 2004**). De plus, les extraits hydro-éthanolique de *Microglossa pyrifolia* (CMF = 25000 µg/mL) (**Zihiri et al., 2003**), de *Mitracarpus scaber* (CMF = 6250 µg/mL) (**Kporou et al., 2009**) sont moins actifs respectivement de 100 fois, 25 fois que l'extrait X_0 sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. L'extrait X_0 présente également une

meilleure performance que l'extrait hydro-éthanolique de *Spermacace verticillata* (CMF = 100000 µg/mL) sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans* (Zihiri et al., 2007). L'extrait X₀ est donc 400 fois plus actif que cet extrait.

S'agissant des espèces de *C. glabrata* et *C. tropicalis*, l'extrait X₀ est 25 fois plus actif que l'extrait hydro-éthanolique de *Mitracarpus scaber* (CMF = 6250 µg/mL) (Kporou et al., 2009).

Au regard de ce qui précède, nous déduisons que lorsque nous passons de X_{Aq} à X₀, nous améliorons l'activité antifongique de X_{Aq} de 2 fois contre *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis*.

On retient de cette analyse que les deux extraits ont de bonnes activités antifongiques. Cependant, l'extrait X₀ concentre mieux les principes actifs de *Eucalyptus torelliana* F. Muell. Il a été retenu pour les essais d'amélioration de l'activité antifongique de EUCA.

- **Extraits issus des partitions de l'extrait X₀**

Ces partitions ont donné huit extraits codifiés X₁₋₁, X₁₋₂, X₂₋₁, X₂₋₂, X₃₋₁, X₃₋₂, X₄₋₁, X₄₋₂. L'analyse des résultats obtenus (Figures 15 à 18 et le tableau V) montre que ces extraits sont actifs sur les 3 souches de *Candida* étudiées mais cette activité est plus ou moins accentuée selon les germes et les extraits.

Candida glabrata et *Candida tropicalis* sont les souches les plus sensibles et *Candida albicans* la souche la moins sensible à ces extraits.

En outre, les CMF obtenus sont plus faibles avec les phases aqueuses (X₁₋₂, X₂₋₂, X₃₋₂, X₄₋₂) issues des partitions par rapport aux phases organiques (X₁₋₁, X₂₋₁, X₃₋₁, X₄₋₁). De ce fait, les phases aqueuses sont plus actives que les phases organiques cela traduirait que les molécules à la bases de l'activité antifongique sont des molécules polaires et donc plus solubles dans l'eau. De plus, ces extraits sont 2 à 16 fois plus actifs que les différentes phases organiques (Ackah et al., 2008 ; Yayé et al., 2012) .

De ces quatre extraits aqueux à l'exception de l'extrait X₂₋₂, les extraits X₁₋₂, X₃₋₂, et X₄₋₂ ont la même performance antifongique sur *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida tropicalis* (CMF = 125µg/mL). Par conséquent, les mélanges de solvant hexane-eau, butanol-eau et chlorophorme-eau sont des mélanges qui permettent une bonne extraction des principes actifs de *Eucalyptus torelliana* F. Muell. à partir de l'extrait hydro-alcoolique.

Par ailleurs, en tenant compte des CI₅₀, l'extrait X₁₋₂ issu de la partition hexane-eau a les plus faibles valeurs de CI₅₀ contre *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida tropicalis*, ces valeurs sont respectivement de (21,19 µg/mL; 08,62 µg/mL et 09,91µg/mL), l'extrait X₁₋₂ est donc le plus actif car il a les paramètres antifongiques les plus faibles contre les trois souches de

Candida. Ce qui permet de dire que le mélange hexane-eau concentre mieux le principe actif de *Eucalyptus torelliana* F. Muell.

Contrairement aux extraits des phases organiques, l'extrait X_{1-1} a les paramètres antifongiques les plus élevés contre *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida tropicalis* de plus ces valeurs sont identiques (CMF = 2000 µg/mL). Cet extrait est 16 fois moins actif que l'extrait X_{1-2} .

En référence aux extraits totaux, l'extrait X_{1-2} est 2 fois plus actif que l'extrait total éthanolique et 4 fois plus actif que l'extrait total aqueux sur *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida tropicalis*. L'activité antifongique des extraits totaux a été nettement améliorée. De plus, La comparaison des performances de X_{1-2} de *Eucalyptus torelliana* F. Muell. à celles de l'extrait X_{1-1} de *Mitracarpus scarber* (CMF = 3125 µg/mL) testé par **Kporou et al. (2010)** montre que l'extrait X_{1-2} de *Eucalyptus torelliana* F. Muell. est 25 fois plus actif que ce dernier sur *Candida albicans* et *Candida tropicalis*. Cela est certainement dû aux types de molécules qui constituent les principes actifs des deux extraits et au mode de défense de ces deux germes vis-à-vis des molécules en présence dans ces différents extraits.

L'activité antifongique de X_{1-2} a été améliorée, cependant, les CMF (125 µg/mL) enregistrées sont nettement supérieures aux CMF (48,75 µg/mL) enregistrées avec une partition similaire de *Terminalia superba* (**Ahon et al., 2012**). L'activité de l'extrait de *Terminalia superba* est 2, 56 fois plus élevée que celle de *Eucalyptus torelliana* F. Muell.

Vu les performances de l'extrait X_{1-2} par rapport aux autres extraits, il a été fractionné par chromatographie sur colonne avec du gel de séphadex G_{50} . Les 10 fractions issues de cette chromatographie ont été testées sur la croissance *in vitro* des trois germes fongiques étudiés.

- **Tests antifongiques des fractions de X_{1-2}**

L'analyse des tests antifongiques sur la croissance *in vitro* des 3 germes montre dans la majorité des cas une réduction du nombre de colonies dans les tubes expérimentaux par rapport au contenu du tube témoin et cela au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente dans les tubes expérimentaux. L'activité des fractions actives est donc dose-dépendante. Ainsi, certaines de ces fractions (F_1 et F_2) ne présentent aucune inhibition dans la gamme de concentration établie, d'autres montrent une activité inhibitrice nette et effective (F_3 à F_{10}).

Par ailleurs, comparativement aux valeurs de CMF de l'extrait de base X_{1-2} et en fonction de la gamme de concentration, les valeurs de CMF ou de CI_{50} obtenues permettent de regrouper les fractions. Ainsi, on obtient 4 groupes de fraction :

➤ Le groupe G_1 qui concerne les fractions qui n'ont aucune activité inhibitrice nette et effective à la valeur maximale de 500 $\mu\text{g/mL}$. Ce sont les fractions F_1 et F_2 .

➤ Le groupe G_2 , il s'agit des fractions qui inhibent la croissance *in vitro* des 3 germes fongiques et dont les valeurs de CMF sont égales à celles de l'extrait de base X_{1-2} . Ce sont les fractions F_3 et F_4 .

➤ Le groupe G_3 , il s'agit des fractions qui inhibent la croissance *in vitro* des 3 germes fongiques et dont les valeurs de CMF sont supérieures à celles de l'extrait de base X_{1-2} . Ce sont les fractions F_6 , F_7 , F_8 , F_9 et F_{10} .

➤ Le groupe G_4 c'est la fraction qui présente effectivement une activité inhibitrice nette et effective sur la croissance *in vitro* des 3 germes fongiques et dont la valeur de CMF est inférieure à celle de l'extrait de base X_{1-2} . Il s'agit de la fraction F_5 .

De la comparaison des fractions du groupe G_1 entre elles sur la base des valeurs de CI_{50} , il ressort que la fraction la plus active est la fraction F_2 bien que leurs valeurs de CMF ne soient pas déterminées.

Par ailleurs, concernant les fractions du groupe G_2 , les fractions F_3 et F_4 ont les mêmes valeurs de CMF. Mais sur la base des valeurs des CI_{50} , la fraction F_3 est la moins active sur les trois germes fongiques. De plus ces deux fractions sont plus actives que les fractions du groupe G_1 .

Avec les fractions du groupe G_3 , il ressort que les fractions F_6 , F_7 , F_8 , F_9 ont les mêmes activités sur *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. glabrata*, mais F_9 est la plus active sur la base des CI_{50} . Après la fraction F_9 viennent les fractions F_6 , F_7 , F_8 pour *Candida albicans*. Par contre, pour *Candida glabrata* et *Candida tropicalis* viennent après la fraction F_9 , les fractions F_8 , F_6 et F_7 .

De ce groupe l'activité la plus faible est obtenue avec la fraction F_{10} . La comparaison des activités du groupe G_3 avec celles des groupes G_1 et G_2 montre que l'activité des fractions du groupe G_3 est meilleure que celle obtenue avec les fractions du groupe G_1 . Cependant, les fractions du groupe G_3 ont une activité inférieure aux fractions du groupe G_2 .

En ce qui concerne la fraction du groupe G_4 (F_5) l'analyse révèle que cette fraction possède la meilleure valeur de CMF par rapport aux valeurs de CMF obtenues avec les fractions des groupes G_1 , G_2 et G_3 . Par ailleurs, il ressort de la comparaison sur la base des valeurs de CI_{50} que l'activité de la fraction F_5 varie d'un germe à l'autre. Ainsi, la fraction F_5 est plus active sur *C. glabrata* et *C. tropicalis*. De ces deux germes l'activité est meilleure sur *C. glabrata*. Cependant *C. albicans* oppose une résistance à la fraction F_5 par rapport à *C. glabrata* et *C. tropicalis*.

En outre, la fraction F_5 possède une activité 2 fois meilleure que l'activité de l'extrait ayant servi de base à sa préparation (extrait X_{1-2}) et 4 fois meilleure que l'activité de l'extrait total X_0 ayant servi à préparer l'extrait X_{1-2} . Elle est également 8 fois plus active que l'extrait total aqueux X_{Aq} . Ces

résultats révèlent que le fractionnement chromatographique a permis de mieux concentrer les principes actifs contenus dans l'extrait X₁₋₂. L'activité antifongique de l'extrait X₁₋₂ a donc été améliorée de 2 fois. La fraction F₅ a donc la meilleure activité antifongique.

Ces résultats obtenus sont meilleurs que ceux de **Kporou et al. (2010)** avec l'extrait chromatographié F₈ de *Mitracarpus scaber* (CMF = 780 µg/mL) sur la croissance *in vitro* de *C. albicans*. En effet, la fraction F₅ est 12 fois plus active que la fraction F₈ de *Mitracarpus scaber*. Il en est de même de la fraction F₁ de *Morinda morindoides* obtenue par **Bagré (2009)** sur la croissance *in vitro* de *C. albicans* pour laquelle la valeur de CMF est de 780 µg/mL. La fraction F₅ est également 12 fois plus active que la fraction F₁ de *Morinda morindoides*.

En conclusion à cette deuxième partie, il ressort que la chromatographie sur colonne de gel de séphadex G₅₀ a permis d'améliorer considérablement l'activité anticandidosique de l'extrait de base X₁₋₂. Cette méthode a permis d'obtenir la fraction F₅. Elle représente la fraction la plus active.

En effet, sur la croissance *in vitro* de *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis*, la fraction F₅ est 2 fois plus active que les extraits X₁₋₂, X₃₋₂ et X₄₋₂, 4 fois plus active que les extraits X₀ et X₃₋₁, 8 fois plus active que l'extrait X_{Aq} et X₂₋₂, 16 fois plus active que l'extrait X₂₋₁ et X₄₋₁, puis 32 fois plus active que X₁₋₁. Cette activité intéressante des extraits de *Eucalyptus torelliana* F. Muell. confirme l'activité antimicrobienne que possède le genre *Eucalyptus*. Ainsi **Oyedeji et al. (1999)** ont démontré des activités antibactériennes considérables sur les bactéries à gram positif et négatif, et antifongiques sur *Candida albicans* des huiles essentielles de cinq variétés de *Eucalyptus* du Nigéria. **Elaissi et al. (2011)** ont montré que l'huile essentielle de *Eucalyptus odorata* est plus active contre *Staphylococcus aureus*.

Selon **Noumi et al. (2011)** et **Bachir et al. (2012)** l'huile essentielle de *Eucalyptus globulus* a un effet sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et les levures du genre *Candida*. Les travaux de **Dongmo et al. (2010)** ont également mis en évidence l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Eucalyptus camaldulensis* et *Eucalyptus saligna*. **Traoré et al. (2013)** ont réalisé des essais antimicrobiens à partir des huiles essentielles de *Eucalyptus citriodora* et *Eucalyptus houseana*. Quant à **Javad et Atefeh en 2010**, ils ont mis en évidence l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits méthanoliques de *Eucalyptus largiflorens* et *Eucalyptus intertexta*. Par ailleurs, des activités anti-tuberculeux, gastroprotectrices, anti-oxydantes et anti-inflammatoire ont été mises en évidence à partir des feuilles de *Eucalyptus torelliana* F. Muell., de plus aucune activité toxique n'a été révélée après des tests sur des rats (**Farah et al., 2002 ; Adeniyi et al., 2006 ; Lawal et al., 2011 ; Alain et al., 2012 ; Ololade & Olawore, 2013**).

- **Données statistiques**

Pour chaque test réalisé avec les différents isolats, la valeur de CMF reste identique par extrait après répétition des tests. L'analyse des données expérimentales montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les tests. Cette observation a été faite dans les travaux de **Ahon et al. (2012)** et de **Yayé et al. (2012)**. En effet, ces auteurs n'ont obtenu aucune différence significative après analyse statistique des paramètres fongiques respectivement des extraits de *Terminalia superba* et *Terminalia mantaly*. Il en est de même pour **Ackah et al. (2008)**, **Ouattara et al. (2008)**, **kporou et al. (2010)**. Ces auteurs ont travaillé respectivement sur les extraits de *Terminalia cattapa*, *Terminalia ivorensis* et *Mitracarpus scaber*.

- **Tri phyto-chimique**

L'analyse des résultats de cette étude montre que X_{Aq} et X_0 contiendraient les 6 groupes chimiques qui sont les composés terpéniques, les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins galliques, les quinones et les saponosides. Il y a une abondance très marquée de ces 6 groupes chimiques dans l'extrait X_0 . Ce qui expliquerait sa forte activité par rapport à l'extrait X_{Aq} .

Par ailleurs, la suite des résultats révèle que l'extrait X_{1-2} ne contiendrait que 5 groupes chimiques dont les plus abondants seraient les composés phénoliques, les tanins galliques et les terpènes. Quant aux flavonoïdes et aux saponosides, ils seraient en très faibles quantités. Ainsi, les résultats très intéressants des tests antifongiques de l'extrait X_{1-2} sur la croissance *in vitro* des 3 germes fongiques traduisent que l'activité antifongique serait liée aux composés terpéniques et aux composés phénoliques. En effet, selon la littérature, les tanins galliques font partie des composés phénoliques.

Concernant la fraction F_5 , les résultats révèlent qu'elle ne contiendrait que 2 groupes chimiques à savoir les polyphénols et les terpènes. En effet, les tanins galliques présents dans cette fraction font partie du groupe des polyphénols.

Ces résultats font ressortir qu'en passant de l'extrait total aqueux à la fraction F_5 , il y aurait une réduction des composés chimiques (6 à 2). Ainsi, on pourrait envisager que l'activité antifongique de l'extrait F_5 serait liée aux polyphénols et aux terpènes.

- **CPG/SM de F_5**

L'analyse des résultats du CPG/SM de la fraction F_5 montre la présence de composés terpéniques et des composés phénoliques simples qui seraient des composés dérivés de l'hydrolyse de tanins galliques. De plus, la corrélation faite entre le tri phyto-chimique et la CPG/SM, montre que les

composés chimiques mis en évidence dans le tri phyto-chimique sont aussi identifiés dans la CPG/SM et sont en proportion importante.

Par ailleurs, l'activité antimicrobienne des composés terpéniques et des phénols a été révélée. Ainsi, **Ionela et al.** en 2007 puis **Daroui-Mokaddem et al.** en 2010 ont démontré les propriétés antimicrobiennes des composés terpéniques. En effet, leurs actions s'exerceraient sur la membrane cytoplasmique des microbes en provoquant leur lyse. Quant à l'activité antimicrobienne des phénols, elle a été démontrée par **Chung et Wei**, en 2001 et **Peronny**, 2005. Pour **Hamilton-Miller (2001)** les phénols inhiberaient les enzymes glucosyltransférases des microorganismes impliqués dans la cariogenèse. Hormis les dérivés des tanins galliques et les terpènes d'autres composés chimiques (alcools, sucres, hydrocarbures) ont été identifiés mais sont présents sous de traces dans la fraction F₅.

Parmi les molécules identifiées par la CPG/SM bon nombre ont été déjà identifié dans des plantes médicinales à savoir l'acide gallique identifié de *Eucalyptus globulus*, de *Origanum vulgare* et de *Mitracarpus scaber*, quant à l'acide syringique, et l'acide para hydroxyphénylacétique ils ont été identifié respectivement de *Sideritis cretica* (**Sanogo et al.**, 2006 ; **Proestos & Komaitis**, 2013) et de *Dovyalis caffra* (**Loots et al.**, 2006). Concernant le lédane et le 3,5-diméthyl-3-hexanol, ils ont été identifié respectivement de *Eucalyptus torelliana* F. Muell. (**Ololade & Olawore**, 2013) et *Sauropus androgynus* (**Wei et al.**, 2011), par contre le D xylose et le glycérol ont tous deux été identifié de *Potentilla anserina* par **Mari et al.** en 2013. De plus certaines des molécules identifiées de la fraction F₅ ont fait l'objet d'étude d'activité antimicrobienne. Ainsi, **Sanogo et al.** en 2006 ont mis en évidence l'activité antimicrobienne de l'acide gallique contenue dans l'extrait de *Mitracarpus scaber* contre *Staphylococcus aureus*. Cette molécule a été testée sur *Pseudomonas aeruginosa* par **Premkumar et al.** en 2010. Quant à l'acide syringique il a montré une bonne activité antimicrobienne contre *Ganoderma boninense* selon les travaux de **Khim** en 2009. Concernant l'acide beta resorcylique son activité antimicrobienne a été prouvée sur *E. coli* par **Baskaran et al.** en 2013.

