

Potentialités bioactives et activité antidermatophytique superficielle d'extraits de *Combretum racemosum* P. Beauv. (Combretaceae)

Richard Kamou KAMOU^{1,2*}, Zinzendorf Yessé NANGA², Gouéh GNAHOUÉ³,
Philippe Sansan KAMBOU⁴, Calixte BAH¹ et Adama COULIBALY¹

¹ Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody, UFR Biosciences, Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

² Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Laboratoire de Bactériologie-virologie, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

³ Ecole Normale Supérieure de Cocody, 08 BP 10 Abidjan 08, Côte d'Ivoire

⁴ Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody, UFR des Sciences Médicales, Laboratoire de Biochimie Médicale, 01 BP 240 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

* Correspondance, courriel : richardkamou@yahoo.fr

Résumé

Ce travail porte sur la mise au point d'un nouveau médicament traditionnellement amélioré à base de *C. racemosum*, accessible aux populations de toutes les couches sociales et capable d'éradiquer les dermatophytoses de la peau, des muqueuses et des annexes cutanées. Pour ce faire, nous avons évalué des composés bioactifs et l'activité antidermatophytique de cinq (5) extraits bruts (aqueux et hydro-organiques 70 %) issus de *C. racemosum* P. Beauv. (Combretaceae) sur deux (2) espèces de *Trichophyton*, souches dermatophytiques communément rencontrées dans les dermatophytoses des humains. Toutes les souches testées se sont révélées sensibles aux cinq extraits étudiés. Cela justifie en partie l'usage de *C. racemosum* P. Beauv. en pratique médicale traditionnelle contre les maladies superficielles microbiennes. Pour ces extraits, les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) enregistrées varient entre $31,25 \pm 0,00$ mg / mL et $125 \pm 0,00$ mg / mL pour *T. rubrum* puis entre $15,625 \pm 0,00$ mg / mL et $62,25 \pm 0,00$ mg / mL pour *T. mentagrophytes* ; tandis que les Concentrations Minimales Fongistatiques (CFS) varient entre $31,25 \pm 0,00$ mg / mL et $125 \pm 0,00$ mg / mL pour *T. rubrum* puis entre $31,25 \pm 0,00$ mg / mL et $62,25 \pm 0,00$ mg / mL pour *T. mentagrophytes*.

Les Concentrations pour Cinquante pourcent d'Inhibition (Cl_{50}) varient entre $1,910 \pm 0,009$ mg / mL et $15,620 \pm 0,002$ mg / mL pour *T. rubrum* puis entre $0,497 \pm 0,0002$ mg / mL et $7,835 \pm 0,001$ mg / mL pour *T. mentagrophytes*. *T. mentagrophytes* se présente comme la souche la plus sensible aux cinq extraits testés. L'extrait brut hydro-éthanolique macéré 70 % (Eeth 70 %) exerce un effet fongicide sur les souches *T. rubrum* ($CMF = 31,25 \pm 0,0$ mg / mL ; $Cl_{50} = 1,910 \pm 0,009$ mg / mL) et *T. mentagrophytes* ($CMF = 15,625 \pm 0,0$ mg / mL ; $Cl_{50} = 0,497 \pm 0,0002$ mg / mL). Pour l'Eeth 70 %, *T. mentagrophytes* se présente comme la souche la plus sensible et *T. rubrum* comme la souche la plus résistante. Le screening phytochimique préliminaire des cinq extraits bruts révèle la présence d'alcaloïdes, de saponines, de stéroïdes de terpénoïdes et de tanins (catéchiques et galliques) à divers degrés de concentration dans notre étude. L'Eeth 70 %, l'extrait le plus actif dans notre travail, contient en concentrations moyennes les mêmes métabolites cités plus haut. Au bout de ce travail, nous retenons que l'extrait brut hydro-éthanolique macéré 70 % (Eeth 70 %) exerce un effet fongicide sur toutes les souches dermatophytiques étudiées. Il pourrait par

conséquent, sous réserve d'études toxicologiques, être utilisé dans le traitement des dermatophytoses de la peau, des muqueuses et des annexes cutanées des humains.

Mots-clés : *Combretum racemosum*, potentialités bioactives, antidermatophytique superficiel.

Abstract

Bioactive potentialities and superficial antidermatophytic activity of *Combretum racemosum* P. Beauv. (Combretaceae) extracts

This work focuses on the development of a new, traditionally improved drug based on *C. racemosum*, accessible to population of all social classes and capable of eradicating dermatophytosis from the skin, the mucous membranes and the skin appendages. To this end, we evaluated bioactive compounds and the antidermatophytic activity of five (5) crude extracts (aqueous and hydro-organic 70 %) from *C. racemosum* P. Beauv. (Combretaceae) on two (2) species of *Trichophyton*, dermatophytic strains commonly encountered in dermatophytosis in humans. All the strains tested were found to be sensitive to the five extracts studied. This justifies in part the use of *C. racemosum* P. Beauv. in traditional medical practice against microbial surface diseases. For these extracts, the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) recorded ranged from $31.25 \pm 0,00$ mg / mL to $125 \pm 0,00$ mg / mL for *T. rubrum* and then from $15.625 \pm 0,00$ mg / mL to $62.25 \pm 0,00$ mg / mL for *T. mentagrophytes*. Whereas Fungistatic Minimum Concentrations (CFS) range from $31.25 \pm 0,00$ mg / mL to $125 \pm 0,00$ mg / mL for *T. rubrum* and then from $31.25 \pm 0,00$ mg / mL to $62.25 \pm 0,00$ mg / mL for *T. mentagrophytes*.

Concentrations for Fifty percent Inhibition (IC_{50}) range from 1.910 ± 0.009 mg / mL to 15.620 ± 0.002 mg / mL for *T. rubrum* and then from 0.497 ± 0.0002 mg / mL to 7.835 ± 0.001 mg / mL for *T. mentagrophytes*. *T. mentagrophytes* is the most sensitive strain of the five extracts studied. The hydroethanolic extract 70 % (Eeth 70 %) exerts a fungicidal effect on the strains *T. rubrum* ($CMF = 31.25 \pm 0.00$ mg / mL, $IC_{50} = 1.910 \pm 0.009$ mg / mL) and *T. mentagrophytes* ($CMF = 15.625 \pm 0.00$ mg / mL, $IC_{50} = 0.4976 \pm 0.0002$ mg / mL). For the Eeth 70 %, the *T. mentagrophytes* strain is the most sensitive strain and *T. rubrum* strain is the most resistant. The preliminary phytochemical screening of the five crude extracts revealed the presence of alkaloids, saponins, terpenoids, steroids and tannins (catechins and gallics) at various degrees of concentration in our study. Eeth 70 %, the most active extract in our work, contains medium concentrations of the same metabolite mentioned above. At the end of this work, we note that the hydroethanolic macerated extract 70 % (Eeth 70 %) exerts a fungicidal effect on all the dermatophytic strains studied. Therefore, subject to toxicological studies, it may be used in the treatment of dermatophytosis of human skin, mucous membranes and the skin appendages.

Keywords : *Combretum racemosum*, bioactive potentialities, superficial antidermatophytic.

