

## Etude botanique, évaluation de l'activité anticandidosique de *hunteria eburnea* et de sa toxicité sur les cellules humaines

Yao KANGA<sup>1\*</sup>, Camara DJENEB<sup>1</sup>, Goueh GNAHOUE<sup>2</sup>, Nathalie GUESSENND<sup>3</sup>,  
Kouadio BENE<sup>1</sup>, Alain Serge AMBE<sup>1</sup> et Guedé Noel ZIRIHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Botanique, Unité de Formation et de Recherche Biosciences, 22 BP 582 Abidjan 22,  
Université Felix Houphouët Boigny, Côte d'Ivoire

<sup>2</sup>Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie, Ecole Normale Supérieure (ENS),  
08 BP 10 Abidjan 08, Côte d'Ivoire

<sup>3</sup>Institut Pasteur, Laboratoire de Bactériologie, Côte d'Ivoire

\* Correspondance, courriel : [kanga.yao@yahoo.fr](mailto:kanga.yao@yahoo.fr)

### Résumé

Les mycoses sont des maladies graves provoquées par des champignons microscopiques pathogènes. Elles représentent un véritable problème de santé publique car leur traitement est particulièrement difficile aussi bien du point de vue chirurgical que sur le plan chimiothérapeutique. Dans le but d'apporter notre contribution à la lutte contre les mycoses en forte recrudescence, nous avons évalué et amélioré par partition dans l'éthanol l'activité antifongique de l'extrait total aqueux de *Hunteria eburnea*, plante médicinale de la pharmacopée ivoirienne, sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, puis évalué sa toxicité sur les cellules humaines. La détermination de la concentration inhibitrice 50 % (CI) et de la Concentration Minimale Fongicide (CMF) a permis d'évaluer l'effet de cette plante sur ce germe fongique et les cellules humaines. La CI<sub>50</sub> est de 4,62 mg/mL avec une CMF de 25 mg/mL. Seul l'extrait éthanolique a exercé un effet antifongique sur *Candida albicans*.

**Mots-clés :** *activité antifongique, extraits végétaux, Hunteria eburnea, Candida albicans.*

### Abstract

**Botanic study and evaluation of *hunteria eburnea* anticandidosic activity and its toxicity on human cells**

The mycoses are serious illnesses provoked by pathogenic microscopic fungi. They represent a real problem of public health because their treatment is also especially difficult a lot of point of surgical view that on the chemotherapeutic plan. In the goal to bring our contribution to the struggle against the opportunist mycoses in strong upsurge, we valued and improved by partition in ethanol the activity of the total aqueous extract of *Hunteria eburnea* Pichon, plant of Ivory Coast pharmacopoeia, on the *in vitro* growth of *Candida albicans*. The determination of the inhibitory concentration 50 % (CI<sub>50</sub>) and of the Fungicidal Minimal Concentration (FMC) permitted to value the effect of this plant on this fungi germ and the human cells. CI<sub>50</sub> is 4,62 mg/mL and 25 mg/mL for the FMC. The éthanolic extract exercised an antifungic effect on *Candida albicans*.

**Keywords :** *Antifungal activity, Hunteria eburnea, Candida albicans, Plant extract.*

## 1. Introduction

Les mycoses sont de nos jours un réel problème de santé publique. Elles sont de plus en plus difficiles à éradiquer et leurs pathogénités sont en très forte progression. L'apparition de souches résistantes aux antibiotiques usuels, le changement dans le spectre clinique des pathogènes (*Candida*), l'émergence d'un pouvoir pathogène chez des souches habituellement saprophytes de notre environnement et les immunodépressions causées par l'infection à VIH sont les principaux facteurs de cette forte recrudescence [1-2]. Les difficultés socio-économiques que connaissent les pays du tiers monde font que les populations n'ont pas toutes accès aux spécialités pharmaceutiques importées. Face à cette situation, des moyens thérapeutiques traditionnels sont envisagés [3-5]. De nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle, sont aussi efficaces que les médicaments importés par l'Afrique. Pour aider les populations démunies à tirer un réel avantage de l'usage de ces plantes médicinales, de leur pharmacopée, nous avons évalué sur le plan scientifique, l'efficacité de *Hunteria eburnea* puis vérifié sa toxicité. Une enquête ethnobotanique nous a permis de sélectionner cette plante à laquelle on prête des vertus anti infectieuses et qui est très utilisée par les tradithérapeutes dans la Région du Haut Sassandra (Côte d'Ivoire). La présente étude vise à évaluer l'activité anticandidosique et la toxicité de l'écorce de *Hunteria eburnea*, une Apocynaceae de la pharmacopée ivoirienne.

