

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES



UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCE

CENTRE DE RECHERCHE & DE FORMATION DOCTORALE, SCIENCE
DE LA VIE, SANTE & ENVIRONNEMENT
GRADUATE PROGRAM FOR LIFE SCIENCES HEALTH AND THE
ENVIRONMENT

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE
LABORATORY OF MICROBIOLOGY

**Evaluation des activités anti-*Candida* et
immunostimulatrice de l'infusé aqueux de tiges
de *Gouania longipetala* (Hemsl.), une plante de la
pharmacopée camerounaise**

THESE

Présentée comme requis partiel en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat/*Ph.D*
en Biochimie

Spécialité : Pharmacologie et Phytobiochimie

Par

BOUOPDA TAMO Sylvain Parfait

Matricule : 07R130

Maître ès-sciences

Sous la codirection de :

Pr. RIWOM ESSAMA Sara Honorine et
Maître de Conférences

Pr. ETOA François-Xavier
Professeur



Année académique 2020-2021

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES



UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCE

CENTRE DE RECHERCHE & DE FORMATION DOCTORALE, SCIENCE
DE LA VIE, SANTE & ENVIRONNEMENT
GRADUATE PROGRAM FOR LIFE SCIENCES HEALTH AND THE
ENVIRONMENT

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE
LABORATORY OF MICROBIOLOGY

**Evaluation des activités anti-*Candida* et
immunostimulatrice de l'infusé aqueux de tiges
de *Gouania longipetala* (Hemsl.), une plante de la
pharmacopée camerounaise**

THESE

Présentée comme requis partiel en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat/*Ph.D*
en Biochimie

Spécialité : Pharmacologie et Phytobiochimie

Par

BOUOPDA TAMO Sylvain Parfait

Matricule : 07R130

Maître ès-sciences

Sous la codirection de :

Pr. RIWOM ESSAMA Sara Honorine et
Maître de Conférences

Pr. ETOA François-Xavier
Professeur

Année académique 2020-2021

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING IN
GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH AND
ENVIRONMENTAL SCIENCES

RESEARCH AND DOCTORATE TRAINING
UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION

Nous, soussignés Pr. FEKAM BOYOM Fabrice et Pr. PENLAP NINTCHOM Véronique épouse BENG respectivement Examineur et Président du jury de Thèse de Doctorat/Ph.D en Biochimie, spécialité Pharmacologie et Phytobiochimie, soutenue par Monsieur BOUOPDA TAMO Sylvain Parfait (Matricule 07R130) le Vendredi 15 Octobre 2021 à 13 heures dans la Salle S01/S02 du Nouveau Bloc Pédagogique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, sous le thème : "Evaluation des activités anti-*Candida* et immunostimulatrice de l'infusé aqueux de tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl), une plante de la pharmacopée camerounaise", attestons que le candidat a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

En foi de quoi, la présente attestation lui est établie pour servir et valoir ce que de droit.


Fait à Yaoundé, le... 24/11/2021

Examineur

Fabrice F. Boyom, ScD
Professor of Biochemistry

Président du jury

Véronique N. Penlap Beng
Professor

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022
 (Par Département et par Grade)
DATE D'ACTUALISATION 22 septembre 2021

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*
VICE-DOYEN / DPSAA : ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*
VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*
VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*
Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal, *Maître de Conférences*
Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (37)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOCHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOU Marceline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
25	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
25	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
26	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
27	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	KOTUE TAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
32	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
33	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste

33	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Assistant	En poste
34	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Assistant	En poste
35	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
36	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
37	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (51)
--

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
7	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8	KAMTCHOING Pierre	Professeur	En poste
9	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
10	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
11	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
12	NOLA Moïse	Professeur	En poste
13	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
14	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
15	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>

16	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
19	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
21	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
22	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
23	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

24	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
25	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
26	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
27	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
28	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
32	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
33	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
34	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
35	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
36	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
37	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
38	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
39	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
40	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste

42	AMPON NSANGO Indou	Assistant	En poste
43	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
44	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
45	FEUGANG YOUNSSI François	Assistant	En poste
46	FOKAM Alvine Christelle Epse KEGNE	Assistante	En poste
47	GONWOUO NONO Legrand	Assistant	En poste
48	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
49	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
50	NWANE Philippe Bienvenu	Assistant	En poste
51	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (31)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MBOLO Marie	Professeur	En poste
5	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
6	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
7	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

8	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
9	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
13	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
14	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
15	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste

17	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
19	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
20	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
21	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
22	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
23	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
24	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste

25	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Assistant	En poste
26	KABELONG BANAHOU Louis-Paul- Roger	Assistant	En poste
27	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
28	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
29	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
30	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
31	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (32)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UD's</i>
10	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>

11	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
12	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
13	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
14	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
15	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
16	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
17	NJIOMOU C. épse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste

20	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
21	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
22	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
23	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
24	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
25	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
26	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
27	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINPROFF
28	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
29	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste

30	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
31	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
32	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (40)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/FSE/UIYI
2	GHOLOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
5	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/ Chef de Département</i>
6	WANDJI Jean	Professeur	En poste

7	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
8	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	C.E/ MINESUP
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	C.S/ MINESUP
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
25	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
26	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
27	ZONDEGOUNBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

28	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
29	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
30	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
31	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
32	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste

33	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
34	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
35	NONO NONO Éric Carly	Assistant	En poste
36	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Assistante	En poste
37	TCHAMGOUE Joseph	Assistant	En poste
38	TSAFFACK Maurice	Assistant	En poste
39	TSAMO TONTSA Armelle	Assistante	En poste
40	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
5	AMINOU Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
6	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
7	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
8	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
10	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
11	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
12	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	Directeur adjoint Enset. Ebolowa
14	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
15	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
16	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

18	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (35)

1	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
2	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>

3	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
4	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
7	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
8	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes & Diplômes/FS/UYI</i>
9	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
10	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

11	BOGSO ANTOINE MARIE	Chargé de Cours	En poste
12	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
13	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
14	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
15	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
16	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
17	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
18	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
19	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
20	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
21	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
22	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
23	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
24	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
25	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
26	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste

27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
29	LOUMNGAM KAMGA Victor	Assistant	En poste
30	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
31	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
32	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
33	OGADOA AMASSAYOGA	Assistant	En poste
34	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste
35	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (21)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
3	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste

4	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
6	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
7	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
8	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

9	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
10	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
11	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste

14	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
15	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
16	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
17	MONI NDEDI Esther Del Florence	Assistante	En poste
18	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
19	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
20	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Assistante	En poste
21	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (44)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. UN</i>
4	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
6	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
9	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
12	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen FS Univ/Bda
13	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste

16	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
17	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18	ENYEGUE A NYAM épse	Maître de Conférences	En poste
19	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
22	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
23	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
25	SAIDOU	Maître de Conférences	Chef de centre/IRGM/MINRESI
26	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UJI</i>

30	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
32	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
33	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
34	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
35	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
36	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
37	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima

38	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste
39	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
40	DJOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Assistante	En poste
41	LAMARA Maurice	Assistant	En poste
42	OTTOU ABE Martin Thierry	Assistant	En poste
43	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste
44	WANDJI NYAMSI William	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (42)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
12	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
13	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
14	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
15	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
16	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
17	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance & du Matériel/UYII</i>
18	TCHAKOUNTE J. épouse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste

32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	CD/Uma
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

41	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
42	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (01)	14 (10)	13 (05)	05 (02)	40 (18)
BPA	15 (01)	8 (06)	18 (05)	10 (03)	51 (15)
BPV	07 (01)	9 (01)	8 (06)	07 (01)	31 (9)
CI	10 (01)	09 (02)	10 (02)	03 (0)	32 (5)
CO	6 (0)	21 (05)	05 (02)	08 (02)	40 (9)
IN	2 (0)	1 (0)	14 (01)	08 (01)	25 (2)
MAT	2 (0)	8 (0)	15 (01)	09 (02)	34 (7)
MIB	3 (0)	5 (03)	06 (01)	06 (02)	20 (6)
PHY	15 (0)	14 (02)	09 (03)	08 (03)	46 (8)
ST	7 (1)	15 (01)	18 (05)	02 (0)	42 (7)
Total	75 (5)	104 (30)	116 (31)	66 (16)	361 (86)

Soit un total de **361 (86)** dont :

- Professeurs **75 (5)**
- Maîtres de Conférences **104 (30)**
- Chargés de Cours **116 (31)**
- Assistants **66 (16)**

() = Nombre de Femmes **86**

TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	vi
REMERCIEMENTS.....	vii
LISTE DES ABREVIATIONS	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES	xi
RESUME	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCTION.....	1
Chapitre I : REVUE DE LITTERATURE.....	4
I. Levures du genre <i>Candida</i>	4
I.1. Taxonomie et caractères généraux.....	4
I.2. Organisation cellulaire.....	4
I.3. Paroi et membrane cellulaire.....	5
I.4. Principales espèces de <i>Candida</i> d'intérêt médical et écologie.....	5
I.5. Facteurs de virulence des <i>Candida</i>	6
I.5.1. Adhérence.....	6
I.5.2. Dimorphisme.....	6
I.5.3. Formation des biofilms.....	7
I.5.4. Sécrétion des enzymes.....	8
I.5.5. Régulation du pH environnant.....	8
I.5.6. Adaptation métabolique.....	9
I.6. Réponse immunitaire anti- <i>Candida</i>	9
I.6.1. Immunité innée.....	9
I.6.1.1. Reconnaissance des <i>Candida</i> par les cellules phagocytaires.....	9
I.6.1.2. Engloutissement et destruction du pathogène.....	10
I.6.1.3. Cellules phagocytaires impliquées dans l'immunité anti- <i>Candida</i>	11
I.6.1.3.1. Polynucléaires neutrophiles.....	11
I.6.1.3.2. Monocytes/macrophages.....	12
I.6.1.3.3. Cellules Natural Killer.....	12
I.6.1.3.4. Cellules dendritiques.....	12
I.6.2. Immunité adaptative.....	13
I.6.2.1. Lymphocytes T.....	13
I.6.2.2. Lymphocytes B et anticorps.....	14

I.7. Facteurs favorisant les infections à <i>Candida</i>	14
I.7.1. Facteurs intrinsèques.....	15
I.7.1.1. Facteurs locaux	15
I.7.1.2. Facteurs physiologiques	15
I.7.1.3. Maladies sous-jacentes	15
I.7.2. Facteurs extrinsèques	16
I.7.2.1. Facteurs alimentaires.....	16
I.7.2.2. Antibiothérapie à large spectre	16
I.7.2.3. Traitements immunosuppresseurs et anti-cancéreux.....	16
I.7.2.4. Dispositifs médicaux.....	16
I.7.2.5. Transplantation d'organes solides.....	17
I.8. Aspects cliniques des candidoses	17
I.8.1. Candidoses superficielles	18
I.8.1.1. Candidoses cutanées	18
I.8.1.2. Candidoses unguéales	18
I.8.1.3. Candidoses des muqueuses.....	18
I.8.2. Candidoses systémiques.....	19
I.8.2.1. Candidémie.....	19
I.8.2.2. Candidose invasive ou disséminée.....	19
I.8.2.2.1. Candidose cardiaque	20
I.8.2.2.2. Candidose hépatosplénique	20
I.8.2.2.3. Candidose pulmonaire.....	20
I.8.2.2.4. Candidose oculaire.....	21
I.8.2.2.5. Candidose neuroméningée.....	21
I.8.2.2.6. Candidose ostéo-articulaire	21
I.9. Traitement des candidoses	21
I.9.1. Polyènes	22
I.9.2. Fluoropyrimidine.....	22
I.9.3. Azolés	22
I.9.4. Echinocandines.....	22
I.10. Résistance aux antifongiques	23
I.10.1. Résistance intrinsèque.....	23
I.10.2. Résistance acquise	24
I.10.2.1. Soustraction de la cible et son remplacement.....	24
I.10.2.2. Modification de la cible cellulaire	24
I.10.2.3. Surexpression de la cible cellulaire.....	25
I.10.2.4. Efflux actif de l'antifongique.....	25

I.10.3. Résistance liée aux biofilms	25
I.11. Autres approches thérapeutiques contre les candidoses.....	28
I.11.1. Immunothérapie anti-candidose.....	28
I.11.1.1. Thérapie par cytokines	28
I.11.1.2. Thérapie cellulaire	28
I.11.1.3. Thérapie par anticorps	28
I.11.1.4. Composés immunogènes	28
I.11.2. Phytothérapie anti-candidose.....	28
I.11.2.1. Composés phénoliques	29
I.11.2.2. Terpénoïdes	29
I.11.2.3. Alcaloïdes	29
I.11.2.4. Hétérosides	30
I.12. Revue sur les plantes médicinales testées dans ce travail	30
I.13. Revue sur les méthodes de criblage des substances antifongiques	30
I.13.1. Les méthodes de diffusion.....	30
I.13.2. Les méthodes de dilution.....	30
I.14. Revue sur les méthodes de criblage des substances immunostimulatrices	30
Chapitre II : MATERIEL ET METHODES.....	35
II.1. Matériel.....	35
II.1.1. Matériel végétal.....	35
II.1.2. Microorganismes utilisés	37
II.1.3. Milieux de culture	37
II.1.4. Animaux d'expérience	37
II.1.5. Réactifs et antifongiques utilisés	37
II.2. Méthodes	39
II.2.1. Schéma de travail	39
II.2.2. Préparation des extraits végétaux	40
II.2.2.1. Extraction à froid dans l'eau distillée	40
II.2.2.2. Extraction par infusion dans l'eau distillée	40
II.2.2.3. Extraction par macération hydro-éthanolique	40
II.2.3. Evaluation de l'activité antifongique des extraits végétaux	40
II.2.3.1. Préparation des milieux de culture	40
II.2.3.2. Préparation de l'inoculum fongique	41
II.2.3.3. Détermination des CMI et CMF.....	41
II.2.3.4. Sélection de l'extrait le plus actif	41
II.2.4. Criblage phytochimique.....	42
II.2.4.1. Mise en évidence des phénols	42

II.2.4.2. Mise en évidence des flavonoïdes	42
II.2.4.3. Mise en évidence des tannins	42
II.2.4.4. Mise en évidence des stérols et triterpènes : test de Liebermann-Burchard.....	42
II.2.4.5. Mise en évidence des lignines : test de Labat.....	42
II.2.4.6. Mise en évidence des alcaloïdes : test de Mayer	42
II.2.4.7. Mise en évidence des saponines : test de Foam.....	42
II.2.4.8. Mise en évidence des sucres réducteurs : test de Fehling's	42
II.2.4.9. Mise en évidence des anthocyanines	42
II.2.5. Fractionnement bioguidé de l'extrait GLE	44
II.2.6. Détermination du mode d'action de l'extrait GLE sur la cellule fongique	46
II.2.6.1. Mesure de l'affinité de l'extrait GLE pour l'ergostérol	46
II.2.6.2. Effet de l'extrait GLE sur la perméabilité membranaire.....	46
II.2.7. Evaluation de l'activité anti-biofilm de l'extrait GLE.....	46
II.2.7.1. Effet de l'extrait GLE sur la formation des biofilms des <i>Candida</i>	46
II.2.7.2. Effet de l'extrait GLE sur le métabolisme des biofilms.....	47
II.2.8. Combinaison de l'extrait GLE aux antifongiques	48
II.2.9. Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité anti- <i>Candida</i> de l'extrait GLE.....	48
II.2.9.1. Induction de l'immunosuppression.....	48
II.2.9.2. Induction de la candidémie	49
II.2.9.3. Traitement antifongique	49
II.2.9.4. Détermination de la charge fongique dans le sang et les reins	50
II.2.9.5. Détermination des paramètres sériques.....	50
II.2.9.5.1. Numération des érythrocytes	50
II.2.9.5.2. Numération des leucocytes.....	51
II.2.9.5.3. Formule leucocytaire	51
II.2.9.5.4. Numération des plaquettes	52
II.2.9.5.5. Dosage de l'alanine aminotransférase.....	53
II.2.9.5.6. Dosage de L-aspartate aminotransférase.....	54
II.2.9.5.7. Dosage de la créatinine	55
II.2.9.5.8. Dosage de l'urée	56
II.2.9.5.9. Dosage des anticorps.....	56
II.2.9.5.10. Effet de l'extrait GLE sur la masse corporelle des animaux, la masse relative des organes et le taux de mortalité	57
II.2.10. Effet de l'extrait GLE sur la stimulation de l'activité phagocytaire	57
II.2.10.1. Stimulation de l'activité phagocytaire des polymorphonucléaires	57
II.2.10.2. Stimulation de l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial	58
II.2.10.2.1. Dosage du glutathion	58

II.2.11. Evaluation de l'innocuité de l'extrait GLE	59
II.2.12. Analyses statistiques	60
Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION	59
III.1. Résultats	61
III.1.1. Rendement d'extraction.....	61
III.1.2. Activité antifongique des extraits de plantes étudiées et sélection de l'extrait le plus actif sur les souches testées.....	62
III.1.3. Criblage phytochimique de l'extrait GLE	68
III.1.4. Fractionnement bioguidé de l'extrait GLE	68
III.1.4.1. Activité anti- <i>Candida</i> des fractions, sous-fractions et composés isolés	68
III.1.4.2. Structures chimiques des composés isolés.....	70
III.1.5. Mode d'action de l'extrait GLE sur la cellule fongique	71
III.1.5.1. Mesure de l'affinité de l'extrait GLE pour l'ergostérol.....	71
III.1.5.2. Effet de l'extrait GLE sur l'intégrité membranaire.....	71
III.1.6. Effet de l'extrait GLE sur les biofilms de <i>Candida</i>	73
III.1.6.1. Effet sur la formation des biofilms.....	73
III.1.6.2. Effet sur l'activité métabolique des biofilms	73
III.1.7. Essai de combinaison de l'extrait GLE aux antifongiques usuels	76
III.1.8. Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité anti- <i>Candida</i> de l'extrait GLE	79
III.1.8.1. Effet de l'extrait GLE sur la variation des paramètres sériques	80
III.1.8.2. Effet de l'extrait GLE sur la masse corporelle et d'organes	83
III.1.8.3. Taux de mortalité	83
III.1.9. Effet de l'extrait GLE sur la stimulation de la phagocytose	84
III.1.9.1. Activité phagocytaire des polymorphonucléaires neutrophiles.....	84
III.1.9.2. Stimulation de l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial	86
III.1.10. Evaluation de l'innocuité de l'extrait GLE.....	87
III.2. Discussion.....	89
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	91
REFERENCES	94
ANNEXES	a
PUBLICATION	r

DEDICACE

*Je dédie ce travail à mes très chers parents, monsieur TAMO TEKU Patrice et
madame MAKAC Julienne*

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail n'a été possible que grâce à la générosité et au soutien indéfectible de nombreuses personnes. J'exprime de ce fait ma profonde reconnaissance :

A mes encadreurs scientifiques, **Pr. ETOA François-Xavier** et **Pr. RIWOM ESSAMA Sara Honorine**. Vous m'avez accueilli au sein du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I et suivi avec une grande attention durant plusieurs années. Merci pour votre soutien inconditionnel et votre persévérance.

Au **Pr. ESSIA NGANG Justin**, Chef du Département de Microbiologie, pour son aide dans la recherche des collaborations nécessaires à la réalisation de ce travail.

Au **Pr. NYEGUE Maximilienne Ascension** pour son assistance morale et matérielle. Vos conseils m'ont été d'une grande importance. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

Au **Pr. SETCHABA**, enseignant au Département de Chimie Organique de l'Université de Rhodes, pour son aide dans l'analyse spectroscopique et l'élucidation des structures chimiques des molécules isolées dans ce travail.

Au **Dr. TCHIKOUA Roger** pour l'expertise scientifique apportée lors de la réalisation des tests microbiologiques.

Au **Dr. NJIKI BIKOI Jacky** pour son aide dans la recherche des collaborations nécessaires à la réalisation des tests immunologiques.

Aux **Dr. NKOUDOU ZE Nardis** et **Dr. SAKE NGANE Carole** pour leurs encouragements et conseils.

Au corps enseignant du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I pour la qualité de la formation à nous transmise.

Au **Dr. TCHINDA FOSSI Cédric** et monsieur **AVINA ZE Joseph** pour leur participation dans la rédaction des protocoles utilisés dans ce travail.

A monsieur **TCHAMGOUE NGALANI Eric** et mademoiselle **GHAPOUTSA NKANDI Rahinatou** pour leur assistance matérielle.

A monsieur **NOBOUE Léopold** et madame **MEGUE Hélène** pour leur aide dans le choix et l'acquisition des plantes médicinales étudiées dans ce travail. Merci pour vos différentes orientations.

A monsieur **NDOGO ETEME Olivier** pour l'expertise apportée lors des différentes étapes d'extraction des plantes médicinales testées.

Au **Centre Pasteur du Cameroun** pour avoir fourni les souches fongiques testées dans ce travail.

A madame **NDOHO Charlie** et mademoiselle **MEIGHE Marie** pour leur participation dans la réalisation *in vitro* des tests antimicrobiens.

A monsieur **BETOTE DIBOUE Patrick** pour les conseils et les améliorations apportés lors de la réalisation des tests antimicrobiens sur le modèle animal.

Aux membres des Laboratoires de Microbiologie, Pharmacologie et Toxicologie, Chimie des Substances Naturelles et Synthèses Organiques, Biologie et Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I, pour leur assistance technique et le matérielle.

A l'Honorable Député **KOUNCHE Albert** et madame **KENGNE Léonie** pour leur soutien financier.

A mes frères et sœurs **KAMGA TAMO Aurélien**, **BOUKDJOM Caroline**, **TOUOMKAM Pamela**, **MAFO Eugénie**, **YOUSSOPHA Darryl**, **TOTA Joseph** et **KAMGA FOKA Robert** pour leur contribution matérielle et leurs encouragements.

A mes amis et collègues **MUNDENE-THIMOTEE Laurence**, **EZO'O MENDO Fabrice**, **DJIDERE AOUDOU Paul**, **NJANKOUO NDAM Youchahou**, **MANET Linda**, **KEMEGNE Gislaine**, **YOUTE FANCHE Sandrine**, **NKOUE TONG Abraham** et **DONGMO NANFACK Albert**. Merci pour votre soutien moral.

A tous ceux qui de près ou de loin ont participé à la réalisation de ce travail, veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ALAT : Alanine Aminotransférase	Hsp : <i>Heat shock proteins</i>
ALS : <i>Agglutinin-Like Sequence</i>	HSQC : <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
ASAT : L-Aspartate Aminotransférase	IL : Interleukine
ATCC : <i>American Type Culture Collection</i>	INF : Interférons
BCR : <i>B cells receptor</i>	IS : Indice de sélectivité
C. : <i>Candida</i>	ISFB : Indice Spécifique de Formation de Biofilms
CAT : Catalase	LIP : Lipases
CDC : <i>Center for Disease Control</i>	MR : <i>Mannose receptor</i>
CLSI : <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>	NCCLS : <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	NK : <i>Natural Killer</i>
CMF : Concentration Minimale Fongicide	Phr : <i>Phosphate starvation response</i>
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice	PMNs : Polymorphonucléaires
EDTA : <i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>	rIFN-γ1b : <i>recombinant interferon-γ1b</i>
ESM : Erreur Standard de la Moyenne	RMN ^{13}C : Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13
Erg : Ergostérol	RMN ^1H : Résonance Magnétique Nucléaire du Proton
FDA : <i>Food and Drug Administration</i>	SAP : <i>Secreted Aspartyl Protease</i>
FIC : <i>Fractional Inhibition Concentration</i>	SDA : <i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
FICI : <i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i>	SDB : <i>Sabouraud Dextrose Broth</i>
FDA : <i>Food and Drug Administration</i>	TGF : <i>Transforming Growth Factor</i>
G-CSF : <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>	TCA : <i>Trichloroacetic acid</i>
GM-CSF : <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>	Th : <i>T-helper</i>
HMBC : <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>	TLR : <i>Toll-like Receptor</i>
G-CSF : <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>	TNF : <i>Tumor Necrosis Factor</i>
	UFC : Unités Formant Colonie

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Ecologie de quelques espèces de <i>Candida</i>	6
Tableau II : Utilisations traditionnelles et travaux antérieures sur les plantes étudiées	31
Tableau III : Informations sur les plantes étudiées	33
Tableau IV : Protocole de dosage de la créatinine	53
Tableau V : Rendements d'extraction des plantes testées	59
Tableau VI : CMI, CMF et rapport CMF/CMI des extraits aqueux des plantes testées.....	60
Tableau VII : CMI, CMF et rapport CMF/CMI des infusés aqueux des plantes testées	62
Tableau VIII : CMI, CMF et rapport CMF/CMI des extraits hydro-éthanoliques des plantes testées	64
Tableau IX : Criblage phytochimique de l'extrait GLE	66
Tableau X : CMI, CMF et rapport CMF/CMI des fractions, sous-fractions et composés isolés de l'extrait GLE	67
Tableau XI : Influence de l'ergostérol sur la CMI de l'extrait GLE	69
Tableau XII : CMI sur <i>C. albicans</i> ATCC 18804 et interprétations des combinaisons	74
Tableau XIII : CMI sur <i>C. glabrata</i> ATCC 90030 et interprétations des combinaisons.....	75
Tableau XIV : CMI sur <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803 et interprétations des combinaisons	75
Tableau XV : CMI sur <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 et interprétations des combinaisons	75
Tableau XVI : CMI sur <i>C. krusei</i> ATCC 6258 et interprétations des combinaisons	76
Tableau XVII : CMI sur <i>C. dubliniensis</i> ATCC 7289 et interprétations des combinaisons	76
Tableau XVIII : CMI sur <i>C. guilliermondii</i> ATCC 6260 et interprétations des combinaisons....	76
Tableau XIX : Récapitulatif des interactions obtenues des combinaisons	77
Tableau XX : Paramètres sériques observés en fin de traitement	80
Tableau XXI : Masse corporelle des animaux et masse relative des organes	81
Tableau XXII : Taux de mortalité des animaux lors du traitement	82
Tableau XXIII : Concentration cytotoxique 50 et indices de sélectivité de l'extrait GLE sur les souches testées	86
Tableau XXIV : Interprétation des paramètres d'inhibition des extraits aqueux des plantes testées.....	b
Tableau XXV : Interprétation des paramètres d'inhibition des infusés aqueux des plantes testées.....	d
Tableau XXVI : Interprétation des paramètres d'inhibition des extraits hydro-éthanoliques des plantes testées.....	f
Tableau XXVII : Interprétation des paramètres d'inhibition des fractions, sous-fractions et composés isolés	h

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cellule de <i>Candida</i>	4
Figure 2 : Paroi et membrane cellulaire des <i>Candida</i>	5
Figure 3 : Types morphologiques des levures du genre <i>Candida</i>	7
Figure 4 : Etapes de formation de biofilms chez les <i>Candida</i>	8
Figure 5 : Etapes de la phagocytose	10
Figure 6 : Principales cellules phagocytaires anti- <i>Candida</i>	11
Figure 7 : Rôle des lymphocytes T dans l'immunité anti- <i>Candida</i>	14
Figure 8 : Aspects cliniques des candidoses chez l'homme	17
Figure 9 : Cibles cellulaires des antifongiques	23
Figure 10 : Biofilms et résistance antifongique	26
Figure 11 : Photographies des plantes étudiées	34
Figure 12 : Schéma général du travail	37
Figure 13 : Fractionnement de l'extrait GLE	42
Figure 14 : Purification de la sous-fraction Sf1	43
Figure 15 : Purification de la sous-fraction Sf3	43
Figure 16 : Structures chimiques des composés isolés de l'extrait GLE	68
Figure 17 : Effet de l'extrait GLE sur la perméabilité de la membrane fongique	70
Figure 18 : Indices spécifiques de formation de biofilms aux concentrations sub-inhibitrices d'extrait GLE	72
Figure 19 : Pourcentage d'inhibition de l'activité métabolique des biofilms aux concentrations sub-inhibitrices d'extrait GLE	73
Figure 20 : Variation de la charge fongique dans le sang au cours du temps	78
Figure 21 : Variation de la charge fongique dans le rein au cours du temps	78
Figure 22 : Effet de l'extrait GLE, de l'acide alphitolique et de l'acide épigouanique sur la modulation de l'activité phagocytaire des polymorphonucléaires neutrophiles	83
Figure 23 : Effet de l'extrait GLE sur l'indice phagocytaire.....	84
Figure 24 : Effet de l'extrait GLE sur la clairance carbone.....	85
Figure 25 : Effet de l'extrait GLE sur le glutathion réduit hépatique.....	85
Figure 26 : Activité hémolytique de l'extrait GLE sur les érythrocytes de mouton	86
Figure 27 : Droites d'étalonnage pour le dosage de l'ALAT et l'ASAT	q
Figure 28 : Droite de régression exprimant le taux d'hémolyse en fonction de la concentration d'extrait GLE	q

RESUME

Ce travail avait pour objectif général d'évaluer les activités anti-*Candida* et immunostimulatrice de l'infusé aqueux de tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.), une plante de la pharmacopée camerounaise. L'activité anti-*Candida* de cet extrait a été évaluée sur sept souches de *Candida* par la méthode de dilution en milieu liquide. D'après les résultats obtenus, l'extrait a inhibé la croissance de toutes les souches testées et a été fongicide sur 6 d'entre elles. L'extrait aurait pour mode d'action de se fixer à l'ergostérol entraînant la dégénérescence de la membrane plasmique fongique. Deux composés bioactifs en ont été isolés à savoir l'acide alphaltolique et l'acide épigouanique. Dans la suite du travail, l'effet de l'extrait sur les biofilms microbiens, les antifongiques et la candidémie induite chez le rat a été évalué. Aux concentrations sub-inhibitrices, l'extrait a significativement réduit la formation des biofilms chez toutes les souches de *Candida* testées. Une réduction significative du métabolisme des biofilms préformés a également été observée. La combinaison de l'extrait aux antifongiques a permis de déceler des interactions synergiques dans lesquelles les CMI des antifongiques ont été réduites de 50 à 98,43 %. Par ailleurs, l'extrait a été actif sur la candidémie induite chez le rat en réduisant significativement la charge fongique dans le sang et les reins des animaux infectés. Après 4 jours de traitement à une dose d'extrait de 400 mg/kg, la charge fongique sanguine a été réduite de 99,99 %. L'activité immunostimulatrice de l'extrait a ensuite été évaluée *in vitro* sur les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) et *in vivo* sur le système réticulo-endothélial du rat. D'après les résultats, l'extrait GLE a stimulé l'activité phagocytaire des PMNs aux concentrations comprises entre 5 µg/mL (4,25 %) et 640 µg/mL (42,55 %). *In vivo*, l'extrait GLE a provoqué une augmentation significative de l'indice phagocytaire du système réticulo-endothélial des animaux traités aux doses de 50 mg/kg (P < 0,01), 100 mg/kg (P < 0,001) et 200 mg/kg (P < 0,001). La toxicité de l'extrait a enfin été évaluée. Il en est ressortit que l'extrait GLE possède une sélectivité élevée pour les souches *Candida* testées et pourrait éliminer l'agent pathogène chez l'hôte sans causer de dommages tissulaires. L'infusé aqueux des tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.) pourrait être mis à profit dans la thérapie contre les infections dues aux *Candida*.

Mots clés : *Gouania longipetala* (Hemsl.), candidoses, immunostimulation.

ABSTRACT

The general objective of this work was to evaluate the anti-*Candida* and immunostimulatory activities of the aqueous infused with stems of *Gouania longipetala* (Hemsl.), a plant from the Cameroonian pharmacopoeia. The anti-*Candida* activity of this extract was evaluated on seven strains of *Candida* by the liquid dilution method. Based on the results obtained, the extract inhibited the growth of all strains tested and was fungicidal on 6 of them. The extract is believed to bind to ergosterol resulting in degeneration of the fungal plasma membrane. Two bioactive compounds have been isolated there, namely alphitolic acid and epigouanic acid. In further work, the effect of the extract on microbial biofilms, antifungals and induced candidemia in rats was evaluated. At sub-inhibitory concentrations, the extract significantly reduced biofilm formation in all *Candida* strains tested. A significant reduction in the metabolism of preformed biofilms was also observed. The combination of the extract with the antifungals showed synergistic interactions in which the MICs of the antifungals were reduced by 50 to 98.43%. Furthermore, the extract was active on induced candidemia in rats by significantly reducing the fungal load in the blood and kidneys of infected animals. After 4 days of treatment at a dose of 400 mg/kg extract, the fungal load in the blood was reduced by 99.99%. The extract's immunostimulatory activity was then evaluated *in vitro* on polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and *in vivo* on the rat reticuloendothelial system. Based on the results, the GLE extract stimulated phagocytic activity of PMNs at concentrations between 5 µg/mL (4.25%) and 640 µg/mL (42.55%). *In vivo*, the GLE extract caused a significant increase in the phagocytic index of the reticuloendothelial system of animals treated at doses of 50 mg/kg ($P < 0.01$), 100 mg/kg ($P < 0.001$) and 200 mg/kg ($P < 0.001$). Finally, the toxicity of the extract was assessed. It was found that the GLE extract has a high selectivity for the *Candida* strains tested and could eliminate the pathogen in the host without causing tissue damage. The aqueous infusion of the stems of *Gouania longipetala* (Hemsl.) Could be used in therapy against infections due to *Candida*.

Keywords: *Gouania longipetala* (Hemsl.), candidiasis, immunostimulation.

INTRODUCTION

Les infections fongiques font près de 1,6 million de décès dans le monde chaque année et leur incidence ne cesse d'augmenter malgré les progrès thérapeutiques (**Coronado et Jiménez-Soriano, 2013**). Elles sont à 80 % causées par les levures du genre *Candida* à l'origine d'infections se manifestant par des lésions cutanéomuqueuses, une fongémie et parfois une inflammation des viscères (**Neeta et Uttamkumar, 2011**). Encore appelées candidoses, ces infections opportunistes peuvent avoir une lourde morbi-mortalité chez les patients immunodéprimés mais aussi chez ceux présentant des facteurs de risques tels que la grossesse, une chimiothérapie intensive, etc. Bien que la communauté scientifique soit constamment à la recherche de nouveaux médicaments, le traitement des candidoses repose de nos jours sur un nombre limité d'antifongiques à savoir les polyènes, azolés, échinocandines et fluoropyrimidines (**Adamczyk, 2011**). Cette thérapie est malheureusement confrontée à la résistance microbienne due d'une part à la sélection au fil du temps des phénotypes de *Candida* naturellement résistants ou ayant acquis une résistance aux médicaments disponibles et d'autre part à l'aptitude des levures du genre de *Candida* à produire des biofilms (**CDC, 2020**).

La résistance des *Candida* aux antifongiques reste une préoccupation majeure en santé publique (**Brown et al., 2012**). Elle est à l'origine d'infections particulièrement réfractaires aux traitements disponibles avec pour conséquences l'augmentation des dépenses médicales, la prolongation des hospitalisations et une hausse de la mortalité (**Nagarathna et al., 2013**). Plusieurs antifongiques autrefois utilisés comme traitement de première ligne contre les candidoses ont perdu leur efficacité thérapeutique. C'est le cas de la 5-Fluorocytosine qui n'est plus administrée en monothérapie dans le traitement des candidémies (**Guinea, 2014**). La résistance microbienne aux antifongiques constitue aujourd'hui une véritable menace pesant sur la santé humaine. Elle touche toutes les régions du monde. Au Cameroun par exemple, des auteurs tels que **Njunda et al. (2012)** ont fait état d'une prévalence élevée de phénotypes de *Candida* résistants aux antifongiques azolés et aux antifongiques polyéniques. Face à cette situation alarmante, il est possible que la rareté de médicaments actifs conduise le monde vers une ère où de simples infections courantes soient difficiles à traiter et deviennent meurtrières (**Brown et al., 2012**). De ce fait, des approches thérapeutiques alternatives sont de plus en plus envisagées afin de rendre plus efficace la thérapie antifongique. L'une d'elles consiste à

coupler l'immunothérapie à l'antibiothérapie lors de la prise en charge des patients (**Nagarathna et al., 2013**).

En effet, au cours d'un traitement antifongique, la stimulation des défenses immunitaires du patient permet d'éradiquer plus rapidement l'agent pathogène, éviter la surconsommation de médicaments, accélérer la guérison et empêcher l'évolution de l'infection vers une forme chronique (**Assia et al., 2013**). Les substances immunogènes administrées au patient pendant la thérapie antifongique peuvent être d'origine naturelle ou synthétique (**Wilfried et al., 2020**). Ce sont entre autres les extraits de plantes, facteurs de croissance, extraits de bactéries, composés synthétiques, etc. Il est par exemple prouvé que l'association du facteur de croissance G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) au Fluconazole permet de traiter plus efficacement la candidémie chez les immunodéprimés. Ces substances immunogènes stimulent principalement les cellules phagocytaires qui agissent à leur tour en synergie avec l'antifongique pour éradiquer l'agent pathogène de l'organisme. De nos jours, la recherche de médicaments pouvant inhiber l'agent infectieux tout en intensifiant les défenses immunitaires de l'hôte constitue un défi dans la lutte contre les infections fongiques récalcitrantes (**Brown et al., 2012**). Pour y parvenir, de nombreux chercheurs se tournent vers l'approche ethnopharmacologique. Ceci passe notamment par l'exploration des plantes médicinales.

Les plantes médicinales constituent une ressource thérapeutique précieuse dans toutes les régions du monde. Elles sont douées de propriétés pharmacologiques variées et la diversité de composés bioactifs qu'elles contiennent fait d'elles un outil important dans la recherche de nouvelles thérapies (**Marobela et al., 2013**). Dans la pharmacopée camerounaise, plus de 500 plantes médicinales ont été inventoriées (**Kenmogne, 2020**). Bien que plusieurs de ces plantes n'aient fait l'objet d'aucune étude scientifique justifiant leur propriété médicinale, elles sont consommées par les populations qui y trouvent satisfaction. C'est le cas par exemple de *Baillonella toxisperma* dont la décoction d'écorces est utilisée au Sud-Cameroun pour soigner la candidose vaginale ou encore de *Gouania longipetala* dont les feuilles sont utilisées à l'Ouest-Cameroun contre les infections fongiques cutanées (**Dzeufiet et al., 2015**). La validation scientifique des propriétés pharmacologiques de ces plantes médicinales et la compréhension des mécanismes d'action mis en jeu permettraient le développement de nouvelles thérapies (**Dzeufiet et al., 2015**). A ce jour, une multitude de travaux réalisés sur les plantes

médicinales du Cameroun a permis de dévoiler leur propriété antifongique et anti-*Candida* en particulier (**Riwom et al., 2015a ; Zeuko'o et al., 2016 ; Ngo-Mback et al., 2020**). De même, les propriétés immunostimulatrices des plantes médicinales ont été démontrées par plusieurs auteurs (**Bachelet, 2013 ; Faivre, 2010 ; Aichour, 2017**).

QUESTION DE RECHERCHE

L'infusé aqueux de tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.) peut-il inhiber la croissance fongique tout en stimulant le système immunitaire ?

HYPOTHESE DU TRAVAIL

L'infusé aqueux de tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.) possède un potentiel antifongique et peut stimuler le système immunitaire.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

La présente étude a pour objectif général d'évaluer les activités anti-*Candida* et immunostimulatrice de l'infusé aqueux de tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.), une plante de la pharmacopée camerounaise. Pour atteindre cet objectif, il était spécifiquement question de :

- Faire une étude *in vitro* et *in vivo* de l'activité anti-*Candida* de l'infusé aqueux de tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.) ;
- Evaluer l'effet de l'extrait sur l'activité phagocytaire des leucocytes et du système du système réticulo-endothélial ;
- Evaluer la toxicité de l'extrait.

Chapitre I

REVUE DE LITTERATURE

I. Levures du genre *Candida*

I.1. Taxonomie et caractères généraux

Les levures du genre *Candida* appartiennent au règne des champignons, phylum des ascomycètes, classe des saccharomycètes et ordre des saccharomycétales. Ce sont des microorganismes eucaryotes de forme ovoïde et de taille comprise entre 3 et 15 μm (**Ripert, 2013**). Elles sont non pigmentées, non capsulées, haploïdes ou diploïdes et la taille de leur génome est comprise entre 10 Mb et 14,5 Mb. Les levures du genre *Candida* sont hétérotrophes et de respiration aérobie ou aérobie facultative. Elles possèdent un thalle unicellulaire et se reproduisent par bourgeonnement des spores. Ces levures se distinguent des autres levures par la composition polysaccharidique de leur paroi cellulaire et leur aptitude à transiter de la forme ovoïde, encore appelée blastoconidie ou blastospore, vers une forme plus ou moins filamenteuse appelée hyphe ou pseudohyphe (**Paramera et al., 2014**).

I.2. Organisation cellulaire

La cellule de *Candida* possède tous les éléments cellulaires caractéristiques d'une cellule eucaryote (figure 1). Elle est constituée d'une paroi, d'une membrane cellulaire, d'un noyau qui renferme des chromosomes et de nombreux organites qui baignent dans le cytoplasme. La seule structure qui différencie le *Candida* d'une cellule eucaryote « classique » est la présence d'une vacuole cytoplasmique (**Russell et Stewart, 2008**).

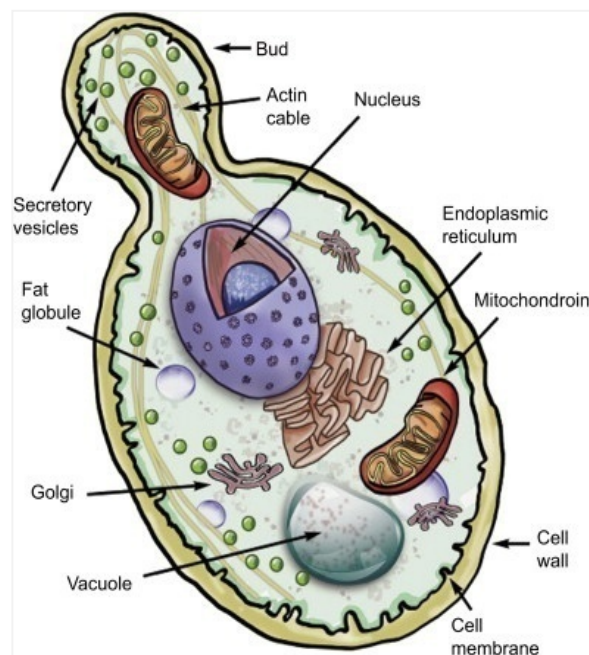


Figure 1 : Cellule de *Candida* (**Russell et Stewart, 2008**).

I.3. Paroi et membrane cellulaire

La paroi des *Candida* (figure 2) est une structure inerte formée de plusieurs couches. Elle est constituée de mannoprotéines, glucanes, chitine et lipides. Elle assure la rigidité et la protection de la cellule fongique vis-à-vis de la pression osmotique, température, pH, substances chimiques, etc (Rocio et al., 2020). La membrane cellulaire quant à elle est formée de deux feuillets contenant des lipides et protéines tels que les phospholipides, stérols, sphingolipides, chitine synthase, phospholipase, glucane synthase, etc. L'ergostérol est le constituant majoritaire de la membrane plasmique des *Candida*. Il assure le maintien de l'intégrité et de la fluidité membranaire (Sarazin, 2010).

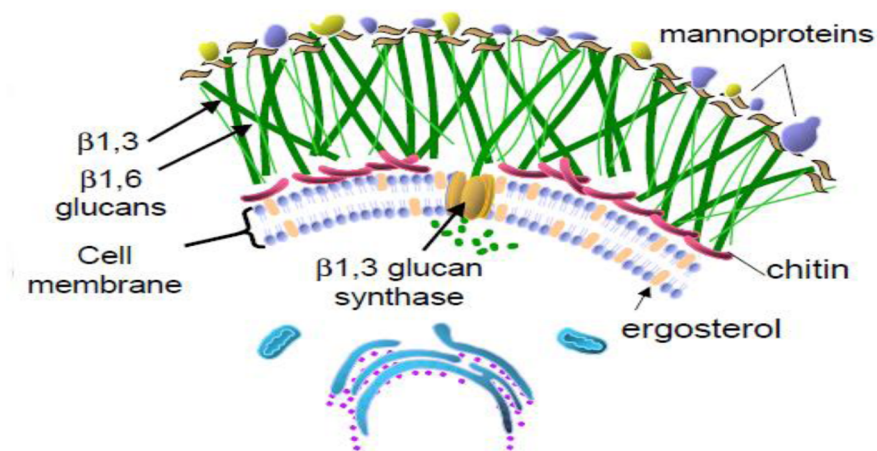


Figure 2 : Paroi et membrane cellulaire des *Candida* (Paramera et al., 2014).

I.4. Principales espèces de *Candida* d'intérêt médical et écologie

Le genre *Candida* compte plus de 200 espèces dont une vingtaine seulement peut causer des infections chez l'Homme. Ces levures vivent chez l'Homme à l'état saprophyte, en équilibre avec la flore bactérienne. Les *Candida* sont présents de manière asymptomatique chez près de 50 % de la population humaine. On les retrouve au niveau l'appareil génital, de la peau, du tractus gastro-intestinal, etc. Ce sont des levures opportunistes qui expriment leur pouvoir pathogène en présence de facteurs favorisants. Les espèces les plus rencontrées en pathologie humaine sont entre autres *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr* et *C. dubliniensis* (Berkow et Lockhart, 2017). Les levures du genre *Candida* possèdent une variété de niches écologiques (tableau I) et peuvent se retrouver dans les aliments, plantes, animaux, eau, sol, etc. (Sanguinetti et al., 2015).

Tableau I : Ecologie de quelques espèces de *Candida* (Sanguinetti et al., 2015)

Espèces de <i>Candida</i>	Ecologie
<i>C. albicans</i>	Tube digestif de l'Homme et des oiseaux ; voies génitales et respiratoires chez l'Homme ; sol ; produits alimentaires
<i>C. glabrata</i>	Muqueuse digestive et voie urogénitale
<i>C. parapsilosis</i>	Produits laitiers ; céréales ; peau ; tube digestif
<i>C. tropicalis</i>	Sol ; eau ; céréales ; voies digestive, urinaire et respiratoire
<i>C. krusei</i>	Voies digestive, urinaire et respiratoire ; peau ; air ; eau ; sol
<i>C. dubliniensis</i>	Oiseaux ; tube digestif ; muqueuse oropharyngée
<i>C. guilliermondii</i>	Peau ; aliments ; voies digestives et respiratoires ; eau ; air
<i>C. lusitanae</i>	Voies digestives ; peau

I.5. Facteurs de virulence des *Candida*

L'infection à *Candida* est le plus souvent initiée par une diminution des défenses immunitaires de l'hôte qui modifie l'équilibre de commensalisme au profit de la levure et entraîne le basculement du stade de colonisation à celui de l'infection. Les facteurs de virulence des *Candida* comprennent entre autres l'adhérence du pathogène aux tissus, le dimorphisme, la formation des biofilms, la sécrétion d'enzymes, la régulation du pH environnant, l'adaptation métabolique et l'interférence avec le système immunitaire (Mayer et al., 2013).

I.5.1. Adhérence

L'adhérence des *Candida* aux cellules de son hôte est un processus complexe faisant intervenir une multitude d'interactions de type « ligand-récepteur ». Elle repose sur la reconnaissance spécifique entre les adhésines fongiques et les récepteurs/ligands de l'hôte. Ces adhésines sont principalement des protéines, mannoprotéines, glycoprotéines et sucres variés de la paroi fongique. Chez *C. albicans* par exemple, les adhésines Als1p et Als3p permettent l'adhésion du pathogène aux cellules endothéliales et épithéliales de l'hôte. L'adhérence peut également se faire par formation de biofilms. Après adhérence, le revêtement cutanéomuqueux et les tissus profonds sont colonisés suite à la multiplication du pathogène (Sudbery, 2011).

I.5.2. Dimorphisme

Le dimorphisme est l'aptitude du pathogène à passer de la forme blastoconidie ronde ou ovale à une forme plus ou moins filamenteuse appelée pseudohyphes ou hyphes (figure 3). Cette transition est induite par un grand nombre de signaux environnementaux

tels que le pH, le niveau de CO₂, la température, etc. Le dimorphisme favorise l'invasion des tissus de l'hôte par l'agent pathogène et lui permet de contourner les défenses immunitaires de l'hôte (Thompson et al., 2011). En effet, les blastoconidies phagocytées par les cellules immunitaires peuvent produire des filaments capables de provoquer la lyse ces dernières, ce qui permet leur évation. De plus, dans des conditions environnementales pauvres en nutriments, les espèces *C. albicans* et *C. dubliniensis* peuvent présenter des formes de résistance appelées chlamydoconidies qui possèdent une paroi cellulaire plus épaisse leur permettant d'échapper aux effets microbicides des antifongiques et des substances environnantes (Jacobsen et al., 2012).

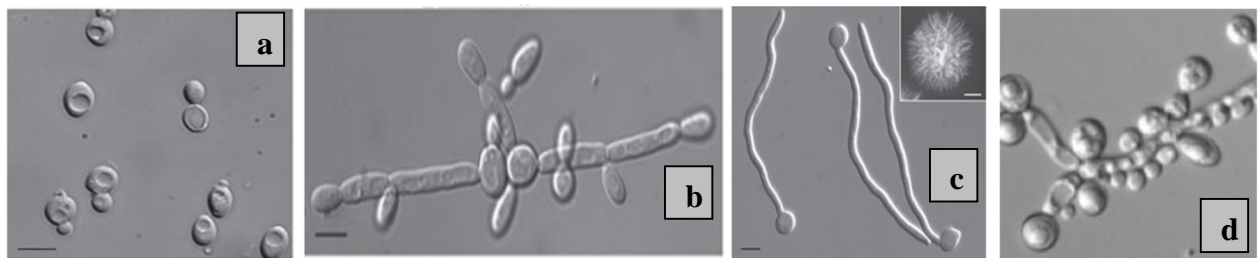


Figure 3 : Types morphologiques des levures du genre *Candida* ; (a) Blastoconidies, (b) Pseudohyphes, (c) Hyphes vrais, (d) Chlamydoconidies (Sudbery, 2011).

I.5.3. Formation des biofilms

Le biofilm est un ciment moléculaire constitué d'une matrice polysaccharidique excrétée par les microorganismes et dans lequel ces derniers vivent en communauté (Poissy, 2015). Cette vie en communauté permet la multiplication, la dissémination et la résistance du pathogène aux agressions physicochimiques. Les biofilms peuvent se développer sur des surfaces biotiques ou abiotiques telles que les muqueuses, prothèses dentaires, cathéters, etc. Tout d'abord, la levure sous forme planctonique adhère à la surface du support et commence à se multiplier pour former des microcolonies constituant la couche basale du biofilm. Les levures produisent ensuite des filaments pour initier la formation du biofilm. Le biofilm formé mature ensuite et est recouvert d'une matrice extracellulaire polysaccharidique. Il s'en suit enfin une dispersion de blastoconidies à partir du biofilm mature (figure 4). Ces cellules nouvellement formées possèdent de propriétés d'adhérence et de virulence plus accrues (Uppuluri et al., 2010).