1. Introduction

La peau, les annexes cutanées et les muqueuses constituent les premières barrières protectrices du corps vivant contre les agressions extérieures de toute nature [1]. Elles renferment en effet, des paramètres physiques, chimiques et biologiques, en particulier microbiens essentiels pour la survie du corps vivant. A cet effet, elles nécessitent une hygiène rigoureuse régulière, et en cas d'agression extérieure, des traitements médicamenteux adéquats et immédiats. Les dermatophytes sont un groupe d'espèces fongiques pathogènes

appartenant aux genres *Trichophyton*, *Microsporum* et *Epidermophyton*, morphologiquement similaires, kératinophiles et ayant une affinité pour le tissu kératinisé (peau, cheveux et ongles) des humains et d'autres animaux pour produire la dermatophytose [2, 3]. Dans le monde entier, les dermatophytes sont majoritairement impliqués dans les infections superficielles chez l'homme, au point qu'ils sont la cause des infections bactériennes secondaires qui peuvent conduire à des infections systémiques de la peau [4, 5]. Les dermatophytoses sont des atteintes superficielles de la peau, des muqueuses et des annexes cutanées dues aux dermatophytes, champignons microscopiques filamenteux à mycélium cloisonné [6]. Elles font partie des maladies infectieuses les plus fréquentes chez les humains. Ce sont des mycoses superficielles cosmopolites, banales, récidivantes et difficiles à guérir pour certains cas, ne menaçant pas la vie, mais qui causent un inconfort physique pour les personnes affectées et pouvant être des facteurs favorisant de graves maladies dont les infections au VIH [7]. Selon l'OMS, l'apparition mondiale des dermatophytoses est évaluée à environ 20 % et concerne principalement les enfants en âge scolaire [8, 9]. Ces dernières années, ce taux a augmenté, surtout chez les patients immunodéprimés, y compris les patients du SIDA, du diabète sucré, de cancers et les patients d'organes transplantés, etc. [10, 11].

En Suisse et dans de nombreux autres pays développés par exemple, la dermatite atopique est fréquente chez l'enfant, avec une prévalence de 10 - 20 % [12]. De plus, de nouveaux antifongiques efficaces contre les dermatophytoses ont vu le jour [13]. Mais, ces antifongiques sont en nombre limité, coûteux et difficiles d'accès par les populations pauvres [14]. A ces limites, s'ajoutent l'émergence de la résistance de certaines souches dermatophytiques aux antifongiques disponibles qui présentent quelques fois une toxicité assez élevée. Tous ces facteurs ci-dessus énumérés, rendent nécessaire la recherche de nouveaux médicaments à base de plantes, efficaces, de faible toxicité et facilement accessibles aux populations de toutes les couches sociales. Les plantes constituent en effet, une source importante d'une immense variété de molécules bioactives [15]. Ces molécules ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie. Parmi ces molécules, on retrouve les alcaloïdes, les coumarines, les quinones, les composés phénoliques, les tannins, les lignines, les flavonoïdes et les terpènes [16, 17]. Les molécules antimicrobiennes issues des plantes sont aussi capables d'inhiber la croissance dermatophytique en agissant sur des cibles cellulaires différentes de celles visées par les antibiotiques actuellement utilisés tels que les pénicillines, macrolides ou tétracyclines.

Elles pourraient également présenter une valeur clinique significative dans le traitement des infections aux souches microbiennes résistantes [18]. Aussi, ce jour, les préparations traditionnelles à base de plantes représentent-elles pour environ 81 % de l'humanité, les soins de santé primaire [19]. *Combretum racemosum* P. Beauv. est une plante panafricaine utilisée en milieu traditionnel comme antimicrobien et condiment dans les soupes. Cette plante renferme assez de composés bioactifs avec activités fortement significatives contre plusieurs pathologies graves dont les maladies infectieuses comme les infections au VIH et dégénératives telles que les cancers, les inflammations, le vieillissement prématûre, les ulcères, les maladies cardiovasculaires et d'autres maladies [20 - 24]. Ce travail, fruit d'une collaboration entre le Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences et le Laboratoire de Bactériologie-virologie de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody-Abidjan, a pour objectif la mise au point d'un nouveau médicament traditionnellement amélioré à base de *C. racemosum*, accessible aux populations de toutes les couches sociales et capable d'éradiquer les dermatophytoses de la peau, des muqueuses et des annexes cutanées. Il consiste à évaluer des composés bioactifs et l'activité antidermatophytique superficielle de cinq extraits bruts (aqueux et hydro-organiques 70 %) de *C. racemosum* P. Beauv. (Combretaceae).

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de feuilles fraîches de *C. racemosum*. Cette plante se rencontre en Afrique de l'Est, dans les recrus forestiers de la région Guinéo-congolaise, au Sénégal et au Cameroun. La plante se rencontre également au Sud du Nigéria où, eu égard à son utilité thérapeutique, elle porte le nom «Ebi-odo» et est appelée « Rose de Noel» [25, 26]. En Côte d'Ivoire, *C. racemosum* se rencontre dans la zone sud forestière; elle est connue sous le nom vernaculaire de betso (en langue Attié dans le Département d'Anyama) et de calo wôrô (en langue Bambara). C'est une grande liane grimpante ou un arbuste sarmenteux atteignant 25 - 30 m de longueur. Les feuilles, ovales ou elliptiques, acuminées et arrondies à la base, mesurent en moyenne 10 cm de longueur et 5 cm de largeur. Elles comprennent environ 8 à 10 nervures latérales. Les inflorescences, des pannicules de courts racèmes spéciformes, sont remarquables par les feuilles bractéaires blanches, des grappes terminales ou axillaires de fleurs jaunes. Les fleurs ont 5 sépales libres et 5 pétales. Elles ont 6 à 7 étamines fertiles, des anthracènes très allongées, poricides. Les fruits, à quatre ailes, sont blanc-verdâtres ou rosâtres à l'état frais. Les feuilles de *C. racemosum* sont récoltées dans le Département d'Anyama (Côte d'Ivoire), en juin 2015 sur la base d'une étude bibliographique selon laquelle la plante est utilisée en milieu traditionnel ivoirien contre des affections microbiennes. Après récolte, elles ont été identifiées par le Professeur AKE-Assi Laurent, au Centre National de Floristique de l'Université Félix Houphouët Boigny d'Abidjan-Cocody, où un spécimen de la plante est déposé au N° 19649, le 17 juillet 1985. Ces feuilles nous ont servi à réaliser des poudres puis les cinq extraits bruts (aqueux et hydro-organiques 70 %).

