

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

**ACTIVITES ANTIFONGIQUE, ANTIRADICALAIRE,
ANTI-INFLAMMATOIRE ET CYTOTOXIQUE DES
HUILES ESSENTIELLES DE QUELQUES PLANTES
MEDICINALES DE LA FAMILLE DES ANNONACEAE
DU TCHAD ET DU CAMEROUN**

Doctorat/Ph.D en Biochimie

Par :

BAKARNGA-VIA ISSAKOU
Master Biochimie

Sous la direction
JAZET DONGMO Pierre Michel
Maître de Conférences

Année Académique
2014-2015





AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire de Yaoundé I. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : biblio.centrale.uyi@gmail.com

WARNING

This document is the fruit of an intense hard work defended and accepted before a jury and made available to the entire University of Yaounde I community. All intellectual property rights are reserved to the author. This implies proper citation and referencing when using this document.

On the other hand, any unlawful act, plagiarism, unauthorized duplication will lead to Penal pursuits.

Contact: biblio.centrale.uyi@gmail.com

DEDICACE

Je dédie ce travail à:

Dieu l'Éternel,

Mon feu père AKONSO BAKARNGA job et mes feus frères SAMBA AINSO
AKONSO Mathias, AMBERA BAKARNGA Antipas.

Ma mère NGALBEGUE OUADAÏ Ruth

Mon épouse Dissa BERMENDORA

Mes enfants : BAKARNGA-VIA Kouahir flacklin, BAKARNGA-VIA Mbealebi
Gnassou Eric, BAKARNGA-VIA Halndouara Kindo Martinien et MAMERE Ruth Lauve.

REMERCIEMENTS

Tout travail de recherche, au-delà de l'effort personnel de l'impétrant, est certes le fruit d'une formation mais aussi d'encouragements, de conseils, de collaborations et de soutiens.

Aussi m'est-il particulièrement agréable d'évoquer ceux qui, d'une manière ou d'une autre ont contribué à mon cheminement scientifique, puis à l'aboutissement de cette thèse.

Je pense:

- Au **Pr. FEKAM BOYOM Fabrice**, responsable du Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes Médicinales pour m'avoir accueilli et accepté de superviser ce travail. Il a su par son aimable attention, son expérience, ses conseils et ses encouragements m'imprégner le goût de la recherche. Qu'il reçoive l'expression de ma profonde gratitude.
- Au **Pr. JAZET Pierre Michel**, Directeur de cette thèse, pour sa disponibilité et sa rigueur scientifique marquées par des orientations et critiques pertinentes. Recevez par ce travail Monsieur, toute ma reconnaissance.
- Au **Pr. MOUNDIPA FEWOU Paul**, Chef de Département de Biochimie, pour les efforts consentis pour notre formation, je tiens à vous exprimer toute ma gratitude.
- Aux **Enseignants du Département de Biochimie** de l'Université de Yaoundé I qui ont contribué à ma formation. Trouvez en ce travail toute ma reconnaissance.
- Au **Pr. MENUT Chantal** de l'Université de Montpellier I (France). Au cours de mes stages dans votre laboratoire, vous m'avez inlassablement suivi, soutenu et conseillé, malgré vos multiples occupations, soyez rassurée de mon sincère dévouement.
- Au **Dr. GARCIA Marcel, Dr. MAGALI Gary-Bobo et Dr. GALLUD Audrey** du Laboratoire de Biochimie Métabolique et Clinique de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de l'Université de Montpellier I(France) pour leurs soutiens, conseils et orientations pendant les manipulations.
- Aux **Membres du Jury** de cette thèse, pour vos critiques, vos suggestions et vos remarques qui contribueront à l'amélioration de la qualité scientifique de ce travail, recevez toute ma gratitude.
- Au **Dr. NGOUANA Vincent, Dr. TSOUH FOKOU Patrick Valère et Dr. NGOUANA Thierry**, pour leur assistance et leurs conseils durant ce travail.

- Au **Dr. TSABANG Nole, M. NANA Victor** et **M. SECKA Youssouf** pour m'avoir assisté lors de la collecte et l'identification des plantes du Tchad et du Cameroun.
- Aux aînés : **DONGMO Mireille, DONKENG DONFACK Valérie, TAFFOU** pour leur soutien, leur disponibilité, pour ce travail.
- Aux camarades de la promotion et à toute la fabuleuse équipe du Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes Médicinales pour la collaboration. Je pense à **HZOUNDA FOKOU Jean Baptiste, TCHOKOUAHA Lauve, NGOUTANE Alvine, ZEUKO'O MENKEM Elisabeth, MEJIATO Pascaline, KENFACK Ide Flavie, SIMO Marguerite, KENGNI Hubert, EKE PIERRE, TOGHUEO KOUIPOU Rufin Marie, JIATSA MBOUNA Cédric Dérick, NGUEMNANG MABOU Lile, CHETCHUEN KUISSI Line, BEDINE BOAT Marie Ampères, NGONGANG TCHONANG Danièle, NGO MBACK Madeleine, YOUMSI FOKOUO Roger Ducos, MADJOUMOUO Michele Stella, CHATUE CHATUE Gael, NJAMPA Cyrille, MARIE JESUS Arc-en-Ciel** et **MBEUKOU Michèle**.
- Aux **familles** qui m'ont accordé leur soutien multiforme. Il s'agit de :
 - **M. BERMENDORA Jacob**, son épouse **DOUDOU Béatrice** et ses enfants ;
 - **M. OUADAI**, ses fils et petits fils ;
 - **M. SECKA Youssouf** et sa famille ;
 - **M. BANBOH Titous** et sa famille ;
 - **M. KOKO Jackson** et sa famille ;
 - **M. DOKSONE PORGOH Victor** et sa famille ;
 - **M. AYAKMO Ernest** et sa famille ;
 - **M. EBAH Abraham** et sa famille ;
 - **M. AHMAT AL-MOUDASSIR Abdallah** et sa famille ;
 - **Pr. ANDOSSA Likius**, son épouse **Abichai** et ses enfants ;
 - **Dr. WALBADET Lucain**, son épouse **Nomosso** et ses enfants ;
 - **Dr. BOGOL Joseph** et sa famille ;
 - **DIRGUI, BADOU, AGDET, BANDA, MOPENG, PASSANET, TAMEGUE, TAPOHOL, ADISSO, FADEL, MADAI, MAHAMAT** et **NGUEANDE**.

REMERCIEMENTS POUR L'APPUI FINANCIER, MATERIEL ET LOGISTIQUE

Qu'il me soit permis de remercier du fond du cœur, ceux qui ont contribué par un appui financier, matériel et logistique, à l'élaboration et la réalisation de ce travail, il s'agit :

- De l'Université Adam Barka d'Abeché (UNABA), pour avoir financé mon premier stage au Laboratoire de Biochimie Métabolique et Clinique de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de l'Université de Montpellier I (France), pour l'étude de la composition chimique et l'activité cytotoxique des huiles essentielles;
- Du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique du Tchad qui, à travers la bourse de la Commission Nationale des Fonds de Formation des Formateurs (CONFOFOR), a financé mon second séjour au Laboratoire de Biochimie Métabolique et Clinique de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de l'université de Montpellier I (France) et a permis de finaliser les travaux sur l'activité cytotoxique des huiles essentielles et leur mécanisme d'action;
- Du Laboratoire de Biochimie Clinique et Métabolique de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron de l'Université de Montpellier I (France), où l'analyse de la composition chimique, l'étude des activités antiradicalaires, anti-inflammatoires et antinéoplasiques des huiles essentielles se sont réalisées.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	i
DEDICACE	xi
REMERCIEMENTS	xii
LISTE DES ABREVIATIONS	xx
LISTE DES FIGURES	xxii
LISTE DES TABLEAUX	xxiv
LISTE DES ANNEXES	xxv
RESUME	xxvi
ABSTRACT	xxviii
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	4
I.1 LES HUILES ESSENTIELLES	4
I.1.1 Définition	4
I.1.2 Composition chimique	4
I.1.3 Biosynthèse des constituants volatils.....	5
I.1.4 Méthodes d'extraction des huiles essentielles	8
I.1.5 Méthodes d'identification des composés des huiles essentielles.....	10
I.1.5.1 Chromatographie en phase gazeuse	10
I.1.5.2 Le couplage Chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse	11
I.1.6 Rôle des huiles essentielles dans la plante	11
I.1.7 Toxicité des huiles essentielles	12
I.1.8 Activités biologiques des huiles essentielles	12
I.1.9 Cibles moléculaires et mode d'action des huiles essentielles	13
I.1.10 Intérêts des huiles essentielles.....	13
I.2 GÉNÉRALITÉS SUR LES CHAMPIGNONS MICROSCOPIQUES	13
I.2.1 Définition	13
I.2.2 Caractères généraux	14
I.2.3 Généralités sur les mycoses	15
I.2.3.1 Mode de contamination.....	15

I.2.3.2 Facteurs favorisant la contamination	15
I.2.4 Le genre <i>Candida</i>	16
I.2.4.1 Description générale	16
I.2.4.2 Quelques espèces de <i>Candida</i> impliquées en pathologie infectieuse chez les PVVIH.....	16
I.2.4.2.1 <i>Candida albicans</i>	16
I.2.4.2.2 <i>Candida parapsilosis</i>	17
I.2.4.2.3 Epidémiologie des infections candidosiques	17
I.2.5 Le genre <i>Cryptococcus</i>	18
I.2.5.1 Description générale	18
I.2.5.2 <i>Cryptococcus neoformans</i>	18
I.2.5.3 Les cryptococcoses	19
I.2.5.4 Epidémiologie des cryptococcoses	19
I.2.6 Quelques antibiotiques utilisés dans le traitement des champignons	20
I.2.7 Les résistances aux médicaments antifongiques.....	21
I.2.7.1 Les différents types de résistances	21
I.2.7.2 Les mécanismes de résistances aux familles d'antifongiques	21
I.3 GÉNÉRALITÉS SUR LES CANCERS.....	22
I.3.1 Historique et Définition	22
I.3.1.1 Historique.....	22
I.3.2 Processus moléculaire de la cancérogenèse	24
I.3.3 Classification des Cancers	25
I.3.4 Epidémiologie de Cancers	27
I.3.5 Les causes des Cancers	28
I.3.6 Les traitements du Cancer.....	28
I.3.7 Effets des Cancers et leur prévention.....	29
I.3.8 Cycle cellulaire et le Cancer	30
I.3.8.1 Cycle cellulaire et sa régulation	30
I.3.8.2 Apoptose	32
I.3.8.2.1 Généralités.....	32
I.3.8.2.2 Les caspases et les protéines mitochondriales	32
I.3.8.3 Biologie du Cancer	33
I.3.8.3.1 Genèse des cellules cancéreuses	34
I.3.9 Les anticancéreuses et leurs modes d'action.....	34

I.4 GÉNÉRALITÉS SUR LE STRESS OXYDATIF ET LES RADICAUX LIBRES.	35
I.4.1 Le stress oxydatif	35
I.4.2 Antioxydants et radicaux libres	36
I.4.3 Production des radicaux libres et rôle des antioxydants	36
I.5 INFLAMMATIONS ET LES ANTI-INFLAMMATOIRES	38
I.5.1 Définition de l'inflammation	38
I.5.2 Inflammations aiguës	38
I.5.3 Inflammations chroniques.....	39
I.5.4 Les anti-inflammatoires et leurs modes d'action	39
I.5.4.1 Inhibiteurs des cyclooxygénases	40
I.5.4.2 Inhibiteurs des lipoxycgénases	41
I.5.5 Rôle de la 5-lipoxycgénase dans le processus de l'inflammation	41
I.5.6 Etude <i>in vitro</i> de l'inhibition des lipoxycgénases.....	42
I.5.6.1 Méthode d'étude <i>in vitro</i> de l'activité inhibitrice des lipoxycgénases	43
I.6 GÉNÉRALITÉS SUR LES PLANTES ÉTUDIÉES	44
I.6.1 Généralités sur les <i>Annonaceae</i>	44
I.6.1.1 Le genre <i>Monodora</i>	45
I.6.1.1.1 Botanique	46
I.6.1.1.2 Ecologie.....	46
I.6.1.1.3 Ethnobotanique	46
I.6.1.1.4 Travaux antérieurs.....	47
I.6.1.2 Le genre <i>Xylopi</i> a	48
I.6.1.2.1 <i>Xylopi</i> a <i>aethiopica</i> (Dunal) A. Rich.....	48
I.6.1.2.2 <i>Xylopi</i> a <i>parviflora</i> (A.Rich) Bentham (1862).....	51
I.6.1.3 Le genre <i>Uvaria</i>	53
I.6.1.3.1 Botanique	54
I.6.1.3.2 Ecologie.....	54
I.6.1.3.3. Ethobotanique	54
I.6.1.3.4 Travaux antérieurs.....	54
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	51
II.1 MATÉRIEL	51
II.1.1 Matériel végétal	51
II.1.2 Matériel fongique	51
II.1.3 Les lignées cellulaires.....	52

II.2 MÉTHODES.....	52
II.2.1 Extraction et Analyse de la composition chimique des Huiles Essentielles	52
II.2.1.1 Extraction des huiles essentielles.....	52
II.2.1.1.1 Principe	52
II.2.1.1.2 Mode opératoire	52
II.2.1.2 Analyse de la composition chimique des huiles essentielles.....	53
II.2.1.2.1 Chromatographie en Phase Gazeuse(CPG)	53
II.2.1.2.2 Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) couplée à la Spectrométrie de Masse(SM)	54
II.2.2 Détermination de l'activité antifongique	55
II.2.2.1 Activité antifongique des huiles essentielles sur les champignons levuriformes	55
II.2.2.1.1 Dénombrement des cellules	55
II.2.2.1.2 Evaluation de l'inhibition de la croissance fongique par la micro-méthode de dilution en milieu liquide.....	56
II.2.3 Détermination de l'activité antiradicalaire	57
II.2.3.1. Principe	57
II.2.3.2 Mode opératoire.....	58
II.2.3.2.1 Préparation des solutions	58
II.2.3.2.2 Evaluation de l'activité antiradicalaire	58
II.2.3.2.3 Expression des résultats	59
II.2.4 Détermination de l'activité anti-inflammatoire	59
II.2.4.1 Principe	59
II.2.4.2 Mode opératoire.....	59
II.2.4.2.1 Préparation des solutions	59
II.2.4.2.2 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles	60
II.2.4.2.3 Expression des résultats	60
II.2.5 Détermination de l'activité antinéoplasique des huiles essentielles	61
II.2.5.1 La culture <i>in vitro</i> des cellules.....	61
II.2.5.2 Test de cytotoxicité.....	62
II.2.5.3 Etude du mécanisme de mort par apoptose des cellules normales et cancéreuses traitées avec les huiles essentielles	63
II.2.6 Analyses statistiques.....	63
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION	64

