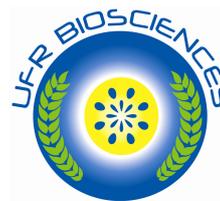


REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union - Discipline - Travail

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE
DE COCODY-ABIDJAN



UFR BIOSCIENCES
22 BP : 582 Abidjan 22
Tél. /Fax : 22 44 44 73
Courriel : biosciences@univ-cocody.ci
ufbiosciences@yahoo.fr

N° d'ordre : 598/2009

LABORATOIRE DE PHARMACODYNAMIE BIOCHIMIQUE

THESE

Présentée à l'UFR Biosciences pour obtenir le titre de

DOCTEUR D'UNIVERSITE
SPECIALITE : BIOCHIMIE - MICROBIOLOGIE

Par
BAGRE ISSA
THEME :

IDENTIFICATION DE SUBSTANCES ANTIFONGIQUES DE *MORINDA MORINDOIDES* (Baker) Milne-Redhead (*Rubiaceae*)

1 - UNE CHROMATOGRAPHIE PROSPECTIVE

2 - ACTIVITE ANTI-INFECTIEUSE SUR LA CROISSANCE *IN VITRO* DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS*, DE *CANDIDA ALBICANS* ET DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*, TROIS GERMES DE GRANDE CONTAGIOSITE.

Soutenue publiquement, le 1^{er} Avril 2009 devant le jury composé de :

M. YANGNI-ANGATE K. H.	Professeur Titulaire	Université de Bouaké	Président
M. FREDERIC GUEDE GUINA	Professeur Titulaire	Université de Cocody	Directeur de Thèse
M. TOURE SEIKOU AMADOU	Professeur Titulaire	Université de Cocody	Rapporteur
M. EDOH VINCENT	Maître de Conférences Agrégé	Université de Cocody	Examineur
M. DJAMAN ALLICO JOSEPH	Maître de Conférences	Université de Cocody	Examineur
M. NIAMKE SEBASTIEN L.	Maître de Conférences	Université de Cocody	Examineur

DEDICACES

A mon père

Monsieur BAGRE KOUAME

Pour m'avoir toujours soutenu, encouragé dans mes études et pour les sacrifices que tu as consentis pour l'éducation de tes enfants.

A la mémoire de ma mère

Madame KANAON EBOU

Tu as toujours fait des sacrifices pour me sortir des difficultés. Continue toujours à prier pour nous à partir de ta nouvelle demeure.

A mon tuteur et père

Monsieur TRAORE DJESSE

Tu as bien voulu m'accepter comme ton fils. Cette thèse est aussi la tienne.

A mes tuteurs

Mesdames TRAORE FATOU, TRAORE MARIAM et TATA KONE

Pour tout le bien que vous me faites.

A Eve

Tu as sûrement été le « catalyseur » du sursaut d'orgueil qui a ranimé en moi la flamme de l'effort pendant les périodes de lassitude.

A mes frères et sœurs

Salif, Tata, MT, Inzbill, Bob, Hemty, Amadou, La vieille, Tantie, Lacina, Eve, Natou, Mariam, Sita, Amy, Salimata, Lasso, Adama, Noel, Moulaye.

Pour m'avoir soutenu tout le long de ces dures années de labeurs.

A mes ami(e)s

Kady, Méité, Kipré, Tuo, Gouless, Fofana, Sangaré, Ali, Bema, Gnahoué, Voko, Bakary, Lacinan, Coulibaly, Sybah, Blandine, Diane, Firmin, Mariette, Eugénie, Maï, Youan Bi
.....etc...

Merci pour votre soutien moral.

REMERCIEMENTS

- A Monsieur **Frédéric GUEDE-GUINA**, Professeur Titulaire de Biochimie, Directeur Honoraire du Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université de Cocody. Directeur de thèse.

« Le savoir est la seule richesse qu'on peut entièrement donner sans jamais la diminuer. »

Amadou Hampaté Ba

Vous m'avez enseigné 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.

Vous n'avez ménagé aucun effort malgré vos nombreuses occupations pour me guider et m'encadrer dans cette voie que j'ai choisie.

J'ai, ici, l'honneur d'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.

Merci très cher maître.

- A Monsieur **YANGNI-ANGATE Koffi Hervé**, Professeur Titulaire à l'Université de Bouaké, Directeur de l'URES de Korhogo.

Professeur, nous mesurons à sa juste valeur l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations.

Veuillez recevoir ici, nos respectueux hommages.

- A Monsieur **TOURE Seikou Amadou**, Professeur Titulaire de Chimie organique et structurale à l'UFR SSMT de l'Université de Cocody. Chef du groupe de chimie fine et synthèse organique.

C'est un honneur que vous nous faites en acceptant de participer au jury de cette thèse.

Votre jugement éclairé nous permettra sûrement d'apprendre d'avantage. Soyez assuré de l'expression de notre sincère et profond respect.

- A Monsieur **DJAMAN Allico Joseph**, Maître de Conférences de Biochimie-parasitologie, Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université de Cocody. Chef de service de Biochimie médicale et fondamentale à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Je vous dis sincèrement et respectueusement merci, pour m'avoir donné de 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 pour avoir apporté votre expertise dans la finition de ce document.

- A Monsieur **EDOH Vincent**, Maître de Conférences Agrégé de Bactériologie à l'UFR des Sciences Médicales de l'Université de Cocody. Chef de Service du Laboratoire de Bactériologie –Virologie du CHU de Treichville.

Malgré vos nombreuses occupations, vous avez accepté de juger ce travail. Depuis lors nous avons des échos favorables à votre égard. Soyez en sûre, nous sommes fiers de vous compter dans ce jury.

- A Monsieur **NIAMKE Sébastien Lamine**, Maître de Conférences et Directeur du Laboratoire de Biotechnologies de l'UFR Biosciences de l'Université de Cocody. Vous marquez assurément de votre empreinte la vie de nombreux Etudiants dans les Universités Ivoiriennes. Pour la qualité de votre contribution scientifique à notre formation, notre admiration pour vous ne fait que grandir à chaque instant. Nous vous adressons nos sincères remerciements.

- A Monsieur **LOUKOU Yao Guillaume**, Maître de Conférences à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Cocody. Chef de service du Laboratoire National de Santé Publique.

C'est un privilège pour nous de bénéficier de votre Savoir. Tout Etudiant ambitieux doit être heureux de vous avoir comme Formateur. Recevez nos remerciements sincères.

- A Monsieur **COULIBALY Adama**, Maître de Conférences au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université de Cocody. Votre ardeur au travail, votre esprit méthodique et vos suggestions ont été d'un apport dans la finalisation de cette thèse. Nous vous remercions du plus profond du cœur.

- A Monsieur **NGUESSAN Jean David**, Maître de Conférences au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université de Cocody. Pour vos conseils, soutien moral et pour avoir participé à la finition de ce travail. Merci Professeur.
- A Monsieur **BAHI Calixte**, Maître-assistant au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université de Cocody. Mon encadreur. Vous avez été chargé de conduire mes premiers pas dans la Recherche. Tout au long de la complicité qui a été la notre, vous vous êtes conduit envers moi plutôt en grand frère qu'en maître. Vous vous êtes mis tout entièrement à la disposition de l'équipe que vous dirigez. J'ai été le bénéficiaire de votre amour pour le travail bienfait. Tout ce que je dirai ici ne suffira pas à vous remercier. Seul Dieu est capable de vous récompenser.
- A Monsieur **KRA Adou Koffi Mathieu**, Maître-assistant au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université de Cocody. Pour son esprit d'ouverture. Pour m'avoir inculqué cette notion de Microbiologie qui m'a permis de mener à terme mes recherches. Pour vos conseils et remarques pertinentes qui m'ont guidé tout au long de mes travaux. Sans oublier ses assurances qui me remontaient chaque fois que le découragement me gagnait. Merci cher maître.
- A Monsieur **ZIRIHI Guédé Noël**, Maître-assistant au Laboratoire de Botanique de l'UFR Biosciences de l'Université de Cocody. Notre Botaniste maison, pour m'avoir guidé dans mes différentes extractions tout au long de mes travaux de recherche. Pour m'avoir rassuré chaque fois qu'un résultat nous semblait non-conforme. Merci cher maître.
- A Monsieur **DJYH Bernard Nazaire**, Assistant au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université de Cocody. Mon frère. Pour vos conseils et votre ouverture, toujours prêt à aider son prochain. Merci Docteur.

- A Messieurs **TREBISSOU, YAPO, BIDIE, YEO, YAPI, FOUNZEGUE, OUATTARA, DOUMBIA, THES, BLA** et **OTOKORE**, Enseignants au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université de Cocody. Pour votre soutien moral et scientifique.

AVANT PROPOS

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'Unité de Formation et de Recherche (UFR) Biosciences de l'Université de Cocody sous la direction du Professeur Frédéric GUEDE-GUINA. Il s'inscrit dans le programme de mise en valeur de la pharmacopée africaine pour aider au développement de Médicaments Traditionnellement Améliorés (MTA), fiables et à la portée de la bourse de nos populations.

Notre mission dans ce travail était de montrer le pouvoir antiinfectieux d'une plante utilisée traditionnellement comme antidiarrhéique qui s'est effectivement avérée efficace contre les diarrhées infectieuses comme le choléra, les diarrhées à *Candida* et à entérobactéries. A partir d'extrait brut, nous avons par la méthode bioguidée, piégé les molécules actives sur les germes fongiques dans une fraction chromatographique.

Nos objectifs spécifiques nous ont amené à étudier les activités de *Morinda morindoides* contre les germes fongiques comme *Aspergillus*, *Candida* et *Cryptococcus* qui sont très contaminants et à la base des mycoses extrêmement mortelles, surtout chez les malades séropositifs.

Notre méthode de chromatographie prospective nous a permis de confirmer le pouvoir antifongique de *Morinda morindoides*, une rubiacée de nos brousses.

TABLE DES MATIERES

DEDICACES	I
REMERCIEMENTS.....	III
AVANT-PROPOS	VIII
TABLE DES MATIERES	X
INTRODUCTION.....	1
1- Intérêt du sujet	2
2- Objectifs	4
3- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
I- GENERALITES SUR LES MYCOSES.....	6
1-1- Nomenclature des mycoses	6
1-2- Habitat des champignons pathogènes.....	7
1-3- Distribution géographique des mycoses et de leurs agents.....	7
1-4- Adaptation à la vie parasitaire et pouvoir pathogène	8
1-4-1- Modes de contamination et de dissémination	8
1-4-2- Colonisation des muqueuses	9
1-4-3- Pénétration dans l'organisme	10
1-5- Interférence avec les mécanismes de défense de l'hôte	11
1-5-1- Mécanismes de défense non spécifique : réponse inflammatoire	11
1-5-2- Mécanismes de défense spécifique : réponses immunitaires humorales et cellulaires	11
1-6- Facteurs favorisants	12
1-6-1- Facteurs généraux.....	12
1-6-2- Rupture des barrières cutanée et muqueuse	12
1-6-3- Perturbation de la flore endogène.....	13
1-6-4- Perturbation de la fonction des neutrophiles, des monocytes et des macrophages	13
1-6-5- Altération des défenses immunitaires à médiation cellulaire	14
1-7- Classification clinique et aspects pathologiques des mycoses.....	14
1-7-1- Mycoses superficielles	14
1-7-2- Dermatophyties	14
1-7-3- Candidoses	15
1-7-4- Pityriasis versicolor	16
1-7-5- Mycoses sous-cutanées	16
- Chromoblastomycose.....	16

- Sporotrichose	16
- Mycétomes	17
1-7-6- Mycoses profondes.....	17
- Cryptococcose.....	17
- Aspergilloses.....	18
- Zygomycoses	18
- Histoplasmoses	18
- Coccidioïdomycose.....	19
- Blastomycose	19
- Paracoccidioïdomycose.....	19
1-8- Diagnostic des mycoses.....	20
1-8-1- Diagnostic chimique.....	20
1-8-2- Diagnostic mycologique.....	20
- Prélèvements médicaux	21
- Examen direct	22
- Histopathologie	22
- Ensemencement et isolement.....	22
- Identification du champignon	23
1-8-3- Moyens diagnostiques indirects	24
- Recherche de la réactivité cutanée	24
- Réactions sérologiques.....	24
- Recherche des antigènes circulants.....	25
- Biologie moléculaire	25
1-9- Agents des mycoses les plus fréquentes	26
1-9-1- Les levures.....	26
1-9-2- Les dermatophytes.....	27
1-9-3- Les Aspergillus.....	28
1-10- Les antifongiques	28
1-10-1- Antifongiques utilisés en pratique dermatologique.....	30
- Les allylamines	30
- Les polyènes.....	33
- Morpholines	35
- Cyclopiroxolamine.....	36
- D'autres familles d'antifongiques sont à l'étude	37

- Les antifongiques locaux	37
- Traitements d'appoint	37
- Schémas thérapeutiques	38
- Médicaments d'avenir.....	38
1-10-2- Traitements des candidoses	38
- Candidoses cutanées	38
- Candidoses des muqueuses	39
- Candidoses cutanéomuqueuses chroniques	39
- Candidoses des nourrissons	40
1-10-3- <i>Malassezia furfur</i>	40
1-11- Conclusion	40
2- GENERALITES SUR MORINDA MORINDOIDES	42
1- Position systématique	42
2- Répartition géographique	43
3- Utilisations thérapeutiques.....	43
4- Molécules isolées à partir des feuilles de <i>Morinda morindoides</i>.....	43
II- MATERIEL ET METHODES.....	46
1- Matériel	47
1-1- Matériel biologique.....	47
1-1-1- Substance végétale	47
1-1-2- Germes testés.....	47
1-2- Milieu de culture.....	47
2- Méthodes.....	48
2-1- Préparations des extraits végétaux.....	48
2-1-1- Préparation de L'extrait total aqueux	48
2-1-2- Préparation de l'extrait éthanolique 70%	48
2-1-3- Préparations des extraits acétatique et acétatique H ₂ O	48
2-1-4- Fractionnement de l'extrait acétatique	49
2-2- Préparation des milieux de culture	54
2-2-1- Préparation de la gélose Sabouraud.....	54
2-2-2- Incorporation des extraits végétaux à la gélose et ensemencement des germes	54
2-3- Dénombrement des colonies.....	57
2-4- Analyse statistique des données	57
2-5- Chromatographie sur couche mince	57

2-6- Tri phytochimique	58
2-6-1- Recherches des alcaloïdes	58
2-6-2- Recherche des polyphénols	59
2-6-4- Recherche des flavonoïdes	60
2-6-5- Recherche des saponosides	61
2-6-6- Recherche des quinones	61
2-6-7- Recherche des stérols	62
III- RESULTATS	64
III-1 INFLUENCE DE L'EXTRAIT TOTAL AQUEUX (Eaq) DE MORINDA MORINDOIDES SUR LA CROISSANCE IN VITRO DE C. ALBICANS, C. NEOFORMANS ET A.FUMIGATUS	65
A- Effet de l'Eaq sur <i>C. albicans</i>	69
B- Effet de l'Eaq sur <i>C. neoformans</i>	70
C- Effet de l'Eaq sur <i>A. fumigatus</i>	70
D- Antifongigrammes et paramètres antifongiques comparés	71
III-2 INFLUENCE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE 70% (Eeth) DE MORINDA MORINDOIDES SUR LA CROISSANCE IN VITRO DE C. ALBICANS, C. NEOFORMANS ET A. FUMIGATUS.....	73
A- Effet de l'Eeth sur <i>C. albicans</i>	75
B- Effet de l'Eeth sur <i>C. neoformans</i>	76
C- Effet de l'Eeth sur <i>A. fumigatus</i>	77
D- Antifongigrammes et paramètres antifongiques comparés	78
III-3 INFLUENCE DES EXTRAITS ACETALIQUE H₂O (Eac H₂O) ET ACETALIQUE (Eac) DE MORINDA MORINDOIDES SUR LA CROISSANCE IN VITRO DE C. ALBICANS, C. NEOFORMANS ET A. FUMIGATUS.....	80
1- Effet de l'extrait acétalique (Eac)	81
2- Effet de l'extrait acétalique H ₂ O (Eac H ₂ O)	81
A- Effet de l'Eac sur <i>C. albicans</i>	82
B- Effet de l'Eac sur <i>C. neoformans</i>	83
C- Effet de l'Eac <i>A. fumigatus</i>	84
D- Effet de l'Eac H ₂ O sur <i>C. albicans</i>	86
E- Effet de l'Eac H ₂ O sur <i>C. neoformans</i>	87
F- Effet de l'Eac H ₂ O sur <i>A. fumigatus</i>	88
G- Antifongigrammes et paramètres antifongiques comparés	90
III-4 INFLUENCE DES fractions 1,2,3 et 4 DE MORINDA MORINDOIDES SUR LA CROISSANCE IN VITRO DE C. ALBICANS, C. NEOFORMANS ET A. FUMIGATUS.....	94
1- Effet de la F1	95

2- Effet de la F2.....	95
3- Effet de la F3.....	96
4- Effet de la F4.....	96
5- Paramètres antifongiques comparés.....	96
A- Effet de la fraction 1 sur <i>C. albicans</i>	97
B- Effet de la fraction 1 sur <i>C. neoformans</i>	98
C- Effet de la fraction 1 sur <i>A. fumigatus</i>	99
D- Effet de la fraction 2 sur <i>C. albicans</i>	101
E- Effet de la fraction 2 sur <i>C. neoformans</i>	102
F- Effet de la fraction 2 sur <i>A. fumigatus</i>	103
G- Effet de la fraction 3 sur <i>C. albicans</i>	105
H- Effet de la fraction 3 sur <i>C. neoformans</i>	106
I- Effet de la fraction 3 sur <i>A. fumigatus</i>	107
J- Effet de la fraction 4 sur <i>C. albicans</i>	109
K- Effet de la fraction 4 sur <i>A. fumigatus</i>	110
L- Effet de la fraction 4 sur <i>C. neoformans</i>	111
M- Courbes de sensibilité et paramètres antifongiques comparés	113
III-5-RECAPITULATIF DES RESULTATS.....	117
III-6 TRI PHYTOCHIMIQUE.....	123
III-7 CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE L'Eac ET DE LA F1	125
IV- DISCUSSIONS ET CONCLUSION.....	126
1- DISCUSSION.....	127
2-CONCLUSION	133
V- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	134
ANNEXE.....	152
Photographie 1 : Aspect des cultures de <i>C. neoformans</i> après 48 heures d'incubation à 30°C.....	153
Photographie 2 : Aspect des cultures de <i>A. fumigatus</i> après 48 heures d'incubation à 30°C.....	154
Photographie 3 : Aspect des cultures de <i>C. albicans</i> après 48 heures d'incubation à 30°C	155

LISTE DES ABREVIATIONS

CI₅₀	= Concentration Inhibitrice pour 50%
CM	= Carrés moyens
CMF	= Concentration Minimale Fongicide
ddl	= degré de liberté
Eac	= Extrait acétatique
Eac H₂O	= Extrait acétatique H ₂ O
Eaq	= Extrait total aqueux
Eeth	= Extrait éthanolique 70%
F1	= Fraction 1
F2	= Fraction 2
F3	= Fraction 3
F4	= Fraction 4
Fcal	= F calculé
Ftab	= F tableau
Sc	= Somme des carrés
Sdv	= Somme des variations
T	= Témoin
TS	= Témoin Sabouraud

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Morinda morindoides</i> (Back.) Milne-Redh. (<i>Rubiaceae</i>)	44
Figure 2 : Diagramme de préparation de l'Eaq.....	50
Figure 3 : Diagramme de préparation de l'Eeth.....	51
Figure 4 : Diagramme de préparation de l'Eac et l'Eac H ₂ O.....	52
Figure 5 : Diagramme de préparation de la F1, la F2, la F3 et la F4	53
Figure 6 : Schéma de la double dilution.....	54
Figure 7 : Schéma de la préparation de l'inoculum	55
Figure 8 : L'acide gallique	59
Figure 9 : Le cholestérol	62
Figure 10 : Sensibilité de <i>Candida albicans</i> à l'Eaq.....	68
Figure 11 : Sensibilité de <i>Cryptococcus neoformans</i> l'Eaq.....	69
Figure 12 : Sensibilité de <i>Aspergillus fumigatus</i> l'Eaq.....	70
Figure 13 : Sensibilité comparée de <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> et <i>Cryptococcus neoformans</i> à l'Eaq.....	71
Figure 14 : Sensibilité de <i>Candida albicans</i> à l'Eeth.....	75
Figure 15 : Sensibilité de <i>Cryptococcus neoformans</i> à l'Eeth	76
Figure 16 : Sensibilité de <i>Aspergillus fumigatus</i> à l'Eeth.....	77
Figure 17 : Sensibilité comparée de <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> et <i>Cryptococcus neoformans</i> à l'Eeth.....	78
Figure 18 : Sensibilité de <i>Candida albicans</i> à l'Eac	82
Figure 19 : Sensibilité de <i>Cryptococcus neoformans</i> à l'Eac	83
Figure 20 : Sensibilité de <i>Aspergillus fumigatus</i> à l'Eac	84
Figure 21 : Sensibilité comparée de <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> et <i>Cryptococcus neoformans</i> à l'Eac.....	85
Figure 22 : Sensibilité de <i>Candida albicans</i> l'Eac H ₂ O.....	86
Figure 23 : Sensibilité de <i>Cryptococcus neoformans</i> l'Eac H ₂ O	87
Figure 24 : Sensibilité de <i>Aspergillus fumigatus</i> l'Eac H ₂ O	88
Figure 25 : Sensibilité comparée de <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> et <i>Cryptococcus neoformans</i> à l'Eac H ₂ O.....	89
Figure 26 : Activité comparée de l'Eac et de l'Eac H ₂ O sur la croissance de <i>Cryptococcus neoformans</i>	90
Figure 27 : Activité comparée de l'Eac et de l'Eac H ₂ O sur la croissance de <i>Candida albicans</i>	91
Figure 28 : Activité comparée de l'Eac et de l'Eac H ₂ O sur la croissance	

de <i>Aspergillus fumigatus</i>	92
Figure 29 : Sensibilité de <i>Candida albicans</i> à la F1	97
Figure 30 : Sensibilité de <i>Cryptococcus neoformans</i> à la F1	98
Figure 31 : Sensibilité de <i>Aspergillus fumigatus</i> à la F1	99
Figure 32 : Sensibilité comparée de <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> et <i>Cryptococcus neoformans</i> à la F1	100
Figure 33 : Sensibilité de <i>Candida albicans</i> à la F2	101
Figure 34 : Sensibilité de <i>Cryptococcus neoformans</i> à la F2	1102
Figure 35 : Sensibilité de <i>Aspergillus fumigatus</i> à la F2	103
Figure 36 : Sensibilité comparée de <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> et <i>Cryptococcus neoformans</i> à la F2	104
Figure 37 : Sensibilité de <i>Candida albicans</i> à la F3	105
Figure 38 : Sensibilité de <i>Cryptococcus neoformans</i> à la F3	106
Figure 39 : Sensibilité de <i>Aspergillus fumigatus</i> à la F3	107
Figure 40 : Sensibilité comparée de <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> et <i>Cryptococcus neoformans</i> à la F3	108
Figure 41 : Sensibilité de <i>Candida albicans</i> à la F4	109
Figure 42 : Sensibilité de <i>Aspergillus fumigatus</i> à la F4	110
Figure 43 : Sensibilité de <i>Cryptococcus neoformans</i> à la F4	111
Figure 44 : Sensibilité comparée de <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> et <i>Cryptococcus neoformans</i> à la F4	112
Figure 45 : Sensibilité de <i>Candida albicans</i> à la F1, la F2, la F3 et la F4	113
Figure 46 : Sensibilité de <i>Cryptococcus neoformans</i> à la F1, la F2, la F3 et la F4	114
Figure 47 : Sensibilité de <i>Aspergillus fumigatus</i> à la F1, la F2, la F3 et la F4	115
Figure 48 : Antifongigramme comparés de l'Eaq, l'Eeth, l'Eac et la F1 pour <i>Cryptococcus neoformans</i>	119
Figure 49 : Antifongigramme comparés de l'Eaq, l'Eeth, l'Eac et la F1 pour <i>Candida albicans</i>	120
Figure 50 : Antifongigramme comparés de l'Eaq, l'Eeth, l'Eac et la F1 pour <i>Aspergillus fumigatus</i>	121

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Résultats de l'analyse statistique	67
Tableau II : Paramètres antifongiques comparés de l'Eaq	72
Tableau III : Paramètres antifongiques comparés de l'Eeth	79
Tableau IV : Paramètres antifongiques comparés de l'Eac et l'Eac H ₂ O	93
Tableau V : Paramètres antifongiques de la F1, F2, F3 et F4.....	116
Tableau VI : Récapitulatifs des paramètres antifongiques	117
Tableau VII : Evolution des paramètres antifongiques de l'Eaq, l'Eeth, l'Eac et la F1	122
Tableau VIII : Composition chimique de l'Eaq, l'Eeth, l'Eac, la F1 et de la F2.....	124

RESUME

Les mycoses sont des maladies graves provoquées par des champignons microscopiques pathogènes. Elles représentent un problème de santé publique en ce sens que leur traitement clinique est particulièrement difficile, non seulement du point de vue chirurgical, mais aussi au plan chimiothérapeutique. A ces difficultés s'ajoutent des phénomènes de résistances aux antibiotiques usuels ; sans compter les limites cruelles d'outils de diagnostic en mycologie clinique. Afin d'apporter une contribution à la prise en charge des mycoses, nous avons évalué l'activité antifongique de *Morinda morindoides*, sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* et *Candida albicans* et par la suite nous avons déterminé par triphytochimique la composition chimique de chaque extrait.

Les résultats ont révélés que la fraction 1 composée d'alcaloïdes et de stérols possède le potentiel d'activité inhibitrice le plus élevé avec une CI_{50} de $0,151 \pm 0,1$ mg/mL pour *Candida albicans*, $0,04 \pm 0,01$ mg/mL pour *Aspergillus fumigatus* et $0,08 \pm 0,02$ mg/mL pour *Cryptococcus neoformans*.

Morinda morindoides possède des composés antifongiques dont il en faut tenir compte.

Mots clés : Antifongique ; *Aspergillus fumigatus* ; *Candida albicans* ; *Cryptococcus neoformans* ; Extraits végétaux.

ABSTRACT

The mycoses are serious illnesses caused by pathogenic microscopic mushrooms. They represent a problem of public health in the sense that their clinical treatment is particularly difficult, not only from the surgical point of view, but also in the plan chemotherapeutic. With these difficulties phenomena of resistance are added to usual antibiotics; without counting the cruel limits of tools for diagnosis in clinical mycology. In order to contribute our share to the assumption of responsibility of the mycoses, we evaluated antifungal activity of *Morinda morindoides*, on the *in vitro* growth of *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* and thereafter we determined by triphytochismic the chemical composition of each extract.

The results revealed that the fraction 1 composed of alkaloids and sterols have a high potential for inhibitory activity with a CI_{50} of $0,151 \pm 0,1$ mg/mL for *Candida albicans*, $0,04 \pm 0,01$ mg/mL for *Aspergillus fumigatus* and $0,08 \pm 0,02$ mg/mL for *Cryptococcus neoformans*.

Morinda morindoides possesses antifungals compounds of which it is necessary to take account.

Key words: Antifungal; *Aspergillus fumigatus*; *Candida albicans*; *Cryptococcus neoformans*; Plant extract.

INTRODUCTION

1- Intérêt du sujet

Ces dernières années, on note une nette recrudescence des pathologies infectieuses aggravées par l'apparition en pathologie humaine du Virus de l'Immunodéficience Humaine ou V.I.H avec ses corollaires de maladies opportunistes (BOUCHET *et al.*, 1989 ; CHABASSE, 1994 ; DUPONT *et al.*, 1996 ; KRA, 2001). Ces maladies infectieuses sont à l'origine d'un taux important de morbidité et de mortalité surtout dans les pays tropicaux et en Afrique de l'Ouest. (DE SOUZA *et al.*, 1995 ; DUPONT *et al.*, 1996).

Parmi ces infections, certaines sont dues à des champignons microscopiques. Il existe environ cent mille espèces connues de champignons qui colonisent notre espace vital. Beaucoup d'entre eux vivent en saprophytes et très peu s'adaptent au parasitisme chez leur hôte vertébré (BOUCHET *et al.*, 1989, CHABASSE, 1994). Ces champignons qui n'étaient que saprophytes il y a quelques années ont subi un changement de leur spectre clinique et on assiste de nos jours à une émergence de leur pouvoir pathogène (DROMER *et al.*, 1996 ; DUPONT *et al.*, 1996). Ainsi les champignons microscopiques tels que *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* et *Candida albicans* sont à l'origine de maladies graves comme les aspergilloses pulmonaires, les cryptococcoses méningées et les candidoses vaginales etc. Ces germes qui non seulement connaissent une nette progression (CHANDRASEKAR *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2001 ; HSUEH *et al.*, 2002 ; CHEN *et al.*, 2003) mais surtout ont développé vis-à-vis des médicaments usuels (Amphotéricine B, terbinafine, fluconazole...) une très forte résistance, ce qui rend leur traitement difficile. Ces médicaments modernes qui s'avèrent presque inefficaces face à ces maladies sont aussi inaccessibles à nos populations du fait de leur coût très onéreux. Cette situation constitue pour nos pays en développement une véritable préoccupation. C'est pour répondre à cette préoccupation qu'à l'instar des chercheurs du monde entier, notre laboratoire s'est orienté vers la recherche et la production de nouvelles molécules à base de plantes qui seraient efficaces contre les mycoses, à moindre coût et accessibles à tous.

Les études ethnobotaniques que nous avons effectuées nous ont amené à recenser dans notre patrimoine floristique qui du reste, présente une très grande richesse en plantes médicinales (ADJANOHOUN et AKE ASSI, 1979), des plantes traditionnellement utilisées dans le traitement des diarrhées et mycoses de tous genres. Parmi ces plantes, *Morinda morindoides* s'est montré particulièrement efficace et nous l'avons sélectionné pour mener notre étude.

Notre intérêt pour *Morinda morindoides* a été suscité par les résultats suivants :

- Les extraits totaux aqueux de *Morinda morindoides* relaxent l'activité contractile duodénale et inhibent également les contractions toniques initiées par l'acétylcholine. (BAHI *et al.*, 2000).
- Les extraits acétatiques et éthanoliques 70% inhibent la croissance *in vitro* de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae* et *Shigella* (BAHI, 1993 ; KOFFI, 2003 ; KOUAME, 2006), germes bactériens communément impliqués dans les diarrhées.
- La fraction chromatographique F5 de *Morinda morindoides* manifeste une cardioinhibition qui se caractérise par un effet inotrope négatif et chronotrope négatif, et pourrait contenir des substances cholinomimétiques indirectes qui accroissent la cardioinhibition induite par les substances cholinomimétiques directes. (N'GUESSAN *et al.*, 2002).
- La fraction chromatographique F5 de *Morinda morindoides* induit une hypotension dose dépendante réversible et en partie (54%) inhibée par l'atropine. (NGUESSAN *et al.*, 2004).
- Les protéines totales de *Morinda morindoides* exercent une hypotension dose-dépendante et réversible à faibles doses sur la pression artérielle carotidienne de lapin et une hypotension irréversible à dose élevée. (M'BOH, 2006).
- Le savon fabriqué avec l'huile de *Morinda morindoides* a une activité effective sur la croissance *in vitro* des souches de *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Aspergillus fumigatus*. (TOURE, 2006).
- Les extraits de *Morinda morindoides* possèdent une activité antiprotozoaire, particulièrement sur *Entamoeba histolytica*. (CIMANGA *et al.*, 2006).
- Les extraits aqueux de *Morinda morindoides* possèdent également une activité effective antimalaria. (TONA *et al.*, 1999).

2 - Objectifs

Notre objectif global est de faire une identification des substances antifongiques de *Morinda morindoides*.

Nos objectifs spécifiques sont de trois ordres:

- Préparer les extraits et les fractions de *Morinda morindoides* en utilisant la chromatographie prospective.
- Evaluer l'activité antifongique de ces extraits et fractions sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*, afin de déterminer les valeurs de CMF (Concentration Minimale Fongicide) et CI_{50} (Concentration pour 50% d'inhibition).
- Enfin, chercher à mettre en évidence par tri phytochimique et chromatographie sur couche mince, la nature des principes actifs qui seraient dans les fractions les plus actives.

I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1- GENERALITES SUR LES MYCOSES

1-1- Nomenclature des mycoses

Les mycoses, ou infections fongiques sont des maladies provoquées par des champignons microscopiques. Traditionnellement, les infections causées par les actinomycètes aérobies (*Nocardia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*), qui sont des bactéries, sont traitées en mycologie médicale.

Il n'existe pas de règles générales unanimement reconnues concernant la nomenclature des mycoses. Le plus souvent, le nom de l'infection fongique est formé à partir du nom du champignon responsable, en lui ajoutant les suffixes « ose » : candidose, cryptococcose, aspergillose, histoplasnose, etc... Dans certains cas, la dénomination de la mycose dérive du nom de la partie du corps atteinte par adjonction du suffixe « mycose » : dermatomycose, onychomycose, otomycose, etc... Ces deux systèmes ne sont pas entièrement satisfaisants car ils manquent de précision sur la localisation de l'infection ou sur l'espèce fongique responsable.

La désignation des mycoses peut se faire de d'autres manières. Par exemple, certaines infections fongiques sont dénommées par le nom de l'auteur de leur découverte : maladie de Gilchrist, maladie de Darling. Ou encore, par un nom particulier, d'origine diverse : pied de Madura (mycétomes fongiques ou actinomycosiques), pied d'athlète (mycose des pieds à dermatophytes ou à *Candida*). Ces deux autres modes de désignation des mycoses ne permettent pas non plus de déduire spontanément l'espèce en cause ou l'organe atteint.

Plusieurs travaux émanent du Conseil de recherche Médicale, de la Société Internationale de Mycologie Humaine et Animale et de l'Organisation Mondiale de la Santé ont permis d'établir une nomenclature des infections mycosiques et des infections causées par certains actinomycètes qui a reçu l'agrément d'une large part de la communauté mycosique internationale. Elle est basée sur la terminologie suivante : « infection- suivie du nom de l'organe atteint- à- suivi du nom du champignon », exemple : infection péritonéale à *Candida albicans*, abcès cérébral à *Scedosporium apiospermum*, pneumopathie invasive à *Aspergillus fumigatus*. (BOIRON, 1996)

1-2- Habitat des champignons pathogènes

Les agents des mycoses peuvent avoir une origine endogène ou exogène.

Les champignons d'origine endogène sont représentés essentiellement par *Candida albicans*. Cette levure vit exclusivement dans le tube digestif de l'homme et de certains animaux. La peau, contrairement aux muqueuses, n'est porteuse de *C. albicans* que dans des cas pathologiques. Par contre, une dizaine d'autres espèces de *Candida* (*C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. glabrata*, etc...), et quelques espèces de *Geotrichum*, sont habituellement saprophytes des muqueuses et des téguments, mais se trouvent également dans la nature.

L'origine exogène caractérise l'immense majorité des cas de champignons pathogènes ou potentiellement pathogènes. D'une manière générale, ils sont retrouvés dans le sol (*Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, agents des mucormycoses) et quelquefois dans les niches écologiques constituées par des substances organiques variées. (BOIRON, 1996 ; BOUCHET *et al.*, 1999).

1-3 Distribution géographique des mycoses et de leurs agents

Certaines mycoses sont cosmopolites : candidose, cryptococcose, aspergillose, dermatophyties etc... La nature des espèces fongiques responsables d'une même affection peut, pour quelques mycoses, varier suivant les régions (dermatophytes).

D'autres mycoses ont une répartition géographique large, mais néanmoins nettement délimitée : chromoblastomycoses, mycétomes, observés dans les régions tropicales et subtropicales du globe.

Enfin, quelques mycoses sont régionales : la coccidioïdomycose est endémique dans le sud-ouest des U.S.A., l'Amérique Centrale et quelques Etats de l'Amérique du Sud ; la paracoccidioïdomycose sévit exclusivement en Amérique Centrale et en Amérique du Sud ; l'histoplasmose à *Histoplasma duboisii* ne s'observe qu'en Afrique Noire.

La circulation intercontinentale des hommes favorise l'observation de mycoses d'importation dans des régions où elles n'existent pas normalement : histoplasmose (1^{ère} mycose d'importation en France par ordre de fréquence), pénicilliose à *Penicillium marneffeii*. Il est rare, néanmoins, que les mycoses fassent souche lorsqu'elles sont introduites occasionnellement dans un pays où elles n'existent pas. Cet apport peut toutefois modifier la flore fongique régionale (champignons des teignes trichophytiques) (CHABASSE *et al.*, 1999).

1-4 Adaptation à la vie parasitaire et pouvoir pathogène

Les champignons regroupent un nombre considérable d'espèces, estimé entre 100.000 et 250.000, largement répandues dans la nature : le sol, l'air ou l'eau et éventuellement sur des organismes vivants de nature animale ou végétale. Sur ce nombre, peu d'espèces fongiques sont impliquées dans la pathologie humaine et vétérinaire. Leur nombre est estimé à moins de 300, mais il s'élève chaque année car de plus en plus d'espèces considérées comme saprophytes peuvent de provoquer une infection à l'occasion de modifications générales ou locales du terrain de l'hôte.

Seules quelques espèces peuvent être considérées comme d'authentiques parasites (dermatophytes anthropophiles : *Microsporum audouinii*, *Microsporum ferrugineum*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton concentricum*, *Epidermophyton floccosum*).

Un groupe de champignons, parfois très infectieux, renferme des espèces dont le niveau d'adaptation parasitaire est plus variable : *Coccidioides immitis*, *H. capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*. La primo-infection est quasiment obligatoire en zone endémique et dans la plupart des cas, elle reste cliniquement inapparente ou ne se traduit que par des manifestations pathologiques discrètes. La guérison est habituellement spontanée : toutefois un inoculum important, une souche particulièrement virulente ou un état d'immunodépression, peuvent conduire à une infection patente.

Enfin, de très nombreux agents des mycoses sont des espèces opportunistes. Leur prolifération dans les tissus est un événement occasionnel qui n'est rendu possible que par des modifications générales ou locales du terrain de l'hôte (facteurs favorisants) : *C. albicans*, *C. neoformans*, *A. fumigatus*, etc.... (BOIRON, 1996).

1-4-1- Modes de contamination et de dissémination

Des champignons endogènes possèdent un caractère saprophytique obligatoire, mais qui n'est pas toujours permanent. *C. albicans* pénètre par la muqueuse du tractus digestif (mais peut aussi occasionnellement être introduit par l'intermédiaire des cathéters).

Les champignons exogènes, sont généralement véhiculés par l'air et/ou les poussières. Ils sont le plus souvent inhalés (*A. fumigatus*, *H. capsulatum*, *C. immitis*, etc...), mais d'autres voies d'entrée dans l'organisme, variant avec l'espèce fongique en cause, existent : micro-effraction cutanée (dermatophytes), inoculation dans les téguments (*S. schenckii*, agents de la chromoblastomycose, agents des mycétomes).

Certains champignons sont susceptibles d'utiliser plusieurs voies de pénétrations : *C. neoformans* envahit souvent l'organisme par voie respiratoire mais peut aussi pénétrer par la peau ; la porte d'entrée habituelle de *B. dermatitidis* est pulmonaire, mais son inoculation cutanée n'est pas rare (KOENIG, 1995).

La dissémination relève généralement d'un passage du champignon dans les vaisseaux : septicémie d'origine veineuse par envahissement progressif. L'absorption digestive (pinocytose) par les entérocytes joue probablement un rôle, de même que le transport des microorganismes par les cellules phagocytaires (macrophages ou polynucléaires).

Certains champignons peuvent persister vivants mais inactifs dans l'organisme pendant des années et exercer un jour leur pouvoir pathogène (*Histoplasma*).

La contagion interhumaine n'existe pas pour les mycoses systémiques. La transmission interhumaine ou de l'animal à l'homme n'existe que pour quelques mycoses superficielles : dermatophyties à agents anthropophiles, candidose génitale. (BOUCHET *et al.*, 1999).

1-4-2- Colonisation des muqueuses

Les infections débutent généralement à partir des muqueuses des tractus respiratoire, digestif ou uro-génital, car la peau saine est habituellement résistante à la colonisation et la pénétration de la plupart des agents pathogènes.

Pour exercer son pouvoir pathogène, le champignon doit pouvoir atteindre les surfaces épithéliales à travers le mucus superficiel sans être éliminé par le flux muqueux, résister à l'action inhibitrice de microorganismes commensaux ainsi qu'aux moyens de défenses spécifiques et non spécifiques de l'hôte et adhérer aux cellules.

Les champignons opportunistes, comme *C. albicans*, peuvent proliférer lorsque le nombre des bactéries est réduit par les antibiotiques. La flore endogène agit par compétition en accaparant les produits nutritifs ou en produisant des substances inhibitrices telles que les colicines ou des acides (bacilles de Döderlein protégeant normalement la muqueuse vaginale d'une prolifération des *Candida*).

C. albicans est la seule espèce parmi les champignons capable de produire des protéinases qui hydrolysent les deux types d'IgA. L'adhérence de cette espèce aux muqueuses, mais également aux mucines qui tapissent le tractus digestif, procède du déroulement séquentiel d'événements physicochimiques aux cours desquels interviennent la charge de surface des

levures, des interactions hydrophobes, puis des interactions plus spécifiques impliquant de véritables ligands de la surface cellulaire (adhésines) (GRILLOT, 1996).

1-4-3- Pénétration et dissémination dans l'organisme

Hormis le cas de champignons pénétrant dans l'organisme par voie traumatique, le deuxième facteur essentiel conditionnant la pathogénicité du germe, est sa capacité à pénétrer à travers les issues.

Dans certains cas, la pénétration reste limitée aux cellules épithéliales (candidose, dermatophyties). Dans d'autres cas, la pénétration est plus profonde et le champignon est susceptible de provoquer une infection systémique ou généralisée (candidose profonde, cryptococcose méningée, aspergillose invasive).