2-2. Souches dermatophytiques

Les souches dermatophytiques utilisées se composent de *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton mentagrophytes*, souches filamenteuses pathogènes du genre *Trichophyton*. Le choix de ces espèces est fait en raison de leur caractère ubiquitaire, et surtout leur implication majoritaire dans plusieurs dermatophytoses. *T. rubrum* est une espèce anthropophile. Son réservoir naturel est l'humain. Chez l'homme, il est le dermatophyte le plus fréquemment observé dans le monde entier [27]. Par exemple, en Europe du nord et en Europe centrale, il est le dermatophyte le plus fréquemment isolé, représentant 80 à 90 % des souches, suivi de *Trichophyton mentagrophytes* [28]. *T. rubrum* est la cause la plus fréquente des infections fongiques de la peau, par exemple de l'infection tinea cruris sur laquelle des résultats de travaux ont été rapportés [29 - 31]. Notre souche de *T. rubrum* (26710) émane du Laboratoire de parasitologie et Mycologie du Centre de Diagnostique et de Recherche sur le SIDA (CeDReS) du CHU de Treichville (**Tableau 1**). *T. mentagrophytes* est un complexe d'espèces anamorphes anthropophiles (exemple: *Trichophyton interdigitale*) et télomorphes zoophiles (exemple : *Arthroderma benhamiae* et *Arthroderma vanbreuseghemii*). La reproduction sexuelle des souches anthropophiles n'est pas observée et *T. mentagrophytes* est toujours appelé par le nom anamorphe *T. interdigitale* [32]. Le réservoir naturel des espèces anthropophiles et zoophiles sont respectivement les humains et les animaux. Après *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* est parmi le genre *Trichophyton*, l'espèce majoritairement impliquée dans les dermatophytoses de la peau, des annexes cutanées (ongles, des poils et des cheveux). Il est responsable de 90 % des dermatophytoses chroniques [33]. *A. benhamiae* par exemple, provoque des infections cutanées inflammatoires non seulement chez les humains, mais aussi chez les cobayes [34]. Notre souche de *T. mentagrophytes* (26799) émane du Laboratoire de Mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Elle est issue de prélèvement vaginal de malades du SIDA du service des maladies infectieuses du CHU de Treichville.

2-3. Traitements de la plante et échantillonnage

Après identification, les feuilles de *C. racemosum* sont d'abord minutieusement triées et débarrassées de corps étrangers. Ensuite, elles sont lavées à l'eau distillée, découpées et séchées à l'abri du soleil et à l'air libre. Au terme du séchage, elles sont pulvérisées à l'aide d'une broyeuse électrique de marque Culatti, type Mfc. Enfin, la poudre fine obtenue est stockée dans des flacons stériles, propres et secs. Le tout est conservé à l'abri de l'humidité et à la température ambiante du laboratoire pour servir à la préparation des cinq extraits bruts (aqueux et hydro-organiques 70 %).

2-4. Préparation des extraits bruts aqueux

L'extrait brut aqueux macéré (codifié Eaq) est obtenu selon la méthode suivante [35] : 100 g de poudre de feuilles sont homogénéisés dans un litre (1 L) d'eau distillée froide dans un blender (mixer) à la température ambiante. À la fin de l'homogénéisation, l'homogénéisât obtenu est d'abord essoré dans un carré de tissu blanc. Ensuite, doublement filtré sur du coton hydrophile (réf.: 87071) et une fois sur du papier wattman 3 mm. Le filtrat obtenu est concentré à l'étuve à 50 °C. L'extrait brut décocté (codifié Edec) est obtenu selon la méthode suivante [36] : 100 g de poudre de feuilles sont d'abord dissous dans un litre (1 L) d'eau distillée froide dans un bêcher. Le tout est ensuite porté à ébullition pendant 15 min sur une plaque chauffante, et homogénéisé dans un blender (Mixer) à la température ambiante. À la fin de l'homogénéisation, l'homogénéisât obtenu est d'abord essoré dans un carré de tissu blanc. Ensuite, doublement filtré sur du coton hydrophile (réf.: 87071) et une fois sur du papier wattman 3 mm. Le filtrat obtenu est concentré à l'étuve à 50 °C. L'Eaq et l'Edec obtenus sont enfin stockés dans des flacons stériles, propres et secs puis conservés à l'abri de la chaleur et de l'humidité pour être séparément utilisés pour l'évaluation des composés bioactifs et l'activité antidermatophytique.

2-5. Préparation des extraits bruts hydro-organiques 70 %

L'extrait brut hydro-acétatique d'éthyle macéré 70 % (codifié Eace 70 %) est préparé selon la méthode suivante [37] : 100 g de poudre de feuilles sont dissous dans un litre (1 L) d'une solution d'eau froide et d'acétate d'éthyle pur (700 mL d'acétate d'éthyle pur 99,5 °G.L pour 300 mL d'eau distillée froide) puis homogénéisés dans un blender à la température ambiante. Après homogénéisation dans un blender à la température ambiante, chaque homogénéisât obtenu est d'abord essoré dans un carré de tissu blanc. Ensuite, doublement filtré sur du coton hydrophile (réf. : 87071) et une fois sur du papier wattman 3 mm. Le filtrat obtenu est concentré à l'étuve à 50 °C. Les extraits bruts hydro-éthanolique macéré 70 % (codifié Eeth 70 %) et hydro-méthanolique macéré 70 % (codifié Emet 70 %) sont préparés selon la méthode précédente [37]. Cependant, la pureté de l'éthanol est de 96 °G.L tandis que celle du méthanol est de 99,85 °G.L. La masse de l'Eace 70 %, l'Eeth 70 % et de l'Emet 70 % obtenue est stockée dans des flacons stériles, propres, secs puis conservée à l'abri de la chaleur et de l'humidité pour être séparément utilisée pour l'évaluation des composés bioactifs puis l'activité antidermatophytique.

2-6. Évaluation des potentialités bioactives des extraits de *C. racemosum*

Nous avons réalisé un screening phytochimique sur chaque extrait brut (Eaq, Edec, Eace 70 %, Eeth 70 % et Emet 70 %) afin de mettre en évidence les composés bioactifs qui y sont contenus [38]. Chaque composé bioactif est mis en évidence selon la méthode décrite par [39]. C'est un ensemble de réactions d'identification et d'indicateurs colorés basées sur la réduction en milieu (alcalin ou basique) de la mixture du réactif par les groupements oxydables des composés bioactifs, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur

qui est fonction du milieu. Pour chaque extrait, nous avons réalisé 10 tests de screening par réactions colorées. Les solutions présentant des indicateurs ont une réaction positive, cela signale la présence de composés bioactifs dans les extraits et donc dans les feuilles de *C. racemosum*.

