

# PUBLICATION N°4

**Titre :** Activités antifongiques des fractions de l'extrait hydroalcoolique de *Hugonia platysepala* sur les germes responsables de cryptococcoses opportunistes du VIH/SIDA.

**Auteurs :** Ousmane Coulibaly, Bonouman Ira, Yaya Soro, Mamadou Dosso, André Touré, Chiaye Yapo-Crezoit

**Revue :** Phytothérapie, volume 19 N°4: pp 250–256.

**Lien de la revue :** <https://phyto.revuesonline.com/>

**Lien de l'article :** <https://doi.org/10.3166/phyto-2019-0218>

**Année de publication :** 2021

**Facteur d'impact :** 0.44



**Phytothérapie**  
DE LA RECHERCHE À LA PRATIQUE

ISSN : 1624-8597; e-ISSN : 1765-2847  
© Lavoisier SAS




**ISSN :** 1624-8597 **e-ISSN :** 1765-2847

**Editeur :** Lavoisier SAS

**Indexation :** SCOPUS : <https://www.scopus.com/sourceid/130170>

# PREUVE D'INDEXATION

SCOPUS : <https://www.scopus.com/sourceid/130170>

 Author Search Sources   [Create account](#) [Sign in](#)




## Source details

[Feedback >](#) [Compare sources >](#)

---

**Phytotherapie**  
Scopus coverage years: from 2005 to Present  
Publisher: Springer Nature  
ISSN: 1624-8597 E-ISSN: 1765-2847  
Subject area: [Medicine, Complementary and Alternative Medicine](#) [Pharmacology, Toxicology and Pharmacokinetics: Pharmacology](#)  
Source type: Journal

[View all documents >](#) [Set document alert](#) [Save to source list](#)

CiteScore 2022	0.8	
SJR 2022	0.143	
SNIP 2022	0.301	

[CiteScore](#) [CiteScore rank & trend](#) [Scopus content coverage](#)

## **COMITE DE LECTURE**

<https://phyto.revuesonline.com/presentation/comite-de-redaction>

### **Comité scientifique**

Dr A. ABENA, Brazzaville, République du Congo

Pr K. ALAOUI, Rabat, Maroc

Pr R. ANTON, Strasbourg, France

Dr B. ARNAL, Bordeaux, France

*(Phytothérapie clinique, médecine de la femme)*

Dr P. BABULKA, Budapest, Hongrie

Dr F. BONTÉ, Orléans, France

Pr D. BOUSTA, Fez, Maroc

Dr C. BUSSER, Obernai, France

Dr M. EDEAS, Paris, France

Pr C. ENGUEHARD-GUEIFFIER, Tours, France

Dr C. FAIVRE, Arcueil, France

Dr J. FLEURENTIN, Metz, France

Pr M. GRANDI, Turin, Italie

Dr F. HADJI-MINAGLOU, Grasse, France

*(Aromathérapie)*

Pr Z. HOUMANI, Blida, Algérie

Pr J. KALOUSTIAN, Marseille, France

Dr J.-M. LECERF, Lille, France

*(Nutrithérapie)*

Pr A. MARCULESCU, Brasov, Roumanie

Dr S. MONTAUT, Sudbury (Ontario), Canada

Dr J.-M. MOREL, Besançon, France

Pr A.-M. ORECCHIONI, Rouen, France

Pr A. PICHETTE, Chicoutimi (Québec), Canada

Pr F. SOUARD, Grenoble, France

Dr R. SOULIMANI, Metz, France

Dr M. STAUB, Strasbourg, France

Dr P.O. TAUXE, Lausanne, Suisse

# Activités antifongiques des fractions de l'extrait hydroalcoolique de *Hugonia platysepala* sur les germes responsables de cryptococcoses opportunistes du VIH/SIDA

## Antifungal Activities of the Fractions of *Hugonia platysepala* Hydroalcoholic Extract on the germs responsible for opportunistic Cryptococcosis of HIV/AIDS

O. Coulibaly · B. Ira · Y. Soro · M. Dosso · A. Touré · C. Yapo-Crezoit

© Lavoisier SAS 2019

**Résumé** Les cryptococcoses sont des maladies opportunistes du sida qui entraînent un fort taux de mortalité chez les personnes vivant avec le VIH (PVVIH). En Côte-d'Ivoire, leur traitement est difficile à cause des résistances, de la toxicité et du coût élevé des antifongiques. Cette étude a été menée dans le but de rechercher, dans la pharmacopée ivoirienne, des phytomolécules aux propriétés antifongiques capables de traiter à moindre coût les cryptococcoses neuro-méningées des immunodéprimés. Les fractions hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et aqueuse finale ont été extraites de *Hugonia platysepala*. Ces fractions ont été testées in vitro sur *Cryptococcus neoformans*, par les méthodes de dilution en milieu liquide et de diffusion en milieu solide. La fraction acétate a été la plus active avec une CMI de 0,78 mg/ml, une CI<sub>50</sub> de 0,52 mg/ml et une CMF de 25 mg/ml contre *Cryptococcus neoformans*. Cette fraction a une activité fongicide plus élevée que celle de l'extrait hydroalcoolique de l'amphotéricine B et du fluconazole qui sont les antifongiques prescrits aux PVVIH. Le scree-