## 2. Matériel et méthodes

### 2-1. Etude monographique de *Hunteria eburnea*

Pour permettre une identification facile de cette plante en milieu naturel, une étude monographique complète a été réalisée ; elle a pris en compte :

- la famille botanique de la plante ;
- les généralités sur cette famille botanique ;
- la description détaillée de la plante ;
- la répartition géographique de cette plante ;
- quelques usages thérapeutiques traditionnels dans la pharmacopée ouest-africaine.

### 2-2-Champignon et cellules testés

La souche de champignon: *Candida albicans*, sur laquelle nous avons fait les tests antifongique, a été fournie par le laboratoire de mycologie de l' UFR des Sciences Médicales de Université Félix Houphouët Boigny de Cocody (Abidjan, Côte d'Ivoire). Ce germe a été isolé des patients en provenance du service des maladies infectieuses du CHU de Treichville. *Candida albicans*, est un champignon opportuniste qui est à l'origine de diverses mycoses cutanées, muqueuses, septicémiques ou viscérales. Ses infections généralisées chez des sujets sévèrement immunodéprimés conduisent souvent à des décès [6-9]. Quant aux cellules HFF, elles ont été fournies par le Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes (LAPM) de Grenoble en France. Ces cellules ont la particularité de former un tapis cellulaire après plusieurs jours de culture (96 heures), on dit alors qu'elles sont confluentes, elles arrêtent de se diviser par inhibition de contact. Lorsque ces cellules sont en culture depuis seulement 24 heures, elles sont dans un état de mitose (cellules en division).

### 2-3. Préparation des extraits

L'écorce de tige de *Hunteria eburnea* a été récoltée, découpée et séchée à l'abri du soleil. Après leur séchage, les écorces ont été broyées et rendu en poudre. Pour obtenir les extraits totaux aqueux, et éthanoliques, la poudre de l'écorce de *Hunteria eburnea* a été extraite comme suit : 100 g de poudre de l'écorce sont introduites dans un bécher de 2000 mL. Nous y avons ajouté 1 litre d'eau distillée. La mixture obtenue est homogénéisée dans un blender (mixer) pendant 10 minutes. L'homogénat obtenu est filtré sur du coton hydrophile puis sur du papier wattman (3 mm). Le filtrat obtenu est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Bücher à la température de 60°C, ce qui nous a permis d'avoir l'extrait total aqueux (ETA). Cinq grammes de l'extrait total aqueux sont constituées et soumises séparément par partition dans 100 mL d'un mélange de solvants (éthanol-eau 70/30 ; v/v). Après décantation, les différentes phases ont été séparées et concentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif. On obtient respectivement les extraits suivants : la phase éthanolique, appelée extrait éthanolique 70 % et la phase résiduelle issue de la partition éthanol-eau, appelée extrait résiduel. L'extraits éthanoliques et aqueux ont été testés séparément sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*.

### 2-4. Calcul du rendement

Le rendement est la quantité d'extrait obtenue à partir de la poudre végétale. Il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante (*Tableau 1*):

$$R = \frac{m}{M} \times 100 \quad (1)$$

*R*: rendement d'extraction ; *m* : masse de l'extrait ; *M* : masse de la poudre fine.

### 2-5. Préparation des milieux de culture

Les cultures de *Candida albicans* ont été faites sur milieu Sabouraud (BIOMERIEUX/ Réf : 51078 : 777666501). L'incorporation des différents extraits végétaux à la gélose Sabouraud a été faite selon la méthode de la double dilution, en tubes penchés [6, 10]. Tous les extraits ont été testés séparément. Chaque série comporte pour chaque extrait végétal 10 tubes tests contenant les extraits végétaux et 2 tubes témoins dont un est sans extrait végétal, servant de contrôle de croissance des germes, l'autre sans germes et sans extrait servant de contrôle de la stérilité du milieu de culture. Pour les 10 tubes tests, les concentrations varient de 50 mg/mL à 0,09766 mg/ mL selon une liaison géométrique de raison 1/2. Après l'incorporation des extraits, tous les 12 tubes de chaque série sont stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes et ensuite inclinés avec petit culot à la température de la salle afin de permettre leur refroidissement et la solidification de la gélose [6, 8, 10].

