

**ETUDE BOTANIQUE, SCREENING
PHYTOCHIMIQUE ET ACTIVITÉ
ANTICANDIDOSIQUE *IN VITRO* DE
PYCNANTHUS ANGOLENSIS (WELW.) WARB.
(MYRISTICACEAE)**

Goueh Gnahoué

Laboratoire de Biochimie et Microbiologie,
Ecole Normale Supérieure, Abidjan

Kouadio Béné

Laboratoire de Botanique, UFR Biosciences,
Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY, Abidjan

Kiyinlma Coulibaly

Université Peleforo Gon Coulibaly de Korhogo, Korhogo, Côte d'Ivoire

Abstract

An ethnobotanical survey conducted among the Brong people in the Transua Department, Zanzan District (Côte d'Ivoire) has revealed *Pycnanthus angolensis*. This is a plant highly recommended for the treatment of microbial diseases. Evaluating the antifungal activity by the method of double dilution in angle sloping tubes on Sabouraud Agar with three trunk bark extracts, it emerged that only ethanol 70% extract (Eeth) has anticandidosic activity. *Candida albicans* seems to be more sensitive with MIC = 25±0.0 mg/ml, IC₅₀ = 1.45±0.05 mg/ml and a MFC = 50±0.0 mg/ml. The phytochemical screening showed the presence of polyphenolic compounds, flavonoids, tannins (catechin), saponins and alkaloids that may justify the activity and their traditional use areas.

Keywords: Phytochemical screening, anticandidosic activity, *Pycnanthus angolensis*, Brong, Transua

Résumé

Une enquête ethnobotanique menée auprès du peuple Brong dans le Département de Transua, District du Zanzan (Côte d'Ivoire) a permis de révéler *Pycnanthus angolensis* connu localement sous le nom de Tiè. C'est une plante fortement recommandée dans le traitement des maladies microbiennes. De l'évaluation de l'activité antifongique par la méthode de

double dilution en tubes penchés sur gélose Sabouraud de trois extraits issu d'écorces de tronc de *Pycnanthus angolensis*, il est ressorti que seul l'extrait éthanolique 70% (Eeth) possède une activité anticandidosique. *Candida albicans* semble être la plus sensible avec une CMI = $25 \pm 0,0$ mg/ml, une $CI_{50} = 1,45 \pm 0,05$ mg/ml et une CMF = $50 \pm 0,0$ mg/ml. Le screening phytochimique a mis en évidence la présence de plusieurs composés chimiques dont les polyphénoliques et les flavonoïdes sont les plus représentés, ce qui justifierait son activité et son utilisation en milieu traditionnel.

Mots-clés : Screening phytochimique, activité anticandidosique, *Pycnanthus angolensis*, Brong, Transua

Introduction

Les candidoses constituent des affections opportunistes très fréquentes et surtout chez des sujets vivant avec le VIH (Dieng *et al.*, 2005). Ces infections généralisées chez des sujets sévèrement immunodéprimés conduisent souvent à des décès. Les candidoses qui constituent les plus fréquentes des infections à levures sont naturellement présentes sur la peau et dans l'intestin. Sur la peau, elles se rencontrent fréquemment dans les plis et aux fesses, surtout chez les jeunes enfants (Tra Bi *et al.*, 2007). Ces vingt dernières années ont vu une nette recrudescence des pathologies infectieuses, aggravées depuis 1980 par l'avènement des récidives et des maladies nouvelles dont les infections à VIH et leur concert d'infections opportunistes (Ackah *et al.*, 2008 ; Pierquin, 2010). Elles sont devenues de nos jours, un réel problème de santé publique.

Par ailleurs les populations dans nos pays en développement, du fait des contextes économiques difficiles, n'ont pas toutes accès aux produits pharmaceutiques importés. De ce fait elles ont de plus en plus recours aux plantes médicinales pour se soigner.