La dissémination relève généralement d'un passage du champignon dans les vaisseaux : septicémie d'origine veineuse par envahissement progressif. L'absorption digestive (pinocytose) par les entérocytes joue probablement un rôle, de même que le transport des microorganismes par les cellules phagocytaires (macrophages et/ou polynucléaires).

Un autre mode de pénétration existe par l'intermédiaire des macrophages, qui peuvent phagocyter les champignons et les entraîner dans les tissus profonds (*C. immitis*, *H. capsulatum*).

La pénétration tissulaire exige des équipements enzymatiques complexes, en particulier lorsqu'il s'agit de tissus composés de scléroprotéines, tels que l'ongle, les épithéliums oesophagiens ou vaginaux (kératinases, alagénases, élastases des dermatophytes, protéases de *C. albicans*). Malgré de nombreux travaux portant sur la morphogénèse, en particulier sur la transformation levure-mycélium, aucune influence prépondérante de facteur externe déclenchant n'a pu être mise en évidence.

La capacité de croître et de se développer dans les tissus de l'hôte conditionne le 3^{ème} élément essentiel du caractère pathogène des champignons. Généralement, leur croissance est lente et devient plus rapide au fur et à mesure de la libération de composants nutritifs au cours de la lyse des tissus. Les enzymes produites par le champignon, peuvent accélérer le processus. Actuellement, seul le fer a été identifié comme élément essentiel du développement des germes pathogènes. La quantité disponible de cet élément est limitée par la présence de transferrine et de lactoferrine, mais il semble que *C. albicans* soit capable, comme certaines bactéries, de synthétiser des sidérophores pouvant compenser la restriction ferrique. (GRILLOT, 1996).

1-5- Interférence avec les mécanismes de défense de l'hôte

Les mécanismes de défense de l'hôte sont d'une double nature : d'abord non spécifiques puis spécifiques au microorganisme en cause.

1-5-1- Mécanisme de défense non spécifique : réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire est la plus importante des mécanismes non spécifiques de défense de l'hôte. Elle est activée par la pénétration d'éléments fongiques au sein des couches profondes de la peau ou des muqueuses, ou dans les organes profonds constituant habituellement un milieu stérile (poumon, appareil urinaire, système nerveux central, etc...).

La réponse inflammatoire comporte d'abord, la production des composés chimiques solubles, toxiques pour les germes (lysozymes, cytokines, interféron, complément et protéines de phase aiguë). Puis, les cellules phagocytaires interviennent (polynucléaires neutrophiles, exerçant un rôle central dans la défense contre l'infection fongique, macrophages).

Les autres cellules jouant un rôle dans la réponse non spécifique sont les polynucléaires basophiles, les mastocytes, les polynucléaires éosinophiles, les plaquettes et les cellules « tueuses naturelles ».

1-5-2- Mécanismes de défense spécifique : réponses immunitaires humorales et cellulaires

Les lymphocytes T et B, ont recours à un mécanisme impliquant la reconnaissance et la mémorisation des microorganismes étrangers, qui amplifie leur action et permet une réponse rapide à la présentation répétée d'un antigène.

L'immunité humorale ne semble pas jouer un rôle très important lors de l'invasion fongique. Les anticorps peuvent, toutefois, intervenir par opsonisation et /ou activation du complément. Leurs présence, parfois utile dans un but diagnostique ; traduit plus l'immunisation que l'immunité.

La fréquente survenue d'infections fongiques chez les patients dont les défenses immunitaires à médiation cellulaire sont altérées, illustre le rôle central des lymphocytes T et du couple macrophages/lymphocyte T dans les mécanismes de défense contre l'invasion fongique (voir facteurs favorisants) : candidose superficielle, cryptococcose, infection à champignons dimorphiques.

1-6- Facteurs favorisants

1-6-1- Facteurs généraux

Les facteurs généraux favorisants les mycoses sont multiples. On peut citer : l'hypoprotidémie, le diabète, le taux de fer et de zinc sériques qui peuvent jouer un rôle dans l'établissement d'une infection fongique ; le rôle des hormones (les femmes résistent mieux que les hommes à de nombreuses mycoses) ; les stéroïdes, qui exercent un effet dépressif à divers niveaux du système immunitaire (diminution des réponses inflammatoires aiguë et chronique, interférence avec l'élimination des corps étrangers, altération de la cicatrisation des plaies et diminution de la production d'anticorps) ; la chimiothérapie, provoquant une déplétion des leucocytes ; les immunosuppresseurs largement utilisés en cancérologie et dans le cadre des transplantations, qui interfèrent avec l'immunité cellulaire et/ou l'immunité humorale. (BOIRON, 1996 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

1-6-2- Rupture des barrières cutanée et muqueuse

Une immunité excessive, la chaleur et les effets irritants de l'urine peuvent altérer l'épithélium (candidoses superficielles du périnée et de l'aîne).

Les excoriations cutanées ou muqueuses, mêmes minimes, peuvent favoriser le développement de mycoses superficielles et sous-cutanées.

Dans les régions tropicales, des plaies par inoculation avec implantation de débris végétaux contaminés par des éléments fongiques peuvent être à l'origine d'infections sous-cutanées (chromoblastomycose).

En milieu hospitalier, les techniques invasives ouvrent aussi la voie aux infections. L'usage très répandu des cathéters intraveineux, en particulier centraux pour chimiothérapie et alimentation parentale, peut être responsable d'infections fongiques graves (septicémie).

Les sondes urinaires peuvent aussi être à l'origine d'infections fongiques, restant localisées et pouvant disparaître par simple retrait de la sonde.

La plupart des médicaments antitumoraux provoquent des ulcérations au niveau de l'oropharynx et du tube digestif. L'infection secondaire des ulcérations digestives par des *Candida* constitue le point de départ pour la dissémination de la maladie (BOUCHET *et al.*, 1999 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

1-6-3- Perturbation de la flore endogène

L'emploi d'antibiotiques à large spectre ou d'antiseptiques modifie la flore microbienne endogène et favorise la colonisation de la bouche et du rectum par différentes levures du genre *Candida*. La suppression des bactéries anaérobies et de cocci à coloration de Gram positive, qui ont le même récepteur d'attachement cellulaire, et les modifications quantitatives du microbiome, semblent favoriser le développement fongique.(CHABASSE *et al.*, 1999).

1-6-4- Perturbation de la fonction des neutrophiles, des monocytes et des macrophages

La germination des spores s'avère être un mécanisme essentiel de la dissémination de l'aspergillose et le macrophage alvéolaire semble avoir pour rôle fondamental la prévention de ce phénomène. Il n'est efficace que sur les spores non germées. Les polynucléaires peuvent être déficients sur le plan qualitatif (granulomatose septique chronique) ou, plus fréquemment, sur le plan quantitatif (chimiothérapies apaisantes). Plus rarement, on peut rencontrer des neutrophiles fonctionnellement défectueux (leucémie aiguë). L'insuffisance neutrophile peut aussi avoir pour origine des anomalies du complément, telle qu'une génération anormale de facteurs chimiotactiques neutrophiles. D'autres anomalies des neutrophiles peuvent provoquer une diminution de l'opsonisation. Les neutrophiles des patients atteints de diabète sucré ont une capacité d'élimination des *Candida* significativement réduite qui restaure, au moins partiellement, lorsque le diabète est équilibré. Il a été démontré que certains antibiotiques, tels que les aminosides, altèrent la fonction neutrophile et que l'amphotéricine B peut aussi inhiber la migration des neutrophiles.

Le rôle des monocytes a été confirmé chez des patients atteints de granulomatose familiale chronique, dans laquelle l'aspergillose invasive est une complication courante. Dans cette maladie, les monocytes produisent en quantité insuffisante du peroxyde d'hydrogène et d'autres produits potentiellement microbicides du métabolisme oxydatif. Des troubles de la fonction monocyttaire (anomalies du chimiotactisme et de l'activité respiratoire) ont aussi été observés dans la candidose cutanéomuqueuse chronique.

Des anomalies de la fonction des macrophages alvéolaires ont été évoquées dans les infections pulmonaires à *Aspergillus* (CHABASSE *et al.*, 1999).

1-6-5- Altération des défenses immunitaires à médiation cellulaire

Les lymphocytes T jouent un rôle central dans le mécanisme de défense contre l'invasion fongique, comme en témoigne la fréquente survenue de mycoses chez les patients dont les défenses immunitaires à médiation cellulaire sont altérées (candidose).

Le SIDA, où le déficit immunitaire est surtout cellulaire, illustre parfaitement cette sensibilité aux infections fongiques. Les transplantations d'organes, la maladie de Hodgkin, la sarcoïdose sont d'autres situations comportant un déficit de l'immunité cellulaire favorables au développement de mycoses. (BOIRON, 1996).

1-7- Classification clinique et aspects pathologiques des mycoses

1-7-1- Mycoses superficielles

Elles concernent l'atteinte primitive de couches superficielles de la peau et des muqueuses et l'atteinte des phanères, en France, les candidoses de la muqueuse oesophagienne et du reste du tube digestif sont classées dans les mycoses superficielles. Les inoculations dermiques profondes ou sous-cutanées sont classées dans les mycoses viscérales profondes. (BOIRON, 1996).

1-7-2- Dermatophyties (BADILLET, 1991).

Les dermatophyties, ou teignes, sont des mycoses dues à des champignons (dermatophytes) ne se développant que dans la couche cornée épidermique et les phanères, au dépend de la kératine. Les facteurs favorisants sont représentés par les facteurs climatiques (chaleur, humidité), immunologiques (SIDA, corticothérapie), et l'hygiène et le mode de vie (sport). Elles se présentent sous forme d'épidermomycoses de la peau glabre, de teignes du cuir chevelu et des poils, et d'onyxis (atteinte des ongles). Pour les dermatophytes qui pénètrent dans l'épiderme par effraction (*Epidermophyton*, *Trichophyton*, *Microsporum*). L'invasion cutanée se fait de proche en proche d'une façon excentrique (herpès, circiné). Pour les dermatophytes qui attaquent les cheveux (*Microsporum* et *Trichophyton*), la pénétration se fait sous la cuticule du cheveu au niveau de l'ostium folliculaire ; la progression des filaments est descendante et s'arrête au bulbe ; les cheveux parasités se cassent à des niveaux différents selon l'espèce du dermatophyte en cause et sont en partie éliminés (plaques d'alopécie). Les dermatophytes peuvent également être responsables de manifestations allergiques et, exceptionnellement, d'infections profondes.

Certaines espèces de dermatophytes sont cosmopolites, d'autres ne se rencontrent que dans certaines régions particulières. On distingue les espèces anthropophiles (*Trichophyton rubrum*, *Microsporum audouinii*, *Epidermophyton floccosum*), parasites obligatoires de l'homme et se transmettant d'un individu à l'autre par contact direct ou indirect (objet de toilette, piscine, saunas, etc...); les espèces zoophiles (*Microsporum canis*, *Trichophyton ochraceum*), parasites des animaux et occasionnellement transmissibles à l'homme; les espèces telluriques, saprophytes du sol et transmissibles à l'homme à l'occasion de contacts avec la terre (travaux de jardinage, genoux des petits enfants) ou par l'intermédiaire d'animaux.

1-7-3- Candidoses

Les candidoses sont des mycoses humaines les plus fréquentes. L'espèce la plus fréquente, *C. albicans*, est un saprophyte du tube digestif, alors qu'une dizaine d'autres espèces de *Candida* (*C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, etc...) peuvent se retrouver sur la peau ou dans le tube digestif. Devenant pathogènes sous l'influence de divers facteurs favorisants, leur dissémination est généralement d'origine endogène et se fait à partir du tube digestif par contiguïté vers les voies génitales, respiratoires, ou la peau, ou par voie hématogène vers les organes profonds. (GRILLOT, 1996).

Les *Candida* sont des levures filamenteuses responsables de mycoses cutanées (intertrigos : fessier, périanal, inguinal, interdigital, axillaire, perlèche, onyxis, abcès divers), mais aussi de mycoses des muqueuses (muguet buccal des nourrissons et des vieillards, vaginite chez les femmes enceintes, balanite), de mycoses digestives (candidoses oropharyngées et oesophagiennes au cours du SIDA), de mycoses broncho-pulmonaires, de mycoses viscérales (abcès cérébraux, rénaux, pleuraux, etc...). On observe depuis quelques années à un accroissement des infections à *Candida*, notamment des infections candidosiques profondes d'origine nosocomiales. (LARONE, 1995).

Les facteurs favorisants des candidoses incluent des facteurs physiologiques (âge, grossesse), des facteurs locaux (macération, humidité, traumatismes, brûlures), des altérations de l'organisme (endocrinopathies : diabète, immunodépression : SIDA, affections intercurrentes : infection, cancer, etc..), des facteurs iatrogènes (médicaments : antibiotiques, corticoïdes, immunosuppresseurs, etc...., chirurgie digestive et cardiaque, transplantation d'organes, cathéters intraveineux, prothèses, etc...) (LARONE, 1995).

1-7-4- Pityriasis versicolor

L'agent fongique responsable est *Malassezia furfur*, levure faisant partie de la flore cutanée normale de l'homme. Lipophile, elle se retrouve normalement dans les oreilles et le nez, et peut provoquer, à la faveur de divers facteurs favorisants (humidité, chaleur, modification hormonale : grossesse, hypercorticisme, etc..., modification de l'immunité cellulaire : SIDA) une mycose cosmopolite caractérisée par des taches irrégulières beiges à brune siégeant sur le tronc, les membres, les épaules et le cou. Elle peut également être responsable de *Pityriasis capitis* (atteinte pelliculaire du cuir chevelu), de dermatite séborrhéique (affection chronique de la peau grasse siégeant au niveau du visage). *M. furfur* peut provoquer des atteintes systémiques, en particulier chez les patients recevant par voie intraveineuse des traitements riches en lipides. En culture, elle se développe sur milieu de Sabouraud contenant de l'huile d'olive ou d'arachide (BADILLET, 1991).

1-7-5- Mycoses sous-cutanées

- Chromoblastomycose

Cette mycose verruqueuse, d'origine traumatique, siège au niveau des membres et s'observe fréquemment dans toutes les zones tropicales et subtropicales. Des cas de localisation cérébrale par dissémination hémotogène ont été signalés de façon exceptionnelle. Elle est provoquée par plusieurs champignons noirs (Dématiés), principalement des genres *Phialophora* (*P. verrucosa*), *Fonsecaea* (*F. pedrosoi*, *F. compacta*), *Cladosporium* (*C. carrionii*), *Wangiella* (*W. dermatitidis*), présents sur les bois morts, les sols forestiers (BOIRON, 1996).

- Sporotrichose

Cette mycose cutanéolymphatique est caractérisée par des lésions gommeuses laissant sourde un pus épais. L'agent responsable est un champignon dimorphique : *Sporothrix schenckii*, qui ne se retrouve que dans quelques foyers en Amérique Centrale, en Afrique du Sud et en Asie. Présent sur les débris végétaux (cactées), l'inoculation cutanée est généralement d'origine traumatique. Pus rarement des formes pulmonaires sont dues à des contaminations par inhalation. Des métastases profondes (cérébrales) peuvent être observées en cas d'immunodépression (BADILLET *et al.*, 1987).

- Mycétomes

Les mycétomes sont des tumeurs inflammatoires polyfistulisées à évolution très lente, endémiques en zone tropicale, caractérisées par la présence de grains parasitaires dans le pus qui s'échappe de fistules. D'inoculation traumatique (épines), ils siègent souvent aux membres inférieurs, mais peuvent aussi atteindre les membres supérieurs et le thorax. Les agents responsables sont, soit des champignons (*Madurella mycetomatis*, *M. grisea*, *Leptosphaeria senegalensis*, *Pyrenochaeta romeroi*, *Scedosporium apiospermum*, etc), soit des actinomycètes. (KWON-CHUNG *et al.*, 1992).

1-7-6- Mycoses profondes

Ce terme est utilisé par opposition au terme superficiel et concerne l'invasion des organes ou viscères profonds (synonymes : mycose viscérales profondes, mycoses systémiques). La terminologie suivante devrait être utilisée : mycoses septicémiques, lorsqu'une ou plusieurs hémocultures sont positives ; mycose viscérale profonde, lorsqu'un viscère ou un organe profond est atteint ; mycose disséminée, lorsqu'au moins deux organes profonds sont atteints. Une mycose disséminée peut être ou non septicémique (par exemple, les aspergilloses invasives sont souvent disséminées sans hémoculture positive) (BOIRON, 1996).

- Cryptococcose

La cryptococcose est une infection cosmopolite du système nerveux central et des méninges, dont la porte d'entrée est le plus souvent pulmonaire. Des lésions cutanées peuvent se manifester secondairement, ainsi qu'au niveau des muqueuses, des os et des articulations. Auparavant peu fréquente (observée chez les malades leucémiques ou cancéreux), cette mycose est actuellement l'une des plus fréquentes chez les patients atteints de SIDA.

La principale espèce pathogène : *Cryptococcus neoformans var. grubii*. La première se retrouve communément en Amérique et en Europe, dans les fientes d'oiseaux. Elle représente l'espèce presque toujours en cause lors de cryptococcose chez les patients atteints de SIDA. La seconde est liée aux arbres *Eucalyptus*, qui constituent leurs biotopes. (BOIRON, 1996 ; BOUCHET *et al.*, 1999 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

- Aspergilloses

Les aspergilloses sont essentiellement des mycoses de l'appareil respiratoire, et occasionnellement des sinusites, des otites du conduit auditif externe, des kératites, des endocardites ou des surinfections de plaies ouvertes (traumatisme, brûlures). Les facteurs favorisants varient selon les formes pathologiques. Dans le cas de l'aspergillose invasive, mycose pulmonaire redoutable, pouvant se disséminer à tous l'organisme (atteinte cérébrale, cardiaque ou cutanée) et mortelle dans plus de 80% des cas, ils sont représentés par la neutropénie prolongée, observée chez les greffés de moelle ou d'organes, chez les patients de services d'hématologie, chez les patients sous corticothérapie au long cours.

Ces mycoses sont provoquées par des moisissures cosmopolites, très fréquentes dans l'environnement (matières organiques en décomposition, silos, composts, bottes de foin) et capables de produire des spores de petites tailles en grande quantité. Espèces thermotolérantes, *Aspergillus fumigatus* et *A. flavus* sont le plus fréquemment en cause. (BOIRON, 1996 ; BOUCHET *et al.*, 1999 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

- Zygomycoses

Les zygomycoses sont des affections cutanées, pulmonaires ou cérébrales dues à des champignons coenocytiques de la classe des Zygomycètes.

Les entomophthoromycoses sont des infections tropicales caractérisées par un épaissement des tissus sous-cutanées et des muscles, et une atteinte des muqueuses, dues à des Entomophthorales : *Basidiobolus haptosporus*, atteignant le tronc et les membres supérieurs, et *Conodiobolus coronatus*, atteignant essentiellement la face.

Les mucormycoses, secondaires à un état de déficience de l'organisme (diabète, leucémie, brûlure, et...) peuvent être pulmonaires, cérébrales ou cutanées, et sont dues à des champignons cosmopolites extrêmement fréquents de l'ordre des Mucorales (*Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*, et plus rarement *Cunninghamella*, *Syncephalastrum*). (BOUCHET *et al.*, 1999 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

- Histoplasmoses

Les deux histoplasmoses diffèrent par leurs aires de répartition géographique, leur tableau clinique et la forme des champignons dimorphiques responsables dans l'organisme (mais pas en culture, où les deux agents fongiques sont strictement semblables). L'histoplasmosse américain, due à *Histoplasma capsulatum*, s'observe aux Etats-Unis (vallée du Mississipi, mais aussi en Amérique Centrale et en Amérique du Sud, en Afrique et en

Asie, mais pas en Europe). Elle est contractée par inhalation (les spores fongiques se retrouvent dans les poussières de fermes, le sol des pigeonniers ou des grottes riches en guano de chauve-souris. La forme pulmonaire généralement bénigne peut être suivie d'une forme disséminée grave (atteintes réticulo-endothéliales et muco-cutanées). Au Etats-Unis, l'histoplasmose est fréquente chez les patients immunodéprimés et représente, chez les patients atteints de SIDA, la 3^{ème} mycose en importance après la candidose et la cryptococcose. L'histoplasmose africaine due à *Histoplasma duboisii* se retrouve uniquement en Afrique et se caractérise par les lésions cutanées ou sous-cutanées bénignes à évolution lente, ou par des atteintes disséminées mortelles. (BOIRON, 1996 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

- Coccidioïdomycose

Cette mycose due à un champignon tellurique, *Coccidioides immitis*, est endémique dans les régions désertiques du sud ouest des Etats-Unis, au nord du Mexique, en Amérique Centrale et en Amérique du Sud. La forme primaire pulmonaire est généralement bénigne, la forme secondaire est disséminée, avec des atteintes cutanées, osseuses, viscérales, etc..., en particulier chez les patients atteints de SIDA. (BOUCHET *et al.*, 1999 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

- Blastomyose

Cette mycose, également due à un champignon dimorphique isolé du sol et du bois, *Blastomyces dermatitidis*, est observée dans une grande partie de l'Amérique du Nord, en Amérique Centrale, dans le nord de l'Amérique du Sud, et présente aussi plusieurs foyers africains. La maladie primaire est pulmonaire, parfois discrète. L'évolution lente est inéluctable avec des atteintes sous-cutanées, muqueuses, osseuses et viscérales (BOIRON, 1996 ; BOUCHET *et al.*, 1999 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

- Paracoccidioïdomycose

Il s'agit d'une mycose profonde caractérisée par des lésions granulomateuses des muqueuses (buccales et nasales), pouvant s'étendre aux organes profonds (rate, intestins, poumons, foie et système nerveux central) par voie lymphatique. Observée uniquement en Amérique du Sud, en Amérique Centrale et au Mexique, elle est due à un champignon dimorphique peut être tellurique, *Paracoccidioides brasiliensis* (BOIRON, 1996 ; BOUCHET *et al.*, 1999 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

1-8- Diagnostic des mycoses

Comme pour toutes les infections microbiennes, le diagnostic des mycoses repose sur la confrontation des examens cliniques, radiologiques, épidémiologiques, etc...., et des examens de laboratoire. Le diagnostic mycologique comprend quatre étapes importantes : 1) le prélèvement, 2) l'examen direct des échantillons médicaux (à l'état frais, après coloration ou non, ou après préparation : éclaircissement ou coloration), 3) la culture sur les milieux appropriés et 4) l'identification de champignons isolés, qui peuvent être complétées par d'autres examens de laboratoire, comme la détection d'une réaction immunologique spécifique, humorale et /ou cellulaire et la mise en évidence d'antigènes circulants (KOENIG, 1995).

1-8-1- Diagnostic clinique

Les différents signes cliniques des mycoses peuvent fournir un diagnostic présomptif d'infection fongique. Les mycoses superficielles et sous-cutanées peuvent produire des lésions caractéristiques, mais également présenter des aspects non spécifiques et atypiques (en particulier en cas de traitements préalables par des topiques corticoïdes).

Dans les mycoses profondes, les signes cliniques ne sont généralement pas spécifiques mais constituent des éléments d'orientation de grande valeur à la lumière des informations sur le terrain, l'origine géographique ou ethnique, le viscère atteint. Les renseignements épidémiologiques (âge, race, notion de voyage antérieurs, contacts avec des animaux, etc....) peuvent permettre d'orienter le biologiste dans le choix des milieux et des techniques à utiliser. Certains examens complémentaires spécifiques peuvent être d'un grand secours (détection d'antigène cryptococcique, scanner dans les candidoses hépato-spléniques).

Selon l'état immunitaire et la virulence du champignon, l'évolution peut être chronique ou subaiguë ou au contraire fulminante (KOENIG, 1995 ; LARONE, 1995).

1-8-2- Diagnostic mycologique

Les prélèvements, lorsqu'ils sont possibles, permettent d'affirmer un diagnostic par l'examen direct, la culture, l'histologie, l'immunologie, voire l'inoculation à l'animal. Lorsqu'un diagnostic a été établi, le laboratoire peut encore être utile dans le choix d'une thérapeutique, le suivi de l'évolution de l'infection ou le contrôle du traitement (KWON-CHUNG *et al.*, 1992).

- Prélèvements médicaux

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

Peau et phanère : il est nécessaire de s'assurer qu'aucun traitement antifongique n'aura été entrepris ; sinon, il faudra effectuer le prélèvement une semaine après l'interruption du traitement. Dans le cas de lésions squameuses, on grattera fortement les squames à la périphérie des lésions à l'aide d'une curette de Brocq, un grattoir de Vidal, ou éventuellement un vaccinostyle stérile, qui seront recueillies dans une boîte de Pétri en verre. Pour des lésions suintantes, on grattera aussi en bord de lésion, ou l'on utilisera un écouvillon. En cas de suspicion de *Pityriasis versicolor*, le scotch-test permettra de faire le diagnostic dès l'examen direct.

Pour les teignes du cuir chevelu et des poils, il sera préférable de faire un examen préalable des lésions sous une lampe de Wood, pour ne prélever que les cheveux fluorescents à l'aide d'une pince à épiler. A défaut, on recueillera les cheveux cassés. Les squames et les croûtes seront raclées avec une curette, le pus des lésions suppurées sera prélevé avec un écouvillon. Enfin, en cas d'onyxis, il est recommandé de couper, avec des ciseaux ou une pince stérile, toute la partie de l'ongle atteint jusqu'à la limite de la partie saine.

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

Muqueuses et orifices naturels : on utilisera un écouvillon stérile.

Prélèvement pulmonaires : les expectorations seront recueillies dans un récipient stérile après rinçage de la bouche avec un antiseptique. Mais il est préférable de réaliser des aspirations trachéales ou bronchiques sous fibroscopie, ou des lavages broncho-pulmonaires.

Urines : elles sont recueillies en récipient stérile.

Liquide céphalo-rachidien et autres liquides : ils sont recueillis en tube stérile.

Sang : le prélèvement de 5 à 10ml de sang se fera sur anticoagulant ou directement sur milieu de culture approprié.

Biopsies de tissus ou d'organes, pièces opératoires : ces prélèvements seront séparés en deux parties : l'une sera fixée dans du liquide de Bouin ou de formol et servira à l'examen anatomopathologique ; l'autre sera placée dans de l'eau physiologique stérile en vue de la culture (LARONE, 1995 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

- Examen direct

Tout matériel d'analyse (liquide céphalo-rachidien, expectoration, lavage broncho-alvéolaire, écouvillonnage des muqueuses, selles, urines, sondage gastrique et autres biopsies, etc...) transmis au laboratoire pour un diagnostic mycologique doit faire l'objet d'un examen microscopique direct. L'examen direct, peut se faire à l'état frais, avec ou sans coloration, ou après préparation de l'échantillon. Il a pour but d'observer le champignon responsable non modifié et d'évaluer la quantité d'éléments fongiques dans le prélèvement. L'examen direct peut se faire sans coloration, mais dans certains cas, la coloration peut faciliter l'observation : la coloration au bleu de lactophénol convient à tous les types de prélèvements ; la coloration de Gram convient également pour la plupart des types de matériel et est positive pour tous les champignons en bon état physiologique.

Les prélèvements, tels que les cheveux, ongles, poils (quelquefois aussi certains échantillons de pus ou d'expectoration), doivent faire l'objet d'un éclaircissement pour rendre visible les éléments fongiques (KOH, chlorolactophénol). Ce type de préparation trouve un intérêt particulier dans le cas de la recherche de dermatophytes.

Les frottis (pus, expectoration) doivent faire l'objet de coloration (Gram, bleu de méthylène, Giemsa, Hotchkiss-McManus), ainsi que les coupes anatomo-pathologiques (Hotchkiss-McManus, Gomori-Grocott) (LARONE, 1995 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

- Histopathologie

L'examen histopathologique occupe une place de premier plan dans l'étude des mycoses sous-cutanées et profondes : les réactions inflammatoires et les modifications tissulaires ont souvent un aspect assez particulier qui oriente les recherches. L'inflammation mycosique est le plus souvent caractérisée par une réaction granulomateuse subaiguë ou chronique à laquelle s'associent suppuration et fibrose.

- Ensemencement et isolement

La culture des champignons est souvent aisée sur les milieux classiques (milieu de Sabouraud, milieux du malt), mais parfois difficile (*Histoplasma*) ou impossible (*Rhinosporidium*). Certains champignons exigent des facteurs de croissance (milieux vitaminés pour *Trichophyton ochraceum*) ou des milieux spéciaux (milieux au sang pour la phase levures de champignons dimorphiques).

Les champignons des mycoses superficielles se développent à la température ordinaire, tandis que les champignons des mycoses profondes poussent également à 37°C, ce qui permet une différenciation avec de nombreux champignons saprophytes qui ne se développent pas à cette température.

Les levures se développent en 24 – 48 heures, les moisissures telles que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, en 2 -4 jours, les dermatophytes et la plupart des autres champignons pathogènes en 6 – 15 jours.

Les champignons ne sont pas sensibles à certains antibiotiques qui, additionnés au milieu de culture (chloramphénicol), permettent d'éliminer les contaminations bactériennes. L'actidione est un antibiotique antifongique qui inhibe la croissance des champignons saprophytes tout en laissant pousser la plupart des pathogènes (sauf *C. neoformans*, *Mucor*).

Dans certains cas (histoplasmoses), il est utile d'inoculer un animal sensible (souris ou hamster) avec le matériel pathologique ; l'ensemencement, 15 jours ou 1 mois après, des organes profonds, permet d'obtenir la culture pure du parasite (LARONE, 1995 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

- Identification du champignon

La culture du champignon étant obtenue, l'étude des caractères macroscopiques, microscopiques et physiologiques des champignons sur les milieux convenables, permettra d'en déterminer le genre et l'espèce.

L'identification des champignons est basée sur l'étude :

- des critères morphologiques, reposant potentiellement par la présence d'une capsule (*C. neoformans*), de tubes germinatif ou de Pseudomycélium (*Candida*), d'arthrospores (*Trichosporon*, *Geotrichum*), de chlamydo-spores (*C. albicans*), d'un bourgeonnement unipolaire (*Malassezia*) ou par la structure de la tête conidienne et du conidiophore (*Aspergillus*) ;
- des critères physiologiques, indispensables pour l'identification des champignons levuriformes (zymogramme, auxanogramme, activités enzymatiques : uréase, phénoloxydase).
- des critères immunologiques, peuvent fournir des renseignements épidémiologiques intéressants : ils permettent en particulier de préciser des sérotypes A ou B de *C. albicans* et les sérotypes A, B, C ou D de *C. neoformans* (LARONE, 1995 ; GRILLOT, 1996 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

1-8-3- Moyens diagnostiques indirects

- Recherche de la réactivité cutanée

Les intradermo-réactions explorent l'hypersensibilité retardée et parfois l'hypersensibilité immédiate pour certaines manifestations allergiques. Une réaction positive signifie que l'organisme a déjà été en contact avec les antigènes mais sans préciser la date de la contamination ; une mycose disséminée très évolutive peut entraîner une allergie cutanée (histoplasmose). La valeur diagnostique d'un tel test est donc limitée, mais son intérêt épidémiologique est souvent plus grand (histoplasmose, coccidioïdomycose) mais dépend de la qualité et de la spécificité des antigènes utilisés (LARONE, 1995 ; GRILLOT, 1996 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

- Réactions sérologiques

Les réactions sérologiques mettent en évidence la présence des anticorps traduisant l'immunisation humorale. Leur détection n'est intéressante seulement que dans certaines mycoses profondes et leur présence ne permet pas toujours de distinguer les infections des simples colonisations. Seules les séro-conversions franches et les grandes positivités ont une signification. Une recherche négative n'exclut pas un diagnostic (IgE spécifiques anti-aspergillaires).

Réactions de précipitation : parmi les méthodes de recherche d'anticorps précipitants, l'électrosynérèse s'avère la technique la plus sensible et la plus rapide (2 à 4 heures).

Réactions d'immunofluorescence : la méthode indirecte est actuellement la plus utilisée, utilisant un sérum anti-globulines humaines ou animales marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.

Autres techniques : d'autres méthodes, utilisant aussi des réactifs marqués (enzymo-immunologie de type ELISA, radio-immunologie) ont maintenant fait leur preuve et offrent un choix de techniques performantes.

La sensibilité et la spécificité de ces techniques sont en général bonnes, mais toujours dépendantes de la qualité des antigènes utilisés.

La difficulté d'interprétation des résultats obtenus réside dans la détermination du seuil de positivité, permettant d'éliminer le bruit de fond et les réactions croisées.

L'utilisation de fractions antigéniques purifiées pourrait permettre de détecter des anticorps plus significatifs sur le plan du diagnostic ou du pronostic (LARONE, 1995 ; GRILLOT, 1996 ; BOUCHET *et al.*, 1999 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

- Recherche des antigènes circulants

La mise en évidence d'anticorps spécifiques n'est pas toujours facile et fiable, même si la fonction immunitaire du patient est intacte. La recherche des anticorps peut être décevante ou peu significative, soit par absence ou diminution de leur synthèse, soit par la lenteur de leur production, soit par la faible valeur discriminante (candidose).

La détection d'antigènes circulants ou de métabolites a fait l'objet de récents développements dans le diagnostic des mycoses. Leur présence est souvent mieux corrélée avec l'évolution de l'infection fongique, et ne dépend que peu de l'intégrité du fonctionnement du système immunitaire du malade. De plus, ils apparaissent plus précocement que les anticorps correspondants et leur mise en évidence peut-être déterminante (cryptococcose, aspergillose, histoplasmosse) (LARONE, 1995 ; GRILLOT, 1996 ; BOUCHET *et al.*, 1999).

- Biologie moléculaire

L'incidence des infections fongiques nosocomiales s'est considérablement accrue depuis une vingtaine d'années, avec pour conséquences une augmentation de la durée d'hospitalisation et de la mortalité des patients. L'origine de cette situation se retrouve dans l'augmentation du nombre d'individus en situation d'immunodépression sévère (SIDA, cancers, etc...), l'utilisation incontrôlée d'antibiotiques à large spectre, ou l'administration de thérapeutiques immunodépressives (chimiothérapie). Les populations les plus exposées au risque mycosique sont les patients des unités de soins intensifs en chirurgie et en néonatalogie, chez lesquels se retrouvent 50% des infections fongiques nosocomiales. L'infection à *Candida (Torulopsis) glabrata*, à *Aspergillus*, à *Fusarium*, à *Trichosporon*, etc... c'est dans ce contexte qu'on a développé un certain nombre de techniques moléculaires destinées à identifier rapidement les agents fongiques responsables. Les techniques reposant sur la réaction de polymérase en chaîne (PCR) sont les plus prometteuses, mais restent encore, à ce jour, peu concurrentielles par rapports aux méthodes biochimiques. Par ailleurs, une meilleure compréhension des phénomènes épidémiologiques a rendu nécessaire la mise au point de méthodes de typage des souches fongiques. Particulièrement développées pour *C. albicans*, ces méthodes reposent sur l'analyse des fragments de restriction de l'ADN génomique, l'hybridation à l'aide de sondes particulières, l'électrophorèse en champ pulsé, ou encore la PCR. L'ensemble de ces techniques, combinée à l'étude de la sensibilité *in vitro* des souches aux antifongiques, permet une meilleure approche de l'épidémiologie et du traitement des infections fongiques (LARONE, 1995 ; GRILLOT, 1996 ; BOUCHET *et al.*, 1999 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

1-9- Agents des mycoses les plus fréquentes

1-9-1- Les levures

Les levures sont des champignons unicellulaires se reproduisant le plus souvent par bourgeonnement. Parmi les quelques 500 espèces connues, une trentaine peuvent être retrouvées en pathologie humaine.

L'isolement des levures est obtenu par réensemencement sur milieu Sabouraud – chloramphénicol et Sabouraud – chloramphénicol – actidione. Il existe également des milieux, notamment chromogéniques, qui permettent simultanément l'isolement et l'identification des principales espèces pathogènes (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. neoformans*).

L'identification de genre reposera sur 1) l'examen macroscopique de la souche : couleur (beige : *Cryptococcus*, rouge saumon : *Rhodotorula*, blanc : *Candida* ou autre), texture de la colonie ; 2) la recherche d'une filamentation sur milieux Rice Agar Tween 80 (RAT) ou Pomme de terre Carotte Bile (PCB). Une pseudofilamentation est caractéristique de *Candida*, la présence supplémentaire de chlamydospores signant la présence de *C. albicans*. Une vraie filamentation correspond au genre *Trichosporon*. L'absence de filamentation devra conduire à observer d'autres aspects morphologiques : levures de petites taille : *Candida* et *Torulopsis*, levures de tailles variables non jointives (capsule) : *Cryptococcus*, levures de grande taille, ovoïdes : *Saccharomyces*. On recherchera également une filamentation en sérum (blastèse), positive en moins de 4 heures pour *C. albicans*, ou la présence d'une capsule (test à l'encre de Chine) caractéristique de *Cryptococcus*. 3) Recherche d'une reproduction sexuée (asques et ascospores, comme chez *Saccharomyces cerevisiae*).

L'identification d'espèce est principalement basée sur les caractères d'assimilation (auxanogramme) et de fermentation (zymogramme), et les tests enzymatiques, à l'aide de galeries commerciales.

Les levures majeures identifiées au laboratoire sont des espèces des genres 1) *Candida*, avec *C. albicans* représentant à elle seule plus de 75% des levures isolées de l'homme toute origine et condition confondues. Les autres espèces importantes du genre sont notamment *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. tropicalis*. 2) *Cryptococcus*, avec essentiellement *C. neoformans*, et très secondairement *C. albidus* et *C. laurentii*. 3) *Malassezia* (*M. fufur*). 4) *Rhodotorula* (*R. rubra*). *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*). 5) *Trichosporon* (*T. asahii*, notamment). (LARONE, 1995 ; GRILLOT, 1996 ; BOUCHET *et al.*, 1999 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

1-9-2- Les dermatophytes

Les dermatophytes sont des champignons kératinophiles responsables d'épidermycoses de la peau glabre, de teignes du cuir chevelu et des poils, et d'onyxis.

Sur le plan épidémiologique, on distingue les espèces anthropophiles, parasites obligatoires de l'homme, les espèces zoophiles (*Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum*) et les espèces telluriques (*M. gypseum*). Après un prélèvement soigneux, l'examen mycologique comportera : 1) l'examen direct de l'échantillon recueilli après éclaircissement (potasse à 10, 20 ou 30%, chlorallactophénol, noir chlorazole, fluorescence). Dans les squames et les ongles, on observera les filaments de diamètre variable, arthosporés. Dans les cheveux et les poils, on reconnaîtra l'un des 5 types de parasitismes pilaires/ endothrix (*T. violaceum* ou *T. soudanense*), favique (*T. schoenleinii*), microsporique (*Microsporum spp.*), micoïde (*T. mentagrophytes*) et mégaspore (*T. verrucosum*). 2) La culture sur milieu de Sabouraud – chloramphénicol et Sabouraud – chloramphénicol – actidione. Après incubation à 27 °C et examen régulier après 5, 10, 15 jours, et voire plus, 3) le diagnostic mycologique reposera sur l'examen macroscopique et microscopique des colonies. L'examen macroscopique comportera l'observation de la taille de la colonies (rapidité de croissance), son aspect, sa surface, sa couleur recto et verso, la présence d'un pigment diffusible ou non. L'examen microscopique portera sur la recherche des éléments caractéristiques : a) aspect (« raquettes », « bambous ») et morphologie (chlamydo-spores, ramifications) des filaments, b) présence morphologie, disposition des microconidies et surtout, des macroconidies, c) ornements particulières (vrilles, organes pectinés, clou, chandeliers, organes nodulaires ou triangulaires). En cas d'identification impossible (mauvaise croissance, absence de sporulation), l'identification pourra être tentée après sub-culture sur divers autres milieux : pomme de terre – carotte (PD), pomme de terre – glucosé (PDA), corn – meal – agar, etc...., généralement à réaliser au laboratoire. Enfin, le diagnostic différentiel de certaines espèces pourra faire appel à d'autres tests, tels que la recherche d'une uréase, d'organes perforateurs, ou la recherche de la forme parfaite. (BADILLET, 1991 ; LARONE, 1995 ; GRILLOT, 1996 ; BOUCHET *et al.*, 1999 ; CHABASSE *et al.*, 1999).

1-9-3- Les *Aspergillus*

Dans la recherche d'une aspergillose, les prélèvements sont généralement d'origine pulmonaire (expectorations, prélèvements sous fibroscopie bronchique, etc....), ou proviennent éventuellement du sinus, du conduit auditif externe, de peau, etc.... A l'examen direct, on observera des filaments de taille régulière, de 3 à 5 µm de diamètre, septés, avec des ramifications à angle aigu. Il est important de noter à ce stade que tous les hyphomycètes vont se présenter sous cette forme, et que seule la culture conduira au diagnostic de certitude. Cette dernière est réalisée sur milieu de Sabouraud – chloramphénicol avec et sans actidione, à 27 et 37 °C. *A. fumigatus* (90% des isolements d'*Aspergillus*) pousse en 48 heures à 37 °C, parfois plus lentement les autres espèces d'*Aspergillus* préférant 27 °C. En cas de difficulté d'identification, un réensemencement sur milieu à l'extrait de malt ou sur milieu de Czapek (milieu de référence pour ces champignons) peut s'avérer nécessaire. L'identification des principales espèces pathogènes reposera sur la couleur et l'aspect des colonies, et sur l'examen microscopique. Il faut observer les différentes parties de la tête aspergillaire : silhouette, conidiophore, vésicule, phialides (et métules), conidies, ainsi que des cellules ou formations accompagnant la culture : cleistothèce, cellules en « noisette », sclérotés.

Le diagnostic sérologique revêt une importance toute particulière dans ce type de mycose, mais il est malheureusement souvent négatif dans le cas de la forme la plus grave de cette mycose, l'aspergillose pulmonaire invasive. Les principales espèces pathogènes retrouvées en clinique sont, de très loin la plus fréquente *A. fumigatus*, et *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. versicolor*, etc....