ning phytochimique a révélé que cette fraction acétate contient des terpènes, des polyphénols, des tanins et des quinones qui seraient responsables de ses propriétés pharmacologiques antifongiques. L'utilisation de *Hugonia platysepala* comme médicament traditionnel amélioré est donc un atout dans le traitement des cryptococcoses chez les immunodéprimés.

**Mots clés** Fractions · *Hugonia platysepala* · Immunodéprimés · Levure · MTA fongicide

**Abstract** Cryptococcosis is an AIDS opportunistic disease which causes a high rate of mortality among HIV people. In Côte-d'Ivoire, the treatment is difficult because of the resistance, toxicity, and the high cost of antifungals. This study was conducted in order to search in Ivorian Pharmacopoeia, phytomolecules able to deal with neuromeningeal Cryptococcosis of the immunosuppressed. Fractions of hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and aqueous final have been extracted from *Hugonia platysepala*. These fractions were tested in vitro on *Cryptococcus neoformans* by dilution and streaming methods. The acetate portion was the most active with 0.78 mg/ml MIC, 0.52 mg/ml IC<sub>50</sub>, and 25 mg/ml MFC against *Cryptococcus neoformans*. This fraction has a fungicide activity which is higher than the activities of the hydroalcoholic extract and classic antifungals: Amphotericin B and Fluconazole. The phytochemical screening revealed that this acetate fraction contains the terpenes, polyphenols, tannins, and quinones, which would be responsible for its antifungal pharmacological properties. The use of *Hugonia platysepala* as an improved traditional medicine is an asset in the treatment of Cryptococcosis for the immunosuppressed.

---

O. Coulibaly (✉) · B. Ira · A. Touré  
Laboratoire de mycologie et parasitologie de l'institut Pasteur de Côte-d'Ivoire, BP 490, Abidjan 01, Côte-d'Ivoire  
e-mail : coulibalyous1@gmail.com

O. Coulibaly · C. Yapo-Crezoit  
Pôle de biologie de l'immunité de l'institut Pasteur de Côte-d'Ivoire, BP 490, Abidjan 01, Côte-d'Ivoire

M. Dosso  
Département de biochimie-génétique,  
université Péléforo-Gon-Coulibaly de Côte-d'Ivoire,  
BP 1328, Korhogo-CI, Côte-d'Ivoire

O. Coulibaly · Y. Soro  
Laboratoire des sciences des procédés chimiques,  
alimentaires et environnementaux de l'INPHB-Côte-d'Ivoire,  
BP 1313, Yamoussoukro, Côte-d'Ivoire

**Keywords** Fractions · *Hugonia platysepala* · Immunosuppressed · Yeast · Fungicide plant

## Introduction

Depuis le début de l'épidémie à VIH/sida, dans les années 1980, environ 80 millions de personnes ont été infectées par le VIH avec 40,2 millions de décès causés par les infections opportunistes liées au sida. Ces infections opportunistes sont d'origine bactérienne, virale, parasitaire ou fongique (candidose, cryptococcose...) [1,2]. Les premiers cas de cryptococcose neuroméningée ont été décrits dès 1894, mais la prévalence a augmenté de façon spectaculaire depuis l'avènement du VIH/sida. En Afrique subsaharienne, dans les années 2000, on estimait à un million le nombre de cas de cryptococcose par an avec 624 700 décès. De nos jours, alors que l'incidence de la maladie a diminué dans les pays occidentaux avec la trithérapie, la cryptococcose reste une cause majeure de méningite en Afrique subsaharienne. Elle occupe le quatrième rang des décès dus aux maladies infectieuses [3–5]. En Côte-d'Ivoire, avant 1980, la maladie était une curiosité clinique avec seulement quatre cas notifiés à Abidjan. Mais depuis 1985, le nombre d'infections de cette mycose chez l'adulte augmente, en relation avec la recrudescence de l'épidémie du VIH. Aujourd'hui, malgré la disponibilité du traitement antirétroviral (ARV) en Côte-d'Ivoire, la cryptococcose reste fréquente et sévère chez les patients infectés par le VIH avec un taux de mortalité de 45,1 % [6,7]. Le traitement de référence comprend l'association de l'amphotéricine B et du 5-fluorocytosine suivie d'un relais de consolidation par le fluconazole. Mais, dans nos pays en développement, l'infection persiste chez les personnes vivant avec le VIH (PVVIH) à cause de l'indisponibilité du 5-fluorocytosine, la toxicité et le coût élevé de l'amphotéricine B et la résistance au fluconazole [8–10].

