

Article original

Pharmacognosie

Étude botanique et exploration de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh. sur la croissance in vitro de *Cryptococcus neoformans*

I. Bagre¹, C. Bahi¹, K. Ouattara¹, N. Zirihi Guede², A.J. Djaman^{1,3}, A. Coulibaly¹, J.D. N'Guessan¹

¹Laboratoire de pharmacodynamie biochimique, UFR biosciences, université de Cocody, 22 BP 582, Abidjan 22, Côte-d'Ivoire

²Laboratoire de botanique, UFR biosciences, université de Cocody, 22 BP 582, Abidjan 22, Côte-d'Ivoire

³Institut Pasteur de Côte-d'Ivoire, 01 BP 490, Abidjan 01, Côte-d'Ivoire

Correspondance : bagrefreefr@yahoo.fr

Résumé : *Morinda morindoides* est une plante qui est citée de façon récurrente dans plusieurs prescriptions thérapeutiques. Afin de mieux connaître cette plante et de pouvoir l'identifier sur le terrain, nous avons, dans cette étude, fait sa description botanique suivie d'une exploration de son activité antifongique. Il ressort de cette étude que *Morinda morindoides* (Rubiaceae) est une espèce guinéo-congolaise qui se retrouve dans les lisières des forêts. C'est une liane grimpante avec des feuilles opposées et possédant des fruits bosselés. Cette plante possède une activité antifongique in vitro sur *Cryptococcus neoformans*. Parmi les extraits testés, la fraction 1 (F1) (CMF = 0,78 mg/ml ; CI₅₀ = 0,08 ± 0,02 mg/ml) est la plus active.

Mots clés : Activité antifongique – *Cryptococcus neoformans* – Extraits végétaux – *Morinda morindoides*

Botanical survey and in vitro exploration of antifungal activity of *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh. on the growth of *Cryptococcus neoformans*

Abstract: *Morinda morindoides* is a plant that is mentioned in a recurrent way in several therapeutic prescriptions. In order to know this plant and be able to identify it on the land, we have, in this study, made its botanical description followed of an exploration of its antifungal activity. It is evident from this study that *Morinda morindoides* (Rubiaceae) is a guineo-congolaise species that meets in the borders of the forests. It is a trailing liana with opposite leaves and properties of the bumpy fruits that yellow to maturity. This plant possesses an in vitro antifungal activity on *Cryptococcus neoformans*. Among the tested extracts, the fraction 1 (F1) [MFC = 0.78 mg/ml; IC₅₀ = 0.08 ± 0.02 mg/ml] is the most active.

Keywords: Antifungal activity – *Cryptococcus neoformans* – *Morinda morindoides* – Plant extract

Introduction

Avec l'avènement du sida, on assiste à une progression rapide de plusieurs maladies dites infections opportunistes. Parmi ces infections, les candidoses, les cryptococcoses et les aspergilloses sont des mycoses en très fortes recrudescences. Ces maladies sont devenues de nos jours un réel problème de santé publique. Elles sont de plus en plus difficiles à éradiquer et leurs fréquences en très forte progression [12,13].

Les 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 cela 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. C'est ainsi que notre choix s'est porté sur *Morinda morindoides*, espèce végétale citée de manière récurrente dans les formulations thérapeutiques, pour une exploration antifongique. Il faut noter que *Morinda morindoides* a fait l'objet de plusieurs études. Entre autres études, Meite et al. [19] ont montré que l'extrait acétatique (Eac) de *Morinda morindoides* a une activité anti-diarrhéique chez des rats dont la diarrhée a été provoquée par l'huile de ricin. La fraction chromatographique F5 de *Morinda morindoides* manifeste une cardio-inhibition qui se caractérise par un effet inotrope négatif et chronotrope négatif, et pourrait contenir des substances cholinomimétiques indirectes qui accroissent la cardio-inhibition induite par les substances cholinomimétiques directes [21].

La fraction chromatographique F5 de *Morinda morindoides* induit également une hypotension dose-dépendante réversible et en partie (54 %) inhibée par l'atropine [20].