#### 2-5-1. Essai antimicrobien

L'inoculum est préparé à partir des cultures jeunes de *Candida albicans* (âgés de 48 heures d'incubation). La suspension mère (dite 10<sup>0</sup>) concentrée à 10<sup>6</sup> cellules/mL est d'abord préparée, par homogénéisation d'une colonie de *Candida albicans* dans 10 mL d'eau distillée stérilisée. A partir de la suspension 10<sup>0</sup>, une seconde suspension (10<sup>-1</sup>) est préparée par dilution au 1/10<sup>ème</sup> de la première. Cette dernière est concentrée à 10<sup>5</sup> cellules/mL. Pour chacun des tubes à essai de chaque série des trois extraits de plante, la culture des germes a été faite sur des milieux précédemment préparés par l'ensemencement en stries transversales (jusqu'à épuisement) de 10 µL de la suspension 10<sup>-1</sup>. Cela correspond à 1000 cellules ensemencées.

Les cultures ainsi réalisées ont été incubées à 30°C. Après 48 heures et 72 heures d'incubation à 30°C, les colonies de *Candida albicans* ont été dénombrées par comptage direct grâce à un stylo compteur de colonies (N° de série 23382 de marque Scinceware de Bel-Art). La croissance dans les 10 tubes expérimentaux de chaque série a été évaluée en pourcentage de survivance, par rapport à 100 % de survivance dans le tube témoin de contrôle de croissance [11-14]. Le traitement des données expérimentales a permis de déterminer les paramètres antifongiques suivants : Concentration minimale fongicide (CMF). Concentration pour cinquante pour cent d'inhibition (CI<sub>50</sub>). La méthode de calcul du pourcentage de survivance de *Candida albicans* dans les tubes expérimentaux, peut se résumer par la formule suivante :

$$S = \frac{n}{N} \times 100 \quad (2)$$

*S* : Survivance des germes (en %), *N* : Nombre de colonies dans le tube témoin, *n* : Nombre de colonies dans le tube expérimental [15].

### 2-5-2. Test de toxicité

Pour mesurer la toxicité de l'extrait éthanolique, les cellules HFF (Human Foreskin Fibroblasts) ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits (*CellStar*) à raison de 3000 à 5000 cellules par puits dans 100 µL de milieu D10. Ces cellules sont maintenues en culture pendant 24 heures (cellules en division) ou 96 heures (cellules confluentes). Par la suite elles ont été exposées pendant 24 heures à différentes concentrations (125 -1000 µg/mL) en extrait de plante solubilisé dans du tampon PBS. Cela a été fait en triplicate, aussi pour le témoin de contrôle sans extrait de plante. La viabilité a été déterminée à l'aide du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules métaboliquement actives, qui précipite et donne une couleur violette. La quantité du précipité formé est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Dans chaque puits, le MTT est ajouté à une concentration de 500 µg/mL et incubé pendant 3h à 37°C. Les cristaux de formazan sont solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) 10 mM. La mesure de la densité optique à 544 nm a été faite à l'aide d'un spectrophotomètre Safir (Tecan) ; cette mesure de l'absorbance permettra de déterminer la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement [16]. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de viabilité par rapport au contrôle sans extrait de plante. Taux viabilité = (Abs<sub>544 nm</sub> extrait / Abs<sub>544 nm</sub> témoin) × 100

## 3. Résultats

### 3-1. Etude monographique de la plante

#### 3-1-1. La Famille des Apocynaceae

Les Apocynaceae sont actuellement l'objet d'un grand nombre d'études botaniques, chimiques et pharmacologiques dans le monde entier, car beaucoup d'espèces sont riches en alcaloïdes ou en hétérosides présentant une grande activité physiologique. Ce sont des lianes ligneuses, des arbrisseaux, des arbustes ou des arbres, rarement des herbes. Les feuilles sont simples entières, opposées ou verticillées, sans stipules. Les inflorescences sont généralement cymeuses. Les fruits sont des baies, des drupes, des capsules ou des follicules. La flore de Côte d'Ivoire compte 74 espèces d'Apocynaceae [17].