III.1 EXTRACTION ET ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES	64
III.1.1 Extraction des huiles essentielles	64
III.1.2 Analyse de la composition chimique des huiles essentielles	65
III.2 ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES ÉTUDIÉES.....	76
III.2.1 Activité antifongique des huiles essentielles.....	76
III.2.2 Activités antiradicalaires	81
III.2.2.1 Activité antiradicalaire du BHT	81
III.2.2.2 Activité antiradicalaire des huiles essentielles	82
III.2.3 Activités anti-inflammatoires	87
III.2.3.1 Activité anti-inflammatoire de l'acide nordihydroguaiarétique.....	87
III.2.3.2 Activité anti-inflammatoire des huiles essentielles	88
III.2.4 Activité Cytotoxique des huiles essentielles	89
III.2.4.1 Evaluation de la cytotoxicité par la méthode au MTT	89
III.2.4.2 Caractérisation phénotypique de l'effet des huiles sur les cellules cancéreuses	98
III.2.4.3 Cycle cellulaire : Mécanisme d'action impliqué dans la mort cellulaire	100
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	103
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	105
ANNEXES.....	a

LISTE DES ABREVIATIONS

AND	: Acide DesoxyriboNucleique
ARN	: Acide RiboNucleique
AIS	: Anti-Inflammatoire Stéroïdien
AINS	: Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
ANOVA	: Analysis Of Variances
ARPE-19	: Adult human Retinal Pigment Epithelium-19
ATCC	: American Type Culture Collection
BHT	: Butyl Hydroxy Toluene
BHA	: Buthyl Hydroxy Anisol
<i>C. albicans</i>	: <i>Candida albicans</i>
<i>C. parapsilosis</i>	: <i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. neoformans</i>	: <i>Cryptococcus neoformans</i>
CE₅₀	: Concentration Efficace 50
CI₅₀	: Concentration Inhibitrice 50
CMF	: Concentration Minimale Fongicide
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CL	: Composés Linéaires
CA	: Composés Aromatiques
CPG	: Chromatographie en Phase Gazeuse
CPG/SM	: Chromatographie Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
COX-1	: Cyclo Oxygénase de type I
COX-2	: Cyclo Oxygénase de type II
DMEF-12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium- F12
DPPH[•]	: Diphenyl Picryl Hydrazine (radical libre)
DPPH	: Diphenyl Picryl Hydrazyl
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
DO	: Densité Optique
ENR	: Especies Nitrogénées Reactives
ERO	: Especies Reactives de l'Oxygène
HE	: Huile Essentielle
HPOD	: HydroPeroxyOctadecaDiénoïque
HPOT	: HydroPeroxyOctadecaTriénique
HETE	: HydroPeroxyEicosaTetraEnoïque
IBMM	: Institut des Biomolécules Max Mousseron
IK	: Indice de Kovats
IP	: Institut Pasteur
IS	: Indice de Selectivité
LTA₄	: Leucotriène A ₄
LTB₄	: Leucotriène B ₄
LTC₄	: Leucotriène C ₄
MCF-7	: Michigan Cancer Fondation -7

MTH	: Monoterpènes Hydrocarbonés
MTO	: Monoterpènes Oxygénés
MTT	: [3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]
NDGA	: NorDihydroGuiaretic Acid
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
OPP	: O-PyroPhosphate
PA	: Pouvoir Antiradicalaire
PPDMA	: PyroPhosphate de DiméthylAllyle
PPG	: PyroPhosphate de Géranyle
PPGG	: PyroPhosphate de Géranyle Granyle
PPF	: PyroPhosphate de Farnésyle
PPI	: PyroPhosphate Is
PVVIH	: Personne Vivant avec le VIH
SA	: Sabouraud Agar
SBF	: Serum Bovin Fœtal
SC₅₀	: Scavenging Concentration 50
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
SIDA	: Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
SM	: Solution Mère
STH	: Sesquiterpènes Hydrocarbonés
STO	: Sesquiterpènes Oxygénés
TBHQ	: TertioButylHydroquinone
Tr	: Temps de rétention
UFC	: Unité Formant Colonie
VIH	: Virus de l'Immunodéficience Humaine

LISTE DES FIGURES

Figure 01 :	Voie du méthyl érythritol Phosphate.....	6
Figure 02 :	Synthèse des différentes classes terpéniques.....	7
Figure 03 :	Biosynthèse des composés aromatiques.....	8
Figure 04 :	Les formes de croissance des espèces du genre <i>Candida</i>	16
Figure 05 :	Les représentations de quelques manifestations des candidoses.....	18
Figure 06 :	<i>C. neoformans</i> et manifestation cutanée de la cryptococcose.....	20
Figure 07 :	Les mécanismes de la résistance aux antifongiques.....	22
Figure 08 :	Prolifération de cellules cancéreuses.....	23
Figure 9 :	Mécanisme moléculaire de la cancérogenèse.....	25
Figure 10 :	Cancer du sein.....	27
Figure 11 :	Cycle cellulaire et sa régulation.....	30
Figure 12 :	Mécanisme d'action des antioxydants sur l'oxydation des acides gras.....	37
Figure 13 :	Mécanisme d'obtention des médiateurs biologiques à partir de la 5-lipoxygénase	42
Figure 14 :	Mécanisme d'obtention des dérivés hydroperoxydes de la lipoxygénase végétale.....	43
Figure 15 :	<i>Monodora myristica</i> (Gaertn.) Dunal.....	45
Figure 16 :	<i>Xylopiya aethiopica</i> (Dunal) A.Rich.....	48
Figure 17 :	<i>Xylopiya parviflora</i> (A.Rich) Bentham (1862).....	51
Figure 18 :	<i>Uvaria angolensis</i> (Cameroun).....	53
Figure 19 :	Chromatogramme du constituant mélangé à deux alcanes à n et (n+1) atomes de carbone..	54
Figure 20 :	Evaluation de la croissance des levures par décoloration du rouge phénol à différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Xylopiya parviflora</i> du Cameroun.....	77
Figure 21 :	Pourcentage de piégeage en fonction de la concentration en BHT.....	81
Figure 22 :	Pourcentage de piégeage du DPPH° en fonction de la concentration en huiles essentielles de <i>Xylopiya aethiopica</i> du Tchad et du Cameroun.....	82
Figure 23 :	Pourcentage de piégeage du DPPH° en fonction de la concentration en huiles essentielles de <i>Xylopiya parviflora</i> du Tchad et du Cameroun.....	83
Figure 24 :	Pourcentage de piégeage du DPPH° en fonction de la concentration en huiles essentielles de <i>Monodora myristica</i> du Tchad et du Cameroun.....	84
Figure 25 :	Pourcentage de piégeage du DPPH° en fonction de la concentration en huile essentielle de <i>Uvaria angolensis</i>	85
Figure 26 :	Pourcentage d'inhibition de la 5-lipoxygénase par le NDGA en fonction de la concentration	87

Figure 27 : Effet cytotoxique de l'huile essentielle de <i>Xylopi</i> a <i>parviflora</i> du Tchad sur les cellules (MCF-7 et ARPE-19)	91
Figure 28 : Effet cytotoxique de l'huile essentielle de <i>Xylopi</i> a <i>parviflora</i> du Cameroun sur les cellules (MCF-7 et ARPE-19).....	91
Figure 29 : Effet cytotoxique de l'huile essentielle de <i>Xylopi</i> a <i>aethiopica</i> du Tchad sur les cellules (MCF-7 et ARPE-19).....	92
Figure 30 : Effet cytotoxique de l'huile essentielle de <i>Xylopi</i> a <i>aethiopica</i> du Cameroun sur les cellules (MCF-7 et ARPE-19).....	92
Figure 31 : Effet cytotoxique de l'huile essentielle de <i>Monodora myristica</i> du Tchad sur les cellules (MCF-7 et ARPE-19).....	93
Figure 32 : Effet cytotoxique de l'huile essentielle de <i>Monodora myristica</i> du Cameroun sur les cellules (MCF-7 et ARPE-19).....	93
Figure 33 : Effet cytotoxique de l'huile essentielle d' <i>Uvaria angolensis</i> sur les cellules (MCF-7 et ARPE-19).....	94
Figure 34 : Caractérisation Phénotypique sans MTT.....	99
Figure 35 : Caractérisation Phénotypique avec MTT.....	99
Figure 36 : Analyse du cycle cellulaire des cellules (MCF-7) traitées avec l'éthanol (contrôle) pendant 24 heures ou supplémentées avec les huiles essentielles à 0,1 µL/mL.....	100
Figure 37 : Analyse du cycle cellulaire des cellules (ARPE-19) traitées avec l'éthanol (contrôle) pendant 24 heures ou supplémentées avec les huiles essentielles à 0,1 µL/mL.....	101

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Quelques antifongiques et leurs modes d'action.....	20
Tableau II :	Les anticancéreuses et leurs modes d'action.....	35
Tableau III :	Echantillon végétal utilisé pour les tests antifongiques, antiradicalaires, anti inflammatoires et antinéoplasiques.....	51
Tableau IV :	Rendements d'extraction des huiles essentielles des fruits et feuilles des plantes de la famille des <i>Annonaceae</i>	64
Tableau V :	Composition chimique des huiles essentielles des fruits de <i>Xylopi aethiopica</i> du Tchad et du Cameroun.....	65
Tableau VI :	Composition chimique des huiles essentielles des fruits de <i>Xylopi parviflora</i> du Tchad et du Cameroun.....	68
Tableau VII :	Composition chimique des huiles essentielles des fruits de <i>Monodora myristica</i> du Tchad et du Cameroun.....	71
Tableau VIII :	Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de <i>Uvaria angolensis</i> du Cameroun.....	73
Tableau IX :	Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles essentielles.....	77
Tableau X :	Concentrations Minimales Fongicides (CMF) et Rapports CMF/CMI des essences et de la Nystatine contre les souches de levures testées.....	79
Tableau XI :	Récapitulatif SC ₅₀ , CE ₅₀ et PA des huiles essentielles.....	85
Tableau XII :	Activité anti-inflammatoire des huiles essentielles et du NDGA.....	88
Tableau XIII :	Récapitulatif de CI ₅₀ et SI des huiles essentielles.....	94

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 :	Appareillage de type Clevenger.....	a
Annexe 2 :	Composition des milieux de cultures utilisés.....	b
Annexe 3 :	Les résultats brutes	c
Annexe 4 :	Les chromatogrammes.....	l

RESUME

Les mycoses, les cancers et toutes autres maladies induites par le stress oxydatif qui s'accompagnent de réactions inflammatoires, constituent actuellement un important problème de santé publique. Pour contribuer à surmonter ces difficultés, cette étude a été menée dans le but d'évaluer les activités antifongique, antiradicalaire, anti-inflammatoire et antinéoplasique des huiles essentielles de quatre Annonaceae (graines de *Monodora myristica*, fruits de *Xylopiya aethiopica*, *Xylopiya parviflora* et feuilles de *Uvaria angolensis*) récoltés au Tchad et au Cameroun.

Les huiles essentielles ont été extraites par hydrodistillation. L'analyse de leur composition chimique s'est faite par Chromatographie en Phase Gazeuse et Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse. L'activité antifongique a été évaluée par la méthode de microdilution en milieu liquide; l'activité anti-radicalaire par la méthode de piégeage du radical DPPH° ; le potentiel anti-inflammatoire par la méthode d'inhibition enzymatique de la 5-lipoxygénase; et l'activité antinéoplasique par la cytométrie de flux en présence du MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide].

Les rendements d'extraction des huiles essentielles ont varié de 0,10 à 4,86% en fonction des organes des espèces de la famille des Annonaceae étudiées, et du lieu de récolte (Tchad et Cameroun). Le meilleur rendement a été obtenu avec les fruits de *Xylopiya aethiopica* du Cameroun (4,86 %).

Une homogénéité spécifique et biochimique des extraits des plantes étudiées a été révélé à travers une richesse en monoterpènes (75 à 94,2%) dans les genres *Monodora* et *Xylopiya* avec comme composés majoritaires l' α -phellandrène (52,7 à 67,1%) et le β -pinène (24,6 à 35,7%) respectivement. L'essence de *Monodora myristica* du Tchad a montré une richesse relative en limonène (14,9%) par rapport à celle du Cameroun qui n'en contient que 1,8%. Par ailleurs l'huile essentielle de feuilles de *Uvaria angolensis* du Cameroun est riche en sesquiterpènes (50,3%) alors que les monoterpènes ne représentent que 12,5%. Cette essence est majoritairement constituée de benzoate de benzyle (32,8%), qui est un composé aromatique.

Les huiles essentielles des fruits de *Xylopiya aethiopica*, *Xylopiya parviflora* et les graines de *Monodora myristica* des deux origines ainsi que celle des feuilles de *Uvaria angolensis* du Cameroun ont inhibé la croissance de *Candida albicans* ATCC24433, *Candida*

parapsilosis ATCC22019 et *Cryptococcus neoformans* IP95026 avec des Concentrations Minimales Inhibitrices comprises entre 5 et 10 mg/ml.

L'huile essentielle des feuilles de *Uvaria angolensis* a démontré un pouvoir antiradicalaire relativement plus élevé avec un pourcentage de piégeage des radicaux livres à 50% de 7,69 g/l, suivie des huiles essentielles des fruits de *Monodora myristica*, *Xylopia aethiopica* et de *Xylopia parviflora* du Tchad et du Cameroun, dont les SC₅₀ sont comprises entre 8,90 et 11,74 g/l.

Une faible activité anti-inflammatoire des huiles de *Monodora myristica*, *Xylopia aethiopica* et *Xylopia parviflora* du Tchad et du Cameroun a été observée, avec une inhibition maximale de 10 à 20% de la lipoxigenase de soja à 18,8 et 28,2 µg/mL. L'huile essentielle de feuilles de *Uvaria angolensis* s'est montrée inactive.

Les huiles essentielles de *Uvaria angolensis*, *Xylopia parviflora*, *Monodora myristica*, et *Xylopia aethiopica* ont inhibé la croissance des cellules cancéreuses (MCF-7) de façon très significative après 72 heures d'incubation, montrant une innocuité relative vis-a-vis des cellules normales (ARPE-19) et avec des indices de sélectivité comprises entre 1,375 et 10,0. Elles ont induit l'apoptose cellulaire par blocage du cycle de la division des cellules cancéreuses (MCF-7) et des cellules épithéliales normales (ARPE-19) en phases S et en phase de transition G₀/G₁.

Il ressort des résultats de ce travail que les huiles essentielles des plantes de la famille des Annonaceae étudiées seraient une source potentielle en métabolites secondaires à activités antifongique, antiradicalaire et antinéoplasique. Des investigations approfondies sont néanmoins requises pour exploiter ces résultats dans l'optique de contribuer à la lutte contre ces affections.

Mots clés : Annonaceae, huile essentielle, composition chimique, activités antifongiques, antiradicalaires, anti-inflammatoires, cytotoxique.

ABSTRACT

Fungal infections, cancer and other diseases associated with free radical generation and inflammation are currently a critical public health issue that needs innovative control measures. In order to contribute to the search for solutions, this study was designed to assess the antifungal, radical scavenging, anti-inflammatory, and antineoplastic activities of essential oils from four Annonaceae plants (*Monodora myristica*, *Xylopia aethiopica*, *Xylopia parviflora*, and *Uvaria angolensis*) collected in Chad and Cameroon.