Pour venir en aide à ces populations et surtout les immunodéprimés à tirer un réel avantage de l'usage des plantes médicinales, nous avons entrepris d'évaluer sur le plan scientifique, l'efficacité des plantes à vertus thérapeutiques anti-infectieuses afin de parvenir à la production de nouvelles molécules à base de plantes qui seraient efficaces contre les mycoses, à moindre coût et accessibles à tous.

Ainsi, par une enquête ethnobotanique menée dans le Département de Transua, plusieurs plantes médicinales antimicrobiennes ont été recensées. Parmi ces plantes, *Pycnanthus angolensis* est très recommandée dans le traitement des maladies microbiennes. Connue sous le nom vernaculaire de Tiè (en langue locale Brong dans le Département), ce faux muscadier ou arbre à suif (*Pycnanthus angolensis*) se rencontre dans la zone

forestière d’Afrique tropicale, depuis le Sénégal et la Guinée jusqu’en Angola. Ailleurs en Afrique, la plante est utilisée comme analgésique, carminative, anthelminthique, anti-inflammatoire, hémostatique et antimicrobien (Burkill, 2000). Akinyeye et Olatunya (2014) révèlent que *P. angolensis* est aussi utilisée dans le traitement de la stérilité féminine, rhumatismes, les maux de gorge et la bronchopneumonie. Les études *in vitro* menées par Kamanzi (2002) ont révélé que *Pycnanthus angolensis* (écorce de tige) n’est pas cytotoxique.

Notre étude vise à décrire, caractériser les grands groupes de composés chimiques et à évaluer l’activité anticandidosique *in vitro* de trois extraits d’écorces de tronc de *P. angolensis* (Welw.) Warb. (Myristicaceae).

Matériel

Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des écorces de tronc de *Pycnanthus angolensis*. Ces organes ont été récoltés lors d’une enquête ethnobotanique menée dans le Département de Transua (District du Zanzan, Côte d’Ivoire). Cette étude avait pour objet de recensées les plantes médicinales antimicrobiennes utilisées par le peuple Brong. *Pycnanthus angolensis* était une plante très sollicitée. Une description botanique de la plante a été faite.

Souches candidosiques

L’évaluation de l’activité anticandidosique a été faite sur deux souches de champignons. Il s’agit de deux levures du genre *Candida* : *C. albicans* et *C. tropicalis*.

Ces souches provenaient du Laboratoire de Mycologie de l’Institut Pasteur de Côte d’Ivoire (IPCI). Elles ont été prélevées sur des malades du SIDA du service des maladies infectieuses du CHU de Treichville (Tableau 1). Ces levures ont été isolées sur gélose de Sabouraud contenant du chloramphénicol (Ref : M1067-500G, lot : 0000215703) fourni par HIMEDIA Laboratories.

Tableau 1 : Les deux différentes souches de *Candida*

Souches	Code	Produits biologiques	Service
<i>Candida albicans</i>	13-304	PV	SMI-CHU (Treichville)
<i>Candida tropicalis</i>	13-298	PV	SMI-CHU (Treichville)

PV : Prélèvement Vaginal, SMI-CHU : Service des Maladies Infectieuses du Centre Hospitalier et Universitaire de Treichville.

Méthodes

Préparation des extraits

Les écorces de tronc de *Pycnanthus angolensis* récoltées et découpées, ont été rincées à l'eau et séchées à l'abri du soleil. Cette partie végétale séchée a été ensuite réduite en poudre fine grâce à un broyeur électrique IKA-MAG RTC.

La préparation des extraits (total aqueux, éthanolique 70% et résiduel aqueux) a été faite selon la méthode décrite par Béné *et al.* (2015).

Extrait total aqueux

Cent grammes (100 g) de poudre d'écorces sont homogénéisés dans 1 litre d'eau distillée dans un Blender (Mixer) à la température ambiante. L'homogénat obtenu est filtré successivement sur du coton hydrophile puis sur du papier Wattman. A l'aide d'une étuve réglée à 50°C, le solvant d'extraction est éliminé. L'évaporat sec est récupéré sous forme de poudre et constitue l'extrait total aqueux (Eta).