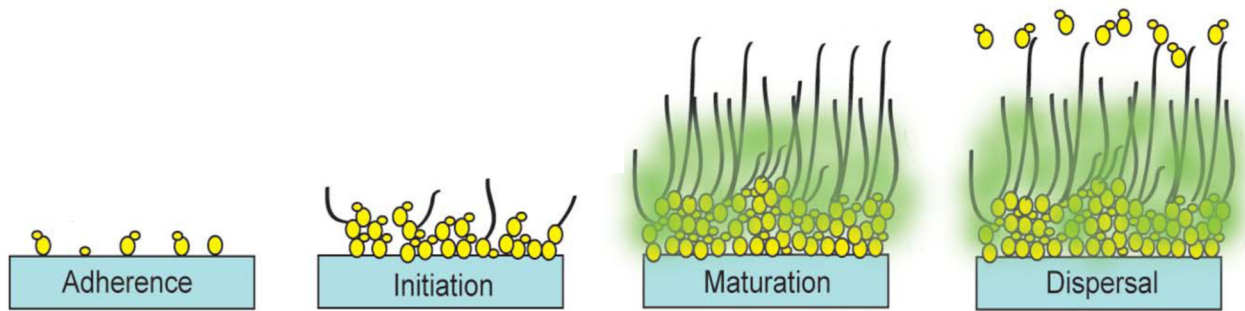


Figure 4 : Etapes de formation de biofilms chez les *Candida* (Finkel et Mitchell, 2011).

I.5.4. Sécrétion des enzymes

Les *Candida* possèdent toute une gamme d'enzymes hydrolytiques qui favorisent leur virulence lors de l'infection en dégradant les protéines, les structures cellulaires et tissulaires, ainsi que le système immunitaire de l'hôte. La famille des enzymes Sap (Secreted Aspartyl Protease) est la mieux caractérisée. Chez *C. albicans* elle comporte 10 membres, Sap1 à Sap10. Ces enzymes participent à la virulence du pathogène par divers mécanismes. Sap1, Sap2 et Sap3 par exemple favorisent l'adhésion du pathogène sur les cellules épithéliales. D'autres enzymes telles que les lipases ont également été caractérisées ; la phospholipase B par exemple facilite l'invasion des tissus de l'hôte par les *Candida*. De même la lipase LIP2 facilite l'acquisition des nutriments lipidiques par le pathogène en cas de carence (Poissy, 2015).

I.5.5. Régulation du pH environnant

Chez l'hôte humain, les *Candida* sont exposés à un pH environnant variant en fonction des tissus. Le pH du sang par exemple est de pH 7,4 celui du tube digestif varie de 2 à 8 et celui du vagin est d'environ 4,78. Certaines espèces de *Candida* peuvent détecter le pH extracellulaire et s'y adapter ou encore le moduler. Chez *C. albicans* par exemple, deux protéines de la paroi cellulaire du pathogène ont été identifiées comme intervenant dans la régulation du pH extracellulaire, les β -glycosidases Phr1 et Phr2. La β -glycosidase Phr1 est exprimée à pH neutre-alkalin lors des infections systémiques à *Candida*. En effet, un pH neutre-alkalin peut causer chez le pathogène un stress grave se manifestant par une acquisition déficiente en nutriments ; conséquence d'un gradient de protons perturbé (Mayer et al., 2013).

I.5.6. Adaptation métabolique

Au cours d'une infection fongique, la phagocytose du *Candida* par les cellules immunitaires de l'hôte l'expose à un stress oxydatif, des enzymes lysosomales et une carence nutritionnelle. Pour échapper au stress oxydatif les *Candida* surexpriment les gènes codant pour des enzymes telles que la superoxide dismutase, catalase, glutathion peroxidase et thiorédoxine réductase. Ces enzymes inactivent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites par les cellules phagocytaires. D'autres parts, lors d'une carence nutritionnelle, certains gènes métaboliques exprimés par le pathogène lui permettent de rétablir l'équilibre nutritionnel et de synthétiser les éléments nécessaires à sa croissance. Ainsi, le gène FTR1 par exemple code pour une perméase possédant une haute affinité pour le fer ; le gène CAT3 s'exprime lors d'une carence du milieu en glucose (Poissy, 2015). La colonisation des tissus de l'hôte par les *Candida* et l'installation de l'infection est toutefois fonction d'une balance entre les facteurs de virulence du pathogène et la réponse immunitaire de l'hôte.

I.6. Réponse immunitaire anti-*Candida*

Le développement des infections à *Candida* dépend de l'interaction entre le pathogène et les défenses immunitaires de l'hôte. La réponse immunitaire anti-*Candida* peut être innée ou adaptative (Brandes et al., 2017).

I.6.1. Immunité innée

La réponse immunitaire anti-*Candida* repose essentiellement sur l'immunité innée qui constitue la première et la principale ligne de défense contre l'infection. Ayant traversés les barrières naturelles (peau, muqueuses, etc.) et colonisés l'hôte, les *Candida* sont confrontés à différents éléments du système immunitaire dont les principaux acteurs sont les cellules phagocytaires ou phagocytes qui capturent l'agent infectieux et l'éliminent de l'organisme (Brandes et al., 2017). Ceci est possible suite à une reconnaissance initiale du pathogène par le phagocyte.

I.6.1.1. Reconnaissance des *Candida* par les cellules phagocytaires

L'action anti-infectieuses des cellules phagocytaires nécessite au préalable la reconnaissance du pathogène par des récepteurs PRRs (Pattern Recognition Receptors) de la cellule immunitaire. Ces PRRs peuvent être intra ou extracellulaires. Ils sont de plusieurs

familles à savoir les récepteurs toll like (TLR), mannoses (MR), C-type lectin like (CLR), mincle, etc. Les PRRs reconnaissent et se lient à différents composés microbiens appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Chez les *Candida* les PAMPs sont principalement des constituants de la paroi fongique tels que les β -D-glucanes, les protéines O-mannosylées et N-mannosylées, le mannose et la chitine. La reconnaissance des PAMPs par les PRRs va aboutir à l'activation de voies de signalisation intracellulaire dont la résultante est l'activation du phagocyte qui englutit et détruit l'agent pathogène (El-Kirat-Chatel, 2010).

I.6.1.2. Engloutissement et destruction du pathogène

La phagocytose de l'agent pathogène (figure 5) se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, grâce à des récepteurs non spécifiques ou des récepteurs pour opsonines, le pathogène adhère à la membrane cellulaire du phagocyte. La cellule développe des pseudopodes autour du pathogène pour l'internaliser dans une vésicule appelée phagosome. Les lysosomes cytoplasmiques fusionnent ensuite avec le phagosome pour former un phagolysosome à l'intérieur duquel l'agent pathogène est lysé par une cascade de mécanismes oxydatifs et non-oxydatifs tels que les espèces réactives de l'oxygène, les protéases et les lysozymes. Le produit de digestion du pathogène est enfin excrété par exocytose (Du et Calderone, 2009).

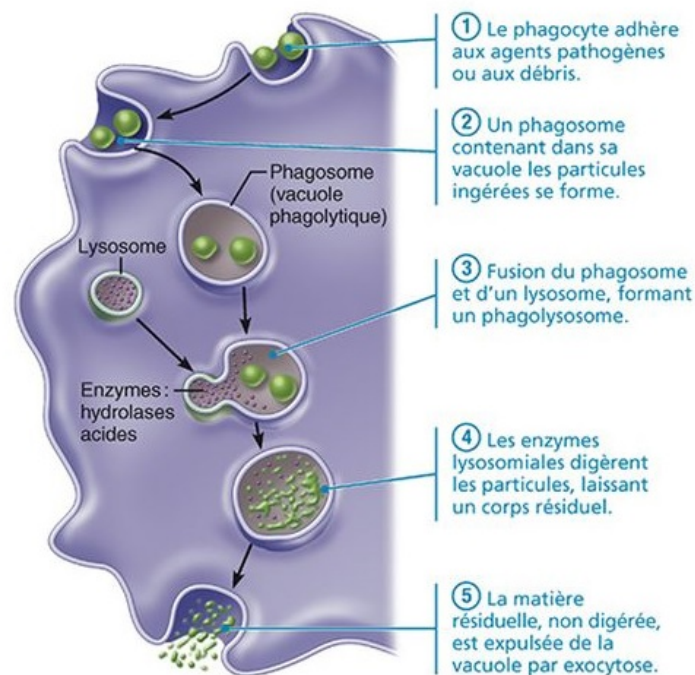


Figure 5 : Etapes de la phagocytose (El-Kirat-Chatel, 2010).

I.6.1.3. Cellules phagocytaires impliquées dans l'immunité anti-*Candida*

Les principales cellules phagocytaires (figure 6) impliquées dans l'immunité anti-*Candida* sont les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages. Les cellules NK et cellules dendritiques y jouent également un rôle (El-Kirat-Chatel, 2010).

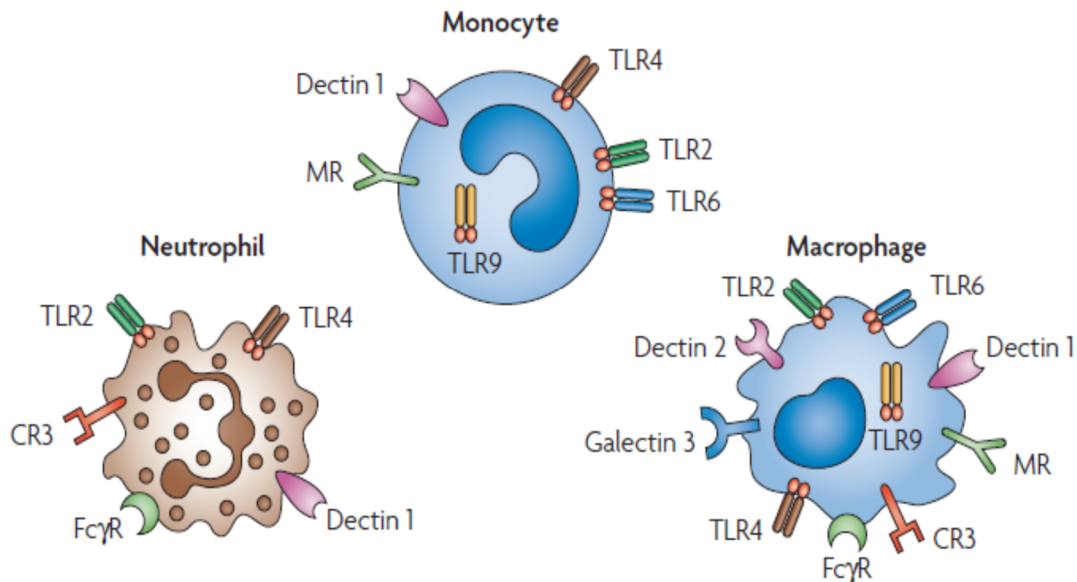


Figure 6 : Principales cellules phagocytaires anti-*Candida* (El-Kirat-Chatel, 2010).

I.6.1.3.1. Polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles (PNNs) constituent après les barrières épithéliales, la première ligne de défense contre les infections à *Candida* (Pillay et al., 2010). Ils représentent près de 70 % des globules blancs et phagocytent les pathogènes circulant dans le sang (Horn et al., 2010). De nombreuses études soutiennent le rôle primordial des PNNs dans la réponse anti-*Candida*. A travers des observations cliniques chez l'Homme, il a été démontré que les patients atteints de neutropénie (déficit en PNNs) sont plus susceptibles aux infections à *Candida*. Les PNNs sont capables de phagocyter aussi bien les formes blastoconidies que les formes filamenteuses des levures *Candida* (Brandes et al., 2017). Ce sont les seuls phagocytes capables d'inhiber la filamentation intracellulaire du pathogène (Brown, 2011). Leur rôle *in vivo* dans la défense de l'hôte contre la candidose disséminée est bien décrit. L'action phagocytaire des PNNs est complétée dans l'organisme par celle des monocytes/macrophages.

I.6.1.3.2. Monocytes/macrophages

Les monocytes proviennent de la différenciation des cellules pluripotentes de la moelle osseuse (**Hume et al., 2012**). Ils sont présents dans le sang et évoluent en macrophages en passant dans les tissus. Les monocytes/macrophages sont impliqués dans la réponse immune innée anti-*Candida* par leur capacité à reconnaître et à éliminer l'agent pathogène par la phagocytose. Chez l'Homme, le rôle des monocytes et macrophages dans la réponse anti-*Candida* a été démontré. Une susceptibilité accrue aux infections à *Candida* a été mise en évidence chez les patients présentant un déficit en myéloperoxydase, une enzyme qui métabolise les espèces oxygénées réactives nécessaires à l'élimination des agents pathogènes par les monocytes/macrophages (**Break et al., 2015**). Une autre étude a démontré que les patients chez qui les récepteurs des macrophages présentent un déficit fonctionnel sont plus sensibles aux candidoses disséminées (**Ngo et al., 2014**). En outre, les monocytes/macrophages participent à la réponse immunitaire adaptative par leur capacité à présenter les particules antigéniques aux lymphocytes T et à sécréter les cytokines (**Hume et al., 2012**).

I.6.1.3.3. Cellules Natural Killer (NK)

Les cellules NK sont capables de phagocyter les *Candida* et les éliminer de l'organisme. Toutefois, leur rôle primordial dans l'immunité anti-*Candida* est leur influence sur les autres cellules du système immunitaire. En effet, il a été démontré qu'au cours d'une candidose invasive, l'activation des cellules NK par les *Candida* entraîne une sécrétion accrue d'INF- γ et TNF- α par ces dernières (**Quintin et al., 2014**). Ces cytokines activent à leur tour les macrophages et neutrophiles. Par conséquent, une déplétion en cellules NK supprimerait l'activité anti-infectieuse des macrophages et neutrophiles contre les *Candida*. D'autres parts, les cellules NK sécrètent des perforines extracellulaires qui détruisent l'agent pathogène par action directe (**Voigt et al., 2014**).

I.6.1.3.4. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont capables de phagocyter et d'éliminer les *Candida* aussi bien sous leur forme blastoconidie que sous la forme d'hyphe. Elles présentent toutefois une activité fongicide moindre par rapport aux neutrophiles, monocytes et macrophages. Les cellules dendritiques sont plus spécialisées dans la capture, le transport et la présentation d'antigènes aux lymphocytes T (**Reizis et al., 2011**). Elles ont un rôle de

« patrouilleur » et sont présentes dans le sang à l'état immature (**Roy et Klein, 2012**). En réponse aux *Candida*, elles se différencient en cellules matures présentant des dendrites leur permettant de migrer vers les organes lymphoïdes où elles déclenchent l'activation et la différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices. Elles établissent ainsi un lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (**Reizis et al., 2011**).

I.6.2. Immunité adaptative

Après initiation de la réponse l'immunitaire innée, une réponse secondaire adaptative est mise sur pieds. Celle-ci comporte deux phases, une première dite à médiation cellulaire où les lymphocytes T sont les principaux acteurs et une seconde à médiation humorale faisant intervenir les anticorps sécrétés par les lymphocytes B (**Richardson et Moyes, 2015**).

I.6.2.1. Lymphocytes T

L'immunité adaptative anti-*Candida* repose principalement sur les lymphocytes T CD4+ encore appelées cellules T helper (Th). Après présentation d'antigènes fongiques aux lymphocytes T CD4+ naïfs par les cellules dendritiques, ces derniers vont sous l'influence des cytokines se différencier et transiter de l'état Th0 (non activé) à l'état Th1, Th2, Th17 ou Treg (figure 7). Cette transition est toutefois régulée car les cytokines qui conduisent au développement d'un type Th inhibent le développement des autres types Th ; c'est la polarisation. La polarisation Th1 est stimulée par les cytokines telles que IL-12. La polarisation Th2 est stimulée par IL-4 et la polarisation Th17 est stimulée par IL-6 et IL-23. Les lymphocytes Th1 et Th17 ainsi activés vont produire des cytokines particulières qui vont à leur tour activer les cellules phagocytaires anti-*Candida* (**Ramirez-Ortiz et Means, 2012**).

Il a été démontré que les lymphocytes Th1 et Th17 participent respectivement à la protection contre les candidoses orales, cutanées et systémiques. Le processus inflammatoire est cependant sous le contrôle des cellules régulatrices Treg qui produisent des cytokines telles que IL-10 et TGF- β qui inhibent les réponses Th1 et Th17. Contrairement aux phénotypes protecteurs Th1 et Th17, l'induction d'un phénotype Th2 est très souvent associée à une augmentation de la croissance et de la dissémination de l'agent fongique (**Romani et al., 2015**). Il a été démontré que les cellules T CD8+ ne

jouent pas un rôle essentiel dans la défense de l'hôte face aux infections à *Candida* (Richardson et Moyes, 2015).

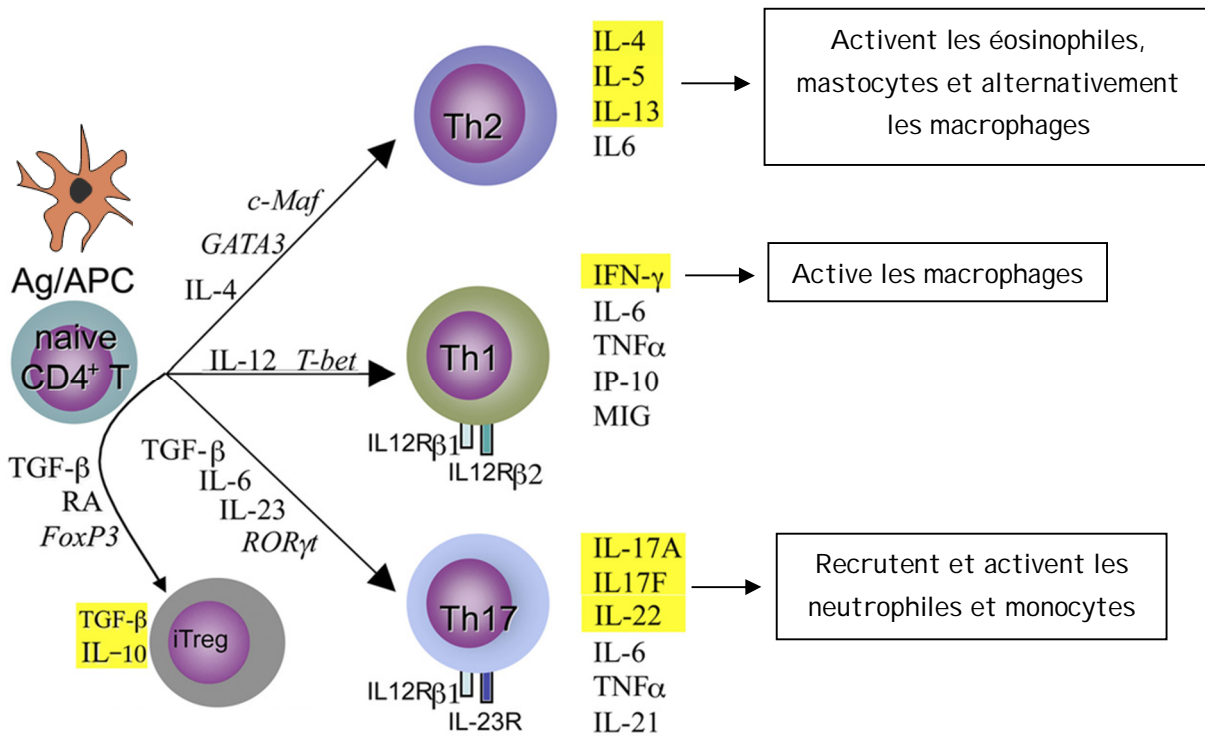


Figure 7 : Rôle des lymphocytes T dans l'immunité anti-*Candida* (Romani et al., 2015).

I.6.2.2. Lymphocytes B et anticorps

Les lymphocytes B sont caractérisés par la présence d'anticorps à leur surface. Ces anticorps jouent le rôle de récepteurs spécifiques (BCR) à l'antigène. Après fixation à l'antigène et activation, les lymphocytes B se transforment en plasmocytes qui sécrètent des anticorps. Pendant de nombreuses années, le rôle des anticorps dans l'immunité anti-*Candida* a été controversé (Casadevall et Pirofski, 2012). Cependant, il a été démontré ces dernières années que les anticorps pourraient jouer un rôle dans la protection contre les infections à *Candida*. Un certain nombre d'anticorps monoclonaux ont été décrits pour *C. albicans*. En effet, plusieurs motifs cibles des anticorps sont présents au niveau de la paroi des *Candida* (polysaccharides, glycolipides, etc.). Les anticorps agiraient en perturbant ou en interférant avec les processus pariétaux (Brena et al., 2011).

I.7. Facteurs favorisant les infections à *Candida*

Du fait de leur caractère opportuniste, les levures du genre *Candida* peuvent engendrer une infection suite à une altération des barrières anatomiques, une maladie sous-jacente affaiblissant l'immunité de l'hôte ou encore à un déséquilibre de la flore

endogène normale. De manière générale, les facteurs favorisant les candidoses peuvent être intrinsèques ou extrinsèques à l'hôte (Kah, 2011).

I.7.1. Facteurs intrinsèques

Les facteurs intrinsèques sont dits de terrain. Il peut s'agir de facteurs locaux liés à l'hôte, de facteurs physiologiques ou de maladies sous-jacentes chez l'hôte.

I.7.1.1. Facteurs locaux

Les levures du genre *Candida* sont dotées d'un grand pouvoir d'adaptation et peuvent passer chez leur hôte de l'état saprophyte à l'état pathogène dès que des conditions idéales à leur développement se présentent. Les facteurs locaux à l'origine de cette transition peuvent être la mauvaise hygiène, la sudation, l'humidité, pH acide, brûlure étendue, lésions du tractus digestif, blessures, frottements, irritation, etc. Ces conditions peuvent favoriser l'installation et le développement des candidoses au niveau de la peau et/ou des muqueuses (Madhu, 2013).

I.7.1.2. Facteurs physiologiques

Les facteurs physiologiques peuvent être l'âge, la grossesse, le stress, surcharge pondérale, etc. Les nouveau-nés sont plus sensibles aux candidoses du fait de l'immaturation de leur système immunitaire mais aussi de leur flore microbienne encore incomplète. De part la modification de pH vaginal, la grossesse rend les femmes enceintes particulièrement sensibles au développement des levures (Talarmin et al., 2009). Le stress peut entraîner une sécrétion accrue de β -endorphines avec pour conséquence un désordre immunitaire local qui favorise la filamentation de *C. albicans* dans le vagin et la survenue d'une candidose vaginale (Yapar, 2014).

I.7.1.3. Maladies sous-jacentes

Toute maladie provoquant une baisse des défenses immunitaires de l'hôte est susceptible d'induire le déclenchement d'une candidose. C'est le cas du diabète sucré, du SIDA ou encore de la leucémie. Le diabète sucré est associé à une diminution de l'activité des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes (Casqueiro et al., 2012). Le SIDA est à l'origine de la chute du taux de lymphocytes T CD4+. La leucémie quant à elle entraîne une diminution des fonctions de l'immunité innée et humorale (Yapar, 2014).

I.7.2. Facteurs extrinsèques

Les facteurs extrinsèques exposant aux candidoses peuvent être l'alimentation, l'antibiothérapie à large spectre, les traitements immunosuppresseurs et anticancéreux, les dispositifs médicaux, la transplantation d'organes solides, etc. (**Kah, 2011**).

I.7.2.1. Facteurs alimentaires

La surconsommation de sucres est propice au développement des *Candida* dans l'intestin et peut provoquer une candidose intestinale. De même, certaines carences nutritionnelles telles qu'un déficit en fer rend les patients plus susceptibles aux candidoses chroniques ; le mécanisme reste inconnu. La nutrition parentérale peut également être un facteur de risque. En effet, il a été démontré que les aliments administrés par voie intraveineuse aux patients peuvent être transporteurs de germes fongiques à l'origine d'une infection (**Tadec et al., 2016**).

I.7.2.2. Antibiothérapie à large spectre

La prise d'antibiotiques à large spectre, surtout lorsqu'elle est prolongée, peut altérer la flore bactérienne et déstabiliser l'équilibre commensal. Ainsi, la modification qualitative et quantitative des bactéries commensales de la muqueuse intestinale favorise la prolifération des saprophytes du genre *Candida*. Ceci peut être à l'origine du déclenchement d'une candidose digestive et/ou d'une candidémie (**Tadec et al., 2016**).

I.7.2.3. Traitements immunosuppresseurs et anticancéreux

Les médicaments immunosuppresseurs ou cytotoxiques utilisés dans la thérapie anticancéreuse entraînent la diminution des défenses immunitaires de l'hôte, le prédisposant ainsi au développement de pathologies opportunistes parmi lesquelles les candidoses. Ainsi, la corticothérapie par exemple est un facteur à risque majeur pour le développement de candidoses chez les patients leucémiques. Elle est à l'origine d'une déplétion de lymphocytes T et de phagocytes (**Kah, 2011**).

I.7.2.4. Dispositifs médicaux

Les dispositifs médicaux prédisposant aux infections à *Candida* en milieu hospitalier peuvent être entre autres les cathéters, sondes, dispositifs intra-utérins, prothèses dentaires, etc. En effet, la formation de biofilms fongiques à la surface des dispositifs médicaux est un foyer à risque de transmission de germes infectieux et

d'établissement d'infection à *Candida*. De nombreux cas de candidémie ont été signalés comme associés aux traitements chirurgicaux (Cateau et al., 2012).

I.7.2.5. Transplantation d'organes solides

Lors d'une greffe d'organes solides tels que le cœur, les poumons, les reins, le foie ou le pancréas, la principale complication reste la survenue d'une infection notamment les infections fongiques invasives. Une étude réalisée par le réseau américain TRANSNET (Transplant-Associated Infection Surveillance Network) a mis en évidence l'incidence des candidoses chez les patients ayant subi une greffe d'organe solide. Sur 1208 cas d'infections 639 étaient des candidoses invasives soit 52,9 % (Pappas et al., 2010).

I.8. Aspects cliniques des candidoses

Les candidoses peuvent se présenter sous plusieurs formes cliniques. En fonction de la localisation de l'infection on peut les regrouper en candidoses superficielles et candidoses systémiques (figure 8).

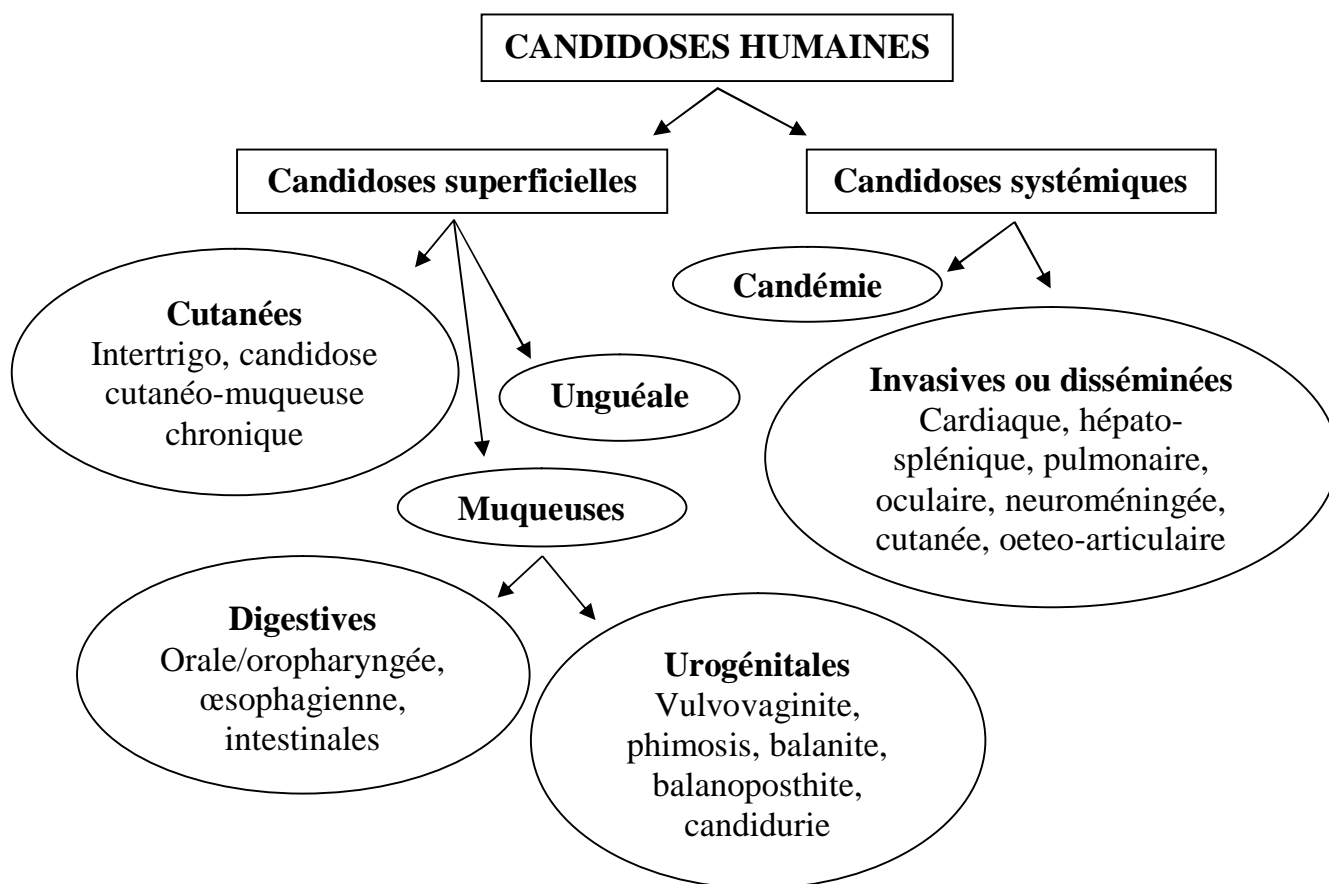


Figure 8 : Aspects cliniques des candidoses chez l'homme (Giannini et Shetty, 2011 ; Coronado et Jiménez-Soriano, 2013).

I.8.1. Candidoses superficielles

Les candidoses superficielles sont les manifestations cliniques les plus courantes d'infections à *Candida*. Souvent bénignes, elles correspondent à une infection de la peau, des phanères ou des muqueuses (**Coronado et Jiménez-Soriano, 2013**).

I.8.1.1. Candidoses cutanées

Les *Candida* vivent à l'état saprophyte sur la peau et peuvent provoquer des infections cutanées en présence de facteurs favorisants. Les candidoses cutanées peuvent être aiguës ou chroniques, généralisées ou limitées à un tégument. Parmi ces infections, on distingue entre autres l'intertrigo et la candidose mucocutanée chronique (**Metin et al., 2018**). L'intertrigo à *Candida* correspond à une inflammation au niveau des zones de contact peau à peau telles que les aisselles, plis sous-mammaire, zones interdigitales, etc. Le principal facteur de développement des lésions est le frottement mécanique sur la peau à l'origine d'un érythème. La candidose mucocutanée chronique quant à elle se caractérise par une inflammation chronique au niveau de la peau, des cheveux, du visage, du cuir chevelu et des mains (**López, 2010**).

I.8.1.2. Candidoses unguéales

Encore appelée onychomycose, la candidose unguéale correspond soit à un périonyxis soit à un onyxis (**ANOFEL, 2014**). Le périonyxis est une atteinte du tissu péri-unguéal qui se manifeste par une tuméfaction douloureuse et érythémateuse autour de la tablette unguéale. L'onyxis quant à lui fait suite au périonyxis et se traduit par une invasion de la tablette unguéale par l'infection. L'évolution de l'infection peut aboutir à une onycholyse totale. L'onychomycose touche environ 3 % d'enfants, 21 % d'adultes et 45 % de personnes âgées dans les pays développés (**Gaüzère, 2018**).

I.8.1.3. Candidoses des muqueuses

Les candidoses des muqueuses peuvent se localiser au niveau des voies digestives et uro-génitales (**Giannini et Shetty, 2011**). La candidose digestive correspond à des lésions inflammatoires sur la muqueuse oro-pharyngée, œsophagienne ou intestinale. L'infection oro-pharyngée est la plus fréquente. Elle touche près de 52 % de personnes atteintes de VIH et 1 à 37 % de nouveaux nés (**Erdogan et Rao, 2015**). Les symptômes d'une atteinte digestive sont entre autres l'apparition des plaques inflammatoires, douleur,

nausée, diarrhée, crampes intestinales, vomissement, etc. Les manifestations les plus fréquentes des candidoses uro-génitales comprennent la vulvovaginite chez la femme et la balanite chez l'homme (**Achkar et Fries, 2010**). La vulvovaginite se caractérise par des lésions érythémateuses, une leucorrhée et des démangeaisons vulvaires. Près de 75 % de femmes présentent au moins un épisode de vulvovaginite durant leur vie. La balanite quant à elle est une inflammation du gland du pénis. Elle affecte 3 à 11 % d'hommes et peut survenir à tout âge (**O'Farrell, 2005**).

I.8.2. Candidoses systémiques

Les candidoses systémiques sont les manifestations les plus graves de candidoses. Elles correspondent soit à une candidémie, soit à une candidose invasive ou disséminée (**Uppuluri et al., 2010**).

I.8.2.1. Candidémie

La septicémie à *Candida* ou candidémie est une infection prouvée par la présence d'une hémoculture positive chez des malades ayant présenté des signes cliniques ou des symptômes compatibles à l'infection. Elle est la conséquence d'une contamination exogène (cathéters, implants, etc.) ou du passage dans le sang de levures ayant colonisé des sites digestifs ou génito-urinaires (**Pfaller et Diekema, 2007**). La candidémie représente de nos jours environ 5 à 10 % des septicémies nosocomiales. Une étude réalisée par **Tessier (2017)** a montré qu'elle peut survenir chez près de 20,51 % de patients en Hématologie-Oncologie, 10 % de patients en Chirurgie et 12,74 % de patients en Réanimation. La mortalité globale est d'environ 50 % et peut dépasser les 60 % chez les individus de plus de 65 ans. La candidémie peut se manifester aussi bien chez les personnes en bonne santé que chez des patients présentant un système immunitaire affaibli. *Candida albicans* est l'espèce la plus impliquée (**Yapar, 2014**).

I.8.2.2. Candidose invasive ou disséminée

La candidose invasive correspond à une infection liée à la présence de la levure dans un site ou organe stérile tandis que la candidose disséminée se caractérise par la présence de la levure dans au moins deux sites ou organes stériles contigus ou non. Les régions touchées peuvent être le cœur, le foie, les reins, les poumons, les yeux, les méninges, les articulations, etc. (**Pfaller et Diekema, 2007**).

I.8.2.2.1. Candidose cardiaque

Lorsque les levures *Candida* traversent la circulation sanguine et se fixent aux zones endommagées du cœur, elles peuvent provoquer une inflammation appelée endocardite à *Candida* ou candidose cardiaque (**Zhang et al., 2014**). L'endocardite à *Candida* est une grave complication de la candidémie avec une mortalité se situant entre 30 et 40 % (**Shi-Min, 2016**). On la retrouve le plus souvent chez des patients présentant des lésions sur la valve native ou prothétique après une chirurgie cardiaque. Les symptômes d'une endocardite comprennent entre autres les douleurs articulaires, thoraciques et musculaires, fatigue, fièvre, frissons, sueur, essoufflement, gonflement des jambes, etc (**Shi-Min, 2016**).

I.8.2.2.2. Candidose hépatosplénique

Les infections hépatiques et spléniques surviennent le plus souvent de manière simultanée, raison pour laquelle elles sont abordées ensemble. Encore appelée candidose disséminée chronique, la candidose hépatosplénique est caractérisée par des microabcès persistants au niveau du foie, de la rate et parfois dans les reins. Elle survient généralement chez les patients atteints de neutropénie (**Cornely et al., 2015**). Les symptômes incluent le plus souvent des douleurs abdominales, une fièvre persistante malgré un traitement antibiotique, l'anorexie, nausées, etc (**Diekema et al., 2012**).

I.8.2.2.3. Candidose pulmonaire

L'infection pulmonaire à *Candida* est rare et le plus souvent liée à une dissémination hématologique du pathogène à partir d'un site distant tel que le tractus gastro-intestinal ou la peau (**Shweihat et al., 2015**). Elle peut subvenir chez des personnes saines mais la plupart des cas s'observe chez les immunodéprimés. On la retrouve fréquemment chez les patients atteints de tumeurs et les patients neutropéniques. C'est une co-infection observée chez environ 17 % de patients atteints de tuberculose. Les symptômes sont assez similaires à ceux de tout autre type d'infection pulmonaire et incluent la fièvre, la toux, une sensation d'essoufflement, des crachats ou, dans les cas graves, du sang, une sensation générale de faiblesse (**Starr, 2017**).

I.8.2.2.4. Candidose oculaire

La candidose oculaire affecte spécifiquement la cornée (kératite) ou, plus rarement, l'œil dans sa globalité (endophtalmie). Environ 1 % de patients souffrants de candidémie manifeste une atteinte oculaire. La candidose oculaire se caractérise par une triade de symptômes à savoir l'œil rouge, l'œil douloureux et la baisse de la vision. Les facteurs de risque d'infections oculaires comprennent l'utilisation excessive de corticostéroïdes et d'antibiotiques, le port de lentilles de contact, les interventions chirurgicales et les maladies associées à l'immunodéficience (**Motukupally et al., 2015**).

I.8.2.2.5. Candidose neuroméningée

Bien que rares dans le système nerveux central (SNC), les *Candida* peuvent infecter à la fois les méninges et le tissu cérébral parenchymateux. La candidose neuroméningée est une infection rare avec une mortalité de près de 40 % (**Henao et Vagner, 2011**). Elle survient chez environ 52 % de patients atteints d'une candidémie. Les symptômes incluent la fièvre, les maux de tête, la rigidité nucale, l'altération de l'état mental, la confusion et la désorientation (**Atsuko et al., 2016**).

I.8.2.2.6. Candidose ostéo-articulaire

La candidose ostéo-articulaire correspond à une arthrite ou une ostéomyélite. Ce sont des inflammations causées par l'ensemencement des articulations ou de l'os par voie hématogène. Elles surviennent chez 1 à 2 % de patients atteints de candidémie (**Kwang et al., 2020**). L'arthrite se localise chez l'adulte au niveau des disques intervertébraux et du genou. L'ostéomyélite quant à elle atteint la colonne vertébrale, le fémur, les côtes, le sternum et les articulations synoviales (**Kohli et Hadley, 2006**). Les symptômes de la candidose ostéo-articulaire sont une douleur locale, un érythème ou un œdème sur la zone atteinte (**Kwang et al., 2020**).

I.9. Traitement des candidoses

Le traitement des candidoses repose principalement sur l'utilisation de quatre (4) classes d'antifongiques à savoir les polyènes, une pyrimidine (5-Fluorocytosine), les dérivés azolés et les échinocandines (**Maubon et al., 2014**).

I.9.1. Polyènes

Les molécules de la famille des polyènes sont produites par des actinomycètes du genre *Streptomyces*. Ce sont des macrolides, c'est à dire des molécules organiques cycliques amphotères (**Chapman et al., 2011**). Ils ont pour cible principale l'ergostérol, le composant essentiel de la membrane plasmique de la levure (**Adamczyk, 2011**). Leur liaison à l'ergostérol crée des pores au niveau de la membrane fongique, augmentant ainsi sa perméabilité. Des composés essentiels à la vie de la levure (ions K⁺, etc.) diffusent ainsi hors du cytosol ce qui conduit à la mort du pathogène (**Adamczyk, 2011**).

I.9.2. Fluoropyrimidine

La 5-Fluorocytosine (5-FC) est l'unique représentant de cette classe d'antifongique. Dans la cellule fongique, elle est convertie par une cytosine désaminase en 5-fluorouracile (5-FU). Le 5-FU exerce son pouvoir fongistatique par deux voies. Il est converti en 5-fluorodéoxyuridine monophosphate ou en 5-fluorouridine triphosphate par des enzymes spécifiques. Le 5-fluorodéoxyuridine monophosphate inhibe la thymidylate synthétase, une enzyme nécessaire à la synthèse de l'ADN. Le 5-fluorouridine triphosphate quant à lui s'incorpore à la place de l'uridine dans l'ARNm ; ce qui inhibe la synthèse protéique (**Larsen, 2011**).

I.9.3. Azolés

Les azolés sont les antifongiques les plus utilisés dans le traitement des candidoses. On distingue deux sous-familles, les imidazolés (Kétoconazole, Miconazole, etc.) et les triazolés (Fluconazole, Itraconazole, etc.). Ces molécules ont une action fongistatique et leur cible principale est la voie de biosynthèse de l'ergostérol. En bloquant l'expression du gène *Erg11* qui code pour la 14 α -lanostérol déméthylase, l'enzyme responsable de la transformation du lanostérol en ergostérol, les azolés provoquent une accumulation de stérols méthylés toxiques et une altération de la membrane cellulaire du pathogène (**Paleiron et al., 2011**).

I.9.4. Echinocandines

Les échinocandines sont des lipopeptides semi-synthétiques. Seulement quelques molécules appartenant à cette classe d'antifongique sont disponibles sur le marché à savoir la Caspofungine, la Micafungine et l'Anidulafungine. Ils inhibent la β -(1,3)-D-

glucane synthétase, l'enzyme responsable de la synthèse du β -(1,3)-D-glucane, un polymère du glucose indispensable à la structure et à l'intégrité de la paroi fongique. Ceci entraîne une fragilisation de la paroi qui se traduit par une fuite de matériel intracellulaire, aboutissant ainsi à la mort de la cellule fongique. La bonne tolérance des échinocandines et leur spectre d'action les placent comme traitement de première ligne des candidoses systémiques (Pappas et al., 2009). Toutefois, la thérapie antifongique contre les infections à *Candida* reste confrontée à l'émergence de la résistance microbienne.

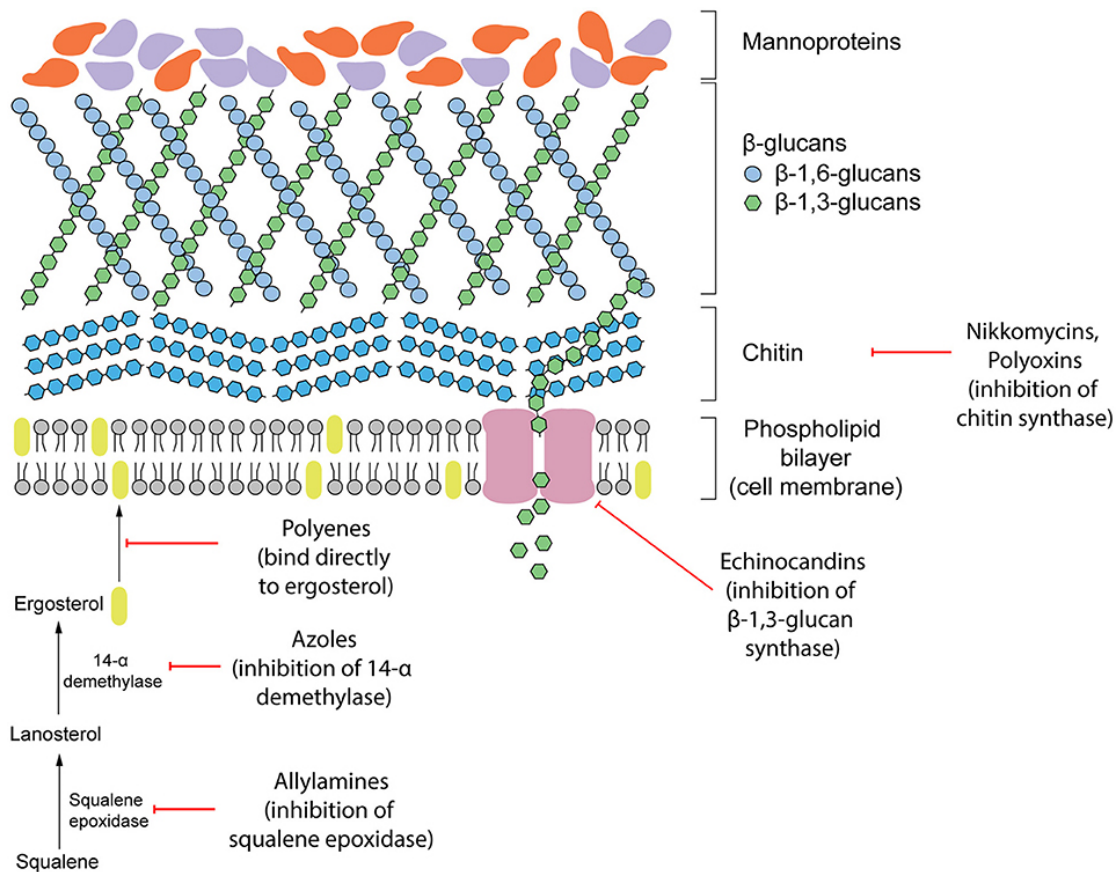


Figure 9 : Cibles cellulaires des antifongiques (Maubon et al., 2014).

I.10. Résistance aux antifongiques

La résistance des *Candida* aux antifongiques peut être intrinsèque, acquise ou liée à la formation des biofilms.

I.10.1. Résistance intrinsèque

La résistance intrinsèque est naturellement présente chez toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre. De façon innée, certaines espèces de *Candida* peuvent être résistantes à un ou à une famille d'antifongiques. Il s'agit en fait de germes

insensibles au mode d'action de l'antifongique. Au fil du temps, l'utilisation massive et répétée d'antifongiques a profondément modifié l'écologie fongique en exerçant une sélection de germes résistants (**Guinea, 2014**). En effet, autrefois peu représentées, les phénotypes de *Candida* naturellement résistants aux antifongiques sont de plus en plus incriminés dans des tableaux cliniques. C'est le cas de *C. lusitaniae* qui résiste aux antifongiques azolés, de *C. kruzei* qui résiste au Fluconazole ou encore de *C. guilliermondii* et *C. auris* qui résistent à l'Amphotéricine B. Il a été également démontré que près de 10 % d'espèces de *Candida* isolées en pathologie humaine présente une résistance à la 5-Fluorocytosine (**Guinea, 2014**). La résistance naturelle est stable et transmise à la descendance génétique (**CDC, 2020**).

I.10.2. Résistance acquise

L'usage inadéquat des antifongiques a conduit à l'émergence de phénotypes de *Candida* résistants à la thérapie conventionnelle (**CDC, 2020**). Nombreux antifongiques autrefois utilisés comme traitement de première ligne contre les infections à *Candida* ont perdu leur efficacité thérapeutique (**Guillot et Dannaoui, 2015**). L'acquisition de résistance peut provenir entre autres de la soustraction, modification ou surexpression de la cible de l'antifongique ou encore de l'efflux actif de l'antifongique (**Adamczyk, 2011**).

I.10.2.1. Soustraction de la cible et son remplacement

Ce mécanisme s'observe dans la résistance des *Candida* aux polyènes. En effet, les polyènes ont pour cible l'ergostérol, un constituant essentiel de la membrane plasmique du pathogène. La résistance se manifeste par la mutation d'un gène codant pour une enzyme particulière de la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Cette mutation génétique empêche la synthèse de l'ergostérol en faveur d'un autre produit de synthèse. Chez *C. albicans* par exemple, la résistance à l'Amphotéricine B se traduit par la mutation du gène Erg3 qui code pour la $\Delta 5,6$ desaturase. Ceci entraîne l'accumulation de 14-méthyl-fécostérol qui se substitue à l'ergostérol (**Zhang et al., 2010**).

I.10.2.2. Modification de la cible cellulaire

La modification de la cible cellulaire de l'antifongique conduit à la diminution de son affinité pour la cible. Ce mécanisme s'observe dans la résistance des *Candida* aux antifongiques azolés et se traduit par des mutations ponctuelles du gène Erg11 qui code

pour la 14 α -lanostérol déméthylase. Ceci a pour conséquence la substitution d'acides aminés dans la structure tridimensionnelle de l'enzyme entraînant ainsi la diminution de l'affinité de l'antifongique pour l'enzyme (**Zhang et al., 2010**). Ce mode de résistance est également observé pour les échinocandines qui ont pour cible principale la β -(1,3)-D-glucane synthétase. La résistance se traduit par la mutation ponctuelle des gènes Fks1 et Fks2 qui codent pour les sous-unités de l'enzyme (**Espinel-Ingroff, 2008**).

I.10.2.3. Surexpression de la cible cellulaire

La surexpression des gènes de la thymidylate synthase ou de la 14 α -lanostérol déméthylase par le pathogène aboutit respectivement à une résistance à la 5-FC ou aux azolés. En effet, dans la cellule fongique, le 5-FC est converti en 5-fluorodesoxyuridine monophosphate, un composé qui inhibe la thymidylate synthétase. La surexpression du gène de la thymidylate synthase inhibe ce mécanisme et permet la biosynthèse protéique et la multiplication du pathogène (**Adamczyk, 2011**). Les antifongiques ont quant à eux pour cible la 14 α -lanostérol déméthylase, l'enzyme responsable de la conversion du lanostérol en ergostérol. Le gène Erg11 qui code pour cette enzyme peut être surexprimé par le germe de telle sorte que l'antifongique ne soit plus capable d'inhiber la quantité d'enzyme présente (**Sanglard, 2002**).

I.10.2.4. Efflux actif de l'antifongique

Chez les levures, deux principales familles de transporteurs sont impliquées dans la résistance aux azolés, les transporteurs de type MF (Major Facilitator) et les transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette). Ces transporteurs exportent l'antifongique hors du cytoplasme (**Sanglard, 2002**). En situation normale, ils sont exprimés à un niveau de base dans la cellule fongique. Quand le pathogène est exposé à l'antifongique, la résistance résulte de la surexpression des gènes codant pour ces transporteurs et l'accumulation des pompes dans la membrane. De cette manière, les azolés ne sont jamais assez concentrés dans la cellule pour inhiber leur cible, le gène Erg11 (**Coste et al., 2009**).

I.10.3. Résistance liée aux biofilms

La résistance des *Candida* aux antifongiques (figure 10) est principalement associée à la formation de biofilms. Les microorganismes se développant au sein d'un biofilm peuvent devenir 10 à 1000 fois plus résistants que les germes planctoniques. Ceci

est dû aux conditions environnementales dans le biofilm (disponibilité en O₂, en nutriments, niveau de CO₂, pH) qui vont permettre une sélection de phénotypes microbiens les plus résistants. De plus, la matrice de polysaccharides des biofilms retarde ou empêche la pénétration de l'antifongique protégeant ainsi le pathogène à l'intérieur du biofilm. Les biofilms favorisent également l'échappement du pathogène aux systèmes de défense de l'hôte (**Beoletto et al., 2016**). Cette résistance résulte entre autres de l'expression de gènes de résistance en particulier ceux codant pour les pompes à efflux (**Lebeaux et Ghigo, 2012**). La capacité des *Candida* à former des biofilms est associée à une mortalité très élevée chez les patients atteints de candidémie (**Beoletto et al., 2016**). Face à la montée de la résistance microbienne aux antifongiques d'autres approches thérapeutiques sont de plus en plus explorées.