2-7. Évaluation de l'activité antidermatophytique des extraits de *C. racemosum*

2-7-1. Préparation des milieux de culture

Un litre (1 L) d'eau distillée est ajouté à 65 g de poudre de gélose Sabouraud dans un erlenmeyer. Le tout est porté à ébullition et agité jusqu'à homogénéisation complète au bain-marie. Le milieu ainsi préparé est reparti dans des flacons stériles, propres, secs et conservé pour la préparation de la gamme des concentrations de chaque extrait brut et du kéroconazole. La gamme des concentrations de l'extrait brut aqueux macéré (Eaq) est préparée selon la méthode de la double dilution en tubes penchés [40] : Une série de 10 tubes à essais numérotés de 1 à 10 est d'abord réalisée. Cette série comporte 8 tubes expérimentaux et 2 tubes témoins. Le témoin qui est sans l'Eaq est le témoin de contrôle de croissance (Tc) des germes. L'autre sans l'Eaq et sans germe est le témoin de contrôle de stérilité (Ts) de la gélose. Le milieu gélosé préalablement préparé est ensuite réparti dans les 10 tubes, à raison de 20 mL dans le tube N°1 et de 10 mL dans les autres. 2,5 g d'Eaq sont homogénéisés dans 20 mL de gélose du tube N°1. La moitié du volume du mélange est transférée dans 10 mL de gélose du tube N°2. Le tout est mélangé et la moitié est transférée dans le tube N°3. Ainsi de suite jusqu'au tube N°8. La moitié du mélange du tube N°8 est prélevée et rejetée. Nous obtenons ainsi la gamme de concentrations d'Eaq suivante : 125 mg / mL ; 62,5 mg / mL ; 31,25 mg / mL ; 15,625 mg / mL ; 7,8125 mg / mL ; 3,90625 mg / mL ; 1,953125 mg / mL ; 0,98 mg / mL. Les concentrations varient de 125 à 0,98 mg / mL selon une liaison géométrique de raison $\frac{1}{2}$. Les 10 tubes sont stérilisés à l'autoclave pendant 15 min à 121 °C. Ils sont enfin inclinés avec un petit culot, à la température du laboratoire jusqu'au refroidissement pour permettre la solidification de la gélose [41]. Les extraits aqueux décocté (Edec), hydro-acétatique d'éthyle macéré 70 % (Eace 70 %), hydro-éthanolique macéré 70 % (Eeth 70 %) et hydro-méthanolique macéré 70 % (Emet 70 %) sont également préparés selon la méthode précédente. Après stérilisation, tous les milieux obtenus sont conservés pour être séparément testés par rapport à *T. rubrum* et *T. mentagrophytes*.

2-7-2. Test antidermatophytique

L'inoculum dermatophytique est préparé à partir de culture de colonies de 5 jours de *T. rubrum* ou *T. mentagrophytes*, précédemment isolés sur du milieu Yeast glucose chloramphénicol (réf. : 51078, lot : 777666501) qui est un milieu sélectif des champignons microscopiques, fourni par Biomedis. Une (1) colonie dermatophytique est prélevée et homogénéisée dans 10 mL d'eau distillée stérilisée pour obtenir une suspension 10^0 de germes. Par dilution au 1/10, 1 mL de cette suspension est transféré et homogénéisé dans 9 mL d'eau distillée stérilisée pour avoir un volume final de 10 mL à la suspension 10^{-1} . Cette dernière est conservée pour l'ensemencement à raison de 10 μ L par tube. Le test antidermatophytique concerne les 8 tubes expérimentaux et le témoin de contrôle de croissance (Tc). Nous avons ensemencé par stries transversales serrées jusqu'à épuisement, 1000 cellules de *T. rubrum* ou *T. mentagrophytes* équivalentes à 10 μ L [42]. Pour chaque extrait, nous avons réalisé trois (3) essais sur chaque souche. Les cultures ainsi réalisées sont incubées à 30 °C pendant 10 jours. Elles servent à déterminer l'activité antidermatophytique.

2-8. Détermination de l'activité antidermatophytique des extraits

Cette partie repose sur des facteurs microbiologiques : dénombrement de colonie dermatophytique, détermination des paramètres antifongiques (CMI, CMF, IC_{50}) et des courbes de croissance de souche.

2-8-1. Dénombrement des colonies dermatophytiques

Après 10 jours d'incubation à 30 °C, nous avons d'abord dénombré les colonies de *T. rubrum* puis *T. mentagrophytes* par comptage direct, grâce à un stylo compteur de colonie, de marque Bel-Art. Ensuite évalué en pourcentage de survie, la croissance de *T. rubrum* puis *T. mentagrophytes* dans chaque tube expérimental, enfin calculé par rapport à 100 % dans le tube Tc[43].

2-8-2. Détermination des paramètres antifongiques

Après dénombrement des colonies, nous avons déterminé la valeur de chaque paramètre anti- fongique : la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), la Concentration pour Cinquante Pourcent d'Inhibition (CI₅₀) et la Concentration Minimale Fongicide / la Concentration Minimale Fongistatique (CMF / CFS). La CMI est la concentration d'extrait dans le tube pour lequel il n'y a eu aucune croissance visible à l'œil nu. La CMF est la concentration d'extrait qui donne 99.99 % d'inhibition comparativement au tube témoin de contrôle de croissance. La CI₅₀ est déterminée graphiquement à partir de la courbe de sensibilité de *T. rubrum* et *T. mentagrophytes* à chaque extrait.

2-9. Analyses statistiques

La valeur des paramètres antifongiques de chaque extrait est déterminée à l'aide du logiciel Graphpad. Les résultats sont donnés en tant que moyenne \pm SE ($n = 3$), en utilisant Cologn Statistica.

3. Résultats et discussion

Dans ce travail, nous avons évalué des composés bioactifs (principes actifs) de cinq extraits bruts de *C. racemosum* P. Beauv. et l'activité antidermatophytique *in-vitro* de ces extraits contre deux dermatophytes (*T. rubrum* et *T. mentagrophytes*).

3-1. Potentialités bioactives

Le screening phytochimique est utilisé pour évaluer les composés bioactifs contenus dans chaque extrait de *C. racemosum*. Les résultats de ce test sont représentés dans le **Tableau 1**. L'analyse de ces résultats indique clairement la présence dans les cinq extraits, d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de composés phénoliques, de saponines, de stéroïdes, de terpénoïdes et de tannins (catéchiques et galliques) à divers degrés de concentrations (**Tableau 1**). L'extrait brut hydro-éthanolique macéré 70 % (Eeth 70 %) contient des alcaloïdes, des saponines, des stéroïdes, des terpénoïdes et des tanins (catéchiques et galliques) à concentrations moyennes (**Tableau 1**). Harbone, Onocha *et al.*, Okwuosa *et al.*, et Kamou *et al.* (a), par des études triphytochimiques confirmées, ont également montré la présence de ces métabolites dans ces extraits de *C. racemosum* [44 - 47]. Ces résultats pourraient justifier en partie l'usage de *C. racemosum* contre les infections superficielles microbiennes en milieu traditionnel. McGaw *et al.*, ont également mis en évidence la présence de ces métabolites secondaires dans l'extrait brut hydro-éthanolique (Eeth 70 %) [48].

Tableau 1 : Composés bioactifs d'extraits bruts de *C. racemosum* P. Beauv.

Composés bioactifs		Extraits bruts aqueux		Extraits bruts hydro-organiques 70 %		
		Eaq	Edec	Eace 70 %	Eeth 70 %	Emet 70 %
Alcaloïdes	B	+	+	+	++	+++
	D	+	+	+	++	+++
Flavonoïdes		+	++	-	-	+
Composés phénoliques		+	++	-	-	+
Quinones libres		-	-	-	-	-
Saponines		+	++	+	++	+++
Stéroïdes		+	++	+++	++	+
Terpénoïdes		+	++	+++	++	+
Tannins	Cat	+	++	-	++	+
	Gal	+	+	-	++	+

Eaq : Extrait brut aqueux macéré; Edec : Extrait brut aqueux décocté; Eace 70 % : Extrait brut hydro-acétatique d'éthyle macéré 70 %; Eeth 70 % : Extrait brut hydro-éthanolique macéré 70 %; Emet 70 % : Extrait brut hydro-méthanolique macéré 70 %; B : Bouchardat ; D : Dragendorff ; Cat : Catéchiques ; Gal : Galliques ; - : Absence de composés bioactifs; + : Faible concentration de composés bioactifs; ++ : Concentration moyenne de composés bioactifs; +++ : Forte concentration de composés bioactifs.