Partition éthanol/eau

Dix grammes (10 g) de l'Eta sont dissouts dans 200 ml d'une solution d'éthanol 70% (67,2 ml d'éthanol pur 96% pour 28,8 ml d'eau distillée) puis homogénéisés dans un Blender. Après décantation dans une ampoule à décanter, on a obtenu une phase liquide avec un résidu solide qui précipite. Le surnageant est recueilli, filtré sur du coton pour le débarrasser de tout résidu et séché à l'étuve (50°C). La poudre obtenue constitue l'extrait éthanolique 70% (Eeth).

De l'expérience précédente, le résidu solide précipité est recueilli et séché à l'étuve (50°C). La poudre obtenue constitue l'extrait résiduel aqueux (Era).

Calcul du rendement

Le rendement est la quantité d'extrait obtenue à partir de la poudre végétale. Il est exprimé en pourcentage ou est sans unité. En pratique, il est déterminé par le rapport du poids de l'extrait sec après évaporation sur le poids de la poudre de matière végétale sèche utilisée pour l'extraction, multiplié par 100. Ceci se traduit par la formule suivante : $Rd = (m \times 100) / M$. (Rd : rendement d'extraction en pourcentage, m : masse en gramme de l'extrait sec, M : masse en gramme de la poudre de drogue).

Screening phytochimique

Un screening phytochimique a été effectué afin de déceler quelques grands groupes de métabolites secondaires contenus dans l'extrait total

aqueux (Eta). Les résumés des réactions sont contenus dans le Tableau 2. Le criblage par réactions colorées a été utilisé (Mangambu *et al.*, 2014).

Tableau 2 : Tableau synthétique de groupes chimiques, réactions d'identification et indicateurs utilisés

Groupes chimiques		Réactifs d'identification	Indicateur (Réaction positive)
Stérols et polyterpènes		Anhydride acétique Acide sulfurique concentré	Apparition à l'interphase d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert.
Polyphénols		Chlorure ferrique FeCl ₃ (2%)	Apparition d'une coloration bleue noirâtre ou verte plus ou moins foncée
Flavonoïdes		Alcool chlorhydrique Copaux de Magnésium Alcool isoamylique	Dégagement de chaleur puis coloration rose-orange ou violacée
Tanins	Catéchiques	Formaldéhyde Acide chlorhydrique concentré	Précipité gélatineux (en gros flocons)
	Galliques	Acétate de sodium Chlorure ferrique	Coloration bleue-noire intense
Quinones		Ammoniaque	Apparition d'une coloration allant du rouge au violet.
Saponosines		Indice mousse	Apparition d'une mousse persistante
Alcaloïdes		Dragendorff (Solution iodo-bismuthate de potassium)	Précipité de coloration brun-rougeâtre
		Burchard (Reaction iodo-iodurée)	

Les solutions présentant ces indicateurs ont une réaction positive et cela signale la présence de groupes chimiques dans la drogue.

Activité antifongique

Préparation des milieux de culture

L'incorporation des extraits végétaux à la gélose Sabouraud a été faite selon la méthode de la double dilution en tubes penchés (Kra, 2001). Tous les extraits ont été testés séparément. Chaque série comporte 12 tubes à essai dont 10 tubes tests (contenant l'extrait végétal) et 2 tubes témoins (un sans extrait végétal, servant de témoin de contrôle de croissance du germe ; l'autre sans germe et sans extrait qui sert de témoin de contrôle de stérilité du milieu de culture).

Pour les dix tubes tests, les concentrations des extraits variaient de 50 à 0,098 mg/ml selon une liaison géométrique de raison 1/2.

Les 12 tubes de chaque série ont été stérilisés à l'autoclave (PBI STEOMATIC III) à 121°C pendant 15 minutes et ensuite inclinés avec petit culot à la température de la salle pour permettre le refroidissement et la solidification de la gélose (Kporou *et al.*, 2009).

Evaluation de l'activité Antifongique

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 platine, puis homogénéisés dans 10 ml d'eau distillée stérilisée. On obtient ainsi une 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 stérile pour avoir un volume final de 10 ml.