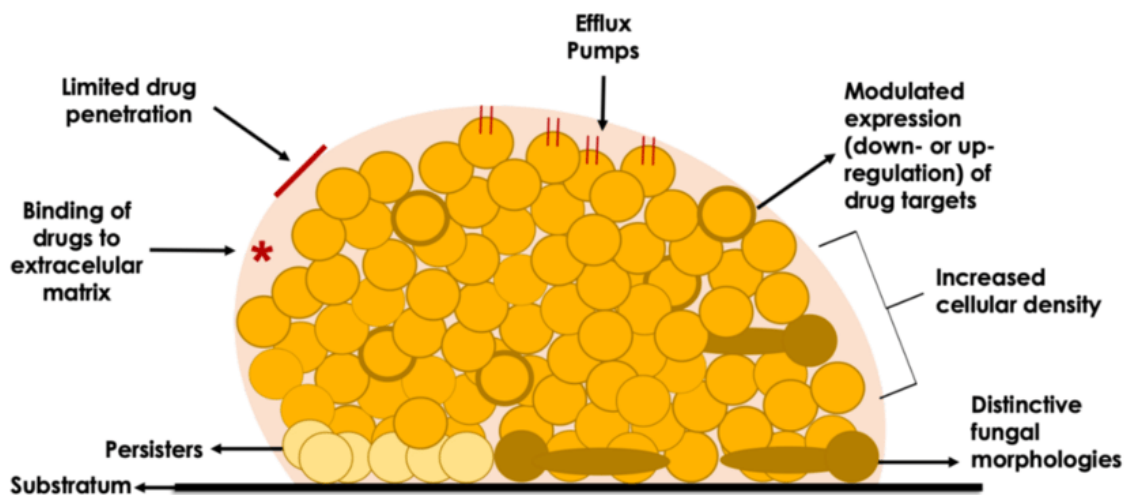


Figure 10 : Biofilms et résistance antifongique (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

I.11. Autres approches thérapeutiques contre les candidoses

Outre les antifongiques synthétiques, d'autres approches thérapeutiques telles que l'immunothérapie et la phytothérapie peuvent être utilisées pour venir à bout de l'infection ou renforcer l'effet thérapeutique des antifongiques.

I.11.1. Immunothérapie anti-candidose

Les progrès récents dans la compréhension des interactions entre les pathogènes fongiques et leur hôte ont conduit à l'exploration de nouvelles stratégies thérapeutiques (**Armstrong et al., 2017**). L'immunothérapie est aujourd'hui reconnue comme une alternative à la chimiothérapie conventionnelle et repose sur l'utilisation du système

immunitaire pour combattre l'infection (**Brown, 2011**). Lors de la thérapie antifongique, la stimulation des défenses immunitaires est très souvent recommandée chez des patients ayant un système immunitaire affaibli. Des recherches sont de plus en plus menées dans ce sens afin de trouver de nouvelles substances immunogènes pouvant renforcer les fonctions immunitaires de l'hôte lors des thérapies anti-infectieuses. En pratique, l'immunothérapie inclue entre autres l'administration de cytokines, cellules immunitaires, anticorps ou de composés immunogènes au patient (**Wilfried et al., 2020**).

I.11.1.1. Thérapie par cytokines

Plusieurs cytokines ont été développées à des fins thérapeutiques contre les candidoses. C'est le cas de la rIFN- γ 1b (forme recombinée de l'IFN- γ) qui a été approuvée par la FDA dans la prophylaxie contre les candidoses invasives (**FDA, 2000**). La rIFN- γ 1b stimule en effet les macrophages qui agissent en coopération avec l'antifongique pour éradiquer plus rapidement l'agent infectieux. Les formes recombinées de G-CSF et GM-CSF ont été également approuvées par la FDA pour leur utilisation clinique. Des études ont montré que l'association de G-CSF ou de GM-CSF aux antifongiques tels que le Fluconazole s'avère plus efficace que l'antifongique utilisé seul et accélère la guérison du patient (**Kumaresan et al., 2018**).

I.11.1.2. Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire antifongique consiste à transfuser les cellules immunitaires à un receveur dans le but de restaurer ou de renforcer ses défenses immunitaires. Ces cellules peuvent être des lymphocytes T, des cellules dendritiques, des granulocytes ou des cellules tueuses naturelles (**Borghi et al., 2014**). La thérapie adoptive utilisant les lymphocytes T CD4+ spécifiques aux levures *Candida* a montré une efficacité dans des études cliniques chez l'Homme (**Deo et Gottlieb, 2015**). Il a également été démontré que les cellules dendritiques pourraient être amorcées *ex vivo* avec des antigènes puis perfusés chez des patients atteints de septicémie à *Candida* (**Shi-Min, 2016**). La transfusion de granulocytes tels que les neutrophiles peut également améliorer l'état des patients atteints de candidose invasive (**Price et al., 2015**). De même, le modèle animal a démontré que la transfusion de cellules NK protège l'animal de la candidémie (**Schmidt et al., 2017**).

I.11.1.3. Thérapie par anticorps

L'intérêt des anticorps dans la thérapie contre les maladies infectieuses s'est accru ces dernières années. Plusieurs études ont démontré que la thérapie par anticorps aurait un effet bénéfique dans la lutte contre les candidoses. C'est le cas de **Matthews et al. (2005)** qui ont démontré qu'un anticorps recombiné et dirigé contre l'épitope hsp90 de *C. albicans* pouvait empêcher le développement de la candidose chez le rat. De même, **Veerdonk et al. (2010)** ont démontré l'effet protecteur des anticorps dirigés contre les polysaccharides de *C. albicans* dans des modèles murins de candidoses invasives. Les anticorps anti-*Candida* produits artificiellement et administrés aux patients constitueraient un moyen efficace de lutte contre les candidoses (**Shi-Min, 2016**).

I.11.1.4. Composés immunogènes

Les composés immunogènes peuvent être d'origine naturelle ou synthétique (**Veerdonk et al., 2010**). De nos jours, des recherches sont menées afin de mettre sur pied des vaccins efficaces contre les candidoses à partir de composés immunogènes. Il a par exemple été démontré que les glycopeptidolipides polaires extraits de la paroi cellulaire de *Mycobacterium chelonae* pourraient être utilisés dans la conception d'un vaccin contre les candidémies (**Spellberg et al., 2006**). De même, le rôle bénéfique des dérivés actifs du 2-désoxy-D-glucose et des adhésines synthétiques tels que Als1p a été démontré dans la thérapie contre les candidoses invasives (**Bozza et al., 2009**). De par leur composition chimique, les extraits de plantes médicinales peuvent également stimuler la réponse immunitaire anti-*Candida* et la phytothérapie a jadis occupé une place de choix dans la lutte contre les candidoses.

I.11.2. Phytothérapie anti-candidose

Les plantes médicinales ont jadis été utilisées dans la prévention et le traitement des infections fongiques. Plusieurs espèces végétales sont aujourd'hui connues pour leur vertu anti-candidose. C'est le cas de *Basilicum ocimum* dont l'extrait aqueux de feuilles est consommé contre la candidémie ou encore de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* qui est utilisée dans le traitement des candidoses digestives. Les plantes médicinales sont en effet de matrices biologiques pourvues de métabolites secondaires à l'origine de leur activité biologique. *In vivo*, ces métabolites peuvent inhiber l'agent pathogène et/ou intensifier la défense immunitaire de l'hôte (**Vikrant et al., 2015**). On

distingue entre autres les composés phénoliques, terpénoïdes, alcaloïdes et hétérosides (Li et al., 2007).

I.11.2.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des molécules constituées d'au moins un noyau benzénique auquel est lié un ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés dans une fonction hétéroside, éther, ester, etc. Ils s'étendent des molécules simples telles que les phénols, acides phénols, coumarines, quinones et flavonoïdes, aux molécules fortement polymérisées telles que les tanins et les lignines (Harborne et Williams, 2000). Leurs propriétés antifongiques et immunostimulatrices ont été démontrées par plusieurs auteurs. La kaempferole par exemple est un flavonoïde qui inhibe la croissance des levures du genre *Candida* (Herrera et al., 2010). La cleistanthine stimule l'activité phagocytaire des macrophages (Aichour, 2017).

I.11.2.2. Terpénoïdes

Les terpénoïdes sont élaborés à partir du mévalonate comme précurseur. L'activité antifongique des terpénoïdes serait due à leur capacité à se complexer aux lipides de la membrane microbienne. Plusieurs terpénoïdes isolées des plantes médicinales ont démontré une activité contre les espèces de *Candida*. Le γ -terpinène par exemple a été active *in vivo* contre la candidémie induite chez le rat. Les terpénoïdes peuvent en outre amplifier la réponse antifongique en stimulant les défenses immunitaires de l'hôte. C'est le cas de l'acide ursolique qui active la synthèse d'IFN- γ et de TNF- α par les macrophages et les cellules NK. L'aucubigénine stimule la prolifération des lymphocytes (Bachelet, 2013).

I.11.2.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés hétérocycliques azotés doués de propriétés médicamenteuses diverses. Ils peuvent être antimicrobiens, immunostimulants, anti-tumoraux, analgésiques, etc. Ils font partie intégrante de la majorité de nos médicaments (Tsuzuki et al., 2007). La quinine et la berbérine par exemple sont aujourd'hui utilisées comme antibiotiques contre des infections microbiennes. La propriété antimicrobienne des alcaloïdes serait due à leur aptitude à s'insérer entre les molécules d'ADN. D'autres molécules telles que l'isopteropodine et l'isorhynchophilline sont utilisées pour

stimuler le système immunitaire lors de la thérapie antimicrobienne chez les immunodéprimés (Aichour, 2017).

I.11.2.4. Hétérosides

Les hétérosides ou glycosides sont des molécules qui proviennent de la condensation d'un sucre et d'une substance non glucidique telle qu'un alcool, phénol, stéroïde, etc. On peut les regrouper en plusieurs classes parmi lesquelles les hétérosides cardiotoniques, cyanogénétiques, anthracéniques, etc. Ils sont doués de propriétés pharmacologiques diverses. Il a par exemple été démontré que les hétérosides anthraquinoniques pouvaient inhiber la croissance de plusieurs espèces fongiques parmi lesquelles les *Candida*. De même, les saponines ont la propriété de se complexer à l'ergostérol de la membrane plasmique des *Candida* entraînant sa rupture. Les ginsénosides stimulent la prolifération des lymphocytes et la production des IL-4, IL-10, IL-12 et IFN- γ (Faivre, 2010).

I.12. Revue sur les plantes médicinales testées dans ce travail

Dans cette étude, un criblage préliminaire de l'activité anti-*Candida* a été réalisé sur treize (13) plantes médicinales de la pharmacopée camerounaise utilisées dans le traitement de diverses affections microbiennes parmi lesquelles les mycoses. Le tableau II ci-après ressort les noms scientifiques des plantes et leur famille, les affections traitées en milieu traditionnel, les parties de la plante utilisées ainsi que les études antérieures déjà réalisées sur ces plantes médicinales.

Tableau II : Utilisations traditionnelles et travaux antérieures sur les plantes étudiées

No	Plantes (familles)	Affections traitées en milieu traditionnel	Parties utilisées	Activités biologiques scientifiquement démontrées
1	<i>Aspilia africana</i> (Pers.) C.D. Adams Subsp. <i>Africana</i> (Asteraceae)	Hémorroïdes, paludisme, toux, anémie, troubles de l'estomac, plaies, infections oculaires, candidoses, cutanées et digestives (Osunwoke et al., 2014). Gonorrhée, maux de tête et fièvre (Yapi et al., 2015).	Feuilles, fleurs, tiges	Antiulcéreuse (Ubaka et al., 2010) ; Tératogénique et anti-inflammatoire (Etim et Oguike, 2011) ; Antiplasmodiale (Akuodor et al., 2012) ; Gastroprotectrice (Ajeigbe et al., 2014).
2	<i>Baillonella toxisperma</i> Pierre (Sapotaceae)	Teignes, démangeaisons, fièvre typhoïde, paludisme, gale, leucorrhées, hémorroïdes, affections broncho-pulmonaires et gastrointestinales, candidoses, rhumatisme, blessures et mal de dent (Ngueguim et al., 2009).	Ecorces, latex, feuilles	Antifongique (Riwom et al., 2015a) ; Antibactérienne (Riwom et al., 2015b).
3	<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn. (Malvaceae)	Arthrite, diarrhée, dysenterie, diabète, arthrite, dermatoses, bronchite, maladies oculaires, candidoses, piqûres d'insectes (Adebayo et al., 2010). Fièvre chronique, abcès, maladie mentale, conjonctivite, vertiges, mal de tête, plaies et ulcères (Elumalai et al., 2012).	Ecorces, épines, feuilles, graines, racines	Anti-diabétique (Dzeufiet et al., 2007) ; Anti-inflammatoire (Bairwa et al., 2010) ; Hypolipidémique (Aloke et al., 2010) ; Hépatoprotectrice (Alagawadi et Shah, 2011).
4	<i>Chenopodium Ambrosioides</i> L. (Chenopodiaceae)	Blessure, constipation, vers intestinaux, douleur, fièvre, antioxydant, infections gastro-intestinales, typhoïde, dysenterie et problèmes respiratoires (Malika et al., 2015). Inflammation, mycoses, tuberculose et rhumatisme (Ali et al., 2016).	Feuilles, tiges, racines, plante entière	Anti-leishmaniose (Monzote et al., 2009) ; Insecticide (Chu et al., 2011) ; Antinoceptive et anti-inflammatoire (Trivellato et al., 2013) ; Hypotensive (Assaidi et al., 2014) ; Antituberculose et antifongique (Ali et al., 2016).
5	<i>Cola nitida</i> (Vent.) Schott & Endl. (Malvaceae)	Coqueluche, asthme, teigne, toux, gale, gonorrhée, dysenterie, ophtalmie, rhume, candidoses, dermatoses, maux de tête, mycoses et diabète (Jayeola, 2001).	Ecorces, noix, feuilles	Antituberculose (Adeniyi et al., 2004) ; Antibactérienne (Ngoupayo et al., 2016).
6	<i>Costus afer</i> Ker-Gawl. (Costaceae)	Varicelle, candidoses, rougeole, toux, mal de gorge, œdèmes, fièvre, grippe, herpès, paludisme et maladies vénériennes (Anaga et al., 2004). Jaunisse, dermatoses, plaies, arthrite rhumatoïde, hypertension, hémorroïdes, abcès, ulcères, odontalgies, diarrhée, dysenterie amibienne, lèpre et colique (Ngono et al., 2011).	Feuilles, tiges, rhizome, fleurs	Anesthésique et hypoglycémiant (Anaga et al., 2004).
7	<i>Ficus glumosa</i> Delile (Moraceae)	Stérilité, œdèmes, hypertension, diabète, hémorroïdes, rhumatismes, dermatoses, diabète, conjonctivite, diarrhée, maux de dents et de tête (Madubunyi et al., 2012).	Ecorces, latex, feuilles, racines	Antioxydante et antidiabétique (Madubunyi et al., 2012).

Tableau II (Suite et fin)

No	Plantes (familles)	Affections traitées en milieu traditionnel	Parties utilisées	Activités biologiques scientifiquement démontrées
8	<i>Gouania Longipetala</i> (Hemsl.) (Rhamnaceae)	Paludisme, analgésique, goutte, candidoses, hydropisie, œdèmes, infertilité, MST, dermatoses, mal des yeux et du cœur, troubles de l'estomac, antidote contre les piqûres venimeuses et les morsures (Dzeufiet et al., 2015).	Feuilles, tiges, sève, racines	Antibactérienne, antioxydante et anti-inflammatoire (Ekuadzi et al., 2012) ; Antidiabétique (Dzeufiet et al., 2015).
9	<i>Musanga cecropioides</i> R.Br. ex Tedlie (Cecropiaceae)	Diabète, diarrhée, hypertension, plaies, toux, constipation, épilepsie, œdème, schizophrénie, tuberculose, rhumatisme, otite, infections cutanées, mycoses, trypanosomose, gonorrhée, maux de dents, anthelminthique, douleurs d'estomac et gonorrhée (Feuya et al., 2015).	Feuilles, sève, écorces, racines	Hépatoprotectrice (Adejuwon, 2009) ; Antioxydante (Feuya et al., 2015) ; Anti-inflammatoire (Abimbola et al., 2015).
10	<i>Scorodophleous zenkeri</i> Harms (Caesalpinioideae)	Rhumatisme, toux, maux de tête, bronchite, rougeole, infections génito-urinaires, candidoses, constipation, blessures et hernie (Kuede et al., 2011).	Feuilles, tiges, écorces, graines	Antibactérienne, antiradicalaire, larvicide (Kuede et al., 2011).
11	<i>Spathodea campanulata</i> P. Beauv. (Bignoniaceae)	Varicelle, herpès, ulcères, filaires, gonorrhée, mycoses, diarrhée, fièvre, épilepsie et constipation (Makinde et al., 2000). Dysenterie, malaria, diabète sucré, maladies de la peau, blessures, œdèmes, inflammations urétrales et maux de foie (Niyonzima et al., 2018).	Ecorces, fleurs, feuilles, racines	Hypoglycémiant, anticomplément et anti-HIV (Niyonzima et al., 1999) ; Antiplasmodiale et anticonvulsante (Ilodigwe et Akah, 2009) ; Antibactérienne et antioxydante (Peter et al., 2016).
12	<i>Spermacoce Princea</i> (K. Schum) Verdc. (Rubiaceae)	Asthme chronique, cancer, plaies, problèmes oculaires, maladies vénériennes, dermatoses, candidoses, pneumonie, typhoïde, diarrhée et paludisme (Jeruto et al., 2008).	Feuilles, tiges, racines, plante entière	Antibactérienne (Ntemafack et al., 2005).
13	<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume (Ulmaceae)	Diarrhée, asthme, infections urinaires, candidoses, fièvre jaune, épilepsie, dysenterie, toux, gonorrhée, maux de gorge, hypertension, paludisme, maux de dents et vers intestinaux (Uddin et al., 2008). Diabète et maladies respiratoires (Buenor et al., 2013).	Ecorces, tiges, feuilles, graines, racines	Antioxydante et antibactérienne (Sarder et Uddin, 2008).

I.13. Revue sur les méthodes de criblage des substances antifongiques

Les méthodes utilisées dans le criblage des substances antifongiques peuvent être regroupées en deux grandes catégories à savoir les méthodes de diffusion et les méthodes de dilution (CLSI, 2020).

I.13.1. Les méthodes de diffusion

Les méthodes de diffusion s'opèrent sur milieu gélosé et sont utilisées pour évaluer la sensibilité des souches microbiennes aux antifongiques. La souche microbienne est au préalable inoculée à la surface de la gélose puis, la substance à tester est introduite dans des puits creusés dans la gélose, ou encore est imbibée sur des disques de papier filtre ou sur des bandelettes qui sont par la suite déposés sur la géloseensemencée. La substance diffuse de manière uniforme dans la gélose et sa concentration dévient inversement proportionnelle à la distance du disque, de la bandelette ou du puits d'inoculation. Après incubation dans les conditions adéquates de croissance du germe, une zone d'inhibition se forme autour du disque, de la bandelette ou du puits et son diamètre est proportionnel à la sensibilité du germe pour la substance testée (CLSI, 2020). Les méthodes de diffusion sont simples, rapides, reproductibles, peu coûteuses, avec des résultats faciles à interpréter. Leur limite principale est qu'elles ne sont pas appropriées pour tester pour les échantillons nonpolaires, qui ne diffusent pas facilement dans le gel d'agar et pour des échantillons volatiles (Matuschek et al., 2018).

I.13.2. Les méthodes de dilution

Les méthodes de dilution permettent de déterminer entre autres, la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale fongicide (CMF) d'une substance potentiellement antimicrobienne vis-à-vis d'une souche microbienne donnée (CLSI, 2008). Elles s'opèrent aussi bien en milieu liquide qu'en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum fongique standardisé au contact de concentrations croissantes d'extrait à tester selon une progression géométrique de raison 2. En milieu liquide, le test se réalise dans une série de tubes (méthode de macrodilution) ou dans une microplaque (méthode de microdilution). En milieu solide par contre, la substance à tester est incorporée dans un milieu gélosé et coulé dans une boîte de Pétri ; la surface de la gélose est par la suiteensemencée avec la souche microbienne. Après incubation dans les conditions adéquates, la CMI est déterminée comme étant la plus petite concentration de

la substance qui inhibe la croissance d'un microorganisme et la CMF est quant à elle déterminée par subculture (CLSI, 2020). Les méthodes de dilution sont les plus utilisées dans le criblage de substances antifongiques. Elles sont assez rapides, faciles à réaliser et automatisables (Matuschek et al., 2018).

I.14. Revue sur les méthodes de criblage des substances immunostimulatrices

Plusieurs méthodes de criblage de substances pharmacologiques douées d'activité immunostimulatrice sont décrites dans la littérature. Elles sont réalisées *in vitro* ou *in vivo*. Les méthodes *in vitro* consistent entre autres à évaluer l'effet de la substance à tester sur l'inhibition de la libération d'histamine par les mastocytes, l'activation de la prolifération des cellules T, l'activation de la dihydro-orotate déshydrogénase (enzyme impliquée dans la synthèse des nucléosides pyrimidiques), la stimulation de l'activité phagocytaire des polymorphonucléaires, etc. Généralement réalisées sur des animaux de laboratoire, les méthodes *in vivo* consistent à évaluer entre autres l'effet de la substance sur la production d'anticorps, la stimulation de la prolifération des cellules immunitaires sanguines, la production des cytokines, la stimulation de l'activité des macrophages, la stimulation de l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial, etc (Ganeshpurkar et Saluja, 2017).

Chapitre II

MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

La plante étudiée dans ce travail a été sélectionnée suite à un criblage antifongique préliminaire réalisé sur les extraits de treize (13) plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle contre les infections fongiques. Ces plantes ont été respectivement récoltées à Bandjoun (Ouest-Cameroun), Dimako (Est-Cameroun), Nkolfoulou et Soa (Centre-Cameroun) ; entre le 29 Décembre 2015 et le 24 Mars 2016. Les différentes parties de plantes récoltées ont été choisies en fonction de leur utilisation en milieu traditionnel. Après récolte, le matériel végétal a été identifié à l'Herbier National du Cameroun (HNC, Yaoundé). Le tableau III ci-dessous présente les noms scientifiques des plantes étudiées, les parties récoltées, la date de récolte et le code d'identification.

Tableau III : Informations sur les plantes étudiées

No	Nom de la plante	Parties récoltées	Lieu de récolte	Noms vernaculaires	Code d'identification
1	<i>Aspilia africana</i> (Pers.) C.D. Adams Subsp. <i>Africana</i>	Feuilles	Bandjoun	Sia msou (Bandjoun), Nanake (Hausa)	16935/SRF Cam
2	<i>Baillonella toxisperma</i> Pierre	Ecorces, feuilles	Dimako	Adjap, Ayap, Nkoumma djap, Odjo'o, Edjoh	54060/HNC
3	<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn.	Ecorces, épines, feuilles	Soa	Doum (Ewondo), Djôm (Bassa), Bouma (Douala)	43623/HNC
4	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Feuilles	Bandjoun	Elo'o nson (Bulu)	85040/HNC
5	<i>Cola nitida</i> (Vent.) Schott & Endl	Ecorces, feuilles	Bandjoun	Tse-tsre (Bandjoun)	14590/SRF Cam
6	<i>Costus afer</i> Ker-Gawl.	Feuilles, tiges	Soa	Nmian (Bulu, Ewondo)	49537/HNC
7	<i>Ficus glumosa</i> Delile	Ecorces, feuilles	Nkolfoulou	Gah (Bandjoun)	46260/HNC
8	<i>Gouania longipetala</i> (Hemsl.)	Feuilles, tiges	Bandjoun	Sobomissile (Bandjoun), Konteh (Lamso)	60787/HNC
9	<i>Musanga cecropioides</i> R.Br. & Tedlie	Ecorces, feuilles	Soa	Asseng (Beti)	44063/HNC
10	<i>Scorodophloeus zenkeri</i> Harms	Feuilles	Soa	Olom (Ewondo), Olan (Bulu), Lem (Bandjoun)	44803/SRF Cam
11	<i>Spathodea campanulata</i> P. Beauv.	Ecorces	Nkolfoulou	Evouvou (Bulu), Evovon (Ewondo, Nanga)	50085/HNC
12	<i>Spermacoce princea</i> (K. Schum) Verdc.	Plante entière	Soa	Kom teu (Bandjoun)	60795/HNC
13	<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	Feuilles, tiges	Bandjoun	Tafang, aveeg (Ewondo), leveeg (Eton)	3116/HNC

HNC : Herbier National du Cameroun ; SRF Cam : Société des Réserves Forestières du Cameroun



Aspilia africana (Pers.) C.D.
Adams Subsp. *Africana*
(Lavierebelle, 2021)



Baillonella toxisperma
Pierre (Alchetron, 2018)



Ceiba pentandra (L.) Gaertn.
(Atamari, 2007)



Chenopodium ambrosioides L.
(Dupont, 2007)



Cola nitida (Vent.) Schott &
Endl (Guido, 2021)



Costus afer Ker-Gawl.
(Hummert, 2008)



Ficus glumosa Delile
(Festus, 2016)



Gouania longipetala (Hemsl.)
(Harris, 2006)



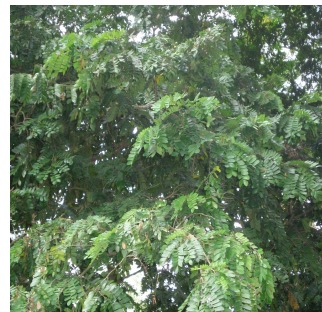
Musanga cecropioides R.Br. &
Tedlie (Chassot, 2017)



Spathodea campanulata P.
Beauv. (Dobignard, 2007)



Spermacoce princea (K. Schum
(Schellenberger, 2011)



Scorodophloeus zenkeri
Harms (Konda, 2011)



Trema orientalis (L.) Blume
(Vengolis, 2018)

Figure 11 : Photographies des plantes étudiées.

II.1.2. Microorganismes utilisés

Le matériel microbien utilisé dans ce travail était constitué de sept (7) souches de *Candida* à savoir, *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida guilliermondii* ATCC 6260 et *Candida dubliniensis* ATCC 7289. Ces souches provenaient respectivement du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I et du Centre Pasteur du Cameroun (CPC, Yaoundé). Elles ont été conservées sur gélose SDA à + 4°C.

II.1.3. Milieux de cultures

Deux milieux de culture ont été utilisés, le milieu Sabouraud Dextrose Agar (SDA) et le milieu Sabouraud Dextrose Broth (SDB). Le milieu SDA a été utilisé pour la conservation et la réactivation des souches microbiennes ainsi que pour l'évaluation de la charge fongique dans le sang et les reins des animaux. Le milieu SDB a quant à lui été utilisé pour l'évaluation des paramètres d'inhibition des extraits végétaux et la détermination de l'effet de l'extrait le plus actif sur la cellule fongique, les biofilms de *Candida* et l'activité des antifongiques.

II.1.4. Animaux d'expérience

Pour la réalisation des tests *in vivo*, les rats femelles de souches Wistar ont été utilisés. Ces animaux provenaient de l'animalerie du Département de Biologie Animale de l'Université de Yaoundé I où ils ont été élevés dans des conditions définies (cycles lumière/obscurité de 12 h, température ambiante de $22 \pm 3^\circ\text{C}$).

II.1.5. Cellules érythrocytaires utilisées

Les érythrocytes provenant du sang de mouton ont été utilisés pour évaluer la toxicité de l'extrait le plus actif sur les souches de *Candida*. Après sacrifice de l'animal, le sang a immédiatement été collecté dans les tubes EDTA et conservé à + 4°C jusqu'à son utilisation.

II.1.5. Réactifs et antifongiques utilisés

Triphényl-2,3,5-tétrazolium chlorure (TTC, Sigma-Aldrich, France), ergostérol (Sigma, Steinheim, Allemagne), cristal violet, cyclophosphamide (Sigma-Aldrich, France), liquide de Marcano (RAL Diagnostics), liquide de Lazarus (RAL Diagnostics),

May-Grünwald (RAL Diagnostics), Giemsa (Sigma-Aldrich, France), kits Span Diagnostics Ltd. (Surat, India), encre de carbone (Sigma-Aldrich, Singapour), triton-X100 (Sigma-Aldrich, France), ferricyanure de potassium (Sigma-Aldrich, France), soude, chlorure ferrique, anhydride acétique (Sigma-Aldrich), acide sulfurique, acide gallique, réactif de Meyer, liqueur de Fehling, Fluconazole (DENK PHARMA), Nystatine (Stada Medicine AG), Posaconazole (Merck, Canada), Kétoconazole (Novagenerics, Algerie) et Itraconazole.

II.2. METHODES

II.2.1. Schéma de travail

La figure 12 ci-dessous présente de manière globale les différentes étapes suivies dans la réalisation de ce travail.

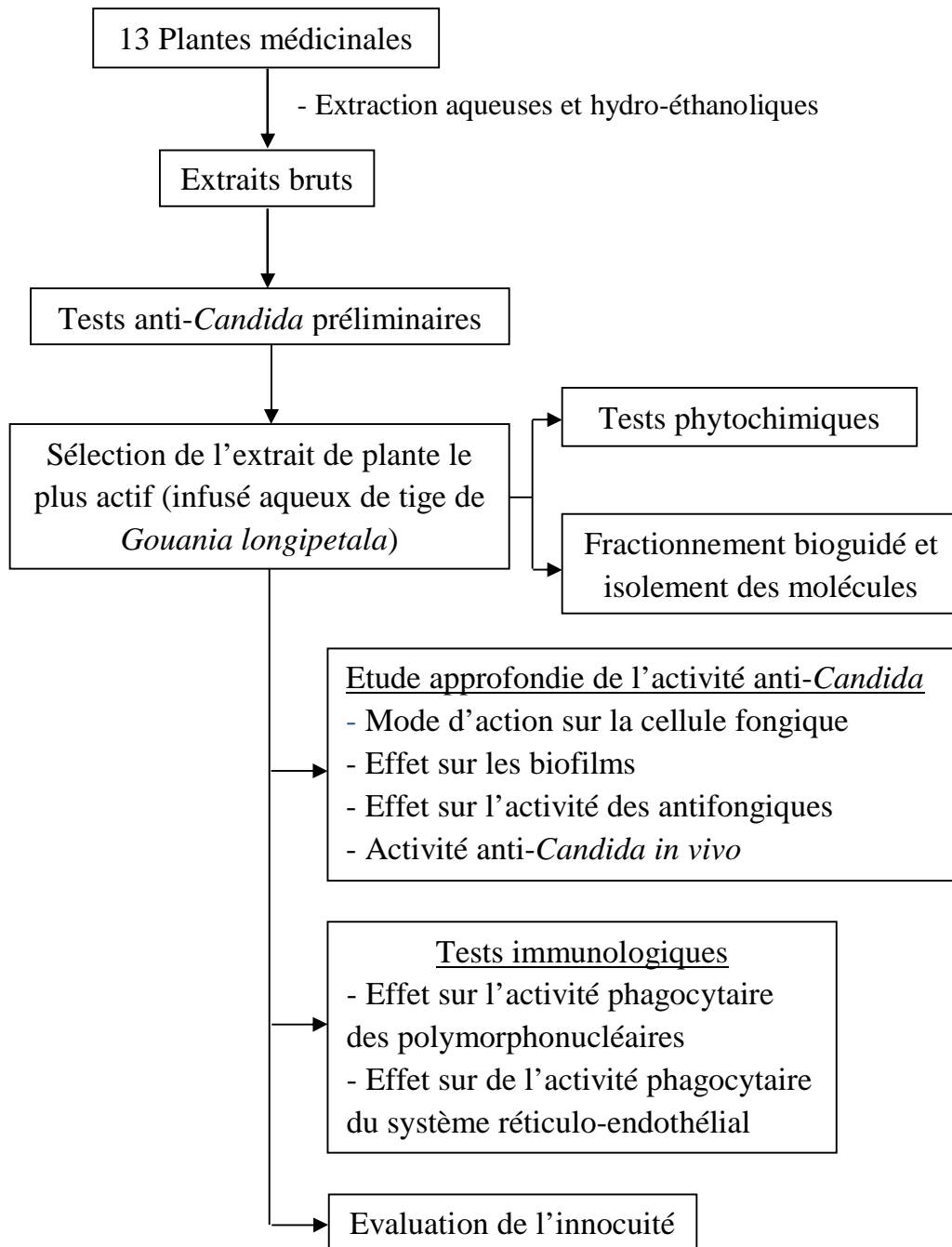


Figure 12 : Schéma général du travail.

II.2.2. Préparation des extraits végétaux

II.2.2.1. Extraction à froid dans l'eau distillée

Après récolte, une masse de 500 g de matériel végétal frais a été découpé et broyé dans un mortier. Le broyat obtenu a été lavé dans 1,5 L d'eau distillée et la solution résultante a été filtrée à l'aide du papier Watman No 1 puis, lyophilisée.

II.2.2.2. Extraction par infusion dans l'eau distillée

Le matériel végétal récolté a été découpé et séché à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 8 à 17 jours. Il a ensuite été broyé à l'aide d'un broyeur électrique et 100 g de poudre obtenue ont été prélevés et homogénéisés dans 500 mL d'eau distillée bouillante (100°C). La solution résultante a été laissée au repos à température ambiante pendant 20 min puis, filtrée sur papier Watman No 1 et lyophilisée.

II.2.2.3. Extraction par macération hydro-éthanolique (3:7)

Une masse de 100 g de poudre végétale a été macérée sous agitation fréquente dans 500 mL du mélange eau-éthanol (3:7) pendant 48 h. La solution résultante a été filtrée et concentrée dans un évaporateur rotatif sous pression réduite. Le concentrât obtenu a été séché à l'étuve à 40°C jusqu'à évaporation totale du solvant. Les rendements (%) d'extraction ont été calculés par la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = (\text{Masse d'extrait obtenu} / \text{Masse végétale extraite}) \times 100$$

II.2.3. Evaluation de l'activité antifongique des extraits végétaux

II.2.3.1. Préparation des milieux de culture

Les milieux de cultures utilisés dans ce travail ont été préparés suivant les directives du fabricant (Fortress diagnostics). Ceci consistait à dissoudre à chaud une masse de 65 g de SDA ou de 30 g de SDB dans 1 L d'eau distillée. Les milieux de culture ainsi préparés ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. Ils ont ensuite été supplémentés de chloramphénicol à 0,05 % afin d'inhiber toute croissance bactérienne éventuelle.

II.2.3.2. Préparation de l'inoculum fongique

Pour chaque souche de *Candida*, de colonies issues d'une culture de 24 h sur gélose SDA ont été prélevées et homogénéisées dans 10 mL d'eau physiologique. La solution obtenue a été ensuite calibrée à une charge fongique de 10^6 UFC/mL par comptage au microscope sur cellule de malassez.

II.2.3.3. Détermination des CMI et CMF

Les CMI et CMF des extraits végétaux ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu liquide suivant les recommandations de la **CLSI (2008)**, avec quelques modifications. Pour cela, une solution mère d'extrait végétal a été préparée dans du SDB à une concentration de 16384 $\mu\text{g/mL}$. Dans une microplaque de 96 puits, un volume de 100 μL de cette solution mère a été ensuite dilué en série dans du SDB suivant une progression géométrique de raison 2. Cette dilution a permis d'établir des concentrations finales d'extrait comprises entre 8 et 4096 $\mu\text{g/mL}$. Chaque puits de la microplaque a ensuite été supplémenté de 100 μL d'inoculum fongique (10^6 UFC/mL) et la préparation a été incubée à 37°C pendant 48 h. Après incubation, la CMI a été déterminée comme étant la plus petite concentration d'extrait ne laissant apparaître aucune croissance microbienne visible à l'œil nu. Un volume de 100 μL du contenu des puits de concentrations supérieures ou égales à la CMI a été prélevé et ensemencé sur gélose SDA contenue dans une boîte de Pétri. La CMF a été déterminée comme la plus petite concentration d'extrait pour laquelle aucune reprise de croissance n'a été observée après une incubation de 48 h à 37°C. La Nystatine et le Fluconazole ont été utilisés comme références.

II.2.3.4. Sélection de l'extrait le plus actif

L'extrait le plus actif a été sélectionné sur la base de son spectre d'action. Tout d'abord, l'activité des extraits végétaux sur les souches de *Candida* testées a été classifiée suivant l'échelle de **Holetz et al. (2002)** qui suggère que pour :

- $\text{CMI} \leq 100 \mu\text{g/mL}$, l'activité de l'extrait est élevée ;
- $100 < \text{CMI} \leq 500 \mu\text{g/mL}$, elle est modérée ;
- $\text{CMI} > 500 \mu\text{g/mL}$, elle est faible.

Le mode d'action de l'extrait sur les souches de *Candida* a ensuite été déterminé en évaluant le rapport CMF/CMI. Selon l'échelle de **Fauchère et Avril (2002)** adoptée aux champignons par **Nyegue (2006)**, lorsque :

- $CMF/CMI = 1$ ou 2 , l'extrait est fongicide ;
- $4 \leq CMF/CMI \leq 16$, l'extrait est fongistatique ;
- $CMF/CMI > 16$, l'extrait est tolérant.

Le pourcentage de levures sensibles, le nombre d'activités élevées, modérées, faibles, fongicides et fongistatiques ont enfin été déterminés pour chaque extrait (annexe 2). L'extrait présentant le plus grand nombre d'activité élevée ou modérée, et ayant été fongicide sur la majorité des souches testées a été sélectionné comme extrait le plus actif. Cet extrait correspondait à l'infusé aqueux de tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.). Il a été codifié « Extrait GLE ».

II.2.4. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique a été réalisé sur l'extrait GLE suivant les protocoles standards décrits dans la littérature, avec quelques modifications.

II.2.4.1. Mise en évidence des phénols

Cinq cent milligrammes (500 mg) d'extrait ont été dissouts dans 2 mL d'eau distillée. Un volume de 3 mL de chlorure ferrique 5 % a été ajouté au mélange. Après homogénéisation, la solution a été supplémentée de quelques gouttes de ferricyanure de potassium. L'observation d'un précipité vert indiquait la présence de phénols (**Harbone, 1998**).

II.2.4.2. Mise en évidence des flavonoïdes

Cinq cent milligrammes (500 mg) d'extrait ont été dissouts dans 5 mL d'eau distillée. Un volume de 2,5 mL de méthanol a été ajouté à la solution obtenue et cette dernière a été filtrée. Un millilitre (1 mL) de NaOH 10 % a ensuite été ajouté à 1 mL de filtrat. L'apparition d'un précipité de couleur jaune indiquait la présence des flavonoïdes (**Trease et Evans, 1989**).

II.2.4.3. Mise en évidence des tannins

Cinq cent milligrammes (500 mg) d'extrait ont été dissouts dans 5 mL d'eau distillée. La solution a été chauffée au bain marie pendant 5 min puis, filtrée. Quelques gouttes de chlorure ferrique 3 % ont ensuite été ajoutées au filtrat. La présence des tanins s'est traduite par l'apparition d'une coloration bleu sombre (**Harbone, 1998**).

II.2.4.4. Mise en évidence des stérols et triterpènes : test de Liebermann-Burchard

Cent milligrammes (100 mg) d'extrait ont été dissouts dans 3 mL de chloroforme. Quatre (4) gouttes d'anhydride acétique et d'acide sulfurique concentré ont été ajoutées à la solution. L'apparition d'une coloration rouge-violacé ou bleu indiquait respectivement la présence de triterpènes ou de stéroïdes (**Sofowora, 1993**).

II.2.4.5. Mise en évidence des lignines : test de Labat

Cinquante milligrammes (50 mg) d'extrait ont été dissouts dans 2,5 mL d'eau distillée. Deux millilitres (2 mL) d'acide gallique ont été ensuite ajoutés au mélange. L'apparition d'une coloration vert olive indiquait la présence de lignines (**Harbone, 1998**).

II.2.4.6. Mise en évidence des alcaloïdes : test de Mayer

Cent milligrammes (100 mg) d'extrait ont été dissouts dans 3 mL de H₂SO₄ 1 %. La solution a été ensuite chauffée au bain-marie pendant 5 min puis, filtrée. Cinq (5) gouttes de réactif de Meyer ont été ajoutées au filtrat. La formation d'un précipité blanc traduisait la présence d'alcaloïdes (**Harbone, 1998**).

II.2.4.7. Mise en évidence des saponines : test de Foam

Cinquante milligrammes (50 mg) d'extrait ont été dissouts dans 2,5 mL d'eau distillée. La solution a ensuite été vigoureusement homogénéisée. L'apparition d'une mousse persistante traduisait la présence de saponines (**Harbone, 1998**).

II.2.4.8. Mise en évidence des sucres réducteurs : test de Fehling's

Cinquante milligrammes (50 mg) d'extrait ont été dissouts dans 2,5 mL d'eau distillée. Un volume de 2,5 mL de liqueur de Fehling a été ensuite additionné à la solution. La formation d'un précipité rouge brique après 2-3 min de chauffage au bain-marie indiquait la présence de sucres réducteurs (**Trease et Evans, 1989**).

II.2.4.9. Mise en évidence des anthocyanines

Cent milligrammes (100 mg) d'extrait ont été dissouts dans 5 mL de H₂SO₄ 1% ; l'apparition d'une coloration orange traduisait la présence des anthocyanines (**Sofowora, 1993**).

II.2.5. Fractionnement bioguidé de l'extrait GLE

L'extrait GLE a été fractionné par chromatographie bioguidée comme l'indique les figures 13, 14 et 15 ci-après. Les structures chimiques des composés isolés ont été élucidées par analyses spectroscopiques RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMBC et HSQC avec la collaboration des Laboratoires de Chimie Médicinale et Pharmacognosie de l'Université de Yaoundé I et de Chimie Organique de l'Université de Rhodes.

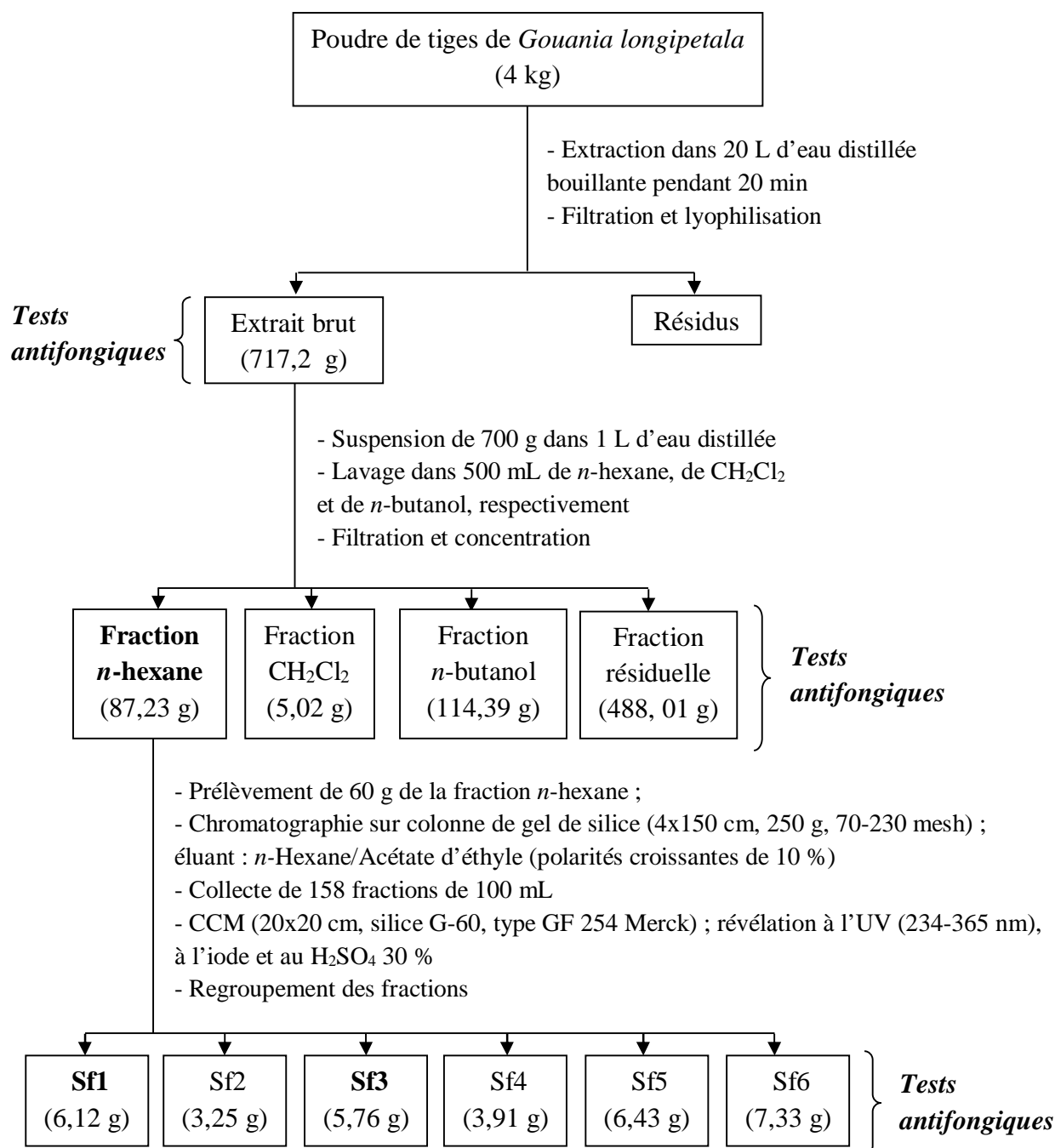


Figure 13 : Fractionnement de l'extrait GLE.

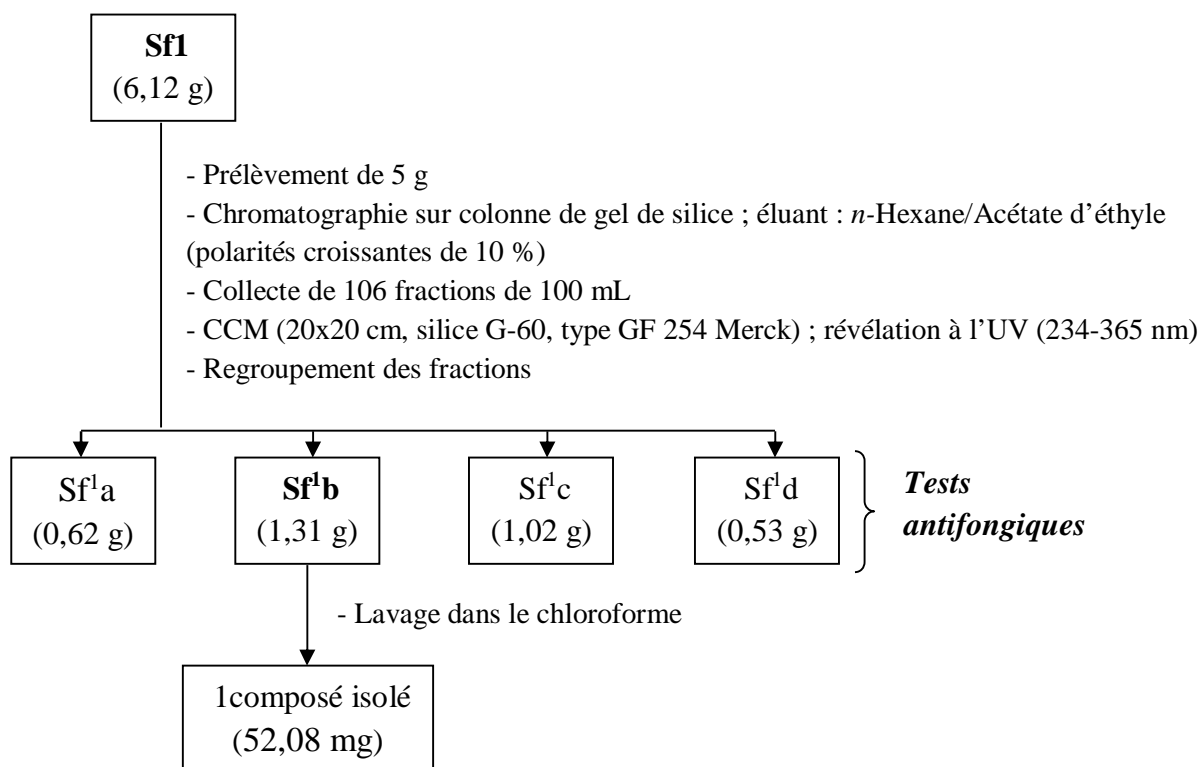


Figure 14 : Purification de la sous-fraction Sf1.

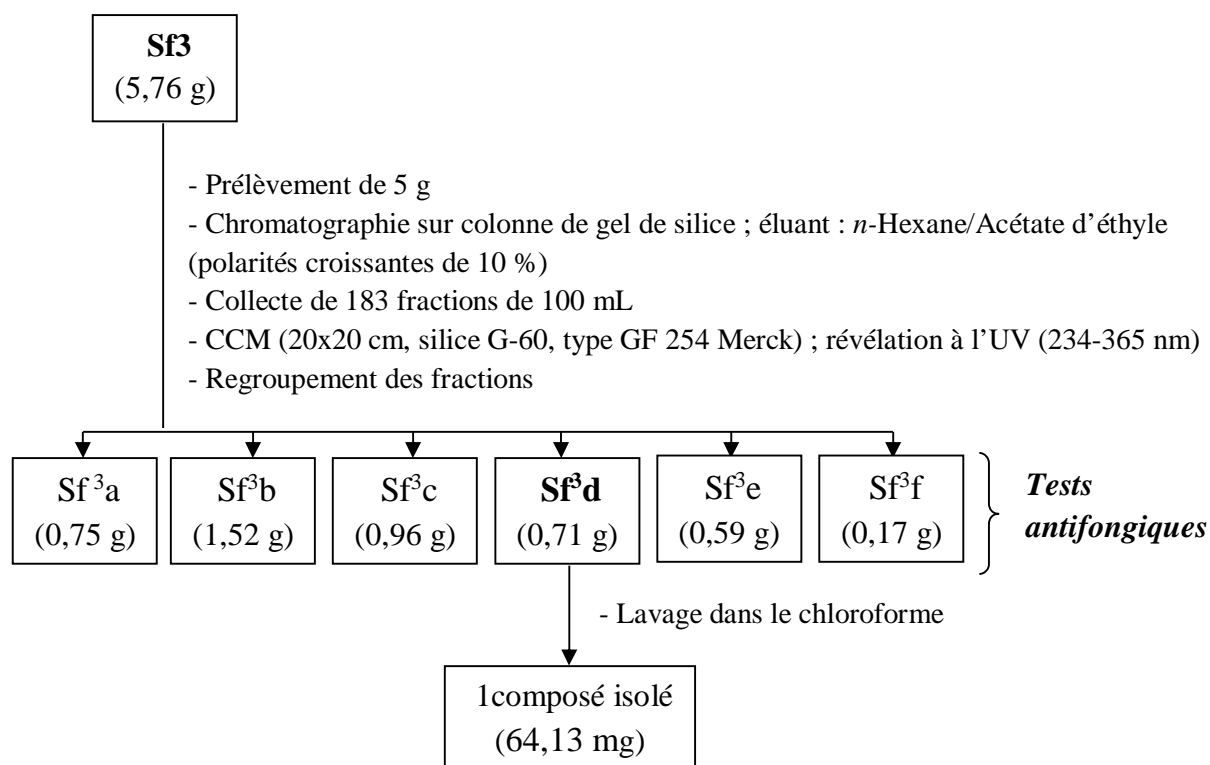


Figure 15 : Purification de la sous-fraction Sf3.