De nombreux autres champignons filamenteux, autrefois considérés comme de simples contaminants, peuvent être à l'origine de mycoses dites émergentes, qu'il convient de savoir diagnostiquer. Sans oublier les autres espèces fongiques responsables de mycoses graves : zygomycètes, champignons dimorphiques, etc.... IL est nécessaire de se reporter à des ouvrages donnant un panorama de l'ensemble des mycoses retrouvées aujourd'hui dans les laboratoires (par exemple, le Guide de mycologie médicale de H. Koenig). (BOIRON, 1996).

1-10- Les antifongiques

La conception de la triade classique de l'infection : parasite – hôte – antifongique est d'une importance particulière dans la chimiothérapie des mycoses. La constitution anatomique et la physiologie des champignons sont bien particulières, différentes de celles des bactéries ; de ce fait, la plupart des antibactériens ne sont pas des antifongiques. La

composition de la paroi cellulaire, du matériel qui l'entoure et de la membrane cytoplasmique joue un rôle considérable dans la perméabilité de la cellule. Pour cela, non seulement l'hydrosolubilité mais aussi la liposolubilité des substances antifongiques méritent une attention particulière.

Plusieurs familles thérapeutiques sont utilisables actuellement dans le traitement des mycoses :

- Les polyènes : nystatine, amphotéricine B
- Les pyrimidines : flucytosine
- Les azolés : imidazolés, triazolés
- La griséofulvine
- Les allylamines : terbinafine
- Les morpholines : amorolfine
- L'hydroxypyridone : ciclopiroxolamine.

Les antifongiques agissent différemment selon leur famille chimique sur les organites cibles des champignons. Certains ont une action sur la synthèse de la paroi fongique : polyoxines, nikkomycines, papulacandines, echinocandines (ils sont encore à l'étude), d'autres sur la membrane plasmique (polyènes, ciclopiroxolamine), ou sur l'ergostérol, constituant spécifique de la paroi des cellules fongiques (allylamines, azolés, terbinafine, thiocarbamate et amorphine). Certains bloquent la division cellulaire en métaphase (griseofulvine). La flucytosine agit comme inhibiteur de la synthèse des acides nucléiques. Les mitochondries sont les cibles des inhibiteurs de la chaîne respiratoire (ciclopiroxolamine).

Les mécanismes d'action des antifongiques permettent de comprendre la résistance des champignons aux médicaments.

In vitro, on teste l'efficacité des antifongiques par l'étude de la CMI (concentration minimale inhibitrice). L'obtention des souches est différente pour les dermatophytes, les levures ou les moisissures. Les méthodes ne sont pas standardisées, et les CMI sont différentes selon les souches étudiées et selon les antifongiques testés. La CMF, signifie la concentration minimale fongicide (concentration minimale d'antifongique capable de tuer plus de 90 % des agents

pathogènes, après 24 ou 48 heures d'incubation). Certains antifongiques ont une CMI = CMF comme l'amorolfine ou la terbinafine, on parle alors de fongicidie intrinsèque.

Ces mesures de CMI sont intéressantes pour les champignons responsables de mycoses profondes, ou de mycoses à répétition, telles que les levures.

En clinique, l'efficacité du traitement est jugée sur la guérison clinique et la négativation des examens mycologiques.

1-10-1- Antifongiques utilisés en pratique dermatologiques

- Les allylamines

Ils agissent sur la synthèse de l'ergostérol au stade de l'époxydation du squalène, et l'accumulation de squalène entraîne la mort du champignon. Il s'agit d'antifongiques fongicides intervenant au niveau du cytochrome P450 (CYP2D6) (RYDER, 1992 ; VICKERS *et al.*, 1999).

- **La terbinafine** (SAMSOEN, 1992 ; SAYAG *et al.*, 1995)

C'est une molécule fongicide avec une CMI superposable à la CMF. Les CMI montrent une action fongistatique pour *Candida albicans*. Pour *Malassezia furfur*, on note une activité *in vitro*, mais la terbinafine prise par voie orale n'est pas retrouvée dans la sueur, et n'est donc pas un traitement du *Pityriasis versicolor* (FAERGEMANN, 1994 ; JENSEN, 1990). Elle agit aussi sur certains champignons dimorphes.

Chez l'homme, la terbinafine est absorbée à plus de 70 % au niveau du tube digestif, puis diffuse rapidement par voie sanguine (concentration plasmatique maximale atteinte en 2 heures). Elle est fortement liée aux protéines plasmatiques. Métabolisée largement dans le foie, elle diffuse ensuite rapidement vers le derme et se concentre dans le *stratum corneum*. Elle diffuse aussi dans le sébum, atteignant des concentrations élevées dans les follicules pileux, les cheveux, les ongles, le tissu graisseux et les zones riches en sébum. Cette distribution reflète bien le caractère lipophile et kératinophile de la molécule (BIMBAUM, 1990). Dans l'ongle, la pénétration se fait par la matrice et par le lit de l'ongle, avec des concentrations efficaces dès la 4^{ème} semaine de traitement (FAERGEMANN *et al.*, 1991 ; FINLAY, 1992). Il faut 3 mois de traitement pour obtenir une diffusion du produit sur la totalité de la tablette unguéale. La rémanence du produit dans la peau, les ongles et les

cheveux explique une amélioration prolongée des signes cliniques malgré l'arrêt du traitement.

L'élimination du produit se fait sous forme de métabolites inactifs, dans les urines (70 % de la dose administrée). Contrairement au kétoconazole, on ne note pas d'effet endocrinien.

La terbafine a la même efficacité chez le sujet jeune et chez le sujet âgé. Elle n'est ni mutagène ni embryotoxique pour l'animal, mais son emploi est contre-indiqué en cas de grossesse, et doit s'accompagner d'une contraception efficace chez la femme en âge de procréer. Le médicament est excrété dans le lait maternel, son emploi est donc déconseillé pendant l'allaitement. Il ne modifie pas le métabolisme des hormones et des autres médicaments (BACK, 1990).

Elle est contre-indiquée en cas d'hypersensibilité à la terbinafine, en cas d'insuffisance hépatique ou rénale sévère. En cas de traitement par rifampicine, on peut noter une diminution des taux plasmatiques de terbinafine.

Les effets indésirables décrits dans la littérature sont les suivants :

* Troubles digestifs : nausées, douleurs abdominales, diarrhées, anorexie (DEL PALACIO *et al.*, 1990).

* Troubles du goût (agueusie ou dysgueusie), réversibles après arrêt du traitement en 1 à 2 mois (BACK, 1992 ; STRICKER *et al.*, 1992 ; BEUTLER *et al.*, 1993 ; DEKKER, 1993).

* Eruptions cutanées transitoires, urticaires ou rashes non spécifiques, érythèmes polymorphes (MAC GREGOR *et al.*, 1994).

* Des réactions cutanées sévères ont été décrites, de façon exceptionnelle, à type de syndrome de Stevens-Johnson, ou syndrome de Lyell (CARSTENS *et al.*, 1994 ; RZANY *et al.*, 1994). Ces réactions sont apparues dans les deux premiers mois de traitement

* Troubles neurologiques : céphalées, vertiges (DEL PALACIO *et al.*, 1990).

* Troubles hépatiques : hépatites de type mixte à prédominance cholestatique. Une augmentation des transaminases peut se produire en cas de traitement dans 1 cas sur 10 000 (DEL PALACIO *et al.*, 1990 ; LOWE *et al.*, 1993 ; VAN'T WOUT *et al.*, 1994 ; IHRE-LUNDGREN *et al.*, 1995).

* Modifications de la formule sanguine (neutropénie, thrombopénie) réversibles à l'arrêt du traitement (KOVACS *et al.*, 1994 ; SAYAG *et al.*, 1995 ; ZAIAS *et al.*, 1996).

Ces manifestations justifient une surveillance sanguine tous les mois en cas de traitement long, comportant une surveillance de la NFS et des enzymes hépatiques (BAUDRAZ-ROSSELET *et al.*, 1992 ; JONES, 1995 ; NEJJAM *et al.*, 1995).

Ce produit est utilisé chez l'enfant surtout pour les teignes à *Trichophyton tonsurans* (l'agent des teignes le plus fréquent aux USA (PADILLA-DESGARENNES *et al.*, 1992). Il n'y a pas d'AMM pour cette indication en France. Il est actif sur *Trichophyton violaceum*, avec un succès de 100 % (HAROON *et al.*, 1992 ; JONES, 1995 ; NEJJAM *et al.*, 1995 PADILLA-DESGARENNES *et al.*, 1992). La durée du traitement varie de 4 semaines pour certains à 12 semaines pour d'autres. Il semble moins actif sur les teignes microscopiques ou inflammatoires.

* Dans les essais cliniques, il faut 6 mois pour traiter un onyxis à dermatophyte des mains avec 95 % de guérison, 12 mois pour obtenir 80 % de guérison au niveau des ongles des orteils (WENIG, 1995). Cribier et Grosshans ont traité 50 onychomycoses à dermatophytes avec 86 % de guérison en 4 à 8 mois (CRIBIER *et al.*, 1994). Dans certaines études, les taux de guérison sont d'environ 80 à 90 % sans rechute à 1 an, mais le degré de l'atteinte unguéale n'est pas précisé (CHIRITESCU *et al.*, 1996). Des essais de traitements courts de trois mois ont lieu, pour les onychomycoses, la guérison clinique apparaissant après arrêt du traitement comme pour l'itraconazole du fait de la rémanence du produit (GOODFIELD *et al.*, 1992). La guérison mycologique est plus rapide.

Récemment, une étude de traitement court a montré que 6 semaines de traitement peuvent suffire pour les ongles des mains, mais pas pour les ongles des pieds. Dans cette étude, les critères favorables à la guérison sont une atteinte récente et ne touchant pas les gros orteils. Le facteur négatif est la persistance d'un examen mycologique négatif après 3 mois de traitement, persistance qui devrait imposer un traitement plus long. L'importance de l'atteinte de départ (matricielle ou distale) importe peu dans cette étude (TAUSCH *et al.*, 1997). Les récurrences sont peu fréquentes à l'arrêt du traitement, avec un taux de 6 % pour les mains et 12 % pour les pieds à 1 an. Roberts signale un taux de 9 % de récurrence, et confirme l'efficacité du traitement et sa bonne tolérance (ROBERTS, 1994).

Pour certains auteurs, il faut associer un traitement local en cas d'atteinte importante. Ceci a été fait en associant du Locéryl[®] (amorolfine) sur les ongles dermatophytes des orteils ayant une atteinte matricielle (FEUILHADE DE CHAUVIN, 1995 et 1996).

Lamisil[®] crème (1995) : traitement local des dermatophytes de la peau glabre en 1 à 2 semaines à raison d'une application par jour (HOLDCROFT, 1994), du *Pityriasis versicolor* en 2 semaines (ASTE *et al.*, 1991), des intertrigos à dermatophytes en 2 à 4 semaines (une fois par jour ou deux applications par jour pendant une semaine). Certains auteurs donnent de bons résultats dans 80 à 90 % des cas de mycoses de la peau glabre, 75 à 85 % des cas d'intertrigos. La guérison est clinique et mycologique (SAYAG *et al.*, 1996).

- **La naftifine**

La naftifine (crème à 1 %) est commercialisée dans plusieurs pays. Des études comparant la naftifine dans les dermatophyties plantaires et de la peau glabre avec des dérivés imidazolés (clotrimazole, éconazole) ont montré des résultats identiques (DEGREEF, 1993 ; DEGREEF *et al.*, 1994).

L'activité anti-inflammatoire de la naftifine reste inexplicée.

- **La buténafine**

D'autres allylamines comme la buténafine sont à l'étude.

- Les polyènes

Les deux principaux polyènes utilisés sont : la nystatine (Mycostatine[®]) et l'amphotéricine B (Fungizone[®]) pour le traitement des candidoses digestives et mucocutanées. *In vivo*, ils ne possèdent qu'une action fongistatique. Plus de 60 autres polyènes produits par les actinomycètes ont été découverts, mais ne sont pas utilisés.

- **La flucytosine (1967)**

La 5-fluorocytosine (ou flucytosine) : pyrimidine fluorée synthétique, elle pénètre dans la cellule fongique grâce à une cytosine-perméase. Son mode d'action repose sur l'inhibition de la synthèse protéique par incorporation à l'ARN, et inhibition de la synthèse d'ADN. Fongistatique *in vivo*, la flucytosine est principalement active sur les levures et les agents de chromoblastomycoses. Son efficacité est limitée par l'existence de résistances primaires

fréquentes (70% des souches de *C. tropicalis* sont résistantes), et par l'apparition de résistances secondaires, interdisant son administration en monothérapie. De plus, elle possède une toxicité hématologique et digestive.

Ses indications ne concernent pas les mycoses courantes.

- **Les dérivés azolés**

Ce nom générique définit des composés qui ont un noyau imidazole. De nombreux composés sont utilisés soit en topique, soit par voie générale.

***Le miconazole (Daktarin[®])**

Il fut le premier imidazole utilisable par voie IV.

*** Le kétoconazole (1979)**

Il fut le premier dérivé imidazolé actif par voie orale. L'étendue de son spectre d'action antifongique a révolutionné le traitement des mycoses dans les années 1980. Son usage par voie orale est limité du fait de risques hépatiques.

*** L'itraconazole**

C'est un dérivé dioxalane triazolé. Il s'agit d'une molécule lipophile, pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool et l'éther. Le mode d'action des triazolés est le même que celui des dérivés imidazolés avec une spécificité plus grande pour l'enzyme cytochrome P450 fongique que pour le cytochrome P450 humain. Il est réservé à un usage hospitalier. Il est très actif sur les dermatophytes, les levures, certains agents des mycoses profondes et les moisissures.

*** Le fluconazole (1988)**

Il s'agit aussi d'un bistriazolé, soluble dans l'eau, qui agit sur l'inhibition de la synthèse des stérols fongiques plus que sur celle des stérols des mammifères, avec une action très spécifique sur le cytochrome P450 fongique. Son spectre d'action concerne aussi les dermatophytes mais il a une indication particulière pour les levures.

*** Le saperconazole (VAN CUTSEN *et al.*, 1989)**

Il s'agit d'un dérivé triazolé fluoré dont le spectre d'action est le même que celui de l'itraconazole, avec une action renforcée sur *Aspergillus* (VANDEN BOSSCHE, 1990).

Il existe sous forme de capsules à 100 mg, et pourrait être injecté par voie intraveineuse, car il est trois fois plus soluble que l'itraconazole.

*** Les autres molécules imidazolées**

- Le sertaconazole agit sur les moisissures (*Scopulariopsis brevicaulis*) (TOSTI *et al.*, 1996), sur *Candida albicans* y compris sur les souches résistantes aux autres imidazolés. *In vitro*, il semble très actif sur *Epidermophyton floccosum* et sur *Trichophyton mentagrophytes*.

- Le terconazole est un triazolé disponible uniquement en traitement externe des vulvovaginites (crème et ovules).

- Le flutrimazole (UR-4059) a été essayé *in vitro* sur différents champignons (CARRILLO-MUNOZ *et al.*, 1994).

- D'autres dérivés imidazolés actifs par voie orale sont à l'étude : le vibunazole, l'alteconazole et l'ICI 195, 739 (DEGREEF, 1993). Le voriconazole est un triazolé étudié pour ses propriétés antifongiques sur les champignons opportunistes (KAUFFMAN *et al.*, 1997).

- De nombreuses molécules imidazolées dont la toxicité est importante par voie générale sont utilisées uniquement en topiques.

- L'Amycor-Onychoset[®] est une forme galénique intéressante qui contient 40 % d'urée. Il s'agit d'une crème destinée à la destruction des ongles malades, dont l'application doit être suivie d'un traitement local.

- Morpholines

L'amorolfine est un dérivé de la morpholine, fongistatique et fongicide. Sa fongicidie vient d'une double action sur la synthèse de l'ergostérol : inhibition de deux enzymes, la delta-4 réductase et la delta 7-8 isomérase. On note, une accumulation de delta-14 ignostérol dans la paroi cellulaire, alors que le taux d'ergosterol est bas. On observe alors des dépôts de chitine dans et autour de la paroi, ce qui entraîne la mort du champignon. Réservée à un usage local, du fait de sa toxicité, l'amorolfine est utilisé sous forme de solution filmogène à 5 %,

depuis 1992, pour le traitement des onychomycoses sous le nom de Locéryl[®] (MARTY, 1995 ; ZAUG, 1995). Elle est fongicide pour les dermatophytes, les levures, les dématiées (*Scytalidium dimidiatum*) et sur certaines moisissures (*Scopulariopsis brevicaulis*). Certains genres sont peu sensibles : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*. Son efficacité clinique a été étudiée sur les onychomycoses (ZAUG, 1995).

- Ciclopiroxolamine

Il s'agit d'un antifongique de la famille des pyridones, réservé à un usage local. Il a une action fongistatique en inhibant l'entrée d'ions métalliques, de phosphates et du potassium dans la cellule fongique. Il a une action fongicide en perturbant l'activité des chaînes respiratoires du champignon (en chélatant le fer en particulier) (ELEWSKI *et al.*, 1996 ; VIDIMOS *et al.*, 1991 ; VIGUIE-VALLANET *et al.*, 1997).

Son spectre d'activité est large : dermatophytes, levures et moisissures (*Scopulariopsis* et *Aspergillus*). L'activité antifongique est inconstante sur *Scytalidium dimidiatum*. Les germes Gram + et Gram - rencontrés en dermatologie sont sensibles. Cette molécule possède aussi une action anti-inflammatoire importante (LASSUS *et al.*, 1988). Elle se présente sous différentes formes galéniques :

- * Crème : Mycoster[®] 1 % (1982), indiquée dans le traitement local de toutes les mycoses cutanées (dermatophyties, candidoses, et *Pytirisias versicolor*),
- * Solution : Mycoster[®] 1 % (1982) : utile pour le traitement des mycoses pileuses,
- * Solution filmogène à 8 % (1991) : utilisée pour le traitement local des mycoses unguéales (CESCHIN-ROQUES *et al.*, 1991).

- **Griséofulvine** (1964)

Isolée de *Penicillium griseofulvum* et d'autres *Penicillium*, elle a été le premier antifongique actif sur les dermatophytes, utilisée en clinique humaine (1958) (PADILLA-DESGARENNES *et al.*, 1996).

Son spectre d'action est très étroit, comprenant les dermatophytes, les genres *Alternaria* et *Aspergillus* et certains agents de mycétomes (DEL ROSSO, 1996).

- D'autres familles d'antifongiques sont à l'étude

La cilofungine, analogue de l'échinocandine B (KAUFFMAN *et al.*, 1997) agit en inhibant la synthèse de B-glucan de la paroi cellulaire fongique. Il s'agit d'un antifongique à l'étude dans les candidoses et aspergilloses mais aussi dans les pneumocystoses (KAUFFMAN *et al.*, 1997). La dermaseptine, peptide de la peau des amphibiens a des propriétés antifongiques sur les *Candida* et les *Aspergillus* (MOR *et al.*, 1991). La nikkomycine Z qui inhibe la synthèse de la chitine fongique est un traitement futur des champignons dimorphes (KAUFFMAN *et al.*, 1997).

Les pradimicines sont fongicides sur les *Candida* et les *Aspergillus* (KAUFFMAN *et al.*, 1997). Des souches de *Bacillus licheniformis* FSJ 2 sont antifongiques pour les dermatophytes *in vitro* (FASSOUANE *et al.*, 1995).

Des facteurs de croissance (G-CSF, GM-CSF) ont été utilisés chez les patients atteints de mycoses profondes et résistants aux traitements pour aider l'action des antifongiques (BODEY *et al.*, 1993).

Les cytokines ont été essayées (IL 12 et interféron-gamma) dans le traitement d'infections fongiques graves chez les animaux (JOLY *et al.*, 1994). Leur utilisation en pathologie humaine est hypothétique.

Certaines molécules soufrées auraient une activité antifongique, surtout sur les dermatophytes. Il s'agit d'études *in vitro*.

- Les antifongiques locaux

Les antifongiques locaux restent recommandés dans les mycoses superficielles en première intention. On constate souvent une amélioration rapide des lésions avec ces traitements locaux seuls, mais le taux de guérison clinique est voisin de 90 % dans les meilleurs cas, et la guérison mycologique n'excède pas 85 % des cas (JONES, 1995 ; SMITH, 1996).

- Traitements d'appoint

Le décapage des lésions cutanées est nécessaire avant de traiter par un antifongique local. Il en va de même pour les teignes et les onychomycoses (HAY *et al.*, 1988).

L'association de corticoïdes, préconisée par certains auteurs en cas de lésions inflammatoires est à éviter. En effet, l'application de corticoïdes locaux sur une mycose a toujours augmenté les signes cliniques de la mycose (extension d'une candidose vulvaire aux plis, apparition de granulomes sur une dermatophyte cutanée qui traduit la pénétration dermique du dermatophyte, extension d'une teigne du cuir chevelu traitée pour dermite séborrhéique). L'association d'un antifongique et d'un corticoïde dans la même préparation est inutile (CHIRITESCU *et al.*, 1996)

- Schémas thérapeutiques

Avant tout traitement d'une lésion supposée mycosique, un prélèvement s'impose pour confirmer le diagnostic (DEGREEF, 1993 ; ASSAF *et al.*, 1996). Pour qu'il soit fait dans de bonnes conditions, il faut un arrêt de plus d'un mois pour les antifongiques locaux et un arrêt de plus de 2 mois pour les antifongiques oraux ou les vernis. La meilleure solution reste donc de l'effectuer avant la mise en route du traitement (FEUILHADE DE CHAUVIN, 1995 et 1996).

- Médicaments d'avenir

L'itraconazole est un excellent antifongique pour traiter les teignes, à la dose de 100 mg/j pendant 30 jours (ELEWSKI, 1994).

Le fluconazole a été peu étudié dans les teignes. Il a servi au traitement d'un kériion dû à *Trichophyton mentagrophytes* en 20 jours à raison de 50 mg/jour (GATTI *et al.*, 1991).

1-10-2- Traitement des candidoses

Sur la peau, *Candida albicans* peut être considéré comme pathogène, car il n'existe pas à l'état saprophyte comme sur les muqueuses. Pour les autres levures, il faut des précautions pour affirmer leur pathogénicité.

- Candidoses cutanées

- **Candidoses à plis**

Il faut traiter les facteurs de macération et appliquer un antifongique local : dérivé imidazolé ou ciclopiraxolamine sous forme de crème 1 à 2 fois par jour.

L'association d'un traitement par voie orale se fait en cas de lésions très étendues, ou de déficit immunitaire associé (kétoconazole, itraconazole ou fluconazole).

- **Onychomycoses à Candida**

Elles sont presque toujours localisées sur les ongles des mains, accompagnées souvent d'un périonyxis. Le traitement fait appel aux traitements locaux surtout, dérivés imidazolés, Mycooster[®] en crème, associé à une solution filmogène antifongique sur l'ongle (Mycooster[®] ou Locéryl[®]).

- Candidoses des muqueuses

- **Candidoses buccales**

Le muguet est traité par voie topique avec des gels buccaux contenant un imidazolé (Daktarin[®]) ou par un polyène (nystatine ou amphotéricine B). Les imidazolés par voie orale ont été essayés : le kétoconazole à 200 mg/j est actif en 10 jours, l'itraconazole à 100 mg/j en 14 jours et le fluconazole à 50 mg/j en 7 à 14 jours est actif chez les sujets immuno-compétents.

- **Candidoses oro-pharyngées des sujets HIV+**

Elles nécessitent toujours un traitement par voie orale, à prolonger du fait de la faible réponse immunitaire du patient. Avec le fluconazole, il existe des risques de résistance aux traitements et de sélection d'espèce de *Candida* autre que *albicans* (*Candida tropicalis*, *Candida glabrata*) qui résistent aux imidazolés et aux triazolés.

- **Candidoses vaginales pour les candidoses vulvo-vaginales aiguës**

Ces lésions sont souvent sensibles aux traitements locaux (ovule et crème). Les candidoses vulvo-vaginales chroniques pour lesquelles il faut vérifier l'authenticité de la mycose par un prélèvement afin d'éliminer d'autres causes de vaginite infectieuse ou de vulvite non infectieuse avant de faire un traitement par voie générale.

- Candidoses cutané-muqueuses chroniques

Elles associent chez des enfants ou dès l'enfance des lésions cutanées (ongles souvent atteints), des lésions muqueuses chroniques et récidivantes et une immunodéficience de nature variée, avec souvent une ou plusieurs endocrinopathies. Le traitement fait appel aux imidazolés et aux triazolés (itraconazole et fluconazole) sur de longues durées.

- Candidoses des nourrissons

La candidose congénitale se caractérise par l'apparition à la naissance d'une éruption erythémato-papuleuse puis pustuleuse, sans atteinte muqueuse, qui évolue spontanément vers la guérison en 8 à 10 jours.

La candidose néonatale survient une semaine après la naissance. Elle est due à une contamination pendant l'accouchement. Le traitement comprend des antifongiques locaux pour traiter les lésions cutanées (siège) et un antifongique par voie buccale (Fongizone® pour traiter les lésions muqueuses : muguet et atteinte du tube digestif).

1-10-3- *Malassezia furfur*

- Les folliculites à *Malassezia furfur*

Les folliculites à *Malassezia furfur* surviennent sur le front des nouveau-nés (ARACTINGI *et al.*, 1991 ; AMORIC *et al.*, 1995) et guérissent avec un traitement imidazolé local ou chez des adultes jeunes chez qui il faut effectuer une correction des causes favorisantes : locales (transpiration, macération, hyperséborrhée, hyperkératose de l'infundibulum folliculaire), ou thérapeutiques (corticothérapie locale ou générale, antibiothérapie), ou un problème de terrain (diabète, immuno-dépression) (SAVIN, 1996).

- Dermatite séborrhéique

Malassezia furfur se trouve en grande quantité sur le visage en cas de dermatite séborrhéique. Le rôle pathogène de cette levure est controversé (BROBERG, 1995), mais le traitement de cette affection fait appel souvent à des antifongiques. Le kétoconazole a un rôle anti-inflammatoire. Le succès de certaines substances comme les corticoïdes dans la dermatite séborrhéique s'explique aussi par un mécanisme anti-inflammatoire (NENOFF *et al.*, 1994). Cette action anti-inflammatoire se fait par interférence avec la production de leucotriènes. A noter aussi, pour cet antifongique, une action sur l'acide rétinoïque de la peau (DEGREEF *et al.*, 1994).

1-11- Conclusion

En pédiatrie, les mycoses le plus fréquemment rencontrées sont les candidoses digestives bénignes qui guérissent rapidement sous antifongique buccal. Les candidoses néonatales et la candidose cutanéomuqueuse chronique ont été discutées. Les dermatophyties

les plus fréquentes chez les enfants sont les teignes (CAPESIUS-DUPIN *et al.*, 1995). L'association d'érythromycine ou de prednisone au traitement des kériions par griséofulvine a une petite action sur le prurit et les douleurs, mais ne réduit pas le temps de traitement. A l'inverse, l'association de topique antifongique réduit le temps de traitement (AL-FOUZAN *et al.*, 1993). En cas de teigne, il faut rechercher une atteinte des adultes de l'entourage.

Les dermatophyties de la peau glabre des enfants sont dues à *Microsporum canis* souvent, ou à d'autres agents des teignes. Les onyxis sont rares (HENNEQUIN *et al.*, 1996) et sont accompagnés d'intertrigos au niveau des pieds. Devant ces lésions, un examen attentif des pieds des autres membres de la famille permet de retrouver des lésions chez les parents et/ou les autres enfants. Il est alors important de traiter toute la famille pour faire disparaître le dermatophyte de la maison.

Chez les jeunes enfants, *Malassezia furfur* donne rarement des lésions de pityriasis versicolor, mais un tableau de pustulose néonatale (ARACTINGI *et al.*, 1991), et des folliculites cicatricielles chez des nourrissons. Toutes ces lésions disparaissent sous traitement antifongique local (AMORIC *et al.*, 1995). On a souvent recours à la griséofulvine, mais des traitements par terbinafine ou des dérivés azolés (fluconazole ou itraconazole) ont été essayés avec succès chez les enfants (ELEWSKI, 1996 ; SUAREZ, 1997).

La mortalité et la morbidité des infections fongiques à *Aspergillus sp.* et à *Candida sp.* restent encore élevées, surtout chez les patients transplantés ou atteints de cancers. Les échecs cliniques observés ne sont pas toujours imputables à la résistance *in vitro* des souches impliquées, d'autant que peu de méthodes standardisées permettent leur détection. Par ailleurs, les valeurs critiques déterminant le seuil de résistance ne sont clairement établies que pour la 5-fluorocytosine, l'itraconazole et le fluconazole pour les seuls *Candida* dans les localisations muqueuses de candidoses. Les traitements classiques par l'amphotéricine B, les azolés conventionnels ou la 5-fluorocytosine ont montré leurs limites. Les derniers antifongiques mis sur le marché, susceptibles de prendre leur relais devraient notamment présenter un large spectre d'activité, être idéalement fongicides, ne pas donner lieu à des interactions médicamenteuses, avoir des propriétés pharmacocinétiques favorables et être démunis de toxicité, si possible pour un coût raisonnable. (LORTHOLARY, 2004).

2- GENERALITES SUR *MORINDA MORINDOIDES*

La plante étudiée appartient à la famille des *Rubiaceae*. Les *Rubiaceae* sont des arbres, arbustes, des lianes ou des herbes. Les feuilles, opposées ou verticillées, simples, stipulées, à stipules intra ou inter-pétiolaires, sont de formes et de tailles variables. Les inflorescences sont des grappes ou des cymes. Les fleurs, hermaphrodites, tétramères ou pentamères, ont un calice généralement dialysépale, une corolle gamopétale à lobes valvaires ou terdus ; un androcée inséré sur la corolle et un gynécée infère habituellement bicarpellé. Les fruits sont des capsules, des baies ou des drupes.

Morinda morindoides (Bak.) Milne-Redh, Kew Bull. 1944 : 31 (1947) ; Hepper, F.W.T.A., ed. 2,2: 189 (1863), est une liane grimpante, glabre. Les feuilles, opposées, oblongues elliptiques ou obovales elliptiques cunéiformes à la base. Ces feuilles longuement acuminées, glabres, mesurent 6 – 15 cm de longueur sur 3 – 8 cm de largeur (Figure 1) : le limbe porte, environ, 6 paires de nervures latérales. Les fleurs, blanches, groupées et capitules, ont le tube de la corolle court et robuste. Les fruits, bosselés, jaunes à maturité, mesurent 4 cm de diamètre (ZIRIHI, 1991).

1- Position systématique

Règne	: Végétal
Sous règne	: Eucaryote
Embranchement	: Spermaphyte
Sous embranchement	: Angiosperme
Classe	: Dicotyledones : Dialypetales
Ordre	: Gentianales
Famille	: <i>Rubiaceae</i>
Genre	: <i>Morinda</i>
Espèce	: <i>morindoides</i>

2- Répartition géographique

Espèce guinéo-congolaise, on la trouve, souvent, sur les lisières des forêts.

3- Utilisations thérapeutiques

- Les Bété d'Issia (Centre-ouest de la Côte d'Ivoire) l'appelle *Zèllékelé* et l'utilise comme antifongique (ZIRIHI, 1991).
- Une décoction aqueuse de feuilles fraîches constitue un remède traditionnel typique employé pour le traitement de la malaria, des vers intestinaux et des amibiases (KAMBU, 1990 ; TONA *et al.*, 1999).
- Ses extraits possèdent une activité antiprotozoaire, particulièrement sur *Entamoeba histolytica*. (CIMANGA *et al.*, 2006).
- Elle est traditionnellement utilisée dans le cadre des syndromes diarrhéiques dans la région de Daloa (Côte d'Ivoire) (BAHI *et al.*, 2003).

4- Molécules isolées à partir des feuilles de *Morinda morindoides*

Des travaux antérieurs ont permis à certains auteurs d'isoler plusieurs molécules à partir des feuilles de *Morinda morindoides*. Ce sont :

- Treize (13) flavonoïdes :

Quercétine ; quercétine 7, 4'- diméthyléther ; quercétine 3- rutinoside ; quercétine 3- rhamnoside ; kaempférol 3- rhamnoside ; kaempférol 3- rutinoside ; kaempférol 7- rhamnosyl- sophoroside ; chrysoériol 7- néohespéridoside ; apigénine 7- glucoside ; lutéoline 7-glucoside ; kaempférol ; apigénine ; lutéonine. (CIMANGA *et al.*, 1995, 2006)

- Quatre (4) iridoïdes :

Gaertnéroside ; acide gaertnérosique ; méthoxygaertnéroside ; époxy- gaertnéroside. (CIMANGA *et al.*, 2006)

- Un stérol (1) :

Stigmastérol. (SERI, 2006)

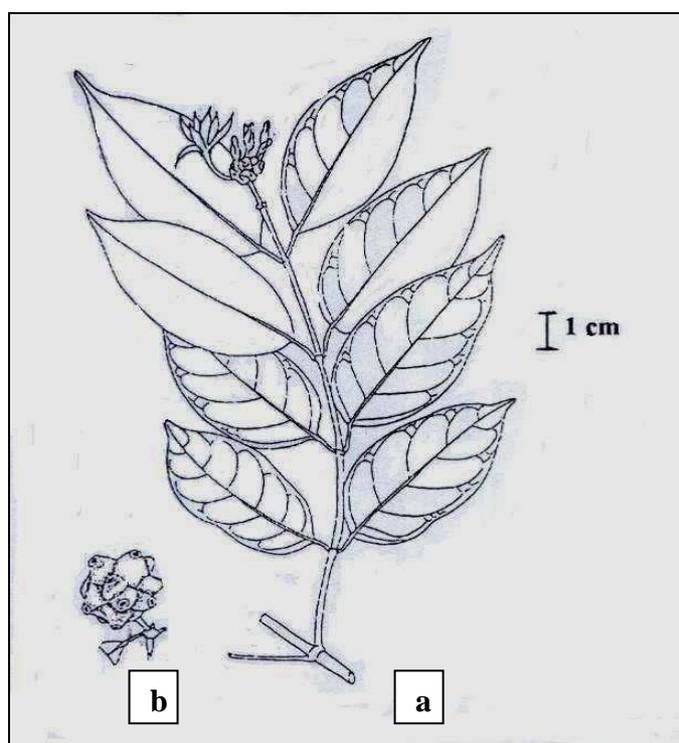


Figure 1: *Morinda morindoides* (Back.) Milne-Redh. (*Rubiaceae*)

- a- Rameau feuillé avec fleurs
- b- Fruits



Photographie: *Morinda morindoides* (Back.) Milne-Redh. (Rubiaceae)

a- Rameau feuillé avec fleurs

II

MATERIEL ET METHODES

1- MATERIEL

1-1 Matériel biologique

1-1-1 Substance végétale

Le matériel végétal utilisé est constitué de feuilles de *Morinda morindoides* récoltées dans la région du Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire.

1-1-2 Germes testés

Le support microbien est composé de souches fongiques de *Candida Albicans* (n° 3076/PV du 06/04/2000), d'*Aspergillus fumigatus* (n° 896/AB du 18/01/2000) et de *Cryptococcus neoformans* (n° 9527/PB du 21/03/2000) fournies par le service de Mycologie de l'UFR des Sciences Médicales d'Abidjan (Côte d'Ivoire). Ces souches ont été isolées des prélèvements vaginaux, aspirations bronchiques et expectorations de malades au service des maladies infectieuses du CHU de Treichville (Abidjan).

1-2 Milieux de culture

La gélose Sabouraud glucosée de références 695771 DARDILLY ADM Y42310 fournie par OXOID LTD a été utilisée pour la culture des germes.

2- METHODES

2-1 Préparation des extraits végétaux

Les feuilles de *Morinda morindoides* ont été lavées, découpées et séchées à l'abri du soleil et rendues en poudre fine grâce à un broyeur de type IKA-MAG.

2-1-1 Préparation de l'Extrait total aqueux (Eaq)

L'extrait total aqueux a été préparé selon la méthode décrite par GUEDE-GUINA *et al.* (1993), puis améliorée par ZIRIHI *et al.* (2003).

Pour obtenir l'Eaq, 80g de poudre de *Morinda morindoides* ont été macérés dans 2 litres d'eau distillée puis homogénéisés sous agitation magnétique pendant 48 heures à 80°C à l'aide d'un agitateur magnétique de type IKA-MAG RCT. L'homogénat obtenu est filtré successivement deux fois sur du coton hydrophile puis sur du papier WHATMAN 3µm. Le filtrat obtenu est évaporé à l'aide d'une étuve bactériologique de type MMM Medcenter (Venticell) à 45°C (GUEDE-GUINA *et al.*, 1993). La poudre qu'on obtient est l'extrait total aqueux. (Figure2).

2-1-2 Préparation de l'Extrait éthanolique 70% (Eeth)

L'Eeth a été obtenu en dissolvant 25g de l'Extrait total aqueux dans 500 ml d'une solution d'éthanol 70% puis homogénéisé pendant 24 heures à l'aide d'un agitateur magnétique. Après filtration sur du coton hydrophile puis sur du papier WHATMAN 3µm, le filtrat recueilli est évaporé à l'étuve de type MMM Medcenter (Venticell). La pate obtenue est de couleur verdâtre et constitue l'Extrait éthanolique 70% (Eeth). (Figure 3)

2-1-3- Préparation des Extraits acétatiques (Eac) et acétatiques H₂O (Eac H₂O)

Ces extraits ont été obtenus en dissolvant 25g d'extrait éthanolique 70% dans 500 ml d'une solution composée d'un mélange d'acétate d'éthyle et d'eau distillée (v/v). Le tout est homogénéisé pendant 24 heures à l'aide d'un agitateur magnétique. Après décantation on obtient deux phases : une phase supérieure qui est l'acétate d'éthyle et une phase inférieure qui est l'eau distillée. Les deux phases sont recueillies et évaporées à l'étuve de type MMM Medcenter (Venticell). La phase acétatique donne une pate qui est l'Extrait acétatique (Eac) et la phase aqueuse donne une poudre qui est l'Extrait acétatique H₂O (Eac H₂O). (Figure 4)

2-1-4- Fractionnement de l'Extrait acétatique

Les Fractions 1, 2, 3 et 4 sont obtenues après séparation de l'Eac sur une colonne chromatographique montée avec du gel de silice [MERCK- Gel de Silice 60 (0,063-0,200 mm)]. La colonne utilisée a un diamètre de 2 cm et une hauteur de 50 cm avec un robinet en verre. L'éluant est constitué par du dichlorométhane pur et par un mélange de dichlorométhane-méthanol (95 /5). Le gel de silice est préparé dans le dichlorométhane pur puis coulé dans la colonne jusqu'à une hauteur de 20 cm.