Pour freiner cette infection mortelle et venir en aide aux PVVIH dans nos pays pauvres, nous devons donc rechercher de nouvelles molécules plus adaptées, disponibles et moins coûteuses dans notre patrimoine floristique. Selon l'OMS [11], 80 % de nos populations utilisent les plantes médicinales pour se soigner, les substances végétales semblent être une bonne alternative aux médicaments modernes. C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à *Hugonia platysepala*, plante médicinale utilisée dans la pharmacopée traditionnelle ivoirienne pour ses vertus thérapeutiques. Nommée en dioula *Tchèbanikala*, *Hugonia platysepala* est un arbuste lianescent de la famille des linacées et très répandue en Afrique de l'Ouest. Dans la zone forestière ivoirienne, elle est utilisée traditionnellement contre les fortes douleurs, les dermatoses et les troubles d'estomac.

La présente étude qui a pour but de trouver une phytomolécule plus efficace que les antifongiques classiques est donc une contribution à la lutte contre les mycoses provoquées par *Cryptococcus neoformans*, levure opportuniste chez les sujets infectés par le VIH. Elle consistera donc à déterminer

l'activité antifongique des extraits partitionnés (ou fractions) des feuilles de *Hugonia platysepala*, à les comparer aux antifongiques classiques prescrits aux malades et enfin à identifier, par screening phytochimique, les biomolécules antifongiques éventuelles contenues dans les extraits actifs.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de feuilles de *Hugonia platysepala* récoltées dans la région du Sud-Ouest de la Côte-d'Ivoire dont les coordonnées sont : 5°47'08" Nord - 6°36'29" Ouest, Altitude : 134 mètres. Cette plante a été identifiée au Centre national de floristique de l'université Félix-Houphouët-Boigny de Cocody.

### Souche fongique

La levure microscopique pathogène qui a fait l'objet de cette étude est la souche MY18-22998 de *Cryptococcus neoformans*. Elle a été isolée dans des prélèvements de patients atteints du VIH/sida au laboratoire de mycologie de l'institut Pasteur de Côte-d'Ivoire.

### Collecte de la plante

Les feuilles de *Hugonia platysepala* ont été récoltées, lavées et séchées à l'abri du soleil pendant trois semaines puis broyées grâce à un broyeur IKA-MAG. La poudre fine obtenue a été conservée dans des bocaux en verre.

### Préparation de l'extrait total hydroalcoolique

Cet extrait a été obtenu selon la méthode mise au point par Guédé-Guina et al. [12] et modifiée par Zihiri et Kra [13]. On dissout 100 g de poudre de *Hugonia platysepala* dans 500 ml d'éthanol à 70 % qu'on homogénéise pendant 24 heures à l'aide d'un agitateur magnétique IKA-MAG. Après décantation, le surnageant est filtré et évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif de BUCHI. La pâte résultante est séchée à l'étuve, et la poudre obtenue est l'extrait hydroalcoolique (EtOH).

### Fractionnement de l'extrait total hydroalcoolique

Les différents extraits partitionnés ou fractions ont été obtenus grâce à une extraction par des solvants de polarités croissantes (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, eau). L'hexane a été utilisé pour l'élimination des lipides et de la chlorophylle, le dichlorométhane pour l'extraction des aglycones, l'acétate d'éthyle pour l'extraction des saccharides et polyhétérosides [13,14]. Vingt grammes de l'extrait hydroalcoolique (EtOH)

de la plante sont dissous dans 150 ml d'eau distillée et 150 ml d'hexane contenus dans un erlenmeyer. L'ensemble est macéré sous un agitateur pendant une heure. Après décantation, le surnageant est filtré à l'aide de papier-filtre Whatman n° 2. La même quantité d'hexane est ajoutée à la phase aqueuse (culot) et le même procédé est répété trois fois de suite jusqu'à l'obtention d'une phase hexane limpide : c'est la fraction hexane ou Fhex. Après l'extraction à l'hexane, la phase aqueuse est reprise avec 150 ml du dichlorométhane, et l'erlenmeyer est porté à l'agitateur pendant une heure. Après décantation, la phase inférieure (culot) est recueillie et filtrée. Le même procédé est repris trois fois jusqu'à l'obtention d'une phase dichlorométhane limpide : c'est la fraction dichlorométhane ou Fdcm. La phase aqueuse (surnageant) est reprise trois fois avec l'acétate d'éthyle dans les mêmes conditions et selon le même procédé jusqu'à l'obtention d'un surnageant qui est la fraction acétate d'éthyle ou Face. Ensuite, la phase aqueuse (culot) est également recueillie et filtrée à la fin pour donner la fraction aqueuse finale ou Faqf.