La culture des germes sur les milieux précédemment préparés a été faite par l'ensemencement en stries transversales serrées jusqu'à épuisement de 1000 levures de chaque souche de *Candida* équivalent à 10 μ l de la suspension 10^{-1} (Holt, 1975). Les cultures ainsi réalisées ont été incubées à la température de la salle pendant 72 heures.

Dénombrement des colonies

Après le temps d'incubation, les colonies de germes fongiques ont été dénombrées par comptage direct grâce à un stylo compteur de colonies de type Geiger. La croissance dans les 10 tubes expérimentaux a été évaluée en pourcentage de survivance, calculé par rapport à 100% de survivance dans le tube témoin de contrôle de la croissance (Zirihi *et al.*, 2003). La méthode de calcul du pourcentage de survivance s'est faite selon la formule suivante :

$$S = (n/N) \times 100$$

(S = Survivance de *Candida albicans* en pourcentage, N = nombre de colonies dans le tube témoin, n = Nombre de colonies dans le tube expérimental).

Paramètres antifongiques recherchés

Le traitement des données a permis de déterminer les paramètres antifongiques suivants :

- **La CMI** (Concentration Minimale Inibitrice) : c'est la concentration d'extrait dans le tube pour lequel il n'y a aucune croissance visible à l'œil nu.
- **La CI₅₀** (Concentration pour cinquante pour cent d'Inhibition) : c'est la concentration qui donne 50% d'inhibition. Elle est déterminée graphiquement à partir du tracé de courbe de sensibilité de chaque extrait sur *C. albicans*.
- **La Fongicidie (CMF ou CFS)** : après les 72h d'incubation, la surface de la gélose contenue dans les tubes tests ayant résisté à *C. albicans* est légèrement prélevée,ensemencée à l'aide d'une anse de platine sur gélose neutre puis incubée pendant 72h à la température de la salle. Deux cas peuvent se présenter :

- présence de colonies de *C. albicans*, l'extrait est dit **fongistatique**. On détermine ainsi **la CFS** (Concentration Fongistatique).
- absence de colonies de *C. albicans*, l'extrait est dit **fongicide**. Cette dernière observation permet de déterminer **la CMF** (Concentration Minimale Fongicide qui donne 99,99 % d'inhibition comparativement au tube témoin de contrôle de croissance).
- **La courbe de sensibilité** : elle représente l'évolution de la sensibilité de *C. albicans* en fonction des variations de la concentration de l'extrait.
- **Le rapport d'efficacité** : il permet de déterminer le nombre de fois qu'un extrait donné est n fois plus efficace qu'un autre. Pour un paramètre antifongique donné (ici la CMF), ce rapport est calculé en divisant la valeur la plus élevée par la valeur la plus basse.

Résultats

Etude botanique de Pycnanthus angolensis (Welw.) Warb. (Myristicaceae)

Synonyme : *Myristica angolensis* Welw. (1852)

Nom vernaculaire : Brong : Tiè

La famille des Myristicaceae renferme, généralement, des arbres.

Pycnanthus angolensis est un arbre atteignant 35 m de hauteur; entaillée, l'écorce, brun-grisâtre, exsude un liquide jaune ou rose. Les feuilles, alternes, oblongues, acuminées, cordées à la base, feutrées en dessous, mesurent, de 15- 30 cm de longueur sur 6-11 cm de largeur ; elles portent de nombreuses nervures latérales saillantes en dessous (Figure 1). Les inflorescences sont des panicules. Les fleurs, minuscules, sont groupées en de petits capitules. Les fruits, drupacés, oblongs, s'ouvrent en deux valves charnues ; ils mesurent de 3- 4 cm de longueur et renferment une graine oblongue entourée d'un arille rose ou rouge (Zirihi, 2006).

Ecologie

Pycnanthus angolensis est une espèce guinéo-congolaise, on la trouve aussi bien dans les formations secondaires que dans les forêts primaires.



Rameau feuillé, b. Fruits, c. Inflorescences (Planche Zirihi , 2006) Feuillage de *P. angolensis*

Figure 1 (A et B) : *Pycnanthus angolensis* (Welw.) Warb.