Essential oils were extracted by hydrodistillation, and their chemical compositions determined using Gas Chromatography and Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry. The antifungal activity of the oils were evaluated using the microdilution method; the antiradical activity was evaluated following the DPPH° free radical scavenging potential; the anti-inflammatory activity was assessed following the inhibitory effect of oils against the 5-lipoxygenase; and the anticancer activity was evaluated by determining cell viability in the presence of MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide], using flow cytometry.

The yields of extraction of the essential oils ranged from 0.10 to 4.86%, depending on plant species, plant organ collected and its origin. The highest yield was obtained with the fruits of *X. aethiopica* from Cameroon (4.86%).

The results from the chemical analyses indicated that samples from *Monodora* and *Xylopia* from both origins contained mainly monoterpenoids (75-94%), with α -phellandrene (52.7-67.1%) and β -pinene (24.6-35.7%) as respective major constituents. The essential oil of *M. myristica* from Chad showed higher content in lomonene (14.9%) as compared to the Cameroonian sample (1.8%). The essential oil from *Uvaria angolensis* leaf contained mainly sesquiterpenoids (50.3%), and 12.5% of monoterpenoids only. The major constituent of this sample was an aromatic compound (benzyl benzoate) with 32.8%.

The essential oils from the fruits of *X. aethiopica*, *X. parviflora*, and *M. myristica*, and leaves of *U. angolensis* inhibited the growth of *Candida albicans* ATCC24433, *Candida parapsilosis* ATCC22019 and *Cryptococcus neoformans* IP95026 with Minimum Inhibitory Concentrations ranging from 5 to 10 mg/ml.

The essential oil from *U. angolensis* exhibited the highest radical scavenging potential, with a 50% scavenging concentration (SC₅₀) of 7.69 g/l, followed by essential oils from *M. myristica*, *X. aethiopica*, and *X. parviflora* that showed SC₅₀ between 8.9 and 11.74 g/l.

The essential oils from *X. aethiopica*, *X. parviflora*, and *M. myristica* exerted 10-20% moderate inhibition of the 5-lipoxygenase and no activity was recorded from essential oil of *U. angolensis*.

All the oils samples from both origins significantly inhibited cancer cells (MCF-7) growth after 72 hours incubation, with a notable selectivity relative to normal cells (ARPE-19). Selectivity indices ranged from 1.375 to 10. Cells cycles were stopped at phases G₀/G₁ and S followed by apoptosis.

The results obtained from this investigation indicated that essential oils from Annonaceae plants contain bioactive secondary metabolites, with potential effects against fungal infections, free radicals, inflammatory and cancer cells. Further detailed investigations are required to confirm these findings and formalize their eventual use to control the targeted affections.

Keywords: Annonaceae, essential oil, chemical composition, activity, antifungal, radical scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic.



INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'incidence globale des mycoses et des cancers représente un véritable problème de santé publique dans le monde. La mortalité et la morbidité liées à ces maladies sont considérables (**Bourgeois, 1999 ; WHO, 2013**). Cliniquement, les mycoses telles que les candidoses et les cryptococcoses sont les infections majeures (particulièrement chez les patients immunodéprimés) dues aux champignons des genres *Candida* et *Cryptococcus*. Elles sont responsables de taux de mortalité de 5 à 71% pour les candidoses invasives et de 70% pour les cryptococcoses, surtout chez les patients vivant avec le VIH/SIDA (**Winter et al., 2009 ; Sganga, 2011 ; Taggart et al., 2011 ; Chen et al., 2013**). Par ailleurs, les cancers constituent une cause majeure de décès dans le monde. En effet, sur un total de 58 millions de décès enregistrés en 2005 au niveau mondial, 13 % (soit 7,6 millions) étaient imputables au cancer, soit plus que la proportion de décès causés par le VIH/SIDA, la tuberculose et le paludisme réunis (**OMS, 2006 ; WHO, 2013**). Selon des projections de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), d'ici 2020, le nombre de décès dû au cancer va connaître une augmentation considérable dans les pays en développement, aussi bien en Asie, en Afrique qu'en Amérique Latine et ceci, principalement en raison du vieillissement constant de la population humaine et de l'augmentation de la pollution (**Rastogi et al., 2004**). Au Cameroun, il y a 27,9 cas de cancer du sein pour 100 000 femmes (**Globocan 2010**). Des études effectuées par **Mbassi et al. (2010)** au service Médicale d'Oncologie de l'Hôpital General de Yaoundé, Cameroun, de janvier 1998 à décembre 2007, ont montré que sur 2,355 patients consultés, 48 étaient diagnostiqués du cancer de poumons (28 Hommes et 20 femmes). Le comité national du contrôle des cancers au Cameroun a révélé une croissance du taux des Cancers avec une incidence annuelle de 12.000 en 2004 à 14.000 en 2010 et une prévalence de 25.000 cas (**Enow et al., 2012**). Le stress oxydatif dû à l'excès de radicaux libres produits pendant le développement des mycoses et au cours de la respiration est impliqué dans la modification des structures biologiques des cellules (protéines, lipides, ADN) entraînant le vieillissement de l'organisme (cellules, tissus, organes) et générant de nombreuses pathologies parmi lesquelles les cancers, l'athérosclérose, l'artérite, l'asthme, la maladie de Parkinson, le mongolisme, le diabète et les inflammations aiguës ou chroniques (**Aurousseau, 2002; Rock, 2003 ; Favier, 2003; Kaplan et al., 2007**). Globalement, les infections d'origine fongique ainsi que le cancer génèrent une quantité considérable de radicaux libres et l'inflammation, et contribuent inéluctablement à l'affaiblissement l'organisme atteint. Le contrôle des infections d'origine fongique et du cancer qui s'accompagnent du stress oxydatif

et des inflammations aiguës ou chroniques est un défi que la communauté scientifique a de la peine à relever.

En effet, cet objectif est rendu difficile à atteindre à cause de plusieurs facteurs notamment la multiplicité des souches fongiques, l'émergence et l'étendue de la résistance des agents fongiques, le vieillissement, la consommation du tabac, les mauvaises habitudes alimentaires, la pollution de l'environnement, le spectre d'action réduit des principes actifs antifongiques, antioxydants, anti-inflammatoires et anticancéreux disponibles et leur coût non abordable (**Sanglard et Odds, 2002 ; Rastogi et al., 2004**).

Face à ce défi, il est urgent de rechercher de nouveaux principes actifs aux cibles métaboliques et mode d'action différents. Le fil conducteur qui relie toutes ces composantes exige que les nouvelles thérapies aient un spectre d'action de préférence synergique. Pour ce faire, les substances naturelles issues des plantes médicinales se sont révélées être la source la plus crédible des molécules au profil recherché. Plus précisément, les huiles essentielles ont démontré de multiples propriétés biologiques bénéfiques, potentiellement exploitables dans la lutte contre les infections fongiques, le stress oxydatif, les inflammations et le cancer (**Baylac et Racine, 2003 ; Avlessi et al., 2004 ; Kuate, 2005; Modzelewska et al., 2005 ; Jazet et al, 2008**).

Ainsi, cette étude cible un groupe unique de plantes aromatiques tropicales (Annonaceae) dont les caractéristiques en font une réelle source de nouveaux médicaments (**Aminimoghadamfarouj et al., 2011**). En effet, **Tatsadjieu et al. (2003)** ont montré que l'huile essentielle de *Monodora myristica* du Cameroun a une activité sur des souches de bactéries et de champignons ; **Boyom (2004)** et **Boyom et al. (2011)**, ont montré respectivement que les huiles essentielles extraites de l'écorce de tronc et des feuilles d'*Uvaria angolensis* et des extraits méthanoliques et éthanoliques de *Xylopiaparviflora* possèdent une activité antiplasmodiale sur la souche W2 de *plasmodium falciparum*. De même, **Choumessi et al, (2012)** ont révélé que les extraits éthanoliques de *Xylopiathiopica* du Cameroun présentent une activité anti-proliférative sur des lignées de cellules cancéreuses (HCT116 du cancer de colon, U937 et KG de la leucémie).

De ces faits nous avons émis l'hypothèse selon laquelle :

Il existe une continuité biogénétique dans les plantes aromatiques du Tchad et du Cameroun et leurs huiles essentielles possèdent des pouvoirs antifongiques, antioxydants, anti-inflammatoires et anticancéreux intéressants.

La présente étude a par conséquent pour objectif d'investiguer les huiles essentielles de quatre plantes de la famille des Annonaceae du Tchad et du Cameroun pour leurs propriétés antifongiques, antiradicalaires, anti-inflammatoires et antinéoplasiques.

Pour cadrer cet objectif dans son véritable contexte, nous nous sommes posés les questions suivantes:

- *Monodora myristica*, *Xylopia aethiopica*, *Xylopia parviflora* et *Uvaria angolensis* poussant au Tchad et au Cameroun contiennent-elles des huiles essentielles aux caractéristiques chimiques comparables ?
- Existe-il une similitude d'activités biologiques entre les espèces du Tchad et celles du Cameroun ?

La réponse à ces deux questions permettrait de scruter l'existence des mêmes espèces au Tchad et au Cameroun, et de mettre en évidence l'étendue de la variabilité dans leurs compositions chimiques et activités biologiques.

Plus spécifiquement, il a été question de :

- Récolter les organes de quatre plantes aromatiques du Tchad et du Cameroun, extraire les huiles essentielles par hydrodistillation et analyser leur composition chimique par chromatographie en phase gazeuse et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ;
- Déterminer leurs propriétés antifongiques sur *Candida albicans* ATCC24433, *Candida parapsilosis* ATCC22019 et *Cryptococcus neoformans* IP95026 par la méthode de microdilution en milieu liquide ;
- Evaluer leurs activités antiradicalaires par suivi spectrophotométrique de la décoloration du DPPH et leur potentiel anti-inflammatoire par suivi de l'inhibition de la 5-lipoxygénase ;
- Déterminer leurs effets cytotoxiques sur deux lignées cellulaires (MCF-7 et ARPE-19).

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1 LES HUILES ESSENTIELLES

I.1.1 Définition

Il existe plusieurs expressions pour définir « huile essentielle ». La norme française, AFNOR NF T 75-0006, donne la définition suivante « produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir des *Citrus* » (AFNOR, 2000). La définition qui semble la plus universellement acceptée est la suivante « huile obtenue suite à l'extraction de la matière végétale à la vapeur d'eau » (Pibiri, 2005). Ce sont des produits généralement odorants, obtenus soit par entraînement à la vapeur d'eau de végétaux ou parties de ceux-ci, soit par expression du péricarpe frais de certains fruits. Cette définition est toute fois restrictive car elle exclut aussi bien les produits obtenus par extraction à l'aide des solvants organiques que ceux obtenus par d'autres procédés (Bruneton, 1987).

I.1.2 Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents (Sell, 2006). Ces composés sont des molécules volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes. Seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, y sont rencontrés, les monoterpènes (myrcène, β -pinène, γ -terpinène, etc.) et les sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisabolène, etc.).

Rappelons ici que les terpènes sont des composés issus du couplage de plusieurs unités « isopréniques » (C_5H_8), soit deux unités pour les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$) et trois pour les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$). Exceptionnellement, quelques diterpènes ($C_{20}H_{32}$) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles (Vila *et al.*, 2002).

Dans la majorité des cas, les huiles essentielles sont des mélanges de plusieurs dizaines de composés issus de diverses voies biosynthétiques (AFNOR, 2000). Les dérivés les plus représentatifs se répartissent dans les deux classes principales que sont les terpénoïdes et les composés aromatiques (Bruneton, 1999). Les huiles essentielles intègrent aussi d'autres composés plus spécifiques dérivant de familles particulières telles que celles des Liliaceae et

le groupe de plantes dites « arbres à ail » qui produisent des composés soufrés. Dans certains cas, des composés azotés sont également identifiés (Svoboda, 1999).

D'autre part, la composition et les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles dépendent de plusieurs facteurs que sont, l'espèce botanique, le chemotype, le stade du cycle végétatif, la période de récolte, l'organe considéré, les facteurs extrinsèques (climat, sol, etc.), ainsi que les procédés de leur obtention (AFNOR, 2000).

Dans le cadre de ce travail, une brève revue sera consacrée uniquement aux terpénoïdes et aux composés aromatiques, couramment retrouvés dans les huiles essentielles.

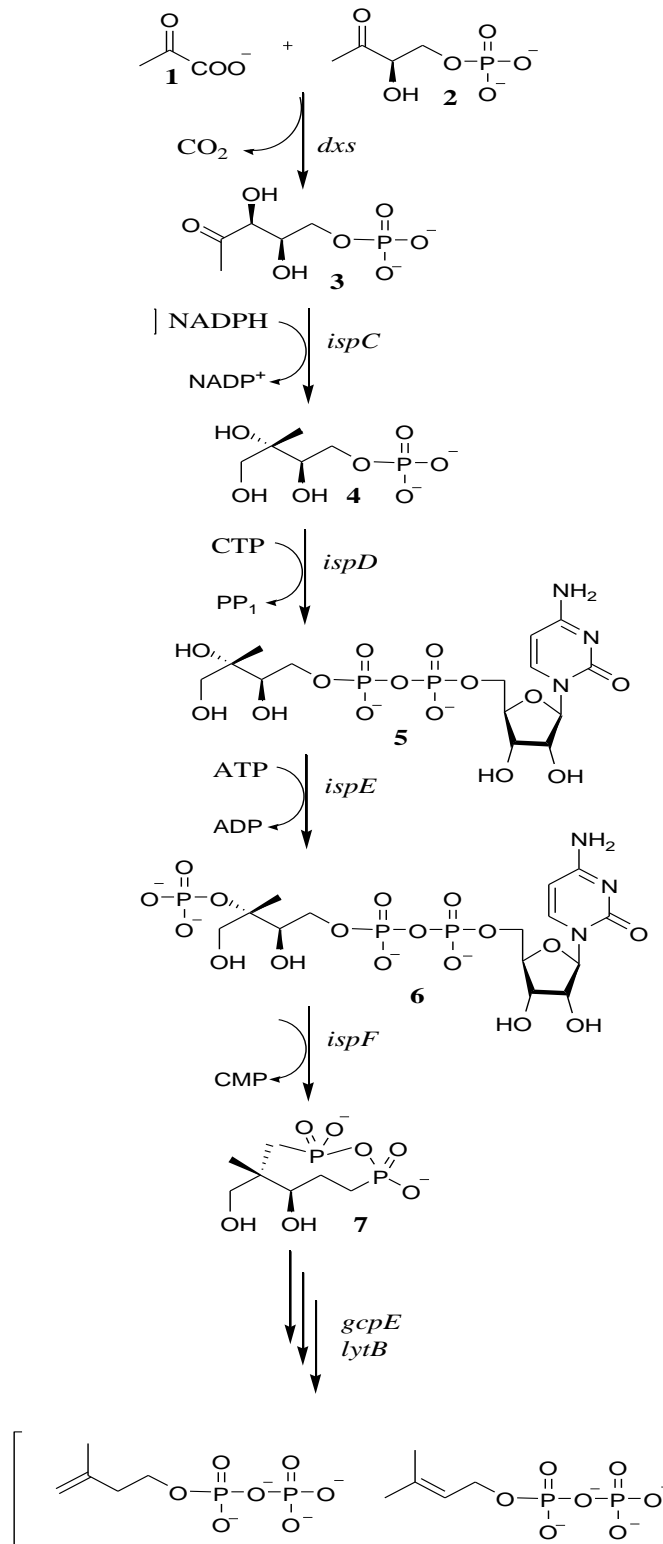
I.1.3 Biosynthèse des constituants volatils

L'ensemble des composés volatils secrétés par les végétaux résulte de trois voies métaboliques principales (Bruneton, 1987; Rohdich *et al.*, 2001).