### Préparation des milieux de culture

L'incorporation des extraits partitionnés Fhex, Fdcm, Face et Faqf au milieu Sabouraud-chloramphénicol a été faite selon la méthode de la double dilution en tubes inclinés [13,15]. Pour chacune des fractions, on a préparé une série de 12 tubes à essai comportant dix tubes tests et deux tubes témoins, dont l'un sans extrait végétal constituant le témoin de croissance des germes fongiques et l'autre sans extrait et sans germes servant de témoin de contrôle de stérilité du milieu gélosé. Ainsi, 2 g d'extrait végétal sont homogénéisés dans 20 ml de gélose Sabouraud-chloramphénicol liquide à 40 °C dans le tube T1 afin d'obtenir la concentration de 100 mg/ml. Ensuite, la moitié du tube T1 a été transférée dans un tube T2 contenant 10 ml de gélose Sabouraud-chloramphénicol. Cette opération est répétée successivement pour les autres tubes jusqu'au tube T10 comportant la plus faible concentration de 0,195 mg/ml. Les dix tubes tests contiennent alors une gamme de concentrations décroissantes des extraits allant de 100 à 0,195 mg/ml selon une liaison géométrique de raison 1/2. Après une stérilisation à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes, on laisse les tubes à essai inclinés à la température ambiante pour permettre le refroidissement et la solidification de la gélose contenant l'extrait de plante.

### Tests antifongiques d'évaluation

L'évaluation de l'activité antifongique des extraits a été faite selon la méthode de dilution en milieu liquide [16,17]. On prélève à l'aide d'une anse de platine une jeune colonie de levures qui est homogénéisée dans 10 ml d'eau distillée stérile afin d'obtenir la suspension mère ( $10^0$ ) concentrée à  $10^6$  cellules/ml. À partir de la suspension  $10^0$ , on prépare une

seconde suspension ( $10^{-1}$ ) par dilution au 1/10 de la première afin d'obtenir une concentration de  $10^5$  cellules/ml. Cette suspension est utilisée pour ensemercer tous les tubes à essai préparés sauf le témoin de contrôle de la stérilité (TS). Les tubes sont ensuite portés à incubation à 37 °C pendant 48 heures puis on y dénombre les colonies par comptage direct. La croissance des germes dans les tubes à essai est exprimée en pourcentage de survivance (S) et calculée par rapport à 100 % de survivance dans le tube témoin de contrôle de croissance selon la formule :

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

S = pourcentage de survivance ; n = nombre de colonies du tube test ; N = nombre de colonies du tube témoin

Le traitement de ces données expérimentales permet d'obtenir les paramètres antifongiques :

- la concentration minimale inhibitrice (CMI) est la concentration minimale pour laquelle il n'y a aucune croissance visible à l'œil nu ;
- la concentration pour 50 % d'inhibition ( $CI_{50}$ ) est déterminée graphiquement à partir de la courbe de sensibilité ;
- la concentration minimale fongicide (CMF) est la plus faible concentration à partir de laquelle il n'y a pas de reprise de la croissance fongique. Elle est déterminée par une subculture réalisée sur gélose neuve à partir des tubes au sein desquels aucune croissance n'a été observée.

### Tests antifongiques d'efficacité

La confirmation de l'activité antifongique des fractions a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu solide à partir de disques imbibés des fractions et des antifongiques classiques [18,19]. Le principe de la méthode des disques repose sur la diffusion de la substance antifongique active dans la gélose contenant le micro-organisme à partir d'un disque avec création d'un gradient de concentration. L'inoculum préparé ( $10^6$  cellules/ml) est versé à la surface de la gélose Sabouraud-chloramphénicol coulée en boîte de Pétri. Après séchage à 37 °C pendant cinq minutes, les boîtes de Pétri sont stérilisées à l'autoclave pendant une heure. Des disques stérilisés de 6 mm de diamètre découpés sur du papier Whatman sont déposés dans les différentes fractions à la concentration de 50 mg/ml pendant une heure. Les disques ainsi imbibés des fractions sont déposés dans les boîtes de Pétri inoculées à côté de disques imbibés d'antifongiques classiques qu'on laisse incuber à 37 °C pendant 48 heures. Les diamètres d'inhibition sont mesurés autour de chaque disque convenant à une fraction déterminé [15,16].

### Screening phytochimique

Le criblage phytochimique a été effectué dans le but de déceler les grands groupes chimiques contenus dans les

différentes fractions de *Hugonia platysepala*. Le résumé de ces réactions de colorations et de précipitations est contenu dans le tableau 1 [20].

## Résultats

### Rendement des fractionnements

Les fractionnements effectués ont permis d'obtenir des fractions dont les rendements varient de 09,82 à 41,26 %. Les fractions Face et Faqf ont les meilleurs rendements (Tableau 2).