II.2.6. Détermination du mode d'action de l'extrait GLE sur la cellule fongique

II.2.6.1. Mesure de l'affinité de l'extrait GLE pour l'ergostérol

La CMI de l'extrait GLE sur *Candida albicans* ATCC 18804 a été déterminée en absence et en présence d'ergostérol. Dans une microplaque de 96 puits, une dilution de raison géométrique 2 de l'extrait GLE a été réalisée dans du SDB de façon à établir des concentrations finales d'extrait comprises entre 8 et 4096 µg/mL. L'ergostérol (50 µL) dissout dans du SDB a ensuite été ajouté à la série de dilution à une concentration de 100, 200 ou 400 µg/mL. Un témoin sans ergostérol a été réalisé. Cinquante microlitres (50 µL) d'inoculum fongique calibré à 2×10^6 UFC/mL a par la suite été introduit dans les puits de la microplaque. Après une incubation de la préparation à 37°C pendant 48 h, une augmentation de la CMI de l'extrait GLE en présence d'ergostérol indiquait son affinité pour ce composé. La Nystatine a été utilisée comme référence (Sortino et al., 2007).

II.2.6.2. Effet de l'extrait GLE sur la perméabilité membranaire

L'effet de l'extrait GLE sur la perméabilité de la membrane fongique a été évalué par le protocole décrit par Khan et Ahmad (2012). A partir d'une culture (48 h, 37°C) de *Candida albicans* ATCC 18804 sur gélose SDA, un inoculum fongique calibré à 10^6 UFC/mL a été préparé dans du NaCl 0,9 %. De volumes de 5 mL de cet inoculum ont été distribués dans les tubes à essai et traités avec 5 mL d'extrait GLE dissout dans le NaCl 0,9 % ; de façon à établir des concentrations finales d'extrait de CMI, 2 CMI et 4 CMI. La Nystatine (5 µg/mL) a servi de témoin positif et le NaCl 0,9 % de témoin négatif. A des intervalles de temps de 1 h, 4 h, 8 h et 16 h, le contenu de trois tubes de chaque concentration a été centrifugé à 1250 trs/min pendant 2 min. L'absorbance du surnageant recueilli a ensuite été mesurée à 260 nm et 280 nm pour évaluer respectivement la quantité d'acides nucléiques et de protéines présente dans le milieu.

II.2.7. Evaluation de l'activité anti-biofilm de l'extrait GLE

II.2.7.1. Effet de l'extrait GLE sur la formation des biofilms des *Candida*

L'effet de l'extrait GLE sur la formation des biofilms a été évalué suivant le protocole décrit par Wu et al. (2013). Dans une microplaque de 96 puits, un inoculum de levures calibré à 10^6 UFC/mL a été mis en présence de concentrations d'extrait GLE de 5, 10, 20, 40 et 80 % CMI. Le Fluconazole (5 µg/mL) a été utilisé comme référence. Après une incubation de la préparation à 37°C pendant 48 h, les cellules planctoniques ont été

éliminées et les puits de la microplaque ont été rincés 3 fois à l'eau distillée. La microplaque a ensuite été séchée à température ambiante pendant 30 min. Un volume de 200 µL de cristal violet 0,1 % a été introduit dans chaque puits et la préparation a été incubée à température ambiante pendant 15 min. L'excès de colorant a ensuite été éliminé et les puits ont été rincés 3 fois avec de l'eau distillée. Deux cent microlitres (200 µL) d'éthanol 95 % a été introduit dans chaque puits et après 15 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 600 nm. Un contrôle de croissance microbienne, un contrôle contenant uniquement l'extrait dissout dans du SDB et un blanc contenant uniquement le SDB ont été réalisés. L'indice spécifique de formation de biofilms (ISFB) dans chaque puits a été déterminé par la formule suivante :

$$\text{ISFB} = (\text{Abs T} - \text{Abs E}) / (\text{Abs Cr} - \text{Abs B})$$

Où, Abs T est l'absorbance du puits test, Abs E est l'absorbance de l'extrait GLE dissout dans du SDB à la concentration testée, Abs Cr est l'absorbance du contrôle de croissance et Abs B est l'absorbance du blanc contenant uniquement du SDB.

II.2.7.2. Effet de l'extrait GLE sur le métabolisme des biofilms

L'effet de l'extrait GLE sur le métabolisme des biofilms a été évalué par le protocole décrit par **Ramage et Lopez-Ribot (2005)**. Cent microlitres (100 µL) d'inoculum fongique calibré à 10⁶ UFC/mL dans du SDB ont été introduit dans les puits d'une microplaque. Après une incubation de 48 h à 37°C, les cellules planctoniques ont été éliminées et les puits ont été rincés 3 fois à l'eau distillée. De volumes de 100 µL d'extrait GLE dissout dans du SDB aux concentrations de 5, 10, 20, 40 et 80 % CMI ont ensuite été introduits dans ces puits. Le Fluconazole (5 µg/mL) a servi de référence. Après une incubation de la préparation à 37°C pendant 48 h, 50 µL de TTC 0,5 % ont été ajoutés dans chaque puits. La préparation a ensuite été ré-incubée à 37°C pendant 3 h et l'absorbance des puits a été mesurée à 490 nm. Un contrôle de croissance microbienne, un contrôle contenant uniquement l'extrait GLE dissout dans du SDB et un blanc contenant uniquement du SDB ont été réalisés. Le pourcentage d'inhibition du métabolisme des biofilms a été déterminé par la formule ci-dessous :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(\text{Abs Cr} - \text{Abs B}) - (\text{Abs T} - \text{Abs E})] / (\text{Abs Cr} - \text{Abs B}) \times 100$$

Où, Abs Cr est l'absorbance du contrôle de croissance, Abs B est l'absorbance du blanc contenant uniquement du SDB, Abs T est l'absorbance du puits test et Abs E est l'absorbance de l'extrait GLE dissout dans du SDB à la concentration testée.

II.2.8. Combinaison de l'extrait GLE aux antifongiques

L'extrait GLE a été combiné à cinq antifongiques (Fluconazole, Nystatine, Posaconazole, Kétoconazole et Itraconazole) par la méthode de l'échiquier comme décrit dans le protocole M7-A6 du NCCLS (2003). Pour ce faire, des dilutions géométriques de raison 2 d'antifongique et d'extrait GLE ont été réalisées séparément dans deux microplaques contenant du SDB. Ces dilutions ont été ensuite combinées entre elles de telle sorte qu'en combinaison, la concentration maximale de la substance testée soit égale à sa CMI. Un volume de 100 µL d'inoculum fongique calibré à 10⁶ UFC/mL dans du SDB a été ensuite ajouté dans chaque puits de la microplaque. Après une incubation de la préparation à 37°C pendant 48 h, la combinaison de plus faible concentration en antifongique ayant inhibé toute croissance visible du germe a été identifiée. Le pourcentage de réduction de la CMI de l'antifongique, les concentrations inhibitrices fractionnelles (FIC) et les index de concentrations inhibitrices fractionnelles (FICI) ont été calculés par les formules ci-dessous (Iten et al., 2009) :

$$\text{Réduction de CMI (\%)} = (\text{CMI de l'antifongique en combinaison} / \text{CMI de l'antifongique testé seul}) \times 100$$

$$\text{FIC (1 ou 2)} = \text{CMI de 1 ou 2 dans la combinaison} / \text{CMI de 1 ou 2 testé seul}$$

$$\text{FICI} = \text{FIC (1)} + \text{FIC (2)}$$

Le type d'interaction entre l'extrait GLE et l'antifongique a été déterminé sur la base des FICI (Iten et al., 2009). Ainsi, pour :

- $\text{FICI} \leq 0,5$ l'interaction est dite synergique ;
- $0,5 < \text{FICI} \leq 1$ elle est additive ;
- $1 < \text{FICI} \leq 4$ on parle d'indifférence ;
- $\text{FICI} > 4$ elle est dite antagoniste.

II.2.9. Evaluation *in vivo* de l'activité anti-*Candida* de l'extrait GLE

L'effet de l'extrait GLE sur la candidémie induite chez des rats immunodéprimés a été évalué suivant la méthode de **Kretschmar et al. (2001)**.

II.2.9.1. Induction de l'immunosuppression

Des rats femelles de souche Wistar âgés de 7 à 9 semaines et de poids compris entre 124 et 138 g ont été réunis. Pendant une période de 3 jours, ces animaux ont été rendus immunodéprimés par administration intrapéritonéale de Cyclophosphamide à une dose quotidienne de 150 mg/kg. L'état d'immunodépression a été vérifié en évaluant la décroissance du taux de globules blancs sériques. Les animaux immunodéprimés ont ensuite été maintenus dans des conditions hygiéniques.

II.2.9.2. Induction de la candidémie

A partir d'une culture de 24 h de *Candida albicans* ATCC 18804 sur gélose SDA, un inoculum fongique calibré à 10^7 UFC/mL a été préparé dans du NaCl 0,9 %. Les animaux ont ensuite été infectés par injection intraveineuse de 0,1 mL de cet inoculum (**Jothy et al., 2012**). L'établissement de la candidémie chez l'animal a été confirmé quelques heures après par l'apparition de signes cliniques tels que : animaux moribonds, fourrure froissée, activité réduite, posture courbée, incapacité de manger et boire, torticolis. Vingt-quatre heures (24 h) après infection, trois (3) animaux ont été sacrifiés et la charge fongique dans le sang et les reins a été déterminée (**Wiederhold et al., 2011**).

II.2.9.3. Traitement antifongique

Les rats infectés ont été répartis en 5 groupes de 18 rats chacun à savoir les groupes G1, G2, G3, P et N. Le traitement a débuté 24 h après infection des animaux et s'est étendu sur une période de 5 jours (J0 à J4). Les animaux des groupes tests G1, G2 et G3 ont respectivement reçu par voie intraveineuse des doses quotidiennes d'extrait GLE de 100, 200 et 400 mg/kg. Ceux du groupe N ont reçu 0,5 mL de NaCl 0,9 % et ceux du groupe P ont été traités au Fluconazole à une dose de 10 mg/kg. Les solutions mères d'extrait GLE et de Fluconazole administrées aux animaux ont été préparées dans l'eau distillée à une concentration de 50 mg/mL. Pour atteindre la dose de traitement voulue, le volume de solution à administrer à l'animal a été déterminé par la formule ci-après (**OCDE, 2001**) :

$$V = D \times P/C$$

Où, V (mL) est le volume de solution à administrer, D (mg/kg) est la dose, P (kg) est le poids de l'animal et C (mg/mL) est la concentration de la solution administrée.

II.2.9.4. Détermination de la charge fongique dans le sang et les reins

A des intervalles de temps de 24 h, trois (3) animaux de chaque groupe ont été sacrifiés par dislocation cervicale. Le sang a été collecté dans un tube EDTA et le rein a été prélevé, pesé et homogénéisé dans 5 mL de NaCl 0,9 %. Une série de dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-3}) du sang et d'homogénat de rein obtenu a été réalisée dans le NaCl 0,9 %. Un volume de 0,1 mL de chaque dilution a été ensuite ensemencé sur gélose SDA enrichie au chloramphénicol (0,05 %) et les préparations ont été incubées à 37°C pendant 24 h. Le nombre d'unités formants colonies (UFC) de levures a ensuite été dénombré et exprimé en log UFC/mL de sang ou log UFC/g de rein.

II.2.9.5. Détermination des paramètres sériques

Le taux d'érythrocytes et de leucocytes sanguins a été déterminé par dénombrement microscopique. Une partie du sang collecté a été centrifugé à 3000 trs/min et la concentration d'aspartate aminotransférase (ASAT), d'alanine aminotransférase (ALAT), de créatine et d'urée dans le sérum a été déterminée par dosage à l'aide des kits span diagnostics. Le titre d'anticorps a été déterminé par le test d'hémagglutination.

II.2.9.5.1. Numération des érythrocytes

Principe

En présence d'un liquide de dilution globulaire rouge, le sang total subi une lyse des globules blancs en faveur des globules rouges qui sont conservés intact.

Mode opératoire

Le sang contenu dans le tube EDTA a été agité et aspiré à l'aide d'une pipette de Potain à bille rouge, jusqu'à la graduation 0,5. En se servant de la même pipette, le liquide de Marcano a également été aspiré pour atteindre la graduation 101. Après une agitation de 3 min, le sang contenu dans la pipette était ainsi dilué au $1/200^{\text{ième}}$ dans le liquide de Marcano. La chambre de comptage de la cellule de Malassez a été ensuite remplie et la

préparation laissée au repos pendant 3 min. A l'objectif 40X du microscope, le nombre N d'érythrocytes dans 4 rectangles de la cellule de Malassez a été déterminé (**Mankele, 2005**). Le taux d'érythrocytes a été ensuite déduit par l'équation :

$$\text{Taux d'érythrocytes (Nombre/mm}^3\text{de sang)} = N \times 5000$$

II.2.9.5.2. Numération des leucocytes

Principe

En présence d'un liquide de dilution leucocytaire, le sang total subi une lyse des érythrocytes en faveur des leucocytes qui sont conservés intact.

Mode opératoire

Le sang contenu dans le tube EDTA a été agité et aspiré à l'aide d'une pipette de Potain à bille blanche jusqu'à la graduation 0,5. En se servant de la même pipette, le liquide de Lazarus a été également aspiré pour atteindre la graduation 11. Après une agitation de 3 min, le sang contenu dans la pipette était ainsi dilué au 1/20^{ième} dans le liquide de Lazarus. La chambre de comptage de la cellule de Malassez a été ensuite remplie et la préparation laissée au repos pendant 3 min. A l'objectif 40X du microscope, le nombre N de leucocytes dans 5 bandes horizontales de la cellule de Malassez a été déterminé (**Mankele, 2005**). Le taux de leucocytes a été déduit par l'équation :

$$\text{Taux de leucocytes (Nombre/mm}^3\text{de sang)} = N \times 40$$

II.2.9.5.3. Formule leucocytaire

Principe

La formule leucocytaire est une méthode pronostique basée sur l'emploi successif de deux colorants, le May-Grünwald et le Giemsa. Le May-Grünwald fixe le frottis par son alcool méthylique et colore le cytoplasme et les granulations neutrophiles, basophiles et éosinophiles. Le Giemsa quant à lui colore les noyaux et les grosses granulations azurophiles des lymphocytes et parasites.

Mode opératoire

Un frottis sanguin a été réalisé sur une lame porte objet et séché à température ambiante. Le frottis a ensuite été recouvert de 0,1 mL de réactif de May-Grünwald et la préparation a été laissée au repos pendant 3 min. Un volume de 0,1 mL d'eau distillée a été ajouté à la préparation et le mélange a été homogénéisé. Après 1 min, l'excès de solution a été éliminé et le frottis a été rincé à l'eau distillée, recouvert de Giemsa 10 % et laissé au repos pendant 20 min. Il a ensuite été rincé à l'eau distillée et séché à température ambiante. Une goutte d'huile à immersion a été déposée sur ce dernier et la préparation a été examinée à l'objectif 100X du microscope. Sur une feuille de papier, un tableau de 100 cases (10 x 10) a été tracé. Les différents types leucocytaires (neutrophiles, éosinophiles, basophiles, lymphocytes et monocytes) ont été identifiés sur le frottis et notés au fur et à mesure dans le tableau. La proportion de chaque type leucocytaire par rapport aux 100 leucocytes mentionnés dans le tableau a été déterminée. La concentration C de ce type leucocytaire par mm³ de sang a ensuite été déduite par la formule suivante (Barbé *et al.*, 2012) :

$$C \text{ (Nombre/mm}^3 \text{ de sang)} = \text{Proportion du type leucocytaire} \times \text{Taux de leucocytes}$$

II.2.9.5.4. Numération des plaquettes

Principe

L'oxalate d'ammonium neutralise le calcium essentiel à la coagulation du sang en le précipitant sous forme de sels d'oxalate de calcium. Les plaquettes sont ainsi libérées et peuvent être dénombrées.

Mode opératoire

Après avoir agité le sang contenu dans le tube EDTA, il a été aspiré à l'aide de la pipette de Potain jusqu'à la graduation 0,5. En se servant de la même pipette, une solution d'oxalate d'ammonium 1 % a été également aspirée pour atteindre la graduation 11. Après une agitation de 30 s, le sang contenu dans la pipette était ainsi dilué au 1/20^{ième} dans la solution d'oxalate d'ammonium 1 %. La chambre de comptage de la cellule de Malassez a été par la suite remplie et la préparation laissée au repos pendant 15 min. A l'objectif 40X du microscope, le nombre N de plaquettes sanguines dans 5 bandes

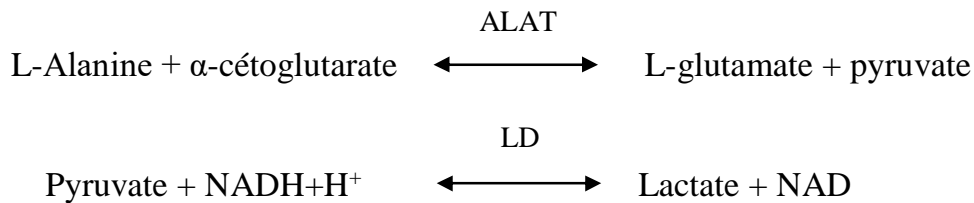
horizontales de la cellule de Malassez a été déterminé (Mankela, 2005). Le taux de plaquettes sanguines a été déterminé par l'équation :

$$\text{Taux de plaquettes sanguines (Nombre/mm}^3\text{de sang)} = N \times 40$$

II.2.9.5.5. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT)

Principe

L'ALAT catalyse le transfert du groupement amine de la L-alanine sur l' α -cétoglutarate pour former le L-glutamate et le pyruvate. Le pyruvate formé réagit avec le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) pour donner le lactate et le nicotinamide adénine dinucléoside oxydé (NAD). Le taux d'oxydation du NADH est déterminé par mesure de l'absorbance à 340 nm et est proportionnel à l'activité de l'ALAT dans l'échantillon.



Réactifs

Réactifs 1 : Tampon tris (pH 7,5)	100 mmol/L
L-alanine	50 mmol/L
Lactate déshydrogénase (LD)	> 1200 U/L
Réactifs 2 : α -cétoglutarate	15 mmol/L
NADH	0,18 mmol/L

Mode opératoire

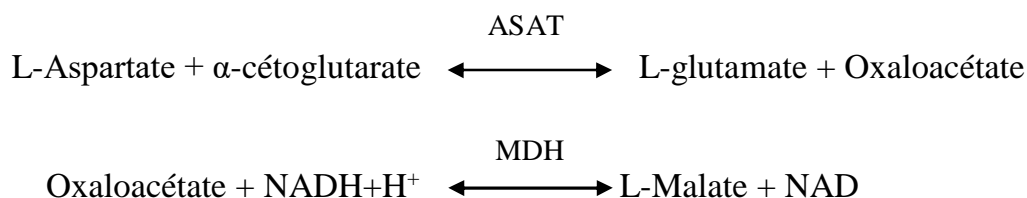
Le réactif de travail a été préparé en mélangeant dans une proportion 4:1 le réactif 1 au réactif 2. Un volume de 100 μ L de sérum sanguin a été ensuite introduit dans un tube à essai et 1000 μ L du réactif de travail y ont été ajoutés. Après homogénéisation, la solution a été laissée au repos pendant 10 min puis, l'absorbance a été déterminée à 340 nm contre le blanc (réactif de travail). L'activité de l'ALAT correspondante à la densité

optique lue a été déterminée à partir d'un étalon réalisé avec l'ALAT dans les mêmes conditions (figure 27, annexe 4).

II.2.9.5.6. Dosage de L-aspartate aminotransférase (ASAT)

Principe

L'ASAT catalyse le transfert du groupement amine de la L-aspartate sur l' α -cétoglutarate pour former l'oxaloacétate et le L-glutamate. L'oxaloacétate formé réagit avec le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) pour donner le L-malate et le nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (NAD). Le taux d'oxydation du NADH est déterminé par mesure de l'absorbance à 340 nm et est proportionnel à l'activité de l'ASAT dans l'échantillon.



Réactifs

Réactifs 1 : Tampon tris (pH 7,8)	100 mmol/L
L-aspartate	240 mmol/L
Malate déshydrogénase (MDH)	≥ 600 U/L
Lactate déshydrogénase	≥ 600 U/L
Réactifs 2 : α -cétoglutarate	12 mmol/L
NADH	0,18 mmol/L

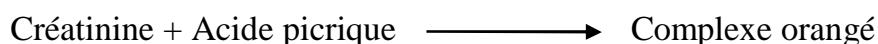
Mode opératoire

Le réactif de travail a été préparé en mélangeant dans une proportion 4:1 le réactif 1 au réactif 2. Un volume de 100 μ L de sérum sanguin été ensuite introduit dans un tube à essai et 1000 μ L du réactif de travail y ont été ajoutés. Après homogénéisation, la solution a été laissée au repos pendant 10 min puis, l'absorbance a été déterminée à 340 nm contre le blanc (réactif de travail). L'activité de l'ASAT correspondante à la densité optique lue a été déterminée à partir d'un étalon réalisé avec l'ASAT dans les mêmes conditions (figure 27, annexe 4).

II.2.9.5.7. Dosage de la créatinine

Principe

La créatinine en milieu alcalin réagit avec l'acide picrique pour former un complexe orangé. La quantité de complexe formée est directement proportionnelle à la concentration de créatinine dans l'échantillon.



Réactifs

Réactif 1 : Acide picrique	40 mM/L
Réactif 2 : Hydroxyde de sodium	200 mM/L
Réactif 3 : Créatinine standard	2 mg/dL

Mode opératoire

Le réactif de travail a été préparé en mélangeant le réactif 1 au réactif 2 en proportion égale. Le pipetage a ensuite été réalisé dans des tubes à essai comme indiqué dans le tableau IV ci-dessous :

Tableau IV : Protocole de dosage de la créatinine

	Standard	Test
Sérum	...	100 µL
Réactif 3	100 µL	...
Réactif de travail	1000 µL	1000 µL

Les préparations ainsi réalisées ont été homogénéisées et l'absorbance (abs) a été mesurée à 505 nm après 90 et 120 secondes. La concentration de l'échantillon en créatinine sérique a été déterminée par la formule suivante :

$$[\text{Créatinine}] = (\Delta\text{abs Echantillon} / \Delta\text{abs Standard}) \times 2$$

Avec,

$\Delta\text{abs Echantillon}$ = abs à 120 secondes - abs à 90 secondes

$\Delta\text{abs Standard}$ = abs à 120 secondes - abs à 90 secondes

[Créatinine] = Concentration de créatinine dans l'échantillon en mg/dL.

II.2.9.5.8. Dosage de l'urée

Principe

En milieu acide et à chaud, l'urée réagit avec le diacétylmonoxime (butane-2,3-dione monoxime) pour former un composé coloré rouge ayant une longueur d'onde d'absorption maximale de 520 nm.

Mode opératoire

L'urée sérique a été dosée par la méthode de **Cheesbrough (1991)**. Dans un tube à essai, un volume de 0,2 mL de sérum a été dilué dans 0,8 mL d'eau distillée. Un millilitre (1 mL) d'acide trichloroacétique a ensuite été ajouté à la solution. Cette dernière a été centrifugé à 3000 rpm pendant 5 min et le surnageant a été récupéré. Un étalon et un tube test contenant respectivement 0,2 mL de solution d'urée (10 mg/mL) et 0,2 mL de surnageant ont été réalisés. Trois millilitres (3 mL) de diacétylmonoxime 3 % ont été ensuite introduits dans chaque tube. Les solutions obtenues ont été incubées à 100°C dans un bain marie pendant 10 min. Les tubes ont ensuite été refroidis à l'eau et l'absorbance (abs) de chaque solution a été mesurée à 520 nm. La concentration d'urée sérique en mg/mL de solution a été déterminée par la formule suivante :

$$[\text{Urée}] = (\text{abs tube test}/\text{abs étalon}) \times [\text{étalon}]$$

II.2.9.5.9. Dosage des anticorps

Le titre d'anticorps du sérum sanguin a été déterminé par le test d'hémagglutination comme décrit par **Shruthi et al. (2018)**. Du sang de mouton fraîchement prélevé dans un tube EDTA a été centrifugé à 4000 trs/min pendant 5 min. Le plasma sanguin a été éliminé et le culot restant a été lavé 2 fois dans du tampon phosphate salin (100 mM, pH =7,4). La suspension érythrocytaire obtenue a été calibrée dans le tampon phosphate à une concentration de 4×10^3 cellules/mL. Un volume de 100 µL de sérum sanguin de l'animal a ensuite été prélevé et une dilution double a été réalisée dans les puits d'une microplaque contenant chacun 100 µL de NaCl 0,9 %. Cinquante microlitres (50 µL) de suspension érythrocytaire a été introduit dans chaque puits et la microplaque a été incubée à 37°C pendant 1 h. Un volume de 20 µL de chaque puits a ensuite été prélevé et déposé sur une lame porte objet. La solution a été examinée au microscope (40X) et le titre d'anticorps a

été déterminé comme étant la réciproque de la dilution la plus élevée de sérum entraînant une hémagglutination.

II.2.9.5.10. Effet de l'extrait GLE sur la masse corporelle des animaux, la masse relative des organes et le taux de mortalité

La masse des animaux, du foie, du thymus, de la rate et du rein a été mesurée les premier et dernier jour du traitement. Les variations de masse corporelle (ΔMC) et de masse relative des organes (ΔMR_O) ont été respectivement déterminées par les formules :

$$\Delta MC \text{ (g)} = MC_f - MC_i$$

$$\Delta MR_O \text{ (g/100g MC)} = (M_{Of}/M_{cf} - M_{Oi}/M_{ci}) \times 100$$

Où, ΔMC est la variation de masse corporelle de l'animal, MC_f la masse corporelle finale, MC_i la masse corporelle initiale, ΔMR_O la variation de masse de l'organe, M_{Of} la masse finale de l'organe et M_{Oi} la masse initiale de l'organe.

Le taux de mortalité TM (%) enregistré pour chaque dose de traitement a été déterminé par la formule suivante :

$$TM \text{ (\%)} = (\text{Nombres d'animaux décédés} / \text{Nombre d'animaux de départ}) \times 100$$

II.2.10. Effet de l'extrait GLE sur la stimulation de l'activité phagocytaire

II.2.10.1. Stimulation de l'activité phagocytaire des polymorphonucléaires

L'effet de l'extrait GLE et des molécules isolées sur l'activité phagocytaire des polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) a été évalué par la méthode décrite par **Ponkshe et Madhavi (2002)**. Un volume de 0,2 mL de sang a été déposé sur une lame porte-objet et incubé à 37°C pendant 25 min. Le caillot sanguin a été éliminé et la lame soigneusement rincée au NaCl 0,9 %. Le frottis restant sur la lame a ensuite été inondé de 100 μ L d'extrait GLE dissout dans l'eau distillée à une concentration de 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 ou 640 μ g/mL. La préparation a été incubée à 37°C pendant 15 min et l'excédent de solution a été éliminé. Le frottis a ensuite été recouvert de 100 μ L d'inoculum de *Candida albicans* ATCC 18804 calibré à 10^8 UFC/mL dans du NaCl 0,9 %. Après une incubation de 1 h à température ambiante, le frottis a été rincé au NaCl 0,9 %, fixé au méthanol et coloré avec 100 μ L de Giemsa 10 % pendant 1 min. Il a ensuite été rincé et

examiné à l'objectif 100X du microscope. L'acétonitrile 0,1% a été utilisé comme contrôle positif. Le pourcentage de phagocytose (PP) a été déterminé comme le nombre moyen de cellules de *Candida* phagocytées par 100 PMNs et le pourcentage de stimulation de l'activité phagocytaire des PMNs a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Stimulation (\%)} = [(\text{PP du contrôle} - \text{PP du test})/\text{PP du contrôle}] \times 100$$

II.2.10.2. Stimulation de l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial

L'effet de l'extrait GLE sur la stimulation de l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial a été évalué par le test de clairance carbone comme décrit par **Kehili et al. (2014)**. Des rats femelles de souche Wistar âgés de 8 à 12 semaines et de poids compris entre 154 et 176 g ont été repartis en six groupes de 4 animaux chacun à savoir les groupes N, G0, G1, G2, G3 et G4. Les animaux du groupe G0 ont été traités par injection intra-péritonéale de 0,5 mL de NaCl 0,9 % ; ceux des groupes G1, G2, G3 et G4 ont été traités aux doses d'extrait GLE de 25, 50, 100 et 200 mg/kg, respectivement. Les animaux du groupe N n'ont pas été traités et ont servi de témoins négatifs. Après 48 h, les animaux ont reçu par injection intraveineuse une suspension d'encre de carbone à une dose de 0,1 mL/10 g. Du sang a été prélevé au niveau du plexus rétro-orbitaire avant injection d'encre de carbone puis, après 10 et 30 min. Un volume de 25 μ L de sang recueilli a été dissout dans 4 mL de Na₂CO₃ 0,1 % et la densité optique de la solution obtenue a été mesurée à 675 nm. L'indice phagocytaire (K) du sang et la clairance carbone (temps de demi-vie du carbone dans le sang, $t_{1/2}$) ont été déterminés par les formules suivantes :

$$K = (\text{Ln DO}_1 - \text{Ln DO}_2) / (t_2 - t_1)$$

$$t_{1/2} = 0,693/K$$

Où, DO₁ et DO₂ sont les densités optiques aux instants t_1 et t_2 , respectivement.

II.2.10.2.1. Dosage du glutathion (GSH)

Après avoir sacrifié les animaux, le foie a été prélevé et 1 g a été homogénéisé dans 2 mL de TCA 5 %. L'homogénat a ensuite été centrifugé à 2000 trs/min pendant 20 min et le surnageant a été prélevé. Un volume de 50 μ L de surnageant a été dilué dans 950 μ L de tampon phosphate (0,1 M ; pH = 8) puis, 20 μ L d'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque

(0,01 M) y ont été ajoutés. La densité optique de la solution résultante a été déterminée à 412 nm contre un blanc de TCA 5 %. La teneur en glutathion réduit (GSH) en mmol/g de foie a été déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions avec du glutathion (**Ellman, 1959**).

II.2.11. Evaluation de l'innocuité de l'extrait GLE

L'innocuité de l'extrait GLE sur les érythrocytes du mouton a été évaluée selon le protocole décrit par **Lee et al. (2002)**. De volumes de 2,5 mL d'extrait GLE dissout dans du tampon phosphate salin (100 mM, pH = 7,4) ont été introduits dans des tubes à essai pour des concentrations finales de 256, 512, 1024, 2048 et 4096 µg/mL. Ces tubes ont été ensuite supplémentés de 2,5 mL de suspension érythrocytaire (4×10^3 cellules/mL) de mouton. La préparation a été incubée à 37°C pendant 1 h. Un volume de 0,5 mL de chaque solution a ensuite été prélevé et suspendu dans 1 mL de tampon phosphate salin. La solution résultante a été centrifugée à 4000 trs/min pendant 5 min et le surnageant a été récupéré. La quantité d'hémoglobine intracellulaire libérée des érythrocytes a été déterminée par mesure de l'absorbance du surnageant à 548 nm. Le tampon phosphate salin a servi de témoin négatif et le triton-X100 à 1 % a servi de témoin positif. Pour chaque échantillon le taux d'hémolyse a été déterminé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = [(\text{Abs T} - \text{Abs E}) / (\text{Abs TP} - \text{Abs tr})] \times 100$$

Où, Abs T est l'absorbance de la suspension érythrocytaire traitée à l'extrait GLE, Abs E est l'absorbance de l'extrait dissout du tampon phosphate salin à la concentration testée, Abs TP est l'absorbance du témoin positif et Abs tr est l'absorbance du triton-X100 dans le tampon phosphate salin à une concentration de 1 %.

La concentration cytotoxique 50 (CC₅₀) et l'indice de sélectivité (IS) ont également été déterminés. La CC₅₀ a été estimée à l'aide de la droite de régression ($R^2 = 0,9889$) exprimant le taux d'hémolyse (%) en fonction de la concentration d'extrait GLE (figure 28, annexe 4) et l'IS a été évalué par la formule (**Barile et al., 1993**) :

$$\text{IS} = \text{CC}_{50} / \text{CMI}$$

II.2.12. Analyses statistiques

Tous les tests ont été réalisés en triplicité et les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm écart type. L'analyse statistique et les diagrammes ont été réalisés à l'aide des logiciels SPSS Statistic 17.0 et GraphPad Prism 5. Les moyennes ont été comparées par le test one-way ANOVA et ont été considérées comme significativement différentes pour *P < 0,05, **P < 0,01 et ***P < 0,001.

Chapitre III

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats

III.1.1. Rendement d'extraction

L'extrait de plante étudié dans ce travail (infusé aqueux de tiges de *Gouania longipetala*) a été sélectionné suite à un criblage anti-*Candida* préliminaire réalisé sur les extraits de 13 plantes médicinales. Les différentes parties de ces plantes ont été collectées et extraites à froid dans l'eau, par infusion dans l'eau bouillante et par macération hydro-éthanolique (3:7). Le tableau V ci-dessous présente les rendements d'extraction obtenus. Il en ressort que les rendements d'extraction déterminés sont compris entre 1,16 et 29,05. L'infusé aqueux de tiges de *Gouania longipetala* Hemsl. a présenté un rendement d'extraction de 11,93.

Tableau V : Rendements d'extraction (%) des plantes testées

No	Nom de la plante	Parties utilisées	Extraits aqueux (à froid)	Infusés aqueux	Extraits hydro-éthanoliques (3:7)
1	<i>Aspilia africana</i> (Pers.) C.D. Adams Subsp. Africana	Feuilles	4,72	3,45	11,03
2	<i>Baillonella toxisperma</i> Pierre	Ecorces	5,38	8,09	9,65
		Feuilles	4,52	3,91	5,04
3	<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn.	Ecorces	11,03	18,07	13,55
		épines	2,94	1,16	3,28
		Feuilles	4,35	6,30	4,42
4	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Feuilles	5,82	2,82	7,71
5	<i>Cola nitida</i> (Vent.) Schott & Endl.	Ecorces	8,39	6,77	20,49
		Feuilles	4,63	4,08	7,92
6	<i>Costus afer</i> Ker-Gawl.	Feuilles	3,31	13,82	5,08
		Tiges	7,04	13,64	6,76
7	<i>Ficus glumosa</i> Delile	Ecorces	4,39	19,33	29,05
		Feuilles	4,41	18,07	14,97
8	<i>Gouania longipetala</i> (Hemsl.)	Feuilles	7,35	14,09	15,82
		Tiges	3,08	11,93	16,24
9	<i>Musanga cecropioides</i> R.Br. & Tedlie	Ecorces	8,30	5,02	11,63
		Feuilles	6,29	5,80	5,04
10	<i>Scorodophloeus zenkeri</i> Harms	Feuilles	4,87	13,89	19,18
11	<i>Spathodea campanulata</i> P. Beauv.	Ecorces	7,74	15,03	20,09
		Feuilles	3,01	22,09	13,07
12	<i>Spermacoce princea</i> (K. Schum) Verdc.	Plante entière	6,35	4,72	7,03
13	<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	Feuilles	2,30	5,08	14,56
		Tiges	7,23	5,42	9,98

III.1.2. Activité antifongique des extraits de plantes étudiées et sélection de l'extrait le plus actif sur les souches testées

Les tableaux VI, VII et VIII ci-après présentent les paramètres d'inhibition obtenus des extraits végétaux testés. Il ressort que, les CMI et CMF déterminées sont comprises entre 128 et 4096 µg/mL. L'interprétation des CMI (tableaux XXIV, XXV et XXVI en annexe 2) a permis de déceler de ces extraits végétaux essentiellement des activités antifongiques faibles (CMI > 500 µg/mL) ou modérées (100 < CMI ≤ 500 µg/mL). L'infusé aqueux de tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.) a présenté le plus grand nombre d'activités modérées sur les souches de *Candida* testées (6/7 souches). Il a de plus inhibé la croissance de 100 % de souches et a été fongicide sur 6/7 souches. Cet extrait a été sélectionné comme le plus actif sur les souches testées et codifié « Extrait GLE ».

Tableau VI : CMI, CMF et rapport CMF/CMI des extraits aqueux (à froid) de plantes testées

No	Plantes	Parties utilisées	CMI et CMF (µg/mL)	Souches fongiques						
				CA	CG	CT	CP	CK	CD	CGu
1	<i>Aspilia africana</i> (Pers.) C.D. Adams Subsp. Africana	Feuilles	CMI	2048	512	-	-	1024	1024	128
			CMF	4096	1024	-	-	-	-	2048
			CMF/CMI	2	2	-	-	-	-	16
2	<i>Baillonella toxisperma</i> Pierre	Ecorces	CMI	-	2048	2048	256	1024	-	-
			CMF	-	-	4096	256	4096	-	-
			CMF/CMI	-	-	2	1	4	-	-
		Feuilles	CMI	-	-	4096	-	-	256	512
			CMF	-	-	-	-	-	2048	512
			CMF/CMI	-	-	-	-	-	4	1
3	<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn.	Ecorces	CMI	2048	-	1024	128	1024	1024	-
			CMF	2048	-	1024	-	-	1024	-
			CMF/CMI	1	-	1	-	-	1	-
		Epines	CMI	-	-	-	-	-	-	1024
			CMF	-	-	-	-	-	-	-
			CMF/CMI	-	-	-	-	-	-	-
		Feuilles	CMI	-	-	4096	512	-	2048	-
			CMF	-	-	-	2048	-	2048	-
			CMF/CMI	-	-	-	4	-	1	-
4	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Feuilles	CMI	4096	4096	2048	-	512	1024	2048
			CMF	-	4096	2048	-	-	-	4096
			CMF/CMI	-	1	1	-	-	-	2
5	<i>Cola nitida</i> (Vent.) Schott & Endl.	Ecorces	CMI	-	-	-	1024	-	2048	-
			CMF	-	-	-	1024	-	2048	-
			CMF/CMI	-	-	-	1	-	1	-
		Feuilles	CMI	-	1024	2048	-	-	-	256
			CMF	-	-	-	-	-	-	1024
			CMF/CMI	-	-	-	-	-	-	4

Tableau VI (Suite et fin)

No	Plantes	Parties utilisées	CMI et CMF (µg/mL)	Souches fongiques							
				CA	CG	CT	CP	CK	CD	CGu	
6	<i>Costus afer</i> Ker-Gawl.	Feuilles	CMI	1024	-	-	-	512	-	-	
			CMF	-	-	-	-	512	-	-	
			CMF/CMI	-	-	-	-	1	-	-	
		Tiges	CMI	-	2048	-	-	-	-	4096	-
			CMF	-	2048	-	-	-	-	4096	-
			CMF/CMI	-	1	-	-	-	-	1	-
7	<i>Ficus glumosa</i> Delile	Ecorces	CMI	4096	-	2048	4096	1024	-	-	
			CMF	4096	-	-	4096	-	-	-	
			CMF/CMI	1	-	-	1	-	-	-	
		Feuilles	CMI	256	1024	-	-	128	512	4096	
			CMF	512	1024	-	-	256	1024	4096	
			CMF/CMI	2	1	-	-	2	2	1	
8	<i>Gouania longipetala</i> (Hemsl.)	Feuilles	CMI	512	4096	-	512	-	1024	-	
			CMF	-	4096	-	-	-	-	-	
			CMF/CMI	-	1	-	-	-	-	-	
		Tiges	CMI	256	-	256	1024	4096	-	512	
			CMF	512	-	4096	2048	4096	-	512	
			CMF/CMI	2	-	16	2	1	-	1	
9	<i>Musanga cecropioides</i> R.Br. & Tedlie	Ecorces	CMI	512	-	-	4096	-	128	-	
			CMF	-	-	-	-	-	512	-	
			CMF/CMI	-	-	-	-	-	4	-	
		Feuilles	CMI	1024	512	4096	2048	1024	1024	1024	
			CMF	1024	-	4096	4096	1024	2048	-	
			CMF/CMI	1	-	1	2	1	2	-	
10	<i>Scorodophloeus zenkeri</i> Harms	Feuilles	CMI	2048	512	128	2048	-	2048	1024	
			CMF	2048	-	4096	4096	-	4096	-	
			CMF/CMI	1	-	32	2	-	2	-	
11	<i>Spathodea campanulata</i> P. Beauv.	Ecorces	CMI	1024	2048	-	1024	2048	-	-	
			CMF	-	2048	-	-	2048	-	-	
			CMF/CMI	-	1	-	-	1	-	-	
		Feuilles	CMI	-	-	-	-	-	2048	-	
			CMF	-	-	-	-	-	4096	-	
			CMF/CMI	-	-	-	-	-	2	-	
12	<i>Spermacoce princea</i> (K. Schum) Verdc.	Plante entière	CMI	1024	512	512	-	1024	2048	1024	
			CMF	4096	-	2048	-	1024	-	-	
			CMF/CMI	4	-	4	-	1	-	-	
13	<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	Feuilles	CMI	-	4096	-	256	512	1024	1024	
			CMF	-	-	-	2048	-	-	1024	
			CMF/CMI	-	-	-	8	-	-	1	
		Tiges	CMI	512	-	1024	1024	-	-	512	
			CMF	2048	-	-	-	-	-	-	
			CMF/CMI	4	-	-	-	-	-	-	

- : CMI ou CMF > 4096 µg/mL ; CA : *Candida albicans* ATCC 18804 ; CG : *Candida glabrata* ATCC 90030 ; CT : *Candida tropicalis* ATCC 13803 ; CP : *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ; CK : *Candida krusei* ATCC 6258 ; CD : *Candida dubliniensis* ATCC 7289 ; CGu : *Candida guilliermondii* ATCC 6260

Tableau VII : CMI, CMF et rapport CMF/CMI des infusés aqueux des plantes testées

No	Nom de la plante	Parties utilisées	CMI et CMF (µg/mL)	Souches fongiques						
				CA	CG	CT	CP	CK	CD	CGu
1	<i>Aspilia africana</i> (Pers.) C.D. Adams Subsp. Africana	Feuilles	CMI	512	2048	256	-	512	-	2048
			CMF	4096	4096	2048	-	1024	-	-
			CMF/CMI	8	2	8	-	2	-	-
2	<i>Baillonella toxisperma</i> Pierre	Ecorces	CMI	1024	-	-	1024	512	1024	512
			CMF	1024	-	-	-	4096	2048	1024
			CMF/CMI	1	-	-	-	8	2	2
		Feuilles	CMI	4096	512	-	-	1024	512	-
			CMF	-	1024	-	-	-	-	-
			CMF/CMI	-	2	-	-	-	-	-
3	<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn.	Ecorces	CMI	-	-	1024	1024	1024	128	-
			CMF	-	-	2048	4096	-	512	-
			CMF/CMI	-	-	2	4	-	4	-
		Epines	CMI	1024	-	4096	-	-	-	1024
			CMF	4096	-	4096	-	-	-	1024
			CMF/CMI	4	-	1	-	-	-	1
		Feuilles	CMI	2048	4096	512	1024	512	1024	256
			CMF	2048	4096	1024	2048	-	-	256
			CMF/CMI	1	1	2	2	-	-	1
4	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Feuilles	CMI	512	-	128	2048	-	2048	1024
			CMF	512	-	512	4096	-	2048	1024
			CMF/CMI	1	-	4	2	-	1	1
5	<i>Cola nitida</i> (Vent.) Schott & Endl.	Ecorces	CMI	-	512	1024	-	4096	-	128
			CMF	-	512	1024	-	4096	-	512
			CMF/CMI	-	1	1	-	1	-	4
		Feuilles	CMI	-	-	256	512	-	-	2048
			CMF	-	-	2048	512	-	-	4096
			CMF/CMI	-	-	8	1	-	-	2
6	<i>Costus afer</i> Ker-Gawl.	Feuilles	CMI	2048	512	-	1024	-	2048	512
			CMF	2048	512	-	1024	-	-	1024
			CMF/CMI	1	1	-	1	-	-	2
		Tiges	CMI	-	1024	512	-	-	-	1024
			CMF	-	4096	1024	-	-	-	-
			CMF/CMI	-	4	2	-	-	-	-
7	<i>Ficus glumosa</i> Delile	Ecorces	CMI	-	-	-	2048	1024	-	-
			CMF	-	-	-	2048	4096	-	-
			CMF/CMI	-	-	-	1	4	-	-
		Feuilles	CMI	4096	1024	-	-	256	-	512
			CMF	-	2048	-	-	256	-	512
			CMF/CMI	-	2	-	-	1	-	1
8	<i>Gouania longipetala</i> (Hemsl.)	Feuilles	CMI	512	256	-	1024	2048	-	-
			CMF	-	-	-	-	2048	-	-
			CMF/CMI	-	-	-	-	1	-	-
		Tiges	CMI	128	512	256	128	128	128	256
			CMF	256	512	256	128	512	128	256
			CMF/CMI	2	1	1	1	4	1	1

Tableau VII (Suite et fin)

No	Nom de la plante	Parties utilisées	CMI et CMF (µg/mL)	Souches fongiques						
				CA	CG	CT	CP	CK	CD	CGu
9	<i>Musanga cecropioides</i> R.Br. & Tedlie	Ecorces	CMI	2048	-	-	128	1024	512	-
			CMF	2048	-	-	256	-	512	-
			CMF/CMI	1	-	-	2	-	1	-
		Feuilles	CMI	-	512	256	2048	-	128	-
			CMF	-	512	-	2048	-	1024	-
			CMF/CMI	-	1	-	1	-	8	-
10	<i>Scorodophloeus zenkeri</i> Harms	Feuilles	CMI	512	1024	4096	1024	2048	1024	512
			CMF	1024	2048	-	1024	2048	-	1048
			CMF/CMI	2	2	-	1	1	-	2
11	<i>Spathodea campanulata</i> P. Beauv.	Ecorces	CMI	512	-	2048	512	-	1024	1024
			CMF	2048	-	4096	4096	-	-	-
			CMF/CMI	4	-	2	8	-	-	-
		Feuilles	CMI	-	-	-	-	-	-	-
			CMF	-	-	-	-	-	-	-
			CMF/CMI	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>Spermacoce princea</i> (K. Schum) Verdc.	Plante entière	CMI	512	1024	2048	2048	512	512	1024
			CMF	-	-	4096	-	1024	4096	4096
			CMF/CMI	-	-	2	-	2	8	4
13	<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	Feuilles	CMI	512	-	1024	-	1024	2048	-
			CMF	512	-	-	-	2048	4096	-
			CMF/CMI	1	-	-	-	2	2	-
		Tiges	CMI	-	2048	-	1024	512	-	512
			CMF	-	4096	-	-	512	-	512
			CMF/CMI	-	2	-	-	1	-	1

- : CMI ou CMF > 4096 µg/mL ; CA : *Candida albicans* ATCC 18804 ; CG : *Candida glabrata* ATCC 90030 ; CT : *Candida tropicalis* ATCC 13803 ; CP : *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ; CK : *Candida krusei* ATCC 6258 ; CD : *Candida dubliniensis* ATCC 7289 ; CGu : *Candida guilliermondii* ATCC 6260

Tableau VIII : CMI, CMF et rapport CMF/CMI des extraits hydro-éthanoliques (3:7) des plantes testées

No	Nom de la plante	Parties utilisées	CMI et CMF (µg/mL)	Souches fongiques						
				CA	CG	CT	CP	CK	CD	CGu
1	<i>Aspilia africana</i> (Pers.) C.D. Adams Subsp. Africana	Feuilles	CMI	512	512	2048	256	1024	512	1024
			CMF	-	1024	4096	512	-	1024	-
			CMF/CMI	-	2	2	2	-	2	-
2	<i>Baillonella toxisperma</i> Pierre	Ecorces	CMI	256		128	256	-	2048	2048
			CMF	512		128	256	-	-	4096
			CMF/CMI	2		1	1	-	-	2
		Feuilles	CMI	-	1024	-	2048	256	512	-
			CMF	-	-	-	-	1024	512	-
			CMF/CMI	-	-	-	-	4	1	-
3	<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn.	Ecorces	CMI	2048	512	1024	-	512	4096	1024
			CMF	-	1024	1024	-	512	4096	-
			CMF/CMI	-	2	1	-	1	1	-
		Epines	CMI	-	4096	-	2048	-	-	-
			CMF	-	-	-	2048	-	-	-
			CMF/CMI	-	-	-	1	-	-	-
		Feuilles	CMI	-	256	256	512	512	-	512
			CMF	-	-	-	1024	512	-	-
			CMF/CMI	-	-	-	2	1	-	-
4	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Feuilles	CMI	-	-	-		2048	512	1024
			CMF	-	-	-		2048	1024	-
			CMF/CMI	-	-	-		1	2	-
5	<i>Cola nitida</i> (Vent.) Schott & Endl.	Ecorces	CMI	512	-	-	256	2048	512	-
			CMF	512	-	-		2048	-	-
			CMF/CMI	1	-	-		1	-	-
		Feuilles	CMI	2048	4196	512	1024	128	1024	512
			CMF	4096	-	1024	-	-	4096	4096
			CMF/CMI	2	-	2	-	-	4	8
6	<i>Costus afer</i> Ker-Gawl.	Feuilles	CMI	4096	512	-	512	-	-	-
			CMF	4096	-	-	-	-	-	-
			CMF/CMI	1	-	-	-	-	-	-
		Tiges	CMI	512	-	1024	256	1024	512	2048
			CMF	-	-	-	1024	1024	-	4096
			CMF/CMI	-	-	-	4	1	-	2
7	<i>Ficus glumosa</i> Delile	Ecorces	CMI	4096	-	-	-	-	2048	-
			CMF	-	-	-	-	-	2048	-
			CMF/CMI	-	-	-	-	-	1	-
		Feuilles	CMI	4096	256	-	128	-	-	-
			CMF	-	256	-	4096	-	-	-
			CMF/CMI	-	1	-	32	-	-	-
8	<i>Gouania longipetala</i> (Hemsl.)	Feuilles	CMI	-	4096	-	1024	512	-	2048
			CMF	-	4096	-	-	512	-	-
			CMF/CMI	-	1	-	-	1	-	-
		Tiges	CMI	2048	-	256	2048	-	2048	512
			CMF	2048	-	512	2048	-	4096	2048
			CMF/CMI	1	-	2	1	-	2	4

Tableau VIII (Suite et fin)

No	Nom de la plante	Parties utilisées	CMI et CMF ($\mu\text{g/mL}$)	Souches fongiques						
				CA	CG	CT	CP	CK	CD	CGu
9	<i>Musanga cecropioides</i> R.Br. & Tedlie	Ecorces	CMI	-	1024	512	128	-	512	512
			CMF	-	-	512	1024	-	1024	512
			CMF/CMI	-	-	1	8	-	2	1
		Feuilles	CMI	512	512	-	-	1024	4096	-
			CMF	1024	1024	-	-	-	-	-
			CMF/CMI	2	2	-	-	-	-	-
10	<i>Scorodophloeus zenkeri</i> Harms	Feuilles	CMI	-	256	4096	4096	2048	-	512
			CMF	-	512	4096	4096	2048	-	512
			CMF/CMI	-	2	1	1	1	-	1
11	<i>Spathodea campanulata</i> P. Beauv.	Ecorces	CMI	1024	4096	-	512	-	1024	256
			CMF	2048	4096	-	-	-	-	1024
			CMF/CMI	2	1	-	-	-	-	4
		Feuilles	CMI	-	-	-	4096	-	4096	-
			CMF	-	-	-	-	-	4096	-
			CMF/CMI	-	-	-	-	-	1	-
12	<i>Spermacoce princea</i> (K. Schum) Verdc.	Plante entière	CMI	256	-	1024	-	512	128	-
			CMF	512	-	1024	-	1024	1024	-
			CMF/CMI	2	-	1	-	2	8	-
13	<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	Feuilles	CMI	1024	4096	-	-	512	256	1024
			CMF	2048	-	-	-	-	512	-
			CMF/CMI	2	-	-	-	-	2	-
		Tiges	CMI	1024	-	256	1024	-	-	-
			CMF	-	-	-	-	-	-	-
			CMF/CMI	-	-	-	-	-	-	-
-	Antifongiques de référence	Fluc.	CMI	32	16	16	8	32	32	16
			CMF	64	32	16	64	32	128	16
			CMF/CMI	2	2	1	8	1	4	1
		Nyst.	CMI	16	16	32	16	64	8	16
			CMF	16	16	64	16	128	32	32
			CMF/CMI	1	1	2	1	2	4	2

- : CMI ou CMF > 4096 $\mu\text{g/mL}$; CA : *Candida albicans* ATCC 18804 ; CG : *Candida glabrata* ATCC 90030 ; CT : *Candida tropicalis* ATCC 13803 ; CP : *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ; CK : *Candida krusei* ATCC 6258 ; CD : *Candida dubliniensis* ATCC 7289 ; CGu : *Candida guilliermondii* ATCC 6260 ; Fluc. : Fluconazole ; Nyst. : Nystatine

III.1.3. Criblage phytochimique de l'extrait GLE

Les résultats obtenus du criblage phytochimique sont mentionnés dans le tableau IX ci-dessous. Il en ressort que l'extrait GLE contient des phénols, flavonoïdes, tannins, stérols, triterpènes, alcaloïdes, saponines et sucres réducteurs.