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

- 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 [7,8,9,10,11] ;

- quatre iridoïdes : gaertnéroside ; acide gaertnérosique ; méthoxygaertnéroside ; époxygaertnéroside [5,6] ;

- un stérol : stigmastérol [22].

La cible biologique choisie est *Cryptococcus neoformans* qui est une levure arrondie ou ovale de 4 à 6 µm entourée d'une capsule mucilagineuse. Ce champignon est un pathogène opportuniste, très virulent en cas de baisse d'immunité, notamment chez le malade atteint du VIH. Il peut induire des infections cutanées, systémiques et neuroméningées comme la méningoencéphalique subaiguë et la septicémie cryptococcique. *Cryptococcus neoformans* est aussi connue comme étant particulièrement pernicieuse et rebelle aux thérapeutiques et ayant développé une résistance vis-à-vis des médicaments modernes (amphotéricine B, terbinafine, fluconazole, etc.) [12-14,23]. Ces raisons justifient le choix de cette souche pour évaluer le pouvoir antifongique des extraits de *Morinda morindoides*.

Cet article a un double objectif :

- faire une description botanique complète de cette plante afin de faciliter son identification sur le terrain ;
- faire une exploration antifongique, étude qui n'est pas encore réalisée.

Matériel et méthodes

Étude monographique de la plante étudiée

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

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

Préparation des extraits

Le matériel végétal est constitué de feuilles de *Morinda morindoides* récoltées dans la région du Centre-Ouest de la Côte-d'Ivoire. Ces feuilles ont été lavées, séchées à l'abri du soleil et rendues en poudre fine grâce à un broyeur électrique de type IKA Labortechnik (type MFC). La poudre a été

extraite selon la méthode de Zirihi et Kra [29] comme suit : 100 g de poudre de plante sont extraits à l'eau distillée par broyage dans un mixeur (Blender). L'homogénat obtenu est essoré dans un carré de tissu, filtré successivement deux fois sur coton hydrophile puis sur papier Whatman 3 mm. Le volume du filtrat obtenu est d'abord réduit à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Büchi à la température de 60 °C. La pâte de couleur marron est recueillie et lyophilisée, et l'extrait obtenu ainsi est l'extrait total aqueux (Eaq) [18,19]. À l'aide d'un agitateur magnétique, 5 g d'Eaq sont dissous dans 100 ml d'une solution hydroalcoolique (70 % éthanol, 30 % eau distillée). La phase supérieure alcoolique obtenue est recueillie, réduite et lyophilisée ; c'est l'extrait éthanolique (Eeth) 70 %. Cet extrait a été partitionné dans un mélange eau distillée/acétate d'éthyle (v/v). Les deux phases obtenues ont été séparées à l'aide d'une ampoule à décanter et lyophilisées. La fraction acétate d'éthyle a été notée Eac et la fraction aqueuse a été notée extrait acétatique H₂O (Eac H₂O).

La fraction acétatique (Eac), présentant la meilleure activité antifongique, a été chromatographiée sur colonne de gel de silice (Merck-gel de silice 60 [0,063-0,200 mm]). L'éluant est constitué du mélange (dichlorométhane/méthanol : 95/5). Quatre fractions ont été obtenues en fonction de la coloration. F1 (jaune or), F2 (vert foncé), F3 (vert clair) et F4 (jaune orangé).

Les cinq extraits Eaq, Eeth, Eac, Eac H₂O et F1 ont été testés sur la croissance in vitro de *Cryptococcus neoformans*.

Souche microbienne et réalisation des tests in vitro

La souche de *Cryptococcus neoformans* utilisée au cours de notre expérimentation nous a été fournie par le laboratoire de mycologie de l'UFR des sciences médicales de l'université de Cocody (Abidjan, Côte-d'Ivoire). Cette souche a été isolée sur des malades du sida. L'incorporation des différents extraits de *Morinda morindoides* à la gélose Sabouraud (69571 DARDILLY ADM Y42310, fournie par OXOID LTD) a été faite selon la méthode de la double dilution, en tubes penchés. Les séries comportent, pour chaque extrait, neuf tubes à essai dont sept tubes tests contenant les extraits végétaux et deux tubes témoins sans extraits végétaux (l'un servant de témoin de contrôle de croissance des germes ; l'autre sans germes servant de témoin de contrôle de la stérilité du milieu de culture). Pour les neuf tubes tests, les concentrations varient de 300 à 4,687 mg/ml pour l'Eaq, de 50 à 0,78 mg/ml pour l'Eeth, l'Eac et l'Eac H₂O et de 3,125 à 0,0487 mg/ml pour la F1 (selon une liaison géométrique de raison 1/2). Après l'incorporation des extraits, tous les neuf tubes de chaque série sont stérilisés à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes et ensuite inclinés avec petit culot à la température de la salle pour les refroidir et solidifier la gélose [1,15-17,28,29].