### Paramètres antifongiques

Au bout de 48 heures d'incubation à 37 °C, de manière dose-dépendante, les fractions hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et aqueuse finale de *Hugonia platysepala* diminuent le nombre de colonies de *Cryptococcus neoformans* (Figs 1, 2). La croissance des germes dans les tubes, exprimée en pourcentage de survivance (S), est traduite sous forme de courbes de sensibilité présentées sur la figure 3. Les courbes de sensibilité ont permis de déterminer les paramètres antifongiques consignés dans le tableau 3.

### Diamètres d'inhibition des extraits et des antifongiques classiques

Après 48 heures d'incubation des souches de *Cryptococcus neoformans* dans des disques imbibés de fractions de *Hugonia platysepala* et d'antifongiques classiques, on constate dans les boîtes de Pétri la présence d'halo d'inhibition autour des disques imbibés. Ces diamètres d'inhibition sont mesurés et représentés dans un diagramme (Fig. 4).

### Screening phytochimique

L'étude phytochimique qualitative a permis de détecter les différentes familles chimiques présentes dans les fractions de *Hugonia platysepla*. Les résultats obtenus par des réactions de coloration et de précipitation sont représentés dans le tableau 4.

## Discussion

L'objectif de ce travail est de rechercher dans les fractions de *Hugonia platysepla* des molécules antifongiques plus

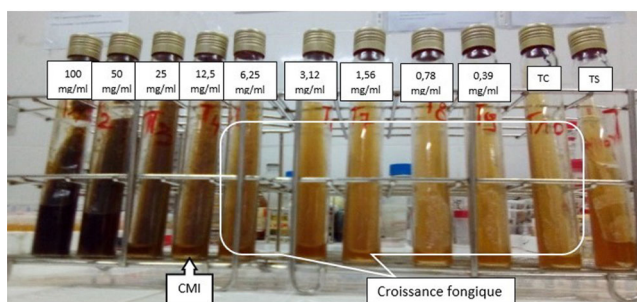
Groupes chimiques	Réactifs	Résultats
Stérols et polyterpènes	Anhydride acétique Acide sulfurique	Anneau pourpre ou violet
Alcaloïdes	Alcool à 60 °C Réactif de Dragendorf Réactif de Bouchardat	Coloration orangée Coloration brun rougeâtre
Polyphénols	Solution alcoolique de chlorure ferrique 2 %	Coloration bleu noirâtre
Flavonoïdes	Acide chlorhydrique concentré Copeaux de magnésium	Coloration rouge ou orange
Anthocyanes	Alcool chlorhydrique Alcool isoamylique	Coloration rouge cerise Coloration brun rouge
Tanins galliques	Réactif de Stiany Chlorure ferrique 1 %	Coloration bleu noir
Quinones	NaOH 1 %	Coloration jaune ou rouge
Chaque groupe chimique a des réactifs bien déterminés et une coloration spécifique attendue		

	Fhex	Fdcm	Face	Faqf
<b>Rendement (%)</b>	14,23 ± 0,52	9,82 ± 0,23	41,26 ± 2,43	30,48 ± 1,20
Les fractions obtenues sont : Fhex : fraction hexane ; Fdcm : fraction dichlorométhane ; Face : fraction acétate d'éthyle ; Faqf : fraction aqueuse finale				

efficaces que les antifongiques classiques contre *Cryptococcus neoformans*, germe responsable des cryptococcoses opportunistes du VIH/sida.



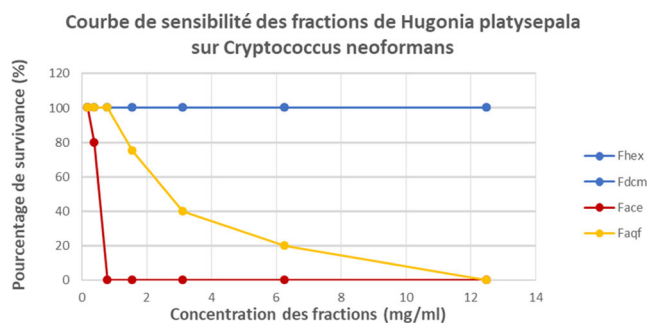
**Fig. 1** Tubes à essai montrant l'inhibition de la croissance de *Cryptococcus neoformans* par la fraction Face de *Hugonia platysepala*. T4 = 12,5 mg/ml, T5 = 6,25 mg/ml, T6 = 3,12 mg/ml, T7 = 1,56 mg/ml, T8 = 0,78 mg/ml, T9 = 0,39 mg/ml, TC = témoin de croissance, TS = témoin de stérilité. Les tubes à essai de concentrations croissantes de *Hugonia platysepala* présentent une croissance de *Cryptococcus neoformans* à partir du tube T9 de concentration 0,39 mg/ml. La CMI de Face est donc de 0,78 mg/ml