### 3-1-2. *Hunteria eburnea*. Pichon

Nom vernaculaire Bété: Krigbiyi

#### 3-1-2-1. Description

*Hunteria eburnea* est un arbuste ou petit arbre à écorce lisse très mince, entaille brune, latex blanc. Les feuilles sont simples, opposées, elliptiques à oblongues glabres, il y a 12 à 24 paires de nervures. Les inflorescences sont en petit cymes terminales ou axillaires. Les fleurs sont blanches odorantes de Décembre à Avril. Les fruits sont globuleux accouplés, jaune orangé à maturité de diamètre environ 5 cm. Dans le fruit il y a 10 à 12 graines enfouies dans une pulpe gélatineuse. C'est une espèce des sous-bois des forêts humides (**Figure 1**).

#### 3-1-2-2. Répartition géographique

Cette espèce est représentée dans les forêts denses humides africaines.

#### 3-1-2-3. Utilisation thérapeutique:

Les écorces de tige sont utilisées après décoction en boisson contre les maladies microbiennes dans la région de Daloa (Côte-d'Ivoire) et contre le paludisme. En Sierra Leone, on prépare avec l'écorce de *Hunteria eburnea* un tonique amer qui est employé comme stomachique et en lotion pour traiter la fièvre.



A. Tronc de *Hunteria eburnea*

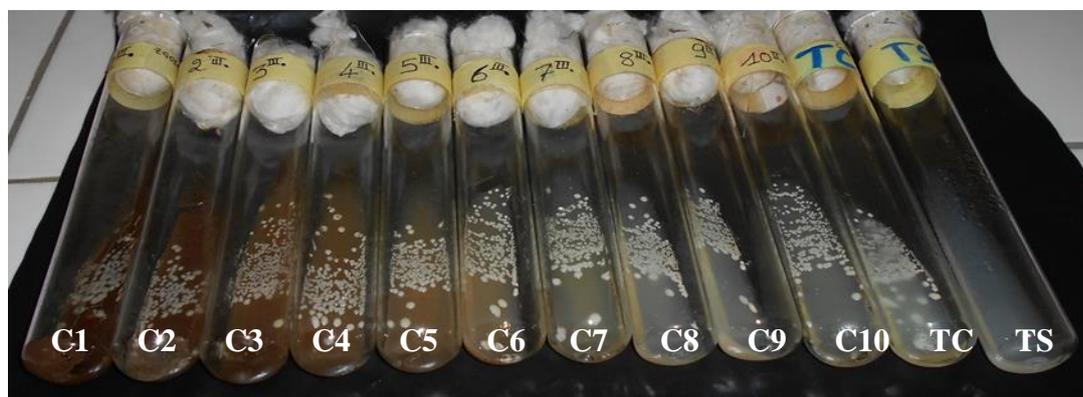
B. Rameau feuillé de *Hunteria eburnea*

**Figure 1** : *Hunteria eburnea* A et B

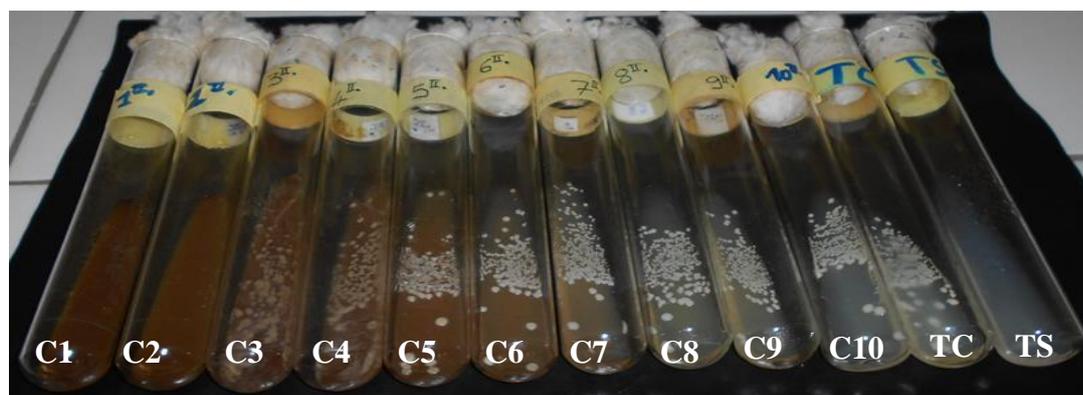
### 3-2. Tests antifongiques

Après 72 heures d'incubation à 30°C, on observe comparativement au témoin, une baisse progressive du nombre de colonies de *Candida albicans* au fur et à mesure que les concentrations des extraits végétaux augmentent dans les tubes expérimentaux. Cela est observé pour toutes les séries des deux extraits (**Figure 2 et Figure 3**).

Des inhibitions nettes et effectives ont été obtenues à différentes concentrations selon les extraits. Les valeurs des CMF (concentration minimale fongicide) pour les deux extraits sont consignées dans le **Tableau 2**. Les données expérimentales traduites sous forme de courbes de sensibilité sont résumées à la **Figure 4**.



**Figure 2 :** Action dose réponse de l'extrait total aqueux de *Hunteria eburnea* sur la croissance in vitro de *Candida albicans* après 72 heures



**Figure 3 :** Action dose réponse de l'extrait ethanolique 70% de *Hunteria eburnea* sur la croissance in vitro de *Candida albicans* après 72 heures

**Tableau 1 :** Rendement des différents extraits

Solvant	Masse (g)		
	Poudre végétale	Extraits	Rendement (%)
Eau	200	20	10
Ethanol 70 %	5	2	40

**Tableau 2 :** Valeurs des paramètres antifongiques des différents extraits de *Hunteria eburnea* à 30°C et à 72 H d'incubation des cultures de *Candida albicans*

Différents extraits de <i>hunteria eburnea</i>	Paramètre antifongiques		
	CI <sub>50</sub>	CMF	CMI
ETA	> 50	> 50	> 50
EE 70 %	4,62 mg/mL	25 mg/mL	25 mg/mL

De façons générales, la courbe de l'extrait éthanolique présente une allure décroissante avec une pente un peu forte (Figure 4).