II- CONCLUSION

Cette étude s'inscrit dans le programme de recherche de notre laboratoire dont l'objectif est de valoriser les plantes de la médecine traditionnelle ivoirienne. Il s'agit surtout de chercher de nouvelles molécules à partir d'extrait de plantes pouvant servir de nouvelles têtes de séries de médicaments.

Dans ce travail, la plante étudiée est un *Eucalyptus torelliana* F. Muell. à laquelle on accorde des vertus anti-infectieuses en milieu traditionnel. Cette étude confirme le bien fondé de cette assertion. Les résultats de ces investigations ont permis de comprendre que :

- Des 20 extraits testés, vu les gammes de concentration utilisées, 18 extraits ont montré une bonne activité sur les germes de *C. albicans*, de *C. tropicalis* et de *C. glabrata*. Cette activité est dose-dépendante puis varie selon les germes et les extraits.
- Parmi ces 18 extraits actifs, 13 possèdent une activité fongicide et 5 ont une activité fongistatique sur la croissance *in vitro* des 3 germes fongiques.
- De tous ces germes fongiques, le plus sensible est *C. glabrata* et le moins sensible est *C. albicans*. L'espèce *C. tropicalis* a une sensibilité intermédiaire.
- Au niveau des extraits totaux, l'extrait hydroalcoolique X_0 est 2 fois plus actif que l'extrait total aqueux. X_{1-2} est l'extrait le plus actif parmi les 8 extraits obtenus après partition de X_0 et son activité antifongique est 2 fois plus élevée que celle de l'extrait hydroalcoolique.
- Parmi les 10 fractions issues de la chromatographie de X_{1-2} , la fraction F_5 est non seulement l'extrait le plus actif parmi les fractions mais aussi renferme les principes actifs qui sont des terpènes et des dérivés de tanins galliques. Il est 2 fois plus actif que X_{1-2} et 4 fois plus actif que X_0 , l'extrait de base.
- L'obtention de la fraction, la plus active a nécessité la préparation de l'extrait de base, à partir d'un mélange ethanol-eau (70/30 v/v) suivi d'une partition dans la combinaison de solvant hexane-eau, dont l'extrait issu de la phase aqueuse, est chromatographié sur gel de filtration sephadex G_{50} .
- Cette méthode d'extraction a permis d'atteindre notre objectif qui était non seulement d'évaluer mais aussi d'optimiser l'activité antifongique des extraits de *Eucalyptus torelliana* F. Muell. Par ce procédé, la fraction F_5 obtenue a été l'extrait le plus actif. Les propriétés anti-infectieuses accordées à *Eucalyptus torelliana* F. Muell. sont donc justifiées.

En perspective, ces travaux doivent se poursuivre afin d'étudier : la toxicité des extraits, le mécanisme d'action de ces composés chimiques sur la croissance des germes et de réaliser aussi des tests *in vivo*. On pourrait par ailleurs proposer une formulation galénique stable qui peut permettre de mettre au point un Médicament Traditionnellement Amélioré (MTA) pour le traitement des infections.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

-
- Abi-Said D., Anaissie E., Uzun O., Raad H., Pinzcowski H. & Vartivarian S., 1997.** The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *CID*, 24: 1122-1128.
- Ackah J. A. A. B., 2004.** Spectre anti-infectieux de MISCA-F₃ sur la croissance *in vitro* *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus*. Mémoire DEA Biotechnologie et Sciences des aliments option pharmacologie des substances naturelles, Université de Cocody-Abidjan, UFR Biosciences, Côte d'Ivoire. 34p.
- Ackah A. J., Kra, A. M., Zirihi, G. N. & Guédé-Guina F., 2008.** Evaluation of the antifungal activity of TEKAM, évaluation de l'activité antifongique de tekam, un extrait de plante, sur la croissance *in vitro* de *candida albicans* *R Ivoir Sci Technol*, 11 : 119 -129.
- Ackah J. A. A. B., 2009.** Evaluation et essai d'optimisation de l'activité antifongique de *Terminalia catappa* Lin, une combretacea de la pharmacopée ivoirienne sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*, *candida albicans* et *Trichophyton mentagrophytes*. Thèse Unique. UFR Biosciences. Univ. de Cocody-Abidjan (C. I), N° ordre 625/2009. 238 p.
- Ackah J. A. A. B., Kokora P. A., Yayé Y.G., Bahi C., Loukou Y. G., Coulibaly A., Djaman A. J., 2014.** Action spectrum of *Terminalia mentaly* on the *in vitro* growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *IJ PRS*, 3: 795-800.
- Adeniyi B. A., Odufowoke, R. O. & Olaleye S. B., 2006.** Antibacterial and Gastroprotective Properties of *Eucalyptus torelliana* (Myrtaceae) crude Extracts. *International Journal of Pharmacology*, 2: 362-365.
- Adeniyi B. A., Lawal T. O. & Mahady G. B. 2009:** *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus torelliana* . *Pharm Biol*. 47: 99–102.
- Adou K., Edi K. A., Mahan E. & Diahussie K. A., 2000.** Synthèse des réalisations dans les sites expérimentaux de l'ex IDFOR/DFO, Abidjan, Cote D'Ivoire, 99p.
- Agoumi A., El-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 Méd*, 7:1-6.
-

-
- Ahmad S., Khan Z., Mustafa A.S. & Khan Z. U., 2002.** Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J C M*; 40: 2483–2489.
- 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. & Djaman A. J. 2012.** Improvement of the antifungal activity of the hydro-alcoholic extract of *terminalia superba* on the *in vitro* growth of three pathogenic fungi. *IJBPAS*, 1: 1434-1442.
- Alain A. G., Felicien A., Boniface Y., Alain K. Y., Chantal M. & Dominique S., 2012.** Chemical and Biological Investigation of leaves of *Eucalyptus Torelliana* Essential oils from Benin. *Intl Res J of Biol Sci*, 1: 6-12.
- Alanio A. & Bretagne S., 2010.** Antifungal microbiological resistance of *Aspergillus*: From identification to mutation sequencing. *JA* 12: 114–119.
- Ali-Emmanuel N., Moudachirou M., Akakpo A. J. & Quetin-Leclercq J., 2002.** Activités antibactériennes *in vitro* de *Cassia alata*, *Lantana camara* et *Mitracarpus scaber* sur *Dermatophilus congolensis* isolé au Bénin. *Rev Élev Méd vét.* 55: 183-187.
- Ann O., 1982.** Maladies parasitaires et fongiques. Ed C et R, Paris, France, 305 p.
- Antonopoulou, S., Aoun, M., Alexopoulos, E. C., Baka, S., Logothetis, E., Kalambokas, T., Zannos, A., Papadias, K., Grigoriou, O., Kouskouni E. & Velegraki A., 2009.** Fenticonazole activity measured by the methods of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and CLSI against 260 *Candida* vulvovaginitis isolates from two European regions and annotations on the prevalent genotypes. *AAC*. 53, 2181–2184.
- Aquaron M., 2005.** Conférence- relation entre les hommes et les plantes, Conférence du 18/08/2005 Les Causeries en Montagne, Sabenca de la Valéia, Barcelonnette. 5 p.
- Avni T, Leibovici L & Paul M. 2011.** PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J C M*; 49:665–670.
- Bachir R.G. & Benali M. 2012.** Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2: 739-742.
-

-
- Badillet G., 1991.** Dermatophyties et dermatophytes. 3ème Ed. *Varia*, Amsterdam, Hollande. 303 p.
- Bagre I., 2004.** Spectre anti-infectieux de BGG, une substance antidiarrhéique de source naturelle. Mémoire DEA. Biotechnologie, Univ. de Cocody-Abidjan. Côte d'Ivoire. 29 p.
- Bagre I., 2009.** Identification de substance antifongique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redhead (*Rubiaceae*), une chromatographie prospective et activité anti-infectieuse sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*, de *Candida albicans* et de *Cryptococcus neoformans*, Trois germes de grande contagiosité. Thèse de Doctorat d'Université. UFR Biosciences. Université de Cocody Abidjan Côte d'Ivoire, 168 p. N° d'ordre : 598/2009.
- Banerjee S. N., Emori T. G., Culver D. H., Gaynes R. P., Jarvis W. R. & Horan T., 1991.** Secular trends in nosocomial primary blood stream infections in the United States. *Am J Med*, 91:86S–89S.
- Bar-Hen A., Mariadassou M., Poursat M.A. & Vandenkoornhuyse P., 2008.** Influence function for robust phylogenetic reconstructions. *Mol Bio Evol.* 25:869-873.
- Barker J. J., 2006.** Antibacterial drug discovery and structure-based design. *Drug Discov Today*, 11: 391-404.
- Bartoli J., Turmo, E., Alguero, M., Boncompte, E., Vericat, M., Conte, L., Ramis, J., Merlos, M., Garcia-Rafanell J. F. & Orn, J., 1998.** New azole antifungals. 3. Synthesis and antifungal activity of 3-substituted-4(3H)-quinazolinone derivatives of 3-amino-2-aryl-1-azolyl-2-butanol. *J M C.*, 41: 1869-1882.
- Baskaran A. S., Varunkumar B., Indu U., Abhinav U., Anup K-J, David S. J., Venkitanarayanan & Kumar V., 2013.** Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on Cattle Hides by Caprylic Acid and β -Resorcylic Acid. *J F P*, 5: 318-322.
- Beck-Sague C. M. & Jarvis T. R., 1993.** Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States. *J Infect Dis*, 167:1247–1251.
- Ben A. B., 2008.** Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs: Texturation par détente instantanée contrôlée (DIC). Thèse de doctorat. Université de La Rochelle. UFR des Sciences. 207p.
-

-
- Benoit-Vical, 2005.** Ethnomedecine in malaria treatment. *IDrugs*, 8: 45-52.
- Bergquist R., 2006.** Editor in chief of an international scientific journal of the Global Network for Geospatial Health. *Geo Hea*, 1: 1-2.
- Blot S., Vandewoude K., Hoste E., Poelaert J. & Colardin F., 2001.** Outcome in critically ill patients with candidal fungaemia: *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *J Hosp Infect*, 47:308-313.
- Boiron P., 1996.** Organisation et biologie des champignons. *Collection 128, Edition Nathan*. Paris, France. 126p.
- Bon M., 2004.** Champignons de France et d'Europe occidentale. Flammarion, Paris, France. 2004. 368p.
- Bonga G. M., Vangah-Manda M., De Souza C. & Guédé- Guina F., 1996.** Mise en évidence de phytostéroïdes antifongiques contre *Cryptococcus neoformans*. *Rev Méd et de Pharma Afr*, 9: 21 - 28.
- Bonnin A., 2012.** Transition commensal-pathogène au cours des candidoses invasives à *Candida albicans*: approches moléculaires et cellulaires. *Acad Natle Méd*, 196: 139-149
- Bouchet P., Regis P., Crugnard J. L. & Madulo-Leblond G., 1989.** Mycologie générale et médicale. *Ed. Masson*, Paris, France. 180p.
- Bouquet A. & Debray M., 1974:** Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire, imprimerie Louis Jean, Paris (France) 232pp.
- Bouza E. & Munoz P., 2008.** Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int J Antimicrob Agents*, 32 : 87-91.
- Bowman W. C. & Rand M. J., 1980.** Textbook of pharmacology. 2nd Ed. Blackwell scientific publication, Oxford, England. 150 p.
- Bryskier A., 1999.** Cibles antifongiques et recherche en antifongiques. In Antibiotiques, Agents antibactériens et Antifongiques. Bryskier A, Ellipses, Paris. 1104-1132 pp.
- Bustamante J., N. Mahlaoui N., Casanova J.-L., Blanche S. 2011 :** Infections fongiques et déficits immunitaires héréditaires. *Arch Pédiat*, 18 : S8-S14
-

-
- Calderone R. A., 2002.** Introduction and historical perspectives. In: Calderone RA (ed) *Candida and candidiasis*. ASM Press, Washington D.C.: 15–25pp.
- Cavalli J-F., 2002.** Caractérisation par CPG/IK; CPG/SM et RMN du carbone-13 des Huiles essentielles de Madagascar. Thèse doctorat de l'université de Corse Pascal Paoli (France), 230p.
- Chaaib K. 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. Univ. de Lausanne. Suisse 211 p.
- Chabasse D., Guiguen C. & Contet-Audonneau N., 1999:** Mycologie médicale. Masson, Paris , France 324 p.
- Chabasse D., Contet-audonneau N., Bouchara J-P., Basile A-M., 2008.** Du prélèvement au diagnostic. Eds Biomérieux, Paris, France, 189p.
- Chabasse D., M. Pilet & J.-P. Bouchara, 2009.** Emergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine. *R F L* Vol., 2009 ; Issue 416 : 71-86.
- Charles D., Loulerque P., Viard J.P., Drauer F. & Lortholary O., 2007.** Infections fongiques au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. *Elsevier Masson Consulte*, Paris, France. 8-002-C-10. 5 p.
- Charles P. E., Dalle F. & Aube H., 2005.** *Candida spp.* colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study. *Int Care Med*; 31: 393-400.
- Choi H. J., Kim J.-H., Lee C-H., Ahn Y. J., Song J.-H., Baek S.-H. & Kwon D.-H., 2009.** Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. *Antiviral Res*, 81: 77-81.
- Chouvalova E., 1984.** Les maladies tropicales. *Ed. Mir-Moscou*, Russie. 194 p.
- Chung K-T & Wei C-I., 2001.** Are tannins a double edged sword in biology and health? *Tr in Food Sci and Techn*, 9 : 168-175.
-

-
- Cimanga K., Yink L., De Bruyne T., Apers S., Cas P., Hermans N., Bakana P., Tona L., Kamby K., Kalenda D.T., Pieters L., Vanden Berghe D. & Vlietinck A.J., 2000:** Radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity of phenolic compounds from *Bridelia ferruginea* stem bark. *J. Pharm. Pharmacol.*, 53: 757-761.
- Coffi K., Koné S., Ramiarantsoa H., Tue Bi B., Chalchat J. C., Chalard P., Figueredo G., & Ahibo-Coffy A., 2012 :** Monoterpene hydrocarbons, major components of the dried leaves essential oils of five species of the genus *Eucalyptus* from Côte d'Ivoire. *Natural Science* 4: 106-111.
- Cole G. T., Seshan K. R., Phaneuf M. & Lynn K. T., 1991.** Chlamydospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice. *Can J Microbiol*, 37: 637-646.
- Courtecuisse R. & Duhem B., 2000.** Guide des champignons de France et d'Europe (Delachaux & Niestlé, 1994-2000). 476p.
- Cowan M. M., 1999.** Plant products as Antimicrobial Agents. *Cl.Microbio. Rev.*, 12: 564-582.
- Dannaou E. 2013.** Résistance des *Candida* aux antifongiques : détection et mécanismes. *R F L Vol.* 2013, Issue 450, 71–77.
- Daroui-Mokaddem H.-M., Ahmed K., Mabrouka B., Boudjemaa S., Aida E. A., Christian B. & Zahia K., 2010.** GC/MS Analysis and antimicrobial activity of the essential oil of fresh leaves of *Eucalyptus globulus*, and leaves and stems of *Smyrniololus* from Contantine (Algeria). *Nat Prod commun.*, 5: 1669-1672.
- Daroui-Mokaddem H. 2012.** Etude phytochimique et biologique des espèces *Eucalyptus globulus* (myrtaceae), *Smyrniololus* (apiaceae), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* (asteraceae). Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba Algérie, 198p.
- Datry A & Ingibjorg. H. D., 1993.** Les mycoses superficielles. Dermatologie Tropicale. AUPELF-UREF, Paris, France. 290 p.
- David M., 2003 :** Fungal Morphogenesis, volume 35, Cambridge University Press, USA, 469p
-

-
- Del Rosso J. Q., 1996.** Treatment of onychomycosis and tinea pedis with intermittent itraconazole therapy. *J Am Osteop Assoc*, 96: 607-609.
- Denis B. & Lortholary O., 2013.** Infections fongiques pulmonaires chez les patients séropositifs pour le VIH. *Rev Mal Resp*, 30: 682–695.
- Develoux M., Dieng M. T., Kane A. & N'diaye B. 2003.** Prise en charge des mycétomes en Afrique de l'ouest. *Bul. de la Soc.de Path Exo*, 96: 376 - 382.
- Develoux M. & Bretagne S., 2005.** Candidoses et levures diverses. *Elsevier Masson Consulte*, Paris France, 8-062-A-10, 5 p.
- Diallo D., 2000.** Ethnopharmacological survey of medicinale plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (Mimosaceae), *Trichilia emetica* (Meliaceae). Thèse doctorat, Lausanne, Suisse, 221 p.
- Diallo A., 2005.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (Myrtaceae). Thèse de Pharmacie. Faculté de Medecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'Université de Bamako (Mali). 100 p.
- 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. & 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.
- Djaman A. J., Dje K. M. & Guédé-Guina F., 1997.** Evaluation d'une action antiplasmodiale de *Olex subscorpioides* sur les souches chloroquino résistantes de *P. falciparum*. *Rev de Med Et Pharm Afric*, 11-12, 177-183.
- Djoukeng J. D., 2005.** Etude phytochimique et activités biologiques de quatre espèces Camerounaises de la famille des Myrtaceae: *Eucalyptus saligna* Sm., *Callistemon viminalis* W., *Syzygium guineense* W. et *Syzygium aromaticum* M. et P. Thèse. Faculté des sciences. Université de Neuchâtel (Suisse).218p.
- Dongmo B. N. ,Dongmo P. M. J., Ngoune L. T., Kwazou N. L., Zollo P. H. A. & Menut C. 2010.** Antifungal Activities of Essential Oils of some Cameroonian Myrtaceae on *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. *Asian J Exp Biol Sci*, 1: 907-914.
-