- La voie du méthyl erythritol phosphate conduisant aux précurseurs acycliques de l'isoprène (Pyrophosphate d'isopentenyle et Pyrophosphate de diméthylallyle) ;
- la voie du mévalonate conduisant à la synthèse des terpènes ;
- la voie du shikimate qui usine les composés aromatiques.

Les figures 1, 2 et 3 représentent les trois principales voies métaboliques de la biosynthèse des terpénoïdes et composés aromatiques chez les plantes.

La biosynthèse des terpénoïdes implique l'addition tête-à-queue des unités isopréniques dont la biosynthèse est décrite dans la figure 1, pour produire les précurseurs acycliques des différentes sous-classes de terpènes.



dxs= 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase ; *ispF*= 2C- methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase ;
ispC= 2C- methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase ; *gcpE*= 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate reductase ;
ispD= 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase ; *lytB*= 1-hydroxy 2-methyl-butenyl 4-diphosphate reductase ;
ispE= 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase.

Figure 1 : Voie du méthyl érythritol Phosphate (Rohdich *et al.*, 2001)

Pour les terpènes couramment rencontrés dans les huiles essentielles, nous avons le pyrophosphate de géranyle (GPP, C₁₀) qui comporte deux unités d'isoprènes et qui conduit aux monoterpènes, le pyrophosphate de farnésyle comportant trois isoprènes et menant aux sesquiterpènes (C₁₅) (figure 2). Dans des cas rares, des diterpènes peuvent être identifiés dans certaines huiles essentielles. Leur précurseur acyclique est le pyrophosphate de géranyle géranyle qui comporte quatre unités isopréniques. (**Bruneton, 1999**).

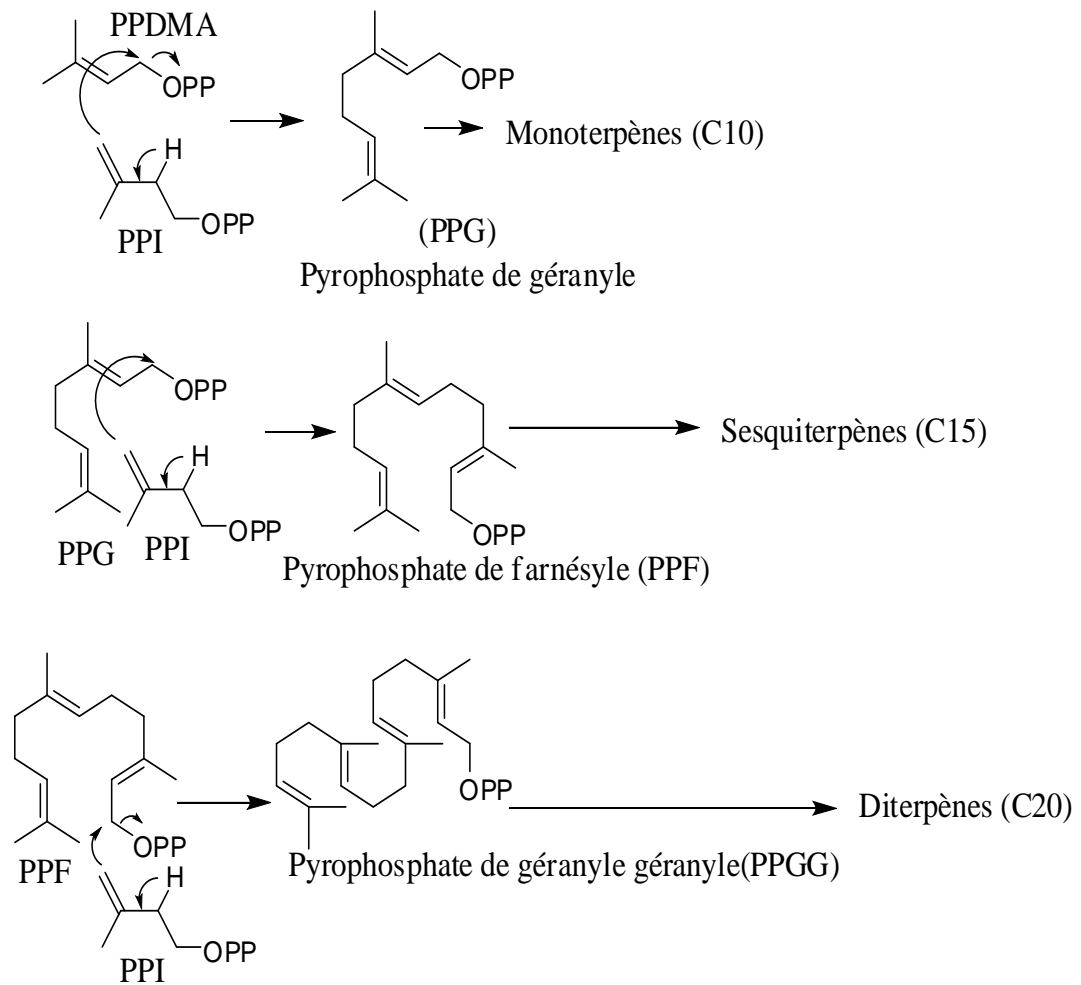


Figure 2: Formation des précurseurs des différentes classes de terpènes (**Bruneton, 1999**)

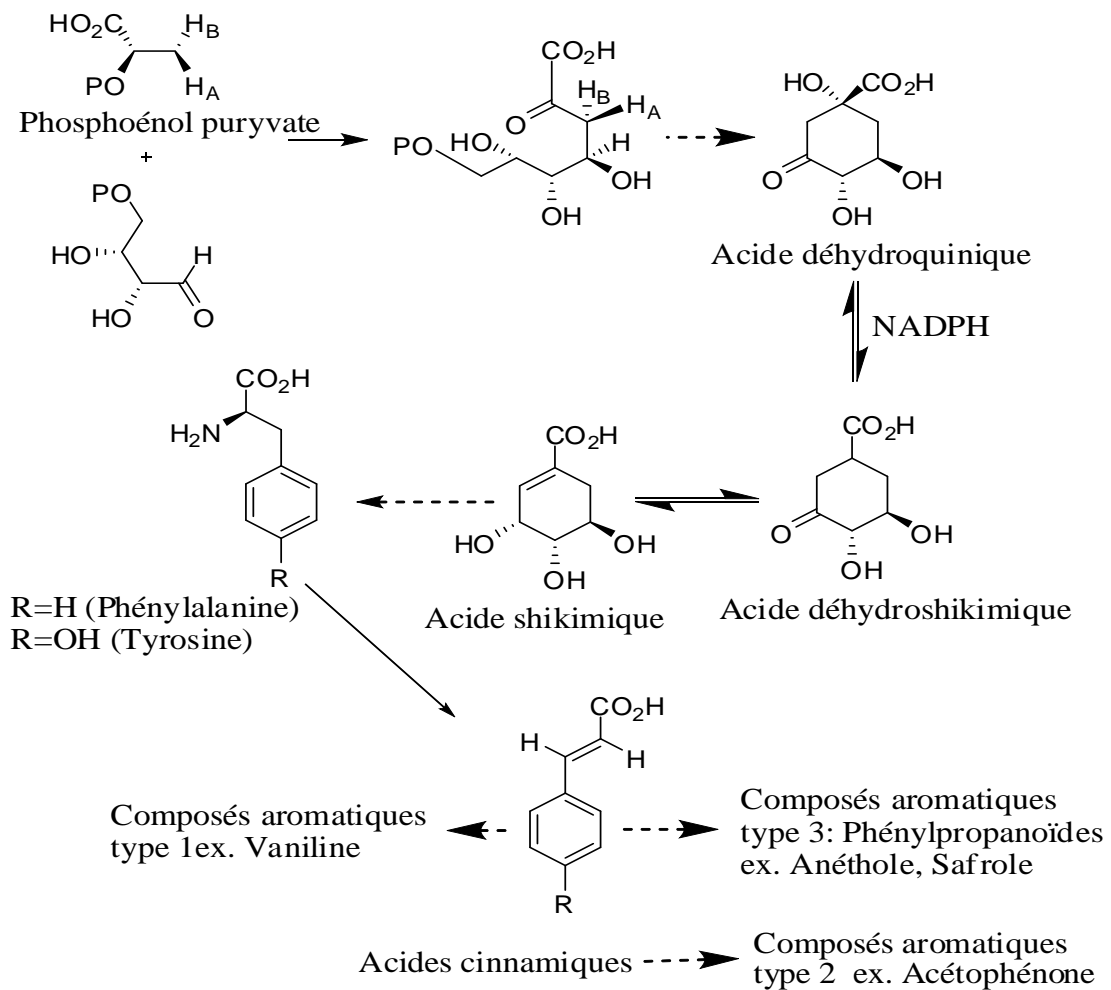


Figure 3 : Biosynthèse des composés aromatiques (Bruneton, 1999)

I.1.4 Méthodes d'extraction des huiles essentielles

L'extraction d'une huile essentielle consiste à isoler de la plante ou d'un organe de celle-ci par une technique appropriée. Le matériel végétal pour cela est au préalable soumis à des traitements mécaniques tels que le broyage, râpage qui facilitent non seulement le transport des matériaux, mais rendent l'huile essentielle beaucoup plus extractible. A cet effet, plusieurs techniques peuvent être utilisées :

❖ Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est actuellement la technique la plus répandue pour l'extraction des huiles essentielles. Elle est utilisée dans 80% de la production des huiles essentielles grâce à son principe simple. En effet la plupart des composés odorants volatils contenus dans les végétaux sont susceptibles d'être entraînés par les aérosols de vapeurs d'eau du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe (**Garnero,**

1992 ; Bruneton, 1999). Ces vapeurs sont condensées par réfrigération et l'essence séparée par décantation. Cette méthode a plusieurs variantes dont l'hydrodistillation qui a été utilisée dans le cadre de ce travail.

❖ **Expression à froid**

Elle est utilisée dans environ 10% des cas et consiste à passer le matériel végétal (péricarpe de Citrus) pour rompre les poches sécrétrices et en faire sortir l'huile essentielle qui est séparée de l'eau cellulaire par décantation (**Garnero, 1992 ; Maxwell-Hudson, 1995**).

Les autres méthodes décrites ci-après permettent d'obtenir des mélanges apparentés aux huiles essentielles, mais qui la plupart de temps ne possèdent pas les mêmes propriétés physico-chimiques.

❖ **Enfleurage**

L'enfleurage est réservé aux organes végétaux qui présentent environ 24 heures après leur cueillette, des activités physiologiques de production et d'exhalaison de parfums, tels que les pétales de fleurs, et qui sont suffisamment fragiles pour supporter de hautes températures. Cette méthode est utilisée dans environ 3% de cas et est réputée coûteuse. Elle consiste à étaler les organes au contact d'un corps gras tel que le syndoux ou l'axonge qui se saturent de parfum et donne une pommade florale qui ensuite épuisée à l'aide d'un solvant organique volatil (**Garnero, 1992**).

❖ **Extraction par les solvants organiques volatils**

Elle consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui est ensuite éliminé par distillation sous vide. On obtient une concrète qui après traitement à l'alcool absolu à froid donne l'absolue (**Salle, 1991**).

❖ **Extraction à l'aide du four à micro-ondes**

Elle consiste à irradier le matériel en présence ou non d'un solvant organique ou aqueux. Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation.

Cette méthode présente l'avantage d'être rapide, mais ne permet le traitement que d'une quantité limitée de matériel végétal (**Craveiro *et al.*, 1989**).

❖ **Extraction par le dioxyde de carbone (CO₂) liquide ou supercritique**

Soumis à une température de 31,1°C et à une pression de 73,8 bars, le CO₂ présente des propriétés extractives élevées vis-à-vis des arômes et autres constituants des huiles essentielles). En dehors de ses propriétés extractives, le CO₂ présente l'avantage d'être non toxique, ininflammable et inodore, d'emploi simple, bon marché et disponible avec une grande pureté. Cette méthode nécessite néanmoins un appareillage très coûteux (**Garnero, 1992**).

I.1.5 Méthodes d'identification des composés des huiles essentielles

Selon la Pharmacopée Européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures physiques : indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative. La couleur et l'odeur sont aussi des paramètres importants (**Pibiri, 2005**). La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse (CPG) et la chromatographique en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse (CPG/SM) qui permettent une meilleure détermination de la composition chimique.

I.1.5.1 Chromatographie en phase gazeuse

Le principe de la séparation par CPG consiste à partager l'échantillon à analyser entre deux phases. L'une de ces phases est un liquide stationnaire uniformément réparti sous forme d'une pellicule mince sur un solide inerte de grande surface spécifique, tandis que l'autre phase est un gaz mobile qui s'écoule à travers l'ensemble stationnaire.

La CPG s'est montrée une méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une huile essentielle, elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative (**Paris et Godon, 1979**).

L'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur le partage de produit analysé entre une phase gazeuse mobile et une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte (**Skoog *et al.*, 2003**).

Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. Du phénomène appelé «

réention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé (**Tranchant, 1995**).

I.1.5.2 Le couplage Chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse

Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence (**Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996**).

Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes (**Pradeau et Cohen, 1992**).

- **Ionisation** : les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de l'échantillon de départ ;
- **Accélération** : Les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.
- **Séparation** : Les ions seront distribués suivant leur rapport masse/charge ;
- **Détection** : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées ;
- **Traitement du signal** : le signal sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports : masse/charge.

L'appareillage CPG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG.

I.1.6 Rôle des huiles essentielles dans la plante

Plusieurs rôles physiologiques sont attribués aux huiles essentielles dans la plante. Les essences dans la plante régulent la transpiration diurne en absorbant par l'intermédiaire de leurs constituants insaturés de la lumière et de la chaleur au cours de leur évaporation (**Guenther, 1948**). Grâce à leurs odeurs caractéristiques et leur volatilité, les huiles essentielles jouent un rôle dans la communication chimique (**Bruneton, 1999**). En effet, elles interviennent dans la pollinisation et la dispersion des spores. D'autre part, les essences

naturelles permettent aux plantes de s'adapter aux conditions environnementales ; c'est ainsi qu'elles constituent un moyen de défense contre les prédateurs (microorganismes, champignons).

I.1.7 Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme tous les produits naturels : "ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme". Cet aspect des huiles essentielles est d'autant plus important que leur utilisation, de plus en plus populaire, tend à se généraliser avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques telle que l'aromathérapie. De nombreux ouvrages font référence à la toxicité des produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. Mais en règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible avec des DL₅₀ supérieures à 5g/kg (**Bruneton, 1999**).

Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) (**Smith et al., 2000**) ou phototoxique (huiles de *citrus* contenant des furocoumarines (**Naganuma et al., 1985**)).

Certains auteurs (**Fanchomme et al., 1990 ; Maihebiau, 1994**) se basent sur la composition chimique des huiles essentielles et les toxicités relatives des familles biochimiques qui les constituent pour conclure sur leur toxicité ; par exemple, une utilisation prolongée des huiles essentielles à thuyones est neurotoxique. Chez l'homme des intoxications aiguës sont possibles. Les accidents graves, le plus souvent observés chez les petits enfants, ont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'huiles (**Pibiri, 2005**).

I.1.8 Activités biologiques des huiles essentielles

Les effets bénéfiques des composés volatils des huiles essentielles sont utilisés depuis fort longtemps par les anciennes civilisations pour soigner les pathologies courantes. Aujourd'hui, après avoir été délaissées un temps ou peu utilisées par la médecine, le potentiel thérapeutique des (huiles essentielles et leurs constituants) est reconsidéré et les études qui leurs sont consacrées abondent dans la littérature scientifique.

Ainsi, de nombreux travaux ont montré des activités biologiques variées des huiles essentielles, parmi lesquels figurent :

- Les activités pesticides (**Teugwa et al., 2006 ; Souguir et al., 2013**) ;

- Les activités antifongiques et antibactériennes (**Kuiate, 2005; Jazet *et al.*, 2007 ; Aouni *et al.*, 2013 ; Hzounda *et al.*, 2014**) ;
- Les activités anticancéreuses (**Modzelewska *et al.*, 2005 ; Wei *et al.*, 2008 ; Cha et Kim, 2012; Helen *et al.*, 2012**) ;
- Les activités antiplasmodiales (**Boyom *et al.*, 2003 ; Boyom, 2004**) ;
- Les activités antioxydantes et antiradicalaires (**Boyom *et al.*, 2005 ; Jazet *et al.*, 2007 ; Alitonou *et al.*, 2013**) ;
- Les activités anti-inflammatoires (**Line *et al.*, 2008 ; Jazet *et al.*, 2008 ; Alitonou *et al.*, 2013**) ;
- Les activités antivirales (**Duschatzky1 *et al.*, 2005 ; Astani1 et Schnitzler, 2014**).

I.1.9 Cibles moléculaires et mode d'action des huiles essentielles

De nombreuses études ont montré que les huiles essentielles agissent sur des cibles moléculaires et enzymatiques suivant des modes d'actions particuliers. Les huiles essentielles agissent sur les hyphes des moisissures en déformant la structure des mitochondries de ces derniers. A travers ses composés, les huiles essentielles agissent sur la paroi cellulaire et/ou l'ADN ; entraînent la rupture des membranes et la destruction du système enzymatique de nombreux microorganismes (**De Billerbeck *et al.*, 2000 ; Tatsadjieu, 2003**).

I.1.10 Intérêts des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont très utilisées en cosmétique et en parfumerie où elles sont considérées comme éléments de base, ainsi que dans le domaine de l'aromathérapie pour les massages, les inhalations ou les bains. Elles sont aussi utilisées en agroalimentaire pour leurs saveurs et leurs arômes (café, vins, liqueurs distillées). Enfin, en industrie pharmaceutique. Elles sont utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes, antibiotiques et antioxydantes (**Bachelot *et al.*, 2006**).

I.2 GÉNÉRALITÉS SUR LES CHAMPIGNONS MICROSCOPIQUES

I.2.1 Définition

Les champignons, encore appelés mycètes, sont des organismes hétérotrophes uni- ou pluricellulaires incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes) d'aspect filamenteux ou levuriformes. Ils peuvent vivre en

saprophyte, symbiote ou parasite, se procurent en nutriments par adsorption (**Chabasse *et al.*, 2002**).

I.2.2 Caractères généraux

Les formes sous lesquelles se représentent les champignons sont variées. Celles couramment rencontrées sont structurées en fonction de leur mode de reproduction. En effet, les champignons se reproduisent suivant deux mécanismes : un mécanisme sexué et un mécanisme asexué. Ils sont formés d'un appareil végétatif appelé thalle constitué des cellules végétatives allongées et cloisonnées nommées hyphes (**Koenig, 1995**). Ces hyphes s'associent le plus souvent en mycélium, sorte de feutrage difficile à observer à l'œil nu ; parfois, le thalle est un simple tube sans cloisons, on parle alors de structure coenocytique et de siphon. Les colonies formées de cellules filamenteuses se représentent soit comme des moisissures avec des filaments anciens enchevêtrés, soit sous forme de croûte compacte glabre ou recouverte de duvet de filaments. Les colonies unicellulaires ont une consistance crémeuse avec des formes rondes ou ovales (**Lamoureux, 2003**).

La classification des champignons est difficile car il n'y a pas de critères fixes de classification.

- Selon la constitution de l'appareil végétatif, on distingue (**Leyral et Vierling, 2001**):
 - Les champignons supérieurs ou streptomycètes qui présentent toujours un mycélium cloisonné ;
 - Les champignons inférieurs ou siphomycètes dont le mycélium est toujours non cloisonné ;
- Selon le type des spores produites en reproduction sexuée, on divise en 4 sous divisions aux phylums (**koenig, 1995**) :
 - Zygomycotina : présence de zygospores;
 - Ascomycotina : présence d'ascospores;
 - Basidiomycotina : présence de basidiospores;
 - Deuteromycotina : absence de spores sexuées.

I.2.3 Généralités sur les mycoses

Les mycoses sont des infections provoquées par la présence d'un champignon microscopique pathogène dans l'organisme (**Chabasse *et al.*, 2004**). Les symptômes sont extrêmement variés et dépendent non seulement de l'hôte lui-même (de sa nature, de sa capacité de résistance et de la localisation de la maladie) mais également du pathogène et de sa virulence (**Dupont, 2002**).

Le nom d'une mycose découle soit du nom de la partie du corps envahie (dermatomycose, onychomycose); soit le plus souvent du champignon responsable (aspergillose, candidose). Du point de vue clinique, on divise les mycoses selon leur affinité particulière pour une partie du corps. Celles qui se développent sur l'épiderme, les phanères ou les muqueuses sont appelées mycoses superficielles alors que celles qui attaquent de façon sélective certains organes ou viscères sont les mycoses profondes (**Etoundi, 1982**).

I.2.3.1 Mode de contamination

On s'infecte d'un champignon en lui donnant l'occasion d'une manière ou d'une autre d'entrer dans son hôte. La porte par inhalation des spores des champignons qui vivent dans le sol, soit cutanée par léger traumatisme de la peau, par une épine souillée. Il n'est pas exclu que les muqueuses puissent être une autre voie.

La transmission des teignes d'une personne à une autre se fait soit par contact direct, soit indirectement à travers les objets souillés (objet de toilettes, vêtements, chaussures, plancher des piscines, plages). *Candida albicans* pénètre par la muqueuse du tractus digestif (mais peut aussi occasionnellement être introduit par l'intermédiaire des cathéters) (**Odds, 1998**).

I.2.3.2 Facteurs favorisant la contamination

Les facteurs favorisant peuvent légèrement différer d'un champignon à un autre. Le développement des mycoses est favorisé par (**Bouguerra *et al.*, 2004**) :

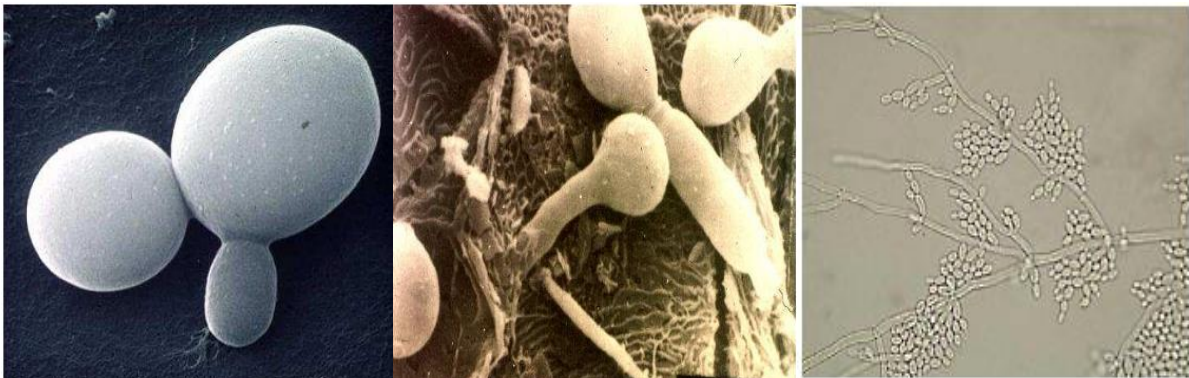
- **Les facteurs physiologiques** : l'âge, la grossesse, l'obésité ;
- **Les conditions locales** : l'humidité, la chaleur, le manque d'hygiène, la transpiration excessive, les traumatismes ou brûlure ;

- **Les médicaments** : prise de certains traitements (antibiotiques, corticoïdes, somnifères, immunodépresseurs, chimiothérapie) ;
- **La chirurgie** : surtout digestive et cardiaque, les transplantations d'organes, la pose des cathéters intraveineux, de prothèses ;
- **Le stress oxydatif** qui affaiblit le système immunitaire (**Favier, 2003**).

I.2.4 Le genre *Candida*

I.2.4.1 Description générale

Il regroupe des levures blanches, opaques, de formes ovoïdes, non pigmentées, non capsulées, à bourgeonnement multilatéral, productrices ou non de mycélium, de pseudo mycélium (figure 4) (**AFEP, 2002 ; Gloor, 2009**) ; leurs tailles varient de 4 à 6 μm de diamètre.



Candida forme **blastospore** *Candida* forme **pseudofilament** *Candida* forme **filament**

Figure 4 : Les formes de croissance des espèces du genre *Candida* (**Kah, 2011**)

On dénombre actuellement 248 espèces appartenant au genre *Candida* dont 23 espèces sont pathogènes pour l'homme (**Chabasse, 2006**).

I.2.4.2 Quelques espèces de *Candida* impliquées en pathologie infectieuse chez les PVVIH

I.2.4.2.1 *Candida albicans*

Il est la levure la plus fréquente chez l'Homme, représentant 60 à 80% des isolats et est responsable de plus de 50% des candidoses invasives (**Tortorano et al., 2004**). *Candida*

albicans est une levure cosmopolite, commensale des muqueuses oropharyngées, gastro-intestinales, génito-urinaires et respiratoires (Gloor, 2009).

Sur une gélose Sabouraud dextrose, les colonies sont blanches crémeuses, molles et lisses à ridées. En conditions hostiles, elle produit des chlamydozoospores.

I.2.4.2.2 Candida parapsilosis

C'est une levure saprophyte responsable d'environ 7% des infections dues aux *Candida* ; elle cause les candidémies d'origine externe (Almirante *et al.*, 2006). C'est le deuxième agent étiologique des septicémies candidosiques après *Candida albicans* (Kah, 2011), en particulier chez les immunodéprimés. Elle est commensale de la peau, à l'origine des lésions de celle-ci et des ongles.

Elle a une forme variable de la ronde à l'ovale et est parfois associée à un pseudomycélium. Les colonies sont blanches à crèmes, lisses et globuleuses ou plissées (Gloor, 2009).

I.2.4.2.3 Epidémiologie des infections candidosiques

Les infections à *Candida*, aussi bien au niveau mondial qu'à l'échelle locale connaissent un essor significatif ces dernières années. Les candidoses invasives sont l'une des causes majeures de morbidité et de mortalité, particulièrement chez les sujets immunodéprimés (Sganga, 2011).

En effet, dans le monde, 90% de patients infectés par le VIH souffrent de candidoses oropharyngées et au moins 75% d'entre eux développent une candidose œsophagienne associée (Repentigny *et al.*, 2004). Les candidémies représentent 5 à 10 % des septicémies et les candidoses invasives jusqu'à 17% des infections nosocomiales (Maruyama *et al.*, 2005). La mortalité due aux candidoses invasives atteint désormais les 71% chez les sujets immunodéprimés (Winter *et al.*, 2009). Cette augmentation de la mortalité est étroitement liée à l'émergence de nouvelles espèces du genre *Candida* autres qu'*albicans* (Pfaller *et Diekema*, 2004 ; Sganga, 2009). Bien que *Candida albicans* reste l'isolat majeur, les espèces non-*albicans* émergent de plus en plus et sont responsables d'au moins 50% des candidémies (Bassetti *et al.*, 2006 ; Pereira *et al.*, 2010); les espèces les plus fréquentes étant *Candida parapsilosis* et *Candida glabrata* (Ruan *et al.*, 2008 ; Leroy *et al.*, 2009).

Au niveau national, des patients infectés par le VIH, consultés à l'Hôpital Central et au Centre Hospitalier Universitaire de Yaoundé, 77% souffrent des candidoses oropharyngées (Lohoué *et al.*, 2004) et 36,2% de candidoses génito-urinaires (Lohoué *et al.*, 2005). Une étude menée sur les patients sous traitement à la clinique de la Fondation sur la Recherche Phytobiotechnologique de Bamenda a montré que 28,30% souffrent de candidose gastro-intestinale, 39,7% de candidose œsophagienne, 79,6% de candidose buccale (Yongabi *et al.*, 2009).

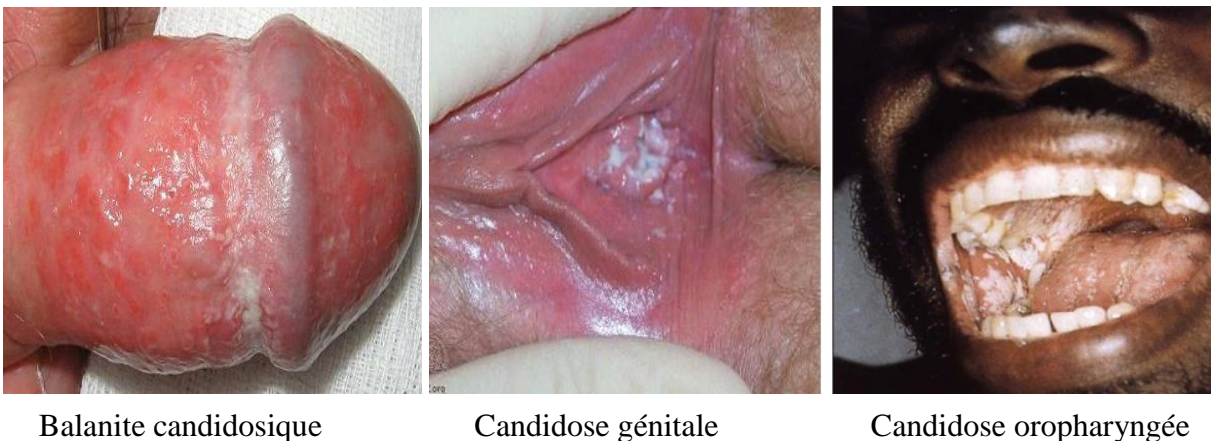


Figure 5 : Quelques manifestations des candidoses (Kah, 2011)

I.2.5 Le genre *Cryptococcus*

I.2.5.1 Description générale

Ce sont des organismes unicellulaires, de forme sphérique ou ovoïde de 3 à 7 µm, avec une paroi épaisse doublée d'une capsule. La capsule mucilagineuse est constituée de deux macromolécules, le galactoxylo-mannane (12%) et le glucuronoxylo-mannane (88%) (Gargni et Pini, 1992). Ils se reproduisent par bourgeonnement. Les principales espèces pathogènes sont *Cryptococcus neoformans*, comportant deux variétés (*neoformans* et *grubii*), et *Cryptococcus gattii* (Byrnes *et al.*, 2011).