Extraction

Rendement de l'extrait total aqueux

Pour cent (100) grammes de poudre d'écorces de *P. angolensis*, nous avons obtenu $7,5 \pm 0,25$ grammes d'extraits totaux aqueux soit $Rd = 7,5 \pm 0,25 \%$.

Rendement de la partition éthanol/eau

Pour cinq (5) grammes de Eta fractionnés, on obtient : $1,76 \pm 0,03$ g de Eeth ($Rd = 35,2 \pm 0,6\%$) et $2,17 \pm 0,07$ g de ERA ($Rd = 43,4 \pm 1,40\%$).

Screening phytochimique

La méthode du screening phytochimique utilisé a permis de mettre en évidence la présence de polyphénols, de flavonoïdes, de tanins (catéchiques et galliques), de saponines et d'alcaloïdes (Tableau 3).

Tableau 3 : Screening phytochimique de l'extrait total aqueux de *P. angolensis* (Ea)

Groupes chimiques	Stérols et polyterpènes	Polyphénols	Flavonoïdes	Tanins		Saponosines	Alcaloïdes	
				Cat.	Gal.		B	D
Ea	-	+	+	+	-	+	+	+

Cat. : Catéchiques , Gal. : Galliques , B : Bouchardat, D : Dragendorff.

+ Présence du métabolite secondaire, - Absence du métabolite secondaire

Effet des extraits de *P. angolensis* sur les levures

Après 72h d'incubation, on observe comparativement au tube témoin, une baisse progressive du nombre de colonies de levures au fur et à mesure que les concentrations des extraits Eeth augmentent dans les tubes expérimentaux. Les extraits Eta et Era ont été inactifs sur les deux souches de *Candida* aux différentes concentrations de cette étude.

Les courbes de l'extrait (Eeth) sur les deux levures présentent une allure décroissante (Figure 2). Néanmoins, la pente de *C. albicans* est plus forte que celle de *C. tropicalis* parce que plus proche de l'axe des ordonnées. Les deux courbes coupent l'axe des abscisses aux concentrations de 25 mg/ml pour les deux souches de *Candida*. Cela illustre la sensibilité dose dépendante des deux sources de *Candida*.

Les courbes présentent deux phases : une phase décroissante et une phase stationnaire qui se confond avec l'axe des abscisses. L'abscisse des points d'intersection de ces courbes avec l'axe des abscisses détermine la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) qui est la même valeur ($25 \pm 0,0$ mg/ml) pour les deux levures. Ces antifongigrammes permettent également de déterminer graphiquement les CI_{50} ($CI_{50} C.albicans = 1,45 \pm 0,05$ mg/ml et $CI_{50} C. tropicalis = 5,55 \pm 0,15$ mg/ml).