-
- Dromer F. & Dupont B., 1996.** The increasing problem of fungal infections in the immunocompromised host. *J M M*, 6: 1-6.
- Dupont B., 1992.** Les candidoses. *La let del' ifec*, 3: 20 - 28.
- Dupont B., Improvisi L. & Dromer I., 1997.** Facteurs d'échec clinique du traitement des candidoses oropharyngées au cours du SIDA. *La let de l'ifec*, 8 : 23 - 30.
- Dupont B., 2002.** Maladies infectieuses. *Elsevier Masson Consulte*, Paris, France, 8-607-A-15. 5 p.
- EdwardS J. E., 1991.** Invasive *Candida* infections. Evolution of a fungal pathogen. *N. Engl J Med*, 324: 1060 - 1062.
- Eggiman P. H. & Pittet D., 2000.** Candidoses invasives en réanimation. *Sch Med Woch*, 130: 1525 - 1537.
- Eggimann P., Garbino J. & Pittet D., 2003.** Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*; 3: 685-702.
- Elaissi A., Salah K. H., Mabrouk S., Larbi K. M., Chemli R. & Harzallah-Skhiri F. 2011.** Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species' essential oils. *Food Chemistry*, 129: 1427–1434.
- Elujoba A. A., Odeleye O. M. & Ogunyemi C. M., 2005.** Traditional medicine development for medical and dental primary health care delivery system in Africa. *Afr J Trad*, 2: 46-61.
- Eldridge K., Davidson J., Harwood C. & Vanwyck G., 1993.** Eucalypt domestication and breeding. Clarendon Press, Oxford, 288p.
- Enerst E. J. & Rogers D. P., 2005.** Antifungal agents: methods and protocols. Totowa, N.J.: Humana Press, 2005. Collection: Methods in molecular medecine, 118p.
- Fabre M.C., Genin A., Merigoux J. & Moget E. 1992.** Herboristerie Familiale, 103p.
- Farah A., Fechtal M., Chouch A. & Zarira S., 2002.** The essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* and its natural hybrid (clone 583) from Morocco, *Flav Fragr J* 17, 395-397.
- Feuilhade De Chauvin M., 1998.** Mycoses métropolitaines. *Elsevier Masson Consulte*, Paris, France, 12-320-A-10. 5p.
-

-
- Fézan H., Tra Bi, N'guessan F.K., Anne F. & Karim F. 2007.** Antifungal activity of some plants of the Ivorian flora. *Sci & Nat*, 4: 117-122.
- Flannigan B., Morey P., Broadbent C., Brown S. K., Follin T., Kelly K. M., Miller J. D., Nathanson T., Walkinshaw D. S. & White W. C., 1996.** ISIAQ Guideline, Task force I: Control of moisture problems affecting biological indoor air quality. International Society of Indoor Air Quality and Climate, Ottawa, 1996.
- Fournier P. 2011.** Impact de la consommation d'antifongiques sur *Candida sp.* Etude dans un service de réanimation médicale de 2004 à 2009 au CHU de Grenoble. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, UFR de Pharmacie de Grenoble, France, 93p.
- Fyhrquist P., 2007.** Traditional medicinal uses and biological activities of some plant extracts of African *Combretum Loeft.*, *Terminalia L.* and *Pteleopsis Engl.* Species (Combretaceae). Thèse. University Main Building, Unioninkatu 34, Helsinki 2007. 183p.
- Ganapaty S., Pannakal S.T., Srilakshmi G.V.K., Lakshmi P., Waterman P.G. & Brun R., 2008.** Pumilanol, an antiprotozoal isoflavanol from *Tephrosia pumila*. *Phyto Let*, 1: 175-178.
- Gentilini M., Caumes E., Danis M., Mouchet J., Duflo B., Lagardiere B., Dominique R. L. & Brucker G., 1993.** Médecine tropicale. Ed. Flammarion Médecine Sciences, Paris, France. 928 p.
- Georgopapadakou N. H. & Walsh T. J., 1996.** Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Ag. Chemother*; 40: 279-291.
- Goel N., Ranjan P. K., Aggarwal R., Chaudhary U. & Sanjeev N., 2009.** Emergence of non *albicans Candida* in neonatal septicemia and antifungal susceptibility: experience from a tertiary care center. *J Lab Physicians*, 1: 53-55.
- Gonzalez A. G. & Estevez-Braun A., 1997.** Coumarins, *Nat Prod Reprod*, 14: 465-475.
- Grassmann J. & Hippeli S., 2000.** Antioxidant properties of essential oils. Possible explanations for their anti-inflammatory effects. *Arzneimittelforschung Feb*; 50:135-139.
- Greenberg S. & Frishman W. H., 1990:** Coenzyme Q10: a new drug for cardiovascular disease. *J Clin Pharmacol*, 30: 596-608.
-

-
- Grillot R & Lebeau B., 1999.** Antifongiques systémiques. In Antibiotiques, Agents antibactériens et Antifongiques, Bryskier A, 1104-1132pp.
- Guarro J., Gené J. & Stchigel A. M., 1999.** Developments in Fungal Taxonomy. *J C M*, 12: 454-500.
- Guédé-Guina F., Berrebi-Bertrand I., Smith M. O. & Ochillo R. F., 1991.** Pharmacological characterization of novel ouabain analog from *Mansonia altissima*. "Proceeding of word first congress on cell and Mol. Bio. " by Peters press, Bondgoetenlan 153, B-300, leuven, Belgium.
- Guédé-Guina F., Vangah-Manda M., Bonga G. M. & De Souza C., 1996.** Activité antimicrobienne d'un extrait végétal contre les germes opportunistes au cours du SIDA. *Rev Méd et Pharm Afric* 9: 13-19.
- Guédé-Guina F.; Kra., Vangah-Manda M. Bonga G. M. & 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. Bioméd.*, 2: 11-16.
- Guelzim K., Limimouni B., Kouach J., El-Mellouki W. & El-Fihri H S., 2004.** Epidémiologie des candidoses vaginales à Mitrovica. *RISSFA*, 77: 261 - 266.
- Gurbuz I., Yesilada E. & Ito S., 2009.** An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. *J Ethnopharm*, 121: 360-365.
- Hamilton-Miller J.M. 2001 :** Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J M M*. 50: 299-302.
- Handa S. S., Rakesh D. D. & Vasisht K., 2006.** Compendium of Medicinal and Aromatic Plants ASIA. Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies ICS-UNIDO, AREA Science Park.
- Harborne, J. B. 1991:** Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. London: Chapman and Hall. 228p.
- Hayden T., 2008:** "Getting to know nutraceuticals." *Scientific American*. 3 Janvier.
-

-
- Hawksworth D. L. & Rossman A. Y., 1997.** Where are all the undescribed fungi? *Phytopat*, 87: 888-891.
- Hawksworth D. L., 2001.** The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycoll Res*, 105: 1422-1432.
- Henke H., 1995.** Preparative gel chromatography on sephadex LH-20. Heidelberg: Huthig, Chromatography methods. ISBN 3-7785-2428-3. p.89-135.
- Helgason T., Daniell T. J., Husband R., Fitter A. H. & Young J. P. W., 1998.** Ploughing up the wood-wide web? *Nat*, 394: 431.
- Herbaud S., Vouriot J., Berle M. & Paillaud E., 2007.** Candidoses orales chez les personnes âgées hospitalisées : fréquence, facteurs de risque et prévention. *Hyg*, 15: 385 -389.
- Hibbet D. S. & Donoghue M. J., 2001.** Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in homobasidiomycetes. *Syst Biol*, 50: 215-242.
- Hirata T., Fujii M., Akita K., Yanaka N., Ogawa K., Kuroyanagi M. & Hongo D., 2009.** Identification and physiological evaluation of the components from *Citrus* fruits as potential drugs for anti-corpulence and anticancer. *Bioorg Med Chem.*, 17: 25-28.
- Ho S. H., Cheng L. P. L., Sim K. Y. & Tan W. T. H. 1994.** Potential of cloves (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry as a grain protectant against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Posth Bio Techn* 4: 179-183.
- Horn D. I., Neofytos D & Anaissie E. J., 2009.** Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *C I D*; 48: 1695-1703.
- Huq F. & L. N. Misra L. N., 1997.** An alkenol and C-methylated flavones from *Callistemon lanceolatus* leaves. *Planta Medica* 63: 369-370.
- Igor Passi L. B., 2002.** Etude des activités biologique de *Fagara zanthoxyloïdes*, lam (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Bamako Mali, 133p.
-

-
- Ignat I., Volf I. & Popa I. V., 2011.** A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *J Foodchem*. 126: 1821-1835.
- Ionela D. C. & Ion I. B., 2007.** Plant products as antimicrobial agents. *Analele Științifice ale Universității Alexandru Ioan Cuza*”, *Sect Gene și Biol Mol*, TOM VIII, 151-156.
- Jacobs M. R., 1982.** Les *Eucalyptus* dans les reboisements. Collection FAO, Forêts, N°11, 724p
- James T. Y, Porter D., Leander C. A., Vilgalys R. & Longcore J. E., 2000.** Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. *Can J Bot*, 78: 336-350.
- Javad S-G. & Atefeh A. A., 2010.** Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. *Pharmacogn Mag*, 6: 172-175.
- Jennings D.H. & Lysek G., 1996.** Fungal biology. 2e syn. understanding the fungal lifestyle. BIOS Scientific publishers Ltd., UK, 166 p.
- Jepson R. G. & Craig J. C., 2007.** A systematic review of the evidence for cranberries and blueberries in UTI prevention. *Mol Nutr Food Res*, 51: 738-745.
- Joffin J. N., 2003.** Cours de mycologie. 1ère année BTS ABM, Lycée Paul Eluard St Denis, France. 109 p.
- Johnson E. R., Ojwang J.O., Szekely A., Wallace T.L. & Warnock D.W., 1998.** Comparaison of *in vitro* of antifungal activities of free and liposomeencaphsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. *Antimicrob Agents chemother*, 42: 1412 -1416.
- Juyal D., Munseh S., Shekhar P., Vyas K. R. & Neelam S., 2013.** Emergence of non *albicans* *Candida* species in neonatal candidemia. *J Med Sci*, 5: 541-549.
- Kanta F.B., 2000.** Etude de l’activité anticandidosique de certaines plantes médicinales maliennes sur *Candida albicans*. Thèse pharmacie, Bamako, 81 p.
- Khim Phin Chong, 2009.** *In Vitro* Antimicrobial Activity and Fungitoxicity of Syringic Acid, Caffeic Acid and 4-hydroxybenzoic Acid against *Ganoderma Boninense*. *JAS*, 1: 15-20.
-

-
- Kinsman O. S., Pitblado K. & Coson C. J., 1988.** Effect of mammalian steroid hormones and luteinizing hormone on the germination of *Candida albicans* and implications from vaginal candidosis. *Mycoses*, 31: 617-626.
- Kirk P. M., Cannon P.F. & David J.C., 2001.** Dictionary of the fungi, 9th ed., *Egham U.K., CAB Ed.*, 2001, 655 p.
- Koenig H., 1995.** Guide de mycologie médicale. Ellipses, 284 p.
- Kokora P. A., Ackah J. A. A. B ; Nangah Z. Y., Kra A. M., Loukou Y. G., Coulibaly A., & Djaman A. J., 2013.** Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of four medecinal plant on the *in vitro* growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *JDDT*, 3: 113-116.
- Kouakou A. V., N'guessan J. D., Kra A. K. M. & Guede-Guina F. 2007.** Activité antifongique et screening phytochimique de THOS (extrait aqueux de *Thonningia sanguinea*). *Rev de Méd et de Pharma Afr.*, 20 : 45 - 52.
- 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.
- Kourkoumpetis T. K., Velmahos G. C. & Ziakas P. D., 2011.** The effect of cumulative length of hospital stay on the antifungal resistance of *Candida* strains isolated from critically ill surgical patients. *Mycopath*, 171: 85-91.
- Kporou K. E., Kra Adou K. M., Ouattara S., Guédé-Guina F. & Djaman A. J., 2009.** Evaluation de l'activité antifongique de *mitracarpus scaber* sur *candida tropicalis*. *j. sci. pharm biol*, 10: 13-20.
- Kporou K. E., Kra A. K. M., Ouattara S., Guédé-Guina. & Djaman A. J., 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*. *Phytotheurapie*, 8 : 290-294.
- Kra A. K. M., 1997.** Evaluation des effets d'un nouvel anti- aspergillaire de source naturelle. DEA, Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire 30 p.
-

-
- 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 Abidjan, Côte d'Ivoire 126 p.
- Kra A. K. M., Zirihi Guede N. & Guédé-Guina F., 2003.** Evaluation et comparaison des activités antifongiques de *Fagara macrophylla* et de *Strychnos spinosa* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Afr biomed*, 7: 23-27.
- Krawczyk B., Leibner-Ciszak J., Mielech A., Nowak, M. & Kur J., 2009.** PCR melting profile (PCR MP) – a new tool for differentiation of *Candida albicans* strains. *BMC Infect Dis*, 9: 177-184.
- Küpper F.C., Maier I., Müller D.T., Loiseaux-De Goer S. & Guillou L., 2006.** Phylogenetic affinities of two eukaryotic pathogens of marine macroalgae, *Eurychasma dicksonii* (Wright) Magnus and *Chytridium polysiphoniae* Cohn. *CRYPTOGAMIE ALGOL*, 27: 165-184.
- Lacroix C., Dubach M. & Feuilhade M., 2003.** Les échinocandines : une nouvelle classe d'antifongiques. *MED MALADIES INFECT*, 33: 183-191.
- 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. 39 p.
- Lagnika L., 2005.** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de Doctorat pharm. Université Louis Pasteur de Strasbourg /Université d'Abomey-calavi, Bénin. 268 p.
- Lawal, T. O., Adeniyi B. A., Idowu O. S. & Moody J. O., 2011.** In vitro activities of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. and *Eucalyptus torelliana* F. Muell. against non-tuberculous mycobacteria species. *Afr J of Microb Res*, 5: 3652-3657.
- Le Calvez T., 2009.** Diversité et fonctions écologiques des champignons en écosystème hydrothermal marin profond. Thèse N°ordre : 3899. Université de Rennes 1/CNRS. 270 p.
-

-
- Léon E. M., Jacober S. J., Sobel J. D., & Foxman B., 2002.** Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. *BMC Infect Dis*, 2: 1-6.
- Levine S. G., 1990.** Identification of Unknowns by Melting Point and Thin-Layer Chromatography in Combination. *J Chem Ed*, 67, 972p.
- Liu H., 2011.** "Extraction and Isolation of compounds from Herbal Medicines" in Traditional Herbal Medicine Research Methods ed by willow JH Liu 2011 John Wiley and Sons, inc.
- Longcore J. E., Pessier A. P. & Nichols D. K., 1999.** Batrachochytrium dendrobatidis gene et a chytrid patogenic to amphobians. *Mycologia.sp.* 91: 219-227.
- Loots D. J., Westhuizen F. H. & Jerling J. 2006.** Polyphenol composition and antioxidant activity of kei apple (*Dovyalis caffra*) juice. *J agric food chem.*, 54: 1271-1276.
- Lortholary O. 2004.** Associations d'antifongiques. Conférence de consensus commune SFAR, SPILF, SRLF. Ann Fr Anesth Reanim numéro spécial: 60-70pp.
- Lucienne A. D., 2010.** Les plantes médicinales d'Algérie. 2^{ème} Edition Berti. 20-26 pp.
- Mari A., Lyon D., Fragner L., Montoro P., Piacente S., Wienkoop S., Egelhofer V. & Weckwerth W. 2013.** Phytochemical composition of *Potentilla anserina* L. analyzed by an integrative GC-MS and LC-MS metabolomics platform. *Metabolomics*, 9: 599-607.
- Martin M. V., 1999.** The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. *J Antimicrob Chemother*, 44: 429-437.
- Martine J., 2007.** Cours de mycologie 2^{ème} année BTS ABM. Lycée Paul Eluard St Denis, France. 53p.
- Marty P., Brun S. & Gari-Toussaint M., 2000:** Les mycoses profondes tropicales. *Med Trop*, 60: 288-290.
- Mc Calley D. V., 2002.** Analysis of the *Cinchona* alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. *J Chromatogr.A*, 967: 1-19.
-