Tableau IX : Criblage phytochimique de l'extrait GLE

Métabolites testés	Résultats
Phénols	+
Flavonoïdes	+
Tannins	+
Stérols	+
Triterpènes	+
Lignines	-
Alcaloïdes	+
Saponines	+
Sucres réducteurs	+
Anthocyanines	-

+ = Présence ; - = Absence.

III.1.4. Fractionnement bioguidé de l'extrait GLE

III.1.4.1. Activité anti-*Candida* des fractions, sous-fractions et composés isolés

Le tableau X ci-après présente les CMI et CMF obtenues des fractions, sous-fractions et composés isolés de l'extrait GLE. De l'interprétation des CMI obtenues (tableau XXVII, annexe 2), il ressort que la fraction *n*-hexane a été la plus active sur les souches de *Candida* testées. Elle a inhibé la croissance de 6/7 souches avec des activités antifongiques allant de modérées à élevées (CMI \leq 256 μ g/mL). Elle a en outre été fongicide sur 3/7 souches. Les sous-fractions Sf1 et Sf3 issues du dégrossissement de la fraction *n*-hexane sur colonne de silice ont été ensuite les plus actives. Elles ont présenté le plus grand nombre d'activités antifongiques modérées ou élevées et ont respectivement été fongicides sur 4/7 et 5/7 souches. Les sous-fractions Sf¹b et Sf³d issues du dégrossissement de Sf1 et Sf3 ont par la suite été les plus actives et ont permis l'isolement de deux composés bioactifs à savoir l'acide épigouanique et l'acide alphitolique. Ces composés ont présenté des CMI \leq 256 μ g/mL. L'acide épigouanique a inhibé la croissance de toutes les souches avec des activités élevées sur 3/7 souches. Il a également été fongicide sur 6/7 souches. L'acide alphitolique a quant à lui présenté essentiellement des activités antifongiques modérées sur 4/7 souches et a été fongicide sur 4 souches.

Tableau X : CMI, CMF et rapport CMF/CMI des fractions, sous-fractions et composés isolés de l'extrait GLE

Frs, sous-frs et composés isolés	CMI et CMF (µg/mL)	Souches fongiques						
		CA	CG	CT	CP	CK	CD	CGu
Fr. <i>n</i> -hexane	CMI	256	-	128	64	128	256	64
	CMF	256	-	512	256	128	256	512
	CMF/CMI	1	-	4	4	1	1	8
Fr. CH ₂ Cl ₂	CMI	-	1024	-	256	4096	-	4096
	CMF	-	4096	-	256	-	-	4096
	CMF/CMI	-	4	-	1	-	-	1
Fr. <i>n</i> -butanol	CMI	4096	512	2048		1024	512	4096
	CMF	-	2048	-	-	-	-	-
	CMF/CMI	-	4	-	-	-	-	-
Fr. résiduelle	CMI	512	-	-	-	-	2048	-
	CMF	-	-	-	-	-	2048	-
	CMF/CMI	-	-	-	-	-	1	-
Sf1	CMI	128	-	64	512	128	256	512
	CMF	512	-	256	1024	128	512	512
	CMF/CMI	4	-	4	2	1	2	1
Sf2	CMI	512	2048	1024	-	2048	64	512
	CMF	1024	4096	-	-	2048	-	1024
	CMF/CMI	2	2	-	-	1	-	2
Sf3	CMI	512	128	4096	128	256	512	128
	CMF	512	-	-	256	256	1024	128
	CMF/CMI	1	-	-	2	1	2	1
Sf4	CMI	-	512	-	4096	1024	-	-
	CMF	-	1024	-	-	-	-	-
	CMF/CMI	-	2	-	-	-	-	-
Sf5	CMI	512	-	2048	-	256	-	1024
	CMF	4096	-	2048	-	512	-	-
	CMF/CMI	8	-	1	-	2	-	-
Sf6	CMI	1024	-	-	4096	-	512	-
	CMF	-	-	-	-	-	-	-
	CMF/CMI	-	-	-	-	-	-	-
Sf ¹ a	CMI	2048	512	-	-	1024	-	-
	CMF	2048	1024	-	-	-	-	-
	CMF/CMI	1	2	-	-	-	-	-
Sf ¹ b	CMI	256	256	64	512	1024	256	128
	CMF	512	-	128	512	1024	512	128
	CMF/CMI	2	-	2	1	1	2	1
Sf ¹ c	CMI	-	256	-	2048	512	2048	-
	CMF	-	512	-	4096	2048	-	-
	CMF/CMI	-	2	-	2	4	-	-
Sf ¹ d	CMI	512	4096	1024	64	2048	256	2048
	CMF	512	4096	1024	4096	-	512	-
	CMF/CMI	1	1	1	64	-	2	-
Sf ³ a	CMI	-	-	-	-	256	512	4096
	CMF	-	-	-	-	512	-	4096
	CMF/CMI	-	-	-	-	2	-	1
Sf ³ b	CMI	4096	2048	128	4096	-	-	-
	CMF	-	-	-	4096	-	-	-
	CMF/CMI	-	-	-	1	-	-	-

Tableau X (Suite et fin)

Frs, sous-frs et composés isolés	CMI et CMF ($\mu\text{g/mL}$)	Souches fongiques						
		CA	CG	CT	CP	CK	CD	CGu
Sf ^{3c}	CMI	2048	-	-	2048	-	1024	-
	CMF	2048	-	-	-	-	2048	-
	CMF/CMI	1	-	-	-	-	2	-
Sf ^{3d}	CMI	256	-	512	64	512	128	256
	CMF	256	-	512	128	512	128	256
	CMF/CMI	1	-	1	2	1	1	1
Sf ^{3e}	CMI	-	256	-	-	-	-	4096
	CMF	-	-	-	-	-	-	-
	CMF/CMI	-	-	-	-	-	-	-
Sf ^{3f}	CMI	4096	-	4096	-	2048	-	-
	CMF	4096	-	-	-	2048	-	-
	CMF/CMI	1	-	-	-	1	-	-
Acide alphaltolique	CMI	256	64	128	256	-	-	128
	CMF	256	128	256	256	-	-	-
	CMF/CMI	1	2	2	1	-	-	-
Acide épigouanique	CMI	128	128	64	64	128	32	256
	CMF	128	128	512	64	256	64	256
	CMF/CMI	1	1	8	1	2	2	1

- : CMI ou CMF > 4096 $\mu\text{g/mL}$; Frs : fractions ; CA : *Candida albicans* ATCC 18804 ; CG : *Candida glabrata* ATCC 90030 ; CT : *Candida tropicalis* ATCC 13803 ; CP : *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ; CK : *Candida krusei* ATCC 6258 ; CD : *Candida dubliniensis* ATCC 7289 ; CGu : *Candida guilliermondii* ATCC 6260

III.1.4.2. Structures chimiques des composés isolés

L'épuisement bioguidé de l'extrait GLE a conduit à l'isolement de deux triterpènes, l'acide alphaltolique (52,08 mg) et l'acide épigouanique (64,13 mg). Les spectres chimiques RMN ¹H, RMN ¹³C, HMBC et HSQC obtenus de l'analyse spectroscopique de ces composés sont illustrés en annexe 3.

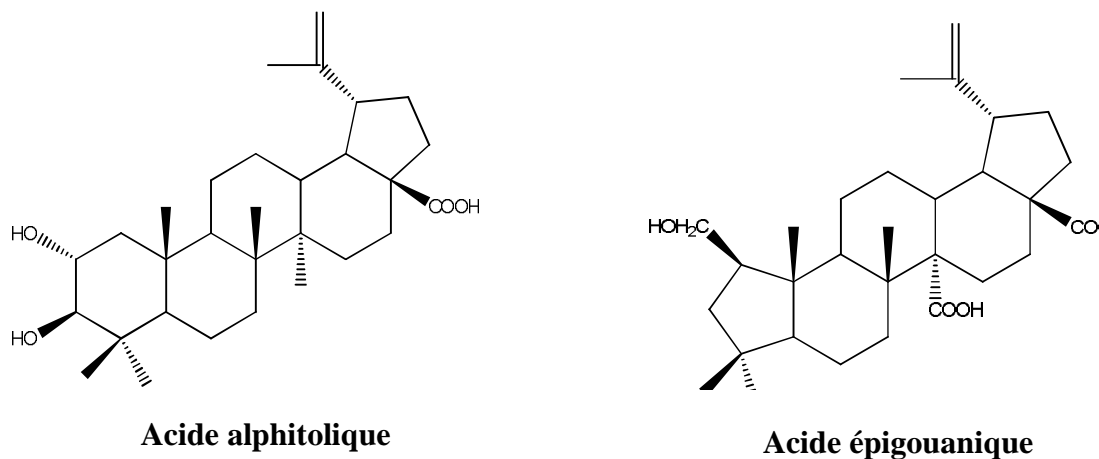


Figure 16 : Structures chimiques des composés isolés de l'extrait GLE.

III.1.5. Mode d'action de l'extrait GLE sur la cellule fongique

III.1.5.1. Mesure de l'affinité de l'extrait GLE pour l'ergostérol

Le tableau XI ci-dessous présente les résultats obtenus du test d'affinité de l'extrait GLE pour l'ergostérol. Il ressort que la CMI de l'extrait GLE sur *Candida albicans* ATCC 18804 a été de 128 µg/mL en absence d'ergostérol et de 256 µg/mL en présence des concentrations d'ergostérol de 200 et 400 µg/mL. La CMI de la Nystatine a quant à elle été de 32 µg/mL en absence d'ergostérol et de 64, 256 et 512 µg/mL en présence de concentrations respectives d'ergostérol de 100, 200 et 400 µg/mL.

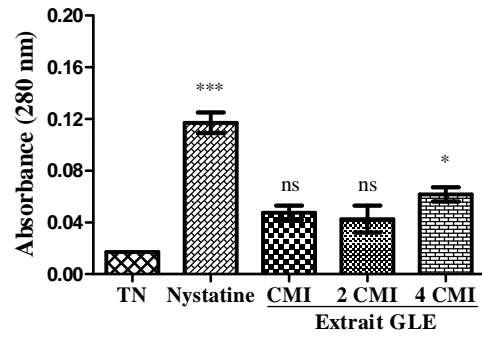
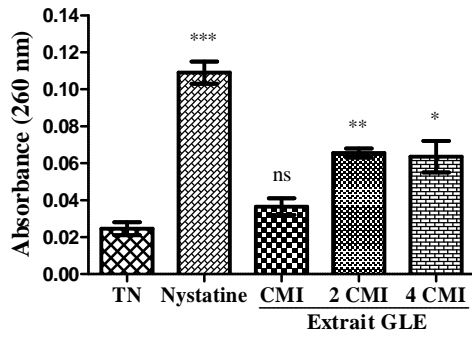
Tableau XI : Influence de l'ergostérol sur la CMI de l'extrait GLE

	Extrait GLE				Nystatine			
	Absence d'ergostérol	Présence d'ergostérol			Absence d'ergostérol	Présence d'ergostérol		
		100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL		100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL
CMI	128	128	256	256	32	64	256	512

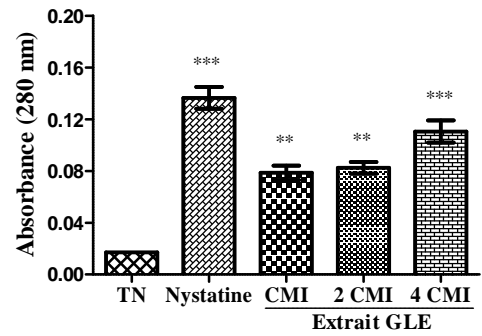
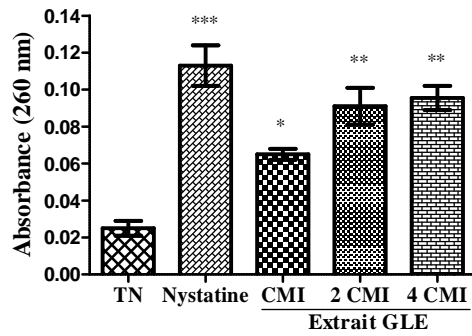
III.1.5.2. Effet de l'extrait GLE sur l'intégrité membranaire

Les résultats obtenus de l'évaluation de l'effet de l'extrait GLE sur l'intégrité de la membrane plasmique de *Candida albicans* ATCC 18804 sont illustrés par la figure 17 ci-après. Il ressort que dès la première heure d'exposition des cellules microbiennes à l'extrait GLE, un efflux significatif ($P < 0,05$; $P < 0,01$) d'acides nucléiques intracellulaires (260 nm) a été observé aux concentrations d'extrait de 2 CMI et 4 CMI. De même, un efflux significatif ($P < 0,01$) de protéines (280 nm) a été observé à une concentration d'extrait de 4 CMI. Après 4 h d'exposition des cellules de *Candida* à l'extrait GLE, l'efflux d'acides nucléiques et de protéines a été significatif ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$) à toutes les concentrations d'extrait GLE testées. Cet efflux de matériel intracellulaire s'est poursuivi jusqu'en fin de traitement (16 h). Pour ce qui est de la Nystatine (5 µg/mL), l'efflux d'acides nucléiques et de protéines intracellulaires a été significatif ($P < 0,001$) dès la première heure de traitement des cellules microbiennes.

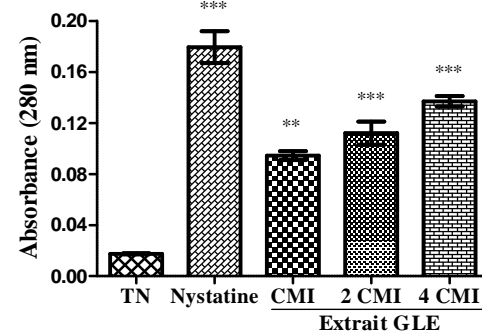
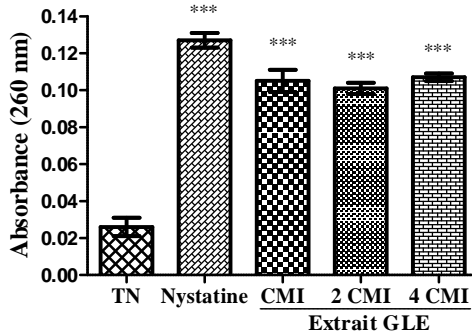
1 h



4 h



8 h



16 h

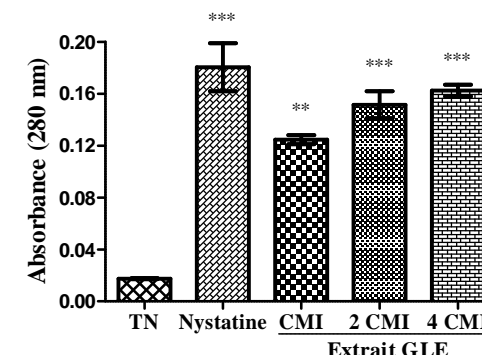
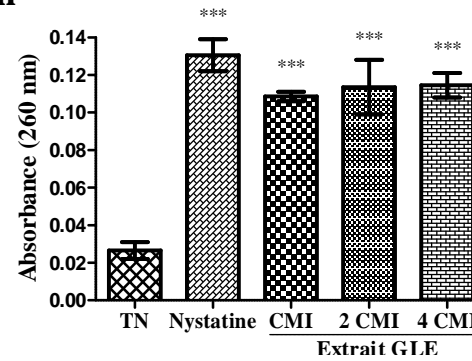


Figure 17 : Effet de l'extrait GLE sur la perméabilité de la membrane fongique. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM, $n = 3$. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$: différence significative au témoin négatif (TN) traité à l'eau physiologique. ns : différence non significative. Acides nucléiques (260 nm), Protéines (280 nm).

III.1.6. Effet de l'extrait GLE sur les biofilms de *Candida*

III.1.6.1. Effet sur la formation des biofilms

La figure 18 ci-après présente l'effet des concentrations sub-inhibitrices d'extrait GLE sur la formation de biofilms des souches testées. Il en ressort que, les indices spécifiques de formation de biofilms (ISFB) déterminés sont compris entre $0,009 \pm 0,001$ et $1,151 \pm 0,013$. Comparée au témoin de croissance, une réduction significative ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$) de la formation de biofilms a été observée chez *C. albicans* ATCC 18804, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *C. dubliniensis* ATCC 7289 et *C. guilliermondii* ATCC 6260 aux concentrations sub-inhibitrices d'extrait GLE de 10, 20, 40 et 80 % CMI. Elle a été également significative chez *C. glabrata* ATCC 90030 ($P < 0,001$) aux concentrations de 20, 40 et 80 % CMI ; et chez *C. parapsilosis* ATCC 22019 ($P < 0,001$) aux concentrations de 40 et 80 % CMI. *Candida krusei* ATCC 6258 a présenté l'ISFB le plus faible ($0,037 \pm 0,008$) à une concentration d'extrait GLE de 80 % CMI.

III.1.6.2. Effet sur l'activité métabolique des biofilms

La figure 19 ci-après présente l'effet des concentrations sub-inhibitrices d'extrait GLE sur l'activité métabolique des biofilms. Comparée à celle du témoin de croissance, l'activité métabolique des biofilms a été réduite chez toutes les souches de *Candida* avec des pourcentages de réduction compris entre 2,10 et 95,52 %. La réduction de l'activité métabolique des biofilms a été significative ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$) chez *C. dubliniensis* ATCC 7289 et *C. guilliermondii* ATCC 6260 à partir d'une concentration sub-inhibitrice de 5 % CMI. Elle a été significative chez *C. albicans* ATCC 18804, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. parapsilosis* ATCC 22019 et *C. krusei* ATCC 6258 à partir d'une concentration sub-inhibitrice de 10 % CMI, et chez *C. tropicalis* ATCC 13803 à partir d'une concentration sub-inhibitrice d'extrait GLE de 20 % CMI. La souche la plus sensible a été *C. dubliniensis* ATCC 7289 chez qui l'activité métabolique des biofilms a été réduite de 95,52 % à une concentration sub-inhibitrice d'extrait GLE de 80 % CMI.

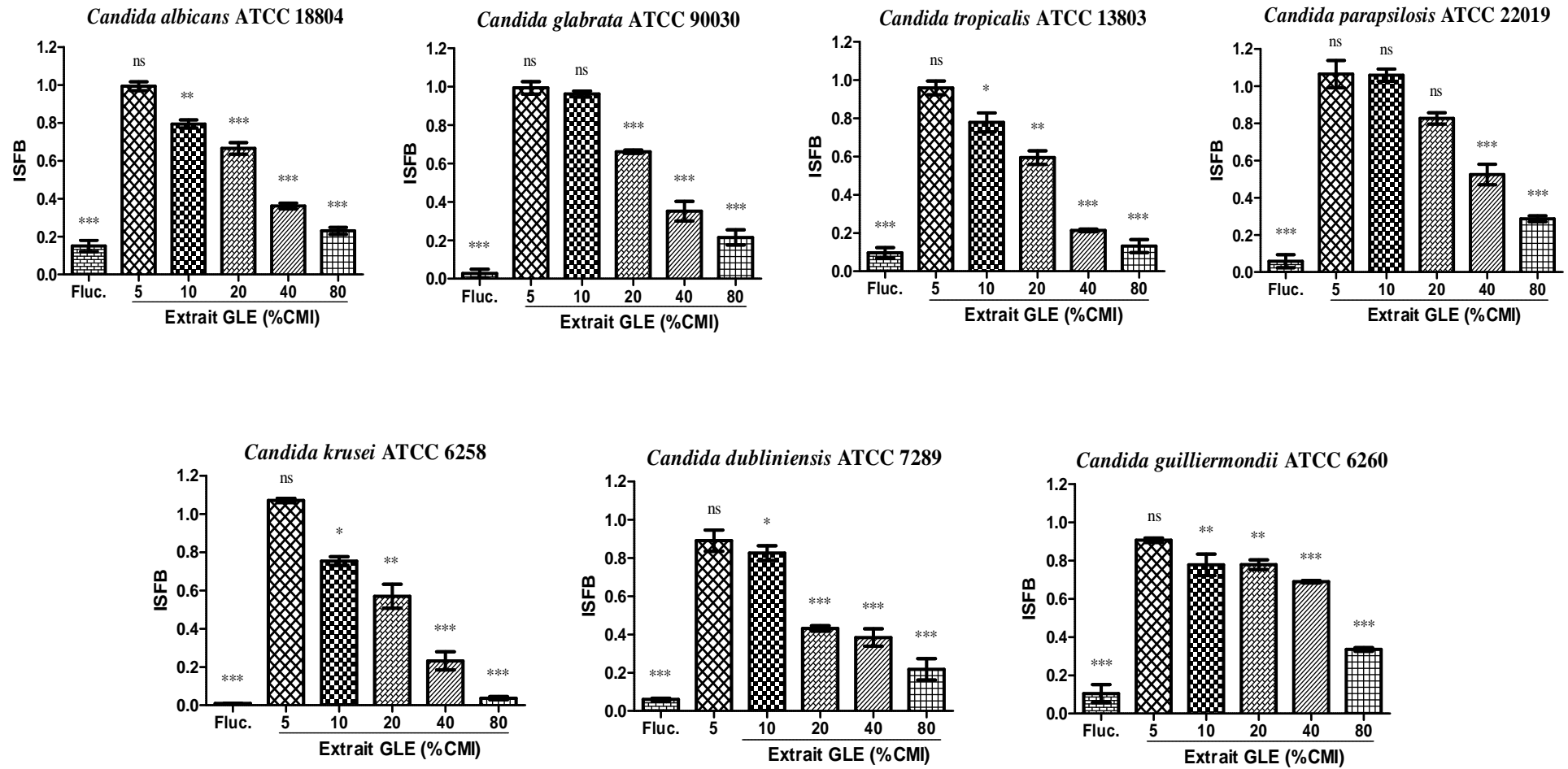


Figure 18 : Indices spécifiques de formation de biofilms (ISFB) aux concentrations sub-inhibitrices d'extrait GLE. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM, n = 3. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$: différence significative au témoin de croissance (ISFB= 1). ns : différence non significative. Fluc. : Fluconazole (5 mg/mL).

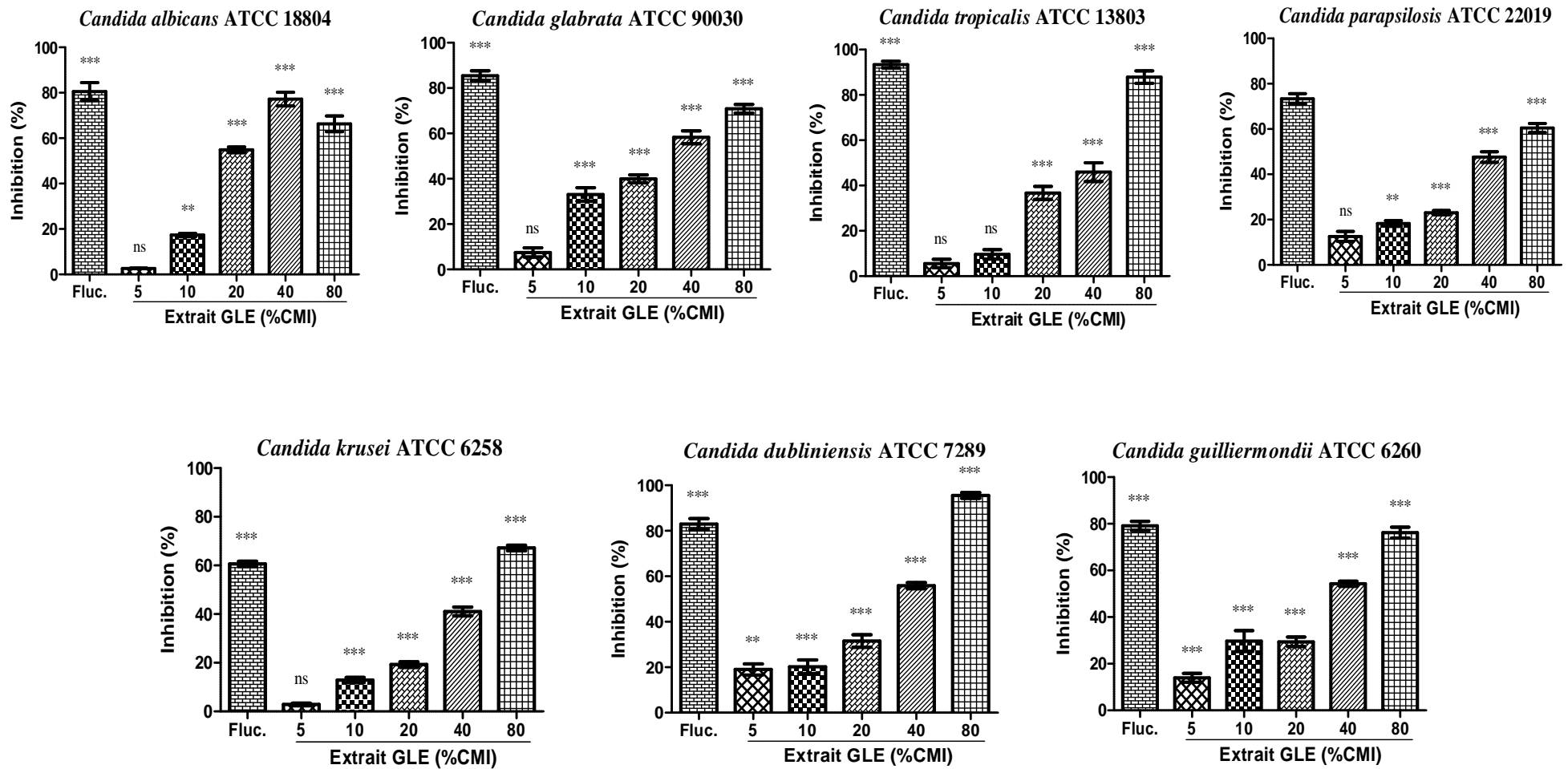


Figure 19 : Pourcentage d'inhibition de l'activité métabolique des biofilms aux concentrations sub-inhibitrices d'extrait GLE. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM, n = 3. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$: différence significative au témoin de croissance. ns : différence non significative. Fluc. : Fluconazole (5 mg/mL).

II.1.7. Essai de combinaison de l'extrait GLE aux antifongiques usuels

Les tableaux XII à XVIII ci-après ressortent les valeurs de CMI, FIC et FICI ainsi que le type d'interaction résultant de la combinaison de l'extrait GLE aux antifongiques.

Il en ressort que des interactions synergiques ont été obtenues sur :

- *Candida albicans* ATCC 18804, de la combinaison Itrac/GLE. Dans cette combinaison la CMI initiale de l'Itraconazole a été réduite de 75 % en présence d'extrait GLE passant de 32 µg/mL à 8 µg/mL ;
- *Candida glabrata* ATCC 90030, des combinaisons Nyst/GLE, Itrac/GLE et Kétoc/GLE. Dans ces combinaisons les CMI de la Nystatine, de l'Itraconazole et du Kétoconazole ont respectivement été réduites de 75, 50 et 93,75 % ;
- *Candida tropicalis* ATCC 13803, des combinaisons Fluc/GLE et Posac/GLE. Les CMI du Fluconazole et du Posaconazole ont respectivement été réduites de 75 et 87,50 % ;
- *Candida krusei* ATCC 6258, des combinaisons Posac/GLE et Kétoc/GLE. Les CMI du Posaconazole et du Kétoconazole ont été réduites de 93,75 % ;
- *Candida guilliermondii* ATCC 6260, de la combinaison Itrac/GLE. Dans cette combinaison la CMI de l'Itraconazole a été réduite de 50 %.

La combinaison Itrac/GLE a présenté le plus grand nombre d'interactions synergiques (tableau IXX).

Tableau XII : CMI sur *C. albicans* ATCC 18804 et interprétations des combinaisons

<i>Candida albicans</i> ATCC 18804						
Combinaisons	CMI individuelles (µg/mL)	CMI en combinaison (µg/mL)	FIC individuelles	FICI	Réduction de la CMI (%)	Interprétation
Fluc/GLE	32/128	8/64	0,25/0,50	0,75	75,00/50,00	Additivité
Nyst/GLE	16/128	8/128	0,50/1,00	1,50	50,00/0,00	Indifférence
Posac/GLE	128/128	128/128	1,00/1,00	2,00	0,00/0,00	Indifférence
Kétoc/GLE	8/128	4/32	0,50/0,25	0,75	50,00/75,00	Additivité
Itrac/GLE	64/128	16/16	0,25/0,12	0,37	75,00/87,50	Synergie

Fluc : Fluconazole ; Nyst : Nystatine ; Posac : Posaconazole ; Kétoc : Kétoconazole ; Itrac : Itraconazole ; GLE : Infusé aqueux des tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.)

Tableau XIII : CMI sur *C. glabrata* ATCC 90030 et interprétations des combinaisons

<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030						
Combinaisons	CMI individuelles (µg/mL)	CMI en combinaison (µg/mL)	FIC individuelles	FICI	Réduction de la CMI (%)	Interprétation
Fluc/GLE	16/512	8/256	0,50/0,50	1,00	50,00/50,00	Additivité
Nyst/GLE	16/512	4/64	0,25/0,12	0,37	75,00/87,50	Synergie
Posac/GLE	8/512	4/256	0,50/0,50	1,00	50,00/50,00	Additivité
Kéto/GLE	16/512	1/128	0,06/0,25	0,31	93,75/75,00	Synergie
Itrac/GLE	32/512	8/128	0,25/0,25	0,50	50,00/50,00	Synergie

Fluc : Fluconazole ; Nyst : Nystatine ; Posac : Posaconazole ; Kéto : Kétoconazole ; Itrac : Itraconazole ; GLE : Infusé aqueux des tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.)

Tableau XIV : CMI sur *C. tropicalis* ATCC 13803 et interprétations des combinaisons

<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803						
Combinaisons	CMI individuelles (µg/mL)	CMI en combinaison (µg/mL)	FIC individuelles	FICI	Réduction de la CMI (%)	Interprétation
Fluc/GLE	32/256	8/64	0,25/0,25	0,50	75,00/75,00	Synergie
Nyst/GLE	8/256	0,50/256	0,06/1,00	1,06	93,75/0,00	Indifférence
Posac/GLE	64/256	8/64	0,12/0,25	0,37	87,50/75,00	Synergie
Kéto/GLE	8/256	8/64	1,00/0,25	1,25	0,00/75,00	Indifférence
Itrac/GLE	8/256	4/64	0,50/0,25	1,75	50,00/75,00	Indifférence

Fluc : Fluconazole ; Nyst : Nystatine ; Posac : Posaconazole ; Kéto : Kétoconazole ; Itrac : Itraconazole ; GLE : Infusé aqueux des tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.)

Tableau XV : CMI sur *C. parapsilosis* ATCC 22019 et interprétations des combinaisons

<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019						
Combinaisons	CMI individuelles (µg/mL)	CMI en combinaison (µg/mL)	FIC individuelles	FICI	Réduction de la CMI (%)	Interprétation
Fluc/GLE	8/128	4/32	0,50/0,25	0,75	50,00/75,00	Additivité
Nyst/GLE	8/128	2/64	0,25/0,50	0,75	75,00/50,00	Additivité
Posac/GLE	4/128	4/32	1,00/0,25	1,25	0,00/75,00	Indifférence
Kéto/GLE	16/128	0,25/64	0,01/0,50	0,51	98,43/50,00	Additivité
Itrac/GLE	8/128	0,12/128	0,01/1,00	1,01	98,43/0,00	Indifférence

Fluc : Fluconazole ; Nyst : Nystatine ; Posac : Posaconazole ; Kéto : Kétoconazole ; Itrac : Itraconazole ; GLE : Infusé aqueux des tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.)

Tableau XVI : CMI sur *C. krusei* ATCC 6258 et interprétations des combinaisons

<i>Candida krusei</i> ATCC 6258						
Combinaisons	CMI individuelles (µg/mL)	CMI en combinaison (µg/mL)	FIC individuelles	FICI	Réduction de la CMI (%)	Interprétation
Fluc/GLE	32/128	1/64	0,03/0,50	0,53	96,87/50,00	Additivité
Nyst/GLE	64/128	32/128	0,50/1,00	1,50	50,00/0,00	Indifférence
Posac/GLE	8/128	0,50/32	0,06/0,25	0,31	93,75/75,00	Synergie
Kétoc/GLE	256/128	16/32	0,06/0,25	0,31	93,75/75,00	Synergie
Itrac/GLE	4/128	4/128	1,00/1,00	2,00	0,00/0,00	Indifférence

Fluc : Fluconazole ; Nyst : Nystatine ; Posac : Posaconazole ; Kétoc : Kétoconazole ; Itrac : Itraconazole ; GLE : Infusé aqueux des tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.)

Tableau XVII : CMI sur *C. dubliniensis* ATCC 7289 et interprétations des combinaisons

<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 7289						
Combinaisons	CMI individuelles (µg/mL)	CMI en combinaison (µg/mL)	FIC individuelles	FICI	Réduction de la CMI (%)	Interprétation
Fluc/GLE	32/128	32/32	1,00/0,25	1,25	0,00/75,00	Indifférence
Nyst/GLE	8/128	2/128	0,25/1,00	1,25	75,00/0,00	Indifférence
Posac/GLE	32/128	8/64	0,25/0,50	0,75	75,00/50,00	Additivité
Kétoc/GLE	4/128	4/32	1,00/0,25	1,25	0,00/75,00	Indifférence
Itrac/GLE	16/128	1/64	0,06/0,50	0,56	93,75/50,00	Additivité

Fluc : Fluconazole ; Nyst : Nystatine ; Posac : Posaconazole ; Kétoc : Kétoconazole ; Itrac : Itraconazole ; GLE : Infusé aqueux des tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.)

Tableau XVIII : CMI sur *C. guilliermondii* ATCC 6260 et interprétations des combinaisons

<i>Candida guilliermondii</i> ATCC 6260						
Combinaisons	CMI individuelles (µg/mL)	CMI en combinaison (µg/mL)	FIC individuelles	FICI	Réduction de la CMI (%)	Interprétation
Fluc/GLE	16/256	4/128	0,25/0,50	0,75	75,00/50,00	Additivité
Nyst/GLE	16/256	8/32	0,50/0,12	0,62	75,00/87,50	Additivité
Posac/GLE	4/256	1/128	0,25/0,50	0,75	75,00/50,00	Additivité
Kétoc/GLE	16/256	16/256	1,00/1,00	2,00	0,00/0,00	Indifférence
Itrac/GLE	128/256	32/64	0,25/0,25	0,50	50,00/50,00	Synergie

Fluc : Fluconazole ; Nyst : Nystatine ; Posac : Posaconazole ; Kétoc : Kétoconazole ; Itrac : Itraconazole ; GLE : Infusé aqueux des tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.)

Tableau IXX : Récapitulatif des interactions obtenues des combinaisons

Combinaisons	<i>Candida albicans</i> ATCC 18804		<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030		<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803		<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>Candida krusei</i> ATCC 6258		<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 7289		<i>Candida guilliermondii</i> ATCC 6260	
	FICI	Int	FICI	Int	FICI	Int	FICI	Int	FICI	Int	FICI	Int	FICI	Int
	Fluc/GLE	0,75	A	1,00	A	0,50	S	0,75	A	0,53	A	1,25	I	0,75
Nyst/GLE	1,50	I	0,37	S	1,06	A	0,75	A	1,50	I	1,25	I	0,62	A
Posac/GLE	2,00	I	1,00	A	0,37	S	1,25	I	0,31	S	0,75	A	0,75	A
Kétoc/GLE	0,75	A	0,31	S	1,25	I	0,51	A	0,31	S	1,25	I	2,00	I
Itrac/GLE	0,37	S	0,50	S	1,75	I	1,01	I	2,00	I	0,56	A	0,75	S

Fluc : Fluconazole ; Nyst : Nystatine ; Posac : Posaconazole ; Kétoc : Kétoconazole ; Itrac : Itraconazole ; GLE : Infusé aqueux des tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.) ; Int = Interaction ; I : Indifférence ; A : Additivité ; S : Synergie.

III.1.8. Evaluation *in vivo* de l'activité anti-*Candida* de l'extrait GLE

Les figures 20 et 21 ci-après présentent la variation de la charge fongique dans le sang et les reins des animaux traités aux doses d'extrait GLE. Il en ressort que :

- Vingt quatre heures (24 h) après infection (J0), la charge fongique a considérablement augmenté dans le sang et les reins des animaux et atteint des valeurs respectives de $3,78 \pm 0,84 \log_{10}$ UFC/mL et $2,30 \pm 0,37 \log_{10}$ UFC/g ;
- Après 2 jours (J2) de traitement, comparativement aux animaux témoins traités au NaCl 0,9 %, une réduction significative de la charge fongique dans le sang ($- 2,72 \log_{10}$ UFC/mL, $P < 0,001$) et les reins ($- 0,89 \log_{10}$ UFC/g, $P < 0,05$) a été observée chez les animaux traités à une dose d'extrait GLE de 400 mg/kg ;
- Après 3 jours (J3), une réduction significative de la charge fongique dans le sang ($- 1,56 \log_{10}$ UFC/mL, $P < 0,05$) et les reins ($- 1,31 \log_{10}$ UFC/g, $P < 0,05$) a été observée chez les animaux traités à une dose de 200 mg/kg ;
- Après 4 jours (J4), la charge fongique dans le sang a été réduite 99,99 % ($- 3,78 \log_{10}$ UFC/mL, $P < 0,001$) chez les animaux traités à une dose de 400 mg/kg ;
- Après 5 jours (J5), une réduction significative de la charge fongique dans les reins ($- 1,62 \log_{10}$ UFC/g, $P < 0,001$) a été observée chez les animaux traités à 100 mg/kg.

Pour ce qui est du Fluconazole (10 mg/kg), il a réduit de 99,99 % la charge fongique dans le sang ($- 3,78 \log_{10}$ UFC/mL, $P < 0,001$) et les reins ($- 2,30 \log_{10}$ UFC/g, $P < 0,001$) après 2 (J2) et 3 jours (J3) de traitement, respectivement.

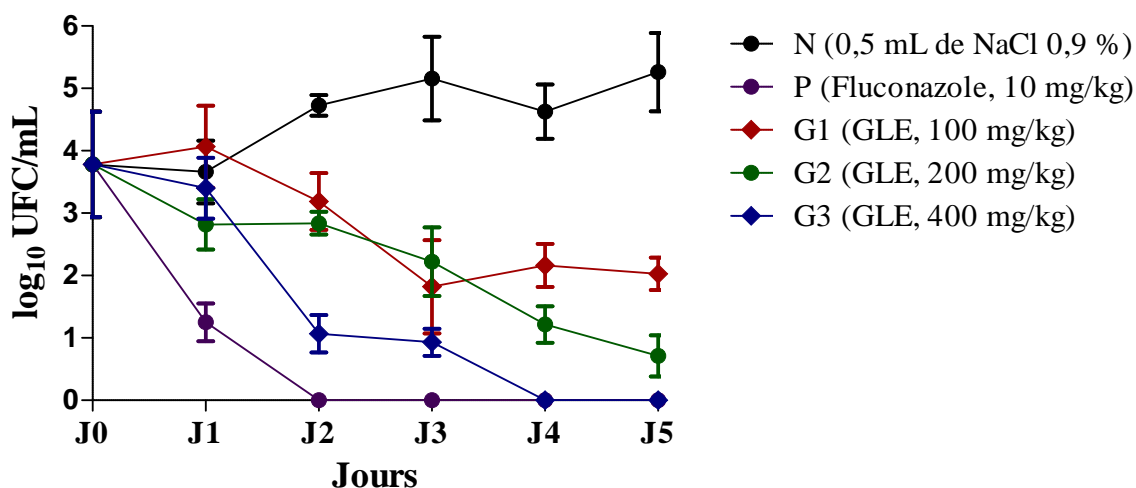


Figure 20 : Variation de la charge fongique dans le sang au cours du temps.

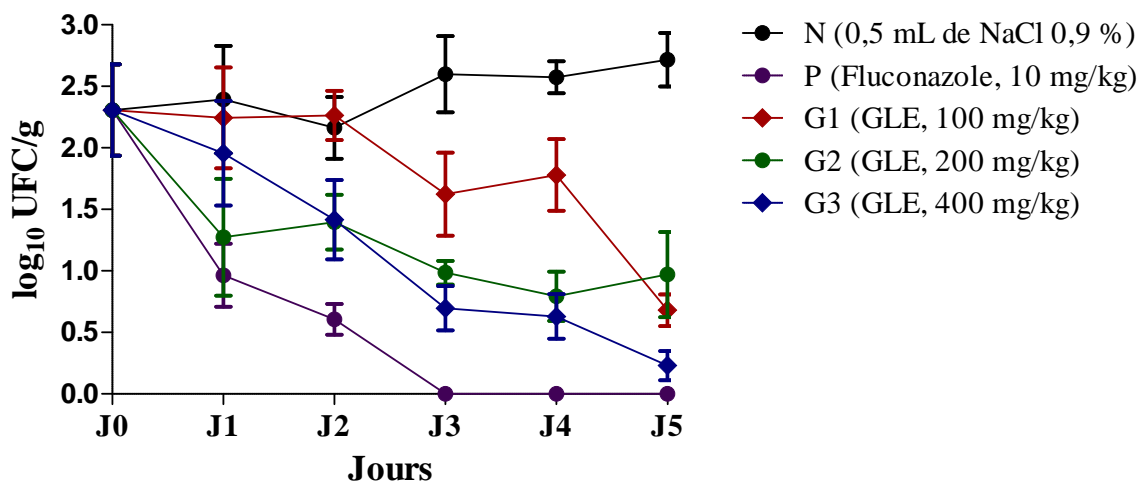


Figure 21 : Variation de la charge fongique dans le rein au cours du temps.

III.1.8.1. Effet de l'extrait GLE sur la variation des paramètres sériques

Le tableau XX ci-après présente la variation des paramètres sériques observés après 5 jours de traitement des animaux aux doses d'extrait GLE. Il en ressort que :

- A une dose 100 mg/kg, comparativement aux animaux traités au NaCl 0,9 %, l'extrait GLE a provoqué une augmentation significative d'érythrocytes ($P < 0,05$) et plaquettes ($P < 0,05$) ;
- A une dose de 200 mg/kg, une augmentation significative d'érythrocytes ($P < 0,05$), leucocytes ($P < 0,05$), lymphocytes ($P < 0,05$), neutrophiles ($P < 0,05$), plaquettes ($P < 0,05$) et anticorps ($P < 0,01$) a été observée ;

- A une dose de 400 mg/kg, une augmentation significative de leucocytes ($P < 0,05$), neutrophiles ($P < 0,01$), plaquettes ($P < 0,01$), ASAT ($P < 0,01$) et anticorps ($P < 0,05$) a été observée.

Pour ce qui est du Fluconazole (10 mg/kg), une augmentation significative ($P < 0,05$) d'éosinophiles, plaquettes et anticorps a été décelée.

Tableau XX : Paramètres sériques observés en fin de traitement

Paramètres sériques	Groupes				
	NaCl 0,9 % 0,5 mL	GLE 100 mg/kg	GLE 200 mg/kg	GLE 400 mg/kg	Fluconazole 10 mg/kg
Erythrocytes (x10 ³ /mm ³)	6,04 ± 0,82	7,91 ± 0,64*	8,28 ± 0,26*	6,60 ± 0,64 ^{ns}	6,44 ± 0,41 ^{ns}
Leucocytes (x10 ³ /mm ³)	10,73 ± 1,21	11,66 ± 3,59 ^{ns}	16,87 ± 0,90*	16,39 ± 0,57*	12,67 ± 1,28 ^{ns}
Lymphocytes (x10 ³ /mm ³)	3,37 ± 0,58	3,08 ± 0,07 ^{ns}	5,24 ± 1,23 ^{ns}	6,73 ± 1,86*	5,78 ± 0,51 ^{ns}
Neutrophiles (x10 ³ /mm ³)	4,30 ± 0,89	6,54 ± 0,39 ^{ns}	6,91 ± 0,13*	8,05 ± 0,72**	5,37 ± 1,28 ^{ns}
Eosinophiles (x10 ³ /mm ³)	0,16 ± 0,04	0,27 ± 0,02 ^{ns}	0,25 ± 0,06 ^{ns}	0,28 ± 0,01 ^{ns}	0,29 ± 0,04*
Monocytes (x10 ³ /mm ³)	1,08 ± 0,17	1,26 ± 0,11 ^{ns}	0,93 ± 0,09 ^{ns}	1,12 ± 0,08 ^{ns}	0,98 ± 0,05 ^{ns}
Basophiles (x10 ³ /mm ³)	0,013 ± 0,004	0,017 ± 0,005 ^{ns}	0,023 ± 0,004 ^{ns}	0,022 ± 0,000 ^{ns}	0,021 ± 0,004 ^{ns}
Plaquettes (x10 ³ /mm ³)	488,39 ± 20,03	709,84 ± 50,05*	738,63 ± 79,05*	830,97 ± 96,13**	753,64 ± 95,90*
ALAT (UI/L)	65,84 ± 1,52	68,64 ± 3,07 ^{ns}	67,17 ± 1,96 ^{ns}	68,99 ± 4,90 ^{ns}	61,74 ± 2,23 ^{ns}
ASAT (UI/L)	32,96 ± 2,43	33,42 ± 2,23 ^{ns}	38,21 ± 1,82 ^{ns}	42,08 ± 2,99**	34,06 ± 0,85 ^{ns}
Urée (mg/mL)	154,07 ± 5,04	152,39 ± 7,47 ^{ns}	155,48 ± 2,51 ^{ns}	152,82 ± 1,25 ^{ns}	153,75 ± 3,10 ^{ns}
Créatinine (mg/dL)	9,44 ± 0,37	10,08 ± 2,64 ^{ns}	13,89 ± 0,60 ^{ns}	18,34 ± 2,15 ^{ns}	9,93 ± 1,16 ^{ns}
Titre d'anticorps	3,33 ± 0,94	10,66 ± 3,77 ^{ns}	20,00 ± 6,92**	16,00 ± 0,00*	14,00 ± 3,46*

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM, n = 3. **P* < 0,05 ; ***P* < 0,01 : différence significative par rapport aux animaux traités au NaCl 0,9 %.
ns : différence non significative.

III.1.8.2. Effet de l'extrait GLE sur la masse corporelle et d'organes

Les masses corporelles et masses relatives d'organes enregistrées le dernier jour de traitement des animaux sont mentionnées dans le tableau XXI ci-dessous. Il ressort qu'après 5 jours de traitement, une réduction significative ($P < 0,05$) de masse corporelle a été observée chez les animaux infectés et traités au NaCl 0,9 %. De même, comparativement aux animaux traités au NaCl 0,9 %, une réduction significative de masse rénale a été observée chez les animaux traités au Fluconazole (10 mg/kg). Aucune variation significative de masse corporelle et de masse d'organes n'a été observée chez les animaux traités aux doses d'extrait GLE.

Tableau XXI : Masse corporelle des animaux et masse relative des organes

Groupes	Poids corporel moyen (g)		Poids relatifs des organes (g/100g MC)			
	Initial	Final	Foie	Thymus	Rate	Rein
NaCl 0,9 % 0,5 mL	128,63 ± 2,91	119,24 ± 3,93*	1,53 ± 0,33	0,27 ± 0,04	0,42 ± 0,04	1,39 ± 0,13
GLE 100 mg/kg	130,66 ± 3,34	127,58 ± 5,05 ^{ns}	1,80 ± 0,29 ^{ns}	0,18 ± 0,20 ^{ns}	0,30 ± 0,05 ^{ns}	1,29 ± 0,15 ^{ns}
GLE 200 mg/kg	127,33 ± 6,59	128,16 ± 8,36 ^{ns}	1,96 ± 0,12 ^{ns}	0,26 ± 0,03 ^{ns}	0,39 ± 0,01 ^{ns}	1,38 ± 0,11 ^{ns}
GLE 400 mg/kg	129,48 ± 3,74	130,82 ± 5,52 ^{ns}	1,92 ± 0,22 ^{ns}	0,24 ± 0,03 ^{ns}	0,45 ± 0,06 ^{ns}	1,13 ± 0,04 ^{ns}
Fluconazole 10 mg/kg	127,07 ± 5,43	131,47 ± 4,61 ^{ns}	2,21 ± 0,42 ^{ns}	0,29 ± 0,01 ^{ns}	0,44 ± 0,08 ^{ns}	1,01 ± 0,05*

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM, n = 3. * $P < 0,05$; différence significative. ns : différence non significative. MC : Masse corporelle.