Dans cette colonne ainsi préparée, 0,25 g d'Eac y sont introduits. Une fois sur la surface du gel, l'extrait est protégé par du coton. Dans un premier temps, le dichlorométhane pur a été utilisé comme éluant jusqu'à infiltration total de l'extrait dans le gel puis le mélange dichlorométhane-méthanol est utilisé jusqu'à la fin de la séparation. Quatre fractions sont obtenues en fonction de la coloration. Ces fractions sont recueillies et évaporées à l'étuve de type MMM Medcenter (Venticell). (Figure 5)

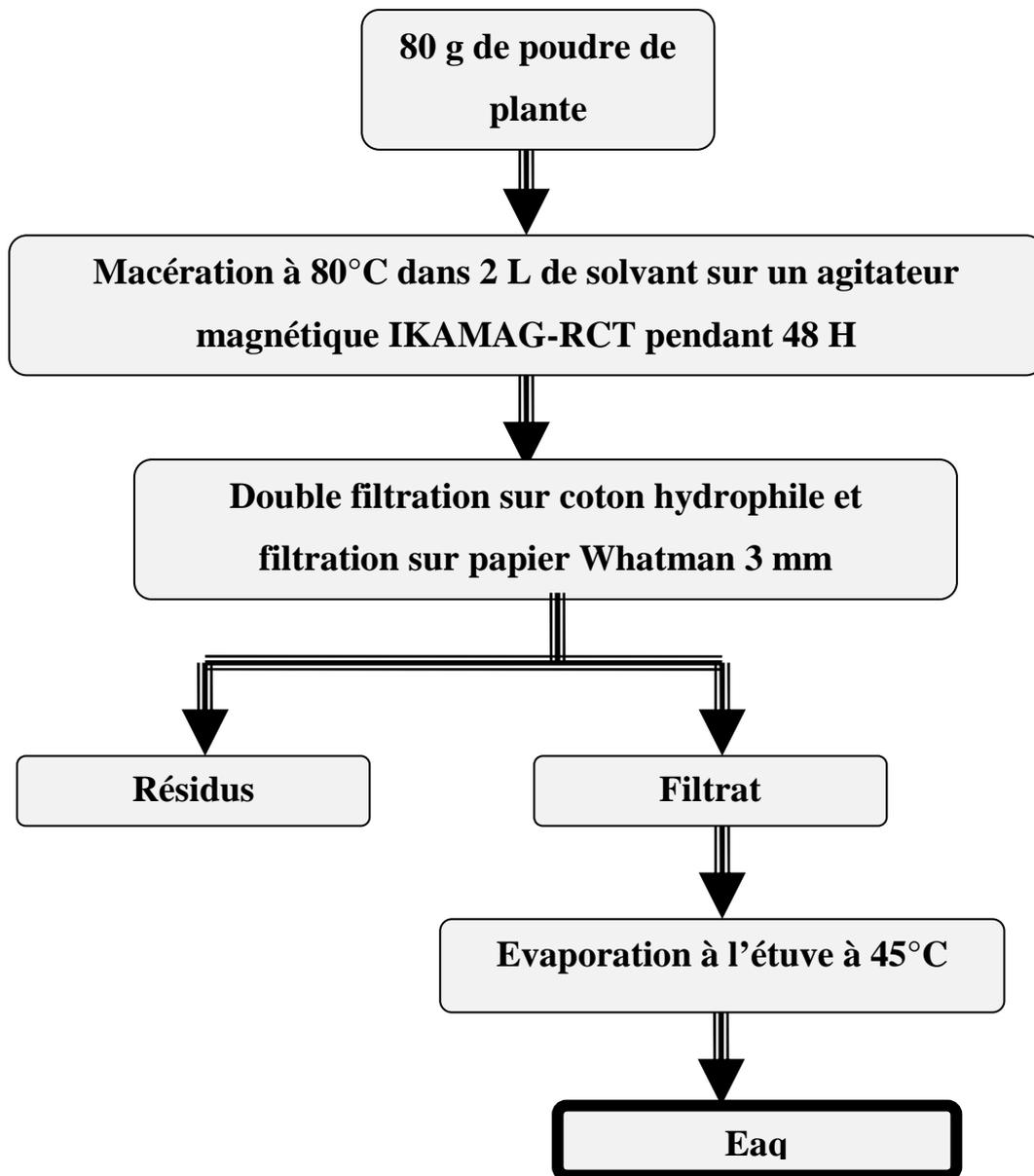


Figure 2 : Diagramme de préparation de l'Extrait total aqueux
(Eaq)

(GUEDE-GUINA *et al.*, 1993 ; ZIRIHI *et al.*, 2003)

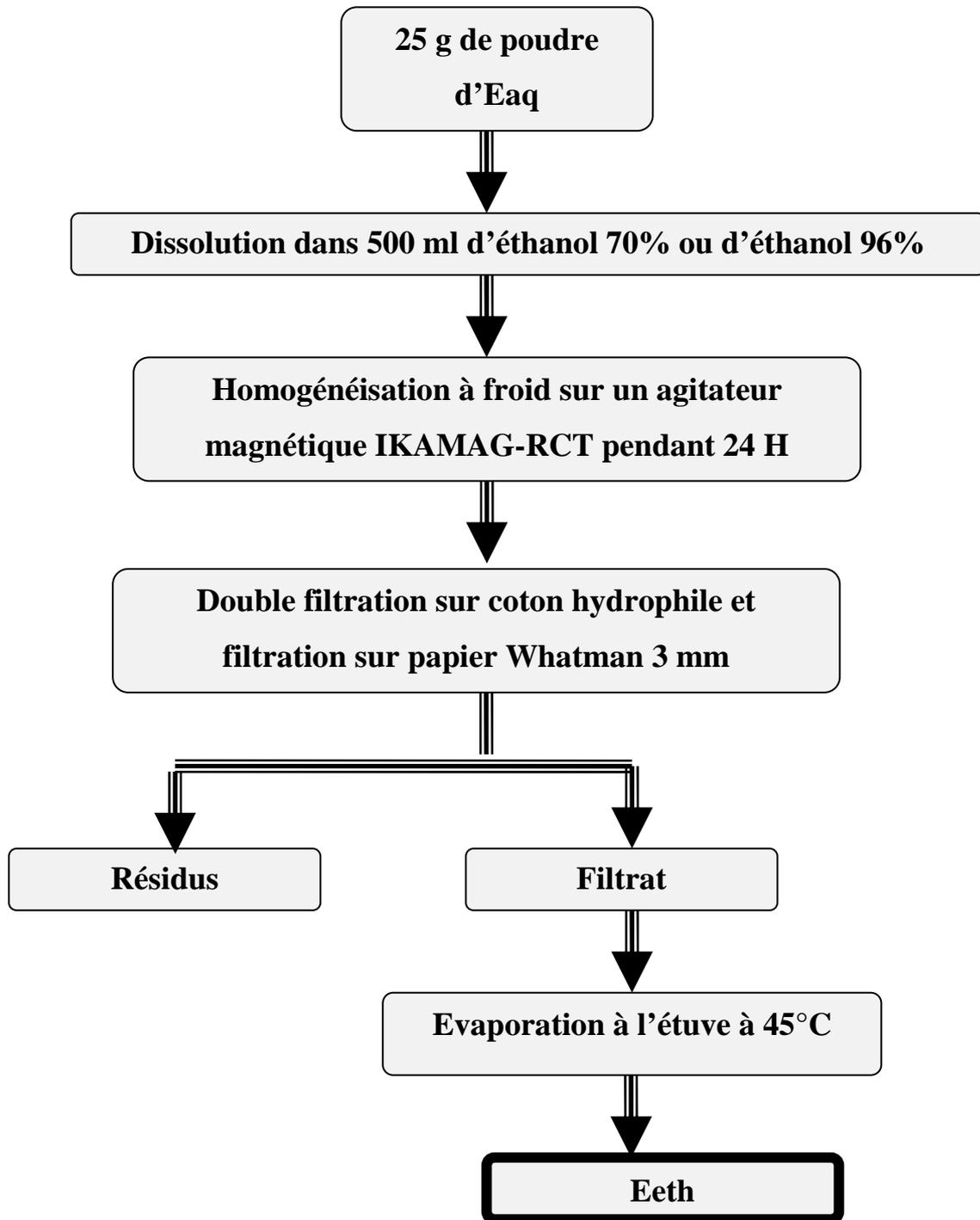


Figure 3 : Diagramme de préparation de l'Extrait éthanolique 70% (Eeth)

(GUEDE-GUINA *et al.*, 1993; ZIRIHI *et al.*, 2003)

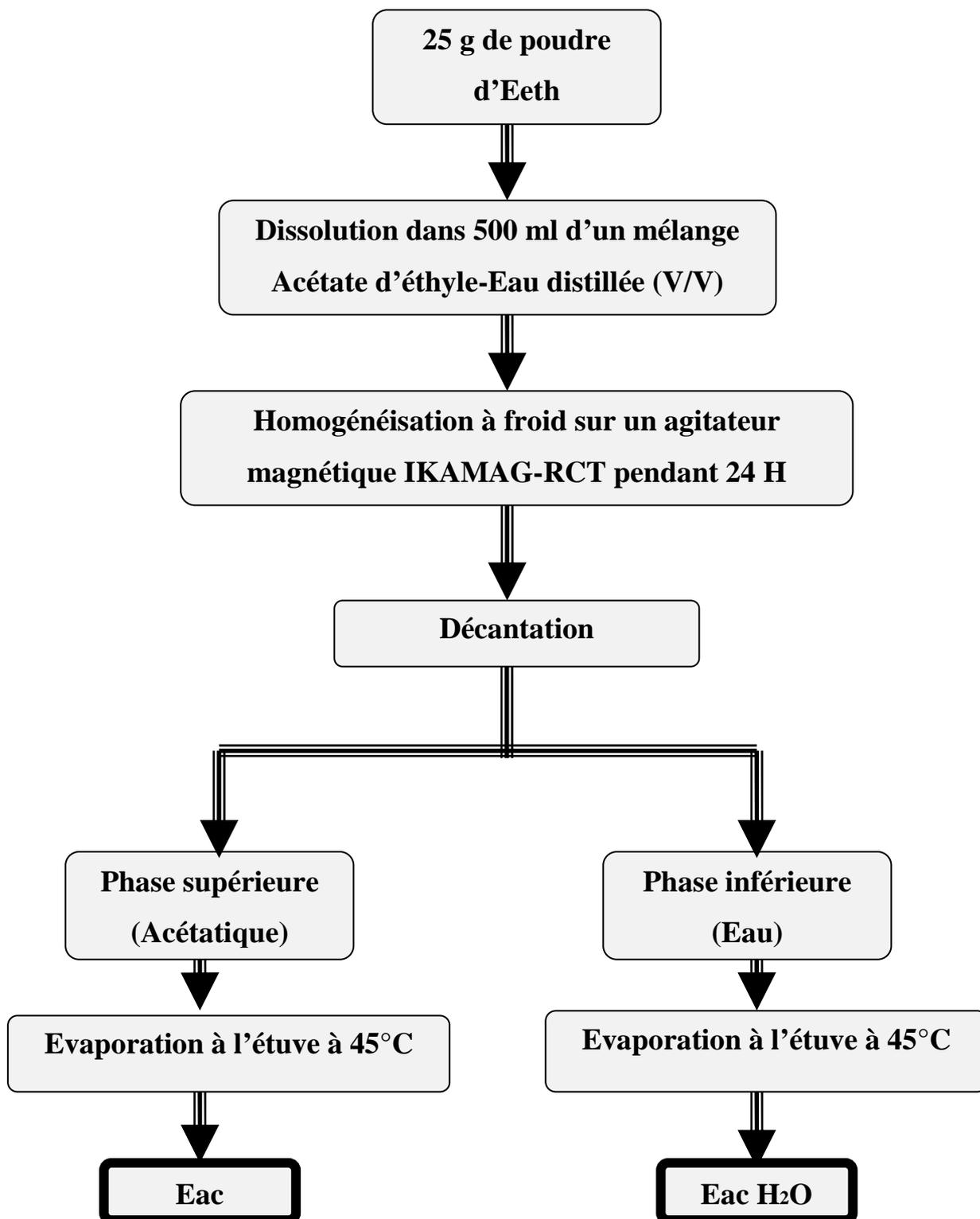


Figure 4 : Diagramme de préparation des Extraits acétatique (Eac) et acétatique H₂O (Eac H₂O)

(GUEDE-GUINA *et al.*, 1993; ZIRIHI *et al.*, 2003)

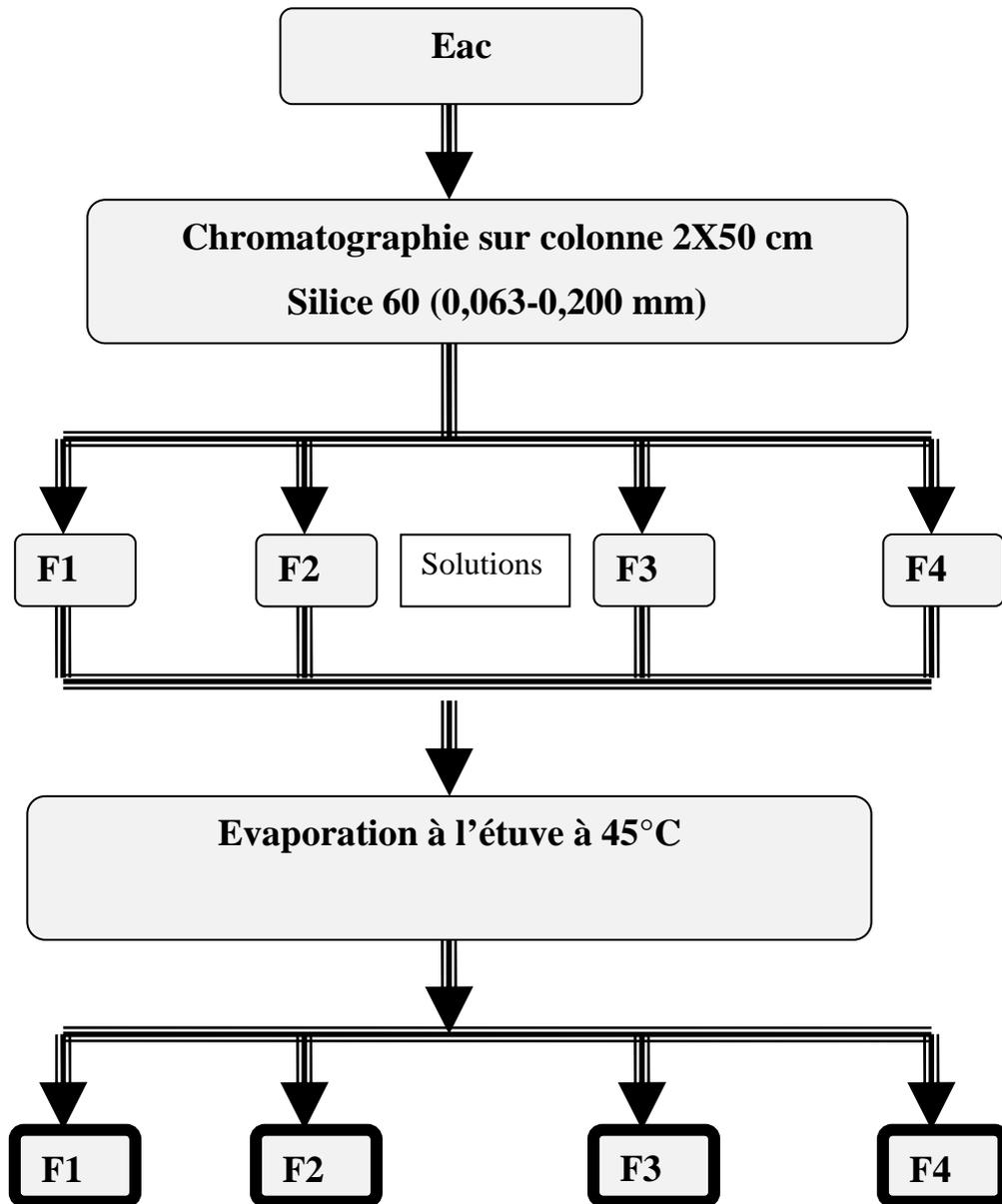


Figure 5 : Diagramme de l'obtention des fractions F1, F2, F3 et F4

(GUEDE-GUINA *et al.*, 1993; ZIRIHI *et al.*, 2003)

2-2- Préparation des milieux de culture

2-2-1- Préparation de la gélose Sabouraud

Le milieu Agar Sabouraud a été préparé en homogénéisant dans 1 litre d'eau distillée 42g de gélose en poudre. Ce mélange est porté à ébullition et agité jusqu'à homogénéisation complète sur un agitateur magnétique chauffant IKA-MAG. Le milieu ainsi préparé est réparti dans 9 tubes à essai (6 cm de long et 2 cm de diamètre) numérotés de 1 à 9 à raison de 20 ml dans le tube 1 et 10 ml dans les autres tubes.

Le tube n°9 est le témoin de stérilité du Sabouraud et le tube n°8, le témoin de croissance des germes sans *Morinda morindoides*.

2-2-2-Incorporation des extraits végétaux à la gélose, préparation de l'inoculum et ensemencement des germes

L'incorporation a été faite pendant que la gélose est encore liquide selon la méthode de la double dilution qui nous a permis d'obtenir une variation de concentration de *Morinda morindoides* allant de 300 mg/mL dans le tube n°1 à 4,687 mg/mL dans le tube n°7 pour l'Eaq; de 50 mg/mL dans le tube n°1 à 0,78 mg/mL dans le tube n°7 pour l'Eeth ; de 12,5 mg/mL dans le tube n°1 à 0,195 mg/mL dans le tube n°7 pour l'Eac H₂O et l'Eac et de 3,125 mg/mL dans le tube n°1 à 0,0487 mg/mL dans le tube n°7 pour la F1, F2, F3 et F4 (selon une liaison géométrique de raison 1/2).

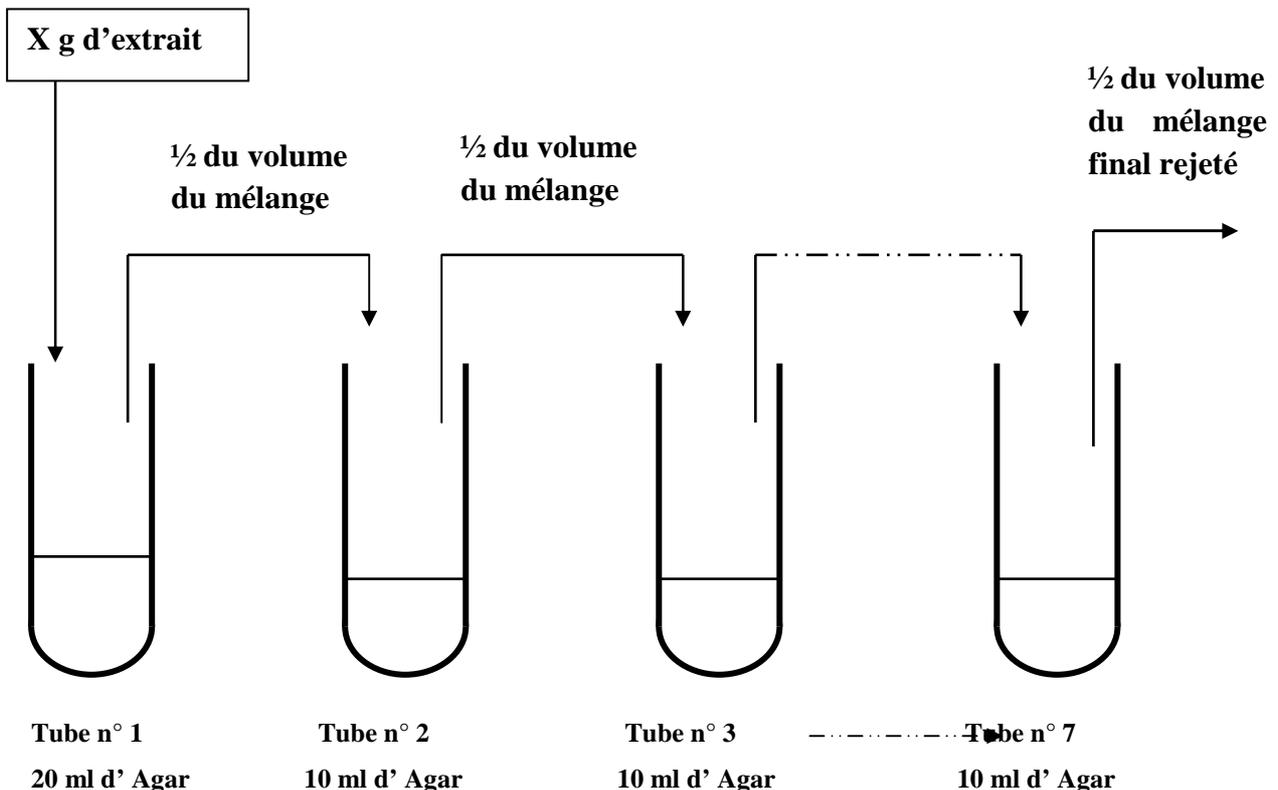


Figure 6: Schéma de la méthode de la double dilution

Les tubes ainsi préparés sont stérilisés à 121°C à l'autoclave de type MEDICLAVE pendant 15 mn, inclinés et refroidit à la température de la salle (37°C) pour permettre à l'Agar de se solidifier.

L'inoculum est préparé à partir de cultures de germes de 48 heures sur Gélose en pente. Ces germes sont prélevés à l'aide d'une anse de KOCH, puis homogénéisés dans 10 ml d'eau distillée stérilisée. L'on obtient ainsi la suspension 10^0 de germes, à partir de laquelle est préparée la suspension 10^{-1} , par dilution au dixième, en transférant 1 ml de la suspension 10^0 dans 9 ml d'eau distillée pour avoir un volume final de 10 ml.

Une seconde dilution à partir de la suspension 10^{-1} , dans les mêmes conditions que précédemment, nous permet d'obtenir la suspension 10^{-2} . Ces différentes préparations sont concentrées à 10^6 germes/ml pour la suspension 10^0 , 10^5 germes/ml pour la suspension 10^{-1} et 10^4 germes/ml pour la suspension 10^{-2} . Dans cette étude, toutes ces trois suspensions ont été testées, mais nous présenterons seulement les résultats pour les dilutions à 10^{-1} .

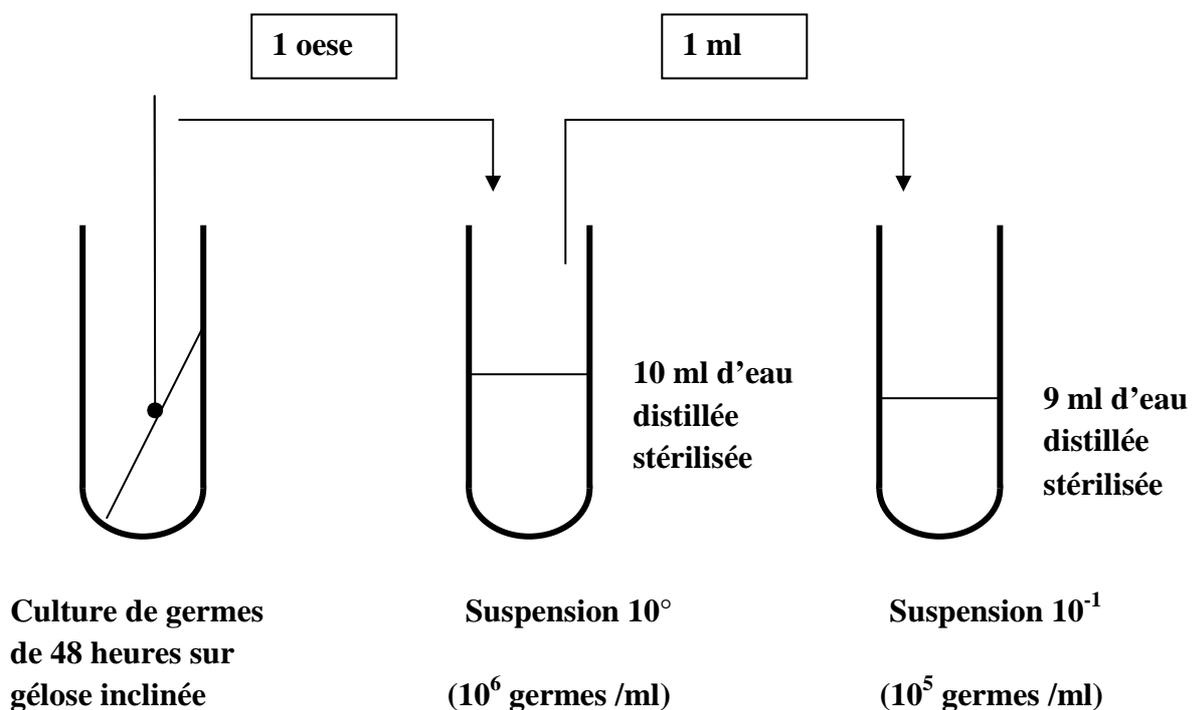


Figure 7: Schéma de la préparation de l'inoculum

Après la solidification de la gélose tous ces tubes sauf le n°9 sont ensemencés avec 10µl d'une suspension contenant environ 10⁵ germes/ml. Ce qui donne 1000 germes pour la suspension 10⁻¹. Cette opération est répétée cinq fois par souche puis les tubes ainsi préparés sont incubés à 30°C. (HALEY *et al.*, 1978 ; GUEDE-GUINA *et al.*, 1991 ; STEVENS, 1997).

2-3-Dénombrement des colonies

Après 48 heures d'incubation, les colonies de *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* et *Candida albicans* ont été dénombrées par comptage direct à l'aide d'un compteur de colonies. Et la croissance des germes dans les 9 tubes expérimentaux 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 *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* et *Candida albicans* dans les tubes expérimentaux, peut se résumer par la formule suivante :

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

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

n : Nombre de colonies dans le tube expérimental. (GUEDE-GUINA *et al.*, 1991, 1995; KRA, 2001).

La Concentration pour 50 % d'Inhibition (CI₅₀) et la Concentration Minimale Fongicide (CMF) pour chaque extrait ont été déterminées. La CI₅₀ donne 50% d'inhibition, estimée par rapport au nombre de germes ayant poussé dans le tube témoin. C'est un paramètre déterminé graphiquement à partir d'un courbe de sensibilité. Il représente, la dose de produit pour laquelle 50% de la croissance des germes fongiques sont inhibés.

La CMF donne 99,99% d'inhibition. C'est la concentration de produit dans le premier tube où aucun germe ne s'est développé. (GUEDE-GUINA, *et al.*, 1991, 1995; KRA, 2001).

2-4- Analyse statistique des données

Pour l'analyse statistique des données expérimentales, a été utilisé le Dispositif en Blocs Aléatoires Complets ou Bloc de FISHER à partir du logiciel GraphPad/prism 4. Ce Dispositif, basé sur la comparaison des variances, nous a permis de montrer s'il existe ou non une différence significative entre les différentes répétitions du même test. ($P < 0,05$).

Hypothèse :

H_0 : il n'existe pas de différence significative entre les tests.

H_C : il existe une différence significative entre les tests.

2-5- Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM a été réalisée afin de séparer les constituants composant la F1.

Principe :

La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants ; elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe et l'autre mobile.

La chromatographie sur couche mince (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange. La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvant. On dépose sur la phase fixe une petite quantité du mélange à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile. La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est le phénomène d'élution, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser.

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur ; caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontal (Rf). Chaque tache correspond à un constituant ou un ensemble de constituants superposés.

Mode opératoire :

La cuve chromatographique est remplie du mélange de solvants (95% de Dichlorométhane- 5% de Méthanol) à une hauteur de 0,5 cm. Elle est recouverte avec le couvercle afin que l'atmosphère dans la cuve reste saturée en vapeur d'éluant.

Sur la plaque chromatographique (5 cm sur 7 cm), l'on trace au crayon de papier un trait horizontal à 1 cm environ du bord inférieur. Ce trait ne doit pas tremper dans le solvant d'élution contenu dans la cuve. On dépose sur le trait, à l'aide de cure-dents, une microgoutte

de la F1. On laisse sécher la tache puis on dépose la plaque verticalement dans la cuve que l'on couvre à l'aide du couvercle. Lorsque le solvant a atteint les $\frac{3}{4}$ environ de la hauteur de la plaque, (1 cm du bord supérieur), on sort la plaque de la cuve et est marqué immédiatement le front du solvant (car le solvant s'évapore très vite). On laisse sécher la plaque à l'air libre. La révélation a été faite avec le réactif de Dragendorff et l'orthovaniline par évaporation.

2-6- Tri phytochimique

Enfin de mettre en évidence les principaux groupes chimiques contenus dans les extraits testés (Eaq, Eeth, Eac et F1), différents essais de caractérisations ont été réalisés.

2-6-1- Recherche des alcaloïdes:

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 précipiter sous forme de sels.

Ainsi les métaux lourds utilisés dans les réactifs servant pour leur détermination sont :

- réactif de BOUCHARDAT (Iode) qui entraîne la formation de précipité brunâtre;
- réactif de DRAGENDORFF (iode, Bismuth) qui engendre la formation de précipité orangé ;
- réaction de VALSER-MAYER (Iode, Mercure) qui forme un précipité blanc laiteux.

Un échantillon d'extrait de *Morinda morindoides* (6 ml), 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 ont été ajoutées, l'apparition d'un précipité orangé indique la présence des alcaloïdes.

Dans le deuxième tube, deux gouttes de réactif de VALSER-MAYER ont été additionnées, l'apparition d'un précipité blanc crème indique une réaction positive.

Dans le troisième tube, deux gouttes de réactif de BOUCHARDAT ont été aussi additionnées, l'apparition d'un précipité brunâtre indique la présence des alcaloïdes (BOUQUET, 1972).

2-6-2- Recherche des polyphénols:

Les polyphénols sont des composés qui possèdent plusieurs groupements phénols et hydroxyles.

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. En outre, en solution aqueuse, les tanins sont précipités par les sels de métaux lourds (Cu, Zn, Sn, Pb, Hg).

La réaction au formol chlorhydrique (réactif de STIASNY) nous permet de distinguer les tanins cathéchiques des tanins galliques par saturation à l'acétate de sodium.

Les tanins cathéchiques sous forme condensée (non hydrolysable) sont précipités par chauffage au bain-marie à 80°C , suivi de refroidissement.

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 spécifique aux polyphénols indiquant la présence des tanins galliques.

Un essai témoin est réalisé avec l'acide gallique.

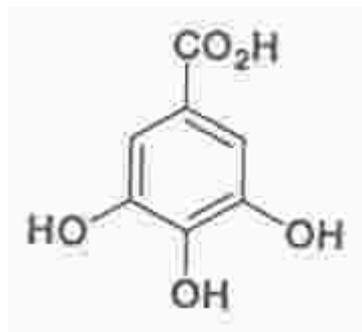


Figure 8: Structure de l'acide gallique

- Pour des polyphénols :

À 2 ml d'extrait de *Morinda morindoides* est ajouté une goutte d'une solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. (BONGA *et al.*, 1995).

Le chlorure ferrique provoque en présence de dérivés polyphénoliques l'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte.

- Pour des tanins cathéchiques

Un échantillon d'extrait de *Morinda morindoides* (5 ml), est évaporé à sec dans une capsule en porcelaine au bain de sable, à ce résidu sont ajoutés 15 ml du réactif de STIASNY. L'ensemble a été porté au bain-marie à 80° C pendant 30 minutes.

L'observation de gros flocon après refroidissement indique la présence de tanin catéchique.

-Pour des tanins galliques

Un échantillon d'extrait de *Morinda morindoides* (5 ml), a été filtré et saturé à l'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de FeCl₃ à 2% provoquant une coloration bleu-noire indiquant la présence des tanins galliques dans le milieu.

2-6-4- Recherche des flavonoïdes:

Les flavonoïdes sont des pigments jaunes très répandus chez les végétaux supérieurs ; ils existent sous forme d'hétérosides dont la génine dérive du noyau benzo- γ -pyrone.

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.

L'échantillon d'extrait de *Morinda morindoides* (2 ml), 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.

L'addition successive de trois copeaux de magnésium et de trois gouttes d'alcool isoamylique fait apparaître une coloration rose ou violacée intense en présence des flavonoïdes (BOWMAN *et al.*, 1980).

2-6-5- Recherche des saponosides:

Les saponosides sont des hétérosides à génine stéroïdique ou triterpénique, doués de propriétés tensioactives.

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 échantillon de volume d'extrait.

L'échantillon d'extrait de *Morinda morindoides* (2 ml) 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.

La hauteur de la mousse formée est mesurée. (LEBEAU *et al.*, 1956 ; BONGA *et al.*, 1995).

2-6-6- Recherche des quinones:

Tout comme les tanins, les quinones existent sous deux formes (libres et combinée). 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 (ammoniac, soude, eau de chaux) une coloration rouge cerise.

Dans une capsule en porcelaine, l'échantillon d'extrait de *Morinda morindoides* (2 ml), 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 pendant 30 minutes.

Après refroidissement, l'hydrolysate est extrait avec 20 ml de chloroforme dans un tube à essai. Il est ensuite saturé avec 0,5 ml d'ammoniac dilué au demi.

L'apparition d'une coloration allant du rouge au violet signale la présence des quinones.

2-6-7- Recherche des stérols:

Les composés stéroliques et terpéniques sont extraits par macération dans un solvant organique. La recherche des stérols et terpénoïdes a été faite par la réaction de LIEBERMAN-BUCHARD.

Ces composés ont une origine commune. En effet, ils sont tous issus d'un même motif de base qui est l'isoprène. C'est la condensation des unités isopréniques qui aboutit, selon la voie de synthèse, soit à un dérivé terpénique soit à un stérol (Figure 8). L'unité isoprénique est lui-même construit dans une première étape, à partir d'un motif comportant deux carbones, fournis par l'acétylcoenzyme-A.

Les processus de condensation et de transfert des unités carbonées sont liés à une activité mitochondriale intermédiaire de synthèse d'acéto-acétylCoA, d'acide β -hydroxy- β -méthylglucarique et d'acide mévalonique (BOWMAN et RAND, 1980). C'est cette origine commune qui explique pourquoi la réaction de LIEBERMAN-BUCHARD, met en évidence à la fois les deux familles de composé.

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.

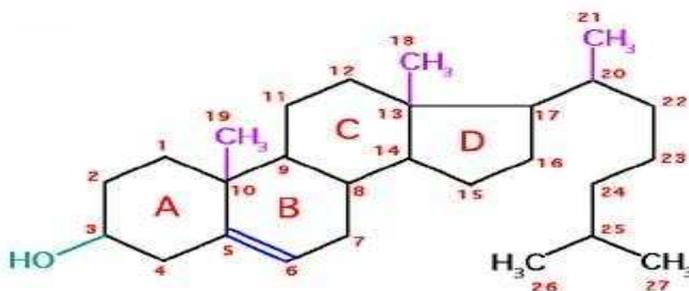


Figure 9: Structure du cholestérol

L'échantillon d'extrait de *Morinda morindoides* (5 ml), 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.

La réaction est positive s'il y a l'apparition d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert.

III

RESULTATS

III-1 Influence de l'Extraits total aqueux (Eaq) de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*.

Les effets de l'extrait total aqueux (Eaq) de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* ont donné les résultats suivants :

Les valeurs obtenues ont permis les tracés des figures 9, 10 et 11. Ce sont les courbes de sensibilité obtenus à partir des pourcentages de survivance en fonction des différentes concentrations de l'Eaq de *Morinda morindoides*. L'allure globale de ces courbes est décroissante et exprime l'inhibition progressive et dose-dépendante de la croissance *in vitro* de *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus*. Ces courbes nous ont permis de déterminer les paramètres antifongiques que sont les Concentrations pour 50% d'Inhibition (CI₅₀) et la Concentration Minimale Fongicide (CMF).

Pour les trois germes, les valeurs de la CI₅₀ et de la CMF sont présentées dans le tableau II : Ainsi pour l'extrait total aqueux (Eaq), les CI₅₀ sont respectivement de 15,5 ± 1,3 mg/mL pour *C. albicans* ; 14,3 ± 2,4 mg/mL pour *C. neoformans* et 12,47 ± 0,75 mg/mL pour *A. fumigatus*.

La CMF est de 300 mg/mL quelque soit le germe.

La CI₅₀ obtenue avec *C. albicans* est supérieure à celle obtenue avec *C. neoformans* qui elle même est supérieure à celle obtenue avec *A. fumigatus*. (CI₅₀ *C. albicans* > CI₅₀ *C. neoformans* > CI₅₀ *A. fumigatus*).

La CMF est identique pour les trois germes. CMF *C. albicans* = CMF *C. neoformans* = CMF *A. fumigatus* = 300 mg/mL.

A- Effet de l'extrait total aqueux (Eaq) sur *Candida albicans*

Tableau I : Résultats de l'analyse statistique

<u>Sdv</u>	<u>ddl</u>	<u>Sc</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>
Concentrations	11	44100	4010	421
Répétitions	4	50,5	12,6	1,32 ^{ns}
Erreur	44	244	8,71	
Total	59	44600		

Sdv : Sommes des variations ; **ddl** : degré de liberté ; **Sc** : Sommes des carrés ; **CM** : Carrés Moyens ; **F** : Facteur ; **ns** : non significatif

Puisque F_{cal} (1,32) est strictement inférieur à F_{tab} (2,61), on accepte donc l'hypothèse nulle H_0 et on rejette H_C . Il n'y a donc pas de différence significative entre les répétitions (tests). ($P < 0,05$)

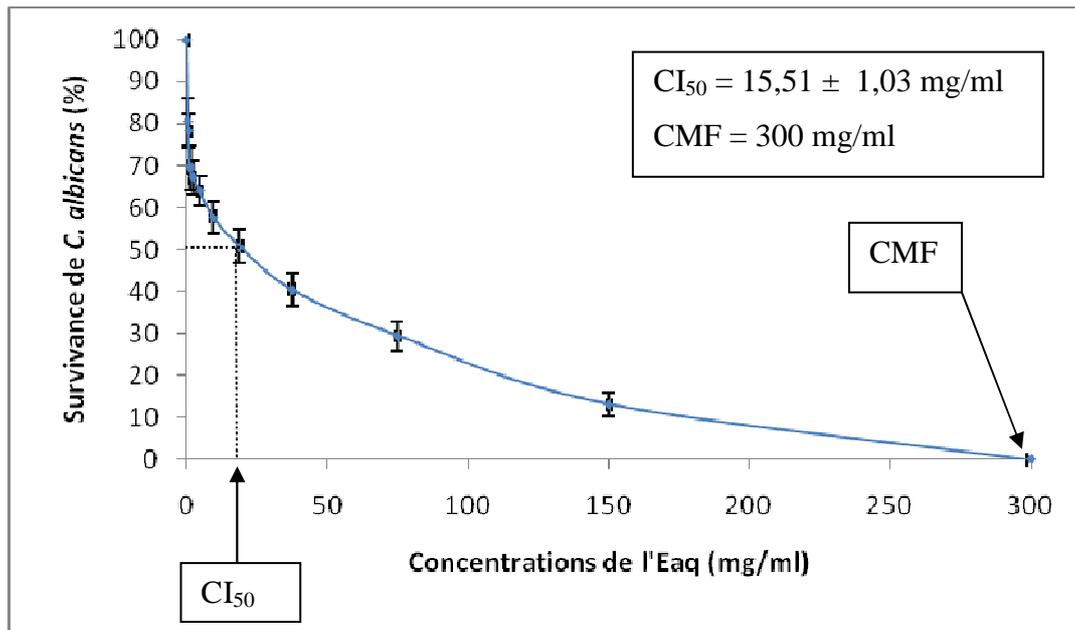


Figure 10: Sensibilité de *Candida albicans* à l'extrait total aqueux (Eaq)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration d'extrait augmente. La courbe s'annule à 300 mg/mL. Cette valeur est donc la concentration minimale à laquelle l'Eaq tue *Candida albicans*. La CI₅₀ est la concentration à laquelle la moitié des germes est inhibé. C'est une valeur qui est déterminée graphiquement.

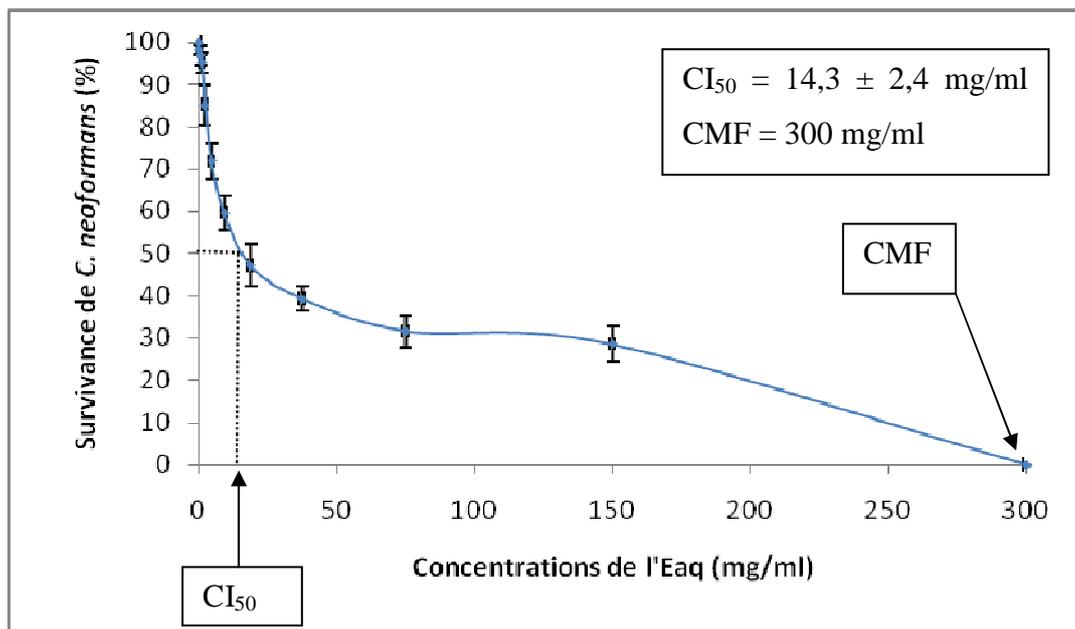
B- Effet de l'extrait total aqueux (Eaq) sur *Cryptococcus neoformans*

Figure 11 : Sensibilité de *Cryptococcus neoformans* à l'extrait total aqueux (Eaq)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration d'extrait augmente. La courbe s'annule à 300 mg/mL. Cette valeur est donc la concentration minimale à laquelle l'Eaq tue *Cryptococcus neoformans*. La CI₅₀ est la concentration à laquelle la moitié des germes est inhibé. C'est une valeur qui est déterminée graphiquement.

C- Effet de l'extrait total aqueux (Eaq) sur *Aspergillus fumigatus*

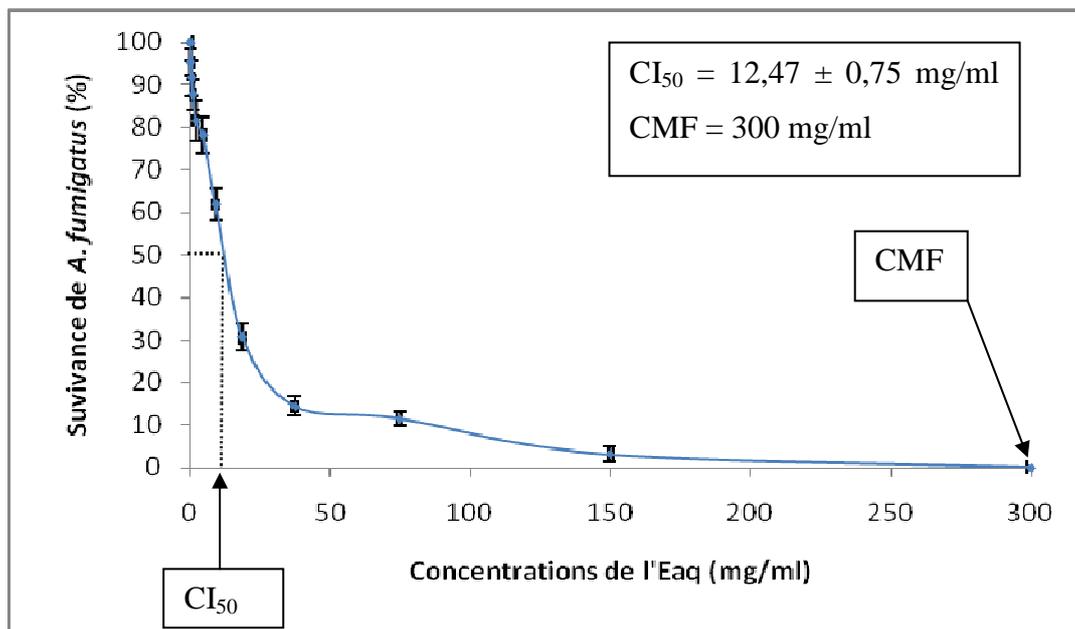


Figure 12 : Sensibilité de *Aspergillus fumigatus* à l'extrait total aqueux (Eaq)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration d'extrait augmente. La courbe s'annule à 300 mg/mL. Cette valeur est donc la concentration minimale à laquelle l'Eaq tue *Aspergillus fumigatus*. La CI₅₀ est la concentration à laquelle la moitié des germes est inhibé. C'est une valeur qui est déterminée graphiquement.