-
- Mc Cullough M. J., Ross B. C. & Reade P. C., 1996.** *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *IAOMS*, 25: 136-144.
- Millon L., 2006.** Traitement des mycoses invasives. DIU chimiothérapie anti-infectieuse, décembre 2006. 5 diapositifs.
- Mimoz O. & Bicetre D. A. R., 2000.** Traitements antifongiques ; Hôpital Paul Brousse, 94804 Villejuif, 2000. 733-742pp.
- Moen M. D., Lyseng-Williamson K. A. & Scott L. J., 2009.** liposomal amphotericine b: a review of its use as empirical therapy in fertile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs*, 69: 361-392.
- Mogode D. J., 2005.** Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpiniaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. Thèse Pharmacie. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie. Université. de Bamako, Mali. 166p.
- Mostafa K. M., Sherief I. K. , Alaa El-Gindy & Kamilia A. T., 2005.** HPLC determination of certain flavonoids and terpene lactones in selected *Ginkgo biloba* L. phytopharmaceuticals. *II Farmaco*, 60:583–590.
- Müller G. M. & Schmit J. P., 2007.** Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodivers Conserv*, 16: 1-5.
- Muller H., Hennequin C., Gallaud J., Dujon B. & Fairhead C., 2008.** The Asexual Yeast *Candida glabrata* Maintains Distinct α and α Haploid Mating Types. *American Society Microbiol*, 7: 848-858.
- N'guessan K., 1995.** Contribution à l'étude ethnobotanique chez les krobou de la sous-préfecture d'Agboville (C.I). Thèse de Doctorat 3^e cycle. UFR Biosciences. Université de Cocody Abidjan Côte d'Ivoire, 557 p.
- Nacoulma Née Ouédraogo 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.
-

-
- Nait A. K. 2012.** Etude de la composition chimique de des essences de quatre espèces d'*Eucalyptus* poussant dans la region de Tizi Ouzou (Algerie). Mémoire de Magister specialité chimie. Departement de chimie. Université Mouloud Mameri Tizi Ouzou (Algérie), 125p.
- Neofytos D., Fishman J. A., Horn D., Anaisse E., Chang C. H., Olyaei A., Pfaller M., Steinbach W. J., Webster K.M. & Marr K. A., 2010.** Epidemiology and out come of invasive infectinons in solid organ transplant recipients. *Tranplt infect dis*, 12: 220-229.
- Nikiema J. B. ; 1997.** Contribution à l'étude phytochimique et pharmacologique de *Leptadenia hastata* (Asclepiadaceae). Thèse de pharmacie, Université libre de Bruxelles, Belgique. 125p.
- Nolard N., Beguin H., Vervloet D. & Magnan A., 2003.** Moisissures. Traité d'allergologie, Flammarion, Paris, France, 441- 461pp.
- Noss A., 1999.** Therapeutic approach to the patient with candidemia. *Clin Microbiol Infect*, 5: 51-57.
- Noumi E., Snoussi M., Hajlaoui H., Trabelsi N., Ksouri R., Valentin E. & Bakhrouf A., 2011** :Chemical composition, antioxidant and antifungal potential of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) and *Eucalyptus globulus* essential oils against oral *Candida* species. *J Med Plants Res*, 5: 4147- 4156.
- Nowakowska Z., 2007.** Mini-review, A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Euro J Med Chem*, 42: 125 -137.
- Oberoi J. K., Wattal C., Goel N., Raveendran R., Datta S. & Prasad K., 2012.** Non *albicans* *Candida* species in blood steam infections in a tertiary care hospital at new Delhi, *Indian J Med Res*, 136: 997-1003.
- Odds, J. C. 1988.** *Candida and candidosis* .A Review and Bibliography. 2nd Ed. Balliere Tindall, London, England. 30p.
- Odds F., Sackin M. & Jones D., 1990.** Numerical taxonomic analysis of imperfect yeast species in *Candida* and *Torulopsis* shows no basis for generic separation. *J Gen Microbiol* 136: 761-765.
-

-
- Odds F., Rinaldi M., Cooper C. J., Fothergill A., Pasarell L. & McGinnis M. 1997.** Candida and Torulopsis: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. *J C M*, 35: 313-316.
- Okunade A., Clark A. M., Hufford C. D. & Oguntimein B. O., 1999.** Azaanthraquinone, an antimicrobial alkaloid from *Mitracarpus scaber*. *J Pharma Sci*, 65: 447-448.
- Ololade Z. S. & Olawore N. O., 2013.** Chemistry and Medicinal Potentials of the Seed Essential Oil of *Eucalyptus toreliana* F. Muell Grown in Nigeria. *Global J Sci Frontier Research*, 13: 1-9.
- OMS, 2003.** Stratégie pour la médecine traditionnelle. Publication OMS. 61p
- Opik M., Moora M., Zobel M., Saks U. Wheatley R., Wright F. & Daniell T., 2008.** High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich coniferous forest. *New Phyto*, 179: 867-876.
- Ouattara S., Mathieu K. A., Kporou K. E. & Guédé-Guina F., 2008.** Evaluation de l'activité antifongique des extraits de *terminalia ivorensis* (tekam 2) sur la croissance *in vitro* de *candida albicans* Rev. Ivoir. Sci. Technol., 12: 205-214.
- Oyediji A. O., Ekundayo O., Olawore O. N., Adenivi B. A. & Koenig W. A., 1999.** Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. *Fitoterapia*, 70: 526-528.
- Padilla E., Ruiz E., Redondo S., Gordillo-Moscoso A., Slowing K. & Tejerina T., 2005.** Relationship between vasodilation capacity and phenolic content of Spanish wines. *J Pharma*, 517: 84-91.
- Pascual-Teresa S., Moreno D., García-Viguera C., 2010.** Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence. *INT J MOL SCI*, 11: 1679-1703.
- Peman J & Zaragoza R. 2010.** Current diagnostic approaches to invasive candidiasis in critical care settings. *Myc*; 53: 424-433.
- Perbet C., 1999.** Les infections mycotiques. *Schweizerische medizinische wochenschrift*, 125 : 1123-1129.
-

-
- Peronny S. 2005.** La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta).Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle .Discipline Eco-Ethologie .151p.
- Peter H. R., Ray F. E. & Susan E. E., 2003.** Biologie Végétale, De Boeck Université, 2003, 968p.
- Pfaller M. A. & Diekema D. J., 2007.** Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, 20: 133–163.
- Pfaller M. A., Diekema D. J & Gibbs D. L., 2010.** Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J C M*; 48: 1366-1377.
- Pfaller M. A. & Diekema D. J., 2010.** Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*, 36: 1-53.
- Pierard G., Caumes E., Franchimont C. & Estrada J. A., 1993.** Dermatologie Tropicale. UREF Université de Bruxelles; Belgique. 350 p.
- Pihet M. & Agnès M., 2013.** Diagnostic biologique des candidoses. *R. F. L.* 2013 : 47–61.
- Pilly E., 2004.** Maladies infectieuses et tropicales. 11ème Ed. CR, Paris, France, 876 p.
- Pittet D., Monod M. & Suter P.M., 1994.** *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg*; 220: 751-758.
- Pinel B., Cassou-Mounat T. & Bensadoun R. J. 2012.** Oropharyngeal candidiasis and radiotherapy. *Rev. Gle*, 16: 222–229.
- Plantefevre G., Chosidow D. & Dupont H., 2004.** Péritonites à levures. *Réa*, 13: 205–215.
- Plantin P., 1997.** Les candidoses cutanéomuqueuses en 1997. *Objectif Peau*, 5: 1944 -1955.
- Playford E.G., Webster A. C. & Craig J. C., 2006.** Antifungal agents for preventing fungal infection in non-neutropenic critically ill and surgical patients: Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Antimicrob Chemother*, 57: 628-638.
-

-
- Portet B., Fabre N., Roumy V., Gornitzka H., Bourdy G., Chevalley S., Sauvain M., Valentin A. & Moulis C., 2007.** Activity-guided isolation of antiparasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochem*, 68: 1312-1320.
- Poulain D. 2013.** *Candida albicans*, plasticity and pathogeny. *R F L*, 2013: 37–46.
- Pousset J L., 2004.** Plantes médicinales d’Afrique. Comment les reconnaître et les utiliser. Edsud Ed, 287 p.
- Pousset J L., 2006.** Place des médicaments traditionnels en Afrique. *Méd Trop*, 66: 606-609.
- Premkumar J., Meena K. S., Chu S. L., Thean H. T. & Kishore R S., 2010.** Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Int J Biol Sci*, 6: 556–568.
- Press J. B., 1996.** Biodiversity: exciting prospects for drug discovery and development. Meeting report of the Monroe wall symposium. *Chemtracts-Organic chemistry* , 9: 286-298.
- Proestos C. & Komaitis M., 2013.** Analysis of Naturally Occurring Phenolic Compounds in Aromatic Plants by RP-HPLC Coupled to Diode Array Detector (DAD) and GC MS after Silylation. *foods*, 2: 90-99.
- Rangel-Frausto M. S., Wiblin T., Blumberg H.M., Saiman L., Patterson J. & Rinaldi M. G., 1999.** National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in 151 rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *C I D*, 29: 253-258.
- Rakotovo G., Rabevohika A. R. & Collas de Chatelperron P., 2012:** Atlas des bois de Madagascar. Edition Quae, 413p.
- Redecker D., 2002.** New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil. *Res Microbio*, 153: 125-130.
- Roilides E., Farmaki E., Evdordou J., Francesconi A., Kasai M. & Filidi J., 2003.** *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit : Epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. *J Clin Microbiol*, 41: 735-741.
-

-
- Samson R. A., Hoeksta E. S. & Frisvad J. C., 2002.** Introduction to food and Airborne Fungi (Revised 6th Edition), 2002, Central bureau voor Schimmelcultures-Utrecht, The Netherlands. Book Review. 389p.
- Sanglard D., Kuchler K., Ischer F., Pagani J. L. & Monod M., 1995.** Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters." *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 2378- 2386.
- Sanogo R., Konipo A., Maiga A., Arama A. E., Diallo D. & Bougoudogo F., 2006.** Formulation d'une pommade dermique à base d'extraits de *mitracarpus scaber* (zucc). *Pharm. Méd. Trad. Afr.* XIV: 159-177.
- Sanogo M., 2007.** Evaluation de l'activité antifongique de *Abrus precatorius* sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Trichophyton mentagrophytes*. Mémoire DEA. Biotechnologie, Université de Cocody, Abidjan. Côte d'Ivoire. 32 p.
- Sarni-Manchado P. & Cheynier V., 2006.** Les Polyphénols en agroalimentaire. Collection STAA, 398p.
- Sayag J., Badillet G. & Zagula M., 1995.** Efficacité et tolérance du Lamisil® (terbinafine). Etude multicentrique dans les mycoses cutanées et unguéales. *Nouv Dermatol*, 14 : 547-552.
- Schaller F., 1999.** Composés antifongiques nouveaux issus de l'investigation phytochimique d'une plante africaine *Bobgunnia madagascariensis* Desv. (Luguminoseae). Thèse de Doctorat en pharmacie, Lausanne, Suisse. 299 p.
- Schmutz J. L. & Barbaud. A., 1995.** "Dermatoses virales": herpès, Varicelle, Zona, Dermatoses à poxvirus et entérovirus. Editions Techniques. Encyclopédie. Médicale. Chirurgicale. (Paris- France). *Dermatologie*, 12-430-A-10: 289-298.
- Schüßer A., Schwarzott D. & Walker C., 2001.** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycolog Res*, 105: 1413-1421.
- Segal B. H. & Steinbach W. J., 2007.** Combination antifungals: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 5: 883-892.
-

-
- Shearer C. A., Descals E., Kohlmeyer B., Kohlmeyer J., Marvanova L., Padgett D., Porter D., Raja H. A., Schmit J. P., Thorton H. A. & Voglymayr H., 2007.** Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiv.and Conser.*, 16: 49-67.
- Shepherd M.G., Poulter R.T.M. & Sullivan P.A., 1985.** *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity. *Annual Review of Microbiology*, 39: 579 - 614.
- Silar P. & Malagnac F. 2013.** *Les champignons redécouverts*, Belin, 232p.
- Speroni F., Puppo M.C., Chalpeau N., De Lamballerie M., Castellani O., Anon M. C. & Anson M., 2005.** High-pressure induced physicochemical and functional modification of low-density lipoproteins from hen egg yolk. *J Agric Food Chem*, 53: 5719-5725.
- Stevens A., 1997.** Oral Amphotericin B as antifungal agent. *J M M*, 7:241-242.
- Stöckigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H. & Stöckigt D., 2002.** High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *J Chromato*, 967: 85-113.
- Suarez S., 1997.** New antifungal therapy for children. *Adv Dermatol*, 12: 195-208.
- Sutradhar R. K., Rahman A.K.M. M., Ahmad M.U. & Bachar S. C., 2008.** Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. *Phytoch Let*, 1: 179-182.
- Taieb F., Mechaï F. Lefort A., Lanternier F., Bougnoux M. E. & Lortholary O., 2011.** Management of candidemia and invasive candidiasis, *La Rev de Méd Int.*, 32: 173–180.
- Talarmin J.P., Boutoille D., Tattevin P., Dargère S., Weinbreck P., Ansart S., Chennebault J. M., Huting P., Léautez-Nainvilleh S., Gay-Andrieui F. & Raffi F., 2009.** Épidémiologie des candidémies : étude observationnelle prospective d’un an dans l’Ouest de la France. *Méd et Mal Infec*, 39: 877–885.
- Talla N. R., 2001.** Contribution au traitement des candidoses buccales au cours de l’infection à VIH: Evaluation de l’activité antifongique de *Cassia alata* sur la croissance in vitro de *Candida albicans*. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Cocody-Abidjan, Côte d’Ivoire. 79p.
-

-
- Tanabe Y., O'donnell K., Saikawa M. & Sugiyama J., 2000.** Molecular phylogeny of parasitic Zygomycota (Dimargaritales, Zoopagales) based on nuclear small subunit ribosomal DNA sequences. *Mol Phylogen Evo*, 16: 253-262.
- Tapondjou A. L., Bouda H., Fontem D.A., Zapfack L., Lontsi D. & Sondengam B. L. (2000).** Local plants used for traditional stored product protection in the menoua division of the western highlands of Cameroon, IntegrateProtection of stored Products. *IOBC Bulletin* 23: 73-77.
- Tapondjou A. L., Alder C., Fontem D. A., Bouda H. & Reichmuth C. 2003.** Bioefficacité des poudres et des huiles essentielles des feuilles de *Chenopodium ambrosioides* et *Eucalyptus saligna* à l'égard de la bruche du niébé, *callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera, Bruchidae). *Cahiers Agricultures* 12: 401-402.
- Taylor J.W., Jacobson D. J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D. M., Hibbet D. S. & Fisher M. C., 2000.** Phylogenetic species recognition and species concept in fungi. *Fung Gene Bio*, 31: 21-32.
- Taylor J.W., Spatafora J., O'donnell K., Lutzoni F., James T., Hibbett D.S., Geiser D., Bruns T.D. & Blackwell M., 2004.** The Fungi. In *Assembling the Tree of Life* (Joel Cracraft, Michael J. Donoghue eds). Oxford University press.
- Terrell CL., 1999** Antifungal agents. Part II. The azoles. *Mayo Clin Proc*, 74: 78-100.
- Tessiilimi Y A., 2008.** Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne de *Microglossa pyrifolia*. Mémoire DEA. Université de Cocody. UFR Boisciences. Abidjan. Côte d'Ivoire, 32 p.
- Therizol-Ferly M., 1990.** Cours de mycologie médicale pour le C.E.S de parasitologie. Faculté de Médecine d'Abidjan, 169 p.
- Toubas D., 2013.** Epidémiologie des candidoses invasives. *R. F. L*, Vol 2013 (450), 27–36.
- Traore N., Sidibe L., Bouare S., Harama D., Somboro A., Fofana B., Diallo D., Figueredo G. & Chalchat J-C., 2013.** Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Eucalyptus citriodora* Hook et *Eucalyptus houseana* W.Fitzg. ex Maiden. *Int J Biol Chem Sci*, 7: 800-804.
-

-
- Vafeiadou K., Vauzour D., Lee H.Y., Rodriguez-Mateos A., Williams R. J. & Spencer J. P.E., 2009.** The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells 3 and protects against neuroinflammatory injury. *Arch Biochem Biophysics*, 484: 100-109.
- Vandenkoornhuyse P., Husband R., Daniell T. J., Watson I.J., Duck J. M., Fitter A. H. & Young J. P. W., 2002.** Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Mol Eco*, 11: 1555-1564.
- Vicente M. F., Basilio A., Cabello A. & Pelaez F., 2003.** Microbial natural products as source of antifungals. *Clin Microbiol Infect Dis*, 9: 15-32.
- Vickers A.E., Sinclair J.R., Zollinger M., Heitz F., Glouzel V., Johanson L. & Fisher V. 1999.** Multiple cytochrome P450 involved in the metabolism of terbinafine suggest a limited potential for drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos*, 27: 1029-1038.
- Vigue-Vallanet C., 1996.** Les prélèvements mycologiques. *An de dermato et vénéréo*, 130 : 1244-1247.
- Vincken J. P., Heng L., De Groot A. & Gruppen H., 2007.** Review Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochem*, 68: 275–297.
- Wang L., Kuo C., Cho S., Seguin C., Siddiqui J., Stoner K., 2013.** Black raspberry-derived anthocyanins demethylate tumor suppressor genes through the inhibition of DNMT1 and DNMT3B in colon cancer cells. *Nutrition and cancer*. 65: 118-125.
- Warnock D. W., 2007.** Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 48: 1-12.
- Wei L. S., Wee W., Siong J. Y. F. & Syamsumir D. F., 2011.** Characterization of antimicrobial, antioxidant, anticancer properties and chemical composition of *Sauropus androgynus* stem extract. *Acta Medica*, 18: 12-16.
- Wingard J.R. 1995.** Importance of candida species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *C I D*, 20: 115-175.
- Wollenweber E., Wehde R., Dorr M., Lang G. & J. F. Stevens J.F., 2000.** C-Methylflavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae. *Phytochemistry*, 55: 965-970.
-

-
- Wood-Sheldon J., Balick, M. J. & Laird S. A., 1997.** Medicinal Plants: Can Utilization and Conservation Coexist? *Advances in Economic Botany*, Vol. 12. Bronx, New York, USA: The New York Botanical Garden.
- Yayé Y. G., Kra A. M., Ackah J. & Djaman A. J., 2011.** Evaluation 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*. *Bulletin de la S. Roy. des Sces de Liege*, 80: 953-964.
- Yayé Y. G., Ackah J. A. A. B., Kra, A. K. M. & Djaman J. A., 2012.** Anti-Fungal Activity of Different Extracts of *Terminalia Mantaly* H. Perrier on the *in vitro* Growth of *Aspergillus fumigatus*. *Eur. J. Sc. Res*, 82:132-138.
- Yigit N., Aktas E., Dagistan S. & Ayyildiz A., 2011.** Investigating biofilm production, coagulase and hemolytic activity in *Candida* species isolated from denture stomatitis patients. *Eurasian J Med*, 43: 27–32.
- Zaug M., 1995.** Clinical experience in onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 4 : 23-30.
- Zirihi G. N., Kra A. K. M. & 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*. *Rev Méd. Pharm. Afr.* 17 : 11-18.
- Zirihi G. N., Kra A. K. M. & 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 de Méd et de Pharma Afr*, 20: 9-18.
-

ANNEXES

ANNEXES I

COMPOSITION CHIMIQUE DE LA GELOSE SABOURAUD

❖ **Composition chimique du milieu sabouraud en g/l d'eau distillée:**

- Bio-thione:	3	- Extrait de malt :	1
- Phosphate dissodique:	0,5	- Phosphate monosodique :	0,5
- Glucose:	19	- Agar :	13
- Bio-trypcase:	3	- Bio-soyase:	3

Le pH = 5,7.