III.1.8.3. Taux de mortalité

Le tableau XXII ci-dessous ressort le taux de mortalité observé au cours du traitement. Une mortalité de 11,11 % (2/18 rats) a été enregistrée 24 h après infection chez animaux traités à une dose d'extrait GLE de 100 mg/kg. Cette mortalité reste toutefois inférieure ($p < 0,05$) à celle des animaux infectés et traités au NaCl 0,9 % chez qui un taux de décès de 27,77 % (5/18 rats) a été constaté dans les 72 h suivant l'infection.

Tableau XXII : Taux de mortalité des animaux lors du traitement

Groupes	Nombre d'animaux décédés	Pourcentage de mortalité
NaCl 0,9 % 0,5 mL	5/18	27,77 %
GLE 100 mg/kg	2/18	11,11 %
GLE 200 mg/kg	0/18	0 %
GLE 400 mg/kg	0/18	0 %
Fluconazole 10 mg/kg	0/18	0 %

III.1.9. Effet de l'extrait GLE sur la stimulation de la phagocytose

III.1.9.1. Activité phagocytaire des polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs)

Les diagrammes ci-après (figure 22) illustrent les résultats obtenus de l'évaluation de l'activité de l'extrait GLE et des triterpènes isolés sur l'activité phagocytaire des polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs). Il ressort de ces diagrammes qu'une stimulation de l'activité phagocytaire des PMNs a été observée de l'extrait GLE et de l'acide alphitologique avec des pourcentages de stimulation compris entre 4,25 et 42,55 % pour l'extrait GLE, et entre 14,89 et 46,80 % pour l'acide alphitologique. L'acide épigouanique a quant à lui stimulé l'activité phagocytaire des PMNs à des concentrations comprises entre 5 µg/mL (25,40 %) et 80 µg/mL (25,53 %).

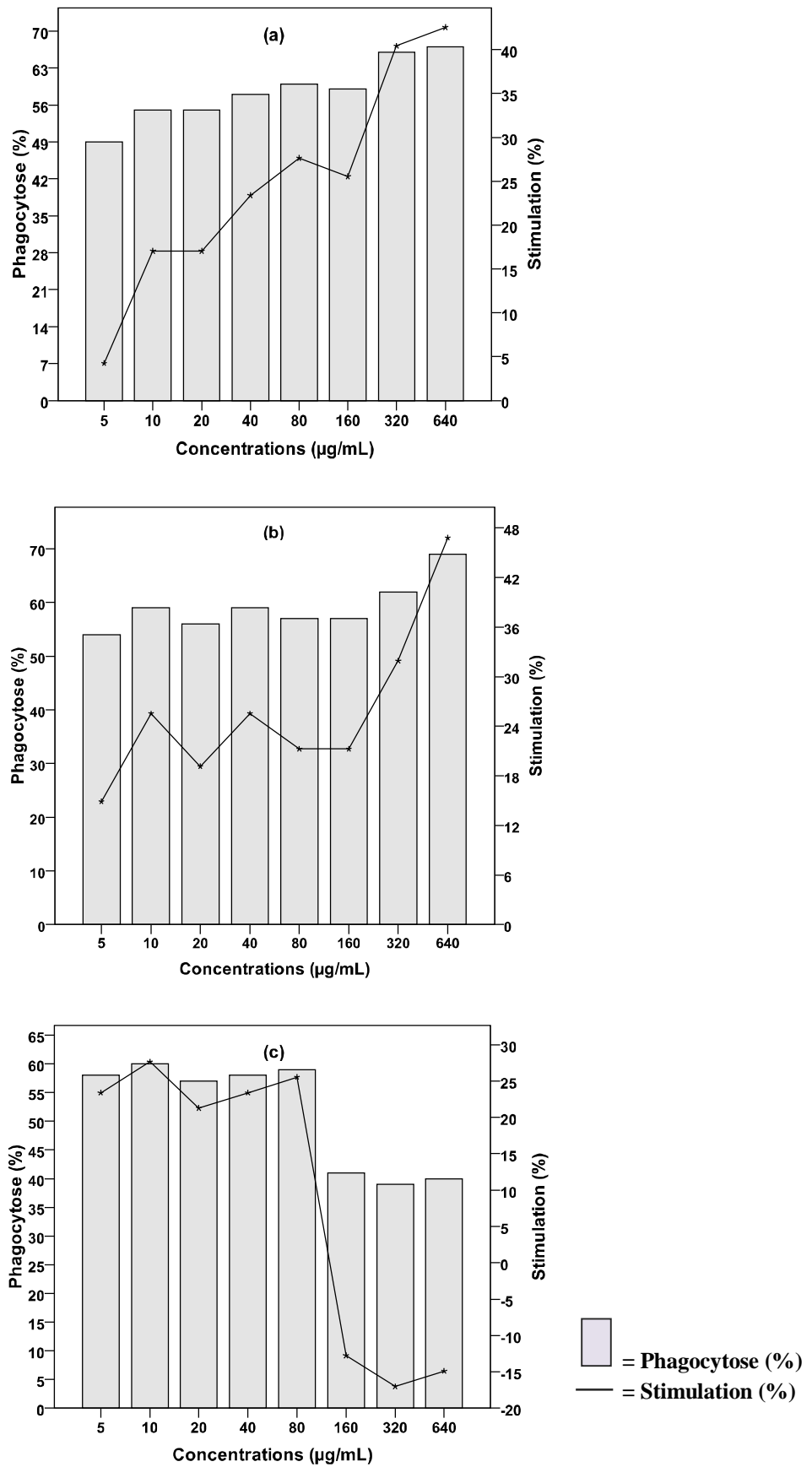


Figure 22 : Effet de l'extrait GLE (a), de l'acide aliphatique (b) et de l'acide épigallocatechin gallate (c) sur la modulation de l'activité phagocytaire des polymorphonucléaires neutrophiles.

III.1.9.2. Stimulation de l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial

Les figures 23, 24 et 25 ci-après présentent les résultats obtenus de l'évaluation de l'effet de l'extrait GLE sur l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial du rat. Il ressort de la figure 23 que les indices phagocytaires (K) déterminés sont compris entre $0,020 \pm 0,004$ et $0,074 \pm 0,006$. Comparé aux animaux témoins traités au NaCl 0,9 %, l'indice phagocytaire a significativement augmenté chez les animaux traités aux doses d'extrait GLE de 50 mg/kg ($P < 0,01$), 100 mg/kg ($P < 0,001$) et 200 mg/kg ($P < 0,001$). La figure 24 montre qu'une réduction significative du temps de demi-vie ($t_{1/2}$) du carbone dans le sang a en outre été observée chez les animaux traités aux doses de 50 mg/kg ($P < 0,01$), 100 mg/kg ($P < 0,001$) et 200 mg/kg ($P < 0,001$). De la figure 25, il ressort que le taux de glutathion réduit hépatique (GSH) est compris entre $0,730 \pm 0,107$ et $2,100 \pm 0,311$ mmol/g de foie. Une réduction significative ($p < 0,001$) de glutathion réduit hépatique a été observée chez les animaux traités aux doses d'extrait GLE de 100 mg/kg ($P < 0,001$) et 200 mg/kg ($P < 0,001$).

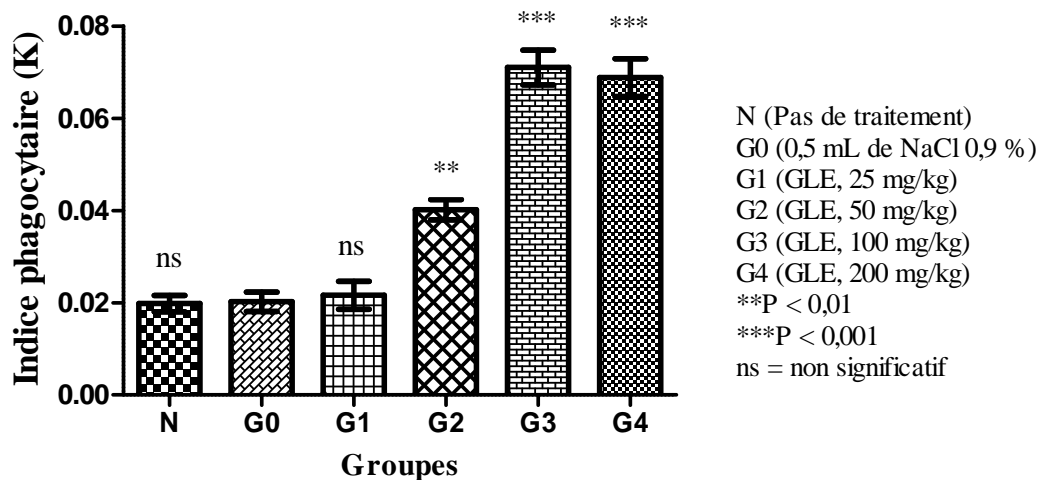


Figure 23 : Effet de l'extrait GLE sur l'indice phagocytaire (K).

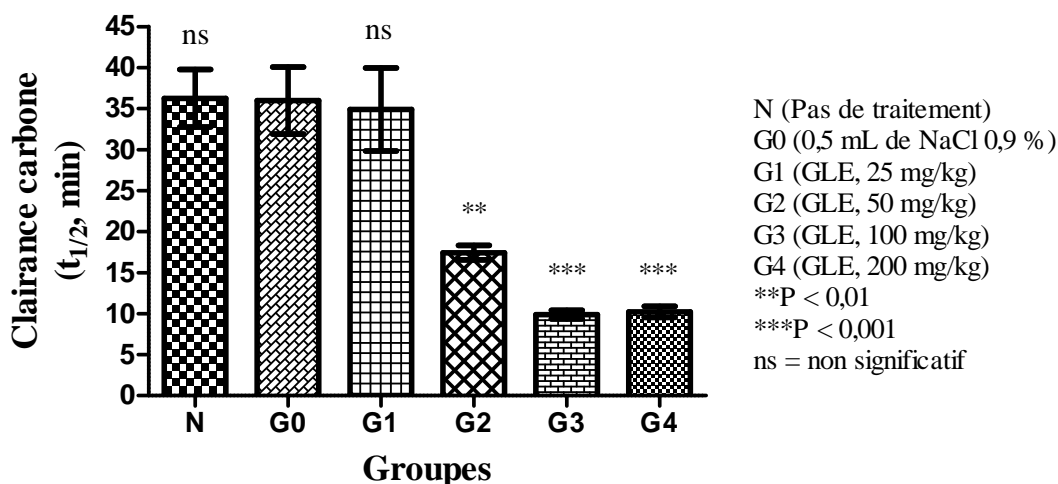


Figure 24 : Effet de l'extrait GLE sur la clairance carbone (t_{1/2}, min).

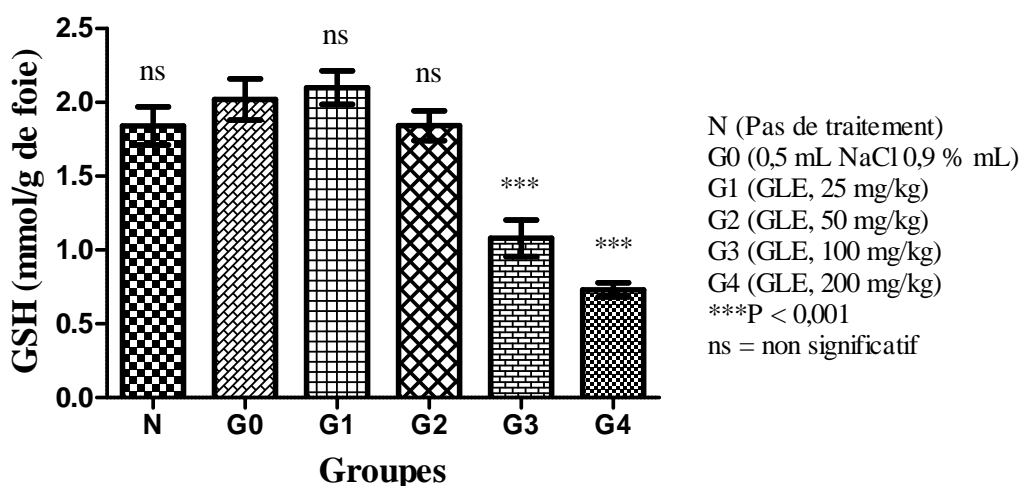


Figure 25 : Effet de l'extrait GLE sur le glutathion réduit hépatique (GSH).

III.1.10. Evaluation de l'innocuité de l'extrait GLE

Les résultats obtenus de l'évaluation de l'innocuité de l'extrait GLE sont illustrés par la figure 26 ci-après. Il en ressort que le taux d'hémolyse est compris entre 0,60 et 2,67 %. Comparée au témoin (PBS + Sang), une hémolyse non significative a été observée pour des concentrations d'extrait GLE inférieures à 4096 µg/mL. Le Triton X-100 1% utilisé comme témoin positif a provoqué une hémolyse de 100 %. La concentration cytotoxique 50 (CC₅₀) déterminée est de 56000 µg/mL. L'indice de sélectivité (IS) de l'extrait GLE pour les souches *Candida* testées est quant à lui compris entre 109,37 et 437,50 (tableau XXIII).

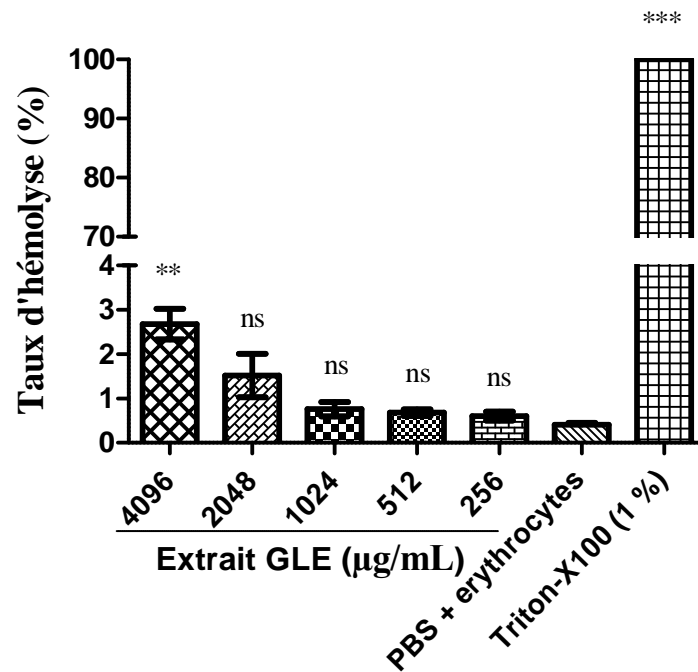


Figure 26 : Activité hémolytique de l'extrait GLE sur les érythrocytes de mouton. Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM, n = 3. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$: différence significative. ns : différence non significative.

Tableau XXIII : Concentration cytotoxique 50 et indices de sélectivité de l'extrait GLE sur les souches testées

CC ₅₀ de l'extrait GLE sur les érythrocytes (µg/mL)	Souches microbiennes	IS
56000	<i>C. albicans</i> ATCC 18804	437,50
	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	109,37
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	218,75
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	437,50
	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	437,50
	<i>C. dubliniensis</i> ATCC 7289	437,50
	<i>C. guilliermondii</i> ATCC 6260	218,75

CC₅₀ : concentration cytotoxique 50 ; IS : indices de sélectivité

III.2. Discussion

La résistance aux antifongiques est devenue un réel problème de santé publique et constitue de nos jours l'une des principales causes de mortalité en milieu hospitalier (Neeta et Uttamkumar, 2011). Ceci suscite l'intérêt de rechercher des thérapies alternatives aux médicaments actuels. Dans ce travail, un screening préliminaire de l'activité anti-*Candida* a été réalisé sur les extraits aqueux et hydro-éthanoliques de treize (13) plantes médicinales. Ces extraits ont inhibé la croissance des souches de *Candida* avec des activités antifongiques allant de faibles ($CMI > 500 \mu\text{g/mL}$) à modérées ($100 < CMI \leq 500 \mu\text{g/mL}$). La différence d'activité antifongique observée a été attribuée non seulement à la concentration des extraits végétaux en principes actifs mais aussi à la variabilité génétique des souches microbiennes testées (Takeo et al., 2004). L'infusé aqueux des tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.) « Extrait GLE » a été sélectionné comme extrait le plus actif des souches de *Candida* testées. Son activité antifongique a été attribuée à la présence de métabolites secondaires tels que les phénols, flavonoïdes, tannins, stérols, triterpènes, alcaloïdes et saponines. Ces résultats corroborent ceux de Ekuadzi et al. (2012) qui ont également détecté la présence de ces métabolites dans l'extrait hydro-éthanolique de tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.).

Suite au fractionnement bioguidé de l'extrait GLE sur gel de silice, deux composés bioactifs ont été isolés à savoir l'acide alphaltolique et l'acide épigouanique. L'activité antimicrobienne de l'acide alphaltolique a été confirmée dans la littérature par plusieurs auteurs. C'est le cas de Braca et al. (2015) qui l'ont isolé de *Licania heteromorpha* et démontré son activité sur les isolats cliniques de *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*. De même, Wolfgang et al. (2009) l'ont isolé de *Zizyphus joazeiro* et démontré son activité sur les bactéries Gram positif. De par leur activité anti-*Candida*, l'acide alphaltolique et l'acide épigouanique pourraient être mis à profit dans le développement de nouvelles thérapies contre les candidoses. Dans la suite du travail, une étude approfondie de l'activité anti-*Candida* de l'extrait GLE a été réalisée.

Tout d'abord, le mode d'action de l'extrait sur la membrane fongique a été recherché. Il en est ressorti, l'extrait GLE possède une affinité pour l'ergostérol. Un efflux d'acides nucléiques et de protéines intracellulaires a en outre été observé suite à l'exposition des cellules de *Candida* à l'extrait. Ceci suggère que l'extrait GLE se lierait à l'ergostérol avec pour conséquence une déstabilisation de la membrane plasmique

fongique. En effet, l'ergostérol est le constituant lipidique majoritaire de la membrane plasmique des *Candida*. La liaison des antifongiques à l'ergostérol entraîne une ouverture de pores membranaires à l'origine d'une fuite du matériel intracellulaire ou d'une rupture de la membrane plasmique (**Bentz et Six, 2009**). Ces résultats corroborent ceux de **Sandrock et Vanetten (2008)** qui ont démontré que les alcaloïdes d'origine végétale tels que la tomatidine peuvent se complexer à l'ergostérol et modifier la perméabilité de la membrane plasmique des *Candida*.

Dans un second temps, l'effet de l'extrait GLE sur les biofilms a été évalué. Comparativement aux témoins non traités, l'extrait a significativement ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$) réduit la formation et l'activité métabolique des biofilms de *Candida*. Cette activité anti-biofilm de l'extrait GLE a été attribuée aux métabolites secondaires. En effet, il a été démontré que les métabolites secondaires tels que les flavonoïdes et terpènes peuvent inhiber entre autres l'adhésion des *Candida* aux tissus, la division des cellules microbiennes à l'intérieur des biofilms, la synthèse d'exopolysaccharides et la capacité des *Candida* à produire les filaments (**Santiago et al., 2015**). Les biofilms constituent le principal mode de virulence et de résistance des *Candida* aux antifongiques (**Kociolek, 2010**). De nos jours, il existe très peu de médicaments ayant pour cible les biofilms de *Candida* (**Kociolek, 2010**). De par ces résultats, l'extrait GLE pourrait servir comme source potentielle de médicament anti-biofilms.

L'effet de l'extrait GLE a ensuite été évalué sur l'activité des antifongiques. Par des interactions synergiques, l'extrait GLE a potentialisé l'activité de ces antifongiques en réduisant leur CMI sur les souches de *Candida* testées. C'est le cas par exemple de l'Itraconazole dont la CMI sur *Candida krusei* ATCC 6258 a été réduite de 93,75 % en présence d'extrait GLE. A notre connaissance, il n'existe aucune publication portant sur la combinaison des extraits de *Gouania longipetala* (Hemsl.) aux antifongiques. Toutefois, d'autres auteurs ont montré l'effet bénéfique de la combinaison d'extraits de plantes aux antifongiques. C'est le cas de **Salih (2016)** qui a démontré que la combinaison d'extrait aqueux d'ail au Fluconazole potentialisait son effet fongicide sur *Candida albicans*. De même, **Giordani et al. (2005)** ont démontré que l'association d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* à l'Amphotéricine B était plus efficace dans le traitement des candidoses invasives. La combinaison d'extraits de plantes aux antifongiques lors de la prise en charge des patients atteints de candidose peut non seulement accélérer

l'élimination de l'agent infectieux mais aussi réduire la dose curative l'antifongique et empêcher l'émergence de résistance (**Machado et al., 2008**). L'étude approfondie de l'activité anti-*Candida* de l'extrait GLE s'est achevée par l'évaluation *in vivo* de son activité anti-*Candida*.

L'effet de l'extrait GLE a été évalué sur la candidémie induite chez des rats immunodéprimés. Une réduction significative ($P < 0,05$; $P < 0,001$) de la charge fongique sanguine et rénale a été observée chez les animaux traités aux doses d'extrait GLE. L'activité antifongique *in vivo* de l'extrait GLE a été attribuée non seulement à sa capacité à inhiber directement l'agent pathogène mais aussi à son action sur le système immunitaire. En effet, l'administration de l'extrait GLE aux animaux a entraîné une augmentation significative ($P < 0,05$; $P < 0,01$) de leucocytes, lymphocytes, neutrophiles et anticorps. Ces derniers peuvent éliminer les pathogènes dans l'organisme par plusieurs mécanismes. Les neutrophiles par exemple sont connus pour leur capacité à phagocyter les cellules de *Candida* en circulation dans le sang (**Chiani et al., 2009**). Aucune variation significative de masse corporelle, de masse d'organes, du taux d'ALAT, d'urée et de créatinine n'a été notée au cours du traitement. Ceci suggère une absence d'effet toxique de l'extrait GLE. L'augmentation significative du taux d'ASAT chez les animaux traités à une dose d'extrait GLE de 400 mg/kg a été attribuée à une atteinte musculaire (**Azza et al., 2012**). La mortalité observée au cours du traitement a quant à elle été attribuée à l'état d'immunodéficiência des animaux à l'origine de l'augmentation de la sévérité de la maladie. Dans la suite du travail, l'effet de l'extrait GLE sur l'activité des cellules du système immunitaire a été évalué.

Premièrement, l'effet de l'extrait GLE et des triterpènes isolés sur l'activité phagocytaire des polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) a été évalué. D'après les résultats, une stimulation de l'activité phagocytaire des PMNs a été observée de l'extrait GLE et de l'acide aliphitique. L'activité de l'extrait GLE sur les PMNs a été attribuée aux métabolites secondaires. En effet, il a été démontré que des métabolites végétaux tels que l'isopteropodine peuvent stimuler la prolifération et l'activité phagocytaire des neutrophiles (**Kawakita et al., 2014**). Cependant, le mécanisme biochimique par lequel ces substances stimulent l'activité phagocytaire des cellules immunitaires reste mal connu. Toutefois, les auteurs tels que **Song et al. (2014)** ont démontré que la liaison des

fructo-oligosaccharides végétaux aux récepteurs PRRs (Pattern Recognition Receptors) des cellules phagocytaires facilitait la reconnaissance des pathogènes par ces dernières.

L'effet de l'extrait GLE a dans un second temps été évalué sur l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial du rat. Une augmentation de l'indice phagocytaire du système réticulo-endothélial a été observée suite au traitement des animaux aux doses d'extrait GLE. Le système réticulo-endothélial regroupe en effet l'ensemble des cellules phagocytaires de l'organisme (**Yona et Gordon, 2015**). Ce sont entre autres les macrophages, neutrophiles, etc. Une augmentation de l'indice phagocytaire suggère que l'extrait active ces dernières (**Rastogi et al., 2008**). En outre, le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) du carbone dans le sang a été significativement réduit chez les animaux traités. Ceci confirme l'action de l'extrait GLE sur les cellules phagocytaires. Une réduction significative de la teneur en glutathion hépatique a été observée chez les animaux traités. Ceci suggère que l'extrait GLE provoque la libération du glutathion hépatique chez l'animal. Le glutathion joue un rôle dans l'activation et la protection des cellules phagocytaires telles que les neutrophiles et macrophages (**Kehili et al., 2014**). L'activité *in vivo* de l'extrait GLE a été attribuée aux métabolites secondaires.

Pour achever ce travail, l'innocuité de l'extrait GLE a été évaluée sur les érythrocytes de mouton. Une cytolyse non significative a été observée pour des concentrations d'extrait GLE inférieures à 4096 µg/mL. D'après les IS déterminés, la CC_{50} de l'extrait GLE a été 109,37 à 437,50 fois supérieure à sa CMI sur les souches de *Candida* testées. Ceci suggère que l'extrait possède une sélectivité élevée ces souches et pourrait les inhiber *in vivo* sans causer de dommage tissulaire chez l'hôte (**Mohammedi et Atik, 2014**). En effet, lorsque la CC_{50} d'un médicament est plus de 10 fois supérieure à sa CMI, ce dernier est théoriquement considéré comme non toxique (**Quispe et al., 2006**). Ces résultats sont en accord de ceux obtenus par **Ezeja et al. (2014)** qui ont démontré que l'extrait au méthanol des feuilles de *Gouania longipetala* (Hemsl.) ne provoquait pas de toxicité aigüe et subchronique chez le rat.

A notre connaissance, les extraits de *Gouania longipetala* (Hemsl.) n'ont fait l'objet d'aucune étude antérieure portant sur leur activité antifongique. Ces résultats corroborent l'utilisation de cette plante contre les infections fongiques en médecine traditionnelle. L'infusé aqueux des tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.) pourrait être mis à profit dans la thérapie contre les candidoses

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

L'objectif général de ce travail était de contribuer à la lutte contre les infections fongiques dues aux levures du genre *Candida* par la valorisation d'un extrait de plante pouvant être exploité dans l'élaboration des thérapies alternatives. Il en ressort que :

- L'infusé aqueux des tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.) a inhibé la formation et le métabolisme des biofilms, potentialisé l'activité anti-*Candida* des antifongiques et agit sur la candidémie induite chez le rat en réduisant significativement la charge fongique dans le sang et les reins des animaux infectés. Sur la cellule fongique, l'extrait GLE se liait à l'ergostérol entraînant la dégénérescence de la membrane plasmique et l'efflux de matériel intracellulaire. L'activité anti-*Candida* de l'extrait GLE a été attribuée à la présence de métabolites secondaires et deux composés bioactifs ont été isolés à savoir l'acide alphaltolique et l'acide épigouanique ;
- L'infusé aqueux des tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.) et les triterpènes isolés ont stimulé l'activité phagocytaire des polynucléaires neutrophiles. Cet extrait a en également stimulé *in vivo* l'activité phagocytaire des cellules du système réticuloendothélial chez le rat ;
- L'infusé aqueux des tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.) possède une sélectivité élevée pour les souches de *Candida* testées et pourrait éliminer le pathogène chez l'hôte sans être toxique.

De tout ce qui précède, l'infusé aqueux des tiges de *Gouania longipetala* (Hemsl.) pourrait servir comme source de thérapies alternatives contre les candidoses ou encore être utilisé en complément aux antifongiques actuels.

Perspectives

Il serait souhaitable de poursuivre ces travaux et nous envisageons dans un proche avenir de :

- Étendre l'étude de l'activité immunostimulatrice de l'extrait et des triterpènes isolés ;
- Réaliser des tests pharmacocinétique et pharmacodynamique sur l'extrait ;
- Formuler un médicament traditionnel amélioré pour lutter contre les candidoses.

REFERENCES

- Abimbola S., Eboji O., Fageyinbo M., Olowokudejo A. et Mutiata I. *Musanga cecropioides* leaf extract exhibits anti-inflammatory activity in animal models. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015; 25(5): 506-12
- Achkar J. et Fries B. *Candida* Infections of the Genitourinary Tract. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010; 23(2): 253-73
- Adamczyk E. Les antifongiques en médecine vétérinaire. *Thèse de Doctorat en Médecine Vétérinaire, Université Claude-Bernard, France*. 2011; 54
- Adebayo T., Adegoke A. et Ajibesin K. Rationalizing some medicinal plants used in treatment of skin diseases. *African Journal of Microbiology*. 2010; 4(10): 958-63
- Adejuwon A. Protective Activity of the Stem Bark Aqueous Extract of *Musanga Cecropioides* in Carbon Tetrachloride- and Acetaminophen-induced Acute Hepatotoxicity in Rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2009; 6(2): 131-8
- Adeniyi B., Groves M. et Gangadharam P. *In-vitro* anti-mycobacterial activities of three species of Cola plant extracts. *Phytotherapy Research*. 2004; 18(5): 414-8
- Aichour R. Effets immunomodulateurs sur les lymphocytes humains et hépatoprotecteur des extraits de *Capparis spinosa*. *Thèse de Doctorat en Sciences, Université Ferhat Abbas Sétif 1, Maroc*. 2017; 45
- Ajeigbe K., Onifade A., Omotosho D., Enitan S. et Olaleye S. Anti ulcerogenic Activity of *Aspilia africana* Leaf Extract: Roles of Gastric Acid, Oxidative Stress and Neutrophil Infiltration. *African Journal of Biomedical Research*. 2014; 17(3): 44-7
- Akuodor G., Amos G., Essien A., Essien D., Akpan J. et Ezeokpo B. Antimalarial Potency of the Leaf Extracts of *Aspilia africana* (Pers.) C.D. Adams. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2012; 17(5): 126-29
- Alagawadi K. et Shah A. Anti-inflammatory activity of *Ceiba pentandra* L. seed extracts. *Journal of Cell & Tissue Research*. 2011; 11(2): 2781-4
- Alchetron. *Baillonella toxisperma*. CC BY-SA. 2018
- Ali G., Crouch R., Denkert A., Porzel A., Othman S., Nasser A., Setzer W. et Ludger W. Chemical composition and biological activity of essential oil of *Chenopodium ambrosioides* from Yemen. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*. 2016; 4(1): 20-2

- Aloke C., Nachukwu N., Idenyi J., Ugwuja E., Nwachi E. et Edeogu C. Hypoglycaemic and hypolipidaemic effects of feed formulated with *Ceiba pentandra* leaves in diabetic rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2010; 4(9): 4473-7
- Anaga A., Njoku C., Ekejiuba E., Esiaka M. et Asuzu I. Investigations of the methanolic leaf extract of *Costus afer* Ker-Gawl for pharmacological activities *in vitro* and *in vivo*. *Phytomedicine*. 2004; 11(3): 242-8
- ANOFEL. Candidoses, Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie. *UMVF-Université Médicale Virtuelle Francophone*. 2014; 1-15
- Armstrong J., Brown G., Netea M., Zelante T., Gresnigt M., van de Veerdonk F., Levitz S. Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. *Fungal infections*. 2017; 17(12): 393-402
- Assaidi A., Legssyer A., Berrichi A., Aziz M., Mekhfi H., Bnouham M. et Ziyat A. Hypotensive property of *Chenopodium ambrosioides* in anesthetized normotensive rats. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 2014; 11(1): 1-7
- Assia B., Sakina Z., Souheila L. et Zahia K. Immunostimulatory activity of *Stachys mialhesi* de Noé. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2013; 9(2): 1-8
- Atamari. *Ceiba pentandra*. Wikimedia Commons. 2007
- Atsuko Y., Vincent Lau K., Peaper D. et Villanueva M. Meningitis Caused by *Candida dubliniensis* in a Patient with Cirrhosis: A Case Report and Review of the Literature. *Mycopathologia*. 2016; 181: 589-93
- Azza Z., Marnissi F., Naya A., Benjelloun N., Zamyati S., Amrani M. et Oudghiri M. Toxicological evaluation of *Thymelaea hirsuta* and protective effect against CCl₄-induced hepatic injury in rats. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2012; 6(1): 379-93
- Bachelet B. Impact de la phytothérapie sur le système immunitaire. *Thèse de Doctorat en Science vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, France*. 2013; 134
- Bairwa N., Sethiya N. et Mishra S. Protective effect of stem bark of *Ceiba pentandra* L. against paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Pharmacognosy Research*. 2010; 2(1): 26-30
- Barbé B., Blesson S. et Jan J. Numération manuelle des globules blancs dans le sang total : Sahli pipette. *Institute of Tropical Medicine*. 2012; 1(1): 1-6

- Barile F., Arjun S. et Hopkinson D. *In vitro* cytotoxicity testing: Biological and statistical significance. *Toxicology*. 1993; 7: 111-6
- Bentz B. et Six D. Ergosterol content of fungi associated with *Dendroctonus ponderosae* and *Dendroctonus rufipennis*. *Annals of the Entomological Society of America*. 2009; 99(2): 189-94
- Beoletto V., Mercedes O., Marioli J., Carezzano M. et Demo M. Antimicrobial natural products against bacterial biofilms. *Kon-Book, Chapter 14*. 2016; 288-91
- Berkow E. et Lockhart S. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infection and Drug Resistance*. 2017; 10: 237-45
- Borghi M., Renga G., Puccetti M., Galosi C., Bartoli A. et Romani L. Antifungal Th Immunity: Growing up in Family. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5: 506-12
- Bozza S., Clavaud C., Giovannini G., Beauvais A. et Sarfati J. Immune sensing of *Aspergillus fumigatus* proteins, glycolipids, and polysaccharides and the impact on the immunity and vaccination. *Journal of Immunology*. 2009; 183: 2407-14
- Braca A., Morelli I., Mendez J., Battinelli L., Braghiroli L. et Mazzanti G. Antimicrobial Triterpenoids from *Licania heteromorpha*. *Planta Medica*. 2000; 66(8): 768-9
- Brandes S., Dietrich S., Hunniger K., Kurzai O. et Figge M. Migration and interaction tracking for quantitative analysis of phagocyte-pathogen confrontation assays. *Medical Image Analogy*. 2017; 36: 172-83
- Break T., Jaeger M., Solis N., Filler S. et Rodriguez C. CX3CR1 is dispensable for control of mucosal *Candida albicans* infections in mice and humans. *Infection and Immunity*. 2015; 83: 958-65
- Brena S., Cabezas-Olcoz J., Moragues M., Larrinoa I., Dominguez A., Quindos G. et Ponton J. Fungicidal monoclonal antibody C7 interferes with iron acquisition in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 3156-63
- Brown G. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annual Review of Immunology*. 2011; 29: 1-21
- Brown G., Denning D., Gow N., Levitz S., Netea M. et White T. Hidden killers: Human fungal infections. *Science Translational Medicine*. 2012; 4(165): 1-6
- Buenor A., Galyuon K. et Oteng A. *Trema orientalis* Linn. Blume: A potential for prospecting for drugs for various uses. *Pharmacognosy Reviews*. 2013; 7(13): 67-72

- Casadevall A. et Pirofski L. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. *Cell Host Microbe*. 2012; 11: 447-56
- Casqueiro J., Casqueiro K. et Alves C. Infections in patients with diabetes mellitus. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2012; 16(1): 27-36
- Cateau E., Rodier M. et Imbert C. Candidoses associées aux cathéters : Quelle place pour les verrous antifongiques ? *Médecine/Sciences*. 2012; 28: 740-5
- CDC. Preventions, Drug-Resistant *Candida* Species. Available online: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/candida-508.pdf> (Visité le 09 Juin 2020)
- Chapman S. et Cleary J. Amphotericin B. *Essentials in Clinical Mycology*. 2011; 87-89
- Chassot P. *Musanga cecropioides* R.Br. ex Tedlie. Piwigo. 2017
- Chiani P., Bromuro C., Cassone A. et Torosantucci A. Anti-beta-glucan antibodies in healthy human subjects. *Vaccine*. 2009; 27(4): 513-9
- Chu S., Feng Hu J. et Liu Z. Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Management Science*. 2011; 67(6): 714-8
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute-
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute-Reference method for broth dilution susceptibility testing of yeasts: approved standard. *Document M27-A3*. 2008; 3: 51
- Cornely O., Bangard C. et Jaspers N. Hepatosplenic Candidiasis. *Clinical Liver Disease*. 2015; 6(2): 47-50
- Coronado C. et Jimenez-Soriano Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 2013; 5: 279-86
- Coste A., Crittin J., Bauser C., Rohde B. et Sanglard D. Functional analysis of cis- and trans-acting elements of the *Candida albicans* CDR2 promoter with a novel promoter reporter system. *Eukaryotic Cell*. 2009; 8(8): 1250-67
- Deo S. et Gottlieb D. Adoptive T-cell therapy for fungal infections in haematology patients. *Clinical & Translational Immunology*. 2015; 4(40): 1-7
- Diekema D., Arbefeville S., Boyken L., Kroeger J. et Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012; 73(1): 45-48
- Dobignard A. *Spathodea campanulata*. Base de données des plantes d'Afrique. 2007

- Du C. et Calderone R. Phagocytosis and killing assays for *Candida* species. *Methods in molecular biology*. 2009; 499: 17-26
- Dupont. *Chenopodium ambrosioides* L. Base de données des plantes d'Afrique. 2007
- Dzeufiet D., Mengue N., Bilanda D., Kameni M., Aboubakar O., Dimo T. et Kamtchouing P. *In vivo* estrogenic-like activities of *Gouania longipetala* Hemsl. (Rhamnaceae) bark extracts in a post-menopause-like model of ovariectomized Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 168: 122-28
- Dzeufiet P., Ohandja Y., Tédong L., Asongalem A., Dimo T., Sokeng D. et Kamtchouinga P. Antidiabetic Effect of *Ceiba Pentandra* Extract on Streptozotocin-induced Non-insulin-dependent Diabetic Rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2007; 4(1): 47-54
- Ekuadzi E., Dickson R. et Fleischer T. Antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Gouania longipetala* (Hemsl.). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2012; 3(5): 1300-5
- El-Kirat-Chatel S. Développement d'outils cellulaires et moléculaires pour l'étude des interactions Candida-phagocytes ; Application à la caractérisation du gène OLE2 codant une désaturase chez *C. lusitaniae*. *Doctorat en Microbiologie, Université Victor Segalen Bordeaux 2, France*. 2010; 46
- Ellman G. Tissue sulphydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959; 82(1): 70-7
- Elumalai A., Mathangi N., Didala A., Kasarla R. et Venkatesh Y. A Review on *Ceiba pentandra* and its medicinal features. *American Journal of Polymer Science and Technology*. 2012; 2(3): 83-6
- Erdogan A. et Rao S. Small intestinal fungal overgrowth. *Current Gastroenterology Reports*. 2015; 17(4): 1-16
- Espinel-Ingroff A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2008; 25(2): 101-06
- Etim N. et Oguike M. Haematology and Serum Biochemistry of Rabbit does Fed *Aspilia africana*. *Nigerian Journal of Agriculture and Environment*. 2011; 7(4): 121-127
- Ezeja M., Anaga A., Asuzu I. Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014; 151(3): 1155-64

- Faivre C. L'avenir en phytothérapie : une place pour l'immunomodulation. *Comptes rendus du Congrès de l'Association Française des Vétérinaires pour Animaux de Compagnie*. 2010; 23-32
- Fauchère J. et Avril J. Bactériologie générale et médicale. *Ellipses éditent, Paris*. 2002; 365
- FDA. Approved Drug Products. *Food and Drug Administration, United State*. 2000
- Festus B. *Ficus glumosa* Delile. PlantzAfrica.com. 2016
- Feuya T. et Akono N. Phytochemical analysis, antioxidant evaluation and total phenolic content of the leaves and stem bark of *Musanga cecropioides*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2015; 3(5): 192-95
- Finkel J. et Mitchell A. Genetic control of *candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*. 2011; 9(2): 109-18.
- Gaüzère B. Mycoses profondes. *Médecine tropicale*. 2018; 1-20
- Giannini P. et Shetty K. Diagnosis and management of oral candidiasis. *Otolaryngologic clinics of North America*. 2011; 44(1): 231-40
- Giordani R., Regli P., Kaloustian J. et Mikail C. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*, Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy Research*. 2005; 18(12): 990-5
- Guido B. *Cola nitida*. Un Mondo Ecosostenibile. 2021
- Guillot J. et Dannaoui E. La résistance aux antifongiques : Importance en médecine humaine et vétérinaire. *Académie Vétérinaire de France*. 2015; 168(4): 314-19
- Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014; 20(6): 5-10
- Harborne J. et Williams C. CAAdvances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000; 55(6): 481-504
- Harborne J. Textbook of Phytochemical Methods. *A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, Chapman and Hall Ltd, London*. 1998; 5: 21-72
- Harris D. *Gouania longipetala* Hemsl. RBG Edinburgh. 2006
- Henao N. et Vagner B. Infections of the central nervous system by *Candida*. *Journal of Infectious Diseases and Immunity*. 2011; 3(5): 79-84

- Herrera C., Alvear M., Barrientos L., Montenegro G. et Salazar L. The antifungal effect of six commercial extracts of *Chilean propolis* on *Candida* spp. *Ciencia Investigacion Agraria*. 2010; 37(1): 75-84
- Holetz F., Pessini G., Sanches N., Cortez D., Nakamura C. et Filho B. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002; 97(1): 1027-31
- Horn D., Ostrosky-Zeichner L., Morris M., Ullmann A. et Wu C. Factors related to survival and treatment success in invasive candidiasis or candidemia: a pooled analysis of two large, prospective, micafungin trials. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2010; 29: 223-9
- Hume D., Ross I., Himes S., Sasmono R., Wells C. et Ravasi T. The mononuclear phagocyte system revisited. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012; 72: 621-27
- Hummert C. *Costus afer*. Wikimedia Commons. 2008
- Ilodigwe E. et Akah P. *Spathodea campanulata*: An experimental evaluation of the analgesic and anti-inflammatory properties of a traditional remedy. *Asian Journal of Medical Sciences*. 2009; 1(2): 35-6
- Iten F., Saller R., Abel G. et Reichling J. Additive antimicrobial effects of the Active components of the essential oil of *Thymus vulgaris*-chemotype carvacrol. *Planta Medica*. 2009; 75(11): 1-6
- Jacobsen I., Wilson D., Wachtler B., Brunke S. et Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Review of Anti-infective Therapy*. 2012; 10(1): 85-93
- Jayeola O. Preliminary studies on the use of kolanuts (*Cola nitida*) for soft drink production. *Journal of Food Technology in Africa*. 2001; 6(1): 25-6
- Jeruto P., Lukhoba C., Ouma G., Mutai C. et Otieno D. An Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Nandi people in Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008; 116(2): 370-6
- Jothy S., Zakariah Z. et Chen Y. *In vitro*, *in situ* and *in vivo* studies on the anticandidal activity of *Cassia fistula* seed extract. *Molecules*. 2012; 17(6): 6997-7009
- Kah N. Dermatophyties, candidoses et autres mycoses superficielles : rôles du pharmacien d'officine. *Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré- Nancy, France*. 2011; 40-73

- Kawakita S., Giedlin H. et Nomoto K. Immunomodulators from higher plants. *Journal of Natural Medicines*. 2005; 46(1): 34-8
- Kehili H., Sakina Z. et Zahia K. Immunostimulatory activity of *Phoenix dactylifera*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2014; 6(3): 73-6
- Kenmogne S. Bulletin d'information de la Médecine Traditionnelle. *Ministère de la Santé Publique du Cameroun*. 2020; 001: 1-33
- Khan M. et Ahmad I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B and fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Medical Mycology*. 2012; 50(1): 33-42
- Kociolek M. Quorum-sensing inhibitors and biofilms. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*. 2010; 8: 315-26
- Kohli R. et Hadley S. Fungal Arthritis and Osteomyelitis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2006; 19(4): 831-51
- Konda A. *Scorodophloeus zenkeri* Harms. Central African Plants. 2011
- Kretschmar M., Amselem S., Zawoznik E., Dietz A., Hof H. et Nichterlein T. Efficient treatment of murine systemic infection with *Candida albicans* using amphotericin B incorporated in nanosize range particles. *Mycoses*. 2001; 44(7): 281-6
- Kuete V., Krusche B., Youns M., Voukeng I., Fankam A., Tankeo S., Lacmata S. et Efferth T. Cytotoxicity of some Cameroonian spices and selected medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011; 134(3): 803-12
- Kumaresan P., Aparecido T. et Kontoyiannis D. Methods of Controlling Invasive Fungal Infections Using CD8+ T Cells. *Frontiers in Immunology*. 2018; 8(1939): 1-14
- Kwang Y., Chulmin P., Ji-Hyun B., Hye-Sun C., Jung-Hyun C., Eun Hee H., Seung O. et Si-Hyun K. Fungal arthritis with adjacent osteomyelitis caused by *Candida pelliculosa*: a case report. *BMC Infectious Diseases*. 2020; 20(438): 1-9
- Lalitagauri D., Paul R., Thomas R. et Helio S. Bactericidal activity of BAL9141, a novel parenteral cephalosporin against contemporary Gram positive and Gram-negative isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2004; 50(1): 73-5
- Larsen R. Flucytosine. *Essentials of Clinical Mycology*. 2011; 36-98
- Latge J. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*. 2007; 66(2): 279-90
- Lavierebelle. *Aspilia africana* - Plante des hémorragies et des blessures. 2021

- Lebeaux D. et Ghigo J. Infections associées aux biofilms. *Medical Sciences*. 2012; 28(8): 727-39
- Lee J., Cho P., Kim T., Kang S., Song K. et Hong S. Hemolytic activity and developmental expression of pore-forming peptide, clonorin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002; 296(5): 1238-44
- Li H., Cheng K., Wong C., Fan K., chen F. et Tian Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry*. 2007; 102(3): 771-6
- López M. Candidosis, a new challenge. *Clinics in Dermatology*. 2010; 28(2): 178-84
- Machado H, Nagem T, Peters V, Fonseca C, Oliveira T. Flavonoides e seu potencial terapeutico. *Biology of Reproduction*. 2008; 27(1): 33-9
- Madhu P. Oral candidiasis. *International Journal of Science*. 2013; 2 (12): 3-6
- Madubunyi I., Onoja S. et Asuzu I. *In vitro* antioxidant and *in vivo* antidiabetic potential of the methanol extract of *Ficus glumosa* Del (Moraceae) stem bark in alloxan-induced diabetic mice. *Comparative Clinical Pathology*. 2012; 21(4): 389-94
- Makinde J., Amusan O. et Adesogan E. Antimalarial activity of chromatographic fractions of *Spathodea campanulata* stem bark extracts against on *Plasmodium bergeri* in mice. *Phytotherapy Research*. 2000; 4(1): 53-6
- Malika A., Fadli M., Hassani L., Boulay B., Markouk M., Khalid B., Abdelaziz A., Mustapha A. et Larhsini M. *Chenopodium ambrosioides* var. *ambrosioides* used in Moroccan traditional medicine can enhance the antimicrobial activity of conventional antibiotics. *Industrial Crops and Products*. 2015; 71(1): 37-43
- Mankele R. Manuel du technicien de laboratoire périphérique. *Projet de renforcement des laboratoires périphériques*. 2005; 1(1): 1-56
- Marobela A., Ghislain F., Okatch H. et Majinda R. Polyphenols: A diverse class of multi-target anti-HIV-1 agents. *Current Drug Metabolism*. 2013; 14(4): 392-413
- Matthews R., Hodgetts S. et Burnie J. Preliminary assessment of a human recombinant antibody fragment to hsp90 in murine invasive candidiasis. *Journal of Infectious Diseases*. 2005; 171: 1668-771
- Matuschek E., Åhman J., Webster C., Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin-Evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas*

aeruginosa and *Acinetobacter* spp. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018; 24: 865-70

Maubon D., Garnaud C. et Cornet M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? *Intensive Care Medicine*. 2014. 40: 1241-55

Mayer F., Wilson D., Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013; 4(2): 119-28

Metin A., Dilek N. et Bilgili S. Recurrent candidal intertrigo: challenges and solutions. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2018; 11: 175-85

Mohammedi Z. et Atik F. Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. 2014; 5(08): 595-600

Monzote L., García M., Montalvo A. et Scull R. Effect of oral treatment with the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against cutaneous leishmaniasis in mice, caused by *Leishmania amazonensis*. *Forsch Komplementmed*. 2009; 16(5): 334-8

Motukupally S., Nanapur V., Chathoth K., Murthy S., Pappuru R. et Sharma S. Ocular infections caused by *Candida* species: Type of species, in vitro susceptibility and treatment outcome. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2015; 33(4): 538-46

Nagarathna P., Reena K., Sriram R. et Johnson W. Review on Immunomodulation and Immunomodulatory Activity of Some Herbal Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2013; 22(1): 223-30

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria. *Approved Standard, Clinical and Laboratory Standards Institute*. 2003; 6: 1-5

Neeta S. et Uttamkumar B. Effect of sulphaphenazole on pathogenic *Klebsiella aerogenes*. *International Journal of Biological Sciences*. 2011; 2(1): 106-10

Netea M., Brown G., Kullberg B. et Gow N. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*. 2008; 6(1): 67-78

Ngo L., Kasahara S., Kumasaka D., Knoblauch S., Jhingran A. et Hohl T. Inflammatory monocytes mediate early and organ-specific innate defense during systemic candidiasis. *Journal of Infectious Diseases*. 2014; 209: 109-19

Ngo-Mback M., Babii C., Jazet D., Kouipou T., Stefan M. et Fekam B. Anticandidal and synergistic effect of essential oil fractions from three aromatic plants used in Cameroon. *Journal of Medical Mycology*. 2020; 30(100940): 1-7