D- Courbes de sensibilité et paramètres antifongiques comparés

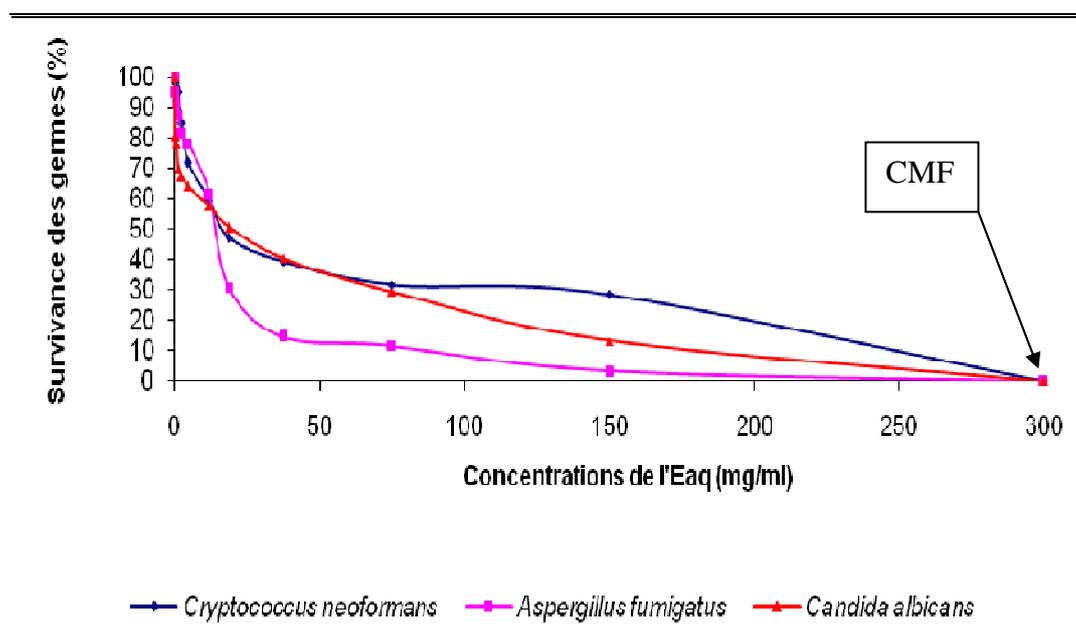


Figure 13 : Sensibilité comparée de *C. albicans*, *A. fumigatus* et *C. neoformans* à l'extrait total aqueux (Eaq)

CMF : Concentration Minimale Fongicide

La figure 13 montre, le regroupement sur une même figure, les trois courbes de sensibilité obtenus précédemment. Cette façon de faire permet de comparer les courbes obtenues par les trois germes. Cette comparaison s'avère difficile ici car les trois courbes de sensibilité ont la même CMF (300 mg/mL).

Tableau II : Paramètres antifongiques comparés de l'extrait total aqueux (Eaq)

Extraits	<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)
Eaq	12,47 ± 0,75	300	14,3 ± 2,4	300	15,51 ± 1,03	300

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Le tableau II présente l'effet de l'extrait total aqueux (Eaq) sur les trois champignons testés. Les trois germes ont la même CMF et diffèrent par leur CI₅₀. *Aspergillus fumigatus* se présente comme le germe le plus sensible et *Candida albicans* comme le plus résistant.

- **III-2 Influence de l'Extraits éthanolique 70% (Eeth) de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*.**

Les effets de l'Extrait éthanolique 70% (Eeth) de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* ont donné les résultats suivants :

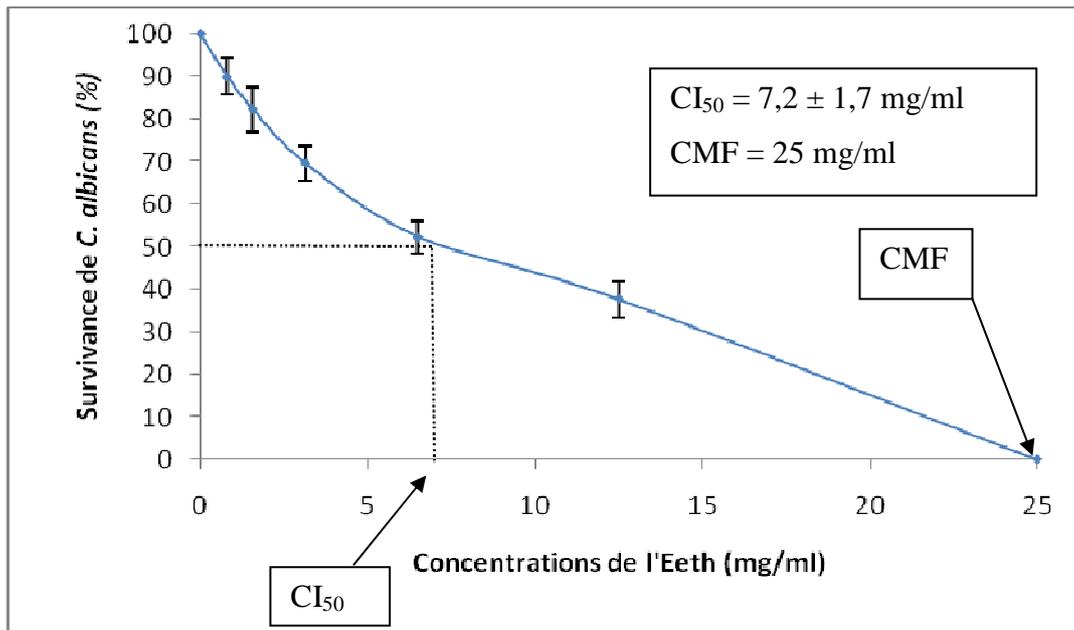
Les valeurs obtenues ont permis les tracés des figures 13, 14 et 15. Ce sont les courbes de sensibilité obtenus à partir des pourcentages de survivance en fonction des différentes concentrations de l'Eeth de *Morinda morindoides*. L'allure globale de ces courbes est décroissante et exprime l'inhibition progressive et dose-dépendante de la croissance *in vitro* de *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus*. Ces courbes nous ont permis de déterminer les paramètres antifongiques que sont les Concentrations pour 50% d'Inhibition (CI₅₀) et la Concentration Minimale Fongicide (CMF).

Pour les trois germes, les valeurs de la CI₅₀ et de la CMF sont présentées dans le tableau III : Ainsi pour l'extrait éthanolique 70% (Eeth), les CI₅₀ sont respectivement de $7,2 \pm 1,7$ mg/mL pour *C. albicans* ; $6,3 \pm 1,5$ mg/mL pour *C. neoformans* et $6,1 \pm 2,1$ mg/mL pour *A. fumigatus*.

La CMF est de 25 mg/mL pour *C. albicans* et *C. neoformans* et de 12,5 mg/mL pour *A. fumigatus*.

La CI₅₀ obtenue avec *C. albicans* est supérieure à celle obtenue avec *C. neoformans* qui elle même est supérieure à celle obtenue avec *A. fumigatus*. (CI₅₀ *C. albicans* > CI₅₀ *C. neoformans* > CI₅₀ *A. fumigatus*).

La CMF est identique pour deux germes. CMF *C. albicans* = CMF *C. neoformans* > CMF *A. fumigatus*.

A- Effet de l'extrait éthanolique 70% (Eeth) sur *Candida albicans***Figure 14:** Sensibilité de *Candida albicans* à l'extrait éthanolique 70% (Eeth)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. La courbe s'annule à 25 mg/mL. Cette valeur est donc la concentration minimale à laquelle l'Eeth tue *Candida albicans*. La CI₅₀ est la concentration à laquelle la moitié des germes est inhibé. C'est une valeur qui est déterminée graphiquement.

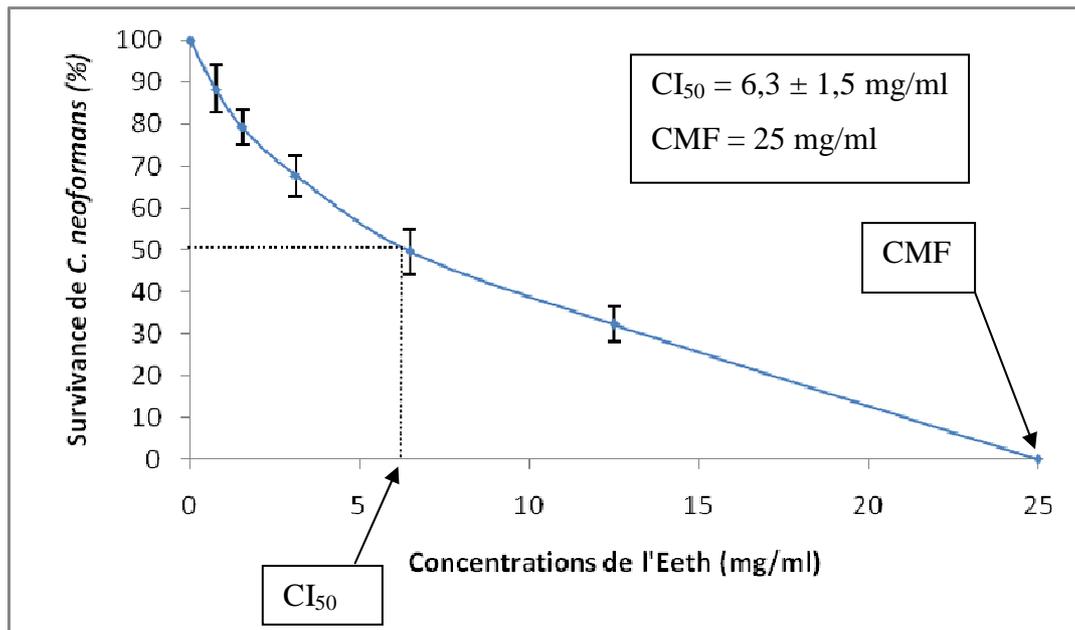
B- Effet de l'extrait éthanolique 70% (Eeth) sur *Cryptococcus neoformans*

Figure 15: Sensibilité de *Cryptococcus neoformans* à l'extrait éthanolique 70% (Eeth)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration d'extrait augmente. La courbe s'annule à 25 mg/mL. Cette valeur est donc la concentration minimale à laquelle l'Eeth tue *Cryptococcus neoformans*. La CI₅₀ est la concentration à laquelle la moitié des germes est inhibé. C'est une valeur qui est déterminée graphiquement.

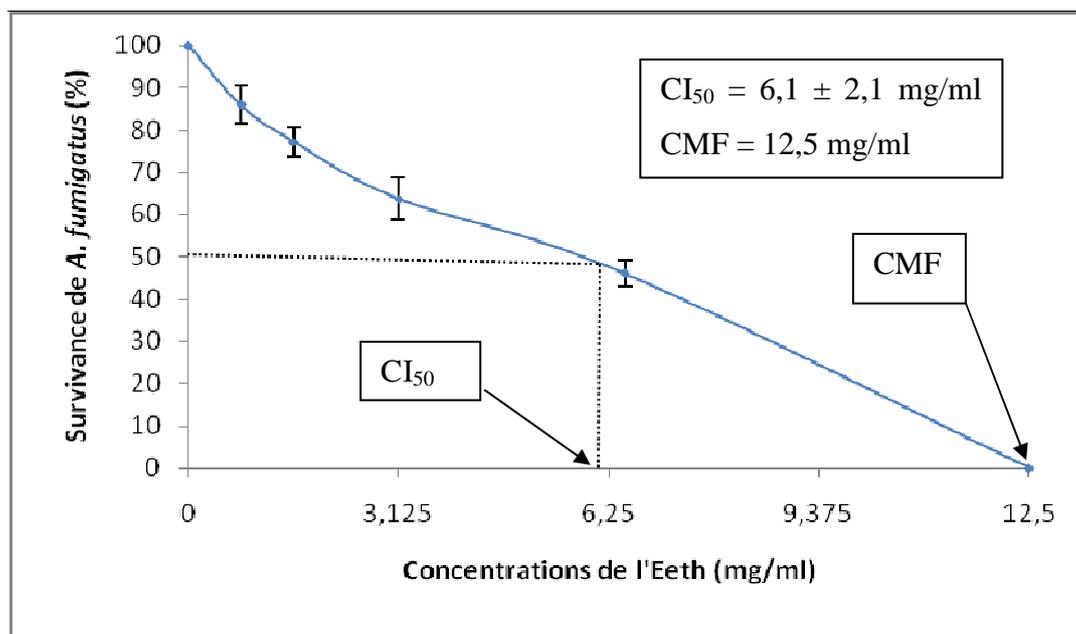
C- Effet de l'extrait éthanolique 70% (Eeth) sur *Aspergillus fumigatus*

Figure 16: Sensibilité de *Aspergillus fumigatus* à l'extrait éthanolique 70% (Eeth)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. La courbe s'annule à 12,5 mg/mL. Cette valeur est donc la concentration minimale à laquelle l'Eeth tue *Aspergillus fumigatus*. La CI₅₀ est la concentration à laquelle la moitié des germes est inhibé. C'est une valeur qui est déterminée graphiquement.

D- Courbes de sensibilité et paramètres antifongiques comparés

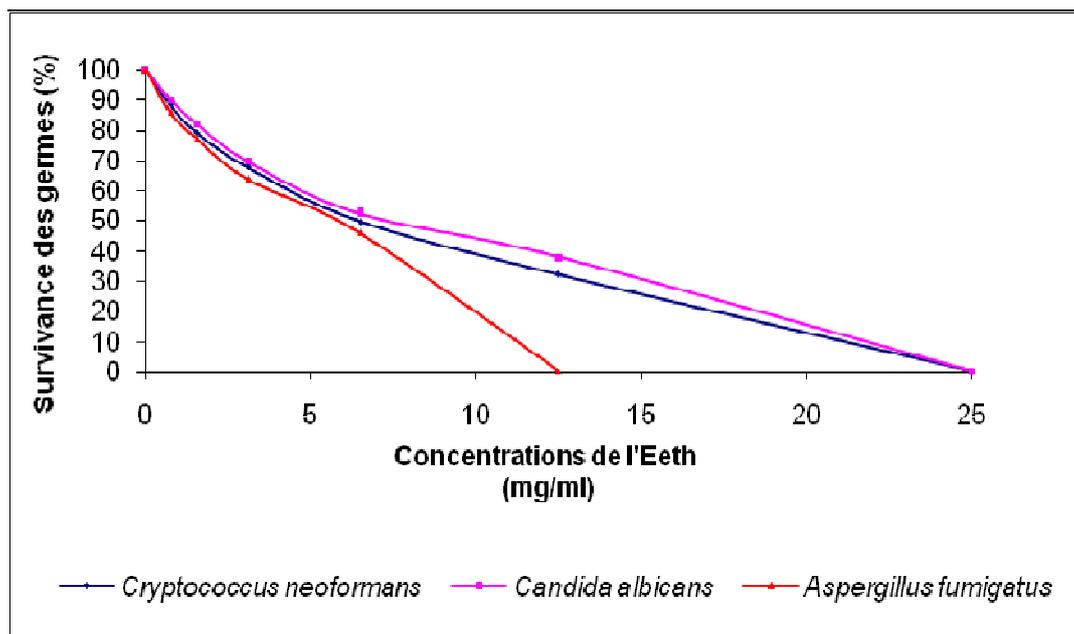


Figure 17 : Sensibilité comparée de *C. albicans*, *A. fumigatus* et *C. neoformans* à l'extrait éthanolique 70% (Eeth)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

La figure 17 montre le regroupement sur une même figure les trois courbes de sensibilité obtenus précédemment avec l'Eeth. Cette façon de faire permet de comparer les courbes obtenues pour les trois germes. Avec *Candida albicans*, on a une CMF de 25mg/mL. Alors qu'avec *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* on a une CMF de 12,5 mg/mL. Cela signifie que *Candida albicans* est le germe le plus résistant à l'Eeth.

Tableau III : Paramètres antifongiques comparés de l'extrait éthanolique 70% (Eeth)

Extraits	<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)
Eeth	6,1 ± 2,1	12,5	6,3 ± 1,5	25	7,2 ± 1,7	25

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Le tableau III présente l'effet de l'Eeth sur les trois champignons testés. *Aspergillus fumigatus* se présente comme le germe le plus sensible et *Candida albicans* comme le plus résistant.

- **III-3 Influence des Extraits acétatique H₂O (Eac H₂O) et acétatique (Eac) de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*.**

Les effets des différents extraits acétatique H₂O (Eac H₂O) et acétatique (Eac) de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* ont donné les résultats suivants :

1- Effet de l'extrait acétatique (Eac) de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* de *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus*.

Les valeurs obtenues ont permis les tracés des figures 17, 18 et 19. Ce sont les courbes de sensibilité obtenus à partir des pourcentages de survivance en fonction des différentes concentrations de l'Eac de *Morinda morindoides*. L'allure globale de ces courbes est décroissante et exprime l'inhibition progressive et dose-dépendante de la croissance *in vitro* de *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus*. Ces courbes nous ont permis de déterminer les paramètres antifongiques que sont les Concentrations pour 50% d'Inhibition (CI₅₀) et la Concentration Minimale Fongicide (CMF).

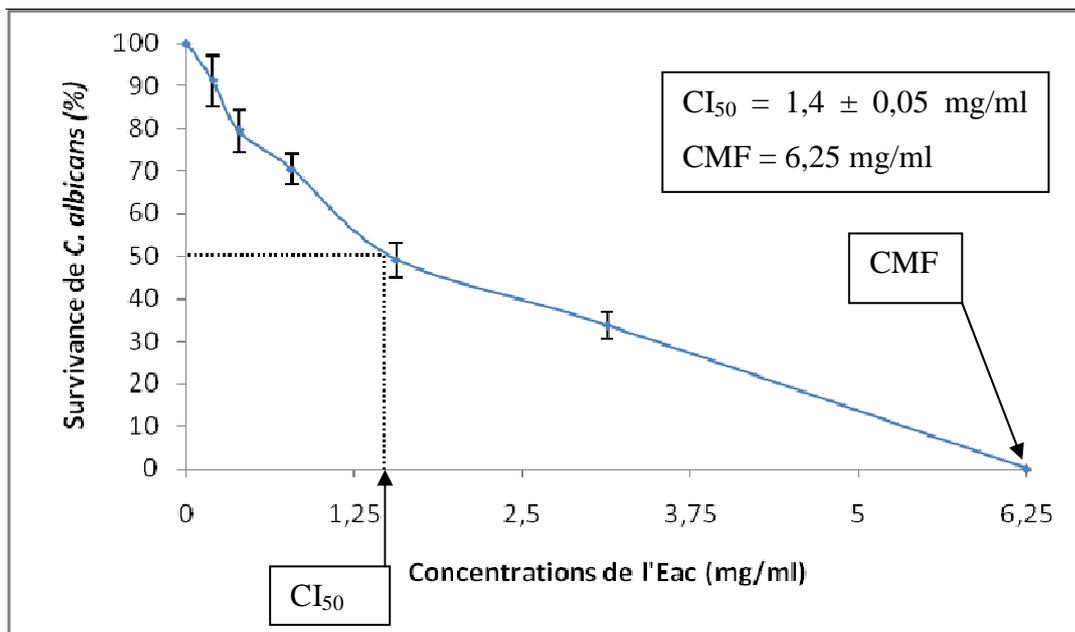
Pour les trois germes, les valeurs de la CI₅₀ et de la CMF sont présentées dans le tableau IV : Ainsi pour l'extrait acétatique (Eac), les CI₅₀ sont respectivement de 1,4 ± 0,05 mg/mL pour *C. albicans* ; 1,35 ± 0,8 mg/mL pour *C. neoformans* et 1,25 ± 0,5 mg/mL pour *A. fumigatus*. La CMF est de 6,25 mg/mL pour *C. albicans* et 3,125 mg/mL pour *C. neoformans* et pour *A. fumigatus*.

La CI₅₀ obtenue avec *C. albicans* est supérieure à celle obtenue avec *C. neoformans* qui elle même est supérieure à celle obtenue avec *A. fumigatus*. (CI₅₀ *C. albicans* > CI₅₀ *C. neoformans* > CI₅₀ *A. fumigatus*).

La CMF est identique pour deux germes. CMF *C. albicans* > CMF *C. neoformans* = CMF *A. fumigatus*.

2- Effet de l'extrait acétatique H₂O (Eac H₂O) de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* de *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus*.

Les figures 21, 22 et 23 montrent l'évolution du pourcentage de survivance des germes en présence et en absence des différentes concentrations de l'extrait acétatique H₂O de *Morinda morindoides*. Ces figures indiquent qu'en absence de l'extrait (0 mg/mL), la survivance des germes est de 100%. L'addition des différentes concentrations de cet extrait au milieu de culture entraîne une diminution progressive très lente dose-dépendante de la croissance des germes. Jusqu'à 12,5 mg/mL aucune inhibition n'apparaît pour aucun de ces germes. L'activité de cet extrait est tellement faible que la détermination des paramètres antifongiques est impossible.

A- Effet de l'extrait acétatique (Eac) sur *Candida albicans***Figure 18 :** Sensibilité de *Candida albicans* à l'extrait acétatique (Eac)

CI_{50} : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. La courbe s'annule à 6,25 mg/mL. Cette valeur est donc la concentration minimale à laquelle l'Eac tue *Candida albicans*. La CI_{50} est la concentration à laquelle la moitié des germes est inhibé. C'est une valeur qui est déterminée graphiquement.

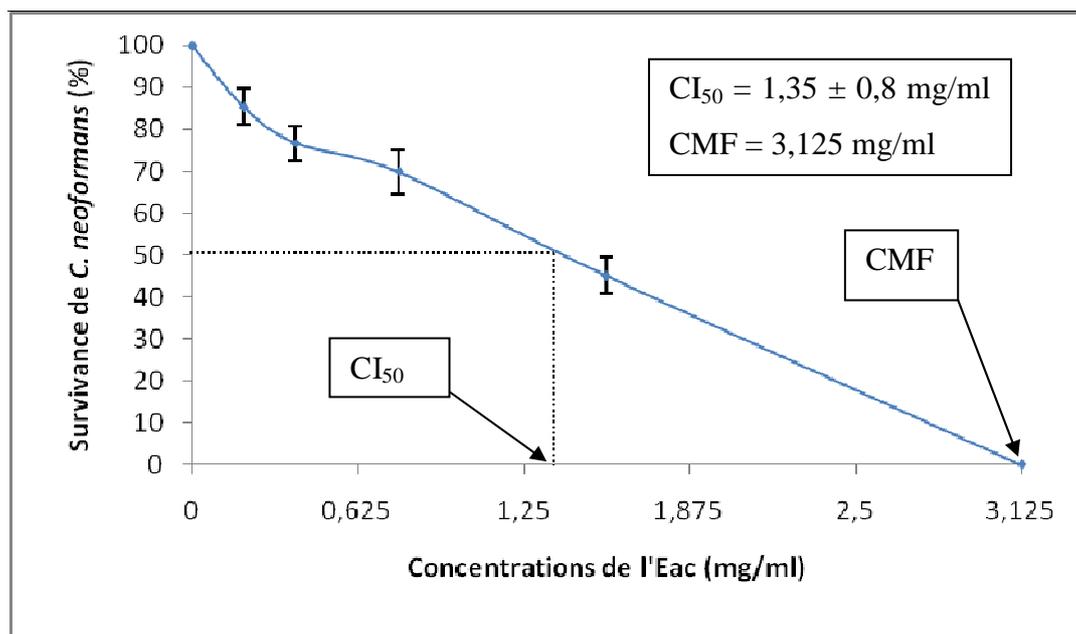
B- Effet de l'extrait acétatique (Eac) sur *Cryptococcus neoformans*

Figure 19 : Sensibilité de *Cryptococcus neoformans* à l'extrait acétatique (Eac)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. La courbe s'annule à 3,125 mg/mL. Cette valeur est donc la concentration minimale à laquelle l'Eac tue *Cryptococcus neoformans*. La CI₅₀ est la concentration à laquelle la moitié des germes est inhibé. C'est une valeur qui est déterminée graphiquement.

C- Effet de l'extrait acétatique (Eac) sur *Aspergillus fumigatus*

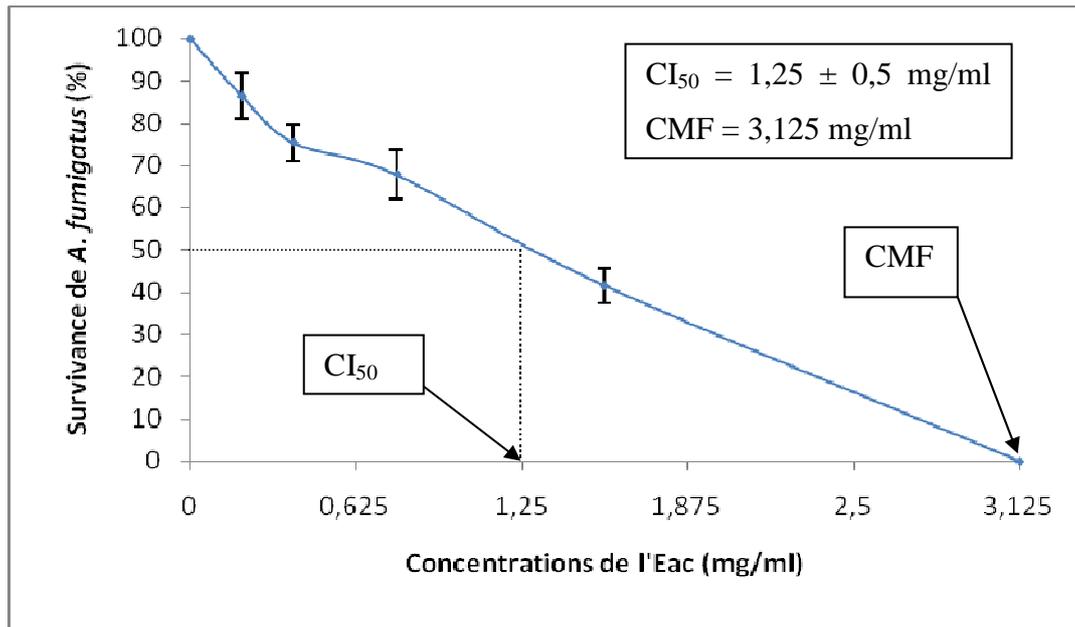


Figure 20 : Sensibilité de *Aspergillus fumigatus* à l'extrait acétatique (Eac)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. La courbe s'annule à 3,125 mg/mL. Cette valeur est donc la concentration minimale à laquelle l'Eac tue *Aspergillus fumigatus*. La CI₅₀ est la concentration à laquelle la moitié des germes est inhibé. C'est une valeur qui est déterminée graphiquement.

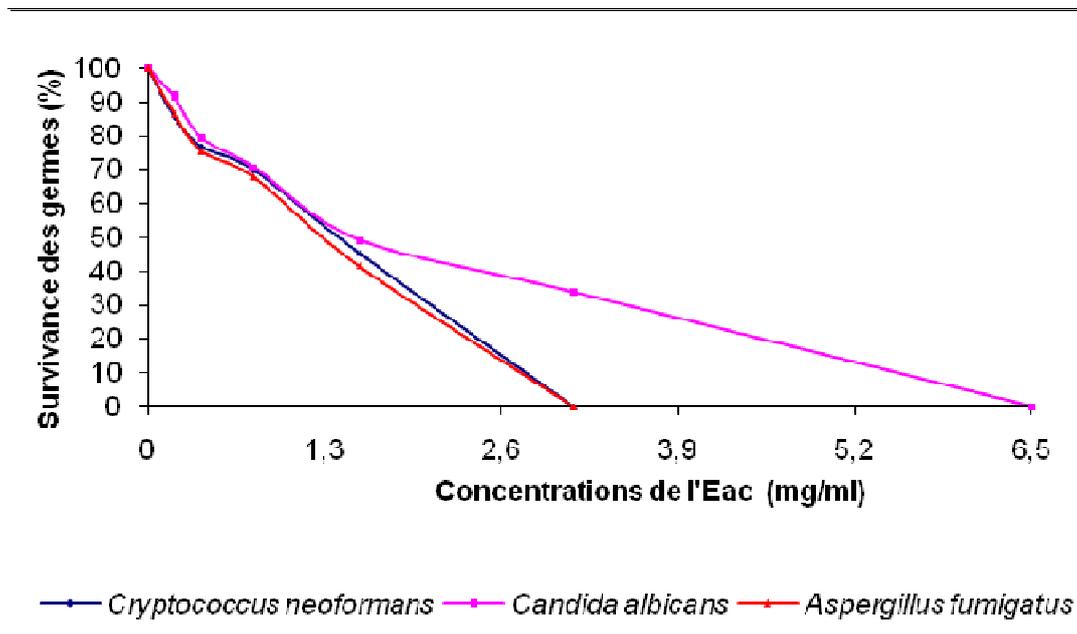


Figure 21 : Sensibilité comparée de *C. albicans*, *A. fumigatus* et *C. neoformans* à l'Eac

La figure 21 montre le regroupement sur une même figure les trois courbes de sensibilité obtenus précédemment avec l'Eac. Cette façon de faire permet de comparer les courbes obtenues pour les trois germes. Avec *Candida albicans*, on a une CMF de 6,5mg/mL. Alors qu'avec *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* on a une CMF de 3,125 mg/mL. Cela signifie que *Candida albicans* est le germe le plus résistant à l'Eac.

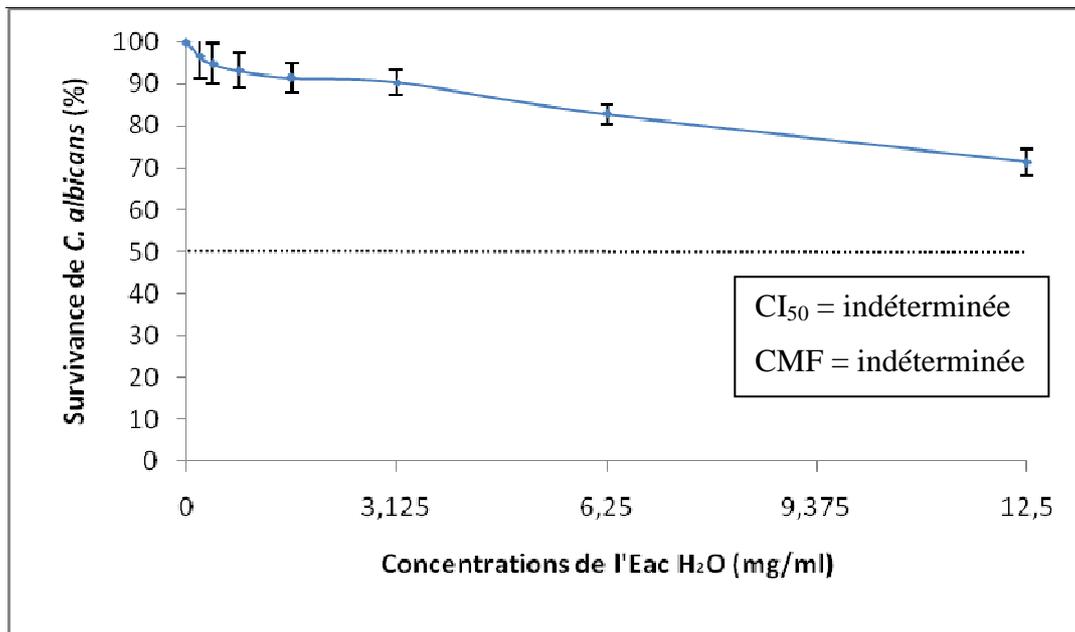
D- Effet de l'extrait acétatique H₂O (Eac H₂O) sur *Candida albicans*

Figure 22: Sensibilité de *Candida albicans* à l'extrait acétatique aqueux (Eac H₂O)

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. La courbe ne s'annule pas jusqu'à la concentration maximale que nous nous sommes fixée (12,5 mg/mL). Etant donné que la courbe ne s'annule pas, l'Eac H₂O ne permet donc pas d'obtenir une CMF à la concentration maximale de 12,5 mg/mL sur *Candida albicans*. La CI₅₀ n'a également pas pu être déterminée.

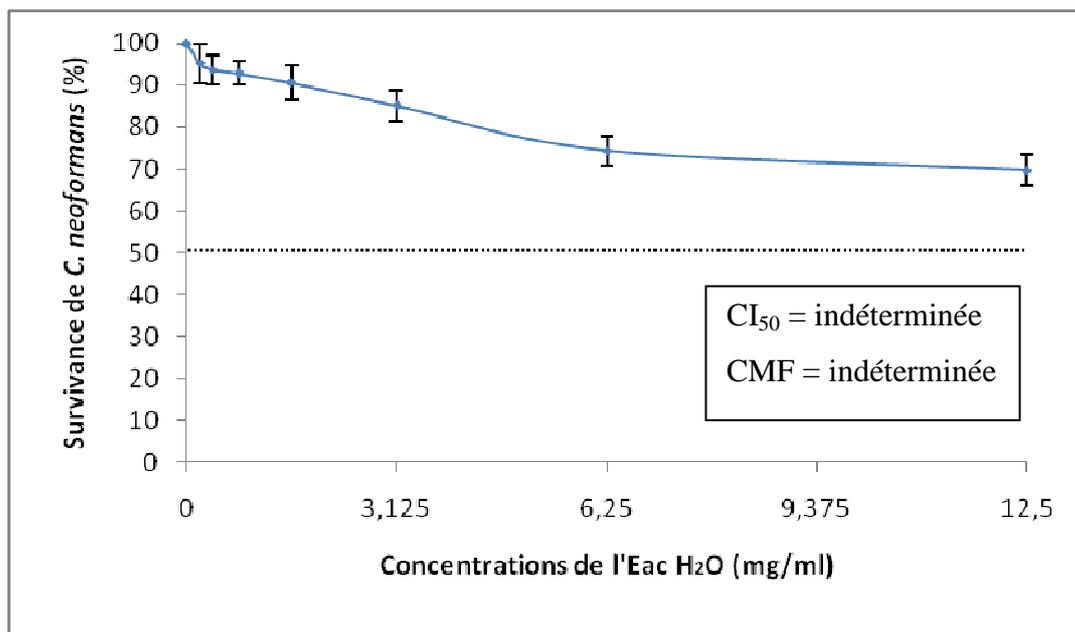
E- Effet de l'extrait acétatique H₂O (Eac H₂O) sur *Cryptococcus neoformans*

Figure 23 : Sensibilité de *Cryptococcus neoformans* à l'extrait acétatique aqueux (Eac H₂O)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. La courbe ne s'annule pas jusqu'à la concentration maximale que nous nous sommes fixée (12,5 mg/mL). Étant donné que la courbe ne s'annule pas, l'Eac H₂O ne permet donc pas d'obtenir une CMF à la concentration maximale de 12,5 mg/mL sur *Cryptococcus neoformans*. La CI₅₀ n'a également pas pu être déterminée.

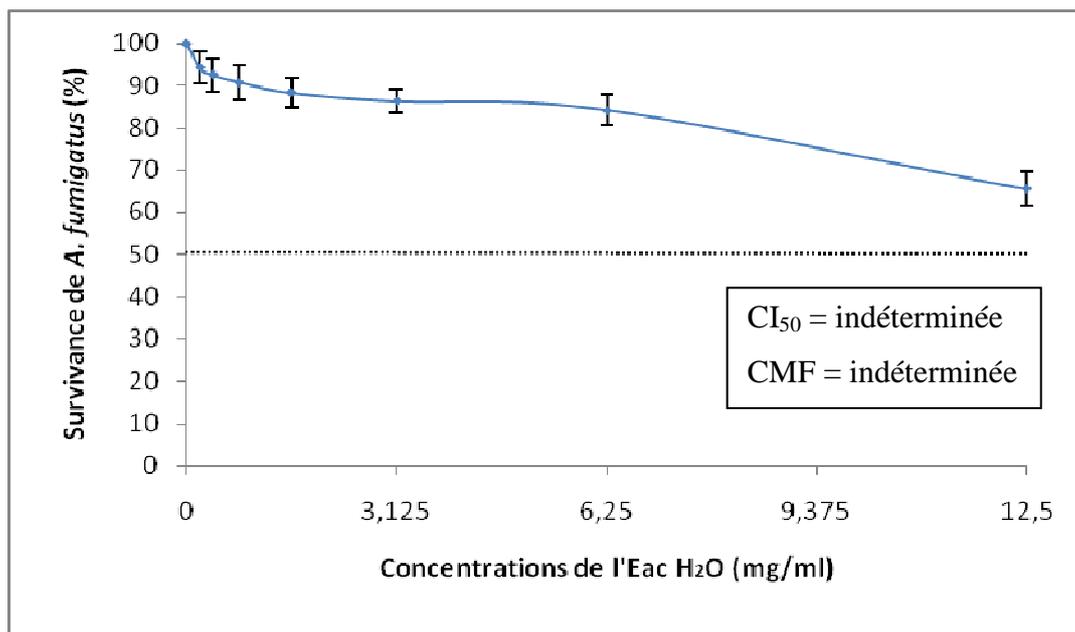
F- Effet de l'extrait acétatique H₂O (Eac H₂O) sur *Aspergillus fumigatus*

Figure 24 : Sensibilité de *Aspergillus fumigatus* à l'extrait acétatique aqueux (Eac H₂O)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. La courbe ne s'annule pas jusqu'à la concentration maximale que nous nous sommes fixée (12,5 mg/mL). Étant donné que la courbe ne s'annule pas, l'Eac H₂O ne permet donc pas d'obtenir une CMF à la concentration maximale de 12,5 mg/mL sur *Aspergillus fumigatus*. La CI₅₀ n'a également pas pu être déterminée.

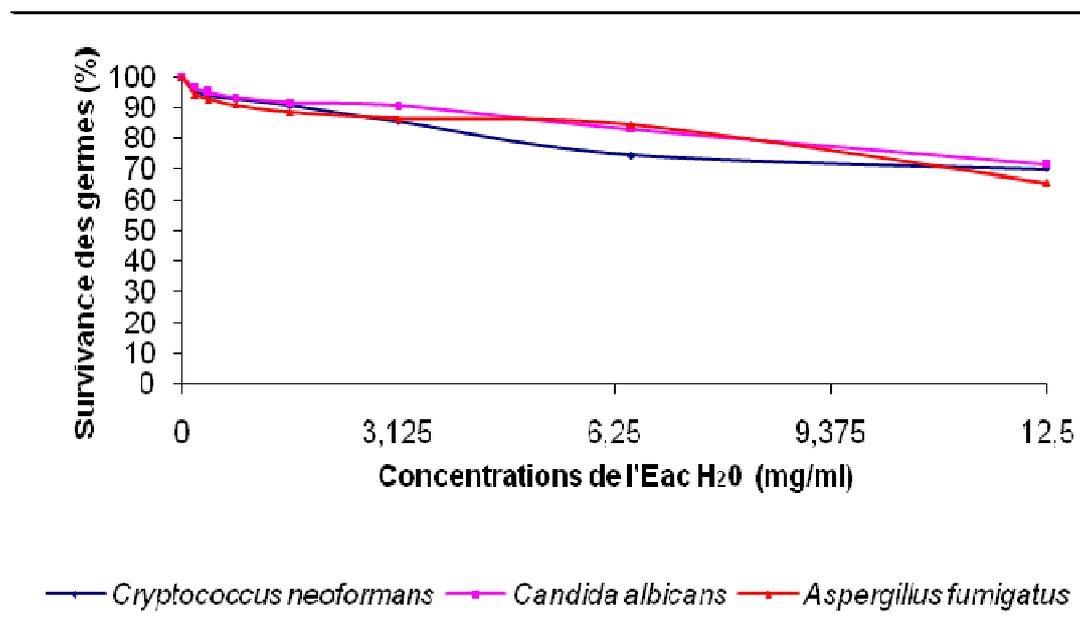


Figure 25 : Sensibilité comparée de *C. albicans*, *A. fumigatus* et *C. neoformans* à l'extrait acétatique aqueux (Eac H₂O)

La figure 25 montre le regroupement sur une même figure les trois courbes de sensibilité obtenus précédemment avec l'Eac H₂O. Cette façon de faire permet de comparer les courbes obtenues pour les trois germes. Ici faire une comparaison s'avère très difficile. Les trois courbes ont pratiquement la même allure. Il n'existe pas de CMF ni de CI₅₀ à la concentration maximale de 12,5 mg/mL. L'Eac H₂O n'a pratiquement pas d'activité antifongique sur les germes de notre étude.

G- Courbes de sensibilité et paramètres antifongiques comparés

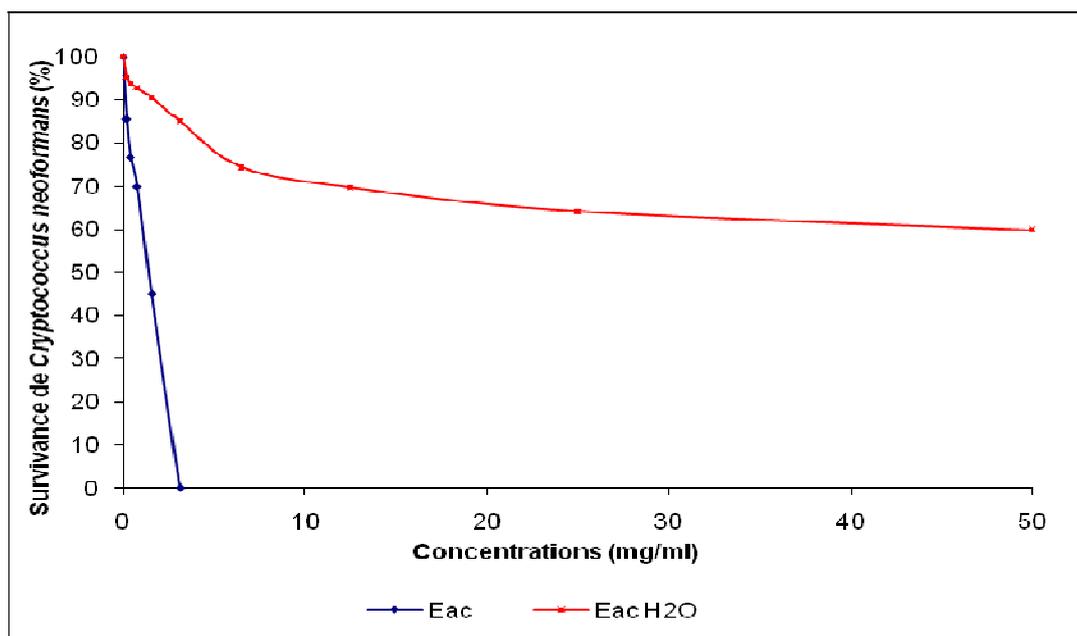


Figure 26 : Activité comparée de l'extrait acétatique et l'extrait acétatique aqueux (Eac H₂O) sur la croissance de *C. neoformans*

La figure 26 présente sur une même figure les antifongiques obtenus avec l'Eac et l'Eac H₂O sur la croissance *in vitro* de *C. neoformans*. Cela permet de comparer les deux courbes. La courbe obtenue avec l'Eac H₂O devient pratiquement parallèle à l'axe des abscisses d'où la non détermination de la CMF. Alors que celle obtenue avec l'Eac à une pente très forte. L'Eac a donc une meilleure activité que l'Eac H₂O.