ANNEXE II

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

LISTE DES PUBLICATIONS

Publication 1 : Agré Don Josette, Ackah Jacques Auguste Alfred Bognan, Yayé Yapi Guillaume, Kporou Kouassi Elysée, Loukou Yao Guillaume & Djaman Allico Joseph : Evaluation of the Anticandidotic Activity of the Crude Aqueous and Ethanolic Extract of *Eucalyptus sp*, a *Myrtaceae* From the Ivorian Pharmacopeia on the *in Vitro* growth of *Candida Albicans*, *Candida Glabrata* and *Candida Tropicalis*. *JOURNAL OF ADVANCES IN BIOLOGY*, 4 : 539-545.

- *JOURNAL OF ADVANCES IN BIOLOGY* impact factor 1,561 (2014)

Publication 2 : Agre Don Josette, Yaye Yapi Guillaume, Ackah Jacques Auguste Alfred Bognan, Kra Adou Koffi Mathieu, Loukou Yao Guillaume & Djaman Allico Joseph : Evaluation and Optimization of Antifungal Activity of Active Components of Extracts of *Eucalyptus sp*, on the *In vitro* Growth of *Candida tropicalis*. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics* 2: 931-938.

- *AMERICAN JOURNAL OF PHYTOMEDICINE AND CLINICAL THERAPEUTICS* impact factor 3,266 (2014)

Publication 3: Agre Don Josette, Yaye Yapi Guillaume, Ackah Jacques Auguste Alfred Bognan, Bony François Nicaise, Loukou Yao Guillaume, Yapi Houphouët Félix & Djaman Allico Joseph: Antifungal Activity of Partitioned Extracts of *Eucalyptus Torelliana* (Myrtaceae) on *In vitro* Growth of *Candida Albicans* and *Candida glabrata*. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*. 5: 300-306.

-*ASIAN JOURNAL OF BIOCHEMICAL AND PHARMACEUTICAL RESEARCH* impact factor 2,56 (2015)

PUBLICATION 1



Evaluation of the Anticandidotic Activity of the Crude Aqueous and Ethanolic Extract of *Eucalyptus* sp, a Myrtaceae From the Ivorian Pharmacopeia on the *in Vitro* growth of *Candida Albicans*, *Candida Glabrata* and *Candida Tropicalis*

Agré Don Josette¹, Ackah Jacques Auguste Alfred Bognan^{1,2}, Yayé Yapi Guillaume^{1*}, Kporou Kouassi Elysée², Loukou Yao Guillaume⁴ and Djaman Allico Joseph^{1, 3}

¹Laboratoire de pharmacodynamie biochimique, U. F. R. Biosciences, Université Félix Houphouët Boigny Cocody-Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22 (Côte d'Ivoire)

²UFR Agroforesterie, Filière Biochimie Microbiologie, Université Jean Lorougnon Guédé, BP 150 (Côte d'Ivoire)

³Département de Biochimie Fondamentale et Clinique, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire BP490 Abidjan 01 (Côte d'Ivoire)

⁴UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Félix Houphouët-Boigny Cocody-Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

*E-mail: yayeyapi@yahoo.fr

ABSTRACT

With the advent of AIDS/ HIV, we assist to a strong new outbreak of thrive's mycoses. To fight against this mycoses apparition, our research team has tested the whole crude extracts action (water and hydro-alcoholic), outlet from husks of *Eucalyptus* sp a Myrtaceae on the *in vitro* growth of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida tropicalis*. Extracts incorporation to the sabouraud's geloses has been made according to double dilution method with in slope tube.

After 48 hours of incubation at 30 °C, these extract exhibited anticandidotic activity in dose-response relationship. The hydro- alcoholic extract is the most active extract on *in vitro* growth three clinical isolate of *Candida*, with the following antifungal parameters (*C. albicans* FMC = 250 µg/mL, IC₅₀ = 14.57 µg/mL, *C. glabrata* FMC = 250 µg/mL, IC₅₀ = 11.90 µg/mL, *C. tropicalis* FMC = 250 µg/mL, IC₅₀ = 11.15 µg/mL).

The crude extracts of *Eucalyptus* sp tested showed anticandidotic activity and this activity was more pronounced with hydro-alcoholic extract.

Keywords: Myrtaceae; anticandidotic activity; *Candida albicans*; *Candida glabrata*; *Candida tropicalis*.

Council for Innovative Research

Peer Review Research Publishing System

Journal: JOURNAL OF ADVANCES IN BIOLOGY

Vol 4, No.3

editor@cirjab.org

www.cirjab.com , editorsjab@gmail.com



INTRODUCTION

Disregarded by the population, medicinal plants have now become an important source in the treatment of evil.

Indeed, after a long period of brilliant scientific advances on therapeutic human placed all his hopes in sophisticated laboratories and high-tech devices, we are now witnessing a renewed interest in the remedies offered by nature; medicinal plants [1, 2]. Indeed, candidiasis have become nowadays a problem of public health. It's difficult to eradicate because of their strong growth and the high number of risk factors exhibiting at the onset of candidemia [3, 4].

They can treat diseases of all kinds such as infectious [5, 6]. This is the case of candidiasis who occupy the hospital instead a disturbing especially a patients with HIV / AIDS [7, 8].

Among these medicinal plants which were granted anti-infectious properties, figure *eucalyptus sp* plant of the family *Myrtaceae*. The species of this genus (*Eucalyptus*) are mostly used for the treatment of bronchitis, respiratory diseases, microbial infections in traditional medicine [9, 10, 11, 12].

In order to verify the validity of anti- infectious properties given to this plant, our research team has finally initiated this study to evaluate the anticandidosic activity of *Eucalyptus sp* extracts on *in vitro* growth of *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata*.

MATERIALS AND METHODS

MATERIAL

Plant Material

The material used is plant powder name EUCA obtained from the bark of *Eucalyptus sp*.

Fungi tested

Fungal clinical germs tested namely *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* were provided to us by the Mycology and Parasitology department of the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire. These germs were isolated from patients with superficial mycoses for *Candida glabrata* and deeper mycoses for *candida albicans* and *candida tropicalis*.

Clinical isolate of the genus *Candida* are opportunistic yeast-like fungi they are the source of most candidiasis and are the most frequent strains in human pathology [13,14,15]. These infections are often deadly for subjects whose immune system is very weak [16].

Culture medium

We used Sabouraud agar (Bio-RAD/Réf: 64449, Lot: 8B2212) buffered to pH 5.7 for this test. Appropriate medium and commonly used for fungi cultivating.

METHODS

Preparation of extracts

Bark from the trunk of *Eucalyptus sp* were cut, collected and dried in the shade. After drying, the pieces of this plant were finely grounded using an electric grinder followed by a warring blender. The powder obtained was coded EUCA. The total aqueous and ethanolic extracts were prepared as follows: One hundred (100) grams of EUCA were extracted by homogenization in blender with one liter (1L) of distilled water (mixer). After six cycles of crushing, the homogenate obtained was first centrifuged in a square of fabric and then filtered successively twice on absorbent cotton and once on Wattman filter paper 3 mm. The obtained filtrate was concentrated using under vacuum at 60 °C. The powder obtained is the crude aqueous extract X_{AQ}. The hydroalcoholic extract was prepared using the same method using a solvent mixture constitutes ethanol-water (v/v; 70/30). The ethanol extract obtained evaporation, to dryness was coded X₀.

Both extracts were tested separately on the *in vitro* growth of *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata*.

Preparation of culture medium

The medium was prepared according to the instructions of the manufacturer's protocol.

The incorporation of various plant extracts in Sabouraud agar was done by the method of the double dilution method agar slopes [17, 18, 19, 20]. For each plant extract, each series consists of 10 test tubes. Eight (8) of these tests tubes containing plant extract. And the other 2 tubes are considered as control tubes. Among these 2 tubes, one without vegetable extract was used as witness of germs growth control while the other without germs and extract was used as witness of culture medium sterility control. For 8 test tubes concentrations ranging from 2,000 to 15.62 µg/mL binding by a geometrical reason of ½.

After the inclusion of the 8 samples in test tubes, all 10 tubes of each extract were removed by the use of forceps sterilized by flaming for 15 minutes at 121 °C and then inclined to room temperature of the laboratory to cooling and solidification of the agar [17, 18, 19, 20]

Antimicrobial Assay

Antimicrobial tests were performed using the same method for the three strains of *Candida*.

From young *Candida* culture (48 hour of incubation), the inoculums were prepared as follows:

A young *Candida* colony taken with a handle was homogenized in 10 mL of sterilized distilled water. This gives the suspension (10^0) concentrated to 10^6 cells/mL. From this suspension, a second suspension (10^{-1}) was prepared by dilution of the first by 1/10. It charges to 10^5 cells/mL.

For each of the test tubes (except the control tube of sterility) the germs culture was done on the agar slant previously prepared medium by seeding 10 μ L of the suspension 10^{-1} . This corresponded to 1,000 cells seeded. The cultures thus produced were incubated at 30 °C for 48 hours.

After incubation, the colonies of *Candida* were numbered with a pen colony counter (serial No. 23382 Scinceware of Bel-Art). Moreover, the growth in the experimental tubes was evaluated as a percentage of survival calculated compared to 100 % survival in the control tube growth control [17, 18, 19, 20]. The processing of these data was used to determine the following antifungal parameters:

- The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) is the lowest concentration for which there is no growth visible to the naked eye.
- The Minimum Fungicidal Concentration (MFC) is the smallest extract concentration in the tube which gave 99.99 % inhibition compared to the control tube. It's obtained after transplanting the agar of the tube corresponding to the MIC.
- The Concentration for 50 % Inhibition (IC_{50}) is the concentration which gave 50 % inhibition. This parameter was determined graphically.

RESULTS

After 48 hours of incubation at 30 °C, it was observed compared with control tube, a gradual decrease in the number of colonies in all three species of *Candida* tested as the concentrations of the plant extracts in the test tube increases. These results are statistical averages of 6 experiments for each extract.

Effective inhibitions were obtained at different concentrations level. Experimental data presented as activity curves of the extract are shown in Figure 1 for *Candida albicans*, Figure 2 *Candida glabrata*, Figure 3 for *Candida tropicalis*.

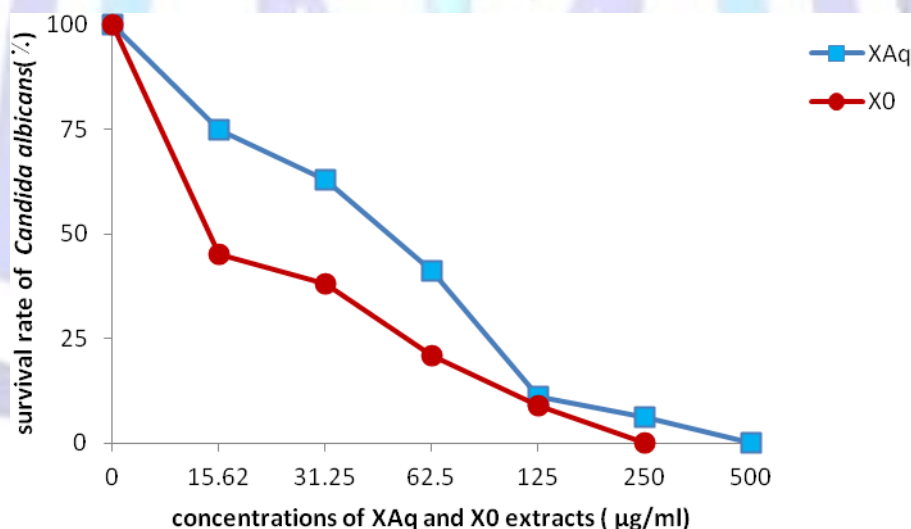


Figure 1: Antifungal Activity of X₀ and X_{Aq} on the *in vitro* growth of *Candida albicans*

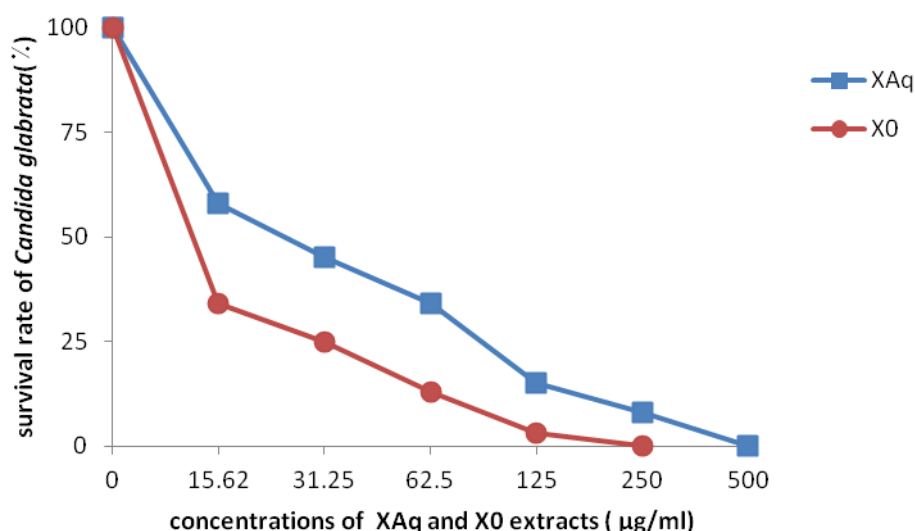


Figure 2: Antifungal Activity of X₀ and X_{Aq} on the *in vitro* growth of *Candida glabrata*

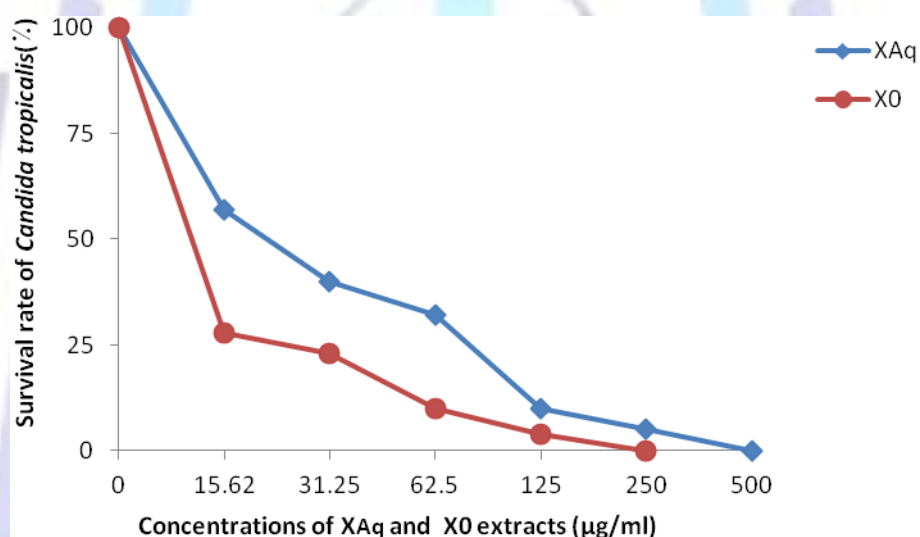


Figure 3: Antifungal Activity of X₀ and X_{Aq} on the *in vitro* growth of *Candida tropicalis*

In general, all activity curves have a decreasing pace with slopes more or less strong according to the extract. However, for the three germs tested, the activity curves of the extract X₀ present stronger slope than X_{Aq} extract (Figure 1 to 3). The values are equal to the one of the MFC. In fact, we still notice that there are not visible colonies on the agar gelose after the period incubation. Values of FMC and IC₅₀ for both crude extracts are shown in Tables 1 and 2.

Table 1: Compared values of antifungal parameters of X_{Aq} extract.