**Fig. 2** Tubes à essai montrant l'inhibition de la croissance de *Cryptococcus neoformans* par la fraction Faqf de *Hugonia platysepala*. T1 = 100 mg/ml, T2 = 50 mg/ml, T3 = 25 mg/ml, T4 = 12,5 mg/ml, T5 = 6,25 mg/ml, T6 = 3,12 mg/ml, T7 = 1,56 mg/ml, T8 = 0,78 mg/ml, T9 = 0,39 mg/ml, TC = témoin de croissance, TS = témoin de stérilité. Les tubes à essai de concentrations croissantes de *Hugonia platysepala* présentent une croissance de *Cryptococcus neoformans* à partir du tube T5 de concentration 6,25 mg/ml. La CMI de Faqf est donc de 12,5 mg/ml

L'extraction par macération successive avec des solvants à polarités croissantes a permis d'obtenir des fractions dont les rendements sont variables de 09,82 à 41,26 %. Ces résultats concordent avec ceux de Adjou et Soumanou [21] qui soutiennent que les rendements de l'extraction des fractions de feuilles fraîches de dix plantes étudiées au Bénin varient en fonction du type de solvant utilisé pour l'extraction. En plus, ces rendements dépendent de l'âge, du lieu et de la période de récolte des feuilles.

L'évaluation de l'activité antifongique des fractions Fhex, Fdcm, Face, Faqf de *Hugonia platysepala* sur *Cryptococcus neoformans* a été effectuée par la méthode de double dilution en milieu liquide. Les fractions issues de l'extrait éthanolique de *Hugonia platysepala* ont donné des réponses différentes face à la souche fongique testée. Les fractions Face et Faqf ont été actives tandis que les fractions Fhex et Fdcm n'ont présenté aucune activité antifongique. Ces réponses sont justifiées par le principe de la partition successive qui a consisté à utiliser plusieurs solvants de polarités différentes dans un ordre précis en vue d'extraire tous les composés extractibles solvant après solvant. Ainsi, au fur



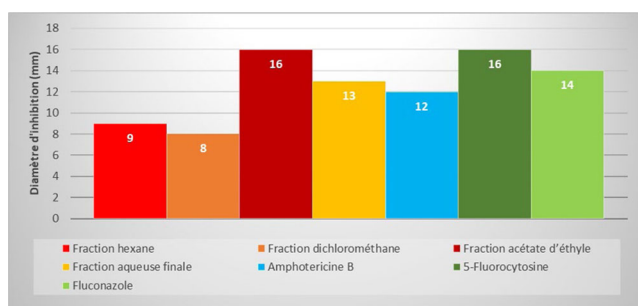
**Fig. 3** Fhex : fraction hexane, Fdcm : fraction dichlorométhane, Face : fraction acétate d'éthyle, Faqf : fraction aqueuse finale. Les courbes des fractions Face et Faqf coupent l'axe des abscisses de chaque souche à 0,78 et à 12,5 mg/ml qui correspondent respectivement à la CMI de la Face et de la Faqf sur les souches de *Cryptococcus neoformans*. Par contre, les fractions Fhex et Fdcm n'ont pas de CMI, car leurs courbes ne coupent pas l'axe des abscisses. Les courbes de sensibilité ont également permis de déterminer la  $CI_{50}$  de Face = 0,52 mg/ml et la  $CI_{50}$  de Faqf = 2,6 mg/ml

	CMI (mg/ml)	$CI_{50}$ (mg/ml)	CMF (mg/ml)	
Face	0,78	0,52	25	Fongicide
Faqf	12,5	2,6	25	Fongicide

Face : fraction acétate d'éthyle ; Faqf : fraction aqueuse finale  
 La fraction Face et Faqf ont la même CMF de 25 mg/ml, mais les CMI et  $CI_{50}$  sont respectivement de 0,78 ; 0,52 mg/ml pour Face et 12,5 ; 2,6 mg/ml pour Faqf



et à mesure que certains composés bioactifs sont isolés et concentrés pendant la partition, d'autres disparaissent. Les tests antifongiques réalisés ont permis de savoir que la fraction Face a la meilleure activité antifongique sur *Cryptococcus neoformans* avec une CMI de 0,78 mg/ml, une  $CI_{50}$  de 0,52 mg/ml et une CMF de 25 mg/ml. Cette fraction Face a donc une action fongicide sur *Cryptococcus neoformans* qui est deux fois meilleure que la CMF de 50 mg/ml obtenue avec l'extrait total hydroalcoolique de la même plante. Cela pourrait s'expliquer par la purification et la concentration des composés bioactifs dans la fraction Face. En effet, l'action de délipidation des solvants hexane et dichlorométhane qui ont précédé l'acétate d'éthyle aurait contribué à l'élimination des molécules susceptibles d'empêcher toute action fongicide des principes actifs. La faible activité antifongique de la fraction Faqf pourrait s'expliquer par le fait que l'eau étant le dernier solvant polaire utilisé, cette fraction renferme très peu de composés bioactifs [15].