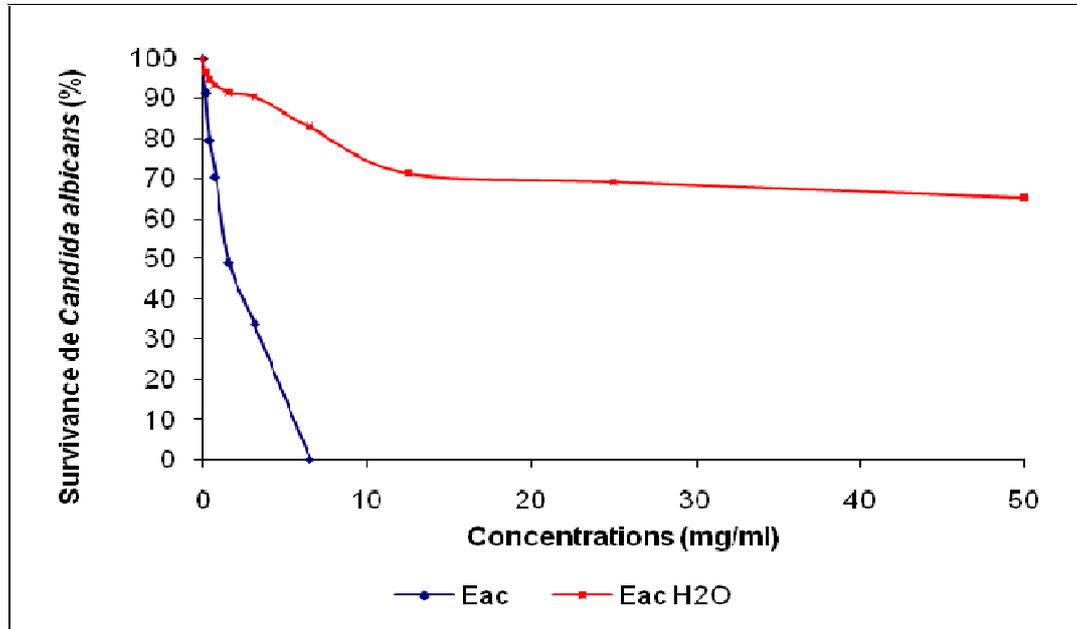


Figure 27 : Activité comparée de l'extrait acétatique et l'extrait acétatique aqueux (Eac H₂O) sur la croissance de *C. albicans*

La figure 27 présente sur une même figure les antifongiques obtenus avec l'Eac et l'Eac H₂O sur la croissance *in vitro* de *C. neoformans*. Cela permet de comparer les deux courbes. La courbe obtenue avec l'Eac H₂O devient pratiquement parallèle à l'axe des abscisses d'où la non détermination de la CMF. Alors que celle obtenue avec l'Eac à une pente très forte. L'Eac a donc une meilleure activité que l'Eac H₂O.

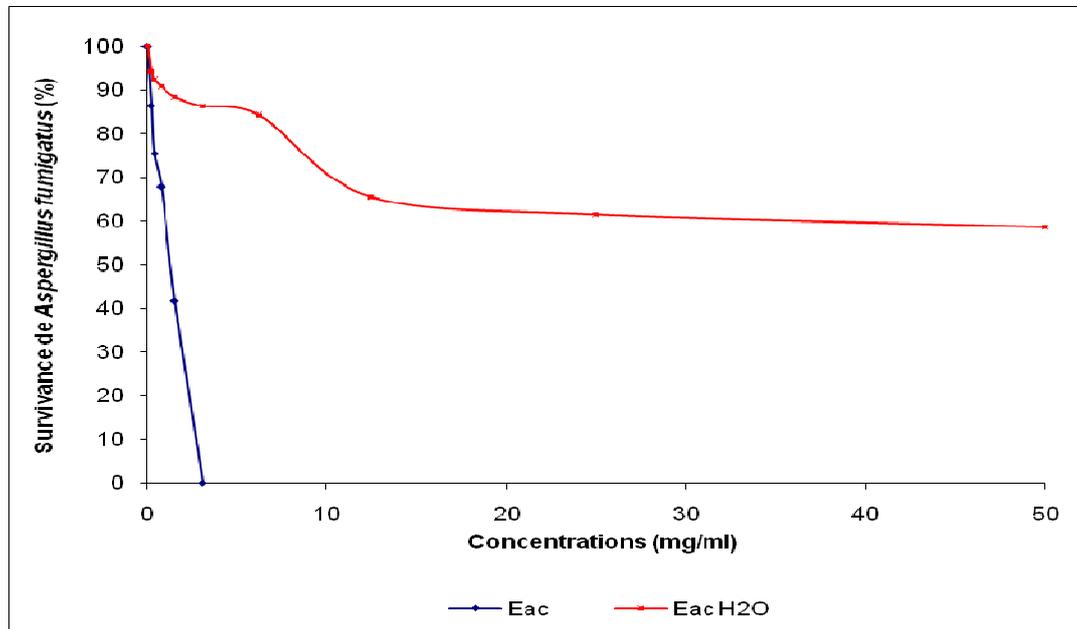


Figure 28 : Activité comparée de l'extrait acétatique et l'extrait acétatique aqueux (Eac H₂O) sur la croissance de *A. fumigatus*

La figure 28 présente sur une même figure les antifongiques obtenus avec l'Eac et l'Eac H₂O sur la croissance *in vitro* de *C. neoformans*. Cela permet de comparer les deux courbes. La courbe obtenue avec l'Eac H₂O devient pratiquement parallèle à l'axe des abscisses d'où la non détermination de la CMF. Alors que celle obtenue avec l'Eac à une pente très forte. L'Eac a donc une meilleure activité que l'Eac H₂O.

Tableau IV : Paramètres antifongiques comparés de l'extrait acétatique et l'extrait acétatique aqueux (Eac H₂O)

Extraits	<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)
Eac H ₂ O	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée
Eac	1,25 ± 0,5	3,125	1,35 ± 0,8	3,125	1,4 ± 0,05	6,25

Le tableau IV montre que l'Eac est très actif sur les trois germes fongiques que l'Eac H₂O. Ces résultats viennent nous conforter dans notre position selon laquelle l'acétate d'éthyle extrait mieux les principes actifs de notre plante.

- **III-4 Influence des fractions F1, F2, F3 et F4 de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*.**

Les effets des différentes fractions (F1, F2, F3 et F4) de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* ont donné les résultats suivants :

1- Effet de la Fraction 1 (F1) de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* de *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus*.

Les valeurs obtenues ont permis les tracés des figures 28, 29 et 30. Ce sont les courbes de sensibilité obtenus à partir des pourcentages de survivance en fonction des différentes concentrations de la F1 de *Morinda morindoides*. L'allure globale de ces courbes est décroissante et exprime l'inhibition progressive et dose-dépendante de la croissance *in vitro* de *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus*. Ces courbes nous ont permis de déterminer les paramètres antifongiques que sont les Concentrations pour 50% d'Inhibition (CI₅₀) et la Concentration Minimale Fongicide (CMF).

Pour les trois germes, les valeurs de la CI₅₀ et de la CMF sont présentées dans le tableau V :

Ainsi pour la F1 les CI₅₀ sont respectivement de $0,151 \pm 0,1$ mg/mL pour *C. albicans* ; $0,08 \pm 0,02$ mg/mL pour *C. neoformans* et $0,04 \pm 0,5$ mg/mL pour *A. fumigatus*.

La CMF est de 0,78 mg/mL pour *C. albicans* et pour *C. neoformans* et de 0,195 mg/mL pour *A. fumigatus*.

La CI₅₀ obtenue avec *C. albicans* est supérieure à celle obtenue avec *C. neoformans* qui elle même est supérieure à celle obtenue avec *A. fumigatus*. (CI₅₀ *C. albicans* > CI₅₀ *C. neoformans* > CI₅₀ *A. fumigatus*).

La CMF est identique pour deux germes. CMF *C. albicans* = CMF *C. neoformans* > CMF *A. fumigatus*.

2- Effet de la fraction 2 (F2) de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* de *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus*.

Les figures 32, 33 et 34 montrent l'évolution du pourcentage de survivance des germes en présence et en absence des différentes concentrations de la F2 de *Morinda morindoides*. Ces figures indiquent qu'en absence de l'extrait (0 mg/mL), la survivance des germes est de 100%. L'addition des différentes concentrations de cette fraction au milieu de culture entraîne une diminution progressive dose-dépendante de la croissance des germes. A partir de 3,125 mg/mL pour *C. albicans* et 1,56 mg/mL pour *C. neoformans* et pour *A. fumigatus*, on note une inhibition complète de ces germes.

Les courbes de sensibilité obtenues, traduisent la sensibilité des différents germes à la fraction 2. Ces courbes ont permis de déterminer les CI₅₀. Ces CI₅₀ sont respectivement de $0,45 \pm 0,15$

mg/mL pour *C. albicans*, $0,4 \pm 0,1$ mg/mL pour *C. neoformans* et de $0,38 \pm 0,08$ mg/mL pour *A. fumigatus*.

3- Effet de la fraction 3 (F3) de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* de *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus*.

La sensibilité de *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus* à la F3 de *Morinda morindoides* est donnée par les figures 36, 37 et 38. L'allure décroissante de ces différentes courbes indique une réduction progressive très lente et dose-dépendante du pourcentage de survivance en présence des différentes concentrations de l'extrait. La faiblesse de l'activité ne permet pas de déterminer de paramètres antifongiques.

4- Effet de la fraction 4 (F4) de *Morinda morindoides* sur la croissance *in vitro* de *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus*.

La sensibilité de *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus* à la F4 de *Morinda morindoides* est donnée par les figures 40, 41 et 42. L'allure décroissante de ces différentes courbes indique une réduction progressive et dose-dépendante du pourcentage de survivance en présence des différentes concentrations de la fraction. L'inhibition des germes en présence de la F4 existe mais elle est très faible ; d'où l'impossibilité de déterminer les paramètres antifongiques jusqu'à une concentration de 6,25 mg/mL.

5- Paramètres antifongiques comparés

Les courbes de sensibilité des figures 44, 45 et 46, et le Tableau V présentent les sensibilités comparées des différents germes aux quatre fractions étudiées. Ces figures donnent les paramètres antifongiques comparés. Ces paramètres n'ont pu être déterminés que pour la F1 et la F2. Ainsi :

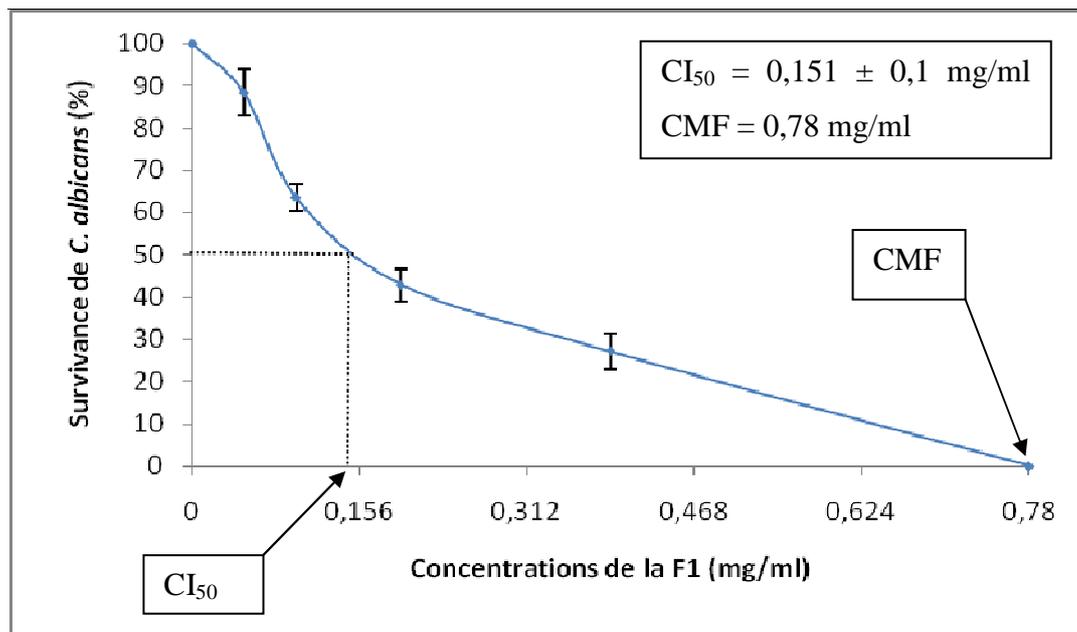
Pour *C. albicans*, la $CI_{50} = 0,151 \pm 0,1$ mg/mL pour la F1 et $0,15 \pm 4,1$ mg/mL pour la F2.

Pour *C. neoformans*, la $CI_{50} = 0,08 \pm 0,02$ mg/mL pour la F1 et $0,4 \pm 0,1$ mg/mL pour la F2.

Pour *A. fumigatus*, la $CI_{50} = 0,04 \pm 0,01$ mg/mL pour la F1 et $0,38 \pm 0,08$ mg/mL pour la F2.

En ce concerne les CMF, nous obtenons :

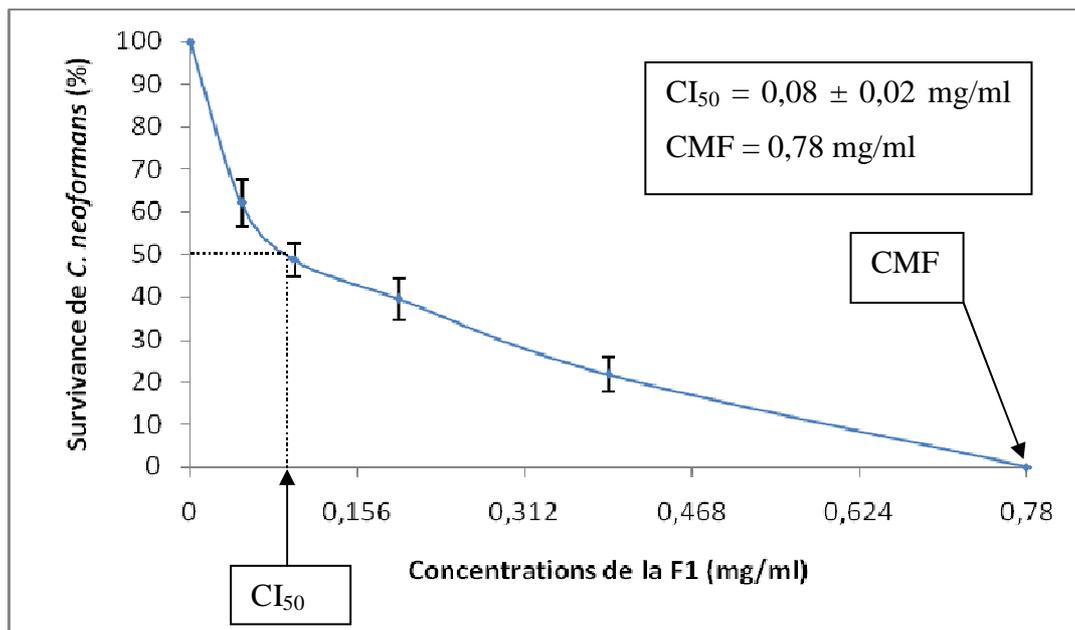
- Pour *C. albicans*: CMF F1 = 0,78 mg/mL et CMF F2 = 3,125 mg/mL.
- Pour *C. neoformans*: CMF F1 = 0,78 mg/mL et CMF F2 = 1,56 mg/mL
- Pour *A. fumigatus* : CMF F1 = 0,195 mg/mL et CMF F2 = 1,56 mg/mL.

A- Effet de la fraction 1 (F1) sur *Candida albicans***Figure 29:** Sensibilité de *Candida albicans* à la fraction 1 (F1)

CI_{50} : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de la F1 augmente. La courbe s'annule à 0,78 mg/mL. Cette valeur est donc la concentration minimale à laquelle la F1 tue *Candida albicans*. La CI_{50} est la concentration à laquelle la moitié des germes est inhibé. C'est une valeur qui est déterminée graphiquement.

B- Effet de la fraction 1 (F2) sur *Cryptococcus neoformans***Figure 30** : Sensibilité de *Cryptococcus neoformans* à la fraction 1 (F1)

CI_{50} : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de la F1 augmente. La courbe s'annule à 0,78 mg/mL. Cette valeur est donc la concentration minimale à laquelle la F1 tue *Cryptococcus neoformans*. La CI_{50} est la concentration à laquelle la moitié des germes est inhibé. C'est une valeur qui est déterminée graphiquement.

C- Effet de la fraction 1 (F1) sur *Aspergillus fumigatus*

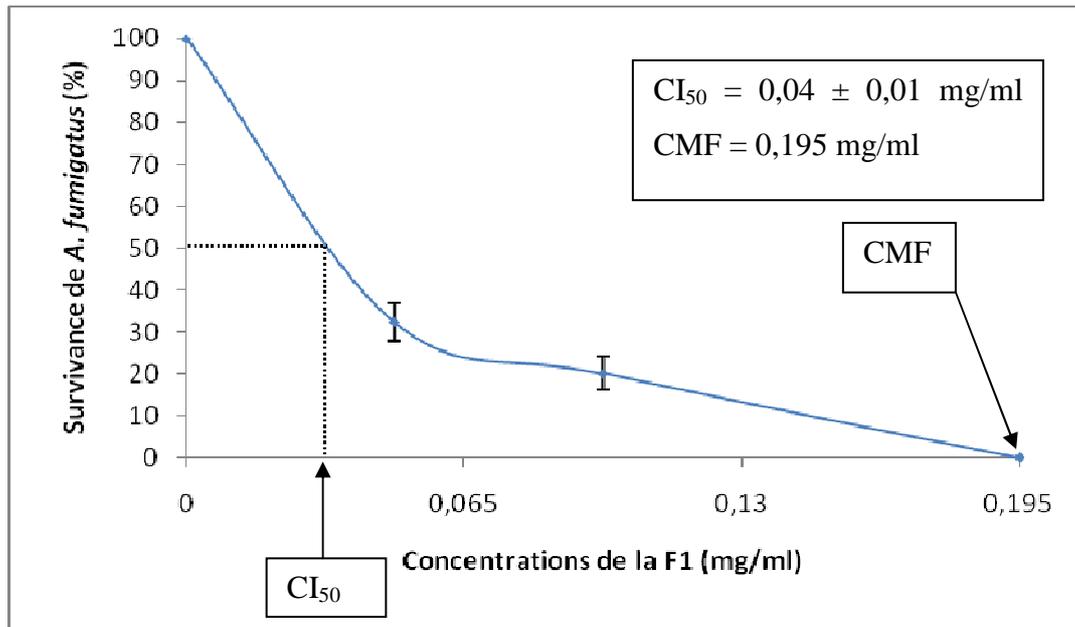


Figure 31 : Sensibilité de *Aspergillus fumigatus* à la fraction 1 (F1)

CI_{50} : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de la F1 augmente. La courbe s'annule à 0,195 mg/mL. Cette valeur est donc la concentration minimale à laquelle la F1 tue *Aspergillus fumigatus*. La CI_{50} est la concentration à laquelle la moitié des germes est inhibé. C'est une valeur qui est déterminée graphiquement.

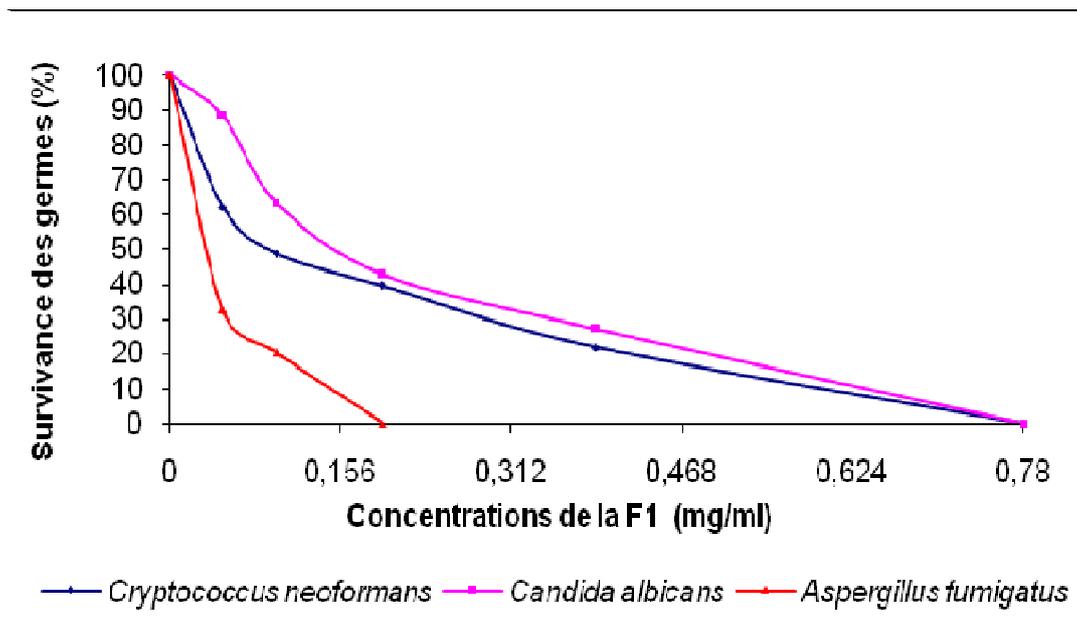


Figure 32 : Sensibilité comparée de *C. albicans*, *A. fumigatus* et *C. neoformans* à la fraction 1 (F1)

La figure 32 montre le regroupement sur une même figure les trois courbes de sensibilité obtenus précédemment avec la F1. Cette façon de faire permet de comparer les courbes obtenues pour les trois germes. Avec *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*, on a une CMF de 0,78 mg/mL. Alors qu'avec *Aspergillus fumigatus* on a une CMF de 0,195 mg/mL. Cela signifie que *Aspergillus fumigatus* est le germe le plus sensible à la F1.

D- Effet de la fraction 2 (F2) sur *Candida albicans*

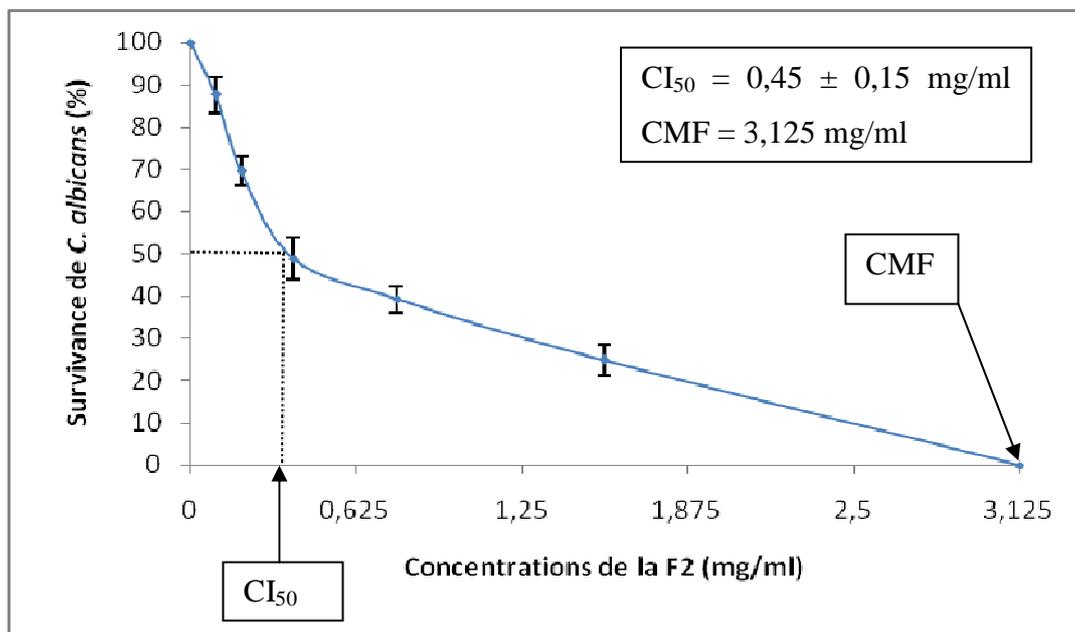
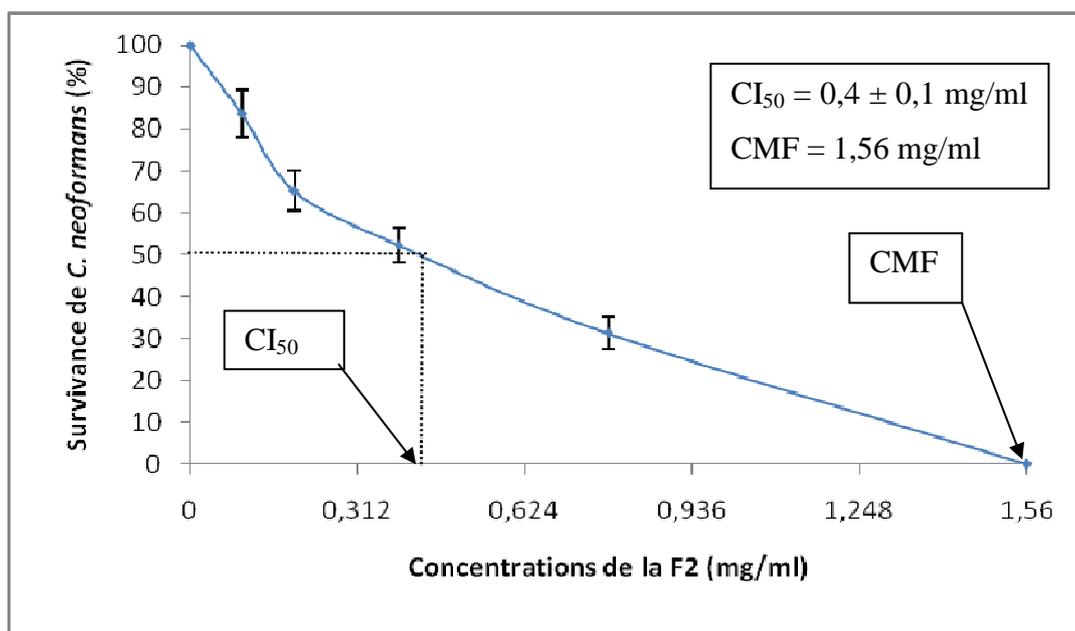


Figure 33 : Sensibilité de *Candida albicans* à la fraction 2 (F2)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

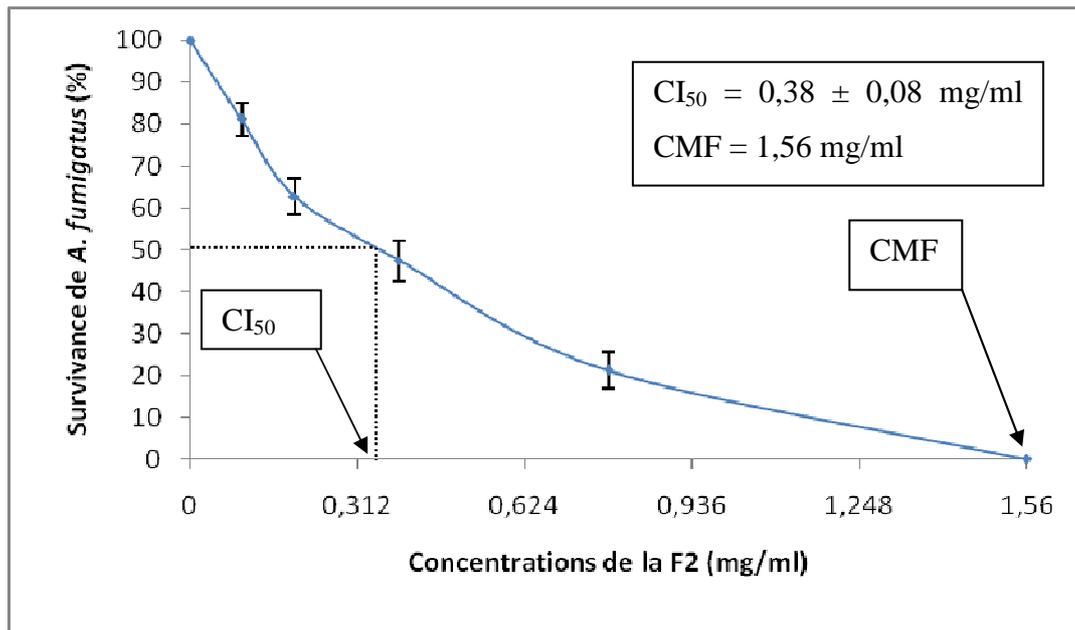
Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de la F2 augmente. La courbe s'annule à 3,125 mg/mL. Cette valeur est donc la concentration minimale à laquelle la F2 tue *Candida albicans*. La CI₅₀ est la concentration à laquelle la moitié des germes est inhibé. C'est une valeur qui est déterminée graphiquement.

E- Effet de la fraction 2 (F2) sur *Cryptococcus neoformans***Figure 34** : Sensibilité de *Cryptococcus neoformans* à la fraction 2 (F2)

CI_{50} : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de la F2 augmente. La courbe s'annule à 1,56 mg/mL. Cette valeur est donc la concentration minimale à laquelle la F2 tue *Cryptococcus neoformans*. La CI_{50} est la concentration à laquelle la moitié des germes est inhibé. C'est une valeur qui est déterminée graphiquement.

F- Effet de la fraction 2 (F2) sur *Aspergillus fumigatus***Figure 35 : Sensibilité de *Aspergillus fumigatus* à la fraction 2 (F2)**

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de la F2 augmente. La courbe s'annule à 1,56 mg/mL. Cette valeur est donc la concentration minimale à laquelle la F2 tue *Aspergillus fumigatus*. La CI₅₀ est la concentration à laquelle la moitié des germes est inhibé. C'est une valeur qui est déterminée graphiquement.

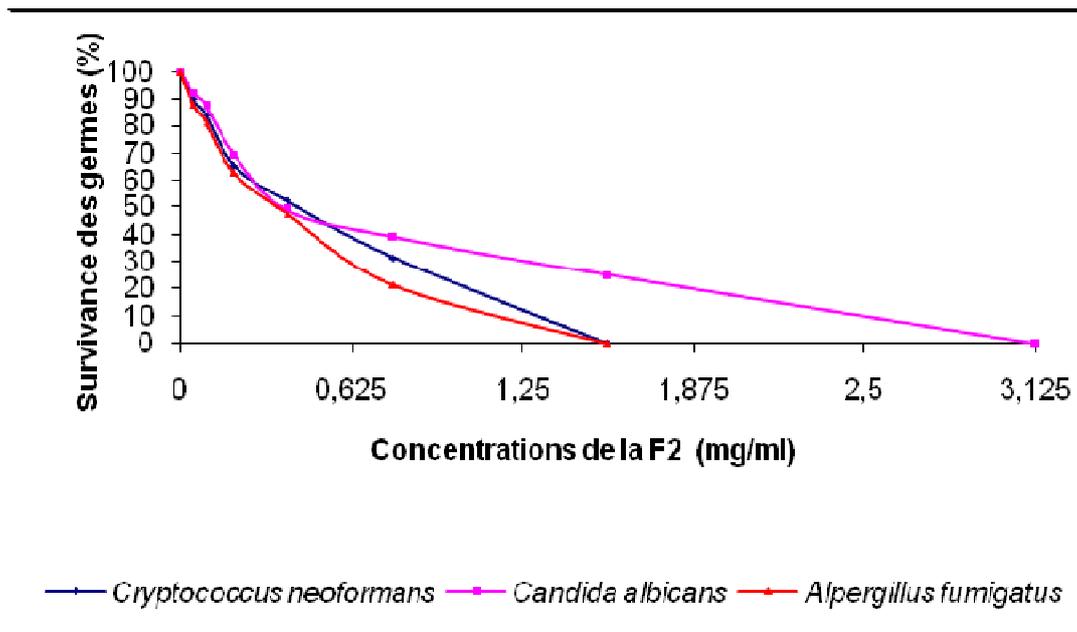
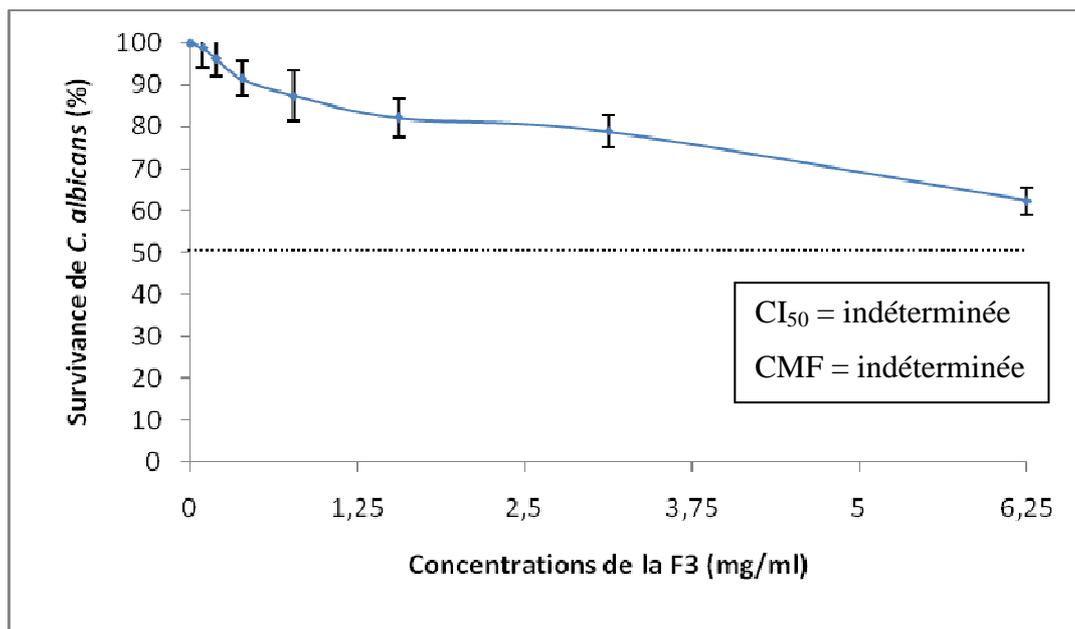


Figure 36 : Sensibilité comparée de *C. albicans*, *A. fumigatus* et *C. neoformans* à la fraction 2 (F2)

La figure 36 montre le regroupement sur une même figure les trois courbes de sensibilité obtenus précédemment avec la F2. Cette façon de faire permet de comparer les courbes obtenues pour les trois germes. Avec *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*, on a une CMF de 1,56 mg/mL. Alors qu'avec *Aspergillus fumigatus* on a une CMF de 3,125 mg/mL. Cela signifie que *Aspergillus fumigatus* est le germe le plus sensible à la F2.

G- Effet de la fraction 3 (F3) sur *Candida albicans***Figure 37 :** Sensibilité de *Candida albicans* à la fraction 3 (F3)

CI_{50} : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. La courbe ne s'annule pas jusqu'à la concentration maximale que nous nous sommes fixée (6,25 mg/mL). Etant donné que la courbe ne s'annule pas, la F3 ne permet donc pas d'obtenir une CMF à la concentration maximale de 6,25 mg/mL sur *Candida albicans*. La CI_{50} n'a également pas pu être déterminée.

H- Effet de la fraction 3 (F3) sur *Cryptococcus neoformans*

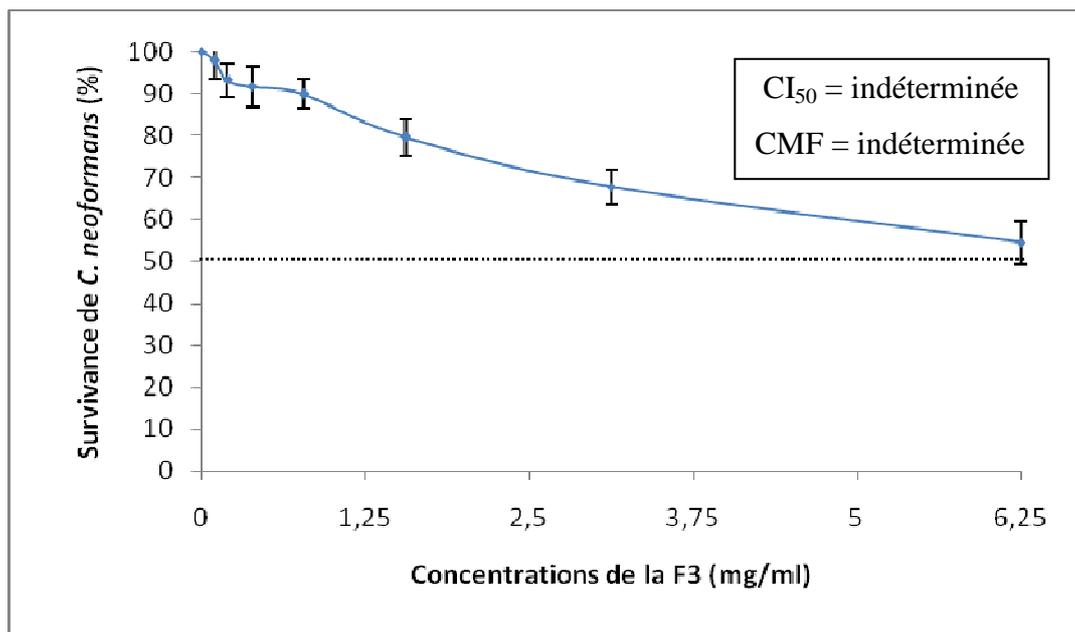


Figure 38 : Sensibilité de *Cryptococcus neoformans* à la fraction 3 (F3)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. La courbe ne s'annule pas jusqu'à la concentration maximale que nous nous sommes fixée (6,25 mg/mL). Étant donné que la courbe ne s'annule pas, la F3 ne permet donc pas d'obtenir une CMF à la concentration maximale de 6,25 mg/mL sur *Cryptococcus neoformans*. La CI₅₀ n'a également pas pu être déterminée.

I- Effet de la fraction 3 (F3) sur *Aspergillus fumigatus*

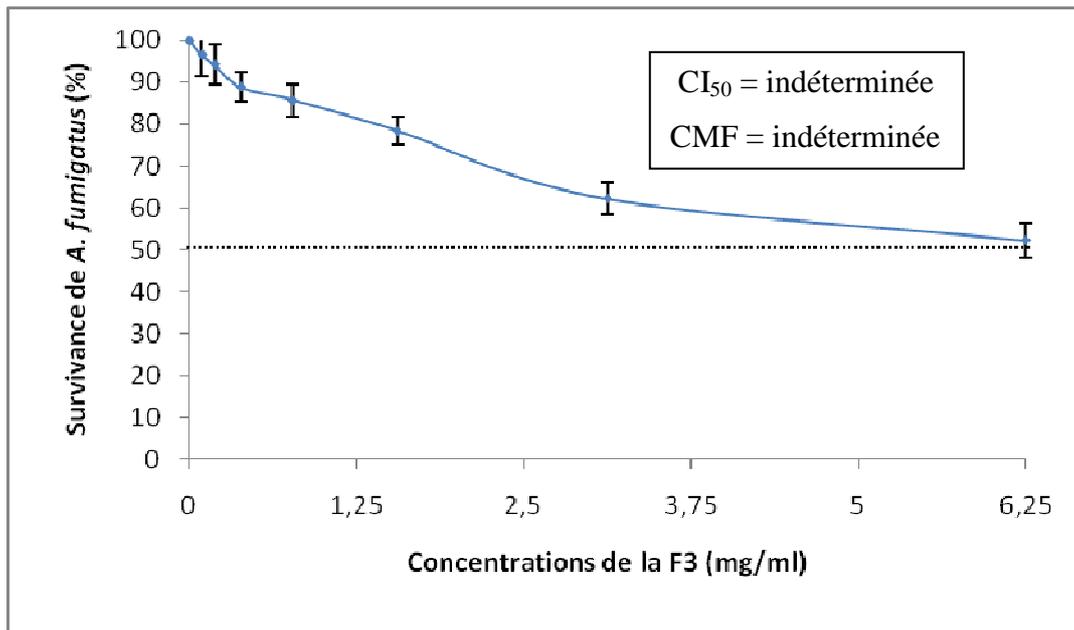


Figure 39 : Sensibilité de *Aspergillus fumigatus* à la fraction 3 (F3)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. La courbe ne s'annule pas jusqu'à la concentration maximale que nous nous sommes fixée (6,25 mg/mL). Etant donné que la courbe ne s'annule pas, la F3 ne permet donc pas d'obtenir une CMF à la concentration maximale de 6,25 mg/mL sur *Aspergillus fumigatus*. La CI₅₀ n'a également pas pu être déterminée.