- Ngono N., Koanga M., Tchinda T., Magnifouet N., Motso C., Mballa B., Ndifor F., Biyiti L. et Amvam Z. Ethnobotanical survey of some Cameroonian plants used for treatment of viral diseases. *African Journal of Plant Science*. 2011; 5(1): 15-21
- Ngoupayo J., Daleu T., Ntsama E., Kasali F. M. et Ndelo J. Phytochemical screening and antibacterial activity of extracts from cloves of *Cola nitida* Schott & Endl. *International Journal of Advances in Pharmacy and Chemistry*. 2016; 5(3): 314-21
- Ngueguim J., Zapfack L., Makombu J., Lahjou J. et Momo S. Plantes médicinales. *Seizième conférence annuelle des biosciences université de Yaoundé I, Comité camerounais de biosciences*. 2009; CCB 09: 61
- Niyonzima G., Laekeman G., Witvrouw M., Poel B., Pieters L., Paper P., Franz G. et Vlietinck A. Hypoglycemic, anticomplement and anti-HIV activities of *Spathodea campanulata* stem bark. *Phytomedicine*. 2018; 6(1): 45-9
- Njunda A., Nsagha D., Assob J., Kanga H. et Teyim P. *In vitro* antifungal susceptibility patterns of *Candida albicans* from HIV and AIDS patients attending the Nylon Health District Hospital in Douala, Cameroon. *The Journal of Public Health in Africa*. 2012; 3(1): 4-7
- Ntemafack A. et Dontien G. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Spermacoce prince* (Rubiaceae), a traditional antibacterial preparation. *Internal Journal of Toxicological and Pharmacological Research*. 2015; 7(3): 1-6
- Nyegue M. Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques et/ou médicinales du Cameroun : évaluation de leurs activités antiradicalaires, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. *Thèse de Doctorat PhD, Université de Montpellier 2, France*. 2006; 194
- OCDE. Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë. *Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*. 2001; 423: 1-14
- O'Farrell N., Quigley M. et Fox P. Association between the intact foreskin and inferior standards of male genital hygiene behaviour: a cross-sectional study. *International Journal of STD & AIDS*. 2005; 16(8): 556-9
- Osunwoke E., Otakore O. et Lelei S. Wound Healing Effects of the Leaves Extract of *Aspilia africana* on Wistar Rats (*Rattus norvegicus*). *Phytomedicine*. 2014; 2(1): 1-5
- Paleiron N., Bizien N. et Vinsonneau U. Insuffisance cardiaque aiguë sous itraconazole: une complication prévisible ? *Revue des Maladies Respiratoires*. 2011; 28(3): 352-4

- Pappas P., Andes D. et Kauffman C. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant - Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clinical Infectious Diseases*. 2010; 50: 1101-11
- Pappas P., Kauffman C., Andes D., Calandra T. et Edwards J. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update of the infectious disease society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2009; 48(5): 503-35
- Paramera E., Karathanos V. et Konteles S. Yeast Cells and Yeast-Based Materials for Microencapsulation. *Microencapsulation in the Food Industry*. 2014; 267-81
- Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 2nd Edition. *Document M60*. 2020
- Peter A., Jagan M., Swarajya L., Ganga R., Sandeep B. et Sudhakara R. Preliminary phytochemical, antioxidant and antibacterial studies on the bark of *Spathodea campanulata* P. Beauv. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2016; 3(2): 243-51
- Pfaller M. et Diekema D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*. 2007; 20(1): 133-63
- Pillay J., den Braber I., Vrisekoop N., Kwast L., de Boer R., Borghans J., Tesselaar K. et Koenderman L. *In vivo* labeling with $2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010; 116: 625-7
- Poissy J. Physiopathologie des candidoses invasives. *Réanimation, Lyon-sud*. 2015; 24(1): 318-27
- Ponkshe C. et Madhavi M. *In vivo* and *in vitro* evaluation of immunomodulatory activity of three marine animal extracts with reference to phagocytosis. *India Journal of Experimental Biology*. 2002; 40(12): 1399-402
- Price T., Boeckh M., Harrison R., Mccullough J., Ness P. et Strauss R. Efficacy of transfusion with granulocytes from G-CSF/dexamethasone-treated donors in neutropenic patients with infection. *Blood*. 2015; 126: 2153-61
- Quintin J., Voigt J., van der Voort R., Jacobsen I. et Verschueren I. Differential role of NK cells against *Candida albicans* infection in immunocompetent or immunocompromised mice. *European Journal of Immunology*. 2014; 44: 2405-14

- Quispe A., Zavala C., Rojas J., Posso M. et Vaisberg A. Efecto citotóxico selectivo *in vitro* de murcin H (*Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2006; 23: 265-9
- Ramage G. et Lopez-Ribot J. Techniques for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. *Methods in Molecular Medicine*. 2005; 118: 71-9
- Ramirez-Ortiz Z. et Means T. The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi. *Virulence*. 2012; 3: 635-46
- Rastogi B., Tiwari U., Dubey A., Bawara B., Chauhan N. et Saraf D. Immunostimulatory activity of *Cocculus hirsutus* in immunosuppressed rat. *Pharmacologyonline*. 2008; 3: 38-57
- Reizis B., Bunin A., Ghosh H., Lewis K. et Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annual Review of Immunology*. 2011; 29: 163-83
- Richardson J. et Moyes D. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. *Virulence*. 2015; 6: 327-37
- Ripert C. *Mycologie médicale*. Tec & doc-Lavoisier. Paris; 2013; 690
- Riwom E., Ngo Mbing J., Nyegue M., Ndoye Foe C., Fodouop M., Bouopda T., Pegnyemb D. et Etoa FX. *In vitro* antibacterial activity of *Baillonella toxisperma* (Pierre) extracts. *African Journal of Microbiology Research*. 2015b; 9(39): 2088-94
- Riwom E., Nyegue M., Ndoye F., Bouopda T. et Etoa FX. *In vitro* evaluation of the antifungal activity of extracts of *Baillonella toxisperma* (Pierre), a Sapotaceae, on the growth of some human pathogenic yeast. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2015a; 9(9): 299-306
- Rocio G., Haroldo C. de Oliveira, Rivera J., Trevijano-Contador N. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers in Microbiology*. 2020: 1-13
- Romani L., Zelante T., Palmieri M., Napolioni V. et Picciolini M. The cross-talk between opportunistic fungi and the mammalian host via microbiota's metabolism. *Seminars in Immunopathology*. 2015; 37: 163-71
- Roy R. et Klein B. Dendritic cells in antifungal immunity and vaccine design. *Cell Host Microbe*. 2012; 11: 436-46
- Russell I. et Stewart G. An Introduction to Brewing Science & Technology - Brewer's Yeast. *The Institute of Brewing*. 2008; 108

- Salih K. Synergistic Effects of Plant Extracts and Antifungal Drugs on *C. albicans*. *Journal of Developing Drugs*. 2016; 5(165): 1-4
- Sandrock R. et Vanetten H. Fungal sensitivity to and enzymatic degradation of the phytoanticipin alpha-tomatine. *Phytopathology*. 2008; 88: 137-43
- Sanglard D. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infectious Diseases*. 2002; 2(2): 73-85
- Sanguinetti M., Posteraro B. et Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*. 2015; 58(2): 2-13
- Santiago C., Lim K., Hwei-San Loh H. et Ting K. Inhibitory Effect of *Duabanga grandiflora* on MRSA Biofilm Formation via Prevention of Cell-Surface Attachment and PBP2a Production. *Molecules*. 2015; 20(3): 4473-82
- Sarazin A. Les glycannes pariétaux de levures et leur implication dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte. *Thèse de Doctorat en Biologie cellulaire, Université Lille 2, France*. 2010; 16
- Sarder N. et Uddin M. Antioxidant and antibacterial activities of *Trema orientalis* Linn: an indigenous medicinal plant of Indian subcontinent. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 2008; 8(4): 395-9
- Schellenberger C. *Spermacoce princeae*. African plants. 2011
- Schmidt S., Tramsen L. et Lehrnbecher T. Natural Killer Cells in Antifungal Immunity. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8(1623): 1-10
- Shi-Min Y. Fungal Endocarditis. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. 2016; 31(3): 252-55
- Shruthi S., Vijayalaxmi K. et Bhasker S. Immunomodulatory Effects of Gallic Acid against Cyclophosphamide- and Cisplatin-induced Immunosuppression in Swiss Albino Mice. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; 80(1): 150-60
- Shweihat Y., Perry J. et Darshana S. Isolated *Candida* infection of the lung. *Respiratory Medicine Case Reports*. 2015; 16: 18-19
- Sofowora A. Phytochemical Screening of Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa Edition. Spectrum Books. 1993; 150-6
- Song S., Beck B., Kim D., Park J., Kim J., Kim H. et Ring E. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunology*. 2014; 40(1): 40-8

- Sortino M., Delgado P., Juarez S., Quiroga J., Aboni R., Insuasty B., Rodero L., Gabirotto F., Enriz R. et Zacchino S. Synthesis and antifungal activity of (Z)-5-arylidenerhodanines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007; 15(1): 484-94
- Spellberg B., Ibrahim A. et Avanesian V. Efficacy of the anti-*Candida* rAls3p-N or rAls1p-N vaccines against disseminated and mucosal candidiasis. *Journal of Infectious Diseases*. 2006; 194: 256-60
- Starr O. Fungal Lung Infections. *Patient*. 2017; 1-18
- Sudbery P. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*. 2011; 9: 737-48
- Tadec L., Talarmin J., Gastinne T., Bretonniere C., Miegerville M., Pape P. et Morio F. Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of Candidemia at a single French hospital: a 7-year study. *Mycoses*. 2016; 59: 296-303
- Takeo O., Masato K., Keiko S., Rika O., Junko M., Hiroshi I., Hiroyuki K., Toshi A., Tosshifumi A. et Shigeo M. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of tricyclic ketolide Te-802 and its analogs. *Journal of Antibiotics*. 2004; 57(1): 518-27
- Talarmin J., Boutoille D., Tattevin P., Dargère S., Weinbreck P., Ansart S., Chennebault J., Hutin P., Léautez-Nainville S., Gay-Andrieu F. et Raffi F. Epidémiologie des candidémies : étude observationnelle prospective d'un an dans l'Ouest de la France. *Médecine et maladies infectieuses*. 2009; 39(12): 877-85
- Tessier X. Épidémiologie des candidémies au CHU de Bordeaux du 30 avril 2012 au 30 mars 2016. *Médecine humaine et pathologie*. 2017; 1-9
- Thompson D., Carlisle P., Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*. 2011; 10(9): 1173-82.
- Trease G., Evans W. Pharmacognosy. *Bailliere Tindall, London*. 1989; 11: 45-50
- Trivellato G., Malheiros A., Meyre S., Buss Z., Monguilhott E., Fröde T. et Souza M. From popular use to pharmacological validation: a study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013; 145(1): 127-38
- Tsuzuki J., Svidzinski T., Shinobu C., Silva L., Rodrigues-Filho E., Cortez D. et Ferreira I. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*. 2007; 79(4): 577-83

- Ubaka M., Ukwe V., Okoye C. et Adibe O. Investigation into the Anti-ulcer Activity of the Aqueous Leaf Extract of *Aspilia africana* C.D. Adams. *Asian Journal of Medical Sciences*. 2010; 2(2): 40-3
- Uddin S., Uddin K. et Ahmed F. Analgesic activity of *Trema orientalis* Linn. in mice. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 2008; 8(1): 187-91
- Uppuluri P., Chaturvedi A., Srinivasan A., Banerjee M. et Ramasubramaniam A. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *Public Library of Science, Pathogens*. 2010; 6(1): 1-12
- Veerdonk F., Netea M., Joosten L. et Kullberg B. Novel strategies for the prevention and treatment of *Candida* infections: the potential of immunotherapy. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Reviews*. 2010; 34: 1063-75
- Vengolis. *Trema orientalis*. Wikimedia Commons. 2018
- Vikrant P., Priya J. et Kunchiraman B. Plants with anti-*Candida* activity and their mechanism of action. *Journal of Environmental Research and Development*. 2015; 9(4): 1189-95
- Voigt J., Hunniger K., Bouzani M. et Barz D. Human natural killer cells acting as phagocytes against *Candida* and mounting an inflammatory response that modulates neutrophil antifungal activity. *Journal of Infectious Diseases*. 2014; 209: 616-26
- Wiederhold N., Najvar L., Bocanegra R., Kirkpatrick W. et Patterson T. Caspofungin dose escalation for invasive candidiasis due to resistant *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011; 55(7): 3254-60
- Wilfried P., Wilflingseder D. et Lass Flörl C. Immunotherapy as an antifungal strategy in immune compromised hosts. *Current Clinical Microbiology Reports*. 2020; 7: 57-66
- Wolfgang S., Jörg H., Ihsan Ç. et Otto S. New Triterpenoids with Antibacterial Activity from *Zizyphus joazeiro*. *Planta Medica*. 2009; 65(8): 740-3
- Wu C., Labrie J., Tremblay Y., Haine D., Mourez M. et Jacques M. Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2013; 115(1): 30-40
- Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2014; 10: 95-105

- Yapi A., Kassi N., Fofié N. et Zirihi G. Etude ethnobotanique des Asteraceae médicinales vendues sur les marchés du district autonome d'Abidjan (Côte d'Ivoire). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2015; 9(6): 2633-47
- Yona S. et Gordon S. From the reticuloendothelial to mononuclear phagocyte system - the unaccounted years. *Frontiers in Immunology*. 2015; 6(328): 1-7
- Zeuko'o M., Virginio C., Soto S. et Fekam B. Anti-*candida* biofilm properties of Cameroonian plant extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2016; 10(35): 603-11
- Zhang Y., Gamarra S., Garcia-Effron G., Park S. et Perlin D. Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs. *Public Library of Science, Pathogens*. 2010; 6(6): 1-13

ANNEXES

Annexe 1 : Composition des milieux de culture et réactifs utilisés

I - MILIEUX DE CULTURE (Composition en g/L)

Sabouraud Dextrose Agar

Tryptone : 5 g

Peptone : 5 g

Dextrose : 40 g

Chloramphénicol : 0,05 g

Agar : 15 g

PH $5,6 \pm 0,2$ à 25°C

Sabouraud Dextrose Broth

Tryptone : 5 g

Dextrose : 20 g

PH $5,6 \pm 0,2$ à 25°C

II - REACTIFS

Suspension d'encre de carbone

Encre de carbone pur : 3 mL

NaCl 0,9 % : 4 mL

Gélatine 3 % : 4 mL

Réactif de Mayer

Chlorure mercurique : 1,35 g

Iodure de potassium : 5 g

Eau distillée : 100 mL

Liqueur de Fehling

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 70 g

Tartrate mixte de Na/K. $4\text{H}_2\text{O}$: 350 g

NaOH : 100 g

Eau distillée : 2 L

Liquide de Marcano

Na_2SO_4 anhydre : 2,2 g

Formol : 1 mL

Eau distillée qsp : 100 mL

Réactif de May-Grünwald

May-Grünwald en poudre : 2,5 g

Alcool méthylique : 1000 mL

Liquide de Lazarus

Acide acétique : 5 mL

Eau distillée qsp : 100 mL

Bleu de méthylène : 0,25g

Solution de Giemsa

Giemsa en poudre : 0,75 g

Alcool méthylique : 75 mL

Glycérine : 25 mL

Annexe 2 : Interprétation des paramètres d'inhibition des extraits de plantes testées

Tableau XXIV : Interprétation des paramètres d'inhibition des extraits aqueux (à froid) des plantes testées

No	Nom de la plante	Parties utilisées	Gammes de CMI décelables (µg/mL)	Pourcentage de levures sensibles (%)	Nombre d'activités élevées (CMI ≤ 100 µg/mL)	Nombre d'activités modérées (100 < CMI ≤ 500 µg/mL)	Nombre d'activités faibles (CMI > 500 µg/mL)	Nombre d'activités fongicides (CMF/CMI = 1 ou 2)	Nombre d'activités fongistatiques (4 ≤ CMF/CMI ≤ 16)	Nombre de tolérance (CMF/CMI > 16)
1	<i>Aspilia africana</i> (Pers.) C.D. Adams Subsp. <i>Africana</i>	Feuilles	128 - 2048	71,42 (5/7)	0	1	4	2	1	0
2	<i>Baillonella toxisperma</i> Pierre	Ecorces	256 - 2048	57,14 (4/7)	0	1	3	2	1	0
		Feuilles	256 - 4096	42,85 (3/7)	0	1	2	1	1	0
3	<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn.	Ecorces	128 - 2048	71,42 (5/7)	0	1	4	3	0	0
		Epines	≥ 1024	14,28 (1/7)	0	0	1	0	0	0
		Feuilles	512 - 4096	42,85 (3/7)	0	0	3	1	1	0
4	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Feuilles	512 - 4096	85,71 (6/7)	0	0	6	3	0	0
5	<i>Cola nitida</i> (Vent.) Schott & Endl.	Ecorces	1024 - 2048	28,57 (2/7)	0	0	2	2	0	0
		Feuilles	256 - 2048	42,85 (3/7)	0	1	2	0	1	0
6	<i>Costus afer</i> Ker-Gawl.	Feuilles	512 - 1024	28,57 (2/7)	0	0	2	1	0	0
		Tiges	2048 - 4096	28,57 (2/7)	0	0	2	2	0	0
7	<i>Ficus glumosa</i> Delile	Ecorces	1024 - 4096	57,14 (4/7)	0	0	4	2	0	0
		Feuilles	128 - 4096	71,42 (5/7)	0	2	3	5	0	0
8	<i>Gouania longipetala</i> (Hemsl.)	Feuilles	512 - 4096	57,14 (4/7)	0	0	4	1	0	0
		Tiges	256 - 4096	71,42 (5/7)	0	2	3	4	1	0

Tableau XXIV : Interprétation des paramètres d'inhibition des extraits aqueux (à froid) des plantes testées (Suite et fin)

No	Nom de la plante	Parties utilisées	Gammes de CMI décelables (µg/mL)	Pourcentage de levures sensibles (%)	Nombre d'activités élevées (CMI ≤ 100 µg/mL)	Nombre d'activités modérées (100 < CMI ≤ 500 µg/mL)	Nombre d'activités faibles (CMI > 500 µg/mL)	Nombre d'activités fongicides (CMF/CMI = 1 ou 2)	Nombre d'activités fongistatiques (4 ≤ CMF/CMI ≤ 16)	Nombre de tolérance (CMF/CMI > 16)
9	<i>Musanga cecropioides</i> R.Br. & Tedlie	Ecorces	128 - 4096	42,85 (3/7)	0	1	2	0	1	0
		Feuilles	512 - 4096	100,00 (7/7)	0	0	7	5	0	0
10	<i>Scorodophloeus zenkeri</i> Harms	Feuilles	128 - 2048	85,71 (6/7)	0	1	5	3	0	1
11	<i>Spathodea campanulata</i> P. Beauv.	Ecorces	1024 - 2048	57,14 (4/7)	0	0	4	2	0	0
12	<i>Spermacoce princea</i> (K. Schum) Verdc.	Plante entière	512 - 2048	71,42 (5/7)	0	0	6	1	2	0
13	<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	Feuilles	256 - 4096	71,42 (5/7)	0	1	4	1	1	0
		Tiges	512 - 1024	57,14 (4/7)	0	0	4	0	1	0

Tableau XXV : Interprétation des paramètres d'inhibition des infusés aqueux des plantes testées

No	Nom de la plante	Parties utilisées	Gammes de CMI décelables (µg/mL)	Pourcentage de levures sensibles (%)	Nombre d'activités élevées (CMI ≤ 100 µg/mL)	Nombre d'activités modérées (100 < CMI ≤ 500 µg/mL)	Nombre d'activités faibles (CMI > 500 µg/mL)	Nombre d'activités fongicides (CMF/CMI = 1 ou 2)	Nombre d'activités fongistatiques (4 ≤ CMF/CMI ≤ 16)	Nombre de tolérance (CMF/CMI > 16)
1	<i>Aspilia africana</i> (Pers.) C.D. Adams Subsp. Africana	Feuilles	256 - 2048	71,42 (5/7)	0	1	4	2	2	0
2	<i>Baillonella toxisperma</i> Pierre	Ecorces	512 - 1024	71,42 (5/7)	0	0	5	3	1	0
		Feuilles	512 - 4096	57,14 (4/7)	0	0	4	1	0	0
3	<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn.	Ecorces	128 - 1024	57,14 (4/7)	0	1	3	1	2	0
		Epines	1024 - 4096	42,85 (3/7)	0	0	3	2	1	0
		Feuilles	256 - 4096	100,00 (7/7)	0	1	6	5	0	0
4	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Feuilles	128 - 2048	71,42 (5/7)	0	1	4	4	1	0
5	<i>Cola nitida</i> (Vent.) Schott & Endl.	Ecorces	128 - 4096	57,14 (4/7)	0	1	3	1	3	0
		Feuilles	256 - 2048	42,85 (3/7)	0	1	2	1	2	0
6	<i>Costus afer</i> Ker-Gawl.	Feuilles	512 - 2048	71,42 (5/7)	0	0	5	4	0	0
		Tiges	512 - 1024	42,85 (3/7)	0	0	3	1	1	0
7	<i>Ficus glumosa</i> Delile	Ecorces	1024 - 2048	28,57 (2/7)	0	0	2	1	1	0
		Feuilles	256 - 4096	57,14 (4/7)	0	1	3	3	0	0
8	<i>Gouania longipetala</i> (Hemsl.)	Feuilles	256 - 2048	57,14 (4/7)	0	1	3	1	0	0
		Tiges	128 - 512	100,00 (7/7)	0	6	1	6	1	0

Tableau XXV : Interprétation des paramètres d'inhibition des infusés aqueux des plantes testées (Suite et fin)

No	Nom de la plante	Parties utilisées	Gammes de CMI décelables (µg/mL)	Pourcentage de levures sensibles (%)	Nombre d'activités élevées (CMI ≤ 100 µg/mL)	Nombre d'activités modérées (100 < CMI ≤ 500 µg/mL)	Nombre d'activités faibles (CMI > 500 µg/mL)	Nombre d'activités fongicides (CMF/CMI = 1 ou 2)	Nombre d'activités fongistatiques (4 ≤ CMF/CMI ≤ 16)	Nombre de tolérance (CMF/CMI > 16)
9	<i>Musanga cecropioides</i> R.Br. & Tedlie	Ecorces	128 - 2048	57,14 (4/7)	0	1	3	2	0	0
		Feuilles	128 - 2048	57,14 (4/7)	0	2	2	2	1	0
10	<i>Scorodophloeus zenkeri</i> Harms	Feuilles	512 - 4096	100,00 (7/7)	0	0	7	5	0	0
11	<i>Spathodea campanulata</i> P. Beauv.	Ecorces	512 - 2048	71,42 (5/7)	0	0	5	1	2	0
12	<i>Spermacoce princea</i> (K. Schum) Verdc.	Plante entière	512 - 2048	100,00 (7/7)	0	0	7	2	2	0
13	<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	Feuilles	512 - 2048	57,14 (4/7)	0	0	4	3	0	0
		Tiges	512 - 2048	57,14 (4/7)	0	0	4	3	0	0

Tableau XXVI : Interprétation des paramètres d'inhibition des extraits hydro-éthanoliques (3:7) des plantes testées

No	Nom de la plante	Parties utilisées	Gammes de CMI décelables (µg/mL)	Pourcentage de levures sensibles (%)	Nombre d'activités élevées (CMI ≤ 100 µg/mL)	Nombre d'activités modérées (100 < CMI ≤ 500 µg/mL)	Nombre d'activités faibles (CMI > 500 µg/mL)	Nombre d'activités fongicides (CMF/CMI = 1 ou 2)	Nombre d'activités fongistatiques (4 ≤ CMF/CMI ≤ 16)	Nombre de tolérance (CMF/CMI > 16)
1	<i>Aspilia africana</i> (Pers.) C.D. Adams Subsp. Africana	Feuilles	256 - 4096	100,00 (7/7)	0	1	6	4	0	0
2	<i>Baillonella toxisperma</i> Pierre	Ecorces	128 - 2048	71,42 (5/7)	0	3	2	4	0	0
		Feuilles	256 - 2048	57,14 (4/7)	0	1	3	1	1	0
3	<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn.	Ecorces	512 - 4096	85,71 (6/7)	0	0	6	4	0	0
		Epines	2048 - 4096	28,57 (2/7)	0	0	2	1	0	0
		Feuilles	256 - 512	71,42 (5/7)	0	2	3	2	0	0
4	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Feuilles	512 - 2048	42,85 (3/7)	0	0	3	2	0	0
5	<i>Cola nitida</i> (Vent.) Schott & Endl.	Ecorces	256 - 2048	57,14 (4/7)	0	1	3	2	0	0
		Feuilles	128 - 4096	100,00 (7/7)	0	1	6	2	2	0
6	<i>Costus afer</i> Ker-Gawl.	Feuilles	512 - 4096	42,85 (3/7)	0	0	3	1	0	0
		Tiges	256 - 2048	85,71 (6/7)	0	1	5	2	1	0
7	<i>Ficus glumosa</i> Delile	Ecorces	2048 - 4096	28,57 (2/7)	0	0	2	1	0	0
		Feuilles	128 - 4096	42,85 (3/7)	0	2	1	1	0	1
8	<i>Gouania longipetala</i> (Hemsl.)	Feuilles	512 - 4096	57,14 (4/7)	0	0	4	2	0	0
		Tiges	256 - 2048	71,42 (5/7)	0	1	4	4	1	0

Tableau XXVI : Interprétation des paramètres d'inhibition des extraits hydro-éthanoliques (3:7) des plantes testées (Suite et fin)

No	Nom de la plante	Parties utilisées	Gammes de CMI décelables (µg/mL)	Pourcentage de levures sensibles (%)	Nombre d'activités élevées (CMI ≤ 100 µg/mL)	Nombre d'activités modérées (100 < CMI ≤ 500 µg/mL)	Nombre d'activités faibles (CMI > 500 µg/mL)	Nombre d'activités fongicides (CMF/CMI = 1 ou 2)	Nombre d'activités fongistatiques (4 ≤ CMF/CMI ≤ 16)	Nombre de tolérance (CMF/CMI > 16)
9	<i>Musanga cecropioides</i> R.Br. & Tedlie	Ecorces	128 - 1024	71,42 (5/7)	0	1	4	3	1	0
		Feuilles	512 - 4096	57,14 (4/7)	0	0	4	2	0	0
10	<i>Scorodophloeus zenkeri</i> Harms	Feuilles	256 - 4096	71,42 (5/7)	0	1	4	5	0	0
11	<i>Spathodea campanulata</i> P. Beauv.	Ecorces	256 - 4096	71,42 (5/7)	0	1	4	1	2	0
12	<i>Spermacoce princea</i> (K. Schum) Verdc.	Plante entière	128 - 1024	57,14 (4/7)	0	2	2	3	1	0
13	<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	Feuilles	256 - 4096	71,42 (5/7)	0	1	4	2	0	0
		Tiges	256 - 1024	42,85 (3/7)	0	1	2	0	0	0

Tableau XXVII : Interprétation des paramètres d'inhibition des fractions, sous-fractions et composés isolés de l'extrait GLE

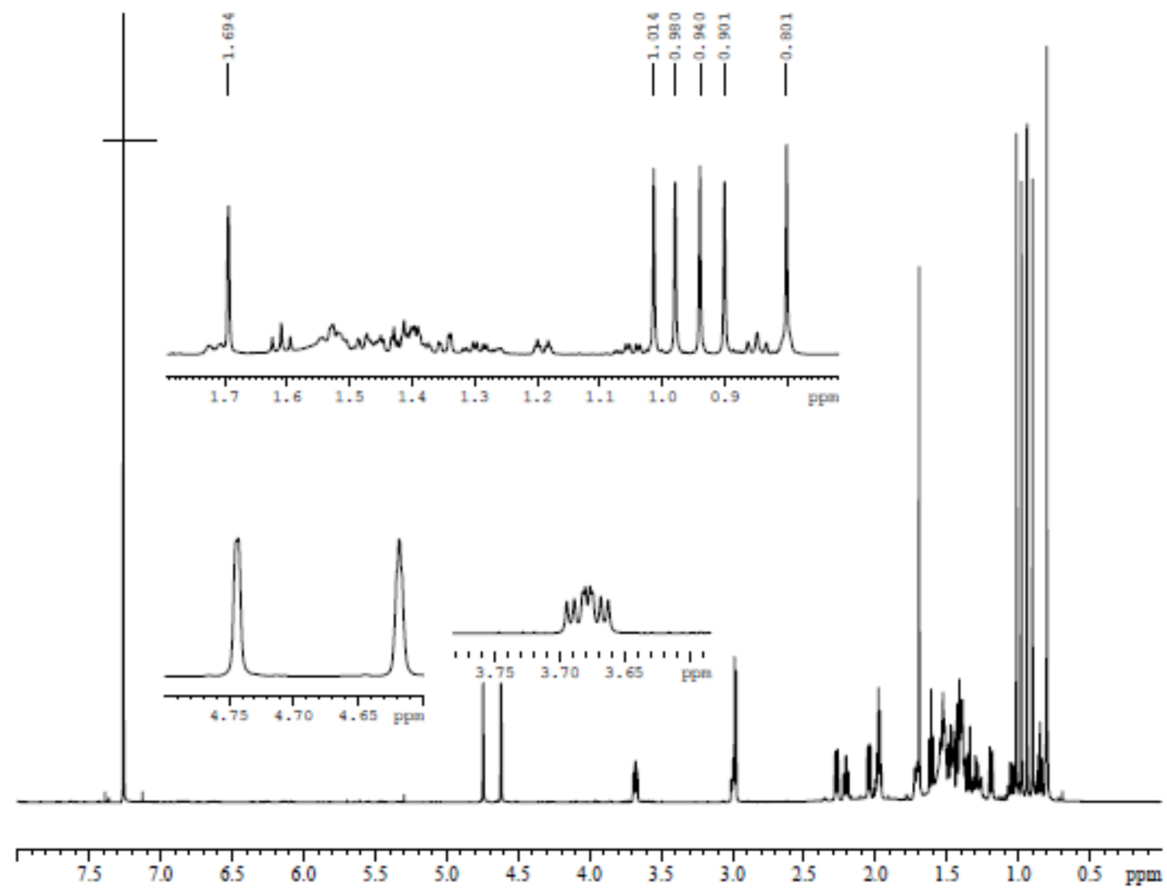
Fractions, sous-fractions et composés isolés	Gammes de CMI décelables (µg/mL)	Pourcentage de levures sensibles (%)	Nombre d'activités élevées (CMI ≤ 100 µg/mL)	Nombre d'activités modérées (100 < CMI ≤ 500 µg/mL)	Nombre d'activités faibles (CMI > 500 µg/mL)	Nombre d'activités fongicides (CMF/CMI = 1 ou 2)	Nombre d'activités fongistatiques (4 ≤ CMF/CMI ≤ 16)	Nombre de tolérance (CMF/CMI > 16)
Fr. <i>n</i> -hexane	64 - 256	85,71 (6/7)	2	4	0	3	3	0
Fr. CH ₂ Cl ₂	256 - 4096	57,14 (4/7)	0	0	4	2	1	0
Fr. <i>n</i> -butanol	512 - 4096	85,71 (6/7)	0	0	6	0	1	0
Fr. résiduelle	512 - 2048	28,57 (2/7)	0	0	2	1	0	0
Sf1	64 - 512	85,71 (6/7)	1	3	2	4	2	0
Sf2	64 - 2048	85,71 (6/7)	1	0	5	4	0	0
Sf3	128 - 4096	100,00 (7/7)	0	4	3	5	0	0
Sf4	512 - 4096	42,85 (3/7)	0	0	3	1	0	0
Sf5	256 - 2048	57,14 (4/7)	0	1	3	2	1	0
Sf6	512 - 4096	42,85 (3/7)	0	0	3	0	0	0
Sf ¹ a	512 - 2048	42,85 (3/7)	0	0	3	2	0	0
Sf ¹ b	64 - 1024	100,00 (7/7)	1	4	2	6	0	0
Sf ¹ c	256 - 2048	57,14 (4/7)	0	1	3	2	1	0
Sf ¹ d	64 - 4096	100,00 (7/7)	1	1	5	4	0	1
Sf ³ a	256 - 4096	42,85 (3/7)	0	0	3	2	0	0
Sf ³ b	128 - 4096	57,14 (4/7)	0	1	3	1	0	0
Sf ³ c	1024 - 2048	42,85 (3/7)	0	0	3	2	0	0
Sf ³ d	64 - 512	85,71 (6/7)	1	3	2	6	0	0
Sf ³ e	256 - 4096	28,57 (2/7)	0	1	1	0	0	0
Sf ³ f	2048 - 4096	42,85 (3/7)	0	0	3	2	0	0
Ac. alphaltolique	64 - 256	71,42 (5/7)	1	4	0	4	0	0
Ac. épigouannique	32 - 256	100,00 (7/7)	3	4	0	6	1	0

Fr. : Fractions ; Sf : Sous-fractions ; Ac. : Acide

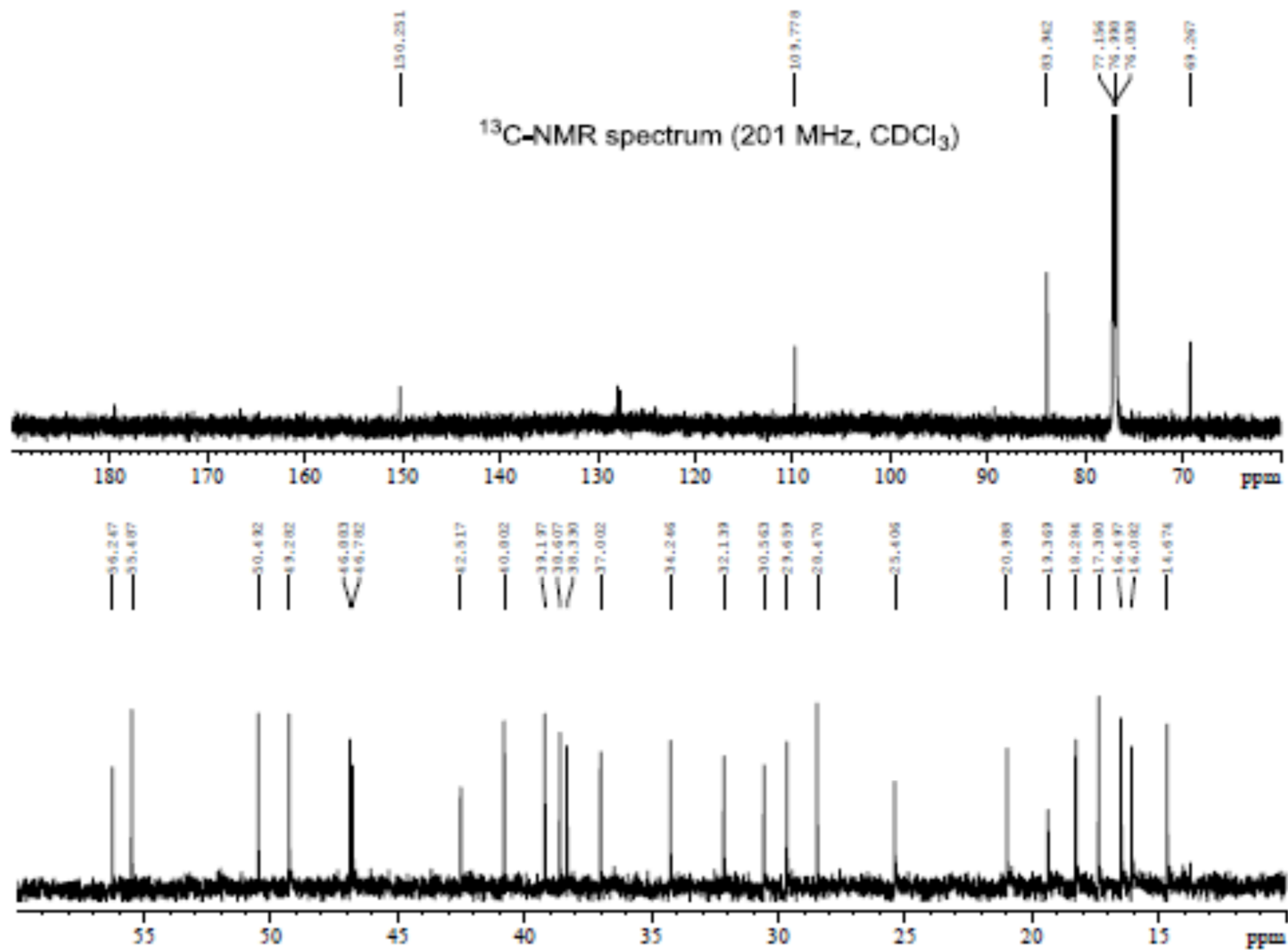
Annexe 3 : Données spectrales des composés isolés de l'extrait GLE

Acide alphaltolique

⊕ Spectre RMN ^1H

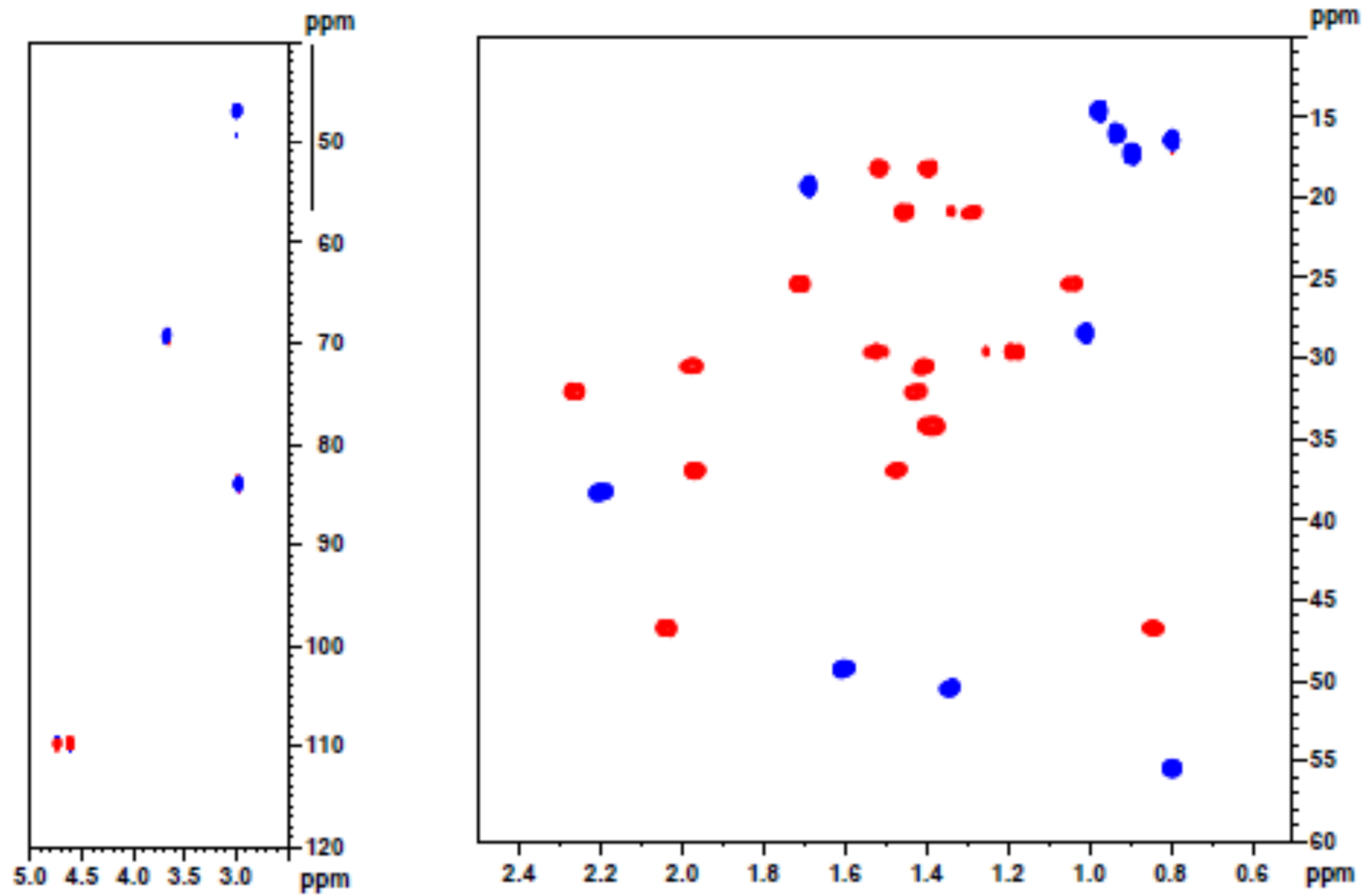


⊕ Spectre RMN ¹³C



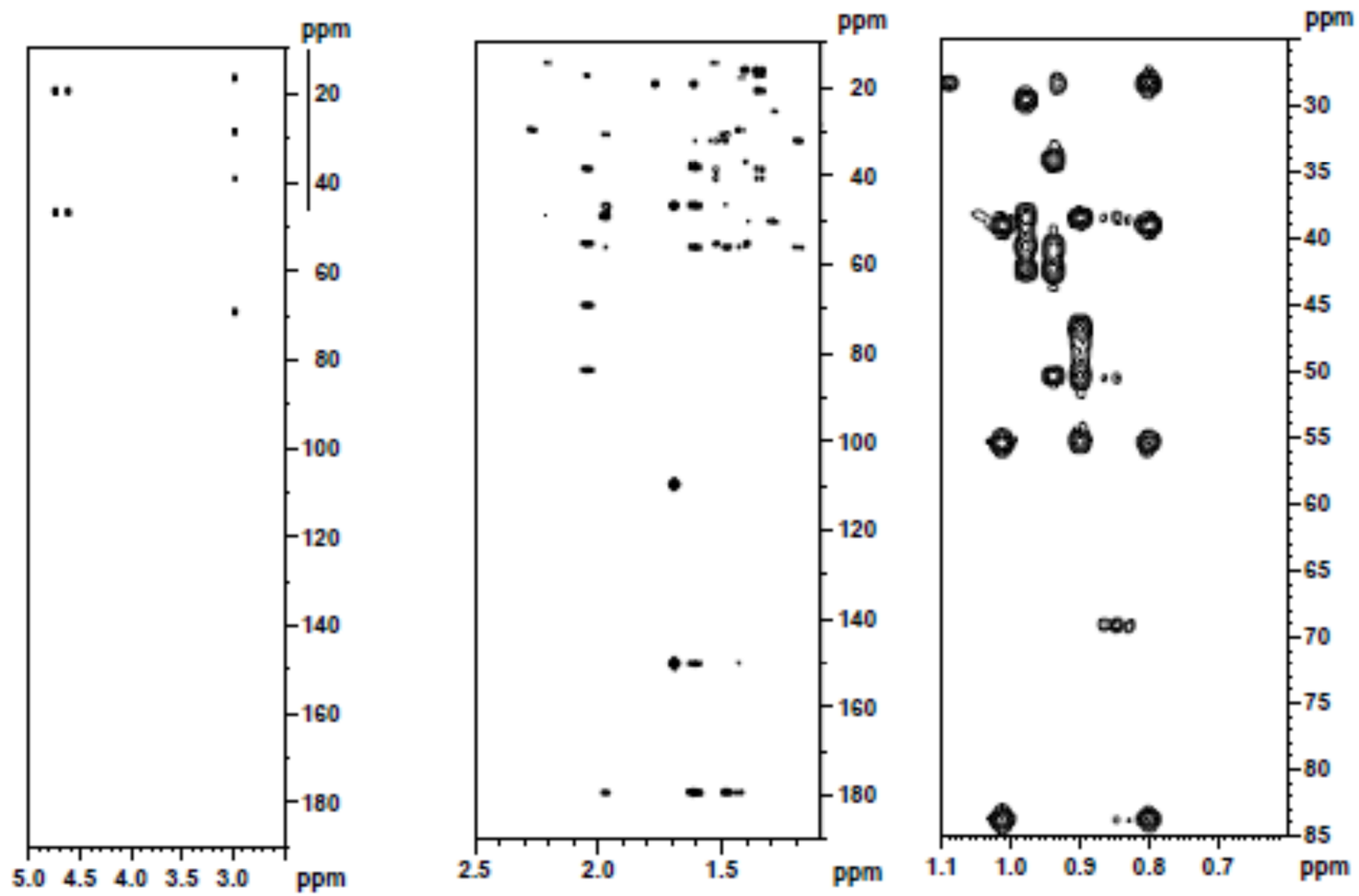
⊕ Spectre HSCQ-DEPT

HSCQ-DEPT spectrum (800 MHz, CDCl₃)



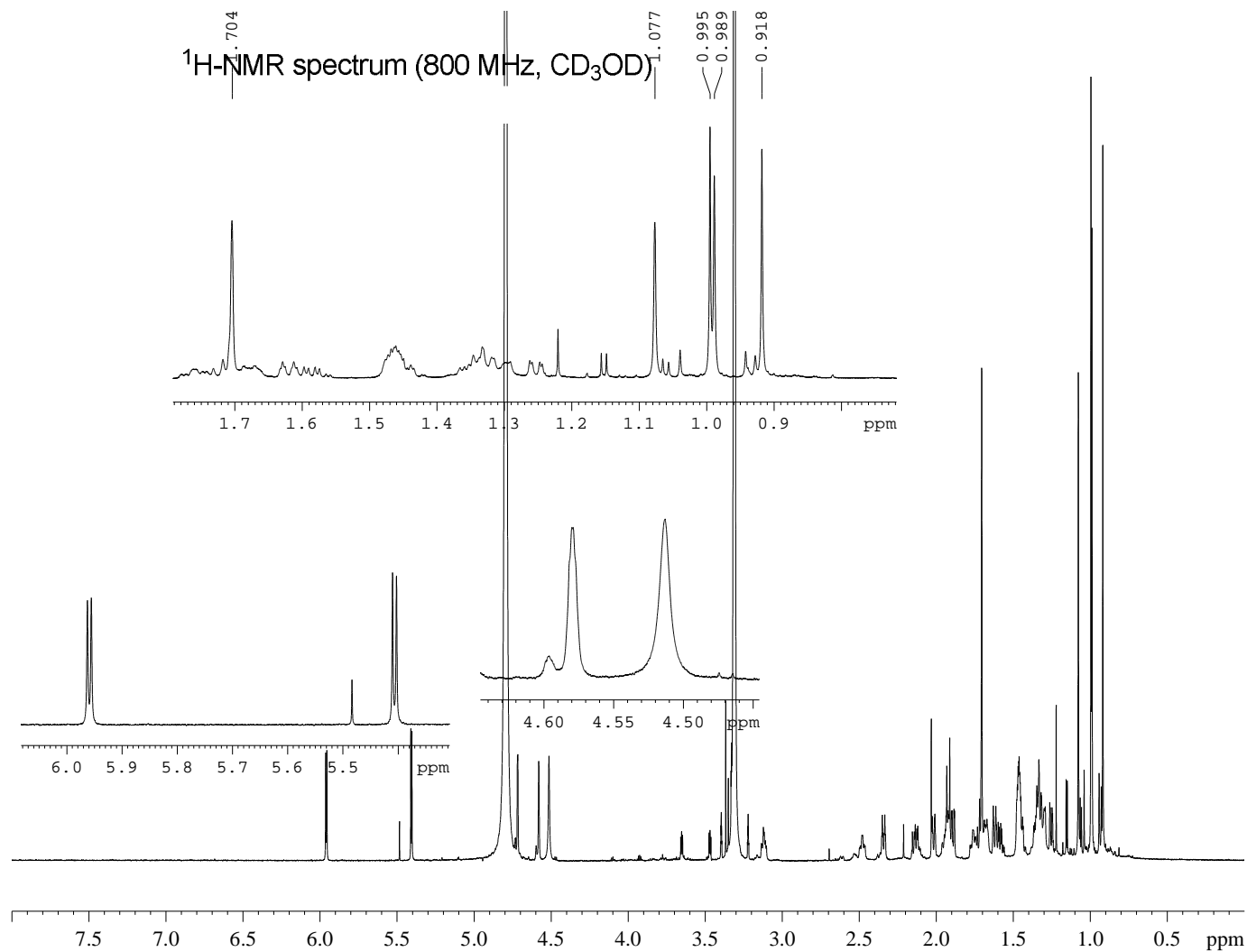
⊕ Spectre HMBC

HMBC spectrum (800 MHz, CDCl₃)