Pour chaque série des différents extraits, les tests antifongiques ont été réalisés par la culture de 1 000 cellules de *Cryptococcus neoformans* sur les milieux précédemment

préparés. Chaque test a été répété cinq fois pour plus de fiabilité. Toutes les cultures ont été incubées à 30 °C pendant 48 heures. Les colonies de *Cryptococcus neoformans* ont été ensuite comptées, et la croissance dans les neuf tubes expérimentaux de chaque série a été évaluée en pourcentage de survivance, calculée par rapport à 100 % de survivance dans le tube témoin de contrôle de la croissance [17,28].

Résultats

Étude monographique de la plante

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 interpétiolaires, 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 ; un androcée inséré sur la corolle et un gynécée infère habituellement bicarpellé. Les fruits sont des capsules, des baies ou des drupes.

Morinda morindoides (Baker) Milne-Redh., Kew Bull. 1944 : 31 (1947) ; Hepper, FWT, 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 (Fig. 1) :

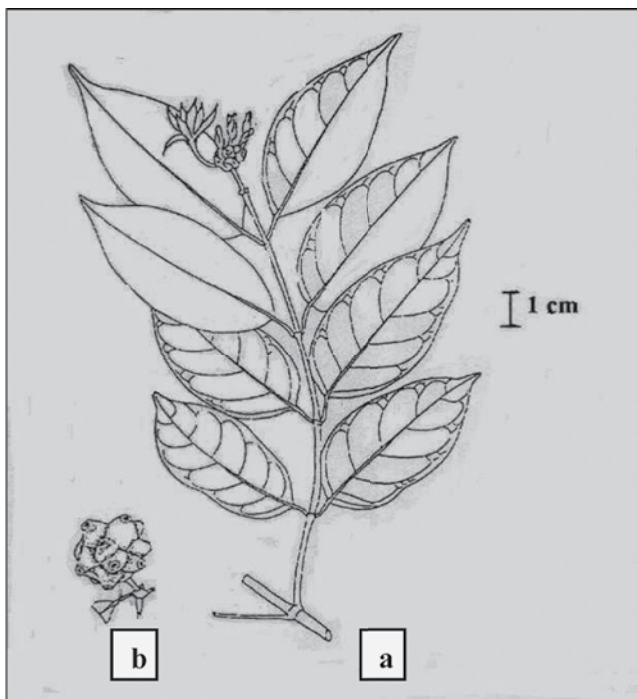


Fig. 1. *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh. (Rubiaceae). a : rameau feuillé avec fleurs ; b : fruits

le limbe porte, environ, six 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.

Répartition géographique

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

Utilisations thérapeutiques

- Les Bétés d’Issia (Centre-Ouest de la Côte d’Ivoire) l’appellent *Zèllékelé* et l’utilisent comme antifongique [28] ;
- une décoction aqueuse de feuilles fraîches constitue un remède traditionnel typique employé pour le traitement de la malaria, des vers intestinaux et des amibiases [18,24,26] ;
- ses extraits possèdent une activité antiprotozoaire, particulièrement sur *Entamoeba histolytica*. [4] ;
- elle est traditionnellement utilisée dans le cadre des syndromes diarrhéiques dans la région de Daloa (Côte-d’Ivoire) [2,3].

Tests antifongiques

Après 48 heures d’incubation à 30 °C, on observe comparativement au témoin, une diminution progressive du nombre de colonies au fur et à mesure que la concentration des extraits augmente dans les tubes expérimentaux. Cela s’observe pour toutes les séries.