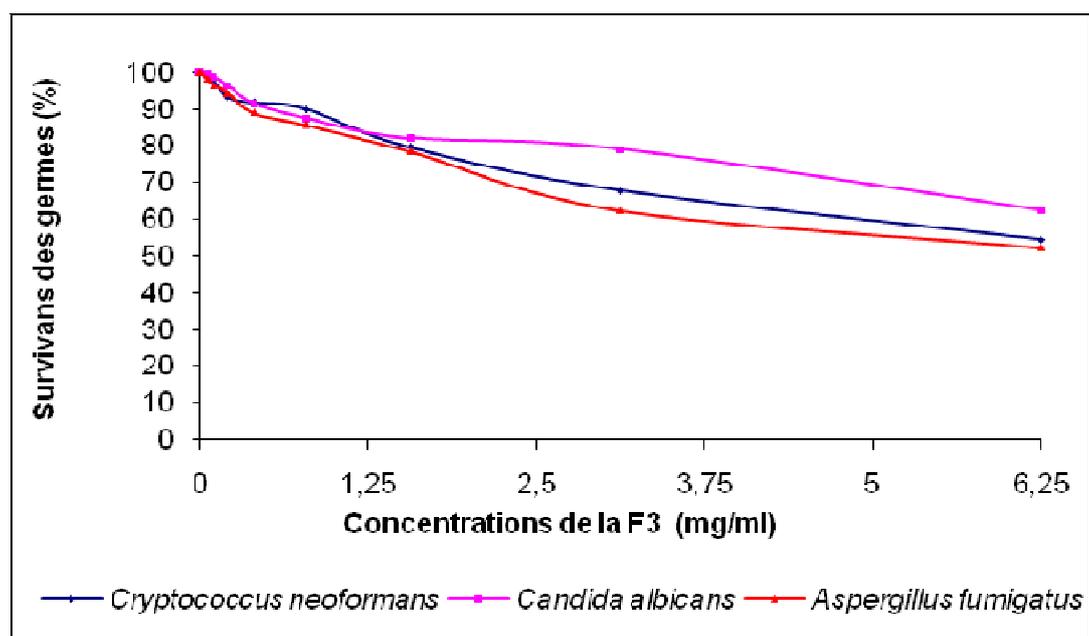
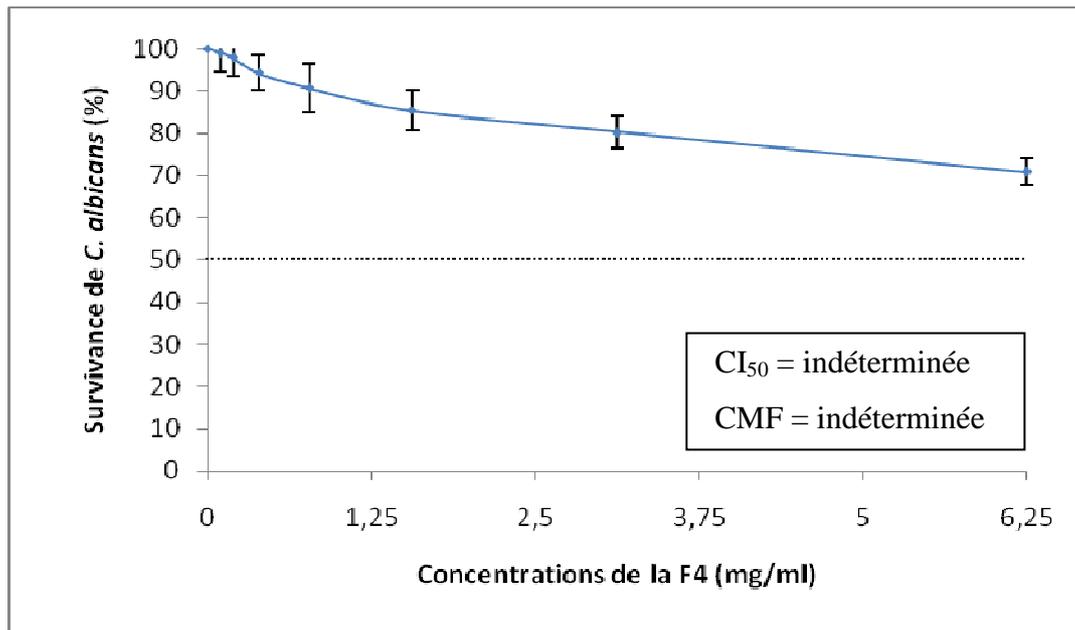


Figure 40 : Sensibilité comparée de *C. albicans*, *A. fumigatus* et *C. neoformans* à la fraction 3 (F3)

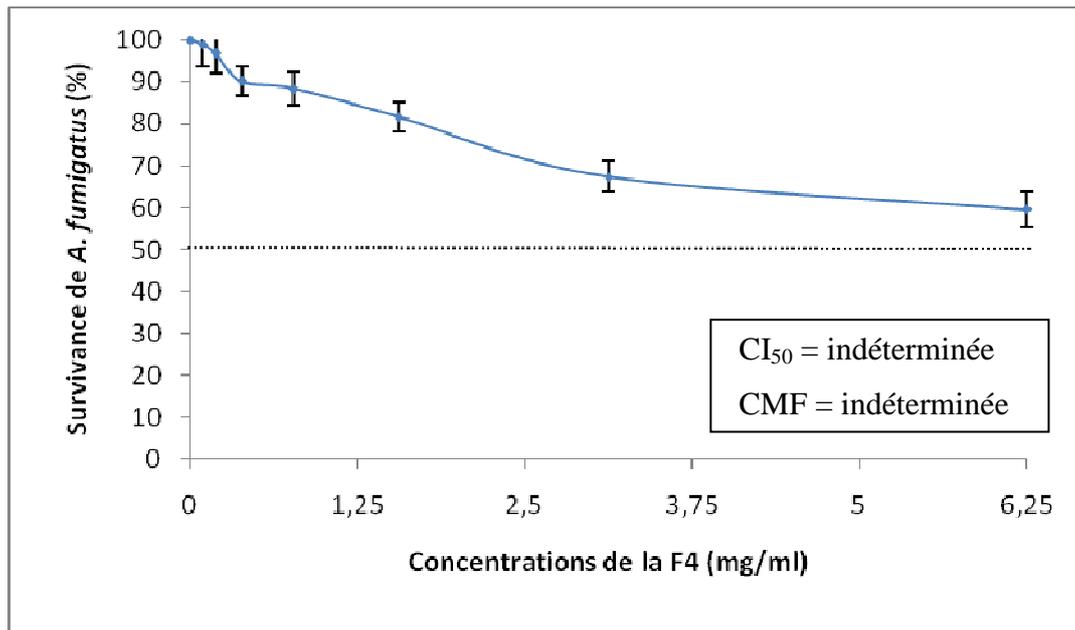
La figure 40 montre le regroupement sur une même figure les trois courbes de sensibilité obtenus précédemment avec la F3. Cette façon de faire permet de comparer les courbes obtenues pour les trois germes. Ici faire une comparaison s'avère très difficile. Les trois courbes ont pratiquement la même allure. Il n'existe pas de CMF ni de CI_{50} à la concentration maximale de 6,25 mg/mL. La F3 n'a pratiquement pas d'activité antifongique sur les germes de notre étude.

J- Effet de la fraction 4 (F4) sur *Candida albicans***Figure 41** : Sensibilité de *Candida albicans* à la fraction 4 (F4)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

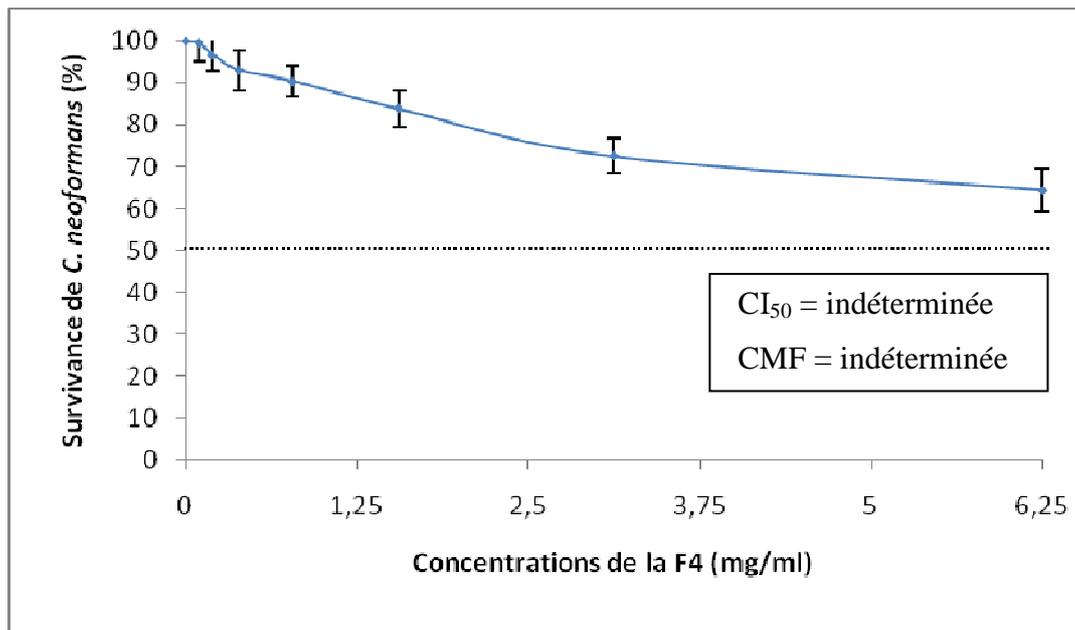
Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. La courbe ne s'annule pas jusqu'à la concentration maximale que nous nous sommes fixée (6,25 mg/mL). Etant donné que la courbe ne s'annule pas, la F4 ne permet donc pas d'obtenir une CMF à la concentration maximale de 6,25 mg/mL sur *Candida albicans*. La CI₅₀ n'a également pas pu être déterminée.

K- Effet de la fraction 4 (F4) sur *Aspergillus fumigatus***Figure 42 : Sensibilité de *Aspergillus fumigatus* à la fraction 4 (F4)**

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. La courbe ne s'annule pas jusqu'à la concentration maximale que nous nous sommes fixée (6,25 mg/mL). Etant donné que la courbe ne s'annule pas, la F4 ne permet donc pas d'obtenir une CMF à la concentration maximale de 6,25 mg/mL sur *Aspergillus fumigatus*. La CI₅₀ n'a également pas pu être déterminée.

L- Effet de la fraction 4 (F4) sur *Cryptococcus neoformans***Figure 43 :** Sensibilité de *Cryptococcus neoformans* à la fraction 4 (F4)

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Cette courbe représente la survie des germes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. La courbe ne s'annule pas jusqu'à la concentration maximale que nous nous sommes fixée (6,25 mg/mL). Étant donné que la courbe ne s'annule pas, la F4 ne permet donc pas d'obtenir une CMF à la concentration maximale de 6,25 mg/mL sur *Aspergillus fumigatus*. La CI₅₀ n'a également pas pu être déterminée.

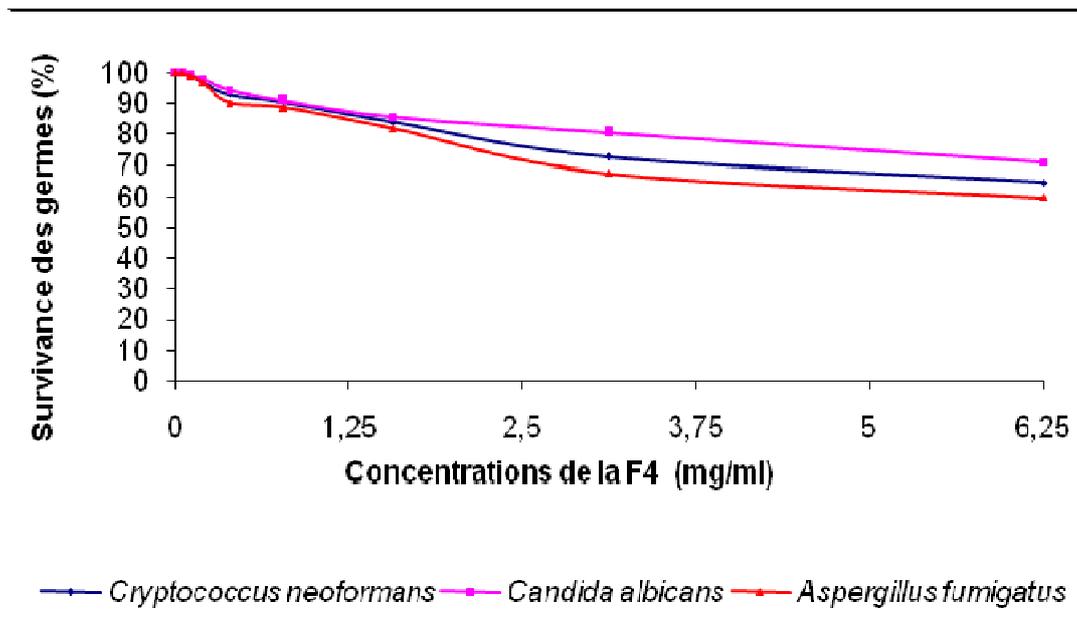


Figure 44 : Sensibilité comparée de *C. albicans*, *A. fumigatus* et *C. neoformans* à la fraction 4 (F4)

La figure 44 montre le regroupement sur une même figure les trois courbes de sensibilité obtenus précédemment avec la F4. Cette façon de faire permet de comparer les courbes obtenues pour les trois germes. Ici faire une comparaison s'avère très difficile. Les trois courbes ont pratiquement la même allure. Il n'existe pas de CMF ni de CI_{50} à la concentration maximale de 6,25 mg/mL. La F4 n'a pratiquement pas d'activité antifongique sur les germes de notre étude.

M- Courbes de sensibilité et paramètres antifongiques comparés

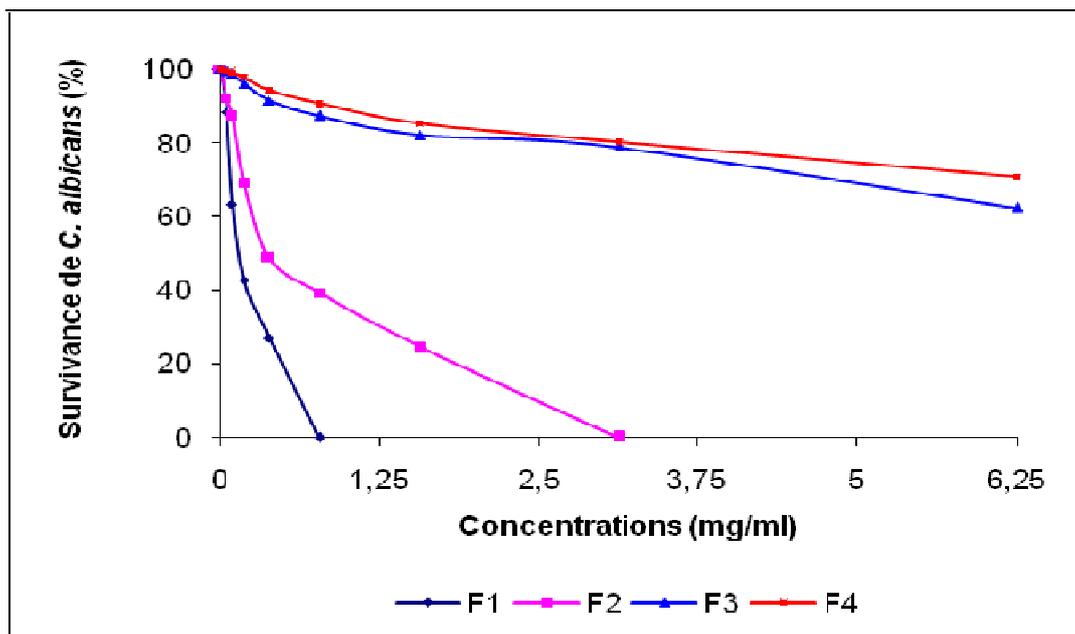


Figure 45: Sensibilité de *Candida albicans* à la F1, la F2, la F3 et la F4

La figure 45 représente les courbes de sensibilité obtenus après l'action des fractions F1, F2, F3 et F4 sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. Plus la pente de la courbe est forte, plus l'activité de la fraction est élevée. La F1 apparaît donc comme la fraction la plus active contre *C. albicans*.

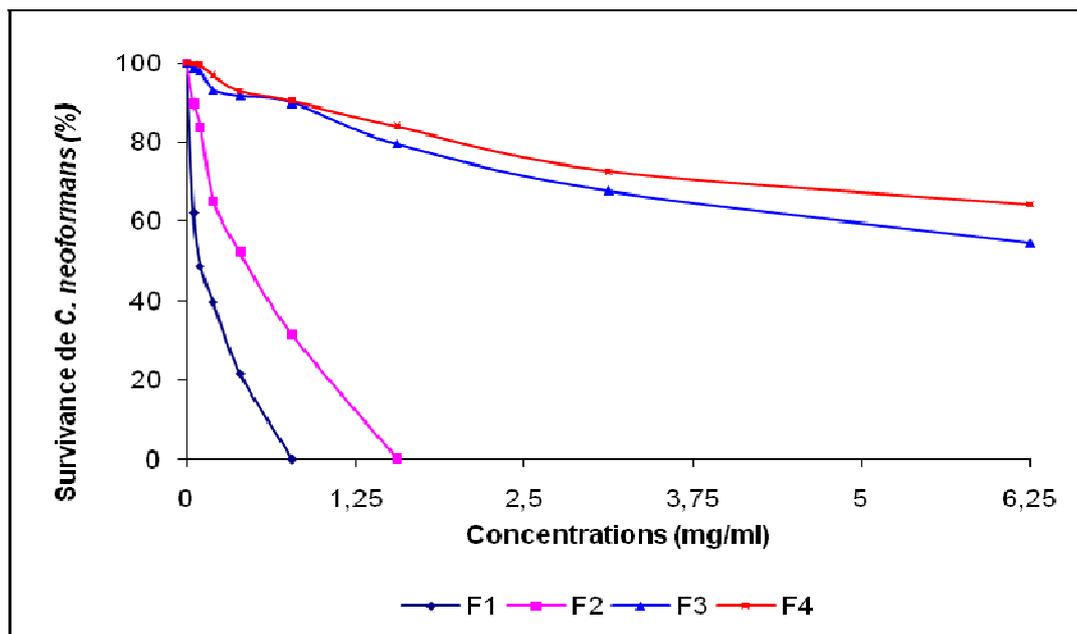


Figure 46 : Sensibilité de *Cryptococcus neoformans* à la F1, la F2, la F3 et la F4

La figure 46 représente les courbes de sensibilité obtenus après l'action des fractions F1, F2, F3 et F4 sur la croissance *in vitro* de *Cryptococcus neoformans*. Plus la pente de la courbe est forte, plus l'activité de la fraction est élevée. La F1 apparaît donc comme la fraction la plus active contre *C. neoformans*.

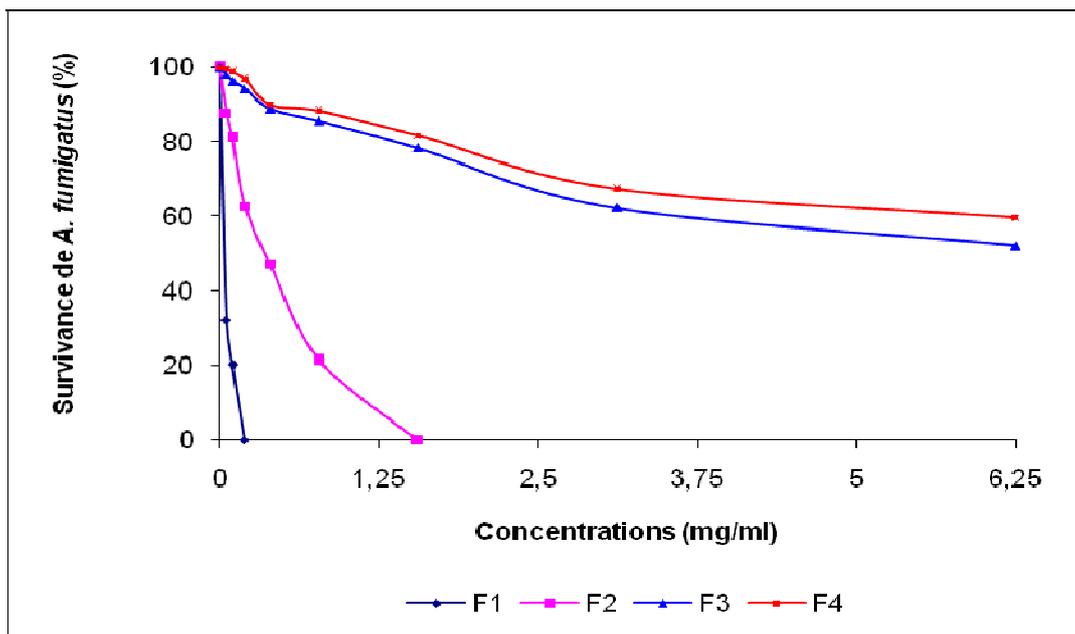


Figure 47 : Sensibilité de *Aspergillus fumigatus* à la F1, la F2, la F3 et la F4

La figure 47 représente les courbes de sensibilité obtenus après l'action des fractions F1, F2, F3 et F4 sur la croissance *in vitro* de *Aspergillus fumigatus*. Plus la pente de la courbe est forte, plus l'activité de la fraction est élevée. La F1 apparaît donc comme la fraction la plus active contre *A. fumigatus*.

Tableau V : Paramètres antifongiques de la F1, la F2, la F3 et la F4

Extraits	<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)
F1	0,04 ± 0,01	0,195	0,08 ± 0,02	0,78	0,151 ± 0,1	0,78
F2	0,38 ± 0,08	1,56	0,4 ± 0,1	1,56	0,45 ± 0,15	3,125
F3	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée
F4	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Le tableau V présente l'activité des fractions F1, F2, F3 et F4 sur la croissance *in vitro* des trois germes fongiques. Seules la F1 et la F2 affichent une activité très considérable. *A. fumigatus* apparaît comme le champignon le plus sensible, suivi de *C. neoformans*. *C. albicans* apparaît comme le champignon le plus résistant. La mention « indéterminée » signifie que le paramètre antifongique n'a pas pu être déterminé à la concentration maximale de 6,25 mg/mL que nous nous sommes fixée.

III- 5 RECAPITULATIF DES RESULTATS

Le tableau suivant présente le récapitulatif des résultats obtenus pour tous les extraits étudiés.

Tableau VI : Récapitulatifs des paramètres antifongiques

Extraits	<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)
Eaq	12,47 ± 0,75	300	14,3 ± 2,4	300	15,51 ± 1,03	300
Eeth	6,1 ± 2,1	12,5	6,3 ± 1,5	25	7,2 ± 1,7	25
Eac	1,25 ± 0,5	3,125	1,35 ± 0,8	3,125	1,4 ± 0,05	6,25
Eac H ₂ O	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée
F1	0,04 ± 0,01	0,195	0,08 ± 0,02	0,78	0,151 ± 0,1	0,78
F2	0,38 ± 0,08	1,56	0,4 ± 0,1	1,56	0,45 ± 0,15	3,125
F3	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée
F4	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée	indéterminée

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Au fur et à mesure qu'on avance, les extraits deviennent de plus en plus actifs. Cela confirme que le choix des solvants d'extraction est le bon. L'activité de l'Eac H₂O, de la F3 et de la F4 qui est pratiquement nulle, montre que les séparations entre solvants et entre fractions ont été bien menées.

Les figures 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 et le tableau VII suivants présentent les évolutions de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* depuis l'extrait total aqueux à la F1.

Les figures 48, 49 et 50 représentant les courbes de sensibilité comparés de l'Eaq, l'Eeth, l'Eac et la F1 pour les trois germes soumis à notre étude, nous montre la nette évolution de l'efficacité du premier extrait au dernier. Ces figures résumant tout le travail que nous avons effectué. On constate que les courbes de sensibilité de la F1 sont confondues avec l'axe des ordonnées. Cela montre l'efficacité de cette fraction.

Les histogrammes des figures 51 à 56 présentent la nette évolution des paramètres antifongiques, sur les trois germes testés, de l'extrait total aqueux (Eaq) à la fraction 1 (F1). Au fur et à mesure que ces paramètres décroissent, l'activité antifongique de l'extrait augmente.

Le tableau VII résume l'évolution des paramètres antifongiques des extraits de *Morinda morindoides* qui sont l'Eaq, l'Eeth, l'Eac et la F1. On remarque que les valeurs diminuent de l'Eaq à la F1. Ce qui nous permet d'affirmer que notre méthode de travail peut constituer une méthode de concentration des principes actifs et leur purification.

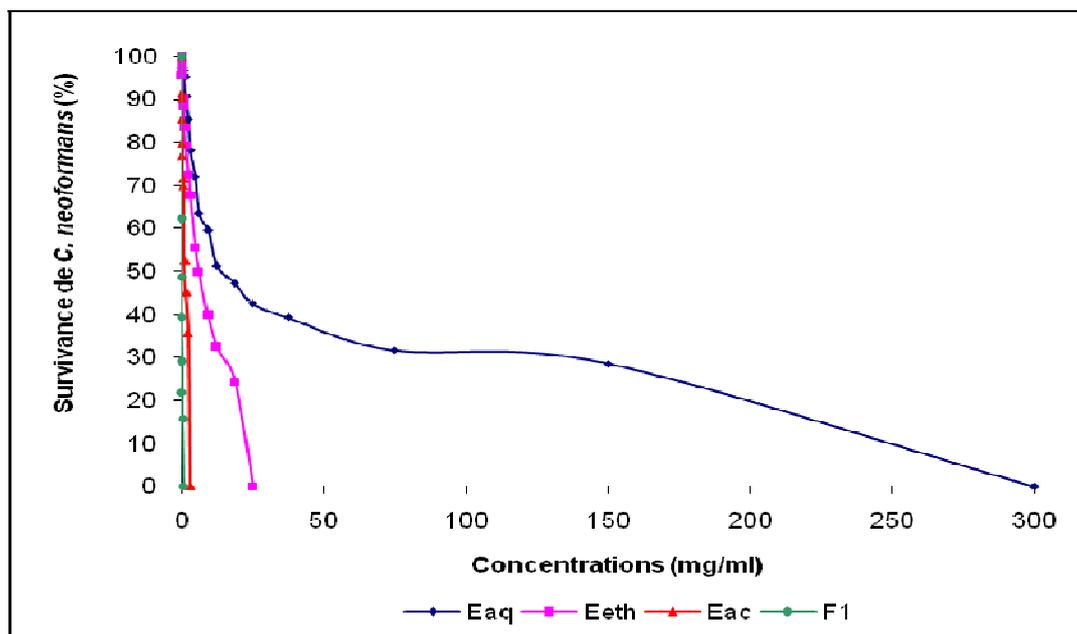


Figure 48: Courbes de sensibilités comparées de l'Eaq, l'Eeth, l'Eac et la F1 pour *Cryptococcus neoformans*.

La figure 48 représente les résultats significatifs obtenus pour *C. neoformans*. L'augmentation de la pente des courbes traduit l'augmentation de l'activité d'un extrait à l'autre. La courbe représentant l'antifongigramme de la F1 est pratiquement confondue à l'axe des ordonnées. Cela traduit le fait que la F1 a une très grande activité sur la croissance *in vitro* de *C. neoformans*.

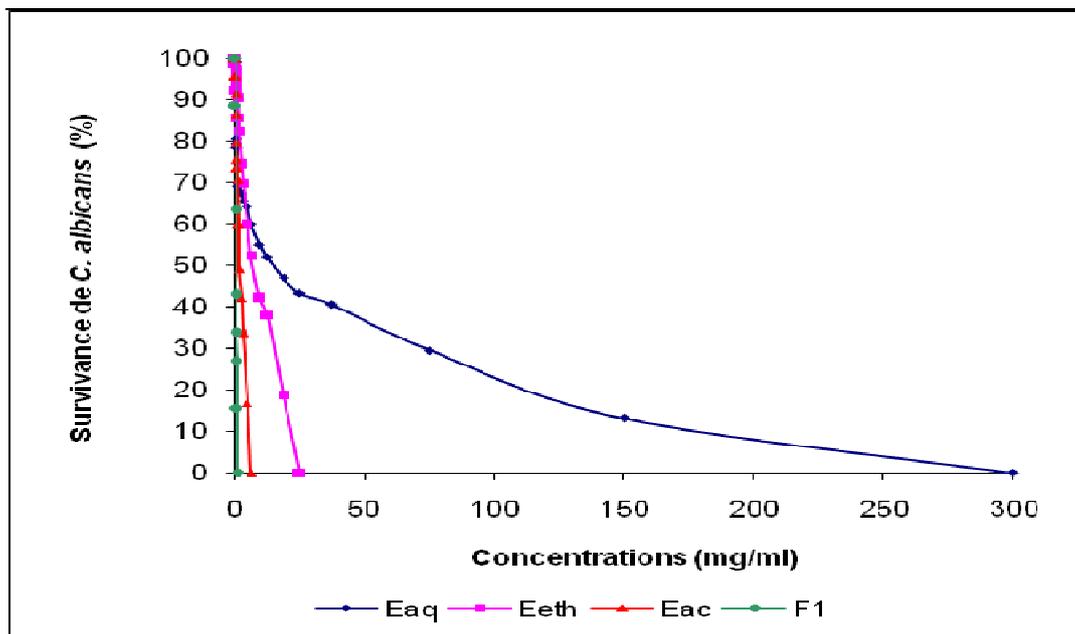


Figure 49: Courbes de sensibilités comparées de l'Eaq, l'Eeth, l'Eac et la F1 pour *Candida albicans*.

La figure 49 représente les résultats significatifs obtenus pour *C. albicans*. L'augmentation de la pente des courbes traduit l'augmentation de l'activité d'un extrait à l'autre. La courbe représentant l'antifongigramme de la F1 est pratiquement confondue à l'axe des ordonnées. Cela traduit le fait que la F1 a une très grande activité sur la croissance *in vitro* de *C. albicans*.

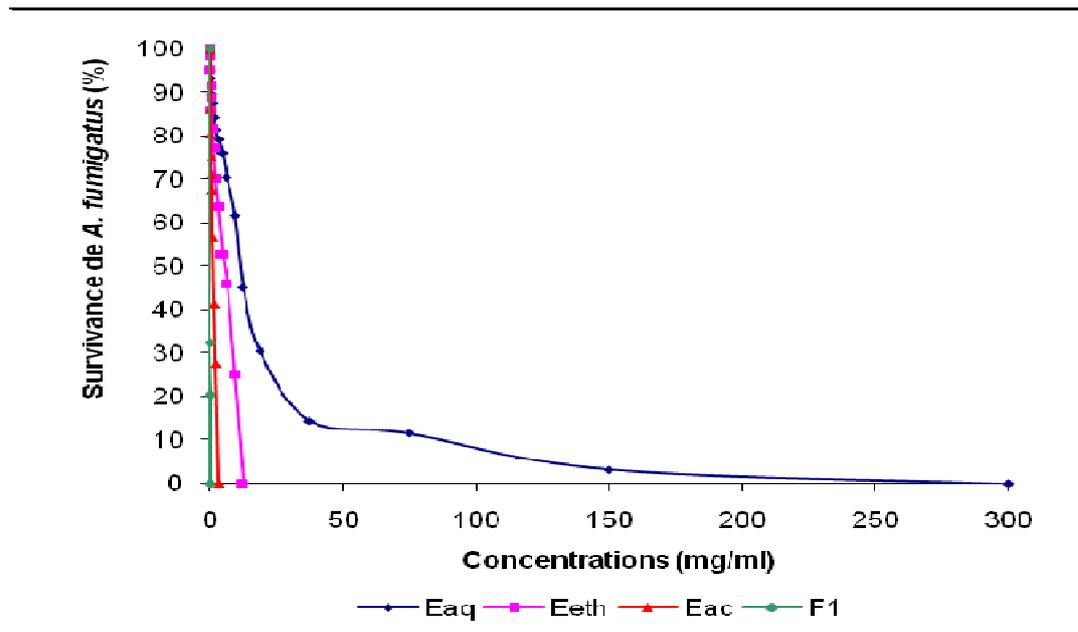


Figure 50 : Courbes de sensibilités comparées de l'Eaq, l'Eeth, l'Eac et la F1 pour *Aspergillus fumigatus*.

La figure 50 représente les résultats significatifs obtenus pour *A. fumigatus*. L'augmentation de la pente des courbes traduit l'augmentation de l'activité d'un extrait à l'autre. La courbe représentant l'antifongogramme de la F1 est pratiquement confondue à l'axe des ordonnées. Cela traduit le fait que la F1 a une très grande activité sur la croissance *in vitro* de *A. fumigatus*.

Tableau VII : Evolution des paramètres antifongiques de l'extrait total aqueux, de la fraction F1 à partir de l'extrait éthanolique 70% et l'extrait acétatique.

Extraits	<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	CMF (mg/mL)
Eaq	12,47 ± 0,75	300	14,3 ± 2,4	300	15,51 ± 1,03	300
Eeth	6,1 ± 2,1	12,5	6,3 ± 1,5	25	7,2 ± 1,7	25
Eac	1,25 ± 0,5	3,125	1,35 ± 0,8	3,125	1,4 ± 0,05	6,25
F1	0,04 ± 0,01	0,195	0,08 ± 0,02	0,78	0,151 ± 0,1	0,78

CI₅₀ : Concentration pour 50% d'Inhibition

CMF : Concentration Minimale Fongicide

Le tableau VII est le récapitulatif des résultats importants obtenus après notre étude. La F1 est la fraction la plus active sur la croissance *in vitro* des germes étudiés. *Aspergillus fumigatus* est le germe le plus sensible, suivi de *C. neoformans*, puis de *C. albicans*.

III-6 TRI PHYTOCHIMIQUES DES EXTRAITS

Les résultats du tri phytochimique des différents extraits aqueux (Eaq), éthanolique (Eeth), acétatique (Eac), la fraction 1 (F1) et de la fraction 2 (F2) sont présentés dans le tableau VIII et qui donne la composition chimique de nos extraits.

Dans le tableau le signe - indique que le groupe chimique recherché est absent dans l'extrait. Le signe + montre que le groupe recherché est présent dans l'extrait. Les signes ++ indiquent que le groupe chimique recherché est abondant dans notre extrait et +++ indique qu'il est très abondant. Nous avons recherché dans les différents extraits huit groupes chimiques qui sont les alcaloïdes, les polyphénols, les tanins catéchiques, les tanins galliques, les flavonoïdes, les saponosides, les quinones et les stérols.

Ce tableau montre que l'extrait total aqueux (Eaq) contient dans les proportions différentes tous les groupes chimiques recherchés. Cet extrait est très riche en saponosides et en flavonoïdes, riche en alcaloïdes, polyphénols et en tanins catéchiques et peu riche en tanins galliques, quinones et en stérols

L'extrait éthanolique 70% (Eeth) est très riche en alcaloïdes et en saponosides, riche en polyphénols et peu riche en tanins galliques et catéchiques, en flavonoïdes, en quinones et en stérols.

L'extrait acétatique (Eac) est très riche en alcaloïdes et riche en polyphénols, en flavonoïdes et en stérols. Il contient peu de saponosides.

La fraction 1 (F1) ne contient que deux éléments: les alcaloïdes et les stérols qui sont très abondants dans cette fraction.

Les résultats sont consignés dans le tableau VIII suivant :

Tableau VIII : Composition chimique des extraits Eaq, Eeth, Eac, et les fractions F1 et F2

	Extrait total aqueux (Eaq)	Extrait éthanolique 70% (Eeth)	Extrait acétatique (Eac)	Fraction 1 (F1)	Fraction 2 (F2)
Alcaloïdes	++	+++	+++	+++	-
Polyphénols	++	++	++	-	-
Tanins catéchiques	++	+	-	-	-
Tanins galliques	+	+	-	-	-
Flavonoïdes	+++	+	++	-	+
Saponosides	+++	+++	+	-	-
Quinones	+	+	-	-	-
Stérols	+	+	++	+++	++

- : Absence

+ : Présence

++ : Abondant

+++ : Très abondant

Le tableau VIII présente la composition chimique de nos extraits. Au fur et à mesure qu'on avance dans l'extraction, certains groupes chimiques disparaissent, pendant que d'autres se concentrent d'avantage.

III-7 CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM) DE LA FRACTION 1 (F1)

Après le tri phytochimique, nous avons voulu isoler les composés présents dans la fraction 1.

Après migration de la phase mobile, et après séchage, une seule tache bien distincte apparaît sur le chromatogramme. La révélation du chromatogramme a été faite avec le réactif de Dragendorff et à l'orthovaniline. Ces deux révélateurs se sont avérés positifs preuve de la confirmation de l'existence de stérols et d'alcaloïdes dans cette fraction.

IV

DISCUSSION ET CONCLUSION

1- DISCUSSION

- Notre travail avait pour objet d'identifier des substances antifongiques de *Morinda morindoides* contre deux types de champignons microscopiques : des champignons levuriformes (*Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*) et des champignons filamenteux (*Aspergillus fumigatus*). Cette étude nous a conduits à utiliser plusieurs techniques de chromatographie telles que la chromatographie liquide – liquide qui est essentiellement basée sur les partitions des différents solvants ; la chromatographie à basse pression fait intervenir des gels de silice et la chromatographie sur couche mince ou CCM. Cette étude a fait également intervenir différents solvants à savoir de l'eau distillée, un mélange éthanol/eau (70/30), un mélange acétate d'éthyle/eau (50/50) et un mélange dichlorométhane/méthanol (95/5). Ces solvants ont servi à la préparation des différents extraits que nous avons utilisés lors de nos travaux.

Pour l'extrait total aqueux (Eaq) qui utilise de l'eau distillée comme solvant, nos résultats montrent que comparativement au témoin de contrôle de croissance, il y a une diminution progressive et dose – réponse du nombre de colonies de ces trois germes dans les tubes tests au fur et à mesure que la concentration de notre extrait augmente. A la concentration de 300 mg/mL, nous observons qu'aucun germe ne pousse dans le tube contenant cette concentration (figure 12). Ainsi notre extrait est donc actif sur les germes étudiés et manifeste une activité antifongique nette en inhibant la croissance *in vitro* de ces germes. Les paramètres antifongiques déterminés à partir de différentes courbes de sensibilité donnent une CMF identique pour les trois germes (CMF = 300 mg/mL) et des CI₅₀ différentes. Pour *Candida albicans* la CI₅₀ est égale à 15,51 ± 1,03 mg/mL. Cette CI₅₀ est de 14,3 ± 2,4 mg/mL pour *C. neoformans* et de 12,47 ± 0,75 mg/mL pour *A. fumigatus*. La plus faible valeur la CI₅₀ est obtenue avec *A. fumigatus* et la plus forte valeur avec *Candida albicans*. Pour comparer la sensibilité de plusieurs germes qui présentent des CMF identiques et des CI₅₀ différentes vis-à-vis d'une substance, il convient de comparer leurs CI₅₀. Les CMF obtenues, l'*A. fumigatus* qui présente une CI₅₀ plus faible se présente comme la souche la plus sensible. Nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par SANOGO (2007) avec l'Eaq de *Abrus precatorius* pour chacun des mêmes germes fongiques. Selon cet auteur, *Abrus precatorius*, à 150 mg/mL, inhibe la croissance *in vitro* de *C. albicans*. Ce même extrait, à 75 mg/mL, inhibe la croissance *in vitro* de *C. neoformans* et *A. fumigatus*. Ces germes sont donc plus sensibles à l'Eaq de *Abrus precatorius* qu'à l'Eaq de *Morinda morindoides*.

- Dans le but d'améliorer l'activité antifongique de l'extrait total aqueux (Eaq), et abaisser ainsi la CMF, nous avons utilisé un mélange de solvant éthanol/eau dans les proportions 70/30 pour préparer un extrait. Nous l'avons appelé extrait total éthanolique 70% (Eeth). Les résultats de l'effet de l'Eeth sur la croissance *in vitro* de *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus* donnent une CMF identique égale à 25mg/mL pour les deux champignons levuriformes (*C. albicans* et *C. neoformans*) et 12,5 mg/mL pour *A. fumigatus*. Les valeurs de la CI_{50} sont respectivement égales à $7,2 \pm 1,7$ mg/mL avec *C. albicans* ; $6,3 \pm 1,5$ mg/mL avec *C. neoformans* et $6,1 \pm 2,1$ mg/mL avec *A. fumigatus*. Ainsi pour cet extrait, *A. fumigatus* qui a les plus faibles valeurs de paramètres antifongiques se présente comme la souche la plus sensible à l'Eeth et *C. albicans* qui a les valeurs les plus élevées, la souche la plus résistante. Nos résultats sont différents de ceux obtenus par ACKAH (2004), avec MISCA-F3 et SANOGO (2007), avec *Abrus precatorius* sur les mêmes germes. En effet, ACKAH (2004) a obtenu comme valeurs de la CMF pour *C. albicans* 50 mg/mL ; pour *C. neoformans*, 50 mg/mL et pour *A. fumigatus*, 18,75 mg/mL. Ces valeurs sont nettement supérieures à celles que nous avons obtenues avec l'Eeth. En effet pour *C. albicans*, nous avons obtenu 25 mg/mL ; pour *C. neoformans*, 25 mg/mL et 12,5 mg/mL pour *A. fumigatus*. Ces germes sont donc plus sensibles à l'Eeth de *Morinda morindoides* qu'à MISCA-F3. Par contre nos valeurs, sont très supérieures à ceux obtenus par SANOGO (2007) avec *Abrus precatorius*. Ces germes sont plus sensibles à cet extrait qu'à l'Eeth de *Morinda morindoides*.

- L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus pour les deux extraits (Eaq et Eeth) montre que pour toutes les souches étudiées, l'extrait éthanolique 70% (Eeth) présente des valeurs de paramètres antifongiques plus faibles que celles de l'Eaq. Par ailleurs le rapport des CMF donne :

- Pour *C. albicans* $CMF_{Eaq} / CMF_{Eeth} = 300/25 = 12$
- Pour *C. neoformans* $CMF_{Eaq} / CMF_{Eeth} = 300/25 = 12$
- Pour *A. fumigatus* $CMF_{Eaq} / CMF_{Eeth} = 300/12,5 = 24$

Ces résultats indiquent que l'Eeth est 12 fois plus actif que l'Eaq pour les souches de *C. albicans* et *C. neoformans* et 24 fois plus actif pour la souche de *A. fumigatus*. En d'autre terme, lorsque nous passons de l'Eaq à l'Eeth, nous améliorons l'activité antifongique de l'Eaq de 12 fois pour les souches de *C. albicans* et de *C. neoformans* ; de 24 fois pour les souches de *A. fumigatus*. L'extrait éthanolique de *Morinda morindoides* est donc l'extrait le plus actif sur la croissance *in vitro* des trois germes fongiques testés par rapport à l'Eaq. Cet extrait concentre mieux les principes actifs. Il a été retenu pour la suite des travaux.