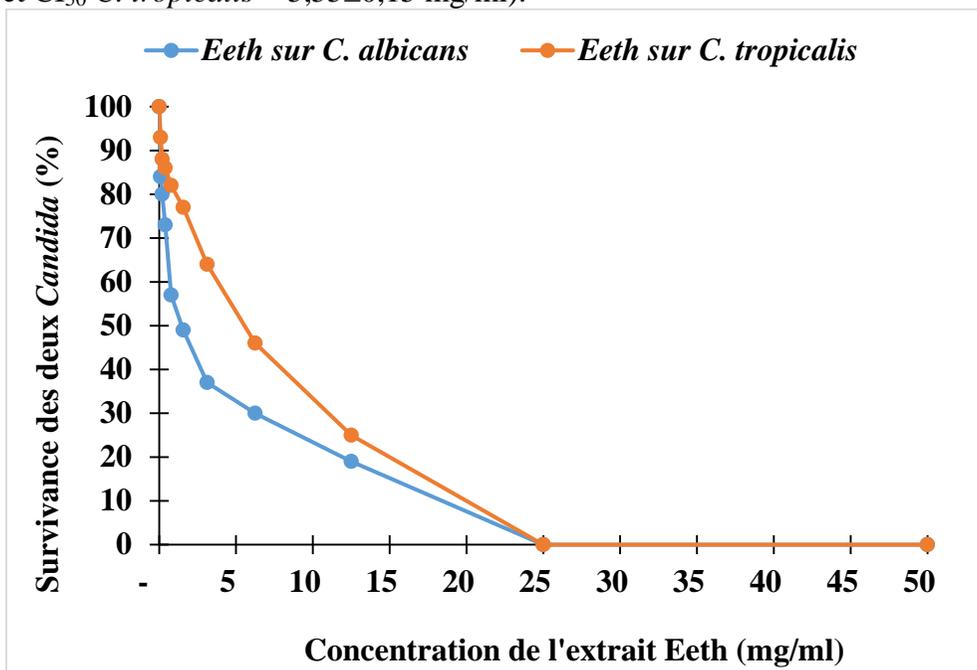


Figure 2 : Courbes de sensibilité de *C. albicans* et *C. tropicalis* à l'extrait Eeth de *P. angolensis*

Dans le Tableau 2 sont consignés les paramètres antifongiques (CMI, CI_{50} et CMF) des extraits.

Tableau 2 : Valeurs des paramètres antifongiques des trois extraits de *P. angolensis* (Pa) à 72 heures d'incubation.

Souches de <i>Candida</i>	Extraits de <i>P. angolensis</i>	Paramètres antifongiques			Fongicidie
		CMI (mg/ml)	CI ₅₀ (mg/ml)	CMF (mg/ml)	
<i>C. albicans</i>	Eta et Era	Pas d'inhibition, pas de CI ₅₀ ni de CMF			
	Eeth	25±0,0	1,45±0,05	50±0,0	Fongicide
<i>C. tropicalis</i>	Eta et Era	Pas d'inhibition, pas de CI ₅₀ ni de CMF			
	Eeth	25±0,0	5,55±0,15	50±0,0	Fongicide

Discussion

L'analyse des résultats montre que *Candida albicans* et *Candida tropicalis* sont résistants à Eta et Era et sensibles à l'Eeth selon une relation dose-réponse aux différentes concentrations considérées dans notre étude.

Cette étude montre que la partition de Eta par le solvant éthanol/eau (67,2-28,8) est une méthode permettant de concentrer mieux les principes actifs. En effet, l'eau est un solvant qui extrait un grand groupe de composés chimiques. Cet ensemble de molécules de diverses tailles masquerait l'activité des molécules actives présentes dans Eta (effet de masse), (Béné *et al.*, 2015). Ainsi, après la partition éthanol/eau, l'Eeth concentre donc beaucoup de principes actifs de faibles et de moyennes tailles qui sont des molécules solubles dans l'éthanol. Ces composés chimiques pourraient être soit des terpènes, soit des alcaloïdes, soit des flavonoïdes, soit des iridoïdes et soit des huiles végétales (Bagré *et al.*, 2011). Ils peuvent alors mieux exprimer leur potentiel antifongique, d'où l'activité observée avec l'Eeth.

Le screening phytochimique de l'Eta indique la présence de composés polyphénoliques, de flavonoïdes, de tanins (catéchiques), de saponines et d'alcaloïdes à différents degrés de concentration. De même Ukwubile *et al.* (2014) et Akinyeye et Olatunya (2014) dans leur étude ont mis en évidence la présence de ces composés dans les écorces de *P. angolensis*. Ces groupes de molécules pourraient être à la base de l'effet antifongique observé. En effet, les polyphénols par exemple sont reconnus comme des molécules antibactériennes et antifongiques.

Conclusion

L'enquête ethnobotanique a permis de révéler *Pycnanthus angolensis*, plante médicinale antimicrobienne utilisée par les Brong du Département de Transua (Côte d'Ivoire). L'extrait éthanolique 70% (Eeth) a une activité anticandidosique sur *Candida albicans* et *Candida tropicalis*. Eeth est fongicide pour les deux souches de *Candida* à 50±0,0 mg/ml. Le screening phytochimique a mis en évidence la présence de composés chimiques pouvant justifier cette activité et leur utilisation en milieu traditionnel.