Fig. 2. *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh. (Rubiaceae). a : rameau feuillé avec fleurs

Les données expérimentales traduites sous forme de courbes sont présentées sur la Figure 3. Les valeurs des CI_{50} (concentration pour 50 % d'inhibition) et de CMF (concentration minimale fongicide) graphiquement déterminées sont consignées dans le Tableau 1. De façon générale, toutes les courbes obtenues présentent une allure régulièrement décroissante, avec des pentes plus ou moins fortes selon les extraits. À part la courbe de l'Eac H₂O, les autres courbes coupent l'axe des abscisses à différents niveaux selon les extraits.

Discussion

Sur le plan botanique, *Morinda morindoides* est une rubiacée qui présente toutes les caractéristiques de cette famille. Elle se développe dans la lisière des forêts, surtout après le défrichage. Jeunes, ses feuilles sont très larges et deviennent petites avec l'âge.

Tableau 1. Valeurs des paramètres antifongiques comparées des extraits de *Morinda morindoides* après 48 heures d'incubation à 30 °C

| | Paramètres antifongiques des extraits (mg/ml) | |
|----------------------|---|-------|
| | CI_{50} | CMF |
| Eaq | 14,3 ± 2,4 | 300 |
| Eeth | 6,3 ± 1,5 | 25 |
| Eac H ₂ O | > 300 | > 300 |
| Eac | 1,35 ± 0,8 | 3,125 |
| F1 | 0,08 ± 0,02 | 0,78 |

n = 5.

Cette étude permettra d'identifier sur le terrain cette plante sans se tromper. Cela s'avère positif, car *Morinda morindoides* renferme plusieurs propriétés thérapeutiques qu'il va falloir exploiter.