I.2.5.2 *Cryptococcus neoformans*

C'est une levure très répandue dans la nature notamment dans l'air, sur les fruits, les plantes, le lait de vache, le bois (Gloor, 2009). Habituellement saprophyte, il ne devient pathogène que lorsque les moyens de défense de l'hôte sont affaiblis. Les principaux facteurs

de virulence sont la capsule, les phénols oxydases, la phospholipase, la superoxyde dismutase, et la croissance à 37° C (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2011).

Les colonies sont de forme variable rondes à allongées, pigmentées en beiges. Il n'y a pas de pseudomycélium. C'est l'agent étiologique principal des cryptococcoses chez les immunodéprimés, spécifiquement les patients atteints de l'infection à VIH (Gloor, 2009).

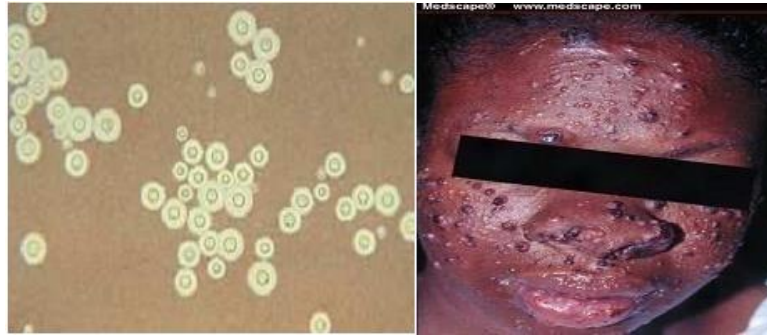
I.2.5.3 Les cryptococcoses

Ce sont des mycoses systémiques, subaiguës ou chroniques du système nerveux central et des méninges dont la porte d'entrée est pulmonaire. Les lésions cutanées secondaires peuvent se manifester sous forme de nodules ou d'ulcération (Eyana, 2007); la maladie peut atteindre les poumons, les viscères, les os et les muqueuses (Bossche *et al.*, 1990).

I.2.5.4 Epidémiologie des cryptococcoses

Les cryptococcoses sont au troisième rang des infections fongiques invasives chez les transplantés d'organes et leur incidence se situe entre 0,3 et 5% (Husain *et al.*, 2001). La mortalité globale due à la cryptococcose neuroméningée est approximativement de 25 à 30 % (Dzoyem *et al.*, 2012). Actuellement, 80 à 90% de sujets atteints de cryptococcose neuroméningée sont des patients VIH positifs (Wallace *et al.*, 2008) et environ 1 million de personnes vivant avec le VIH développent la cryptococcose chaque année ; en fonction de la prise en charge, on a une mortalité autour de 70% (Park *et al.*, 2009 ; Taggart *et al.*, 2011).

En Afrique Centrale, la prévalence de la cryptococcose est comprise entre 15 et 35% (Chen *et al.*, 2000). Une étude menée sur des patients atteints de l'infection à VIH à l'Hôpital Central de Yaoundé, entre Mars et Décembre 2010 a montré que la prévalence de la cryptococcose chez ces individus est de 7,14% (Dzoyem *et al.*, 2012).



Cryptococcus neoformans atteinte cutanée

Figure 6 : *C. neoformans* et manifestation cutanée de la cryptococcose (**Kah, 2011**)

Pour faire face à ces différentes maladies meurtrières, certains moyens thérapeutiques ont été mis au point et il est intéressant de porter un regard synoptique sur leur état actuel.

I.2.6 Quelques antibiotiques utilisés dans le traitement des champignons

Les antibiotiques les plus couramment rencontrés sont consignés dans le tableau I.

Tableau I : Quelques antifongiques et leurs modes d'action

Famille	Représentant	Mécanisme d'action
Les polyènes	Amphotéricine B Nystatine	Altèrent de la perméabilité cellulaire (Hamoir et al., 2001).
les Pyrimidines	Flucocytosine ou 5-Fluorocytosine	Transformé en 5-fluorouracyl qui substitue l'uracyl dans la synthèse de l'ARN et le blocage de la synthèse protéique (Dannoui, 2007).
les Azoles	Miconazole Itraconazole	Provoquent une accumulation du 14-méthylstérol qui altère la membrane (Hamoir et al., 2001).
Les Allylamines	Naftifine et la Terbinafine	Inhibent la squalène époxydase (Ryder et Fabre, 1997)
Autres antifongiques	Griséofulvine	Agit sur la perméabilité de la membrane cellulaire (ANOFEL, 2002).

Outre les effets secondaires indésirés des médicaments disponibles, il y a également une émergence significative des isolats résistants aux antifongiques, particulièrement ceux à usage systémique.

I.2.7 Les résistances aux médicaments antifongiques

I.2.7.1 Les différents types de résistances

Les micromycètes utilisent trois principaux types de résistances pour annihiler l'action des substances antifongiques (**Rajendran *et al.*, 2011**) :

La **résistance naturelle** est caractéristique de toutes les souches d'une espèce ou d'un genre, et peut être due soit à une absence de concentration de la substance dans la cellule, soit à une faible affinité pour sa cible ;

La **résistance acquise** est le fruit d'une modification génétique ; une souche devient résistante lorsque, appartenant à une espèce naturellement sensible à un antifongique, elle est apte à tolérer des concentrations supérieures à celles inhibant *in vitro* les autres souches de l'espèce ;

La **résistance adaptative** est liée à des modifications physiologiques transitoires dont l'augmentation de l'expression des pompes d'efflux, des cibles et les réarrangements structuraux.

I.2.7.2 Les mécanismes de résistances aux familles d'antifongiques

Les phénomènes de résistances chez les champignons sont mis en place via les mécanismes suivants : la modification ou la surexpression de la cible, la surexpression des pompes à efflux membranaires, l'impossibilité de franchir les barrières membranaires, l'absence de bioconversion (**Ghannoum et Rice, 1999**). Ces mécanismes sont illustrés sur la figure 7 ci-dessous.

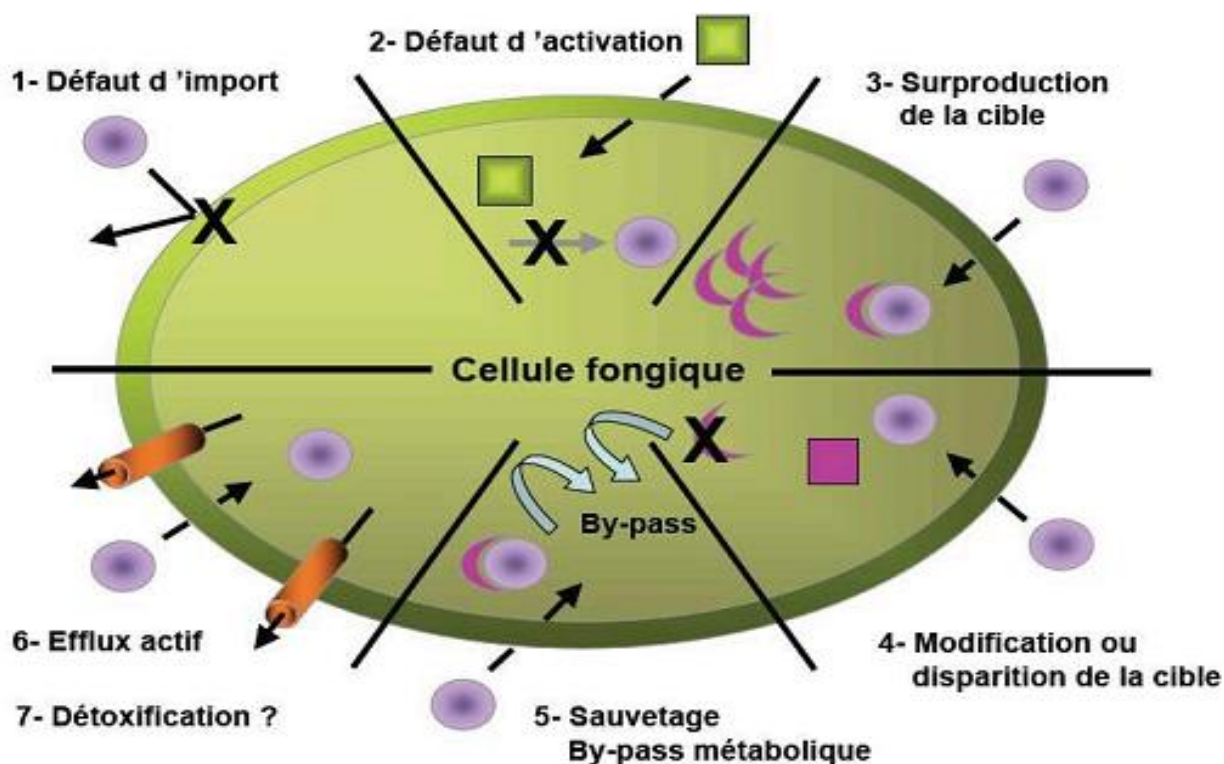


Figure 7: Les mécanismes de la résistance aux antifongiques (El-Kirat-Chatel, 2010)

I.3 GÉNÉRALITÉS SUR LES CANCERS

I.3.1 Historique et Définition

I.3.1.1 Historique

Le cancer vient du mot grec karkinos(d'où dérivent carcinome, carcinologie, carcinogénèse...) qui signifie « crabe » Hippocrate, célèbre médecin généraliste de banlieue dans la Grèce des années 400 avant J.-C, avait comparé à un crabe et ses pinces la tumeur cancéreuse et ses ramifications s'agrippant au tissu atteint. Bien que son origine ait longtemps méconnue, le cancer n'est pas une maladie nouvelle : des cancers du nasopharynx diagnostiqués sur les momies égyptiennes datant de plus de 2000 ans avant J,-C, se sont avérés identiques aux cancers du nasopharynx observés actuellement en Afrique. Si le cancer est la maladie du siècle (XX^e ou XXI^e), c'est parce que sa fréquence augmente avec l'âge et que l'espérance de vie augmente (Moussard, 2010).

I.3.1.2 Définition

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération importante et anarchique de cellules anormales qui ont la capacité d'envahir et de détruire les tissus sains et de se disséminer dans l'organisme. Il peut toucher tous les organes et a de multiples causes, souvent cumulées (Hanahan et Weinberg, 2000 ; Marcotte *et al.*, 2008).

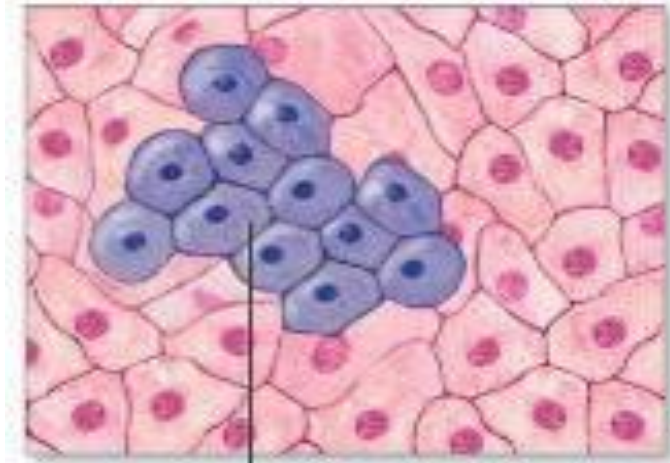


Figure 8 : Prolifération de cellules cancéreuses (Marcotte *et al.*, 2008)

Un cancer commence quand une cellule cesse de se diviser normalement. Après un certain temps, cette cellule se divise pour se reproduire et on a deux cellules anormales. Ces nouvelles cellules vont se reproduire à leur tour et ainsi de suite, jusqu'au moment où des milliers de cellules anormales se regroupent et forment ce qu'on appelle tumeur.

Il y a deux sortes de tumeurs :

- **Les tumeurs bénignes** ne sont pas cancéreuses. Même si elles peuvent prendre la place des cellules normales, elles ne se répandent pas dans d'autres parties du corps ;
- **Les tumeurs malignes** sont cancéreuses. Après un certain temps, elles laissent s'échapper des cellules anormales qui vont se déplacer vers d'autres parties du corps. Ces cellules vont à leur tour se reproduire et former d'autres tumeurs. C'est ce qu'on appelle des **métastases** (Hanahan et Weinberg, 2000 ; Marcotte *et al.*, 2008).

Ainsi, un cancer prend le nom de l'endroit où la première tumeur est apparue ; par exemple, si la maladie a attaqué les poumons, les seins, le foie, etc, on dira qu'il s'agit de : cancer du poumon, cancer du sein, cancer du foie, etc. Les cancers ne se développent pas tous de la même façon ou à la même vitesse.