References:

- Ackah B.A.A.J., Kra A.M.K., Zirihi G.N., Guédé-Guina F. Evaluation de l'activité antifongique de TEKAM, un extrait de plante, sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. Rev. Ivoir. Sci. Technol., 11 : 119-129, 2008.
- Akinyeye R.O., Olatunya A.M. Phytochemical screening and mineral composition of the bark of some medicinal trees in Ondo State, Nigeria. Medicinal and Aromatic Plant Research Journal, 2(3) : 44-49, 2014.
- Bagré I., Bahi C., Ouattara K., Zirihi G.N., Djaman A.J., Coulibaly A., N'Guessan J.D. Étude botanique et exploration de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh. sur la croissance *in vitro* de *Cryptococcus neoformans*. Phytothérapie, 9 : 136-141, 2011.
- Béné K., Camara D., Fofié N'G.B.Y. et Zirihi G.N. Étude ethnobotanique, activité antifongique *in vitro* sur *Candida albicans* et toxicité sur les cellules HFF de *Harrisonia abyssinica* Oliv. (Simaroubaceae), une plante de la pharmacopée ivoirienne. Journal of Applied Biosciences 94 : 8815-8824, 2015.
- Burkill H.M. The useful plants of West Tropical Africa. Royal botanic Gardens, 2 : 144-150, 2000.
- Dieng Y., Faye-Niang M.A., Ndour-Diop A. Sensibilité aux antifongiques des souches de *Candida* responsables de candidoses oropharyngées chez des sujets vivant avec le VIH. Sidanet ; 2(3) : 835-838, 2005.
- Holt J.R. Laboratory test of antifungal drugs. J. of Clinical Pathology, 1(18) : 767-774, 1975.
- Kamanzi Atindehou K. Plantes médicinales de Côte d'Ivoire : Investigations phytochimiques guidées par des essais biologiques. Doctorat d'État ès-Sciences en Biologie Végétale-Phytochimie. Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, 189p, 2002.
- Kporou K.E., Kra A.K.M., Ouattara S., Guédé-Guina F., Djaman A.J., Evaluation de l'activité antifongique de *Mitracarpus scaber* sur *Candida tropicalis*. J. sci. pharm. biol., 10(1) : 13-20, 2009.
- Kra A.K.M., Evaluation et amélioration par séquençage chromatographique d'une action antifongique de MISCA contre *Aspergillus fumigatus*. Thèse. Pharma, Bioch. Univ. Abidjan, 126 p, 2001.
- Mangambu M. J. De D., Mushagalusa K. F., Kadima N. J. Contribution à l'étude phytochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu et ses environs (Sud-Kivu, R. D. Congo). Journal of Applied Biosciences 75 : 6211-6220, 2014.
- Pierquin A.-L. Mycoses opportunistes et immunodépression. Thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1, France. 96 p, 2010.
- Tra Bi F.H., Kouamé N'G.F., Favel A., Fallague K. Activité antifongique de quelques plantes de la flore ivoirienne. Sciences & Nature, 4(2) : 117-122, 2007.

Ukwubile C.A. Phyto-chemical screening and anti-biotics potentials of *Pycnanthus angolensis* (Welw.) Warb. (Myristicaceae) bark juice. Journal of Medical and Applied Biosciences, 4 : 10-15, 2012.

Zirihi G.N. Etudes botanique, pharmacologique et phytochimique de quelques plantes médicinales antipaludiques et/ou immunogènes utilisées chez les Bétés du Département d'Issia, dans l'Ouest de la Côte-d'Ivoire. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire, 181 p,2006.

Zirihi G.N., Kra A.K.M., Guédé-Guina F. Evaluation de l'activité Antifongique de *Microglossa pyrifolia* (LAMARCK) O. KUNTZE (ASTERACEAE) « PYMI » sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. Revue de Médecine et de Pharmacopées Africaines, 17 : 11-18, 2003.