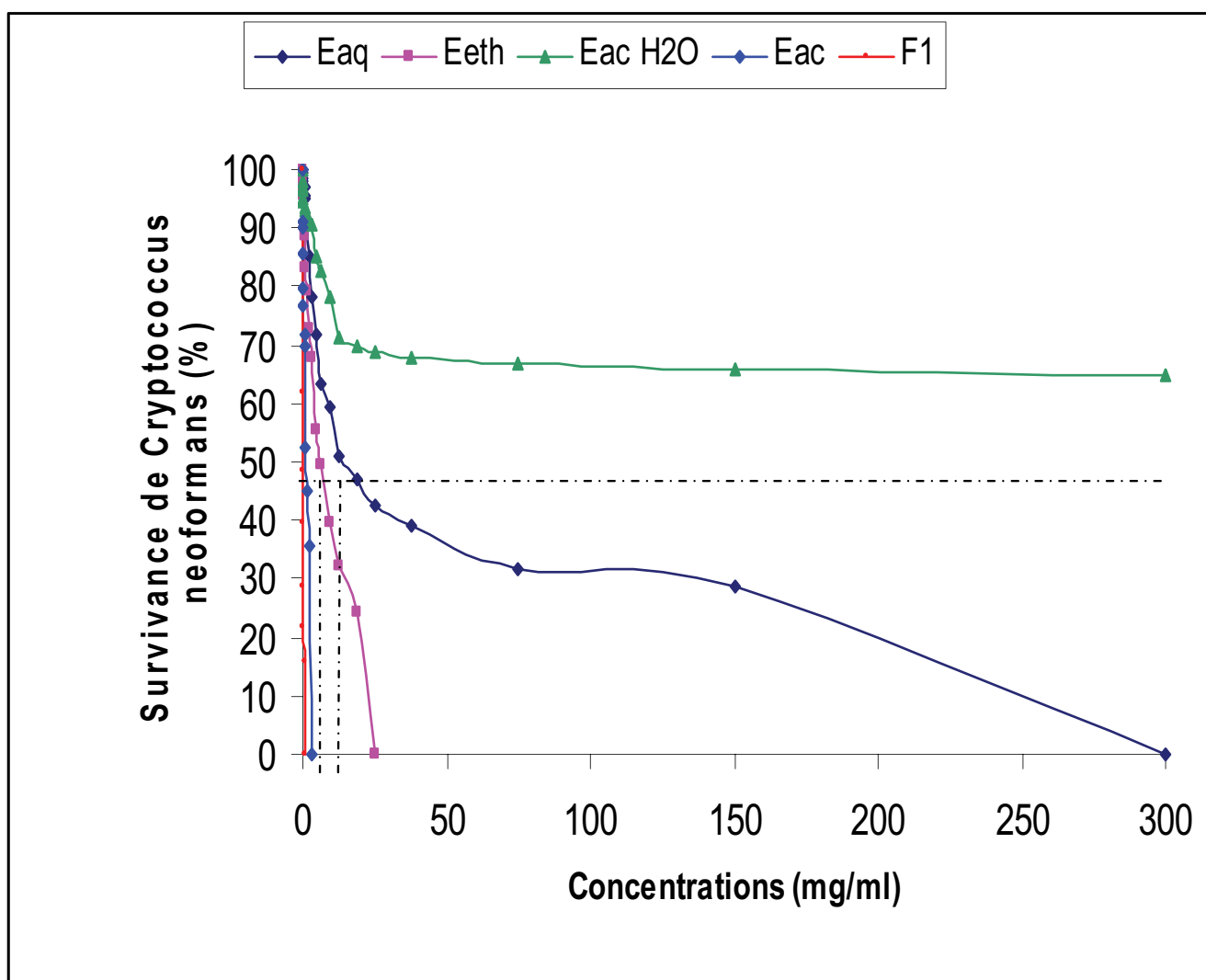


Fig. 3. Sensibilité de *Cryptococcus neoformans* aux extraits de Eaq, Eeth, Eac H₂O, Eac et F1

Sur le plan microbien, l'analyse de nos résultats montre que *Cryptococcus neoformans* est sensible à tous les extraits de notre étude. Nos résultats montrent qu'il y a une diminution progressive du nombre de colonies au fur et à mesure que la concentration des extraits augmente dans les tubes. *Cryptococcus neoformans* est donc sensible aux extraits selon une relation dose-réponse. (Fig. 3 et Tableau 1).

Après 48 heures d'incubation à 30 °C, on observe une inhibition nette et effective dans nos séries de tubes à différentes concentrations. La décroissance de toutes les courbes de sensibilité illustre bien que les extraits sont actifs selon une relation dose-réponse.

Les résultats de cette étude montrent que la partition de l'extrait aqueux dans le mélange de solvants éthanol 70 %, eau distillée 30 % puis la partition de l'extrait alcoolique dans un second mélange de solvants acétate d'éthyle-eau, aboutit à un extrait acétalique qui fractionné sur gel de silice donne une fraction qui améliore l'activité anticryptococcique des extraits de *Morinda morindoides*.

Le rapport d'efficacité établi sur la base des CMF, montre que :

- $CMF_{Eaq}/CMF_{Eeth} = 300/12,5 = 24$;
- $CMF_{Eaq}/CMF_{Eac} = 300/3,125 = 96$;
- $CMF_{Eeth}/CMF_{Eac} = 12,5/3,125 = 4$;
- $CMF_{Eaq}/CMF_{F1} = 300/0,78 = 384$;
- $CMF_{Eac}/CMF_{F1} = 3,125/0,78 = 4$.

Ce qui signifie que l'extrait acétalique est 96 fois plus actif que l'Eaq et quatre fois plus actif que l'Eeth 70 % et que la F1 est quatre fois plus active que l'extrait acétalique et 384 plus active que l'Eaq. Nous déduisons donc de cette analyse que la fraction 1 (F1) est la plus active, car les valeurs de ses paramètres antifongiques (CI_{50} , CMF) sont non seulement les plus basses, mais aussi elle améliore de façon significative (384 fois) l'activité de l'extrait aqueux de base.

Cet extrait concentre donc beaucoup plus de principes actifs. On peut donc déduire que la méthode d'extraction qui met en œuvre des partitions successives des extraits dans des mélanges de solvants permet une meilleure concentration des principes actifs. Ces principes actifs qui sont des molécules solubles dans l'éthanol et l'acétate d'éthyle pourraient être soit des terpènes, soit des alcaloïdes, soit des flavonoïdes, soit des iridoïdes et soit des huiles végétales.