I.3.2 Processus moléculaire de la cancérogenèse

La maladie cancéreuse se caractérise par l'envahissement progressif de l'organe d'origine, puis de l'organisme entier, par des cellules devenues peu sensibles ou insensibles aux mécanismes d'homéostasie tissulaire et ayant acquis une capacité de prolifération indéfinie (immortalisation). Ces cellules tumorales dérivent dans la grande majorité des cas d'une seule cellule (monoclonale). Les particularités des cellules tumorales sont liées à l'accumulation d'altérations de leur génome (génotype). Ces altérations sont le plus souvent acquises au cours de la genèse tumorale, mais certaines peuvent être d'origine héréditaire (prédispositions familiales). Les clones tumoraux peuvent perdre ou conserver certaines caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules originelles, ou en acquérir de nouvelles (variabilité du phénotype des sous-clones). Ces modifications vont s'inscrire à la fois dans le noyau, dans le cytoplasme et sur la membrane des cellules pathologiques. Un néoplasme est la conséquence d'altérations successives du génome des cellules tumorales, qui perturbent de façon permanente l'homéostasie tissulaire dont le mécanisme moléculaire est représenté dans la figure 9 (Szepetowski, 1991)

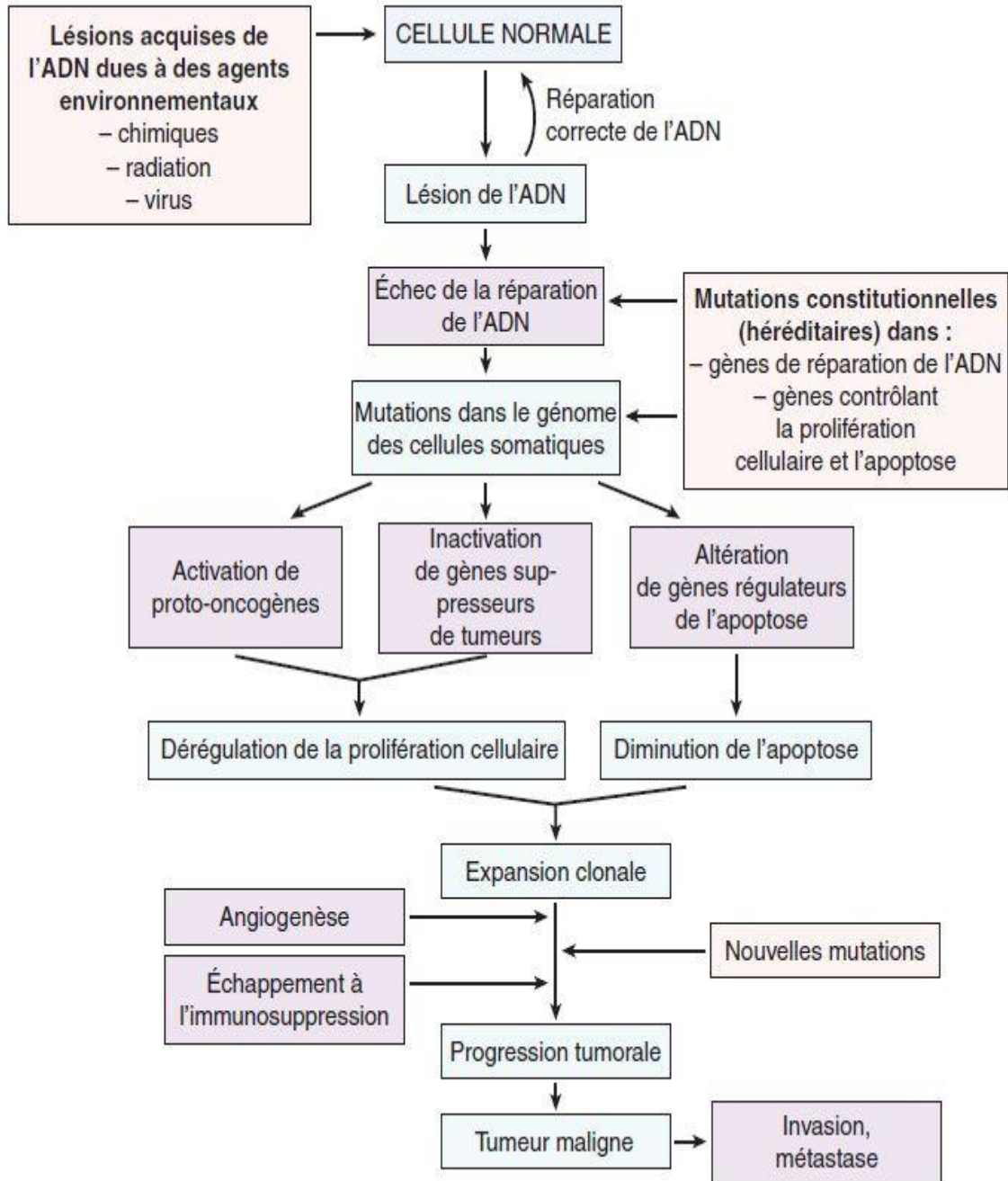


Figure 9 : Mécanisme moléculaire de la cancérogenèse (Szepetowski, 1991)

I.3.3 Classification des Cancers

La classification des cancers s'est établie suivant le type de cellule, de tissu ou l'organe affecté au départ. Ainsi on distingue différents types de cancers :

- Les carcinomes sont les plus fréquents (plus de 85%). Il concerne les tissus épithéliaux, c'est-à-dire des tissus minces formés d'une ou plusieurs couches de cellules jointives.

- Les sarcomes concernent les tissus conjonctifs de soutien de la structure de l'organisme, qu'ils soient communs ou spécialisés (par exemple osseux, cartilagineux, musculaires, adipeux, vasculaires...). Les sarcomes sont très rares (moins de 1%).
- Les lymphomes concernent le tissu hématopoïétique: moelle rouge des os où les cellules du sang se forment et tissu lymphoïde ; se développent à partir des cellules du système immunitaire, le plus souvent dans les ganglions lymphatiques.
- Les leucémies concernent les tissus de la moelle osseuse responsable de la production des globules blancs.
- Les mélanomes : tumeurs malignes de la peau, rarement les muqueuses (respiratoires, digestives, génitales), la choroïde oculaire ou les structures cérébro-méningées.
- Les neuroblastomes sont des tumeurs malignes de type embryonnaire dérivant des crêtes neurales, spécifiques aux enfants. Il s'agit de la tumeur solide de l'enfant la plus fréquente après les tumeurs cérébrales.
- Les hématoblastomes ou tumeurs malignes du foie est le carcinome hépatocellulaire développé dans 90% des cas sur une cirrhose, le plus souvent d'origine alcoolique ou virale.
- Les gliomes ou tumeurs gliales sont l'ensemble des tumeurs cérébrales, bénignes ou malignes, issues du tissu de soutien neuronal ou glie. Ce sont des tumeurs rares, dont le pronostic, extrêmement variable, est principalement lié à plusieurs facteurs parmi lesquels la localisation, la taille et le degré d'extension.
- Les adénocarcinomes ou tumeurs malignes développées aux dépens d'un épithélium glandulaire. Le terme est à distinguer de celui d'adénome qui désigne une tumeur bénigne développée aux dépens d'un épithélium glandulaire.

Ainsi le cancer est une maladie qui touche tous les organismes vivants, incluant les insectes et les plantes. Il y a plus de 200 types de cancers. Toutefois, certains sont beaucoup plus fréquents que d'autres notamment les cancers du sein, de la peau, du poumon, de la prostate, du côlon, du rectum, du col de l'utérus et la leucémie (**Marcotte *et al.*, 2008**).

Notre étude porte sur le cancer du sein représenté par la figure 10 et caractérisé par une lignée des cellules cancéreuses (MCF-7).

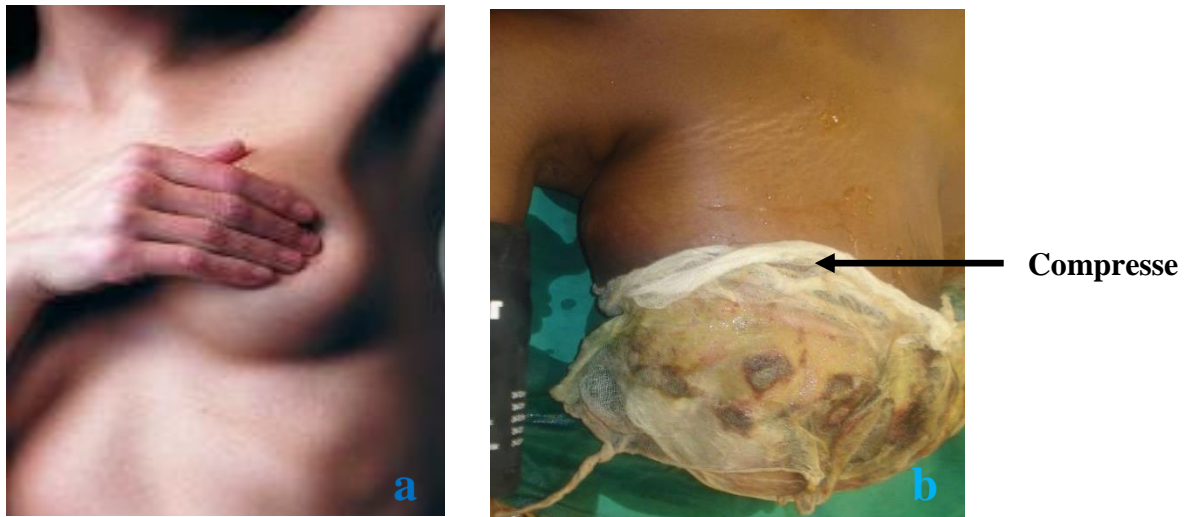


Figure 10 : Cancer du sein (a : diagnostic, b : sein atteint par le cancer) (Marcotte *et al.*, 2008 ; Photographie Bakarnga-Via, 2012)

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Il apparaît surtout après 50 ans. C'est un cancer qui se traite assez bien s'il est dépisté au début, à ce propos il est recommandé aux femmes de se faire examiner les seins par leur médecin pour d'éventuels changements morphologiques tels que les bosses et les fossettes. A cela une mammographie est souhaitable tous les deux ans surtout chez les femmes âgées de 50 à 70 ans. Cette tranche d'âge constitue des sujets à risque (Marcotte *et al.*, 2008).

I.3.4 Epidémiologie de Cancers

Le Cancer est la cause majeure de la mortalité affectant toutes les tranches d'âge des populations dans le monde et est responsable de 7.6 millions de morts en 2008 (WHO, 2013). De plus les provisions de l'OMS révèlent que le nombre de décès liés au cancer devrait atteindre 17 millions à l'horizon 2030 (Rebecca *et al.*, 2012). En effet, les Cancers les plus répandus sont les cancers du sein, colon, poumon et prostate (Monteiro *et al.*, 2014). Au Cameroun, le cancer est un problème de sante publique. Le cancer du sein est la seconde cause de mortalité en majorité dans les pays sub-sahariens (Ahmedin *et al.*, 2001). Au Cameroun, il y a 27,9 cas de cancer du sein pour 100 000 femmes (Globocan 2010). Des études effectuées par Mbassi *et al.* (2010) au service Médicale d'Oncologie de l'Hôpital General de Yaoundé, Cameroun, de janvier 1998 à décembre 2007, ont montré que sur 2,355 patients consultés, 48 étaient diagnostiqués du cancer de poumons (28 Hommes et 20 femmes).Le comité national du contrôle des cancers au Cameroun a révélé une croissance du taux des Cancers avec une incidence annuelle de 12.000 en 2004 à 14.000 en 2010 et une prévalence de 25.000 cas (Enow *et al.*, 2012).

I.3.5 Les causes des Cancers

Le cancer est une maladie qui reste mystérieuse. On peut rarement dire avec exactitude quelles sont les causes de la plupart des cancers. Mais on sait que c'est une maladie qui est liée en grande partie aux conditions et aux habitudes de vie (**Marcotte *et al.*, 2008**):

- Age ;
- Consommation de tabac ;
- Mauvaises habitudes alimentaires (aliments trop gras et trop sucrés, moins de fruits, légumes et d'aliments riches en fibres) ;
- Pollution de l'environnement (sources des agents cancérigènes) ;
- Hérité qui joue un rôle dans l'apparition de certains cancers ; le cancer du sein par exemple ;
- Activité des oncogènes viraux.

I.3.6 Les traitements du Cancer

Il existe plusieurs traitements pour le cancer. Les quatre principaux sont les suivants : la **chirurgie**, la **chimiothérapie**, la **radiothérapie** et l'**hormonothérapie**.

La chirurgie : La chirurgie est une opération qui consiste à enlever une tumeur tout ou une partie. En effet, selon le type de cancer et l'endroit où la tumeur est située, il peut être possible de l'enlever au complet. Dans ce type d'opération, on ôte souvent un peu de tissu sain par mesure de prudence. Si la maladie est plus avancée, on peut enlever une partie de la tumeur, ce qui permet de retarder son développement ou de réduire la douleur (**Lechat, 2006 ; Marcotte *et al.*, 2008 ; Wildiers *et al.*, 2013**).

La chimiothérapie : La chimiothérapie consiste à donner des médicaments à la personne atteinte afin de tuer les cellules cancéreuses. Ces médicaments peuvent prendre plusieurs formes : liquides, pilules ou injections. Ce type de traitement peut durer plusieurs mois (Lechat, 2006 ; Marcotte *et al.*, 2008 ; Wildiers *et al.*, 2013).

La radiothérapie : La radiothérapie consiste à traiter le cancer au moyen de rayons X très puissants ou de substances radioactives. On concentre ces rayons directement sur les tumeurs afin de détruire les cellules cancéreuses (**Lechat, 2006 ; Marcotte *et al.*, 2008 ; Wildiers *et al.*, 2013**).

La chirurgie et la **radiothérapie** servent à traiter des cancers localement. La chimiothérapie, pour sa part, agit partout dans le corps et sert surtout à détruire les cellules cancéreuses qui se sont déjà répandues. Aussi, afin de traiter un cancer, il arrive souvent que l'on utilise ces deux traitements (**Marcotte et al., 2008**).

Si le traitement est très efficace, il peut mener à une rémission. On parle de rémission complète quand on ne trouve plus aucun signe de cancer. Cela peut durer des mois, des années, parfois si longtemps qu'on considère la personne comme guérie. Mais il arrive que le cancer revienne. C'est ce qu'on appelle une récurrence. Alors, il faut reprendre le traitement.

L'hormonothérapie : l'hormonothérapie est utilisée pour lutter contre les cancers dont le développement est dépendant d'hormone. Ce traitement est particulièrement efficace dans les cancers du sein et de la prostate. Il inclut des médicaments dont l'action consiste à stopper la production de certaines hormones et à modifier leur fonctionnement (**Lechat, 2006 ; Marcotte et al., 2008 ; Wildiers et al., 2013**).

I.3.7 Effets des Cancers et leur prévention

Malgré l'efficacité grandissante des traitements, le cancer reste une maladie difficile à combattre. Les traitements ne détruisent pas seulement les cellules cancéreuses, mais aussi certaines cellules saines. Aussi, les personnes qui ont le Cancer sont souvent aux prises avec un grand nombre de désagréments qui peuvent découler de la maladie elle-même, de son traitement ou de la combinaison des deux. Ces désagréments sont nombreux, les plus courants sont : la fatigue, l'anémie, la douleur, les nausées, les vomissements, la perte de cheveux, de poils et de poids.

Comme la prévention est toujours le meilleur moyen de rester en santé, voici quatre conseils inspirés de la Société Canadienne du Cancer (**Nobili et al., 2009**):

- Ne fumez pas et évitez la fumée des autres
- Ayez un régime alimentaire varié : peu d'aliments gras (beurre, charcuterie) et beaucoup de fibres (légumes, fruits, céréales).
- Limitez votre consommation d'alcool.
- Faites de l'activité physique.

I.3.8 Cycle cellulaire et le Cancer

I.3.8.1 Cycle cellulaire et sa régulation

Le cancer peut être défini comme une maladie liée à la prolifération incontrôlée et la dissémination dans l'organisme de cellules devenues anormales. Les processus qui régissent la division cellulaire sont donc très importants dans la cancérogénèse. La division cellulaire est contrôlée par le cycle cellulaire. Il a pour fonction de reproduire des cellules filles identiques à la cellule mère, et celles dont l'ADN est altéré sont réparées ou détruites.

Le dérèglement des systèmes régissant et contrôlant l'avancement du cycle cellulaire est à l'origine de la prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses.