En recoupant l'extrait éthanolique 70% (Eeth) dans un mélange de solvant composé de l'acétate d'éthyle et de l'eau distillée pris dans les proportions 50/50, nous avons préparé un extrait que nous avons dénommé extrait acétatique (Eac). Les résultats de l'effet de l'Eac sur la croissance *in vitro* de *C. albicans* ; *C. neoformans* et *A. fumigatus* montrent une nette inhibition par cet extrait de la croissance *in vitro* des germes suscités. Les plus fortes valeurs de paramètres antifongiques ont été obtenues avec *C. albicans* (CMF = 6,25 mg/mL ; CI₅₀ = 14 ± 0,05 mg/mL). Les plus faibles valeurs des paramètres antifongiques ont été obtenues avec *C. neoformans* (CMF = 3,125 mg/mL ; CI₅₀ = 1,25 ± 0,5 mg/mL). La comparaison des CMF permet de dire que *C. neoformans* et *A. fumigatus* qui ont les plus faibles valeurs de paramètres sont les souches les plus sensibles contrairement à la souche de *C. albicans* qui présente la valeur de CMF la plus élevée. C'est la souche la plus résistante. En comparant les CI₅₀ de *A. fumigatus* et de *C. neoformans*, on s'aperçoit que *A. fumigatus* à la plus faible valeur de la CI₅₀ suivie de *C. neoformans* puis de *C. albicans*. La souche *A. fumigatus* est la plus sensible à notre extrait et la souche *C. albicans* la plus résistante. Les rapports d'efficacité donnent :

- Pour *C. albicans* $CMF_{Eaq} / CMF_{Eac} = 300 / 6,25 = 48$
- Pour *C. neoformans* $CMF_{Eaq} / CMF_{Eac} = 300 / 3,125 = 96$
- Pour *A. fumigatus* $CMF_{Eaq} / CMF_{Eac} = 300 / 3,125 = 96$

L'extrait acétatique (Eac) accroît l'activité de l'Eaq de 48 fois pour *C. albicans* et de 96 fois pour *C. neoformans* et *A. fumigatus*. L'extrait acétatique est l'extrait le plus actif sur la croissance *in vitro* des trois germes fongiques testés par rapport à l'extrait total aqueux (Eaq). L'extrait acétatique (Eac) concentre mieux les principes actifs que l'Eaq.

Les résultats de la phase aqueuse de l'extrait acétatique H₂O (Eac H₂O) montrent que cet extrait n'a eu aucun effet sur la croissance *in vitro* des germes testés. Il n'a pas été retenu pour la suite des travaux.

A partir de l'extrait acétatique (Eac), nous avons fait un fractionnement chromatographique sur gel de silice et avons obtenu quatre fractions notées F1, F2, F3 et F4. chaque fraction a été testée sur la croissance *in vitro* des germes. Les résultats obtenus montrent que seules les fractions F1 et F2 présentent les meilleures efficacités sur la croissance *in vitro* des germes testés.

Pour la fraction F1 : les plus fortes valeurs des paramètres antifongiques ont été obtenues avec *C. albicans* (CMF = 0,78 mg/mL ; CI₅₀ = 0,151 ± 0,1 mg/mL) et *C. neoformans* (CMF = 0,78 mg/mL ; CI₅₀ = 0,08 ± 0,02 mg/mL). Les plus faibles valeurs de

paramètres antifongiques ont été obtenues avec *A. fumigatus* (CMF = 0,195 mg/mL ; CI₅₀ = 0,04 ± 0,01 mg/mL).

Pour la fraction F2 : les plus fortes valeurs de paramètres antifongiques ont été obtenues avec *C. albicans* (CMF = 3,125 mg/mL ; CI₅₀ = 0,45 ± 0,15 mg/mL). Les plus faibles valeurs de paramètres antifongiques ont été obtenues avec *C. neoformans* (CMF = 1,56 mg/mL ; CI₅₀ = 0,4 ± 0,1 mg/mL) et *A. fumigatus* (CMF = 1,56 mg/mL ; CI₅₀ = 0,38 ± 0,08 mg/mL).

- L'analyse de l'ensemble des résultats pour les deux fractions F1 et F2 montre que pour toutes les souches étudiées, la fraction F1 présente les valeurs de paramètres antifongiques plus faibles que celles de la fraction F2. Mais ces deux fractions F1 et F2 ont des valeurs de paramètres antifongiques plus faibles que celles obtenues avec tous les autres extraits (Eaq, Eeth, et Eac). Le rapport d'efficacité des CMF donne :

- Pour *C. albicans* : $CMF_{Eaq} / CMF_{F1} = 300/0,78 = 384$
 $CMF_{Eac} / CMF_{F1} = 6,25/0,78 = 8$
- Pour *C. neoformans* : $CMF_{Eaq} / CMF_{F1} = 300/0,78 = 384$
 $CMF_{Eac} / CMF_{F1} = 3,125/0,78 = 4$
- Pour *A. fumigatus* : $CMF_{Eaq} / CMF_{F1} = 300/0,195 = 1538$
 $CMF_{Eac} / CMF_{F1} = 3,125/0,195 = 16$

- Au vu de tous ces résultats, nous pouvons dire que la fraction F1 est 384 fois plus active que l'Eaq pour les souches *C. albicans* et *C. neoformans* ; 1538 fois plus active que l'Eaq pour la souche *A. fumigatus*. La fraction F1 de *Morinda morindoides* est donc la fraction la plus active sur la croissance *in vitro* des trois germes testés par rapport à l'extrait total aqueux (Eaq) de base. La fraction F1 est donc la meilleure de toutes les fractions et tous les extraits qui concentrent mieux les principes actifs.

- Afin de déterminer la composition chimique de nos extraits et fractions, nous avons réalisé un tri phytochimique.

L'Eaq est très riche en saponosides et en flavonoïdes, riche en alcaloïdes, polyphénols et tanins catéchiques ; moins riche en tanins galliques, quinones et en stérols.

- L'Eeth est très riche en alcaloïdes et en saponosides, riche en polyphénols et moins riche en tanins catéchiques et galliques, en flavonoïdes, quinones et stérols.
- L'Eac est très riche en alcaloïdes, riche en saponosides. Il ne contient pas les tanins et les quinones.
- La fraction F1 est très riche en alcaloïdes et en stérols mais ne contient pas les autres groupes chimiques.
- La F2 contient des flavonoïdes et est riche en stérols mais ne contient pas les autres groupes chimiques.

De manière générale, lorsque nous allons de l'extrait total aqueux à la fraction F1, nous remarquons d'une part la concentration de certaines entités chimiques au profit d'autres entités qui diminuent et finissent par disparaître. Ainsi par exemple, les alcaloïdes qui étaient abondants dans l'Eaq deviennent très abondants dans les extraits Eeth, Eac et la fraction F1. Il en est de même des stérols qui étaient moins abondants dans les extraits total aqueux et éthanolique, et qui deviennent abondants dans l'Eac et très abondants dans la fraction F1.

Les polyphénols abondants dans les extraits Eeth et Eac disparaissent dans la fraction F1. Il en est de même des saponosides qui étaient très abondants dans les extraits Eaq et Eeth moins abondants dans l'Eac et finissent par disparaître dans la fraction F1.

L'extrait total aqueux et l'Eeth contiennent les huit groupes chimiques recherchés, l'Eac en contient cinq et la fraction F1 n'en contient que deux. Par ailleurs les chromatogrammes donnent quatre entités chimiques pour l'Eac et une pour la fraction F1, alors que le tableau de la composition chimique nous donne cinq entités pour l'Eac et deux entités pour la fraction F1. Il est fort probable que les alcaloïdes de la F1 soient lipophiles de telle sorte qu'ils soient fortement imbriqués dans les molécules de stérols pour former une seule entité. C'est ce qui expliquerait aussi la présence de quatre entités observées avec l'Eac au lieu de cinq mis en évidence.

De plus lorsque nous allons de l'Eaq à la fraction F1, nous augmentons ou plus précisément nous accroissons les principes actifs qui pourraient être responsables de l'inhibition des trois germes tests à savoir *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus*. L'activité antifongique de la fraction F1 pourrait être due à la présence dans cette fraction d'alcaloïdes et de stérols, composés représentés en très faible quantité dans l'Eaq. Ce qui expliquerait la faible activité antifongique de cet extrait et la forte activité antifongique de la fraction F1 où ces éléments sont très concentrés. Nos résultats sont en accord avec ceux de KRA *et al.* (2004). Selon ces

auteurs, l'activité antifongique de MISCA-F3 sur *A. fumigatus* est due principalement aux stérols.

L'activité antifongique de notre fraction F1 pourrait être attribuée soit aux stérols, soit aux alcaloïdes ou soit aux deux à la fois. Les techniques et méthodes de séquençage que nous avons utilisées et qui ont permis d'avoir une meilleure fraction F1 dans laquelle les principes actifs contre les germes testés sont les mieux concentrés sont bonnes. Il convient toutefois de faire intervenir d'autres techniques pour séparer les stérols des alcaloïdes afin d'étudier séparément leurs effets sur nos germes.

2- CONCLUSION

Notre étude de l'identification de substances antifongiques de *Morinda morindoides* nous a permis de tirer les conclusions suivantes:

- Tous les extraits que nous avons préparés (Eaq, Eeth, Eac et F1) à partir des différentes techniques de chromatographie utilisées possèdent des propriétés antifongiques. Les souches de champignons étudiées (*C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus*) sont toutes sensibles aux extraits et fractions testés. Les sensibilités diffèrent selon les extraits considérés.

L'efficacité de chaque extrait varie selon le genre de champignon. Ainsi parmi les trois souches testés, les champignons levuriformes sont les plus résistants, singulièrement *C. albicans* est le plus difficile à inhiber, par contre *A. fumigatus* est la souche la plus sensible aux extraits.

- La fraction F1 est nettement plus active que tous les autres extraits (Eaq, Eeth et Eac). Elle améliore en effet de 384 fois l'activité antifongique de l'Eaq pour *C. albicans* et *C. neoformans* et de 1538 fois celle de l'Eaq pour *A. fumigatus*.

- La composition chimique n'est pas la même selon les extraits et fraction. L'Eaq et l'Eeth contiennent tous les groupes recherchés mais en proportion variable. L'Eac contient cinq groupes recherchés et la fraction F1 la plus active n'en contient que deux.

La forte activité antifongique dans la fraction F1 serait due aux alcaloïdes et aux stérols ou au deux à la fois. L'Eaq qui ne contient pas abondamment ces composés (alcaloïdes et stérols) manifeste une très faible activité antifongique. La F2 possède la meilleure activité après la F1 et elle est constituée de flavonoïdes et de stérols. Cette situation milite en faveur des stérols mais il faut rester prudent.

Nos résultats justifient l'utilisation traditionnelle de *Morinda morindoides* comme antifongique.

Cependant, ces travaux doivent se poursuivre afin d'isoler séparément les phytomolécules de la F1 responsables de l'activité et de vérifier leurs activités microbiologiques.

V

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

ACKAH A. B. J. (2004).

Spectre anti- infectieux de MISCA- F3 sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus*. Mémoire de DEA. Biotechnologies et sciences des aliments option Pharmacologie des Substances Naturelles. Université de Cocody, UFR Biosciences, Abidjan, Côte d'Ivoire. 35 p.

ADJANOHOUN E. J. & AKE ASSI L. (1979).

Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire. Abidjan, Centre National de Floristique de l'Université Nationale de Côte d'Ivoire. Tome 1, pp 23-30.

ADOU-BRYN K. D., OUHON J., ASSOUMOU A., KASSI E. A., KONE M. & THERIZOL-FERLY M. (1999).

Champignons et parasites isolés à l'examen de 142 liquides d'aspiration bronchique à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Rev Méd Afr*, 46: 362-376.

AL-FOUZAN A.S., NANDA A. & KUBEC K. (1993).

Dermatophytosis of children in Kuwait: a prospective survey. *Int J Dermatol* 32 : 798-801.

AMORIC J.C., FRAITAG S., BODEMER C., CAPOEN S., BADILLET G. & DE PROST Y. (1995).

Folliculites cicatricielles à *Malassezia furfur* chez l'enfant. *Ann Dermatol Venereol*, 122: 137-121.

ARACTINGI S., CARDRANEL S., REYGAGNE P. & WALLACH P. (1991). Pustulose néonatale induite par *Malassezia furfur*. *Ann Dermatol Vénérolog*, 118: 856-858.

ASSAF R.R. & ELEWSKI B.E. (1996).

Intermittent fluconazole dosing in patients with onychomycosis: results of a pilot study. *J Am Acad Dermatol*, 35: 216-219.

ASTE N., PAU M., PINNA A.L., COLOMBO M.D. & BIGGIO P. (1991). Clinical efficacy and tolerability of terbinafine in patients with pityriasis versicolor. *Mycoses* 34 : 353-357.

BACK D.J. (1990).

Azoles and allylamines: the clinical implication of interaction with cytochrome P450 enzymes. *J Dermatol Treat*, 1 (suppl 2): 11-13.

BACK D. (1992).

Loss of taste and terbinafine. *Lancet*, 340 : 252-260.

BADILLET G. (1991).

Dermatophyties et dermatophytes. Atlas clinique et biologique. Varia, 3è éd. 303 p.

BADILLET G., DE BIEVRE C. & GUEHO E. (1987).

Champignons contaminants des cultures. Champignons opportunistes. Atlas clinique et biologique. Varia. (vol. I) 132 p., (vol. II) 216 p.

BAHI C., DJAMAN A. J., NGUESSAN J. D., TREBISSOU J.N.D. & GUEDE GUINA F. (2003).

Effet de la fraction chromatographique d'un extrait aqueux de *Morinda morindoides* (Bak.) Milne-Redl (Rubiaceae) et *Mareya micranta* (Benth.) Müll. Arg (Euphorbiaceae) sur l'activité de l'acétylcholinestérase de lapin. *J sc pharm biol*, 4: 36-43.

BAHI C., NGUESSAN J. D. & GUEDE GUINA F. (2000).

Mise en évidence d'une action myorelaxante et cholinolytique de BGG, un antidiarrhéique de source naturelle. *Afr biomed*, 5 : 11-18.

BAHI C. (1993).

Evaluation de l'action antidiarrhéique de BGG, un concentré de source végétale. Mémoire de DEA. Pharmacologie des substances naturelles. Université de Cocody, U.F.R. Biosciences. Abidjan, Côte d'Ivoire. 30 p.

BAUDRAZ-ROSSELET F., RAKOSI T., WILI P.B. & KENZELMANN R. (1992).

Treatment of onychomycosis with terbinafine. *Br J Dermatol*, 126 (Suppl 39): 40-46.

BESSON Ph. G. (1995).

Je me sens mal, mais je ne sais pas pourquoi. Ed. Trois Fontaines, Paris. France 155 p.

BERROUANE Y. F., HERWALDT L. A. & PFALLER M. A. (1999).

Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. *J Clin Microbiol*, 37: 531-537.

BEUTLER M., HARTMANN K., KUHN M. & GARTMANN R. (1993).

Taste disorders and terbinafine. *Br Med J*, 26: 307-311.

BIRNBAUM J.E. (1990).

Pharmacology of the allylamines. *J Am Acad Dermatol*, 23: 782-785.

BODEY G.P., ANAISSIE E., GUTTERMAN J. & VADHAN-RAJ S. (1993).

Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant therapy for fungal infection in patients with cancer. *Clin Infect Dis*, 17: 705-707.

BOIRON P. (1996).

Organisation et biologie des champignons. Nathan, Paris. France, vol 7, 128 p.

BONGA G. M., VANGAH-MANDA M., DE SOUZA C. & GUEDE GUINA F. (1995).

Mise en évidence des phytostéroïdes antifongiques contre *Cryptococcus neoformans*. *Rev Méd Pharm Afr*, 9 : 21-30.

BOUCHET P., GUIGNARD H. & VILLARD J. (1999).

Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. Masson, Paris. France, vol 5, 194 p.

BOUCHET P., REGIS P., CRUGNARD J. L. & MADULO-LEBLOND G. (1989).

Mycologie générale et médicale. Masson, Paris. France, vol 3, 215 p.

BOUQUET A. (1972).

Plantes médicinales du Congo- Brazzaville. Travaux et document de l'ORSTOM 13, Paris. France, 112 p.

BOWMAN W. C. & RAND M. J. (1980).

Textbook of Pharmacology. Blackwell Scientific Publication, Second Edition. Vol 5, 1928 p.

BROBERG A. (1995).

Pityrosporum ovale in healthy children, infantile seborrhoeic dermatitis and atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl*, 191: 1- 47.

CAPESIUS-DUPIN C., BENAILY N., HENNEQUIN C. & DE PROST Y. (1995).

Dermatomycoses en pédiatrie. *J Myc Med*, 5 (Suppl.1) : 40-45.

CARRILLO-MUNOZ A.J., TORRES-RODRIGUEZ J.M., MADRENYS-BRUNET N. & GALLACH-BAU C. (1994).

Microdilution susceptibility for *Candida*, Dermatophytes and moulds using flutrimazole and clotrimazole. *J Myc Med*, 4: 34-36.

CARSTENS J., WENDELBOE P., SOGAARD H. & THESTRUP-PEDERSEN K. (1994).

Toxic epidermal necrolysis and erythema multiforme following therapy with terbinafine. *Acta Derm Venereol*, 74: 391-392.

CESCHIN-ROQUES C.G., HANEL H., PRUJA-BOUGARET S.M., LAGARDE I., VANDERMANDER J. & MICHEL G. (1991).

Ciclopiroxolamine cream 1 %: *in vitro* and *in vivo* penetration into the stratum corneum. *Skin Pharmacol*, 4 : 95-99.

CHABASSE D. (1994).

Les nouveaux champignons opportunistes apparus en médecine. Révue générale. *J Mycol Méd*, 4: 9-28.

CHABASSE D. GUIGUON C. & CONTET-AUDONNEAU. (1999).

Mycologie médicale. Masson, Paris. France, vol 3, 324 p.

CHANDRASEKAR, P. H., CUTRIGHT J. L. & MANAVATHU E. K. (2001). *Aspergillus*: rising frequency of clinical isolation and continued susceptibility to antifungal agents, 1994–1999. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 41: 211-214.

CHEN K. Y., S. C. KO, HSUEH P. R., LUH K. T. & YANG P. C. (2001).

Pulmonary fungal infection: emphasis on microbiological spectra, patient outcome, and prognostic factors. *Chest*, 120: 177-184.

CHEN Y. C., CHANG S. C., LUH K. T. & HSIEH W. C. (2003).

Stable susceptibility of *Candida* blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years. *J Antimicrob Chemother*, 52: 71-77.

CHIRITESCU M.M., CHIRITESCU M.E. & SCHER R.K. (1996).

Newer systemic antifungal drugs for the treatment of onychomycosis. *Clin Pediatr Med Surg*, 13: 741-758.

CHONG-REN Y., YING Z., MELISSA R. J., SHABANA I.K., YING-JUN Z., & XING-CONG L. (2006).

Antifungal Activity of C-27 Steroidal Saponins. *Ant Ag Chem*, 50: 1710-1714.

CIMANGA R.K., KAMBOU K., TONA L., HERMANS N., APERS S., TOTTE J., PIETERS L. & VLIETINCK A.J. (2006).

Cytotoxicity and *in vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents. *J Ethnopharmacol*, 107: 83-90.

CIMANGA K., HERMANS N., APERS S., VAN MIERT S., VAN DEN HEUVEL H., CLAEYS, M., PIETERS L., VLIETINCK A.J., (2003).

Complement-inhibiting iridoids from *Morinda morindoides*. *J Nat Prod*, 66: 97-102.

CIMANGA K., DE BRUYNE T., LASURE A., LI Q., PIETERS L., CLAEYS, M., VANDEN BERGHE D., KAMBU K., TONA L. & VLIETINCK A.J., (1995).

Flavonoid *O*-glycosides from the leaves of *Morinda morindoides*. *Phytochemistry*, 38: 1301-1303.

CIMANGA K., (1997a).

The biologically active constituents from two African medicinal plants. *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schlechter (Periplocaee) and *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redhead (Rubiaceae). PhD Thesis, University of Antwerp (UIA), Antwerp, Belgium. 210 p.

CIMANGA K., DE BRUYNE T., VAN POEL B., MA Y., CLAEYS M., PIETERS L., BAKANA P., KAMBU K., TONA L., VANDEN BERGHE D., VLIETINCK A.J., (1997b).

Complement-modulating properties of a kaempferol 7-Orhamnosyl- sophoroside from the leaves of *Morinda morindoides*. *Planta Medica*, 63: 220-223.

CIMON B., CARRIERE J., CHAZALETTE J. P., GINIES J. L., SIX P., VINATIER J. F., CHABASSE D. & BOUCHARA J. P. (1995).

Fungal colonization and immune response to fungi in cystic fibrosis. *J Mycol Méd*, 5: 211-216.

CRIBIER B. & GROSSHANS E. (1994).

Efficacité et tolérance de la terbinafine (Lamisil®) dans une série de 50 onychomycoses à dermatophytes. *Ann Dermatol Venereol*, 121: 15-20.

DEGREEF H.J. (1993).

Nouveaux antifongiques dans le traitement des mycoses cutanées superficielles. *Ann Dermatol Venereol*, 120: 21-31.

DEGREEF H.J. & DE DONCKER P.R.G. (1994).

Current therapy of dermatophytosis. *J Am Acad Dermatol*, 31: 25-30.

DEKKER P.J. (1993).

Loss of taste during administration of terbinafine. *Netherlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 137: 616-617.

DEL PALACIO HERNANDEZ A., LOPEZ GOMEZ S., GONZALEZ LASTRA F., MORENO PALANCAR P. & IGLESIAS DIEZ L. (1990).

A comparative double-blind study of terbinafine (Lamisil®) and griseofulvin in tinea corporis and tinea cruris. *Clin Exp Dermatol*, 15: 210-216.

DEL ROSSO J.Q. (1996).

Treatment of onychomycosis and tinea pedis with intermittent itraconazole therapy. *J Am Osteop Assoc* 96: 607-609.

DE SOUZA C., KOUMAGLO K. & GBEASSOR M. (1995).

Evaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits totaux de quelques plantes médicinales. *Rev Méd Pharm Afr*, 10: 103-112.

DROMER F. & DUPONT B. (1996).

The increasing problem of fungal infections in the immunocompromised host. *J Mycol Méd*, 6: 1-6.

DUPONT B. F., DROMER F. & IMPROVISI L. (1996).

The problem of azole resistance in *Candida*. *J Mycol Méd*, 6 (Supplément II): 12-19.

EHOLIE S.P. (1993).

Etude des infections opportunistes au cours du SIDA. A propos de 262 cas de *aligés* dans le service des maladies infectieuses et tropicale. Thèse, dipl, d'Etat, Med., Université de Cocody, UFR Sciences médicales, Abidjan, Côte d'Ivoire, n°1517, 81p.

ELEWSKI B.E. (1994).

Tinea capitis: itraconazole in Trichophyton tonsurans infection. *J Am Acad Dermatol*, 31: 65-67.

ELEWSKI B.E. (1996).

Cutaneous mycoses in children. *Br J Dermatol*, 134: 7-11.

ELEWSKI B.E. & HAY R.J. (1996).

International summit on cutaneous antifungal therapy, focus on tinea capitis, Boston, Massachusetts, November 11-13, 1994. *Pediatr Dermatol*, 13: 69-77.

FAERGEMANN J. (1994).

Pytirosporom infections. *J Am Acad Dermatol*, 31: 18-20

FAERGEMANN J., ZEHENDER H., JONES T. & MAIBACH I. (1991).

Terbinafine levels in serum, stratum corneum, dermis-epidermis (without stratum corneum), hair, sebum and eccrine sweat. *Acta Derm Venereol*, 71: 322-326.

FASSOUANE A., RACHIDI M., ROUFFAUD M.A., EL-ABBOUYI A. & NGUYEN V.H. (1995).

In vitro antifungal activity of *Bacillus licheformis* FSJ-2 products against dermatophytes. *J Myc Med*, 5: 244-248.

FEUILHADE DE CHAUVIN M. (1995).

Interest of the combination of 5 % amorolfine laqueur and terbinafine tablet in the treatment of foot dermatophytes onychomycosis with involved matrix. Oral communication, ECMM, Brussels, Belgium. October 14, 12p.

FINLAY A.Y. (1992).

Pharmacokinetics of terbinafine in the nail. *Br J Dermatol*, 126 (suppl 39) : 28-32

GARRIGUES J.C., PEREZ E., LINAS M.D., RICO-LATTES, SEGUELE J.P. & LATTES A. (1996).

Tests *in vitro* et études quantitatives de relation structures-activité (QSAR) pour la détermination des propriétés antiaspergillaires d'une série d'analogues de glycolipides. *J Mycol Méd*, 6:111-117.

GATTI S., ARATHOON E. & STEVENS D.A. (1991).

Initial experience in therapy for progressive mycoses with fluconazole. *Lancet*, 338: 1152-1156.

GAZAGNE L., LINAS M.D., MASSIP P., MENOUE J.M. & SEGUELA J.P. (1995). *Aspergillus* et lavage broncho-alvéolaire chez les sujets séropositifs pour le virus de l'immunodéficience humaine. Association avec les autres microorganismes corrélations avec la cytologie et les marqueurs lymphocytaires sanguins. *J Mycol Méd*, 5: 225-229.

GOODFIELD M.J., ANDREW L. & EVANS E.G. (1992).

Short term treatment of dermatophyte onychomycosis with terbinafine. *Br Med J*, 304 : 1151-1154.

GRILLOT R. (1996).

Les mycoses humaines : démarche diagnostique. Elsevier, Paris. France, vol 3, 392 p.

GUEDE-GUINA F., WASHINGTON B., TSAI C.S., VANGAH-MANDA M., SMITH M.D. & OCHILLO R.F. (1991), Isolation of G₂₄₃, a cholinergic agent from *Mareya micrantha*. 12th annual SEPS Meeting,. 8-9 November 1991. New-Orleans. Abstract 9. 14p.

GUEDE-GUINA F., VANGAH-MANDA M., HAROUNA D. & BAHY C. (1993), Potencies of MISCA, a plant source concentrate against fungi. *J Ethno pharmacol*, 14: 45-53.

GUEDE-GUINA F., KRA A.M., BONGA G.M. & DE SOUZA C. (1995).

Activité antimicrobienne d'un extrait végétal contre les germes opportunistes au cours du SIDA. *Rev Méd Pharm Afr*, 9: 13-19.

HAROON T.S., HUSSAIN I., MAHMOOD A., NAGI A.H., AHMAD I. & ZAHID M. (1992).

An open clinical pilot study of the efficacy and safety of oral terbinafine in dry non-inflammatory tinea capitis. *Br J Dermatol*, 126 (Suppl 39): 47-50.

HAY R.J., CLAYTON Y.M., MOORE M.K. & MIDGELY G. (1988).

An evaluation of itraconazole in the management of onychomycosis. *Br J Dermatol*, 119: 359-366.

HENNEQUIN C., BODEMER C., TEILLAC D. & DE PROST Y. (1996). Onychomycosis in children. *J Myc Med*, 6 : 186-189.

HOLDCROFT C. (1994).

Terbinafine a new topical treatment for tinea infections. *Nurse Practitioner* 19: 29-30.

HSUEH P. R., TENG L. J., YANG P. C., HO S. W. & LUH K. T. (2002).

Emergence of nosocomial candidemia at a teaching hospital in Taiwan from 1981 to 2000: increased susceptibility of *Candida* species to fluconazole. *Microb Drug Resist*, 8: 311-319.

HRE-LUNDGREN C., FRISEIL J. & BERGMAN U. (1995).

A patient treated with terbinafine. Intrahepatic biliary stasis is a severe adverse effect. *Lakartidningen*, 92: 1112-1113.

JENSEN J.C. (1990).

Pharmacokinetics of Lamisil in humans. *J Dermatol Treat*, 1 (suppl 2): 15-18.

JOLY V., SAINT-JULIEN L., CARBON C. & YENI P. (1994).

In vivo activity of interferon-gamma in combination with amphotericin B in the treatment of experimental cryptococcosis. *J Infect Dis*, 170: 1331-1334.

JONES T.C. (1995).

Overview of the use of terbinafine (Lamisil®) in children. *Br J Dermatol*, 132: 683-689.

KAMBU K. (1990).

Eléments de Phytothérapie Comparée. Plantes Médicinales Africaines, *Bull Méd Trad Pharm*, 3 : 15-24.

KAO A. S., BRANDT M. E., PRUITT W. R., CONN L. A., PERKINS B. A., STEPHENS D. S., BAUGHMAN W. S., REINGOLD A. L., ROTHROCK G. A., PFALLER M. A., PINNER R. W. & HAJJEH R. A. (1999).

The epidemiology of candidemia in two U.S. cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis*, 29: 1164-1170.

KAUFFMAN C.A. & CARVER P.

(1997). Antifungal agents in the 1990s. Current status and future developments. *Drugs*, 53 : 539-549.

KOENIG H. (1995).

Guide de mycologie médicale. Ellipses Marketing, Paris. France, 284 p.

KOFFI A. E. (2003).

Activité antibactérienne de *bitter* GG (BGG), une substance antidiarrhéique de source naturelle sur le vibron du choléra (extrait totaux aqueux, alcoolique, résiduel et la fraction F5). Mémoire de DEA. Biotechnologies et sciences des aliments option Pharmacologie des Substances Naturelles. Université de Cocody, UFR Biosciences, Abidjan, Côte d'Ivoire. 49 p.

KOUAME B. F. (2006).

Activité antibactérienne de BGG, une substance antidiarrhéique de source naturelle sur *Samonella O.M.A.* (Extrait total aqueux et éthanolique 70%). Mémoire de DEA. Biotechnologies et sciences des aliments option Pharmacologie des Substances Naturelles. Université de Cocody, UFR Biosciences, Abidjan, Côte d'Ivoire. 47 p.

KOVACS M.J., ALSHAMMARI S., GUENTHER L. & BOURCIER M. (1994).

Neutropenia and pancytopenia associated with oral terbinafine. *J Am Acad Dermatol*, 31: 806-815.

KRA A.K..M., ZIRIHI GUEDE N. & GUEGE-GUINA F. (2004).

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.

KRA A.K..M., ZIRIHI GUEDE N. & GUEGE-GUINA F. (2004).

Evaluation et amélioration par fractionnements chromatographiques d'une action antifongique de MISCA contre *Aspergillus fumigatus*. *Afr biomed*, 7: 17-21.

KRA A.K..M. (2001).

Evaluation et amélioration par séquençage chromatographique d'une action antifongique de MISCA contre *Aspergillus fumigatus*. Thèse de doctorat de 3^{ème} cycle. Biochimie, Microbiologie. Université de Cocody, U.F.R. Biosciences. Abidjan, Côte d'Ivoire. 124 p.

KWON-CHUNG K.J. & BENNETT J.E. (1992).

Medical mycology. Lea & Febiger, London, Great Bretagne, 866 p.

LARONE D.H. (1995).

Medically important fungi. A guide to identification. ASM Press, 3rd ed., 274 p.

LASSUS A., NOLTING K.S. & SAVOPOULOS C. (1988).

Comparison of ciclopirox olamine 1% cream with ciclopirox 1%-hydrocortisone acetate 1% cream in the treatment of inflamed superficial mycoses. *Clin Ther*, 10: 594-599.

LEBEAU P. & JANOT M. (1956).

Traité de pharmacie chimique. Masson, Paris. France, vol 5, 838p. Tome 2, 3, 4 et 5.

LORTHOLARY O. (2004).

Épidémiologie et émergence de souches résistantes: Quel profil pour un antifongique idéal ?
J Mycol Méd, 14: 221-225.

LOWE G., GREEN C. & JENNINGS P. (1993).

Hepatitis associated with terbinafine treatment. *Br Med J*, 306: 248-263.

MAC GREGOR J.M. & RUSTIN M.H. (1994).

Terbinafine and erythema multiforme. *Br J Dermatol*, 131: 587-588.

MARTY J.P.L. (1995).

Amorolfine nail laquer : a novel formulation. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 4 (suppl 1):17-21.

M'BOH G.M. (2006).

Effet des protéines totales de BGG sur la pression artérielle de lapin et le Coeur isolé de rat.
Mémoire de DEA. Biotechnologies et sciences des aliments option Pharmacologie des Substances Naturelles. Université de Cocody, UFR Biosciences, Abidjan, Côte d'Ivoire. 30 p.

MOR A., NGUYEN V.H. & NICOLAS P. (1991).

Antifungal activity of dermaseptin, a novel vertebrate skin peptide. *J Myc Med*, 1: 216-220.

NEJJAM F., ZAGULA M., CABIAC M.D., GUESSOUS N., HUMBERT H. & LAKHDAR H. (1995).

Pilot study of terbinafine in children suffering from tinea capitis: evaluation of efficacy, safety and pharmacokinetics. *Br J Dermatol*, 132: 98-105.

NENOFF P. & HAUSTEIN U.F. (1994).

Effect of anti-seborrhea substances against *Pityrosporum ovale* in vitro. *Hautarzt*, 45: 464-467.

NGUESSAN J.D., TREBISSOU J.N.D., BAHİ C., ZIRIHI G.N. & GUEDE GUINA F. (2004).

Effets de BGG, F5 (fraction chromatographique de *Morinda morindoides*) sur la pression artérielle carotidienne de lapin. *Rev Méd Pharm Afr*, 18 : 1-10.

NGUESSAN J.D., TREBISSOU J.N.D., BAHİ C. & GUEDE GUINA F. (2002).

Effets de BGG, F5 (fraction chromatographique de *Morinda morindoides*) sur l'activité contractile du cœur isolé de rat. *Rev Iv Sci Tech*, 3: 127-139.

PADILLA-DESGARENNE M.C., GODOY M.R. & BEIRANA-PALENCIA A. (1996).

Therapeutic efficacy of terbinafine in the treatment of three children with tinea tonsurans. *J Am Acad Dermatol*, 35 : 114-116.

ROBERTS D.T. (1994).

La terbinafine dans les mycoses cutanées et unguéales. L'expérience du Royaume-Uni. *J Myc Med*, 5 (suppl 1) :17-20.

RYDER N.S. (1992).

Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. *Br J Dermatol*, 126 (Suppl 39): 2-7.

RZANY B., MOCKENHAUPT M., GEHRING W. & SCHOPF E. (1994).

Stevens-Johnson syndrome after terbinafine therapy. *J Am Acad Dermatol*, 30: 509-531.

SAMSOEN M. (1992).

Lamisil[®] (terbinafine). La première allylamine fongistatique et fongicide per os. *Nouv Dermatol*, 11 : 743-762.

SANOGO M. (2007).

Evaluation de l'activité antifongique de *Abrus precatorius* sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* et *Trichophyton mentagrophytes*. Mémoire de DEA. Biotechnologies et sciences des aliments option Pharmacologie des Substances Naturelles. Université de Cocody, UFR Biosciences, Abidjan, Côte d'Ivoire. 34 p.

SAVIN R. (1996).

Diagnosis and treatment of tinea versicolor. *J Fam Prac*, 43:127-132.

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.

SAYAG J., BADILLET G. & ZAGULA M. (1996).

Lamisil crème[®] (terbinafine). Efficacité et tolérance. Etude multicentrique dans les mycoses cutanées. *Nouv Dermatol*, 25: 101-105.

SERI S. C. (2006)

Contribution à l'étude chimique et structural des feuilles de *Morinda morindoides* (*Rubiaceae*). Mémoire de DEA. Sciences physique des Structures. Option Chimie organique. Université de Cocody, UFR SSMT, Abidjan, Côte d'Ivoire. 48 p.

SMITH M.L. (1996).

Tinea capitis. *Pediatr Ann*, 25: 101-105.

TEVENS D.A. (1997).

Oral Amphotericin B as antifungal agent. *J Mycol Méd*, 7: 241-242.

STRICKER B.H., DE LONG P.A., SCHREUDER F., BIJLMER-IEST J.C., HERMANN W.A. & VAN ULSEN J. (1992).

Loss of taste sensation in terbinafine administration. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 136: 2438-2440.

SUAREZ S. (1997).

New antifungal therapy for children. *Adv Dermatol*, 12: 195-208.

TAUSCH I., BRAUTIGAM M., WEIDINGER G. & JONES T.C. (1997).

Evaluation of 6 weeks treatment of terbinafine in tinea unguium in a double-blind trial comparing 6 and 12 weeks therapy. The Lagos V Study Group. *Br J Dermatol*, 136: 737-742.

TONA L., CIMANGA R.K., MESIA K., MUSUAMBA C.T., DE BRUYNE T., APERS S., HERMANS N., VAN MIERT S., PIETERS L., TOTTE J. & VLIETINCK A.J. (2004).

In vitro antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol*, 93: 27-32.

TONA L., MESIA K., NGIMBI N. P., CHRIMWAMI B., CIMANGA K., BRUYNE T., APERS S., HERMAN N., TOTTE J., PIETERS L. & VLIETINCK A.J. (2001).

In vivo antimalarial activity of *Cassia occidentalis*, *Morinda morindoides* and *Phyllanthus niruri*. *Ann Trop Med Parasitol*, 95: 47-49.

TONA L., NGIMBI N.P., TSAKALA M., MESIA K., CIMANGA R.K., APERS S., DE BRUYNE T., TOTTE J., PIETERS L. & VLIETINCK A.J. (1999).

Antimalarial activity of 20 crude extracts from nine African medicinal plants used in Kinshasa, Congo. *J Ethnopharmacol*, 68: 193-203.

TONA L., KAMBOU K., NGIMBI N.P., CIMANGA R.K. & VLIETINCK A.J. (1998).

Antimoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants.

J Ethnopharmacol, 61: 57-65.

TOSTI A., PIRACCINI B.M., STINCHI C., VENTURO N., BARDAZZI F. & COLOMBO M.D. (1996).

Treatment of dermatophyte nail infections: an open randomized study comparing intermittent terbinafine therapy with continuous terbinafine treatment and intermittent itraconazole therapy. *J Am Acad Dermatol*, 34: 595-600.

TOURE A. (2006).

Saponification de l'huile de BGG et formulation d'un savon antimicrobien. Mémoire de DEA. Biotechnologies et sciences des aliments option Pharmacologie des Substances Naturelles. Université de Cocody, UFR Biosciences, Abidjan, Côte d'Ivoire. 30p.

VANDEN BOSSCHE H. (1990).

Saperconazole: a selective inhibitor of the cytochrome P-450- dependent ergosterol synthesis in *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Mycoses*, 33: 335-352.

VAN CUTSEM J., VAN GERVEN F. & JANSEN P.A.J. (1989).

Saperconazole, a new potent antifungal triazole: in vitro activity spectrum and therapeutic efficacy. *Drugs Future*, 14: 1187-1209.

VAN 'T WOUT J.W., HERRMANN W.A., DE VRIES R.A. & STRICKER B.H. (1994).

Terbinafine-associated hepatic injury. *J Hepatol*, 21: 115-117.

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.

VIDIMOS A.T., CASIMA C. & TOMECKI K.J. (1991).

Tinea capitis in three adults. *Int J Dermatol*, 30 : 206-208.

VIGUIE-VALLANET C., SAVAGLIO N., PIAT C. & TOURTE-SCHAEFER C. (1997).

Epidémiologie des teignes à *Microsporum langeronii* en région parisienne. Résultat de deux enquêtes scolaires et familiales. *Ann Dermatol Venereol*, 124 : 696-699.

WENIG J.A. (1995).

The systemic treatment of onychomycosis. *Clin Podiatr Med Surg*, 12: 263-274.

YAYE Y. G. (2006).

Evaluation et comparaison des activités antifongiques de MISCA-F3 et MISCA-F4 sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* et *Trichophyton mentagrophytes*. Mémoire de DEA. Biotechnologies et sciences des aliments option Pharmacologie des Substances Naturelles. Université de Cocody, UFR Biosciences, Abidjan, Côte d'Ivoire. 30p.

ZAIÑAS N., GLICK B. & REBELL G. (1996).

Diagnosis and treating onychomycosis. *J Fam Pract*, 42: 513-518.

ZAUG M. (1995).

Amorolfine nail laquer : clinical experience in onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 4 (Suppl. 1): 23-30.

ZIRIHI G.N., KRA A.K.M., ETIEN DIBIE 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 Méd Pharm Afr*, 20 : 9-18.

ZIRIHI G. N., MAMBOU L., GUEDE-GUINA F., BODO B., GRELLIER P., (2005).

In vitro antplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West African plants used for the treatment of malaria. *J Ethno*, 98: 281-285.

ZIRIHI G. N., KRA A. K. M. & 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*. *Rev Méd Pharm Afr*, 17: 11-18.

ZIRIHI G. N. (1991).

Contribution au recensement à l'identification et à la connaissance de quelques espèces végétales utilisées en médecine traditionnelles chez les bété du département d'Issia, Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat de 3^{ème} cycle. Botanique. Université de Cocody, U.F.R. Biosciences. Abidjan, Côte d'Ivoire. 253 p

V

ANNEXES



Photographie 1 : Aspect des cultures de *C. neoformans* après 48 heures d'incubation à 30°C

TS : Témoin Sabouraud ; T : Témoin de croissance

Les concentrations varient de 0,195 à 12,5 mg/ml.



Photographie 2 : Aspect des cultures de *A. fumigatus* après 48 heures d'incubation à 30°C

TS : Témoin Sabouraud ; **T :** Témoin de croissance

Les concentrations varient de 0,04875 à 3,125 mg/ml.



Photographie 3 : Aspect des cultures de *C. albicans* après 48 heures d'incubation à 30°C

TS : Témoin Sabouraud ; **T :** Témoin de croissance

Les concentrations varient de 0,195 à 12,5 mg/ml.