À la lumière de l'ensemble des résultats, nous pouvons dire que notre démarche est acceptable, car elle nous a permis d'améliorer considérablement l'activité anticryptococcique de *Morinda morindoides* en passant de l'Eaq à la F1. La F1 étant 384 fois plus active que l'Eaq.

Conclusion

Cette étude nous a permis de montrer que les extraits de *Morinda morindoides* que nous avons préparés possèdent une activité antifongique sur *Cryptococcus neoformans*. À 48 heures d'incubation à 30 °C, ils possèdent tous une

activité inhibitrice effective obtenue à 300 mg/ml pour l'Eaq, 25 mg/ml pour l'Eeth, 3,125 mg/ml pour l'Eac et 0,78 mg/ml pour la F1. Cette étude montre également que la combinaison de solvants (EtoH 70 %, H₂O 30 % et acétate d'éthyle-eau) est la méthode qui permet de concentrer mieux les principes actifs. Sur le plan botanique, *Morinda morindoides* (rubiaceae) est une liane grimpante dont les feuilles sont opposées, oblongues elliptiques qui mesure 6–15 cm de longueur sur 3–8 cm de largeur. Cette plante est beaucoup utilisée en Afrique comme plante médicinale. Elle a fait l'objet de plusieurs études menées par des chercheurs africains. Ainsi, ses activités antiplasmodiale [25–27], antiprotozoaire [4,27] et antibactérienne ont été étudiées.

Ces études ont révélé que *Morinda morindoides* a une activité antipaludique, antiprotozoaire et antibactérienne.

L'étude que nous avons réalisée met en évidence l'activité antifongique de *Morinda morindoides* qui n'avait pas été auparavant étudiée.

L'analyse des résultats montre que *Morinda morindoides* présente donc une bonne activité antifongique. Cette plante à reproduction facile mérite que l'on s'intéresse beaucoup plus à elle, car elle représente un élément de choix à exploiter comme antimicrobien.

Une analyse plus poussée par triphytochimique, suivie de chromatographie sur colonne et sur couche mince, nous permettra d'isoler les différentes molécules contenues dans la F1 de *Morinda morindoides*, afin de préciser la nature des molécules à activité antifongique.

Liste des abréviations

- CI_{50} : concentration inhibitrice pour 50 %
- CMF : concentration minimale fongicide
- Eac : extrait acétalique
- Eac H₂O : extrait acétalique aqueux (phase aqueuse du mélange acétate d'éthyle/eau)
- Eaq : extrait aqueux
- Eeth : extrait éthanolique
- EtoH : éthanol
- F1 : fraction 1
- F2 : fraction 2
- F3 : fraction 3
- F4 : fraction 4
- UFR : unité de formation et de recherche

Références

1. Ajello L, Georg LK, Kaplan W, Kaufman L (1963) Laboratory manual for medical mycology (2nd Edition). John Wiley and sons, New York, USA, 158 p
2. Bahi C, Djaman AJ, Nguessan JD, et al. (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 Sci Pharm Biol 1: 36–43