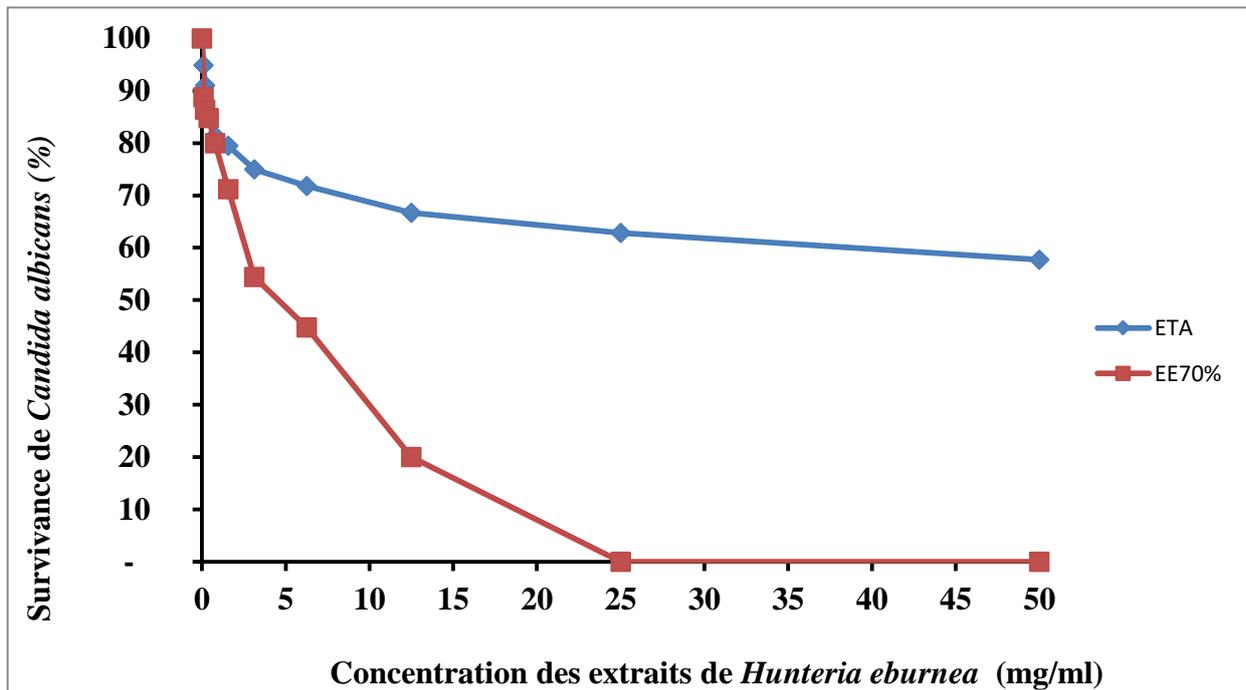


Figure 4 : Sensibilité de *Candida albicans* aux extraits de *Hunteria eburnea*

### 3-3. Test de toxicité avec l'extrait éthanolique 70 %

L'extrait éthanolique de *Hunteria eburnea* n'a pas d'effet toxique sur les cellules humaines qui ne se divisent pas (cellules confluentes). Par contre lorsque les cellules sont en division on a une légère baisse du taux de viabilité (Figure 5).

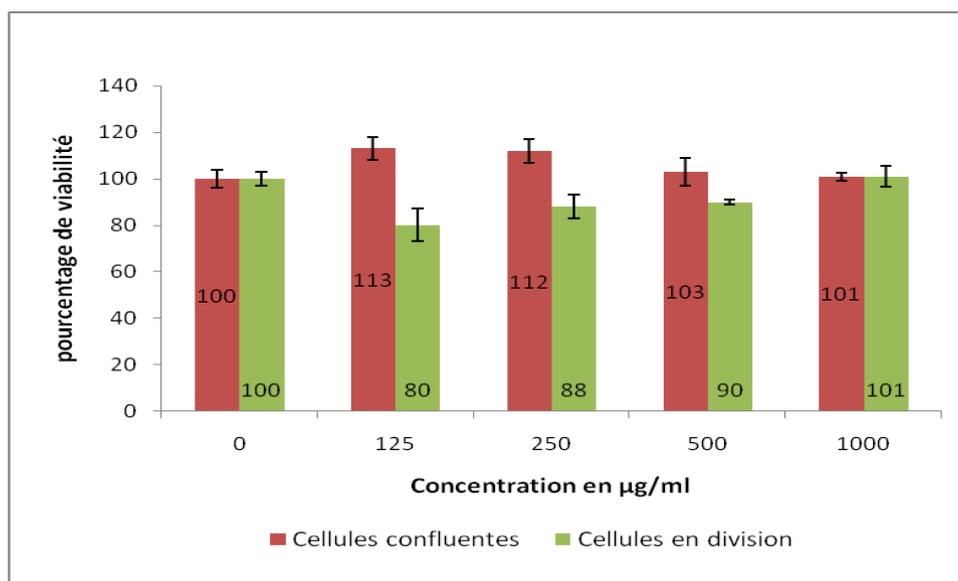


Figure 5 : Taux de viabilité des cellules HFF en présence d'extrait éthanolique de *Hunteria eburnea*

#### 4. Discussion

L'objectif de ce travail était de vérifier les vertus anti-infectieuses des effets de l'extrait aqueux brut de *Hunteria eburnea* puis de la fraction hydro-ethanolique (70 %) sur *Candida albicans* et de sa toxicité sur les cellules HFF. Pour cela nous avons premièrement préparé l'extrait aqueux étant donné que l'eau est le solvant le plus utilisé pour la préparation des recettes traditionnelles et ensuite l'extrait ethanolique 70 %. L'analyse des résultats des tests antifongiques avec les extraits de *Hunteria eburnea* montre que *Candida albicans* est plus résistant à l'extrait aqueux (CMF > 50 mg/mL), mais est sensible à l'extrait ethanolique 70 % avec pour concentration minimale fongicide (CMF) égale à 25 mg/mL. Pour l'extrait ethanolique 70 %, nos résultats montrent qu'il y a une diminution progressive du nombre de colonies en fonction de l'augmentation de la concentration des différents extraits dans les tubes. Ce qui montre que *Candida albicans* est sensible à l'extrait ethanolique 70 % selon une relation dose-réponse. Le rapport d'efficacité établi sur la base des CMF montre que :  $CMF_{Eaq} / CMF_{Eeth} = 50/25 = 2$  ; Ce qui signifie que l'extrait ethanolique est 2 fois plus actif que l'extrait aqueux.