Extrait	Germes fongiques	Paramètres antifongiques	
		CMF (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)
X _{Aq}	<i>Candida albicans</i>	500	48.54
	<i>Candida glabrata</i>	500	24.14
	<i>Candida tropicalis</i>	500	21.30

Table 2: Compared values of antifungal parameters of X₀ extract.

Extrait	Germes fongiques	Paramètres antifongiques	
		CMF (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)
X ₀	<i>Candida albicans</i>	250	14.57
	<i>Candida glabrata</i>	250	11.90
	<i>Candida tropicalis</i>	250	11.15

DISCUSSION

The analysis of the results of antifungal tests with aqueous extract EUCA shows that *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata* are sensitive to the extract with FMC values (MFC X_{Aq} = 500 µg/mL). No cases of resistance have been noted. The value of the inhibitory concentration obtained revealed that the X_{Aq} extract has a more or less pronounced antifungal activity.

Given the good performance obtained with the aqueous extract, we wanted to know if we could improve the activity of the extracts using a solvent for extraction. In view of the study conducted by Zirihi and Kra (2003) [17], we chose the ethanol water mixture 70/30 (v/v) as an extraction solvent.

The results of antifungal tests with the total ethanolic extract of EUCA shows that *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* are sensitive to X₀ with MFC values (MFC X_{Aq} = 250 µg/mL). The report based on the FMC value shows that X₀ is 2 times more active than X_{Aq}. These figures allow a comparison of the performance of the 2 crude extracts.

Note that the greater the slope of a curve is high, that is to say, the more closer the slope approaches the ordinate axis, the more the extract is considered active.

- Against *Candida albicans*

The comparison our results to those of Zihiri and Kra in 2003 [17] reveals that the aqueous and ethanolic extracts EUCA are significantly more active than PYMI extract (PYMI₀, MFC = 50,000 µg/mL; PYMI₁, MFC = 25,000 µg/mL). In fact, X_{Aq} and X₀ are 100 times more active than those extracts. In addition, these extracts X_{Aq} and X₀ show better results than those of *Spermacoce verticillata* (hydro-ethanolic extract; MFC = 100,000 µg/mL) [21].

- Against *Candida tropicalis*

Comparing the performance of our X_{Aq} extract to the aqueous extract of *Borreria latifolia*, *Borreria verticillata*, *Euphorbia hirta*, *Vernonia colorata*, *Turraea heterophylla* having a value of MFC 2,000 µg/mL as shown by the work of FEZAN in 2007 [22] on both strains including *Candida albicans* we noted that EUCA is significantly more active (4 times).

Our results compared to those of KPOROU in 2009 [23] on *Candida tropicalis*, shows that the total extracts are more active than the aqueous and hydroalcoholic extracts (70 %) of *Miltracarpus scaber* (MFC X_{Aq} = 100,000 µg/mL; FMC X₀ = 6,250 µg/mL). The extracts X₀ and X_{Aq} of EUCA are respectively 200 and 25 times more active against *Candida tropicalis*.

We noted that the activity of the crude extracts, based on IC₅₀ *Candida albicans* is the most resistant strain while *Candida tropicalis* is the most sensitive strain with the extract X_{Aq}. However with X₀ extract the sensitivity of *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* are substantially the same.

CONCLUSION

This study has allowed us to highlight the anti-infectious property attributed to this plant. Total extracts of *Eucalyptus sp* tested showed good anticandidotic activity and this activity was more pronounced with the ethanolic extract. Both crude extract acts on germs of *Candida spp* in a dose response relationship. However *Candida albicans* remains the most resistant clinical isolate.

PROSPECTIVE

Looking ahead, further studies by fractioning the ethanol extract in different solvents followed by a phytochemical screening would better concentrate the active ingredient.

ACKNOWLEDGEMENT

Our thanks to the traditional healers who revealed to us the benefits of this plant in traditional medicine, National Floristic Center for identifying this specie and Mycology and Parasitology department of the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire for the clinical isolates.

All those who helped us during the various manipulations:

- Members of Biochemistry-Pharmacodynamic Laboratory
- Member of National Laboratory of Health public of Côte d'Ivoire.



REFERENCES

1. Pamplona-Roger, G. 2000. Guide des plantes médicinales Bibliothèque éducation et santé. Ed.Vie et Santé.1:1-50.
2. OMS. 2003. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle. Publication OMS, 2003. 61p.
3. Toubas, D. 2013. Epidemiology of invasive candidiasis. Revue Francophone des Laboratoires. Volume 2013, Issue 450: 27-36.
4. Herbaud, S.,Vouriou, J., Berle, M., et Paillaud, E. 2007. Candidoses orales chez les personnes âgées hospitalisées : Fréquence, facteurs de risque et prévention. Hygiènes, 15 : 385-389.
5. Press, J.B.1996. Biodiversity: exciting prospects for drug discovery and development. Meeting report of the Monroe wall symposium. Chemtracts-Organic chemistry 9: 286-298.
6. Handa, S.S, Rakesh, D.D., and Vashisht, K. 2006. Compendium of Medicinal and Aromatic Plants ASIA. Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies ICS-UNIDO, AREA Science park. Trieste, Italy, 2008. 260p. www.environment@ics.trieste.it
7. Charles, D., Loulerque, P., Viard, J.P., Drauer, F., et Lortholary, O. 2007. Infections fongiques au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. Elsevier Masson Consulte, Paris, France. 8-002-C-10. 5 p.
8. Rangel-Frausto, M.S., Wiblin, T., Blumberg, H.M., Saiman, L., Patterson, J., and Rinaldi, M.G., 1999. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in 151 rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. Clinical Infection Disease, 29: 253-258.
9. Oyediji, A.O., Ekundayo, O., Olawore, O.N., Adenivi, B.A., and Koenig, W.A., 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. Filoterapia. 70: 526-528.
10. Goldestein, H.B., et Epstein, B.J., 2000. La dentisterie non conventionnelle : Parais 4, les pratiques et les produits dentaires conventionnels. J Can. Dent. Assoc.; 66: 564-568.
11. Bachir, R.G., and Benali, M. 2012. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Eschericia coli* and *Staphylococcus aureus*. Asian pacific Journal of Tropical biomedicine. 2(9): 739-742.
12. Daroui-Mokaddem, H. 2012. Etude phytochimique et biologique des espèces *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniolus olusatrum* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* ET *Chrysanthemum trifurcatum* (Asteraceae). Doctoral Thesis of Biochemistry, Badji Mokhtar-Annaba University. www.biblio.univ-annaba.dz
13. Pinel, B., cassou – Mounat, T., Bensadoun, R.J. 2012. Candidose oropharyngée et radiothérapie Rev. Gle Vol. 16, 222-229.
14. Pihet, M., et Agnes M., 2013: Diagnostic biologique des candidoses. Rev. Francophone Laboratories Vol. 2013 47-61.
15. Poulain, D. 2013. *Candida albicans*, plasticité et pathogénie, Rev. Francophone. Laboratories Vol. 2013, Issue 450, Pages 37-46.
16. Talarmin, J.P., Boutoille, D., Tattevin, P., Dargère, S., Weinbreck, P., Ansart, S., et Chenebault, J.M. 2009. Épidémiologie des candidémies: étude observationnelle prospective d'un an dans l'Ouest de la France. Med. Et Mal. Inf. Vol. 39, Issue 12, 877-885.
17. Zirihi, G. N., Kra, A. K. M., et Guede-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 Méd. Pharm. Afr.17, 11-189.
18. Ackah, A.J., Kra, A.M., Zirihi, G.N., et Guédé-Guina F., 2008. Evaluation of the antifungal activity of TEKAM, évaluation de l'activité antifongique de tekam, un extrait de plante, sur la croissance *in vitro* de *candida albicans* Rev. Ivoir. Sci. Technol, 11, 119 -129.
19. Yayé, Y.G., Ackah, J.A.A.B., Kra, A.K.M., and Djaman, J.A. 2012. Anti-Fungal Activity of Different Extracts of *Terminalia Mantaly* H. Perrier on the *in vitro* Growth of *Aspergillus fumigatus*. Eur. J. Sc. Res. 2012, 82:132-138.
20. Ackah, J.A.A.B., Yayé, Y.G., Yapi, H. F., Kra, A.K.M., and Djaman A.J. 2013. Antifungal Activity of *Terminalia mantaly* on the *in vitro* Growth of *Cryptococcus neoformans*. International Journal of Biochemistry Research & Review 3(1): 63-73.



21. 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 *Candida albicans* et de *Aspergillus fumigatus*. Revue de Médecine et de Pharmacopées Africaines. 20 : 9-18.
22. Fézan, H., Tra Bi, N'guessan, F.K., Anne, F., et Karim F., 2007. Activité antifongique de quelques plantes de la flore ivoirienne. Sci. & Nat.4 (2) :117-122.
23. Kporou, K.E, Kra, A.K.M., Ouattara, S., Guede-Guina, F., et Djaman A.J., 2009. Evaluation de l'activité antifongique de *mitracarpus scaber* sur *candida tropicalis*, J. Sci. Pharm. Biol.,10:13-20.



PUBLICATION 2

Evaluation and Optimization of Antifungal Activity of Active Components of Extracts of *Eucalyptus* sp, on the *In vitro* Growth of *Candida tropicalis*

Agre Don Josette¹, Yaye Yapi Guillaume^{*1}, Ackah Jacques Auguste Alfred Bognan^{1,2}, Kra Adou Koffi Mathieu¹, Loukou Yao Guillaume⁴ and Djaman Allico Joseph^{1,3}

¹Laboratoire de Pharmacodynamique Biochimique, UFR Biosciences, Université Félix Houphouët-Boigny Cocody-Abidjan, 22 Bp 582 Abidjan 22 (Côte d'Ivoire)

²Faculté de Agroforesterie, Département Biochimie-Microbiologie, Université Jean Lorougnon Guédé, Bp 150 Daloa (Côte d'Ivoire)

³Département de Biochimie Clinique et Fondamentale, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire Bp 490 Abidjan 01 (Côte d'Ivoire)

⁴Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody-Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22 (Côte d'Ivoire)

Address for Correspondence

Laboratoire de Pharmacodynamique Biochimique, UFR Biosciences, Université Félix Houphouët-Boigny Cocody-Abidjan, 22 Bp 582 Abidjan 22 (Côte d'Ivoire).

E-mail: yayeyapi@yahoo.fr

ABSTRACT

Infectious diseases continue to be an important public health problem. Among them, candidiasis an opportunist fungal infection especially in patients living with HIV / AIDS is on the increase. Our research team tested different plant extracts (butanolic, hexane, ethyl acetate, chloroform) of crude extract hydro-ethanolic obtained from *Eucalyptus* sp on the *in vitro* growth of *Candida tropicalis*.

Among the 10 extracts tested, X_{1,2} has the highest inhibitory activity (MFC = 125 µg/mL; IC₅₀ = 09.91 µg/mL). The method of preparation of the extract (X_{1,2}) by partitioning of hydro-ethanolic extract in different solvent mixtures is the best way to obtain the best active principle concentration.

Keywords: Hydro-ethanolic extract, *Candida tropicalis*, *Eucalyptus*.

INTRODUCTION

In developing countries, infectious diseases constitute major public health problem due to their frequency and severity¹. Indeed, they are the cause of more than 17 million deaths yearly worldwide of which more than half comes from Africa alone².

This situation has worsened especially with the advent of HIV pandemia that is very difficult to eradicate and which generates various opportunistic infections like bacterial, viral diseases and mycoses due to immune deficiency³. Of these infections, fungal infections have taken a

considerable proportions^{4,5} and those caused by *Candida* are the most common in human especially in patients living with HIV / AIDS⁶⁻⁸.

Despite the damage caused by harmful microorganisms, the scientific world has developed many anti-infective treatments. These remedies have helped reduce the incidence of infectious diseases especially in developed countries⁹. But these remedies remain inaccessible to people in poor areas due to the expensive cost of drugs. This precarious situation associated with the emergence of multidrug-resistant strains, leads the financially handicapped population to use the pharmacopoeia for their treatment needs¹⁰⁻¹².

To help this population cope with this situation, our research team is assessing the scientific basis and the effectiveness of these therapeutic plants and isolate the active principles for the development of more effective and cheaper new drugs. Ethnobotanical surveys have resulted in the selection of several plants widely used by traditional healers for their anti infectious properties.

The objective of our study therefore is to improve the anticandidosic activity of hydro-ethanolic extracts from *Eucalyptus sp* on the *in vitro* growth of *Candida tropicalis*¹³.

MATERIAL AND METHODES

Material

Biologic material

The material used was some powder obtained from the bark of *Eucalyptus sp* coded EUCA. This plant has been identified by the National Floristic Center of University of Félix Houphouët-Boigny (Côte d'Ivoire, Abidjan-Cocody).

Tested Germs

The germ used in this study is *Candida tropicalis*. It was provided by the Mycology and Parasitology laboratory of the Pasteur Institute in Abidjan (Côte d'Ivoire). This microorganism was isolated from a patient with recurrent vaginal discharge.

Culture medium

Sabouraud agar medium was used for germs culture (Bio-RAD/Réf: 64449, Lot: 8B2212) buffered to acid pH (5.7). A suitable and commonly used culture medium for growing fungal germs.

Methods

Preparation of extracts

Pieces of bark of *Eucalyptus sp* was cut, collected and dried under shade, then finely ground using an electric grinder. From the obtained powder, crude hydro-ethanolic extract was prepared. Thus: 100 g of EUCA were extracted by homogenization in blender with one liter (1 L) a solvent mixture of ethanol-water 70/30, v/v. After six cycles of crushing, the homogenate obtained was first filtered in a square of fabric and then filtered twice on absorbent cotton and once on Wattman filter paper 3 mm successively. The filtrate obtained was evaporated to dryness. We have obtained hydro-ethanolic extract coded X₀.

Then, 4 portions of 10 g each of X₀ are subjected to a liquid/liquid partition in 300 mL of 4 different mixtures solvents (hexane-water, ethyl acetate-water, Butanol-water and chloroform-water; v/v, 50/50). After settling, the various phases were separated and concentrated under vacuum. The following extracts were obtained:

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

partition, X_{4.1}: the chloroform phase and X_{4.2} the aqueous phase from the chloroform-water partition.

Preparation of culture medium

Sabouraud agar medium was prepared according to the manufacturer's instructions. Thus 42 g of the medium powder were homogenized in 1000 mL of distilled water (for the purpose of manipulation, we had collected the corresponding amount). This mixture was stirred and heated on a heating magnetic stirrer.

Incorporation of plant extracts

The incorporation of various plant extracts into Sabouraud agar was done following the method of double dilution in slope tubes¹⁴⁻¹⁶. For each plant extract, each series consists of 10 test tubes, 8 of these tests tubes contained plant extracts, and the other 2 tubes are considered control tubes one without plant extract and germs-free served as control of the sterility of the culture medium and the other without plant extract used as a control for the growth of germs. For the 8 test tubes concentrations ranging from 2,000 to 15.62 µg/mL binding by geometrical reason of $\frac{1}{2}$.

After incorporation of the extracts, all 10 tubes of each extract were removed by the use of forceps sterilized by flaming at 121 °C for 15 minutes and then inclined to room of the laboratory to cooling and solidification of the agar^{16,17}.

Antimicrobial test

A young colony of *Candida tropicalis* taken with a handle was homogenized in 10 mL of sterilized distilled water. This gives the suspension (10^9) concentrated to 10^6 cells/mL. From this suspension, a second suspension (10^{-1}) was prepared by dilution of the first solution by

$1/10^{\text{th}}$. This brings the concentration to 10^5 cells/mL.

For each of the test tubes of each series of 9 extracts (except the control tube of sterility of the culture medium) the germs culture was done on the agar slant previously prepared culture medium by seeding 10 mL of the 10^{-1} suspension in transverse striations until exhaustion. This corresponds to 1,000 cells. The cultures thus produced were incubated at 30 °C for 48 hours.

After incubation, the colonies of *Candida tropicalis* were counted with a pen colony (N° 23382Scinceware Bel-Art serial). Growth in eight (8) experimental tubes of each series was evaluated as a percentage of survival calculated relative to 100 % survival in the control tube growth¹⁵⁻¹⁷.

The analysis of experimental data was used to determine the following antifungal parameters:

- The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) is the lowest concentration for which there is no growth visible to the naked eyes.
- The Minimum Fungicide Concentration (MFC) is the minimum concentration of extract in the tube which gave 99.99 % inhibition compared to the control tube growth control tube or the concentration which allows a survival of 0.01 % relative to the growth control tube. It is determined by a sterility test of the tube corresponding to the MIC by inoculating a sample taken from the agar surface of the tube into a new agar.
- The concentration for 50% inhibition (IC₅₀) is the concentration that gave 50 % inhibition estimated relative to the number of counted colonies in the control tube growth control tube. This parameter is determined graphically.

RESULTS AND DISCUSSION

After 48 hours of incubation at 30 °C we observed compared to the control tube, a gradual decrease in the number of colonies gradually as the concentration of plant extract in the test tube increases. This was observed for all series of 9 extracts. These results are statistical averages of 6 experiments for each extract.

Moreover, clear and effective inhibitions were obtained at different concentrations depending on the extracts. Experimental data represented as activities curves are presented in Figure 1 for the crude extracts (X_{Aq} and X_0)¹³ and Figure 2 for extracts partitioned.

In general, all activity curves have a decreasing pace with slopes greater or lesser degree depending on extracts. Regarding the crude extracts, the activity curve of the X_0 extract has a stronger slope than X_{Aq} extract (Figure 1)¹³.