**Fig. 4** Diamètres d'inhibition de *Cryptococcus neoformans* par les fractions de *Hugonia platysepala* et les antifongiques de référence. Les diamètres d'inhibition de *Cryptococcus neoformans* obtenus avec les fractions Face et Faqf de *Hugonia platysepala* sont supérieurs au seuil de sensibilité de 10 mm, ils restent meilleurs à ceux obtenus avec les antifongiques classiques tels que l'amphotéricine B et le fluconazole. Cependant, au vu des diamètres d'inhibition, la fraction Face reste plus efficace que la fraction Faqf

Les travaux de Bagré et al. [22], portant sur l'activité antifongique des feuilles de *Saba comorensis*, ont montré que l'extrait acétate d'éthyle (Eac) a une  $CI_{50}$  de 4,5 mg/ml. Le rapport d'efficacité entre cette  $CI_{50}$  et celle que nous avons obtenue avec la fraction Face de *Hugonia platysepala* est de :  $CI_{50}(\text{Eac})/CI_{50}(\text{Face}) = 4,5/0,55 = 8,18$ . Ce qui signifie que la fraction Face de *Hugonia platysepala* est huit fois plus active que l'extrait Eac de *Saba comorensis*. Ainsi, l'acétate d'éthyle utilisé comme solvant concentre mieux que les autres fractions, les principes actifs des plantes à activités bactéricides et fongicides [23]. Cette activité fongicide de la fraction Face est confirmée par le screening phytochimique qui a révélé la présence de groupements moléculaires suivants : stérols, terpènes, tanins, gallicates et polyphénols. Selon Giordani et al. [24], l'activité antifongique de la fraction à l'acétate d'éthyle s'explique par une forte teneur en composés polyphénoliques dotés de pouvoirs antimicrobiens importants. Ces molécules chimiques, grâce à leurs groupements hydroxyles libres, entraînent la mort des germes fongiques par la destruction des membranes cellulaires suite à une perte totale de l'homéostasie [24,25].

Le test d'efficacité réalisé avec la méthode de diffusion en milieu solide nous a permis de comparer l'action antifongique des fractions de *Hugonia platysepala* à celle des antifongiques de référence prescrits aux PVVIH atteints de cryptococcoses. Concernant nos fractions, la mesure du diamètre des zones d'inhibition a montré que seules les fractions Face et Faqf, qui ont des diamètres d'inhibition respectifs de 16 et 11 mm, sont efficaces contre *Cryptococcus neoformans*. En effet, selon Biyiti et al. [26], un extrait est considéré comme sensible lorsqu'il induit une zone d'inhibition supérieure à 10 mm. Cela confirme que la fraction Face qui a le diamètre d'inhibition le plus élevé est la plus active de toutes les fractions de *Hugonia platysepala* contre *Cryptococcus neoformans*. En outre, la zone d'inhibition de cette fraction Face est identique à celle du 5-fluorocytosine et supérieure à celle des antifongiques classiques, amphotéricine B et fluconazole.

**Tableau 4** Identification des groupes chimiques contenus dans les fractions

Groupes chimiques	Fhex	Fdcm	Face	Faqf
Stérols et terpènes	+	+	+	+
Alcaloïdes	-	-	-	-
Polyphénols	+	-	+	+
Flavonoïdes	-	-	-	-
Anthocyanes	-	-	-	-
Tanins	-	-	+	-
Quinones	-	-	-	+

(+) signifie « présence » ; (-) signifie « absence »

Fhex : fraction hexane ; Fdcm : fraction dichlorométhane ; Face : fraction acétate d'éthyle ; Faqf : fraction aqueuse finale

La Face contient trois groupes chimiques (stérols, terpènes, polyphénols, tanins) comme la Faqf qui contient les quinones à la place des tanins. La Fdcm ne contient que deux groupes chimiques (stérols et terpènes) comme la Fhex qui contient en plus les polyphénols

Traoré et al. [19] ont obtenu des résultats similaires sur *Annona senegalensis* avec des diamètres d'inhibition compris entre 10 et 13 mm.

## Conclusion

Au terme de cette étude, nous pouvons affirmer que le fractionnement de l'extrait hydroalcoolique de *Hugonia platyse-pala* a permis d'obtenir la fraction acétate d'éthyle qui a une activité fongicide sur *Cryptococcus neoformans* plus intéressante que celle de l'amphotéricine B et le fluconazole qui sont les antifongiques couramment prescrits aux malades du sida atteints de cryptococcoses. Ces antifongiques classiques ayant montré leurs limites dans le traitement des mycoses, l'usage de cette plante médicinale comme médicament traditionnel amélioré (MTA) plus efficace et moins coûteux pourrait être bénéfique pour le traitement des cryptococcoses chez les sujets infectés par le VIH. Par ailleurs, des études plus approfondies par chromatographie et spectroscopie permettront de purifier le principe actif afin de donner de meilleurs résultats et de connaître sa nature chimique.