De cette analyse, on peut donc déduire que l'EE70% est plus actif. Une différence de composition entre les deux extraits, liée au mode d'extraction pourrait expliquer ces résultats [18]. Cette observation est soutenue par plusieurs travaux qui ont montré que l'éthanol permet une meilleure concentration des principes actifs [19-21]. En effet, selon ces auteurs, lorsqu'on passe de l'extrait total aqueux à l'extrait ethanolique, certains groupes chimiques sont éliminés et d'autres sont concentrés. Ces principes actifs qui sont des molécules solubles dans l'éthanol pourraient être soit des terpènes, soit des alcaloïdes. Nous pouvons dire que notre démarche est acceptable car elle nous a permis d'améliorer considérablement l'activité de *Hunteria eburnea* en passant de l'extrait total aqueux à l'extrait ethanolique. Le test de toxicité permet de dire que l'extrait ethanolique de *Hunteria eburnea* n'a pas d'effet toxique sur les cellules humaines qui ne se divisent pas (cellules confluentes) ; avec les barres d'erreurs qui se chevauchent, il serait prématuré d'affirmer qu'on a une réelle hausse du taux de viabilité. Par contre lorsque les cellules sont en division on a une légère baisse du taux de viabilité, cette légère baisse qu'on observe aux faibles concentrations en extrait de plante (125 µg/mL, 250 µg/mL et 500 µg/mL) pourrait être dû à la présence dans l'extrait d'une molécule qui aurait un petit effet néfaste sur la mitose. Quand la concentration augmente, il y'aurait peut être une retro-inhibition de la molécule. Ou alors l'effet néfaste pourrait être masqué par l'effet stimulant d'autres molécules. La  $CI_{50}$  de l'extrait ethanolique de *Hunteria eburnea* sur *Candida albicans* est de 4,62 mg/mL à cette concentration là, on peut affirmer que cette plante n'est pas toxique pour les cellules humaines.

#### 5. Conclusion

Cette étude nous a permis de montrer que l'extrait ethanolique de *Hunteria eburnea* Pichon (Apocynaceae) possède une activité antifongique sur *Candida albicans* et n'est pas toxique sur les cellules humaines (HFF). A 72 heures d'incubation à 30°C, il possède une activité inhibitrice obtenue à 25 mg/ml et une  $CI_{50}$  de 4,62 mg/ml. Cette étude montre également que l'éthanol est le solvant qui concentre mieux les principes actifs de notre plante. Cette étude a aussi permis de montrer que notre méthode d'extraction est une voie qui permet de concentrer les principes actifs et donc d'améliorer l'activité anticandidosique obtenue avec l'extrait totale aqueux sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*.

**Liste des abréviations**

*Cl<sub>50</sub>* : concentration inhibitrice pour 50 % ; *CMF* : concentration minimale fongicide ; *Eaq* : extrait aqueux ;  
*Eeth* : extrait éthanolique