In Figure 2, the lowest slope was obtained with X_{1-1} , average slopes were obtained with X_{2-1} , X_{2-2} and X_{4-1} , X_{3-1} extract. The steeper slopes were obtained with X_{1-2} , X_{3-2} and X_{4-2} extracts, in particular that of the X_{1-2} extract. The values of the MFC and IC_{50} for all the extracts are shown in Table I.

The analysis of results obtained show that the extracts are active on the isolated fungal studied in a dose response relationship. Indeed, we observed a progressive decrease in the number of colonies as the concentration of extracts in the experimental tubes increases.

The comparison of crude extracts based on the values of MFC shows that the X_0 extract (MFC = 250 µg/mL) has a better activity than the X_{Aq} (MFC = 500 µg/mL) extract. It is 2 times more active¹³.

Comparing our results to those of Kporou *et al.*, 2009¹⁸ reveals that the hydro-ethanolic extract of EUCA are significantly more active than the MISCA- X_0 (MFC =

6250 µg/mL). It is 200 times on the same isolate. In addition, this improved performance was also observed by comparing the activity of hydro-ethanolic extract of EUCA to activity of hydro-ethanolic extract of *Salvia tigrina* 50 % tested by Dulger and Hacıoglu in 2008¹⁹ on *Candida tropicalis*. Indeed these authors obtained with leaves and roots' bark of this plant, the respective values of MFC 25000 µg/ml and 12500 µg/ml on *Candida tropicalis*. The X_0 extract of EUCA is 100 and 50 times more active.

Regarding the partitioning, no resistance of fungal germs was observed. Moreover, this activity varies from one extract to another. The most active extract X_{1-2} is 16 times more active than X_{1-1} , 8 times more active than X_{2-1} and X_{4-1} and 4 times more active than X_{Aq} and 2 times more active than X_0 (basic extract from which it was prepared) and X_{3-1} .

Furthermore, the activity of X_{1-2} is also better than that obtained by Kporou *et al.*, 2009¹⁸ with hexane extract X_{1-1} (MFC= 3125µg/mL) on the same fungal germs. The same for Fézan *et al.*, 2007²⁰ that obtained with the dichloromethane and methanolic extract 80 % of *Erigeron floribundus* MFC values of 500 µg/mL and > 2000 µg/mL respectively. The X_{1-2} extract is 4 times more active than dichloromethane and more than 16 times than methanolic extract 80 %.

This interesting activity of the extracts of *Eucalyptus sp* confirms the antimicrobial activity that this plant of the genus *Eucalyptus* possesses. Indeed, Oyediji *et al.*, in 1999²¹ showed significant antibacterial activity (gram-positive and gram-negative) and fungal (*Candida albicans*) of essential oils from five varieties of *Eucalyptus* in Nigeria. Similar result was obtained by the work of Elaissi *et al.*, in 2011²² that tested the essential oil of *Eucalyptus odorata* on the *in vitro* growth of *Staphylococcus aureus*. According to Bashir

et al., 2012²³, the *Eucalyptus globulus* essential oil has an effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The works of Javad and Atefeh, 2010²⁴, they have demonstrated the antimicrobial activity of essential oils and methanolic extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*.

CONCLUSIONS

This study elaborates the real anti-infective potential of *Eucalyptus sp.* The results of these investigations have led us to understand that the extracts of this plant have antifungal activity more or less pronounced on the *in vitro* growth of *Candida tropicalis*.

The method using in this study, gave us the most active extract to be X_{1.2} (MFC = 125 µg/ml, IC₅₀ = 09.91 µg/ml) whose anticandidotic activity is relatively high.

Therefore from our observation and results obtained we can then conclude that from a solvent mixture of ethanol-water (70/30, v / v) followed by a partition in a solvent mixture of hexane-water is the best method to employ to better concentrate the active components of EUCA. Thus, the use of this plant as antimicrobial in traditional medicine is justified.

ACKNOWLEDGEMENT

We want to extend our sincere thanks to:

- All traditional healers who have revealed the benefits of this plant in traditional medicine
- Members of the Pharmacodynamic biochemical Laboratory for their active participation in this present work.
- Members of the national floristic center Côte d'Ivoire for plant identification.
- Members of the National Laboratory of Public Health in Côte d'Ivoire for the achievement of this work.

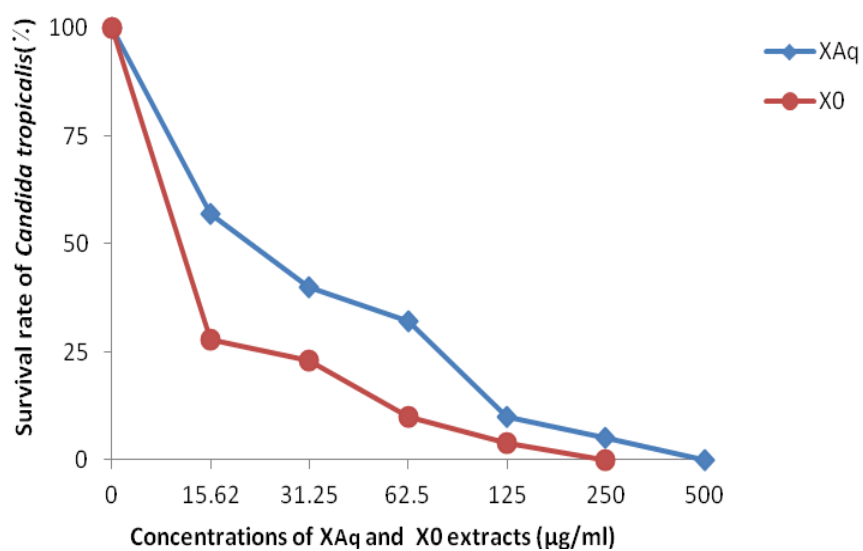
REFERENCES

1. Bourgeois A. Les MST/SIDA au Cameroun. Bidiagnostic and therapy. Magasine bilingue de santé au Cameroun 1999; N° 004.
2. OMS. Maladies infectieuses en Afrique. Situation et perspectives d'action. 7^{ème} Réunion du forum pour le partenariat avec l'Afrique. Moscou, Russie 2006; 19 p.
3. Schmutz JL et Barbaud A. "Dermatoses virales": Herpès, Varicelle, Zona, Dermatoses à poxvirus et entérovirus. Editions Techniques. Encyclopédie Médicale Chirurgicale (Paris- France). *Dermatologie* 1995; 12-430-A-10: 289-298.
4. Hibbert DS, Donoghue MJ. Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in homobasidiomycetes. *Systematic Biology* 2001; 50: 215-242.
5. Lortholary O, Denis B. Infections fongiques pulmonaires chez les patients séropositifs pour le VIH. *Revue des Maladies Respiratoires* 2013; 30: 682-695.
6. Charles D, Loulerque P, Viard JP, Drauer F, Lortholary O. Infections fongiques au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. *Elsevier Masson Consulte*, Paris, France. 2007; 8-002-C-10. 5 p.
7. Bonnin A. Transition commensal-pathogène au cours des candidoses invasives à *Candida albicans*: approches moléculaires et cellulaires. *Académie nationale de médecine*, Paris, France (1947) 2012; 196 : 139-149.
8. Pihet M, Agnes M. Diagnostic biologique des candidoses. *Revue Francophone des Laboratoires* 2013; Vol 2013, 47-61.
9. Soro D, Koné MW, Kamanzi AK. Evaluation de l'activité antibactérienne et anti-radicalaire libres de quelques taxons bioactifs de Côte d'Ivoire. *Europ. J. Sci. Res.* 2010; 40: 307-317.
10. Kaboré ZI, Millogo K, Koné H. Étude antibactérienne *in vitro* d'extraits alcaloïdiques de *Holarrhena floribunda* (Apocynaceae) vis-à-vis d'*Escherichia coli* Entéropathogène, Sérotype 0127. *Rev. Pharma. et Méd. Tradi. Afr.* 1997; IX: 17-23.
11. Akoua KC, Guessend N, Gbonon V, Faye-kette AYH, Dosso M. Methicilline-resistant

- of *Staphylococcus aureus* activity in Abidjan (1998-2001): A new hospital problem. *Medecines Maladies Infectieuses* 2004; 34: 132-36.
12. Guillemot D, Maugendre P, Vhauvin, Sermé TC. Consommation des antibiotiques en France. *BEH* 2004; 3233: 141-147.
 13. Agré DJ, Ackah JAAB, Yayé YG, Kporou KE, Loukou YG, Djaman AJ. Evaluation of the anticandidosis activity of the crude aqueous and ethanolic extracts of *Eucalyptus* sp, a Myrtaceae from the ivoirien pharmacopeia on the *in vitro* growth of *Candida Albicans*, *Candida Glabrata* and *Candida Tropicalis*. *Journal of Advances in Biology* 2014; 4 (3): 539-545.
 14. Holt JR. Laboratory test of antifungal drugs; *Journal of Clinical Pathology* 1975; 1 (18): 767-774.
 15. Zirihi GN, Kra AKM, Guede-Guina F. Evaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Lamarck) O. kuntze (Asteraceae) "PYMI" sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Revue Méd. Pharm. Afr.* 2003; 17 :11-18.
 16. Ackah JAAB, Kra AKM, Zirihi GN, Guédé-Guina F. Evaluation de l'activité antifongique de TEKAM, un extrait de plante, sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Rev. Ivoir. Sci. Technol.* 2008; 11: 119 -129.
 17. Yayé YG, Kra AKM, Ackah JAAB, Djaman AJ. Evaluation 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*. *Bulletin de la Soc. Roy. des Sces de Liège* 2011; 80: 953-964.
 18. Kporou KE, Kra AKM, Ouattara S, Guede-Guina F, Djaman AJ. Evaluation de l'activité antifongique de *Mitracarpus scaber* sur *Candida tropicalis*. *J. Sci. Pharm. Biol.* 2009; 10:13-20.
 19. Dulger B, Hacıoglu N. Antifungal Activity of Endemic *Salvia tigrina* in Turkey. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2008; 7: 1051-1054.
 20. Fézan H, Tra Bi, N'guessan FK, Anne F, Karim F. Activité antifongique de quelques plantes de la flore ivoirienne. *Sci. & Nat.* 2007; 4 (2): 117-122.
 21. Oyedéji AO, Ekundayo O, Olawore ON, Adenivi BA, Koenig WA. Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. *Fitoterapia* 1999; 70: 526-528.
 22. Elaissi A, Salah KH, Mabrouk S, Larbi KM, Chemli R, Harzallah-Skhiri F. Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species essential oils. *Food Chemistry*, 2011; 129 (4): 1427-1434.
 23. Bachir RG, Benali M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012; 2: 739-742.
 24. Javad S-G, Atefeh AA. Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. *Pharmacogn. Mag.* 2010;6(23):172-175.

Table 1. Values of antifungal parameter of different extracts of EUCA

Different extracts of EUCA	Antifungal parameter	
	CI ₅₀ µg/mL	MFC µg/mL
X _{Aq}	21.30	500
X ₀	11.15	250
X ₁₋₁	98.21	2000
X ₁₋₂	09.91	125
X ₂₋₁	19.52	1000
X ₂₋₂	12.35	500
X ₃₋₁	10.62	250
X ₃₋₂	11.51	125
X ₄₋₁	14.75	1000
X ₄₋₂	11.71	125

**Figure 1.** Activity curves of crude extracts X_{Aq} and X₀ on *in vitro* growth of *Candida tropicalis*¹³

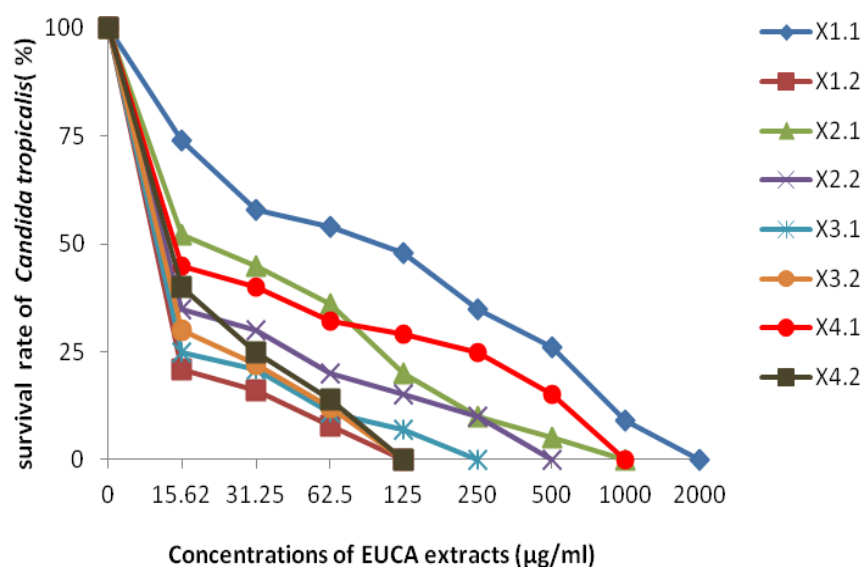


Figure 2. Activity curves of partitioned extract of X_0 on the *in vitro* growth of *Candida tropicalis*

PUBLICATION 3



Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research

Antifungal Activity of Partitioned Extracts of *Eucalyptus Torelliana* (Myrtaceae) on In Vitro Growth of *Candida Albicans* and *Candida Glabrata*

Agre Don Josette¹, Yaye Yapi Guillaume^{1,2*}, Ackah Jacques Auguste Alfred Bognan^{1,2}, Bony François Nicaise⁴, Loukou Yao Guillaume⁴, Yapi Houphouet Felix¹ and Djaman Allico Joseph^{1,3}

1. Lab. de Pharmacodynamie-biochimique, U.F.R. Biosciences, Université Felix Houphouët-Boigny Cocody-Abidjan (UFHB), 22 Bp 582 Abidjan 22 (Cote d'Ivoire).
2. UFR Agroforesterie, Unité Pédagogique de Biochimie-Microbiologie, Université Jean Lorougnon Guédé Daloa (UJLoG), Bp 150 Daloa (Cote d'Ivoire).
3. Département de Biochimie Fondamentale et Clinique, Institut Pasteur de Cote d'Ivoire (IPCI) Bp 490, Abidjan 01 (Cote d'Ivoire).
4. UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Felix Houphouët-Boigny Cocody-Abidjan, (UFHB), 22 Bp 582 Abidjan 22, Cote d'Ivoire.

Received: 25 March 2015; Revised: 24 April 2015; Accepted: 19 June 2015

Abstract: Candidiasis is one of the commonly encountered in hospital infections. Its mastery is difficult because of the many resistance encountered with existing molecules. So to solve this problem, we tested the action of extracts from solvent mixture of butanol-water, hexane-water, ethyl acetate-water, chloroform-water of *Eucalyptus torelliana* (Myrtaceae) on the *in vitro* growth of *Candida albicans* and *Candida glabrata* in Sabouraud agar. The results of this study showed that all tested extracts are active against fungal germs. However, only the extract from the aqueous phase obtained from the hexane-water partition has better anti-candida activity with MFC value of = 125 µg/mL for both fungal germs and IC₅₀ value of = 21.19 µg/mL for *Candida glabrata* and 08.62 µg/mL against *Candida albicans*.

Keywords: Infectious, *Eucalyptus torelliana*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*.

INTRODUCTION:

Medicinal plants are an inexhaustible source of bioactive and natural compounds for men. According to WHO estimates, more than 80 % of the African population depends on the use of traditional medicine for their health care needs [1]. Many factors explain this high percentage: they are intrinsic cultural ties, lack of medical facilities, the high cost of pharmaceutical products, also the increasing impoverishment of local communities [2]. To this is added the resistance developed by microorganisms to common antibiotics in use and the high incidence of infectious diseases including candidiasis that are difficult to control and eradicate [3].

These observations lead researchers to carry out research work in order to discover more effective molecules, which have brought about the idea of investigating natural substances. Borrowing a leaf from these researchers, our research team was establishing the scientific basis for the action of these therapeutic plants. Many works have already been done on the evaluation of the antimicrobial activities of some medicinal plants [4-7]. Similarly, *Eucalyptus torelliana* a Myrtaceae used in the

Ivorian pharmacopoeia for the treatment of infectious diseases has been selected in order to test its' anti-Candida activity. This study showed the results of anti-candida activity of some extracts of *Eucalyptus torelliana* against in vitro growth of *Candida albicans* and *Candida glabrata* germs.

MATERIALS AND METHODS:

Biological Material: The plant material used is a powder obtained from the bark of *Eucalyptus torelliana*. Extracts from this powder have been tested on *Candida albicans* and *Candida glabrata*. These germs were provided by the mycology laboratory of the Pasteur Institute of Abidjan (Côte d'Ivoire). *Candida albicans* has been taken from a patient suffering from deep candidiasis and *Candida glabrata* isolated from a patient with superficial candidiasis. For biological tests, Sabouraud agar culture medium (Bio-RAD/ Ref: 64449; Lot: 8B2212) was used.

Preparation of extracts: Crude aqueous and hydro-alcoholic extracts were prepared from the powder of this plant species. Thus, 100 grams were extracted by homogenization respectively in one liter (1 L) of distilled water and ethanol-water mixture (70 %) in the blender. Homogenate obtained in each case was drained through a clean square of fabric and then filtered twice through cotton wool and Whatman 3 mm filter paper successively. Each filtrate was concentrated in a rotavapor at 60 °C. The powders obtained respectively constitute the crude aqueous extract coded X_{Aq} and crude alcoholic-extracts coded X_0 .