3-2. Activité antidermatophytique superficielle

L'activité antidermatophytique de chaque extrait brut de *C. racemosum* est évaluée. Les valeurs des paramètres antifongiques sont déterminées (**Figures 1 et 2** ; **Tableau 2**). L'analyse des résultats expérimentaux montre que comparativement aux témoins de contrôle de croissance (Tc), il y a une diminution du nombre de colonies de *T. rubrum* et *T. mentagrophytes* dans les tubes expérimentaux au fur et à mesure que la concentration de chaque extrait augmente (**Figures 1 et 2**). Les courbes caractérisant cette diminution présentent une allure décroissante (**Figures 1 et 2**). Ainsi, nos résultats montrent que les cinq (5) extraits testés sont actifs à divers degrés de concentrations allant de $15,625 \pm 0,00$ mg / mL à $125 \pm 0,00$ mg / mL et manifestent une activité antidermatophytique en inhibant la croissance *in-vitro* de *T. rubrum* et *T. mentagrophytes* selon une relation dose-réponse. La sensibilité de *T. rubrum* et *T. mentagrophytes* à chaque extrait ainsi que les courbes obtenues permettent de déterminer les différents paramètres antifongiques de chaque extrait à savoir la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), la Concentration Minimale Fongicide / Concentration Minimale Fongistatique (CMF / CFS), la Concentration pour Cinquante pourcent d'Inhibition (CI₅₀) ainsi que le rapport d'activité CMF / CMI (**Tableau 2**).

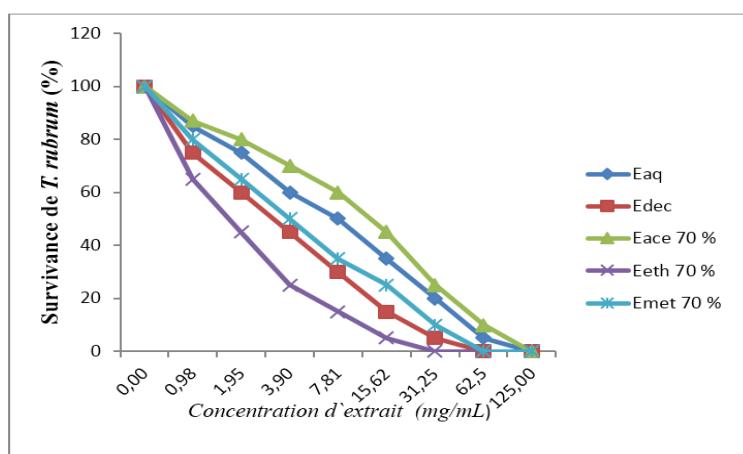


Figure 1 : Courbes de sensibilité de *T. rubrum* en fonction des concentrations des cinq extraits bruts de *C. racemosum* P. Beauv.

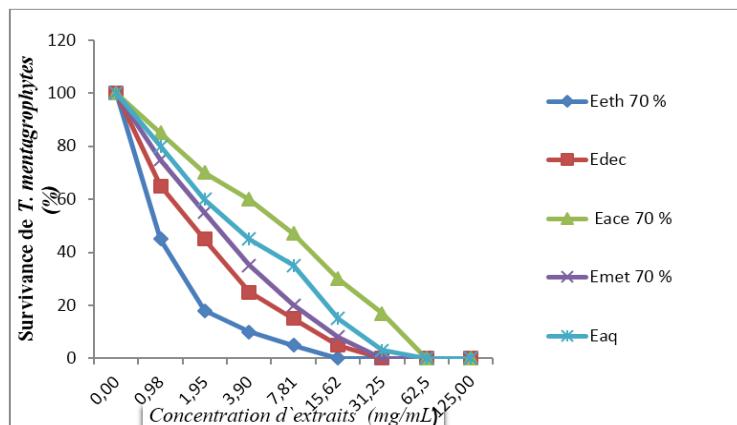


Figure 2 : Courbes de sensibilité de *T. mentagrophytes* en fonction des concentrations des cinq extraits de *C. racemosum* P. Beauv.

Tableau 2 : Valeurs des paramètres antidermatophytiques des cinq extraits de *C. racemosum* P. Beauv.

Souches	Extraits	Paramètres antidermatophytiques (mg / mL)			Fongicidie
		CMI	CI ₅₀	CMF/CFS	
<i>T. rubrum</i> (26710)	Eaq	125 ± 0,00	7,790 ± 0,01	125 ± 0,00	Fongistatique
	Edec	62,5 ± 0,00	3,851 ± 0,016	62,5 ± 0,00	Fongistatique
	Eace 70 %	125 ± 0,00	15,620 ± 0,002	125 ± 0,00	Fongistatique
	Eeth 70 %	31,25 ± 0,00	1,910 ± 0,009	31,25 ± 0,00	Fongicide
	Emet 70 %	31,25 ± 0,00	3,880 ± 0,015	31,25 ± 0,00	Fongistatique
	Két	0,1225 ± 0,00	0,0005 ± 1,05x10 ⁻⁷	0,1225 ± 0,00	Fongicide
<i>T. mentagrophytes</i> (26799)	Eaq	62,5 ± 0,00	7,835 ± 0,001	62,5 ± 0,00	Fongistatique
	Edec	31,25 ± 0,00	1,891 ± 0,009	31,25 ± 0,00	Fongistatique
	Eace 70 %	62,5 ± 0,00	3,862 ± 0,008	62,5 ± 0,00	Fongistatique
	Eeth 70 %	15,625 ± 0,00	0,497 ± 0,0002	15,625 ± 0,00	Fongicide
	Emet 70 %	31,25 ± 0,00	1,940 ± 0,012	31,25 ± 0,00	Fongistatique
	Két	0,0009 ± 0,00	1,180x10 ⁻⁵ ± 10 ⁻⁸	0,0009 ± 0,00	Fongicide

Eaq : Extrait brut aqueux macéré; Edec : Extrait brut aqueux décocté; Eace 70 % : Extrait brut hydro-acétatique d'éthyle macéré 70 %; Eeth 70 % : Extrait brut hydro-éthanolique macéré 70 %; Emet 70 % : Extrait brut hydro-méthanolique macéré 70 % ; Ket : kéroconazole ; CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CMF : Concentration Minimale Fongicide; CFS : Concentration Minimale Fongistatique; CI₅₀ : Concentration pour Cinquante Pourcent d'Inhibition.