3. Bahi C, Nguessan JD, Guédé Guina F (2000) Mise en évidence d'une action myorelaxante et cholinolytique de BGG, un antidiarrhéique de source naturelle. *Afr Biomed* 1: 11-8
4. Cimanga RK, Kambou K, Tona L, et al. (2006) Cytotoxicity and in vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents. *J Ethnopharmacol* 107: 83-90
5. Cimanga K, Kambu K, Tona L, et al. (2006) Antiamoebic activity of iridoids from *Morinda morindoides* leaves. *Planta Medica* 72: 751-3
6. Cimanga K, Hermans N, Apers S, et al. (2003) Complement-inhibiting iridoids from *Morinda morindoides*. *J Nat Prod* 66: 97-102
7. Cimanga K, De Bruyne T, Hu JP, et al. (1999) Constituents from *Morinda morindoides* leaves as inhibitors of xanthine oxidase and scavengers of superoxide anions. *Pharm Pharmacol Commun* 5: 419-24
8. Cimanga K (1997) The biologically active constituents from two African medicinal plants. *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schlechter (Periplocaeeae) and *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redhead (Rubiaceae). PhD Thesis, University of Antwerp (UIA), Antwerp, Belgium, 210 p
9. Cimanga K, De Bruyne T, Van Poel B, et al. (1997) Complement-modulating properties of a kaempferol 7-O-rhamnosyl-sophoroside from the leaves of *Morinda morindoides*. *Planta Medica* 63: 220-3
10. Cimanga K, De Bruyne T, Lasure A, et al. (1995) Flavonoid O-glycosides from the leaves of *Morinda morindoides*. *Phytochemistry* 38: 1301-3
11. Cimanga K, De Bruyne T, Lasure A, et al. (1995) In vitro anticomplementary activity of constituents from *Morinda morindoides*. *J Nat Prod* 58: 372-8
12. Dromer F, Dupont B (1996) The increasing problem of fungal infections in the immunocompromised host. *J Mycol Med* 6: 1-6
13. Dupont BF, Dromer F, Improvisi L (1996) The problem of azole resistance in *Candida*. *Commentary. J Mycol et de Med* 6: 12-9
14. Garrigues JC, Perez E, Linas MD, et al. (1996) Tests in vitro et études quantitatives de relation structures-activité (QSAR) pour la détermination des propriétés anti-aspergillaires d'une série d'analogues de glycolipides. *J Mycol Med* 6: 111-7
15. Guédé Guina F, Vangah-Manda M, Harouna D, Bahi C (1993) Potencies of misca, a plant source concentrate against fungi. *J Ethnopharmacol* 14: 45-53
16. Guédé Guina F, Wangah-Manda M, Bonga GM, De Souza C (1995) Activité antimicrobienne d'un extrait végétal contre les germes opportunistes au cours du sida. *Rev Med Pharmacol Afr* 1: 13-9
17. Holt RJ (1975) Laboratory test of antifungal drugs. *J Clin Pathol* 2: 767-74
18. Kambou K (1990) Éléments de phytothérapie comparée. Plantes médicinales africaines, CRP-Kinshasa, pp 61-74
19. Meite S, Nguessan JD, Bahi C, et al. (2009) Antidiarrheal activity of the ethyl acetate extract of *Morinda morindoides* in rats. *Trop J Pharm Res* 8(3): 201-7
20. Nguessan JD, Trébissou JND, Bahi C, et al. (2004) Effets de BGG, F5 (fraction chromatographique de *Morinda morindoides*) sur la pression artérielle carotidienne de lapin. *Rev Med Pharmacol Afr* 18: 1-10
21. Nguessan JD, Trébissou JND, Bahi C, et al. (2002) Effets de BGG, F5 (fraction chromatographique de *Morinda morindoides*) sur l'activité contractile du cœur isolé de rat. *Rev Iv Sci Tech* 3: 127-39
22. Séri SC (2006) Contribution à l'étude chimique et structurale des feuilles de *Morinda morindoides* (Rubiaceae). Mémoire de DEA, sciences physiques des structures. Option chimie organique, université de Cocody, UFR SSMT, Abidjan, Côte-d'Ivoire, 48 p
23. Stevens DA (1996) Oral amphotericin B as an antifungal agent. *J Mycol Med* 6(Suppl II): 1-2
24. Tona L, Cimanga RK, Mesia K, et al. (2004) In vitro antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 1: 27-32
25. Tona L, Mesia K, Ngimbi NP, et al. (2001) In vivo antimalarial activity of *Cassia occidentalis*, *Morinda morindoides* and *Phyllanthus niruri*. *Ann Trop Med Parasitol* 1: 47-9
26. Tona L, Ngimbi NP, Tsakala M, et al. (1999) Antimalarial activity of 20 crude extracts from nine African medicinal plants used in Kinshasa, Congo. *J Ethnopharmacol* 68: 193-203
27. Tona L, Kambou K, Ngimbi NP, et al. (1998) Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 1: 57-65
28. Zirihi GN, Kra AKM, Etien DT (2007) Étude 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 Med Pharmacol Afr* 20: 9-18
29. Zirihi GN, Kra AKM (2003) Évaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Lamarck) O. Kuntze (Asteraceae) « PYMI » sur la croissance in vitro de *Candida albicans*. *Rev Med Pharmacol Afr* 17: 11-8