Thereafter, 4 portions of 10 grams each of X_0 are constituted and subjected separately to partitioning in 100 mL of 4 different solvents mixtures (hexane-water, ethyl acetate-water, butanol-water chloroform-water; 50/50, v/v). After settling and separation, the different phases were concentrated in a rotavapor. We obtained the following extracts respectively: X_{1-1} : Hexane phase, X_{1-2} : Aqueous phase from the hexane-water partition, X_{2-1} : Ethyl acetate phase, X_{2-2} : Aqueous phase from the ethyl acetate-water partition, X_{3-1} : Butanol phase, X_{3-2} : Aqueous phase from the butanol-water partition, X_{4-1} : Chloroform phase and X_{4-2} : Aqueous phase from the chloroform-water partition.

Preparation of culture medium: Sabouraud medium was prepared according to the manufacturer's instructions: 42 g of the medium (powder) were homogenized in 1000 mL of distilled water (for handling purposes, we used the equivalent amount). This mixture was stirred and heated on a heating magnetic stirrer (IKA-MAG-RCT).

Incorporation of plant extracts: The incorporation of various extracts into Sabouraud agar was done according to the method of double dilution in inclined tubes [3, 8, 9]. Plant extracts were distributed in 8 tubes with concentrations ranging from 2000 to 15.625 $\mu\text{g/mL}$ binding by a geometrical reason of $\frac{1}{2}$. And 2 additional tubes considered control tubes one without plant extract and germs-free served as control of the sterility of the culture medium and the other without plant extract used as a control for the growth of germs. After incorporation of the extracts in tubes, all tubes were autoclaved at 121 °C for 15 minutes and then inclined at laboratory temperature to allow for cooling and solidification of the agar [3, 8, 9].

Antimicrobial Test: Antimicrobial assays were performed in a similarly way for both *Candida* fungal germs tested. The inoculum was prepared from a young colony of *Candida* (48 h incubation) homogenized in 10 mL of sterilized distilled water. This gives the stock suspension (10^0) concentrated to 10^6 cells/mL. From this suspension, a second suspension (10^{-1}) was prepared by dilution of the first solution by 1/10th. This brings the concentration to 10^5 cells/mL.

For each of the test tubes of each series of extracts (except the control tube of the sterility of the culture medium), germs culture was made by seeding in transverse striations of 10 μ L of the suspension 10^{-1} corresponding to 1000 cells. The cultures thus produced were incubated at 30 °C for 48 hours. After the incubation, the colonies were counted by direct counting using a colonies counting pen (serial N°: 23382, Scinceware Bel-Art). The growth in the 8 experimental tubes of each series was evaluated as a percentage of survival calculated relative to 100 % survival in the growth control tube [4, 10]. The analysis of experimental data was used to determine the following antifungal parameters:

- The minimum inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration in which there is no visible growth to the naked eye.
 - The minimum fungicide concentration (MFC): This is the minimum concentration of extract in the tube which gives 99.99 % inhibition compared to growth control tube or it is the concentration that leaves a survival of 0.01 % compared to the growth control tube. It is determined by a sterility test of the tube corresponding to the MIC by inoculating a sample taken from the agar surface of the tube into a new agar.
 - The Concentration for 50 % inhibition (IC_{50}) is the concentration that gave 50 % inhibition estimated relative to the number of counted colonies in the growth control tube. This parameter is determined graphically.
- The fungicidal or fungistatic effect was revealed after transplanting the content of the tube corresponding to the MFC and counting of cells was made possible through various dilutions of the suspension 10^{-1} .

RESULTS:

The results of antifungal tests are reported in Table 1. After 48 hours of incubation at 30°C, a significant antifungal activity was observed for all extracts tested on *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Of these extracts, X_{1-2} extract proved to be the most active with MFC value of 125 μ g/mL on the *in vitro* growth of 2 germs. However IC_{50} values differ (*Candida albicans* IC_{50} = 21.19 μ g/mL; *Candida glabrata* IC_{50} = 08.62 μ g/mL).

Moreover, high and effective inhibitions were obtained at different concentrations level according to the extracts. Experimental data translated as curves of activities are presented in Figure 1 for the most active extract X_{1-2} and for the aqueous extract [11, 12]. In general, the activity curves have a decreasing pace. Moreover, the steepest curve of activity was observed with *Candida glabrata* (Figure1).

DISCUSSION:

Previous work with crude aqueous extracts and hydro-ethanolic extract of *Eucalyptus torelliana* (sp) showed better results especially with the hydro-ethanol extract [11, 12]. In order therefore to improve the activity of the most active extract X_0 , partitioned extracts were prepared. By analyzing the results of antifungal tests showed that *Candida albicans* and *Candida glabrata* are sensitive to these extracts. No resistance was observed. However, the performance of extracts varies depending on the solvent mixture (Table 1). Thus, the X_{1-2} , X_{3-2} and X_{4-2} extract are the most active and have the same MFC values on both fungal germs. However, based on IC_{50} values the X_{1-2} extract is the most active because it has the lowest values on the in vitro growth of 2 fungal germs (Table 1). In addition, it appears that these three active extracts are of the aqueous phases from different partitions except the X_{2-2} extract which showed lower activity and is 4 times less active than X_{1-2} , X_{3-2} and X_{4-2} extracts. Moreover, the comparison of the most active extract X_{1-2} to other extracts showed that this extract is 2 times more active than the basic extract X_0 and 16, 8 and 2 times more active than the X_{1-1} , X_{4-1} and X_{3-1} extracts respectively. To summarize of all these extracts the most active is the X_{1-2} and the least active extract is the X_{1-1} . Furthermore, the inhibitory concentrations value obtained show that the extracts have a more or less pronounced antifungal activity.

In addition, the X_{1-2} extract showed better activity than the hexane extracts of plants tested by Duraipandiyar & Ignacimuthu in 2011 [13] on the in vitro growth of fungal strains.

However, no activity of those plants was determined against *Candida albicans*. It is the same with the trichloromethane extract of the leaves of *Daniellia oliveri* for which no inhibition was observed against *Candida albicans* contrary to trichloromethane extract of leaves of *Pterocarpus erinaceus* of which inhibition was observed at 30000 $\mu\text{g/mL}$ [14]. This same observation was observed with petroleum ether extracts, dichloromethane and methanolic extracts of *Aubepine monogynous* [15] and with the ethanolic extract of the leaves of *Cochlospermum regium* [16]. From these observations we can say that the partition of the extract in hydro-alcoholic solvent mixture of hexane water is the best way to obtain the best extraction of active principle of *Eucalyptus torelliana*. This was seen in the work of Khurram *et al.*, 2011 [17] and Ahon *et al.*, 2012 [9]. In fact, these authors obtained with the hexane extracts of *Dodonaea viscosa* and *Terminalia superba* respectively good activity against *Candida albicans*. As for Yayé *et al.*, in 2011 [8], after defatting with hexane, in Soxhlet extractor, the alcoholic extract of *Terminalia Mantaly* with the residual phase's good activity was observed against *Candida albicans*.

CONCLUSION:

This study found that extracts of *Eucalyptus torelliana* have a more or less pronounced antifungal activity on in vitro growth of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. In fact they all have effective inhibitory activity, but more pronounced with the X_{1-2} extract. This justifies the use of this plant by traditional healers.

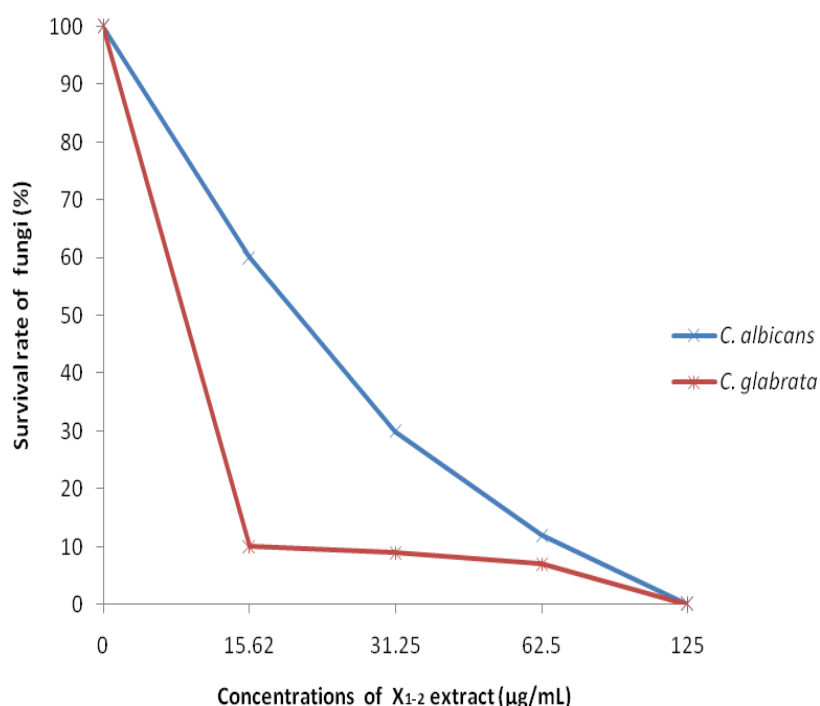
Furthermore, the solvent and the method of extraction used in this study allow better concentration of active principle of this plant and thus improve the antifungal activity of different extracts. Further phytochemical screening followed by chromatography, we enable us isolate the active molecule(s).

ACKNOWLEDGEMENT:

Our thanks to the traditional healers who revealed to us the benefits of this plant in traditional medicine, National Floristic Center for identifying this specie and Mycology and Parasitology department of the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire for the clinical isolates. All those who helped us during the various manipulations: Members of Biochemistry-Pharmacodynamic Laboratory and of National Laboratory of Health public of Côte d'Ivoire.

Table 1: Values of antifungal parameter of different extracts of *Eucalyptus torelliana*

Plant extracts	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida glabrata</i>	
	MFC ($\mu\text{g/mL}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MFC ($\mu\text{g/mL}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
X ₁₋₁	2000	142.85	2000	51.33
X ₁₋₂	125	21.19	125	08.62
X ₂₋₁	1000	204.68	1000	101.56
X ₂₋₂	500	62.50	500	58.23
X ₃₋₁	250	150	250	11.87
X ₃₋₂	125	47.99	125	09.76
X ₄₋₁	1000	328.12	1000	12.14
X ₄₋₂	125	62.50	125	09.37

**Figure 1:** Antifungal Activity of X₁₋₂ on the *In Vitro* Growth of Pathogenic Fungi

REFERENCES:

1. M.M. Tonye and M. Mayet, *African Journal of Biotechnology*, 2007, **6(25)**, 2945-2952.
2. S.A. Enejeo, O.L. Egwari and O.T. Mosaku, *Advances in Biological Research*, 2011, **5(4)**, 221-225.
3. B. Pinel, T. Cassou-Mounat, R-J. Bensadoun, *Cancer/Radiothérapie*, 2012, **16**, 222-229.
4. N.G. Zirihi, M.K.A. Kra, et F. Guede-Guina, *Revue Méd. Pharm. Afr.* 2003, **17**, 11-189.
5. C.O. Okou, M.K.A. Kra, N.G. Zirihi, M. Dosso, F. Guédé-Guina, *J. sci. pharm. biol.*, 2006, **7**, 17-27.
6. I. Bagre, C. Bahi, K. Ouattara, N.G. Zirihi, J.A. Djaman, A. Coulibaly, J.D. N.Guessan, *Phytotherapie* 2011, **9**, 136-141.
7. G.E.K. Bolou, I. Bagre, K. Ouattara and J.A. Djaman., *Trop. J. Pharm. Res.*, 2011, **10**, 335-340.
8. G.Y. Yaye, M.K.A. Kra, B.J.A.A. Ackah et J.A. Djaman., *Bulletin de la Societe Royale des Sciences de Liege*, 2011, **80**, 953-964.
9. M.G. Ahon, M.K.A. Kra, Aw S., N.G. Zirihi, B.J.A.A. Ackah, S. Siaka, E.K. Kporou, J.M. Akakpo-Akue, J.A. Djaman, *IJBPAS.*, 2012, **1(10)**, 1434-1442.
10. B.J.A.A. Ackah, M.K.A. Kra, N.G. Zirihi et F. Guede-Guina, *Rev. Ivoir. Sci. Technol.*, 2008, **11**, 119 -129.
11. J.D. Agre, B.A.A.J. Ackah, G.Y. Yaye, E.K. Kporou, G.Y. Loukou and J.A. Djaman., *Journal of Advances in Biology.*, 2014, **4**, 539-545.
12. J.D. Agre, G.Y. Yaye, B.A.A.J. Ackah, M.K.A. Kra, G.Y. Loukou and J.A. Djaman., *AJPCT*, 2014, **2**, 931-938.
13. V. Duraipandiyar and S. Ignacimuthu., *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.*, 2011, S204-S215.
14. K.N. Tittikpina, A. Agban, A.K. Gbogbo, P.Y. Hoekou, H. Pereki, K.B. Komlan et K. Akpagana, *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 2013, **7(4)**, 1586-1594.

15. W. Bouzid, M. Yahia, M. Abdeddaim, C.M. Aberkane & A. Ayachi., *Lebanese Science Journal.*, 2011, **12 (1)**, 59-69.
16. J.L. Dos S. C. E Silva, B. de P. Bicudo, B.A. Rodrigues, M.M. Mendonça, R.R. Borges, A. Araujo de Almeida, M.K. Pires de Oliveira, *BMC Proceedings.*, 2014, **8 (4)**, 72.
17. M. Khurram, A. Hameed, U.M. Amin, A. Gul, N. Ullah, M. Hassan, A. Qayum, A.K.C.A. Kamran and W. Manzoor., *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.*, 2011, **5**, 1422-1426.

***Correspondence Author:** Yaye Yapi Guillaume, Unite Pedagogique de Biochimie-Microbiologie, UJLoG Daloa, Laboratoire de Pharmacodynamie-biochimique, UFHB Abidjan, 22 Bp 582 Abidjan 22 (Cote d'Ivoire).

RESUME

Les maladies infectieuses constituent un sérieux problème de santé publique aussi bien dans les pays en développement que dans les pays industrialisés. Parmi ces maladies infectieuses, les mycoses ont pris des proportions considérables et en particulier celles à *Candida* dénommées candidoses. Elles sont les plus fréquentes en pathologie humaine et chez les sujets vivant avec le VIH. Cette situation engendre un besoin sans cesse croissant de trouver de nouveaux composés antimicrobiens capable d'inhiber la croissance et les mécanismes de résistances des microorganismes.

C'est dans ce cadre que notre équipe a testé différents extraits végétaux (aqueux, hydro-éthanolique, hexanique, acétatique, butanolique et chloroformique) de *Eucalyptus torelliana* F.Muell. une Myrtaceae sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* et *Candida glabrata*. Tous ces extraits ont montré une activité inhibitrice sur les germes étudiés avec une forte activité pour l'extrait X₁₋₂ (phase aqueuse de la partition hexane-eau). L'optimisation de l'extrait X₁₋₂ par chromatographie sur gel de filtration (sephadex G₅₀), a donné plusieurs fractions dont la plus active est la fraction F₅:

Pour *C. albicans* CMF = 62,5 µg/mL; CI₅₀ = 06,45 µg/mL.

Pour *C. tropicalis* CMF = 62,5 µg/mL; CI₅₀ = 02,70 µg/mL.

Pour *C. glabrata* CMF = 62,5 µg/mL; CI₅₀ = 01,73 µg/mL.

La CPG/SM de la fraction F₅ a permis d'identifier 15 molécules parmi lesquelles les composés majoritaires sont des terpènes et des composés phénoliques notamment les tanins.

La méthode de préparation de l'extrait (X₁₋₂) par partitions de l'extrait hydro-éthanolique dans un mélange de solvant hexane-eau suivie de chromatographie sur gel de filtration sephadex G₅₀ est une méthode permettant non seulement de mieux concentrer mais aussi de purifier et d'isoler les principes actifs.

Mots clé: *Eucalyptus torelliana* activité inhibitrice, chromatographie.

ABSTRACT

Infectious diseases are a serious public health problem in both developing and industrialized nations. Among these infectious diseases are fungal infections (mycosis) which have taken a considerable proportion especially candidiasis caused by yeast of the genus *candida*. They are most common in human disease and in HIV patients. This necessitates a growing need to find new antimicrobial compounds capable of inhibiting the growth and resistance mechanisms of microorganisms.

It is in this context that our research team has tested various plant extracts (aqueous, hydro-ethanolic, hexane, acetate, butanol and chloroform) of *Eucalyptus torelliana* F.Muell. a *Myrtaceae* on the *in vitro* growth of *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata*. All these extracts showed inhibitory activity against the studied pathogens with high activity in the X₁₋₂ extract (aqueous phase of hexane-water partition). Optimizing X₁₋₂ extract by gel filtration chromatography (Sephadex G₅₀), gave several fractions of which F₅ was the most active fraction.

For *C. albicans* MFC = 62,5 µg/mL; IC₅₀ = 06,45 µg/mL.

For *C. tropicalis* MFC = 62,5 µg/mL; IC₅₀ = 02,70 µg/mL.

For *C. glabrata* MFC = 62,5 µg/mL; IC₅₀ = 01,73 µg/mL.

GC/MS of the F₅ fraction allowed to identify 15 molecules majority of the compounds are terpenes and phenolic compounds including tanins.

The preparation method of the extract (X₁₋₂) by partitioning hydro-ethanolic extract in a mixture of hexane-water solvent followed by gel filtration chromatography on Sephadex G₅₀ this method not only concentrate better but also purify and isolate the active principles.

Keywords: *Eucalyptus torelliana*, inhibitory activity, chromatography.