La sensibilité des deux souches aux cinq extraits testés justifie en partie l'usage en milieu traditionnel de *C. racemosum* P. Beauv. pour le traitement des affections microbiennes. Dans des études d'activités antimicrobiennes validées, Onocha *et al.*, Kamou *et al.* (b) et Ajibesin et Ekpo ont aussi montré la sensibilité de ces souches dermatophytiques aux extraits bruts aqueux, acétatique d'éthyle, éthanolique et méthanolique de *Combretum racemosum* [49 - 51]. L'action combinée des alcaloïdes, des flavonoïdes, des composés phénoliques, des saponines, des stéroïdes, des terpénoïdes et des tannins à divers degrés de concentration, serait à la base de l'activité antidermatophytique observée chez les cinq extraits bruts dans notre étude. En effet, les alcaloïdes par exemple, sont doués de propriétés antimicrobiennes [52]. Les flavonoïdes, les tannins et les triterpénoïdes sont reconnus comme des molécules antifongiques [53]. Les flavonoïdes sont en particulier responsables du pouvoir antiallergique, antiparasitaire et inhibent également l'activation des compléments [54, 55]. Les composés phénoliques sont avérés avoir des activités antibactériennes et antifongiques, et sont en effet des composés naturels largement répandus dans le règne végétal qui ont une

importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé [56]. Ils sont aussi utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique [57]. Pour les cinq extraits, les CMI enregistrées varient entre 31,25 mg / mL et 125 mg / mL pour *T. rubrum* puis entre 15,625 \pm 0,00 mg / mL et 62,25 \pm 0,00 mg / mL pour *T. mentagrophytes*; tandis que les CFS varient entre 31,25 \pm 0,00 mg / mL et 125 \pm 0,00 mg / mL pour *T. rubrum* puis entre 31,25 \pm 0,00 mg / mL et 62,25 \pm 0,00 mg / mL pour *T. mentagrophytes*. Les IC_{50} varient entre 1,910 \pm 0,009 mg / mL et 15,620 \pm 0,002 mg / mL pour *T. rubrum* puis entre 0,497 \pm 0,0002 mg / mL et 7,835 \pm 0,001 mg / mL pour *T. mentagrophytes*. *T. mentagrophytes* se révèle la souche la plus sensible aux cinq extraits testés. D'autre part, l'extrait brut hydro-éthanolique macéré 70 % (Eeth 70 %) exerce un effet fongicide sur *T. rubrum* (CMF = 31,25 \pm 0,00 mg / mL ; IC_{50} = 1,910 \pm 0,009 mg / mL) et *T. mentagrophytes* (CMF = 15,625 \pm 0,00 mg / mL ; IC_{50} = 0,4976 \pm 0,0002 mg / mL). Cette activité est comparable à celle du médicament de référence kéroconazole comprimé (CMF = 0,1225 \pm 0,00 ; IC_{50} = 0,0005 \pm 1,05 \times 10⁻⁷ mg / mL pour *T. rubrum* et CMF = 0,0009 \pm 0,0 mg / mL ; IC_{50} = 1,180 \times 10⁻⁵ \pm 10⁻⁸ pour *T. mentagrophytes*). Une étude d'activité antifongique d'extraits bruts (aqueux macéré et hydro-éthanolique macéré 70 %) de feuilles de *C. racemosum* a été menée par Kamou *et al.* (c), des résultats de l'effet fongicide de l'extrait hydro-éthanolique macéré 70 % sur *T. rubrum* et *T. mentagrophytes* ont également été rapportés [58].

Pour l'Eeth 70 %, *T. mentagrophytes* se présente comme la souche la plus sensible et *T. rubrum* comme la souche la plus résistante. L'activité de l'Eeth 70 % serait due aux alcaloïdes, saponines, stéroïdes, terpénoïdes et aux tannins. Ces molécules éthano-solubles et moyennement concentrées de cet extrait ont pu alors mieux exprimer leur potentiel antidermatophytique, d'où l'activité obtenue. Les alcaloïdes par exemple, ont en générale une fonction importante dans les structures biologiques ; ils sont aussi de puissants anti cholinergiques et sont reconnus pour leur pouvoir antibactérien élevé [59, 60]. L'activité de l'Eeth 70 % est en partie attribuée aux alcaloïdes qui, non seulement sont concentrés dans l'Eeth 70 %, mais également possèdent selon la littérature une forte activité antifongique. Une analyse des valeurs de CMI montre que l'Eeth 70 % améliore l'activité antidermatophytique que les autres extraits. Nous rappelons que l'activité d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principe actif [61, 62]. Le rapport d'activité CMF / CMI de l'Eeth 70 % pour toutes les souches de *Trichophyton* étudiées est un (1). Cet extrait peut être qualifié de substance fongicide. L'Eeth 70 % a donc une activité fongicide contre *T. rubrum* et *T. mentagrophytes*. En effet, lorsque le rapport d'activité CMF / CMI d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à quatre (≤ 4), cette dernière est qualifiée de substance fongicide et si le rapport CMF / CMI est supérieur à quatre (> 4), alors elle est dite fongistatique [63].

4. Conclusion et perspectives

Cette étude analytique qui consistait à évaluer des composés bioactifs et l'activité antidermatophytique de cinq extraits bruts de *Combretum racemosum* nous a permis de conclure que tous les extraits analysés contiennent des composés bioactifs à divers degrés de concentrations. L'extrait brut hydro-éthanolique macéré 70 % contient à concentrations moyennes les composés bioactifs. Toutes les souches dermatophytiques étudiées sont sensibles à nos extraits. Cette sensibilité est différente selon les souches. *T. mentagrophytes* est la souche la plus sensible aux cinq extraits, tandis que *T. rubrum* est la moins sensible. L'extrait brut hydro-éthanolique macéré 70 % de *C. racemosum* est fongicide sur *T. rubrum* et *T. mentagrophytes*, car le rapport CMF / CMI est inférieur à 4 pour toutes les souches. Il est la fraction la plus active sur les deux souches. Il concentre mieux les principes actifs et pourrait, après des études toxicologiques, être utilisé comme phytomédecine pour combattre les dermatophytoses de la peau, des muqueuses et des annexes cutanées des humains. Dans nos futurs travaux, nous préparerons d'abord l'extrait partitionné de l'Eeth 70 % de *C. racemosum*, ensuite purifierons ses phytomolécules que nous testerons à nouveau sur *T. rubrum* et *T. mentagrophytes*. Et enfin, nous nous intéresserons à l'étude toxicologique de l'Eeth 70 %.