**Références**

- [1] - J. C. GARRIGUES, E. PEREZ, M.D. LINAS, RICOLATTES, J. P. SEGUELE, A. LATTES, Tests *in vitro* et études quantitatives de relation structures-activité (QSAR) pour la détermination des propriétés anti-aspergillaires d'une série d'analogues de glycolipides. *J. Mycol. Méd.* 6(1996) 111-117.
- [2] - A. L. PIERQUIN, Mycoses opportunistes et immunodépression. Thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1, France, (2010) 96 p.
- [3] - Z. KABORE, K. MILLOGO, Etude antibactérienne in vitro d'extraits alcaloïdiques de *Holarrhena floribunda* (Apocynaceae) vis-à-vis d'*Escherichia coli* Entéropathogène, Sérotype 0127. *Revue Pharmacopée et Médecine traditionnelles africaines*, IX (1997) 17-23.
- [4] - K. AKOUA, N. GUESSENND, V. GBONON, A. Y. FAYE-KETTE, M. DOSSO, Methicillini-resistant of *S. aureus* activity in Abidjan (1998-2001): A new hospital problem. *Medecines Maladies Infectieuses*, 34(3), (2004) 132-36.
- [5] - G. M. AHON, Evaluation et essai d'optimisation de l'activité antifongique des extraits de *Terminalia superba* Engl. Et Diels (Combretaceae) sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*. Thèse Université Felix Houphouët Boigny, Abidjan Côte d'Ivoire, (2014) 117p.
- [6] - D. GUILLEMOT, P. MAUGENDRE, V. HAUVIN, T. C. SERME, Consommation des antibiotiques en France. *BEH* 3233 (2004) 141-147.
- [7] - A. K. M. KRA, "Evaluation et amélioration par séquençage chromatographique d'une action antifongique de MISCA contre *Aspergillus fumigatus*". Thèse. Pharma, Bioch. Univ. Abidjan, (2001) 126 pp.
- [8] - P. M. THES, "Recherche du profil antimicrobien des huiles de G243 et de MISCA sur quelques agents de mycoses de la peau". Mémoire de DEA de biotechnologies, option pharmacologie-microbiologie. Université de Cocody, Abidjan, Cote d'Ivoire (2001) 34p.
- [9] - G. N. ZIRIHI, A. KRA, F. GUEDE-GUINA, "Evaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (LAMARCK) O. KUNZE (ASTERACEAE) << PYMI >> sur la croissance in vitro de *Candida albicans*". *Revue de Med. et Pharm. Afr.* 17 (2003) 11-18.
- [10] - R. HOLT, "Laboratory test of antifungal drug". *J. Clin. Path.* 18 (1975) 767-774.
- [11] - P. LECLERC, C. ARTIGOU, S. GAGNEBIEN, O. DE FENOYL, J. ROCHEMAURE, "Aspergilloses Broncho-pulmonaires", *Revue générale poumon-coeur*, Masson Paris., 5 (1982) 25-33.
- [12] - B. DUPONT, "Mycoses et SIDA, Résumé des rapports, communications affichées" Institut Pasteur-Paris, (1987) 16. 4-9.
- [13] - S. CROMBERG, J. BEYLOUT, M. RAY, "Maladies infectieuses". Ed. Mason, (1988) 232-625.
- [14] - J. A. ACKAH, "Spectre anti-infectieux de MISCA-F3 sur la croissance *in-vitro* de *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton rubrum*". Mémoire de DEA de biotechnologies, option pharmacologie-microbiologie. Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, (2004) 34p.
- [15] - G. N. ZIRIHI, A. KRA, E. T. DADIE, Etude botanique et évaluation des activités antifongiques de *Mitracarpus villosus* (MV) (Rubiaceae) et *Spermacoce verticillata* (SV) (Rubiaceae) sur la croissance *in vitro* de *A. fumigatus*. *Rev. Med. Pharm. Afr.* (2007) 9-17.

- [16] - T. MOSSMAN, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of immunological methods*, 65, (1983) 55-63.
- [17] - L. AKE-ASSI, Flore de la Cote d'Ivoire : Catalogue systématique, biogéographie et écologie. Conservatoire et jardin botanique, Genève, Switzerland ; *Boissera*, 57 (2001), volume I, 396p.
- [18] - J. H. S. THANGARA, O. ADJEI, B. W. ALLEN, F. PORTAELS, *In vitro* activity of ciprofloxacin, Sparfloxacin, Ofloxacin, Amikacin and Rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*; *J. Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 (2), (2000), 231-233.
- [19] - J. L. A. MOROH, C. BAHI, K. DJE, Y. G. LOUKOU, F. GUEDE-GUINA, Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance *in-vitro* des souches d'*Escherichia coli*. *Bull de la SR des Scien de Liège.*, 77 (2008) 44-61.
- [20] - I. BAGRE, C. BAHI, K. OUATTARA, G. N. ZIRIHI, A. J. DJAMAN, A. COULIBALY, J. D. N'GUESSAN, Etude botanique et exploration de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh. sur la croissance *in vitro* de *Cryptococcus neoformans*. *Phytothérapie*, 9 (2011) 136-141.
- [21] - A. KRA, G. M. AHON, D. DJO-BI, S. OUATTARA, A. COULIBALY, A. J. JOSEPH, Antifungal activities of medicinal plants extracts of Ivorian. *J.of. intercul. Ethnopharmacol*, 3(4), (2014) 159-166.