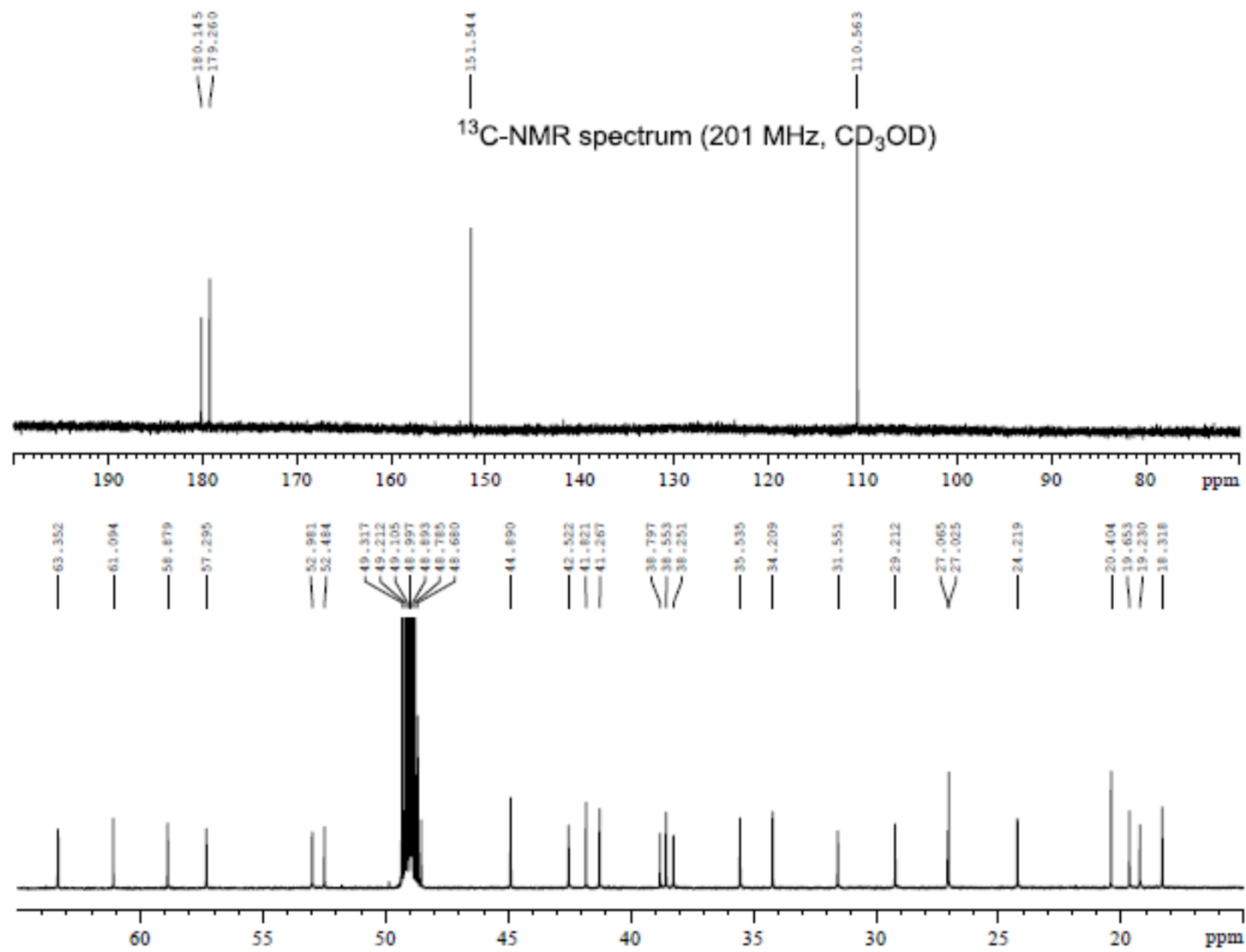
Acide épigouanique

⊕ Spectre RMN ^1H



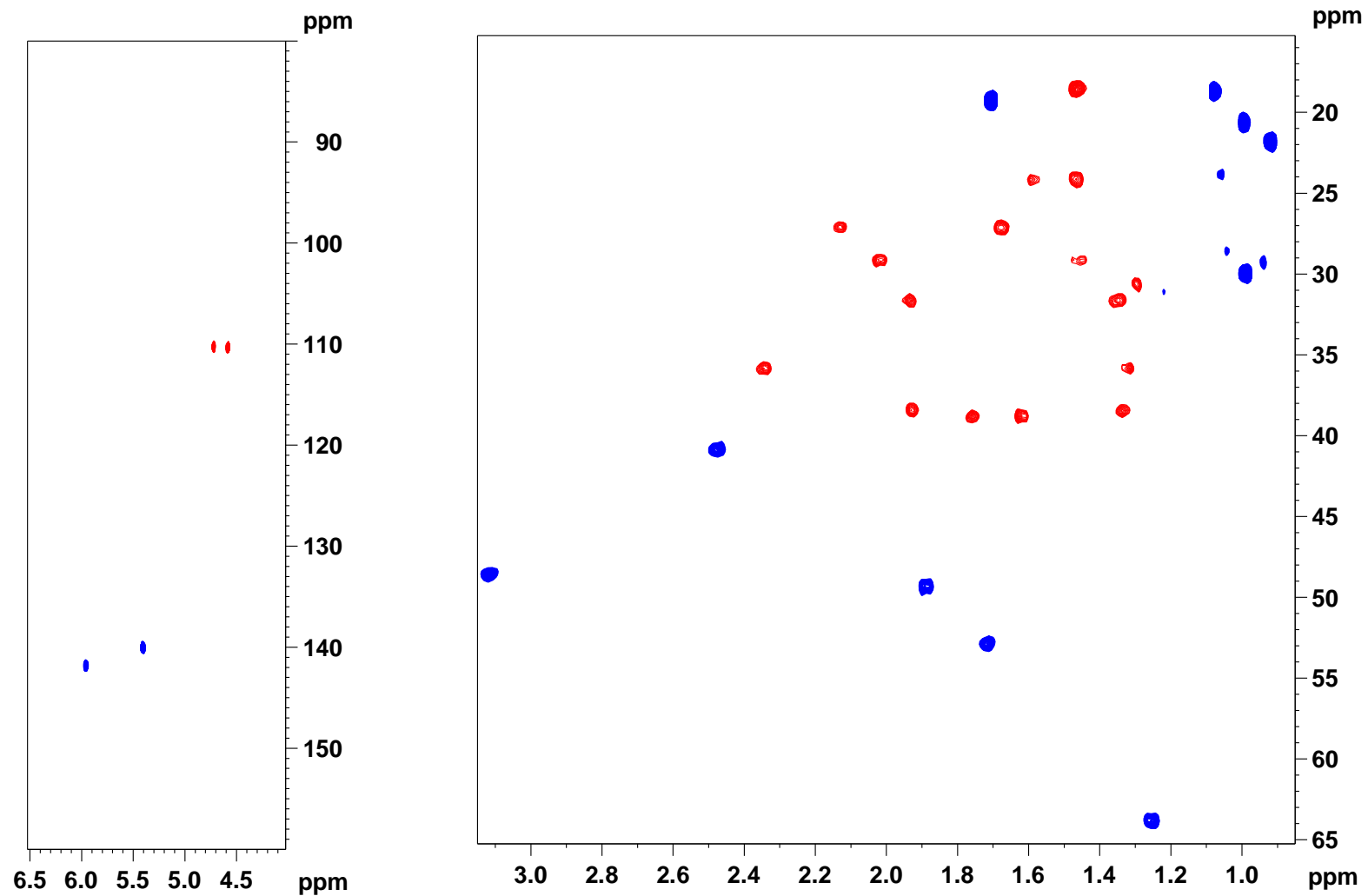
⊕ Spectre RMN ^{13}C

m



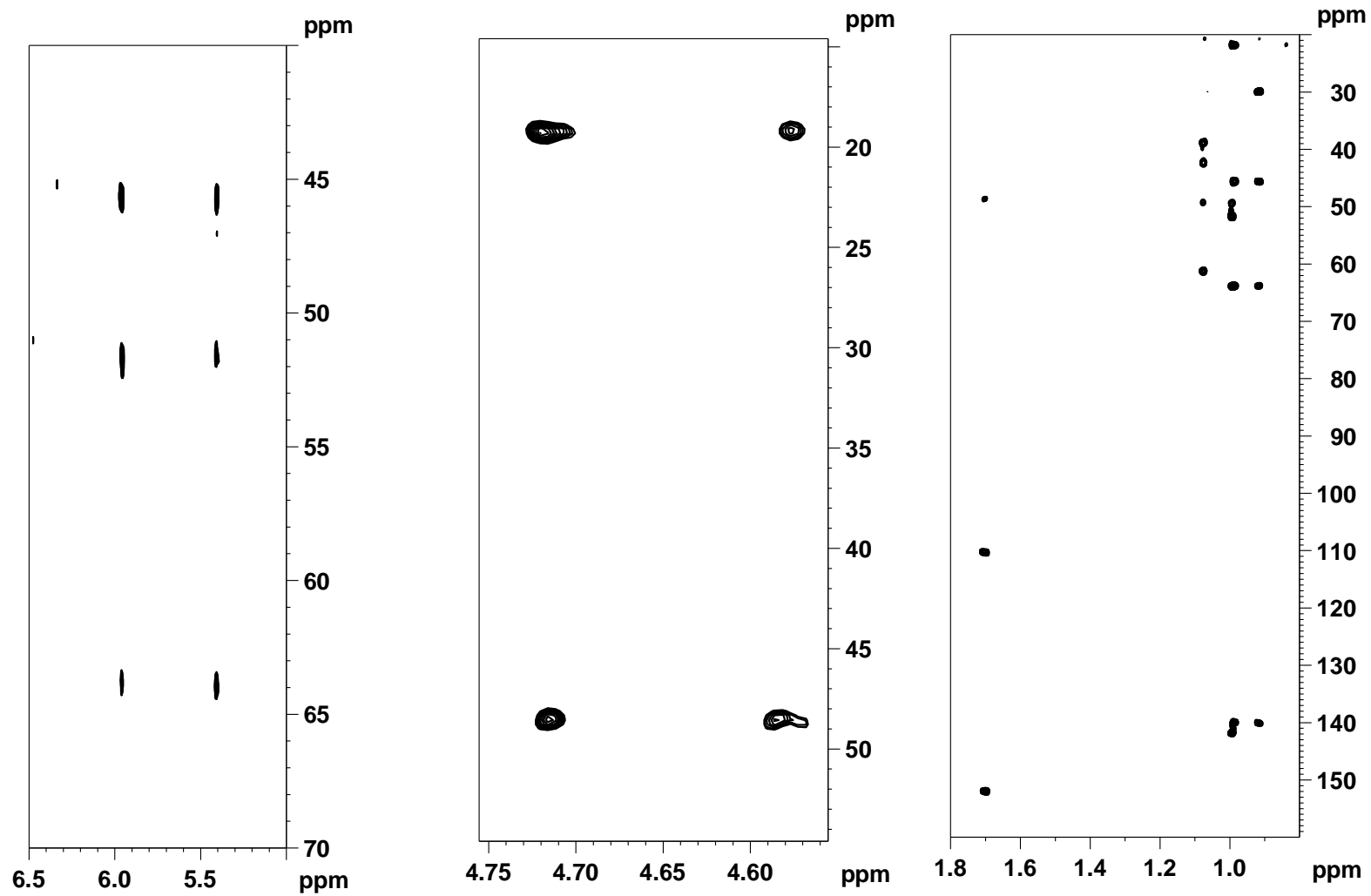
⊕ Spectre HSCQ-DEPT

HSCQ-DEPT spectrum (800 MHz, CD₃OD)



⊕ Spectre HMBC

HMBC spectrum (800 MHz, CD₃OD)



Annexe 4 : Droites d'étalonnage

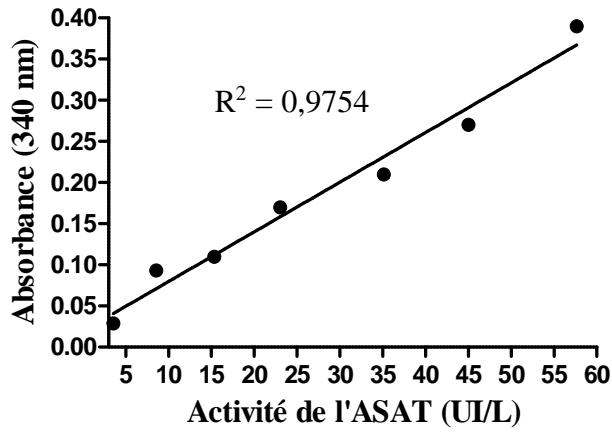
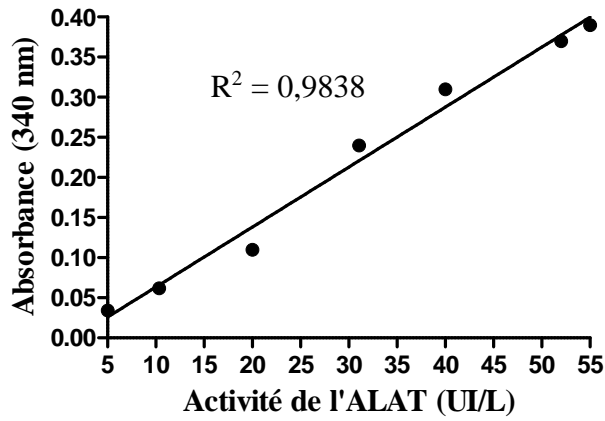


Figure 27 : Droites d'étalonnage pour le dosage de l'ALAT et l'ASAT.

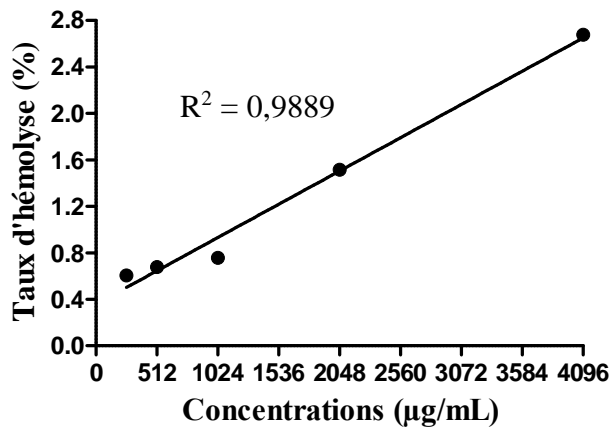


Figure 28 : Droite de régression exprimant le taux d'hémolyse en fonction de la concentration d'extrait GLE.

PUBLICATION



Share Your Innovations through JACS Directory

Journal of Natural Products and Resources

Visit Journal at <http://www.jacsdirectory.com/jnpr>

Effects on the Phagocytosis Modulation of Stems Extract and Triterpenes from *Gouania longipetala* (Hemsl.), A Plant of The Cameroonian Pharmacopeia

S.P. Bouopda Tamo^{1,*}, S.H. Riwom Essama², O. Ndogo Eteme³, T.J.L. Mundene⁴, J.M. Avina Ze⁵, E. Tchamgoue Ngalani², D.K. Setchaba⁶, B. Nyasse³, F.X. Etoa²

¹Department of Biochemistry, Laboratory of Microbiology, University of Yaounde I, Cameroon.

²Department of Microbiology, Laboratory of Microbiology, University of Yaounde I, Cameroon.

³Department of Organic Chemistry, Laboratory of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, University of Yaounde I, Cameroon.

⁴Department of Industrial Chemistry, High Technical Teachers' Training College, University of Douala, Cameroon.

⁵Integrated Health Center of Yambassa, Laboratory of Medical Analysis, Health District of Bafia, Ministry of Public Health, Cameroon.

⁶Department of Organic Chemistry, Laboratory of Organic Chemistry, Rhodes University, South Africa.

ARTICLE DETAILS

Article history:

Received 23 December 2018

Accepted 07 March 2019

Available online 17 April 2019

Keywords:

Gouania longipetala (Hemsl.)

Bioactive Compounds

Immunomodulation

Phagocytic Activity

ABSTRACT

Immunomodulatory therapy is now being recognized as an alternative to conventional chemotherapy for a variety of disease conditions, involving the impaired immune response of the host. The goal of this study is to valorize *Gouania longipetala* (Hemsl.) like potential source of drugs against immune system dysfunction. This medicinal plant is commonly used in the Cameroonian pharmacopeia to cure a lot of diseases including inflammatory diseases. In this work, we evaluated the immunomodulation properties of infused stems extract (GLE) and triterpenes from *G. longipetala* (Hemsl.), with respect to the phagocytosis. GLE was obtained by infusion of dry bark powder in water and the triterpenes were isolated after fractionation of GLE in solvent systems following by column chromatography. The structure elucidation of isolated compounds was based on analysis of spectroscopic data including 1D- and 2D-NMR. The immunomodulation activity was evaluated by two methods. Firstly, the capacity of GLE and triterpenes to modulate phagocytic activity of polymorphonuclear (PMNs) cells was assessed *in vitro* against *Candida albicans*. Secondly, the ability of GLE to modulate reticuloendothelial system was investigated *in vivo* on wistar rats by carbon clearance test. Two triterpenes were isolated, aliphatic and epigouanic acids. The stimulation percentage of PMNs by plant extracts was ranged between 4.25 and 42.55% with GLE and between 14.89 and 46.80% with aliphatic acid. Epigouanic acid show biphasic activity profile, with stimulation of phagocytic activity of PMNs cells at lower concentrations and suppression effects at higher concentrations. *In vivo* test showed that GLE liberates the glutathione particles from animal's liver and enhance the phagocytic activity by stimulating the reticuloendothelial system. The phagocytic index obtained was ranged between 0.020 ± 0.004 and 0.074 ± 0.006 . The results obtained from this study show that extract from *G. longipetala* (Hemsl.) modulate phagocytic activity and would be therefore the potential sources of drugs against immunological disorders.

1. Introduction

The immune system is designed to protect the host from invading pathogen and to eliminate disease [1]. It is involved in the etiology, as well as pathophysiological mechanisms of many infectious diseases. Susceptibility to microbial, allergic and other disorders is higher in immunodeficiency state. In such conditions, the immune system's ability to fight infectious disease is compromised or entirely absent [2]. Immunomodulatory therapy is now being recognized as an alternative to conventional chemotherapy for a variety of disease conditions, involving the impaired immune response of the host [3,4]. The concept of immunomodulation relates to nonspecific activation of the function and efficiency of macrophages, granulocytes, complement, natural killer cells and lymphocytes, and also to the production of various effectors molecules generated by activated cells. It is expected that these nonspecific effects give protection against pathogens and constitute an alternative to conventional chemotherapy [5,1]. Immunomodulators have been known to support T-cell function, activate macrophages, granulocytes, complement and natural killer cells apart from affecting the production of various effectors molecules generated by activated cells [6].

Many of the presently available immunomodulators, such as levamisole, glucans, telerons, L-fucose, as well as *Corynebacterium parvum* bacterium, show one or other side effects that include fever, neutropenia, leucopenia

and at times allergic reactions [7]. Hence, screening for new immunomodulators is an urgent need [8]. The search for more effective and safer agents exerting immunomodulatory activity is becoming a field of major interest all over the world [9]. Agents that regulate host defense mechanisms in the presence of an impaired or exaggerated immune responsiveness can provide supportive therapy to conventional chemotherapy [10,11].

Previous studies showed that some herbal medicine have immunomodulatory activities [12-14]. There are several herbs used in the indigenous systems of medicine that may modulate the body's immune system [15]. Herbal drugs are believed to enhance the natural resistance of the body against infection and their immunomodulatory activities have been reported in numerous plants extracts [16,17]. A variety of plant-derived materials such as lectins, peptides, phenolics, flavonoids, polysaccharides, tannins and saponins have been reported to modulate the immune system [15].

Several herbal preparations that can enhance the natural resistance of the body are extensively being used in the indigenous system of medicines [18,19]. Herbal preparations, originally used in the traditional systems of medicine, are now being investigated and effectively tried in a variety of pathophysiological states [20]. Medicinal plants are a rich source of substances which is the non-specific immunomodulation of essentially granulocytes, macrophages, natural killer and complement functions [21]. They are traditionally used to treat immune disorders, such as inflammatory and autoimmune diseases. Immunomodulation using medicinal plants can provide an alternative to conventional chemotherapy for a variety of diseases especially when host defense mechanism has to

*Corresponding Author: sylvainbouopda@gmail.com (S.P. Bouopda Tamo)

be acquired under the conditions of impaired immune responsiveness [22].

Gouania longipetala (Hemsl.) is a Rhamnaceae family plant commonly used in the Cameroonian pharmacopeia to cure a lot of diseases. Decoction of stems from this plant is traditionally used to treat stomach ache, gastrointestinal infections, malaria, skin diseases, gynecological complaints and pregnancy problems. The leaves are used for the treatment of swellings, edema venomous stings, gout, febrifuges. It is also used as genital stimulants, laxatives and for treatment of venereal diseases. The leaf sap is used for eye treatments, as pain killers and for treating heart diseases [23]. Some previous studies concerning the pharmacological values of this plant have been published. For example, Ekuadzi et al. [24] in their research shown that the stem of this plant possessed antibacterial and anti-inflammatory activities. Ezeja et al. [23] evaluated toxicity profile of methanol leaf extract of the plant in rats.

To the best of our knowledge, no scientific study concerning the immunomodulator effects of *G. longipetala* (Hemsl.) extracts have been reported in the literature. This study was undertaken to evaluate the capacity of stems extract and triterpenes from this plant to modulate the phagocytic activity.

2. Experimental Methods

2.1 Plant Collection and Identification

The stems of *Gouania longipetala* (Hemsl.) was harvested in Banbjoun village (West-Cameroon region, 5° 22' 31" Nord, 10° 24' 44" Est, 1515 m of altitude) on September 15th 2017. The botanical identification was done at the National Herbarium of Cameroon where a specimen was deposited on No. 60787/HNC.

2.2 Preparation of Plant Infusion

After harvest, the stems collected were cut in scraps and air-dried at room temperature away from moisture. They dried stems were then crushed using electric grinder. A weighed quantity of 4 kg of powder was deducted and added to 20 L of boiling distilled water. The mixture was left to stand at room temperature. After 20 min, the solution was filtered through Whatman No 1 filter paper and the filtrate was lyophilized. Extraction was repeated three times. The extract obtained was weighted and stored at 4 °C until use. This extract has been codified GLE.

2.3 Phytochemical Screening

Qualitative phytochemical tests were done on GLE according the standard test procedures described in the literature by Sofowora [25] and Harbone [26].

2.4 Purification of Compounds and Structure Elucidation

A mass of 700 g of GLE was dissolved in 1 L of distilled water and then a liquid-liquid fractionation was carried out in 500 mL volumes of *n*-hexane, CH₂Cl₂ and *n*-butanol, respectively. The various fractions obtained were filtered and concentrated in a rotary evaporator (Laborota 4000-efficient, Heidolph, Germany), and then oven-dried. A mass of 60 g of the *n*-hexane fraction was purified on silica gel column chromatography (4x150 cm, 250 g, 70-230 mesh) using *n*-Hexane/ethyl acetate (*n*-Hex/AcOEt) as elution system, with polarity increase of 10%. After elution, 158 sub-fractions of 100 mL were obtained.

Pre-coated silica gel 60 F254 thin layer chromatography plates (TLC, Merck, Germany) were used for monitoring fractions; spots were detected using UV light (254 and 365 nm) and sprayed with 30% sulphuric acid (H₂SO₄) followed by heating at 110 °C. Basing to their TLC profiles, these sub-fractions were regrouped in 6 fractions namely Sf1, Sf2, Sf3, Sf4, Sf5 and Sf6. The fractions Sf1 and Sf3 were further purified on CC using *n*-Hex/AcOEt elution system. After elution, 108 and 183 sub-fractions of 100 mL were obtained from Sf1 and Sf3, respectively. Based on their TLC profile, these sub-fractions were subsequently grouped into 4 fractions for Sf1 (Sf^{1a}, Sf^{1b}, Sf^{1c} and Sf^{1d}) and 6 fractions for Sf3 (Sf^{3a}, Sf^{3b}, Sf^{3c}, Sf^{3d}, Sf^{3e} and Sf^{3f}). The fractions Sf^{1b} and Sf^{3d} gave two compounds. The structure elucidation of these compounds was assessed by analysis of 1D (1H) and 2D (HSQC, HMBC) NMR spectra obtained at frequencies of 800 and 201 MHz, respectively.

2.5 Phagocytic Activity

2.5.1 In Vitro Phagocytic Activity of Polymorphonuclear (PMNs) Cells

The effect of *G. longipetala* extracts on immunomodulation of human polymorphonuclear cells was evaluated by the method described by Ponskshe and Madhavi [27], with little modifications. From a *Candida* <https://doi.org/10.30799/jnpr.073.19050101>

albicans culture of 24 hours on Sabouraud Dextrose Agar plate, the inoculum was prepared by suspending a pure colony of yeast in 1 mL of human serum 1:4 in salt solution NaCl 0.9%. The concentration of cell suspension was adjusted at 10⁸ UFC/mL by microscopy counting. Human blood (0.2 mL) was deposited on a sterile glass slide. Slides in triplicate were incubated at 35 °C for 25 min to allow clotting. The blood clot was removed and the slide drained carefully with normal saline. Monolayer of polymorphonuclear leucocytes was flooded with predetermined concentrations of the test extracts for 15 min at 37 °C. The PMNs were covered with *C. albicans* suspension for 1 hour. The slide was drained, fixed with methanol and stained with Giemsa stain [28]. The mean number of *Candida* cells phagocytosed by PMNs on the slide was determined microscopically for 100 granulocytes using standard morphological criteria [29]. This number was the percentage of phagocytosis (PP) and was compared with PP of control. The stimulation of the phagocytic activity of PMNs cells was calculated using the following equation:

$$\text{Stimulation (\%)} = [(\text{PP of test} - \text{PP of control}) / \text{PP of control}] \times 100$$

2.5.2 In Vivo Phagocytic Activity

2.5.2.1 Experimental Animals

Wistar rats weighting 135 ± 10 g were selected for the experiment. These animals were raised in the Animal House of Department of Animal Biology of the University of Yaounde I where, they were maintained under standardized condition (12 h light/dark cycles, room temperature of 22 ± 3°C). They were provided with conventional rodent laboratory diets and free access to drinking water *ad-libitum*. Prior the experimental tests, an authorization was obtained from the Cameroon National Ethical Committee. The experiment was performed according to the Animal Ethical Committee guidelines.

2.5.2.2 Carbon Clearance Test

Phagocytic activity of reticuloendothelial systems was assayed by carbon clearance test according the protocol described by Kehili et al. [30]. Animals were randomized into five groups containing 4 rats each; namely N, G0, G1, G2, G3 and G4. The treatment consisted to intra-peritoneal (i.p.) injection of the tested substance. The animals in group G0 (Control) were treated with 0.9% NaCl (0.5 mL/mouse), and those in groups G1, G2, G3 and G4 were administered with GLE at the concentrations of 25, 50, 100 and 200 mg/kg, respectively. After 48 h of i.p. injection, animals were administered with carbon ink suspension at a dose of 0.1 mL/10 g through the tail vein; the mixture consisted of 3 mL black carbon ink, 4 mL of saline and 4 mL of gelatin 3%. Blood samples (25 µL) were withdrawn from the retro-orbital plexus before injection and 10 minutes after injection of colloidal carbon ink capillary tube. The blood collected was then lysed in 0.1% sodium carbonate solution (Na₂CO₃, 4 mL) and the optical density of the solution obtained was measured at 675 nm. Animals in group N (native group) were no treated with plant extract and no administrated with carbon ink suspension. The phagocytic activity was expressed by the phagocytic index (K) which measures all the reticuloendothelial system function in the contact with the circulating blood. The clearance rate was also determinate and expressed as the half-life period of the carbon in the blood (t_{1/2}, min). These parameters are calculated using the following formulas [4]:

$$K = (\ln OD_1 - \ln OD_2) / (t_2 - t_1), t_{1/2} = 0.693 / K$$

where OD₁ and OD₂ are the optical densities at times t₁ and t₂ respectively.

2.5.2.3 Glutathione Assay (GSH)

The animals were sacrificed and after dissection, the liver was deducted. The weight of 1 g of the liver was homogenized in 2 mL of trichloroacetic acid TCA 5%. Then the homogenate was centrifuged at 2000 rpm for 20 min at 4 °C. The supernatant was deducted and used for the determination of glutathione reduced (GSH); following the method described by Ellman [31]. Briefly, 50 µL of the supernatant was diluted in 950 µL of phosphate buffer (0.1 M; pH = 8) and then 20 µL of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (0.01 M) was added to 3 mL of the obtained dilution. The optical density of this last solution was read at 412 nm against a blank prepared in the same condition with TCA 5%. The concentration of GSH was expressed in mmol of GSH/g of liver using a standard curve realized with glutathione in same conditions.

2.6 Statistical Analysis

All the results were expressed as the mean ± standard error. The statistical analysis and the diagrams were performed using SPSS Statistic 17.0 and GraphPad Prism 5 software. Differences between the means were

statistically compared by one-way ANOVA via Tukey's Multiple Comparison Test. The values were considered significantly different when * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

3. Results and Discussion

3.1 Extraction

The extraction yield of the infused *G. longipetala* stems extract (GLE) was 32.47%. The results obtained from phytochemical screening (Table I) showed that GLE contains metabolites groups like flavonoids, phenols, tannins, triterpenes, anthraquinones, anthocyanides, alkaloids, lignins, saponins, sugar, sterols coumarins and proteins. After successive fractionation of this extract on silica gel column chromatography, two triterpenes have been isolated, aliphilic and epigouanic acids.

Table 1 Chemical constituents of the infused *G. longipetala* stems extract (GLE)

Phytomolecules	Test procedures	Results
Phenols	Ferric chloride test	+ve
Flavonoids	NaOH test	+ve
Tannins	Ferric chloride test	+ve
Sterols	Liebermann-Burchard test	+ve
Triterpenoids	test	+ve
Lignins	Labat test	-ve
Alkaloids	Mayer test	+ve
Saponins	Foam test	+ve
Reducing sugar	Fehling's test	+ve
Anthocyanines	H ₂ SO ₄ test	-ve

+ve, Positive; -ve, Negative; GLE, *G. longipetala* infused stems extract

3.2 Characterization of Compounds Isolated

The structure elucidation of the compounds isolated was based on analysis of spectroscopic data obtained from 1D (¹H) and 2D (HSQC, HMBC) NMR spectra, at frequencies of 800 and 201 MHz, respectively. These data were compared to those mentioned in the literature by other authors concerning these compounds. The ¹H-NMR and ¹³C NMR data obtained from each compound are mentioned below. The ChemDraw Pro 8.0 Software for windows was used to draw the chemical structures of compounds isolated (Fig. 1).

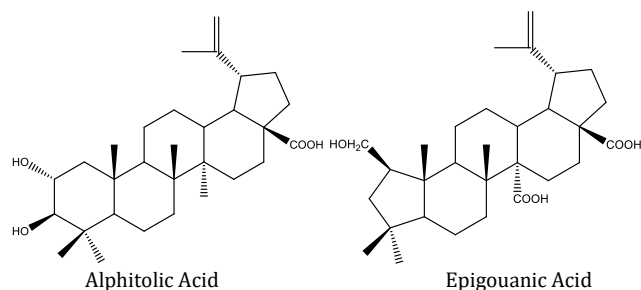


Fig. 1 Chemical structure of aliphilic acid and epigouanic acid

3.2.1 Aliphilic Acid

¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.80, 0.90, 0.94, 0.98 and 1.01 (5s, 15H, all tertiary -CH₃), 1.41 (m, 2H, H-21), 1.34 (m, 2H, H-16), 1.43 (m, 2H, H-20), 1.53 (m, 4H, H-18, H-19 and H-15), 2.20 (m, 3H, H-1 and H-9), 2.28 (m, 2H, H-14), 2.98 (t, 2H, J = 7 Hz, H-2), 3.51 (s, 1H, H-7), 4.52 (s, 2H, H-11), 4.74 (s, 2H, H-12).

¹³C NMR (CD₃OD, 201 MHz) δ (ppm): 39.19 (C-1), 69.26 (C-2), 83.94 (C-3), 39.19 (C-4), 56.24 (C-5), 18.28 (C-6), 34.24 (C-7), 40.80 (C-8), 50.49 (C-9), 38.33 (C-10), 20.98 (C-11), 25.40 (C-12), 38.60 (C-13), 42.51 (C-14), 32.13 (C-15), 34.24 (C-16), 56.24 (C-17), 46.88 (C-18), 49.28 (C-19), 150.25 (C-20), 29.65 (C-21), 30.56 (C-22), 28.47 (C-23), 17.38 (C-24), 16.49 (C-25), 16.08 (C-26), 14.67 (C-27), 179.51 (C-28), 109.77 (C-29), 19.36 (C-30).

3.2.2 Epigouanic Acid

¹H-NMR (800 MHz, CD₃OD): δ = H-1 (d, J = 8 Hz; 5.4); H-3 (d, J = 8 Hz; 5.96); H-5 (dd, J = 4.66, 9.23 Hz; 1.14); H-9 (d, J = 11.41 Hz; 1.88); H-13 (m, 2.41); H-18 (m, 1.69); H-19 (m, 3.3); H-23 (s, 1.04); H-24 (s, 0.91); H-25 (s, 0.98); H-26 (s, 1.07); Ha-29 (s, 4.58); Hb-29 (s, 4.52); H-30 (s, 1.70).

¹³C NMR (CD₃OD, 201 MHz) δ (ppm): 44.89 (C-1), 63.35 (C-2), 42.52 (C-3), 38.79 (C-4), 58.87 (C-5), 19.23 (C-6), 35.53 (C-7), 41.82 (C-8), 52.58 (C-9), 48.78 (C-10), 24.21 (C-11), 27.02 (C-12), 41.26 (C-13), 61.09 (C-14), 29.21 (C-15), 38.25 (C-16), 57.29 (C-17), 52.98 (C-18), 48.68 (C-19), <https://doi.org/10.30799/jnpr.073.19050101>

151.54 (C-20), 31.55 (C-21), 38.55 (C-22), 34.20 (C-23), 27.06 (C-24), 19.65 (C-25), 18.31 (C-26), 180.14 (C-27), 179.26 (C-28), 110.56 (C-29), 20.40 (C-30).

3.3 Phagocytic Activity

3.3.1 In Vitro Phagocytic Activity of Polymorphonuclear (PMNs) Cells

The capacity of *G. longipetala* extracts to modulate the phagocytic activity of human PMNs cells was tested against *Candida albicans* yeasts. The diagrams in Fig. 2 illustrate the phagocytosis and stimulation percentages obtained from the tested substances. These graphs show that the stimulation of phagocytic activity was observed with *G. longipetala* infused stems extract (GLE) and aliphilic acid with percentages of stimulation is ranged between 4.25 and 42.55% for GLE and between 14.89 and 46.80% for aliphilic acid. Epigouanic acid shows a biphasic activity profile. From this compound, a stimulation of the phagocytic activity of PMNs cells have been observed at the concentrations ranged between 5 μ g/mL (25.40 %) and 80 μ g/mL (25.53 %), and a suppression activity has been observed between 160 μ g/mL (- 12.76 %) and 640 μ g/mL (- 14.89 %). At the concentrations tested, aliphilic acid exhibited the highest stimulatory activity at the concentration of 640 μ g/mL (46.80%).

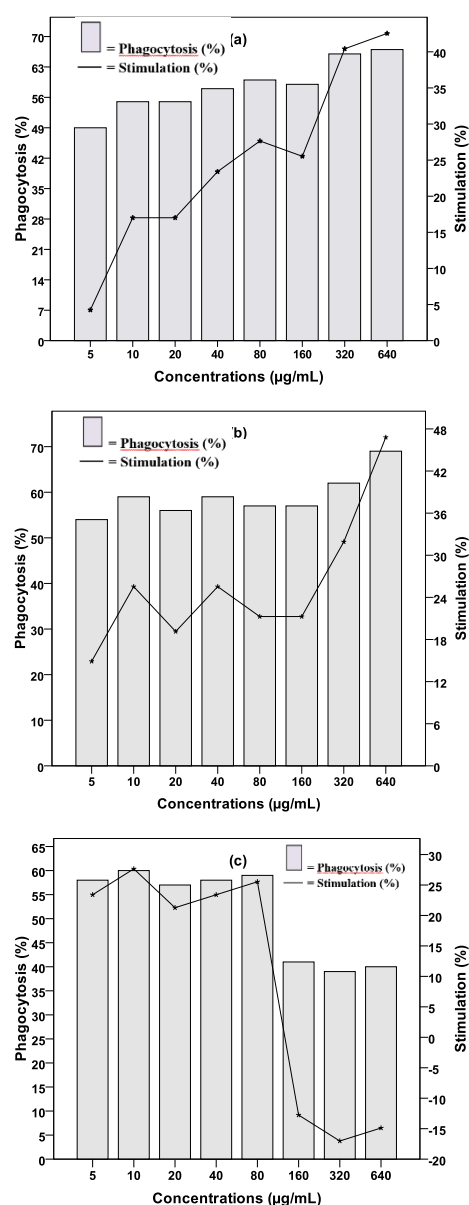


Fig. 2 Immunomodulator effects of *G. longipetala* infused stems extract (a), aliphilic acid (b) and epigouanic acid (c) on human polymorphonuclear cells

3.3.2 Carbon Clearance Test

The ability of infused *G. longipetala* stems extract (GLE) to enhance phagocytic activity was tested on Wistar rats by carbon clearance test. The Fig. 3 shows that the means for the phagocytic index (K) obtained from

animal groups treated with GLE (G1, G2, G3, G4) and control group (G0) is ranged between 0.020 ± 0.004 and 0.074 ± 0.006 . Compared to control group G0 ($K = 0.020 \pm 0.004$), the phagocytic index (K) was significantly increase with groups G2 ($K = 0.040 \pm 0.004$, $P < 0.01$), G3 ($K = 0.071 \pm 0.008$, $P < 0.001$) and G4 ($K = 0.068 \pm 0.009$, $P < 0.001$). After 48 h of intra peritoneal injection (Fig. 4), the clearance rate of carbon was decreased to 35.971 ± 9.127 (group G0) at 9.868 ± 1.167 min (group G3) and the decreasing become significant from the concentration of 50 mg/kg of GLE (group G2, $P < 0.05$). The half time of colloidal carbon was significantly different in test groups G2 ($t_{1/2} = 17.426 \pm 1.967$ min, $P < 0.01$), G3 ($t_{1/2} = 9.868 \pm 1.167$ min, $P < 0.001$) and G4 ($t_{1/2} = 10.230 \pm 1.492$ min, $P < 0.001$), compared to control group G0 ($t_{1/2} = 35.971 \pm 9.127$ min). The results obtained from the evaluation of the glutathione reduced content in the animal's liver (Fig. 5) show that the glutathione values are ranged between 2.100 ± 0.311 and 0.730 ± 0.107 mmol/g of liver. There was a significant difference between control group G0 and test groups G3 and G4 ($P < 0.001$). These results show that GLE liberates the glutathione particles from liver and enhance the phagocytic activity by stimulating the reticuloendothelial system.

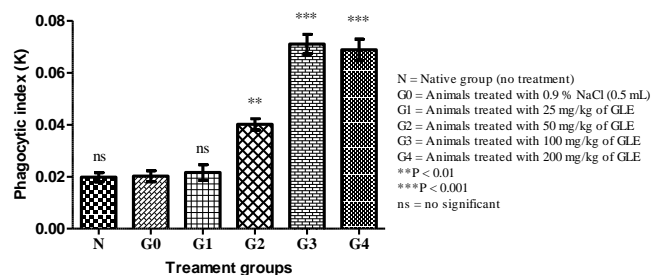


Fig. 3 Effect of *G. longipetala* infused stems extract (GLE) on phagocytic index (K)

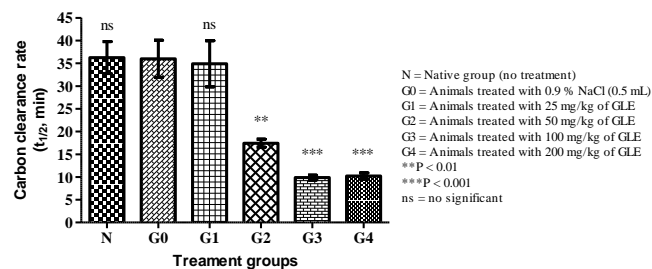


Fig. 4 Effect of *G. longipetala* infused stems extract (GLE) on carbon clearance rate

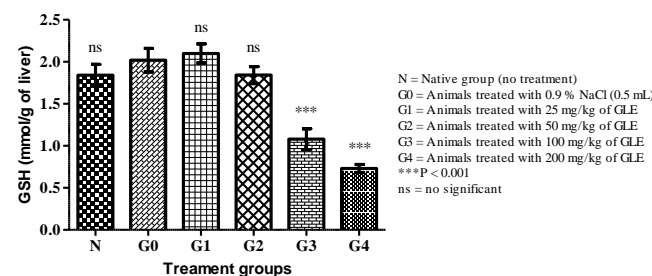


Fig. 5 Effect of *G. longipetala* infused stems extract (GLE) on glutathione reduced (GSH)

Active phagocytosis is the major defense mechanism against infection [32]. It is one of the most important host defense mechanism against invading microorganisms. Among phagocyte cells, there are polymorphonuclear neutrophils (PMNs) cells and macrophages. PMNs cells are the most abundant [33]. They are predominantly important in the removal of invading organisms from the body. They engulf these foreign bodies and degrade them using their powerful enzymes [9]. Macrophages are mononuclear phagocytes that contribute to development and homeostasis of immune response. They are highly phagocytic and, in this capacity, have long been considered to be essential immune effector cells [34]. The clearance rate of granular foreign bodies from circulation reflects the phagocytic function of macrophages [32]. The immune system dysfunction is responsible for various diseases like allergy, asthma, arthritis and cancer. So, modulation of immune responses too much required to controlling the various diseases [9]. This study was carried out in order to evaluate the ability of *G. longipetala* (Hemsl.) extracts to modulate phagocytic activity of human PMNs cells and macrophages.

Firstly, the phagocytic activity modulation of human PMNs cells by infused *G. longipetala* stems extract (GLE) and triterpenes isolated was tested against *Candida albicans* yeasts. Stimulation of the phagocytic

activity of human PMNs cells was observed with GLE and aliphatic acid at the concentrations tested. The stimulation percentage is ranged between 4.25 and 42.55% with GLE and between 14.89 and 46.80% with aliphatic acid. These compounds could be the potential agents for development of new drugs against immunosuppression. Epigouanic acid shows a biphasic activity profile with stimulation of phagocytic activity at lower concentrations and its suppression at higher concentrations. This suggests that this compound may act as cytotoxic agent at higher concentrations but can also act as immunostimulant when applied in small doses [27]. Stimulation or suppression of the immune response through may help in maintaining a disease-free state [10,11]. These compounds could be exploited in the development of new drugs with immunomodulatory activity.

In this study, we also tested the capacity of GLE to enhance activity of the reticuloendothelial system in Wistar rats. Measurement of the activity of the reticuloendothelial system depends upon estimation of the rate of clearance from the blood of foreign materials, such as colloidal carbon [35,4]. The carbon clearance test was conducted to establish phagocytic activity of reticuloendothelial system after treatment of animals with increasing doses of GLE. The phagocytic index obtained from animal groups is ranged between 0.020 ± 0.004 and 0.074 ± 0.006 . Compared to control group, the phagocytic index was significantly increase in animals treated with GLE ($P < 0.01$, $P < 0.001$). After 48 h of i.p injection, the clearance rate of carbon was significantly decreased to 35.971 ± 9.127 at 9.868 ± 1.167 min. This reflects the enhancement of the phagocytic activity of mononuclear macrophage and non-specific immunity, which includes opsonisation of the foreign particulate matter with antibodies and complement C3b, leading to a more rapid clearance of foreign particulate matter from the blood [36]. Macrophages probably secrete a number of cytokines which in turn stimulate other immunocyte [27]. The results also show that the half time of colloidal carbon was significant decreased in test animals compared to control group ($P < 0.01$, $P < 0.001$); this means that GLE enhance the phagocytic activity by stimulating the reticuloendothelial system. Moreover, glutathione reduced content in the animal's liver was significant decreased in test animals. This shows that GLE liberates the glutathione particles from animal's liver. Glutathione is a major antioxidant and a vital component of host defenses. In addition to protecting against free radical injury, it is important in the activation of lymphocytes, critical for the function of natural killer cells and lymphocyte-mediated cytotoxicity, and may have a role in the protection of neutrophils and macrophages against oxidative damage [37,30]. The immunostimulant activity of GLE may be attributed to his phytoconstituents.

In fact, the phytochemical screening realized on GLE showed the relatively presence of secondary metabolites among which flavonoids, phenols, tannins, triterpenes, anthocyanides, alkaloids, saponins, sugar and coumarins. Most of these metabolites have already been cited in the literature for their immunomodulatory activities. For example, flavonoids like flavonols have been reported to stimulate human peripheral blood leukocyte proliferation. They significantly increase the activity of helper t cells, cytokines, interleukin 2, gama-interferon and macrophages [8]. Furthermore, many bioactive compounds isolated from plants such as syringing, curcumin, flavopiridol, combretastatin and lycopene are mentioned in literature for their immunomodulatory effects [38,39].

Immunomodulation is the changes in the body's immune system caused by the agents that activate or suppress its function [40]. The results obtained from this study indicate that infused stems extract and triterpenes from *Gouania longipetala* (Hemsl.) modulate phagocytic activity and could be used as potential immunomodulator agents.

4. Conclusion

In this study, we evaluated the immunomodulatory effects of infused stems extract and triterpenes from *Gouania longipetala* (Hemsl.), a plant of the Cameroonian pharmacopeia. The results obtained support the use of extracts from this plant like potential sources of new drugs to fight against immunological dysfunctions. *Gouania longipetala* infused stems extract and triterpenes isolated have shown significant effects on non-specific immune response by enhancing the phagocytic activity. Further detailed studies will be helpful in elucidating the mechanism of immunomodulation by this plant. This study provides an agreement about the use of medicinal plants for the treatment of immune-related diseases.

Acknowledgment

The authors are thankful to Laboratory of Animal Biology of University of Yaounde I for providing the space for *in vivo* tests and the Honorable Deputy Albert Kouinche for his help in financing this work.

References

- [1] S. Rokeya, K. Salma, D. Kshama, Immunomodulatory effect of methanol extract of *Solanum xanthocarpum* fruits, *Int. J. Pharma Sci. Res.* 2(2) (2011) 93-97.
- [2] B. Neelam, B. Subhash, V. Mohan, T. Prasad, Modulatory activity of a polyphenolic fraction of *Cinnamomum zeylanicum* L. bark on multiple arms of immunity in normal and immunocompromised mice, *Jour. Appl. Pharm. Sci.* 4(7) (2014) 114-122.
- [3] S. Upadhaya, Therapeutic potential of immunomodulatory agents from plant products, In *immunomodulation: Narosa publishing house, Delhi, 1997*, pp.149-150.
- [4] B. Assia, Z. Sakina, L. Souheila, K. Zahia, Immunostimulatory activity of *Stachys mialhesi* de Noé, *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 9 (2013) 2-4.
- [5] A. Vigila, X. Baskaran, Immunomodulatory effect of coconut protein on cyclophosphamide induced immune suppressed Swiss Albino mice, *Ethnobot. Leaflet.* 12 (2008) 1206-1212.
- [6] H. Wagner, H. Kraus, K. Jurcic, Search for potent immune stimulating agents from plants and other natural sources, In *Immunomodulatory agents from plants*, H. Wagner (Ed.), Birkhauser verlag Basel, Switzerland, 2003.
- [7] C. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Schlomchik, Basic concepts of immunology, In: *Immunobiology*, E. Lawrence (Ed.), Current Biology, London, 1996.
- [8] S. Kawakita, H. Giedlin, K. Nomoto, Immunomodulators from higher plants, *J. Nat. Med.* 46 (2005) 34-38.
- [9] P. Nagarathna, K. Reena, R. Sriram, W. Johnson, Review on immunomodulation and immunomodulatory activity of some herbal plants. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 22(1) (2013) 223-230.
- [10] H. Wagner, A. Proksch, Immunomodulatory drugs of fungi and higher plant in economic and medicinal plant research, Academic Press, London, 1983.
- [11] A. Tilwari, P. Narmada, D. Uma, Immunomodulatory activity of the aqueous extract of seeds of *Abrus precatorius* Linn (Jequirity) in mice, *Iran. J. Immunol.* 8(2) (2011) 96-103.
- [12] C. Su, X. Xu, D. Liu, M. Wu, F. Zeng, et al., Isolation and characterization of exopolysaccharide with immunomodulatory activity from fermentation broth of *Morchella conica*, *Daru. Jour. Faculty Pharm.* 21(5) (2013) 1-6.
- [13] A. Azadmehr, R. Hajiaghaee, M. Zohal, G. Maliji, Protective effects of *Scrophularia striata* in ovalbumin-induced mice asthma model, *Daru. Jour. Pharm. Sci.* 21(56) (2013) 1-6.
- [14] A. Abbas, L. Robabeh, M. Sahar, H. Reza, S. Mojtaba, Immunomodulatory effects of *Ziziphora tenuior* L. extract on the dendritic cells, *Daru J. Pharm. Sci.* 22(63) (2014) 1-6.
- [15] S. Pattanayak, P. Mazumder, Immunomodulatory activities of *Dendrophthoe falcata* (L.f) ettingsh in experimental animals: *In vitro* and *In vivo* investigations, *J. Sci. Res.* 3(3) (2011) 619-630.
- [16] C. Atal, M. Sharma, A. Khariya, Immunomodulating agents of plant origin, *J. Ethnopharmacol.* 18 (1986) 133-141.
- [17] A. Geoffrey, C. Angerhofer, M. Pezzuto, Recent studies on cytotoxic anti-HIV and antimalarial agents from plants, *Pure Appl. Chem.* 66(10/11) (1994) 2283-2286.
- [18] C. Atul, M. Sharma, A. Kaul, A. Khajuria, Agents of plant origin: Preliminary screening, *J. Ethnopharmacol.* 18 (1986) 133-141.
- [19] C. Ankur, C. Aadarsh, M. Ashish, M. Shilpi, U. Patil, Evaluation of the immunomodulatory activity of methanolic and ethanolic extract of leaves of *Aegle marmelos* in rats, *Int. J. Drug Dev. Res.* 2(3) (2010) 664-668.
- [20] L. Shah, S. Patil, J. Patil, Observation on clinical evaluation of indigenous herbal drugs in the treatment of mental illness, *Ind. J. Pharmacol.* 29 (1997) 347-349.
- [21] K. Sainis, P. Sumariwalla, A. Goel, G. Ghintalwar, A. Sipahimalani, A. Banerji, Immunomodulatory properties of stem extracts of *Tinospora cordifolia*: cell targets and active principles. In: *Immunomodulation*, S.N. Upadhyay (Ed.), Narosa Publishing House, New Delhi, 1997.
- [22] D. Vattem, K. Shetty, Biological function of ellagic acid: A review, *J. Food Biochem.* 29 (2005) 234-266.
- [23] M. Ezeja, O. Aruh, U. Isaac, Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats, *J. Ethnopharmacol.* 151 (2014) 1155-1164.
- [24] E. Ekuadzi, A. Dickson, C. Theophilus, Antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Gouania longipetala* Hems!, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 3(5) (2012) 1300-1305.
- [25] A. Sofowora, Medicinal plants and traditional medicine in Africa, Spectrum Books Ltd., Ibadan, 1993.
- [26] J. Harbone, Phytochemical methods, A guide to modern technique of plants analysis, 3rd Ed., Chapman and Hall, London, UK, 1998.
- [27] C. Ponskhe, M. Madhavi, *In vivo* and *in vitro* evaluation of immunomodulatory activity of three marine animal extracts with reference to phagocytosis, *India, J. Experiment. Biol.* 40 (2002) 1399-1402.
- [28] K. Brune, L. Schmid, M. Glatt, B. Minder, Correlation between antimicrobial activity and peroxidase content of leukocytes, *Nature* 245 (1973) 209-210.
- [29] G. Biozzi, B. Benacerraf, B. Halpern, Quantitative study of granuloplectic activity of the reticulo-endothelial system, *J. Experiment. Biol.* 34(4) (1953) 441-457.
- [30] H. Kehili, Z. Sakina, K. Zahia, Immunostimulatory activity of *Phoenix dactylifera*, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6(3) (2014) 73-76.
- [31] U. Kumar, C. Manjunath, T. Thaminzhmani, R. Kiran, Y. Brahmaiah, A review on immunomodulatory activity plants, *Ind. J. Novel. Drug. Deliv.* 4(2) (2012) 93-103.
- [32] A. Tripathi, V. Chitra, N. Sheikh, D. Mohale, A. Dewani, Immunomodulatory activity of the methanol extract of *Amorphophallus campanulatus* (Araceae) tuber, *Trop. J. Pharm. Res.* 9(5) (2010) 451-454.
- [33] E. Kolaczowska, P. Kubes, Neutrophil recruitment and function in health and inflammation, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 159-175.
- [34] V. Sunitha, M. Sunil, E. Radhakrishnan, M. Jyothis, Immunomodulatory activity of *Caesalpinia sappan* L. extracts on peritoneal macrophage of albino mice, *Int. J. Sci. Res.* 4(12) (2015) 449-452.
- [35] G. Sener, Protective effect of beta-glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis, *Int. Immunopharmacol.* 5(9) (2005) 1387-1396.
- [36] R. Furthvan, B. Bergvanden, Clinical immunology, Gower Medical Publishing, London, 1991.
- [37] W. Hong, J. Rounds, S. Helton, K. Robinson, W. Wilmore, Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury, *Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts.* 215(2) (1991) 114-119.
- [38] U. Sharma, M. Bala, N. Kumar, B. Singh, R. Munshi, S. Bhalerao, Immunomodulatory active compounds from *Tinospora cordifolia*, *J. Ethnopharmacol.* 141(3) (2012) 918-926.
- [39] W. Tang, E. Chan, C. Kwok, Y. Lee, J. Wu, et al., A review of the anticancer and immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* fruit, *Inflammopharm.* 20(6) (2012) 307-314.
- [40] A. Swapnali, J. Ujwala, Immunomodulatory activity of *Carcum copticum* leaf extracts, *Biomed. Pharm. J.* 3(1) (2010) 273-275.