Références

- [1] - D. W. SCOTT, W. H. MILLER and C. E. GRIFFIN, "Muller & Kirk's Small Animal Dermatology", 6th Edition Saunders, (2001) 1552 p.
- [2] - I. WEITZMAN and R. C. SUMMERBELL, "The Dermatophytes", *Clin. Microbiol. Rev.*, 8 (1995) 240 - 259
- [3] - J. CHANDER, "Test Book of Medical Mycology", 3rd ed., Mehta Publishers : Maharashtra, India, (2009) 122 - 146
- [4] - V. K. BHATIA and P. C. SHARMA, "Determination of minimum inhibitory concentrations of itraconazole, terbinafine and ketoconazole against dermatophyte species by broth microdilution method", *Indian J. Med. Microbiol.*, 33 (2015) 533 - 537
- [5] - V. K. BHATIA and P. C. SHARMA, "Epidemiological studies on dermatophytosis in human patients in Himachal Pradesh, India", *Springerplus*, 3 (2014) 134 p.
- [6] - M. FEUILHADE, J. BAZEX et A. CLAUDY, "Infections à dermatophytes de la peau glabre, des plis et des phanères", Université de Rouen, Faculté de Médecine-Pharmacie, diagnostic et traitement des dermatophytoses des plis, et de la peau glabre de voisinage, des teignes et des mycoses unguéales, (2002) 7 p.
- [7] - M. BORGERS H. DEGREEF and G. CAUWENBERGH, "Fungal infections of the skin: infection process and antimycotic therapy *Curr Drug Targets*", 6 (2005) 849 - 862
- [8] - V. SHARMA, T. K. TUMAWAT, A. SHARMA, R. SETH and S. CHANDRA, "Dermatophytes: Diagnosis of dermatophytosis and its treatment", *Afr. J. Microbiol. Res.*, 9 (2015) 1286 - 1293
- [9] - A. SEPAHVAND, J. ABDI, Y. SHIRKHANI, S.H. FALLAHI, M. TARRAHI and S. SOLEIMANNEJAD, "Dermatophytosis in Western Part of Iran, Khorramabad", *Asian Journal of Biological Sciences*, 02 (2009) 58 - 65
- [10] - J. CHANDER, "Test Book of Medical Mycology", 3rd ed. Mehta Publishers : Maharashtra, India, (2009) 122 - 146
- [11] - D. A. SANTO and J. S. HAMDA, "Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*", *J. clinical Microbiology*, 43 (2005) 1917 - 1920
- [12] - D. Y. M. LEUNG and T. BIEBER, "Allergen-Induced Dermatitis Causes Alterations in Atopic dermatitis", *The Lancet*, 361 (2003) 151 - 160
- [13] - Y. MATSUDA, K. SUGIURA, T. HASHIMOTO, A. UEDA, Y. KONNO and Y. TATSUMI, "Efficacy coefficients determined using nail permeability and antifungal activity in keratin-containing media are useful for predicting clinical efficacies of topical drugs for onychomycosis", *PLoS ONE*, (2016) 11 p.
- [14] - M. D. BENNET, P. BHANDOL and I. J LEITCH, "Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern Uses 807 new estimates", *Annals of Botany*, 86 (2000) 859 - 909
- [15] - J. FERRARI, "Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud", ex A. Rich., thèse de doctorat, Lausanne, (2002)
- [16] - T. BAHORUN, "Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentiel. Food and agricultural resarch council", (1997) 83 - 94
- [17] - A. MARFAK, "Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides", Thèse de doctorat, Limoges, (2003) 181 p.
- [18] - J. N. ELOFF, "Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants", *Journal of Ethnopharmacology*, 60 (1998) 1 - 8
- [19] - WORLD HEALTH ORGANISATION, "A report of the consultation meeting on traditional and modern medicine : Harmonizing two approaches", Beijing, China, (2000) 22 - 26

- [20] - I. B. AFANASLEV, A. I. DOROZHKO et A.V. BORDSKII, "Chélation et radicaux libres Mécanismes d'élimination des inhibiteurs Action de la rutine et de la quercétine dans les lipides Peroxydation", *Biochim. Pharmacol.*, 38 (1989) 1763 - 1769
- [21] - G. R. PETTIT, S. B. SINGH, M. L. NIVEN, E. HAMED and J. M. SCHMIDT, "Isolation, Structure, et Synthèse de Combretastatins A-1 et B-1, de nouveaux inhibiteurs puissants de Microtubule, dérivé de *Combretum caffrum*", *J. Produits naturels*, 50 (1) (1997) 119 - 131
- [22] - C. OKWUOSA, P. UNEKWE, E. NWOBODO and K. CHILAKA, "The anti-ulcer activities of leaf extracts of *combretem racemosum* (Family: Combretaceae)", *Journal of Biomedical Investigation*, 4 (1) (2006) 9 - 14
- [23] - A. B. ALIYU, M. A. IBRAHIM, A. M. MUSA, H. IBRAHIM, I. E. ABDULKADIR et A. O. OYEWALE, "Évaluation de l'activité antioxydante d'extrait de *Bauhinia rufescens* Lam. (Caesalpiniaceae)", *J. Plantes médicinales Research.*, 3 (8) (2009) 563 - 567
- [24] - C. N. OKWUOSA, P. U. O. ACHUKWU, N. C. AZUBIKE and A. I. E. ABAH, "Protective Effect of the Leaf Extracts of *Combretem racemosum* P. Beauv (Combretaceae) on Cyclo-phospahamide Induced Pancytopaenia and Liver Injury in Male Rats", *Research Journal of Pharmacology*, 6 (2) (2012a) 30 - 34
- [25] - M. OGHENEJOBO, B. U. S. OGHENEJOBO, K. E. UVIEGHARA and E. OMUGHELE, "Phytochemical Screening and Antimicrobial Activities of the Fractionated Leaf Extract of *Combretem racemosum*", *Scholars. Academic Journal of Pharmacy*, 3 (6) (2014) 455 - 462
- [26] - H. M. BURKILL, "The useful plants of West Tropical Africa", *Royal Botanical garden*, 5 (1985) 378 p.
- [27] - I. DHIB, I. KHAMMARI, A. YAACOUB, F. HADJ SLAMA, M. BEN SAID, R. ZEMNI and A. FATHALLAH, "Relationship between phenotypic and genotypic characteristics of *Trichophyton mentagrophytes* strains isolated from patients with dermatophytosis", *Mycopathologia*, (2017)
- [28] - C. SEEBAKER, J. P. BOUCHARA and B. MIGNON, "Updates of the epidemiology of dermatophyte infections, *Mycopathologia*", 166 (2008) 335 - 352
- [29] - A. FATHALLAH et F. SAGHROUNI, "Diagnostique des mycoses superficielles", Hôpital farhat hached de Sousse, STPI, (2008) 25 - 26
- [30] - S. BALAKUMAR, S. RAJAN, T. THIRUNALASUNDARI, S. JEEVA, "Epidemiology of dermatophytosis in and around Tiruchirapalli, Tamilnadu, India", *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, 2 (2012) 286 - 289
- [31] - A. PANDEY, M. PANDEY, "Isolation and characterization of dermatophytes with tinea infection at Gwalior (M.P.)", *India Int. J. Pharm. Sci. Investig.*, 2 (2013) 5 - 8
- [32] - F. SYMOENS, O. JOUSSON, C. PLANARD, M. FRATTI, P. STAIB, B. MIGNON, M. MONOD", Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex", *Int J Med Microbiol.*, 301 (2011) 260 - 266
- [33] - K. IKUTA, S. KITAMURA, T. YADA, T. AZUMA, F. ITO, M. MURAYAMA, M. YAMAGUCHI, T. NISHIMURA, T. KANEKO, A. ISHIMATSU and M. IWATA, "Development and application of assessment systems for the effects of acidification on inland water fish ecosystems in East Asia", *Progress Report of the Global Environmental Research-Acid Rain*, IV, (1997) 62 - 66
- [34] - P. STAIB, C. ZAUGG et B. Mignon *et al.*, "Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae* in vitro versus during infection", *Microbiology*, 156 (2010) 884 - 895
- [35] - M. PIERRE et M. LIS "Secrets des plantes", *Editions Artemis*, Paris, 1 (2007) 463 p.
- [36] - G. N. ZIRIHI et A. K. M. KRA et F. GUEDE-GUINA, "Evaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pirifolia* (LAMARCK) O. KUNTZE (Asteraceae) «PYMI» sur la croissance in-vitro de *Candida albicans*", *Rev. Méd. Pharm., Afr.*, 17 (2003) 11 - 19
- [37] - A. J. ACKAH, A. M. KRA, G. N. ZIRIHI et F. GUEDE-GUINA, "Evaluation of the antifungal activity of TEKAM, évaluation de l'activité antifongique de tekam, un extrait de plante, sur la croissance in vitro de *candida albicans*", *Rev. Ivoir. Sci. Technol.*, 11 (2008) 119 - 129