**Contributions des auteurs :** • C.O. : enquête ethnobotanique, expérimentations, analyses, interprétations et rédaction ;

• S.Y., D.M. : protocoles, analyses et interprétation des fractionnements et screening ;

• Y.C., T.A. et I.B. : protocoles, analyses et interprétation des tests antifongiques.

**Liens d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

## Références

- Dromer F, Lortholary O (2003) Les mycoses/Annales de l'Institut Pasteur : Actualités, Elsevier, Paris, 236 p
- Onusida (2015) Diapositives clés sur les données épidémiologiques. www.unaids.org
- Luma NH, Temfack E (2013) Cryptococcal meningoencephalitis in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome in Douala Cameroon: a cross sectional study. North Am J Med Sci 5:486–91
- OMS (2017) Résultats de l'enquête mondiale de l'OMS sur le mycétome. REH 93:423–8 (2018)
- Park BJ, Wannemuehler KA (2009) Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. Aids 23:525–30
- Aoussi EF, Ehui E (2012) Cryptococcal meningitis and HIV in the era of HAART in Ivory Coast. Med Mal Infect 42:349–54
- Odehouri K, Moreau J, Saracino-Chapman J, et al (1991) La méningite à cryptocoque à propos de trois cas. Rev Med Côte-d'Ivoire 61:21–7
- Cheong JW, McCormack J (2013) Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? Med Mycol 51:261–9
- Léautez S, Raffi F (2001) Thérapeutique des mycoses profondes (sans les aspergilloses et des fusarioses). Rev Fr Lab 2001 (332):23–30
- Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F (2010) Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 50:291–322
- OMS (2003) Médicaments essentiels et politiques pharmaceutiques : donner un soutien aux pays pour réduire le manque d'accès aux médicaments. OMS, Genève, Suisse, 20 p
- Guédé-Guina F, Kra AKM, Vangah-Manda M, et al (1997) Inhibition par MISC-A-F2 de la croissance de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*, trois germes opportunistes du sida. J Afr Biomed 2:11–6
- Zirih G, Kra AKM (2003) Évaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Lamarck) et Kuntze (Asteraceae) sur la croissance in vitro de *Candida albicans*. Rev Med Pharm Afr 17:11–8
- Ambe A, Camara D, Ouattara D, et al (2016) Étude ethnobotanique, évaluation in vitro de l'activité antifongique et cytotoxique des extraits d'*Enantia polycarpa*. Int Biol Chim Sci 10:23–34
- Goly C, Soro Y, Kassi B, et al (2015) Antifungal activities of the essential oil extracted from the tea of savanna (*Lippia multiflora*) in Côte-d'Ivoire. Int J Biol Chem Sci 9:24–34
- Touré A, Bahi C, Ouattara K, et al (2011) Phytochemical screening and in vitro antifungal activities of extracts of larvae of *Morinda morindoides* (Morinda, Rubiaceae). J Med Plants Research 5:6780–6
- Ackah J, Oussou K, Angaman D, et al (2016) Activités antimycosique et screening phytochimique des différents extraits de *Terminalia catappa* Linne un antifongique de source naturelle. J Soc Ouest-Afr Chim 42:36–42
- Vinod KG, Vikas KN, Kalishankar M (2010) Antimicrobial activity of *Spondias pinnata* resin. J Med Plants Research 4:1656–61
- Traoré Y, Ouattara K, Yéo D, et al (2012) Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). J Appl Biosci 58:4234–42
- Harbone J (1998) Phytochemical Methods, a guide to modern techniques of plant analysis. 3<sup>rd</sup> ed. London; New York:Chapman and Hall
- Adjou ES, Soumanou MM (2013) Efficacité des extraits de plantes contre les moisissures toxigènes isolées de l'arachide. J Appl Biosci 70:5555–66
- Bagré I, Bahi C, Ouattara K, et al (2011) Étude botanique et exploration de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh. sur la croissance in vitro de *Cryptococcus neoformans*. Phytothérapie 9:136–41
- Ben AA, Combes S, Preziosi-bello L, et al (2006) Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. Lett Appl Microbiol 43:149–54
- Giordani R, Regli P, Kaloustian J, et al (2004) Antimicrobial effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. Phytother Res 18:990–5
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV (2003) Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. J Appl Microbiol 95:853–60
- Biyiti LF, Meko'o DJL, Tamzic V, et al (2004) Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. Pharm Méd Trad Afr 13:11–20