- [38] - A. GUEDE, "Etude des effets physiologiques d'un extrait aqueux de *Landolphia hirsuta* (Apocynacée), traditionnellement utilisé comme antihémorroïdaire et essai de formulation de suppositoires à effet antihémorroïdaire", Thèse de doctorat en pharmacie - UFR de Pharmacie d'Abidjan, N° 815 / 03, (2003) 200 p.
- [39] - M. J. MANGAMBU D. DE, K. F. MUSHAGALUSA et N. J. KADIMA, "Contribution à l'étude phytochimique de quelques médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu et ses environs (Sud-Kivu, R. D. Congo)", *Journal of Applied Biosciences*, 75 (2014) 6211 - 6220
- [40] - K. BENE, D. CAMARA, N`G. B. Y. FOFIE et G. N. ZIRIHI, "Etude ethnobotanique, activité antifongique in-vitro sur *candida albicans* et toxicité sur les cellules HFF de *Hirrizonia abissinica* Oliv. (Simaroubaceae), une plante de la pharmacopée ivoirienne", *Journal of Applied Biosciences*, 94 (2015) 8815 - 8824
- [41] - K. E. KPOROU, A. K. M. KRA, S. OUATTARA, F. GUEDE-GUINA et A. J. DJAMAN, "Evaluation de l'activité antifongique de *Mitracarpus scaber* sur *Candida tropicalis*", *J. sci. pharm. biol.*, 10 (1) (2009) 13 - 20
- [42] - F. GUEDE-GUINA, M. WANGAH-MANDA, G. M. BONGA, C. DE SOUSA, "Activité antimicrobienne d'un extrait végétal contre les germes opportunistes au cours du SIDA", *Rev. Méd. Pharm. Afr.*, 9 (1) (1995) 13 - 19
- [43] - A. K. M. KRA, "Evaluation et amélioration par séquençage chromatographique d'une action antifongique de MISCA contre *Aspergillus fumigatus*", Thèse de doctorat 3^{ème} cycle, UFR-Biosciences, Université Abidjan Cocody, (2001) 118 p.
- [44] - J. P. HARBONE, "Méthodes phytochimiques", 2nd Ed., Dakota du Nord Oxford Université Presse, Londres, (1991)
- [45] - P. A. ONOCHA, E. O. AUDU, O. EKUNDAYO and O. O. DOSUMU, "Phytochemical and antimicrobial properties of extracts of *Combretum racemosum*", *Acta Horticultae*, 675 (2005a) 97 - 101
- [46] - C. N. OKWUOSA, P. U. O. ACHUKWU, N. C. AZUBIKE et A. I. E. ABAH, "Effet de protection des extraits de feuilles de *Combretum racemosum* P. Beauv (Combretaceae) sur la Pancytopenie et la lésion hépatique induite par Cyclophosphamide chez les rats mâles", *Research Journal of Pharmacology*, 6 (2012b) 30 - 34
- [47] - K. R. KAMOU, K. OUATTARA, I. BAGRE, G. L. GNAHOUE, A. OUATTARA and A. COULIBALY, "Phytochemical screening and antifungal activities of *Combretum racemosum* P. Beauv. (Combretaceae) extracts against five clinicals fungals strains", *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5 (10) (2016a) 119 - 126
- [48] - L. J. MCGAW, T. RABE, S. G SPARG, A. K JAGER, J. N ELOFF and J. VAN STADAN, "An investigation on the biological activity of *Combretum* species", *Journal of Ethnopharmacology*, 75 (2001) 45 - 50
- [49] - P. A. ONOCHA, E. O. AUDU, O. EKUNDAYO, and O. O. DOSUMU, "Phytochemical and antimicrobial properties of extracts of *Combretum racemosum*", *Acta Hortic.*, 675 (2005b) 97 - 101
- [50] - K. R. KAMOU, K. OUATTARA, I. BAGRE, G. L. GNAHOUE, A. OUATTARA and A. COULIBALY, "Phytochemical screening and antifungal activities of *Combretum racemosum* P. Beauv. (Combretaceae) extracts against five clinicals fungals strains", *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5 (10) (2016b) 119 - 126
- [51] - K. K. AJIBESIN et A. B. EKPO, "Antimicrobial activities of the leaves of *Combretum micranthum* and *Combretum racemosum*", *Global J. Med. Sci.*, 1 (2002) 13 - 7
- [52] - S. FAIZI, M. RASHID, R. A ALIK, S. AHMED, S. A. KHAN, A. A. AQEEL, N. BIBI et S. A. AHMED, "Évaluation de propriété antimicrobienne de *Polyalthia longifolia* var. *Pendula*: isolement d'une lactone comme l'agent antibactérien actif de l'extrait d'éthanol de la tige". *Phytother. Res.*, 17 (10) (2003) 1177 - 1181
- [53] - SCALBERT, "Propriétés antimicrobiennes des tannins, Phytochimie", 30 (1991) 3875 - 3883
- [54] - K. CIMANGA, K. KAMBU, L. TONA and N. HERMANS *et al.*, "Cytotoxicity and in vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents", *Journal of Ethnopharmacology*, 107 (2006) 83 - 90
- [55] - R. MANKELE, J. M. OUAMBA, A. A. ABENA et A. YALAF, "Étude des effets de *Morinda morindoides* (Back) sur le système immunitaire de l'homme", *Phytothérapie*, 4 (2) (2006) 68 - 73

- [56] - C. KOECHLIN-RAMONATXO, "Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way of nutrition in respiratory diseases", *Nutr. Clin. et Métab.*, 20 (2006) 165 - 177
- [57] - M. SUHAJ, "Spice antioxidants isolation and their antiradical activity : a review ", *J. Food Compos. and Analys.*, 19 (2006) 531 - 537
- [58] - K. R. KAMOU, K. OUATTARA, I. BAGRE, G. L. GNAHOUE, A. OUATTARA and A. COULIBALY, "Phytochemical screening and antifungal activities of Combretum racemosum P. Beauv. (Combretaceae) extracts against five clinicals fungals strains", *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5 (10) (2016c) 119 - 126
- [59] - F. SCAZZOCCHIO, M. F. COMATA, L. TOMASSINI and M. PALMERY, "Antibacterial activity of Hydrastis canadensis extract and its major isolated alkaloids *Planta medica*", 67 (6) (2001) 561 - 564
- [60] - D. MUSTER, B. S. LOTFI, "Thérapeutique médicale buccodentaire: moyens et méthodes Publié par Elsevier Masson", ISBN 2842995651, 9782842995652, (2004) 290 p.
- [61] - H. WAGNER, "Pharmazeutische Biologie. Drogen und irhe inhaltsstoffe, Gustav Fisher Verfag", Stuttgart-New-York, (1993) 522 p.
- [62] - J. H. S. THANGARA, O. ADJEI, B. W. ALLEN and F. PORTAELS *et al.*, "In vitro activity of ciprofloxacin, Sparfloxacin, Ofloxacin, Amikacin and Rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*", *J. Antimicrob. Agents Chemother*, 45 (2) (2000) 231 - 233
- [63] - A. A. MARMONIER, "Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques", *Bactériologie Médicale, technique usuelles*, (1990) 227 - 236