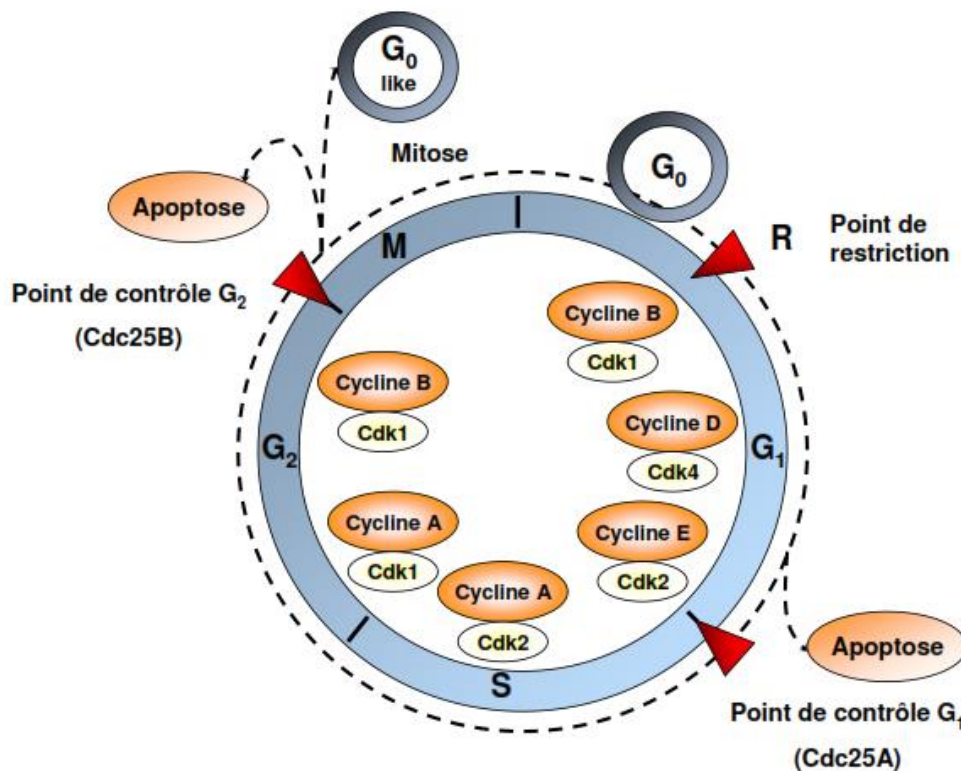


Figure 11 : Cycle cellulaire et sa régulation (Karp, 2010).

Le cycle cellulaire est représenté sur la figure 11. Ce cycle concerne toutes les cellules activées par un facteur de croissance et comprend quatre étapes dont la chronologie est strictement déterminée : G₁, S, G₂, M :

G₁: synthèse des molécules nécessaires à la division cellulaire (désoxyribonucléotides, enzymes ...), il n'y a pas de réplication de l'ADN (cellule diploïde).

S : réplication de l'ADN, la cellule $2n$ devient $4n$ (tétraploïde).

G₂: la cellule met en place les protéines du fuseau mitotique. Il y a séparation des deux centrosomes.

M : mitose.

Les cellules qui ne sont pas dans le cycle cellulaire sont dites « quiescentes » et se trouvent en phase G₀.

A l'état physiologique, la progression d'une cellule vers la phase suivante n'est possible que lorsque tous les événements relatifs à la phase précédente sont achevés. Le système possède deux points de contrôle (passage de G₁ à S et de G₂ à M) et un point de restriction R en G₁. Chaque changement de phase du cycle cellulaire est précédé d'un contrôle sous la dépendance de kinases (CdK), de protéines activatrices (cyclines) ou inhibitrices (CKI).

Les éléments clefs des événements majeurs du cycle cellulaire sont les enzymes à activité protéine kinase : les CdK. Elles sont régulées par deux types de mécanismes :

- des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation,
- par l'association avec les protéines activatrices, les cyclines.

L'activité des CdK est très faible au début de G₁. Cette activité déclenche la formation des complexes de pré-réplication. Au milieu de la phase G₁, l'activité des CdK est plus importante. Elle est due à l'association des CdK4 et CdK6 aux cyclines de type D. Parmi les substrats de ces enzymes, il y a la pRb (protéine régulatrice). La phosphorylation de pRb conduit à la transcription de plusieurs gènes, dont celui codant pour les cyclines E et A, CdK1 et les protéines intervenant dans la réplication. Le passage de G₁ à S (initiation de la réplication) est induit par l'activité des complexes CyclineE-CdK2 et CyclineA-CdK2. Le passage de G₂ à M est provoqué par l'activité des complexes CyclineA-CdK1 et CyclineBCdK1, responsables de la phosphorylation de substrats tels que le cytosquelette, les histones et les protéines de l'enveloppe nucléaire (**Karp, 2010**).

Les Phosphatases Cdc25A, B et C déphosphorylent et activent les complexes CdK/cycline. Cdc25A permet le passage G₁, S (activation de Cdk2-cycline E), alors que Cdc25B autorise la transition G₂-M (activation de CdK1-Cycline B). Cdc25A et Cdc25B sont surexprimées dans de nombreux cancers (**Karp, 2010**).

I.3.8.2 Apoptose

I.3.8.2 .1 Généralités

Le terme apoptose est utilisé pour décrire une des formes de mort cellulaire survenue dans les organismes multicellulaires. L'apoptose est définie en tant que mort cellulaire programmée qui implique le « suicide » des cellules à l'état individuel en faveur du bon fonctionnement de l'organisme dans son ensemble. Elle subit un ensemble de mécanismes de régulation et engage un grand nombre de voies de la signalisation cellulaire. Les composants de ces voies sont codés par le génome, exprimés et prêts à être activés lorsque le *stimulus*-inducteur de la mort cellulaire apparaît (**Hengartner, 2000 ; Moussard, 2010**). Ce processus est essentiel dans le maintien du nombre de cellules dans les tissus et de manière générale, dans le maintien de l'équilibre de l'organisme. L'inhibition de l'apoptose ou une apoptose défectueuse ont pour conséquence le développement de cancers, de pathologies auto-immunes et de maladies d'origine virale alors qu'une apoptose excessive peut conduire au développement de désordres neurodégénératifs (**Rathmell et Thompson, 2002**). De nombreux *stimuli* localisés à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule sont à l'origine de l'enclenchement d'un processus apoptotique. Dans certains cas, l'absence de facteurs de croissance peut être suffisante pour induire l'apoptose au même titre que l'ADN endommagé, le stress oxydatif, le traitement avec des molécules cytotoxiques ou l'irradiation, l'interruption de la signalisation qui régule le cycle cellulaire, les ligands de récepteurs spécifiques de la mort cellulaire (DR : Death Receptors). Il existe deux voies de signalisation principales qui contrôlent le déroulement de l'apoptose : la voie extrinsèque ou celle des récepteurs extracellulaires (TNF α : Tumeur Necrosis factor et FasL : Fas Ligand) et la voie intrinsèque ou mitochondriale (Bcl2, Bax, cytochrome c et les caspases). Le signal apoptotique implique l'activation de nombreux enzymes qui font partie de deux grandes familles : celle des caspases et celle des protéines de la famille Bcl-2. Les caspases ont un rôle important dans les processus de dégradation des organites cellulaires, alors que les protéines Bcl-2 participent au maintien et à la propagation du signal (**Kim et al, 2006 ; Moussard, 2010**).

I.3.8.2 .2 Les caspases et les protéines mitochondriales

L'apoptose est une forme active de mort cellulaire programmée, qui constitue une réponse de l'organisme à des stimuli physiologiques ou pathologiques provoquant un déséquilibre entre production et élimination de cellules. Les stimuli extérieurs ou intérieurs modifient le rapport des protéines (Bcl2/Bax) de la membrane mitochondriale et entraînent

l'ouverture des pores mitochondriales et libération dans le cytosol du cytochrome c et la chute du potentiel électrochimique de la membrane mitochondriale (**Cohen, 1993 ; (Moussard, 2010)**).

La chute du potentiel électrochimique de la membrane mitochondriale entraîne :

- un découplage des phosphorylations oxydatives et arrêt de la synthèse d'ATP dans la mitochondrie ;
- un défaut de maturation des protéines mitochondriales synthétisées dans le cytosol ;
- un arrêt de la traduction mitochondriale ;

La libération dans le cytosol du cytochrome c active les procaspases en caspases (enzymes protéolytiques connues sous le nom des caspases de Cysteiny-ASpartate-SPECIFIC proteASES dont le génome humain code pour au moins 14 caspases réparties en caspases activatrices (1,4,5,11,12,13,14) de cytokines, initiateuses (2,8,9,10) des voies intrinsèques, extrinsèques et la libération du cytochrome c, effectrices(3,-,7) de l'apoptose.

Les caspases ont des cibles sur lesquelles elles exercent leur pouvoir de clivage protéolytique qui a pour conséquences :

- la dégradation des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire (actine, histones H1, topoisomérase I et lamines nucléaires) ;
- l'activation des endonucléases du cytoplasme qui fragmentent l'ADN (**Cohen, 1993 ; (Moussard, 2010)**).

I.3.8.3 Biologie du Cancer

Le cancer provient de six altérations de la physiologie cellulaire qui sont communes à toutes les cellules cancéreuses conduisant leur prolifération incontrôlée (**Hanahan et Weinberg, 2000**) :

- Acquisition des cellules cancéreuses à produire leurs propres signaux de croissance et d'être sensibles ;
- Insensibilité aux signaux antiprolifératifs ;
- Blocage du mécanisme de l'apoptose ;
- Acquisition d'une capacité à se diviser à l'infini ;
- Activation de l'angiogenèse des capillaires sanguins à proximité ;
- Formation des tumeurs secondaires (métastases) à partir des tumeurs primaires.

I.3.8.3.1 Genèse des cellules cancéreuses

Une cellule devient cancéreuse suite à une altération de son ADN. Il existe deux types de modifications génétiques conduisant à la formation d'une cellule cancéreuse (**Karp, 2010 ; Lechat, 2006**) :

- Inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs ;
- Activation de proto-oncogènes en oncogènes.

➤ Inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs

La plupart des protéines codées par les gènes suppresseurs de tumeurs fonctionnent comme des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire (**Karp, 2010**).

La mutation la plus rencontrée dans les cancers humains, est celle du gène qui code pour la protéine p53 (50% des cancers). Elle est directement impliquée dans le processus de réparation de l'ADN et dans le phénomène d'apoptose. Une protéine p53 non fonctionnelle conduit à l'accumulation d'erreurs dans le génome pouvant amener à l'apparition d'une cellule cancéreuse (**Yokota, 2000**).

➤ Activation de proto-oncogènes en oncogènes

La prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses est due à l'activation constitutive des oncogènes cellulaires dénommés c-oncogène. A l'état physiologique, ces gènes se trouvent sous forme de «proto-oncogènes» qui sont c-myc, N-myc et L-myc. Ils sont impliqués dans les processus de croissance et de différenciation tissulaire. Ils sont induits en oncogènes par transformation virale, par mutation, par amplification ou translocation/dérépression génique et confèrent aux cellules cancéreuses leur autonomie de croissance puis génèrent des erreurs dans les programmes de maturation cellulaire. L'amplification des proto-oncogènes (c-myc, N-myc et L-myc) est responsable des affectons néoplasiques telles que les leucémies, neuroblastomes et les carcinomes (**Szepetowski et al, 1991; Moussard, 2010**).

L'oncogène muté le plus fréquemment retrouvé dans les tumeurs humaines est Ras. Il code pour une protéine de fixation au GTP (Ras) régulatrice dans une des voies de contrôle de la prolifération cellulaire (**Yokota, 2000; Lechat, 2006; Karp, 2010**).

I.3.9 Les anticancéreuses et leurs modes d'action

Les agents anticancéreux utilisés en médecine moderne affectent généralement l'ADN, le fuseau mitotique et les récepteurs hormonaux des cellules tumorales. Le tableau II présente

quelques anticancéreux et leurs modes d'action (**Peterson et Mitchison, 2002 ; Bernades-Genisson *et al.*, 2003**).

Tableau II : Les anticancéreuses et leurs modes d'action

Famille	Représentants	Mécanisme d'action
Agents alkylants	Cyclophosphamide, Busulfan, Carmustine	Substitution d'un radical alkyl réactif à un proton d'une structure nucléophile hautement réactive de l'ADN ; La formation de ponts inter ou intra caténaux non réparables entraînant une altération de structure de l'ADN.
Inhibiteurs de topoisomérases I et II	Anthracyclines, Bléomycine, Etoposide	La stabilisation des complexes clivables ADN-topoisomérase provoquant ainsi des coupures (cassures) de l'ADN.
Antimetabolites	5-Fluoro-uracile (5 FU) Gemcitabine	Inhibition de la synthèse d'ADN, ARN
Inhibiteurs du fuseau mitotique	Les alcaloïdes Taxanes Les cytokines : IFN, IL (Interféron recombinant, Interleukine)	Inhibition de la polymérisation. Inhibition de la dépolymérisation.
Immuno suppresseurs	Les Anticorps monoclonaux : Rituximab Les anti-angiogénèse : Imatinib Les corticoïdes	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-angiogénèse et immuno-modulation. • Une action antiprolifératrice sur les cellules tumorales. • inhibiteurs des tyrosineskinases. • une action sur les récepteurs hormonaux des cellules tumorales.

Au cours des mycoses et le cancer naissent le stress oxydatif, les radicaux libres et les inflammations.

I.4 GÉNÉRALITÉS SUR LE STRESS OXYDATIF ET LES RADICAUX LIBRES

I.4.1 Le stress oxydatif

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers. La surproduction des molécules oxydantes telles que les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) et les Espèces Nitrogénées Réactives (ENR), ou le déficit en antioxydant, génèrent le stress oxydatif qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles (**Pincemail *et al.*, 1999 ; Yildirim *et al.*, 2001**).

Le stress oxydatif induit de nombreuses maladies qui apparaissent avec l'âge puisque le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux libres. Ces maladies sont le cancer, l'athérosclérose, le diabète, la maladie de parkinson, la maladie de Alzheimer et les pathologies cardiaques coronariennes (**Duan et al., 2006**).

Au cours des infections, le stress oxydatif induit par une libération des cytokines prooxydantes et d'autres types de réactions d'oxydation mènent à une utilisation accrue des vitamines « antioxydantes » et à la séquestration en complexe de plusieurs minéraux qui sont utilisées pour former les enzymes antioxydantes (**Ghanmoun et Rice, 1999**). Chez les sujets infectés par le VIH, par exemple, cette utilisation accrue des nutriments vient s'ajouter à d'autres facteurs tels que la malabsorption pour induire des carences nutritionnelles qui déprime le système immunitaire (**Hosein, 1998**). Cette condition d'immunodépression favorise le développement de nombreuses infections, parmi lesquelles les infections fongiques (**Boiron, 2008**). Pour se prémunir des effets néfastes des ERO et des ENR, l'organisme va développer différents mécanismes de défenses antioxydantes.

I.4.2 Antioxydants et radicaux libres

Un antioxydant est une substance qui à faible concentration supprime ou inhibe significativement le processus d'oxydation avant d'être elle-même oxydée (**Vaya et Aviram, 2001**). Cette réaction d'oxydation met en jeu des intermédiaires appelés radicaux libres qui sont des espèces chimiques neutres ou chargées possédant un électron non apparié (électron célibataire). L'antioxydant capte et neutralise les radicaux libres ; élimine et remplace également les molécules endommagées (**Rock, 2003**).

I.4.3 Production des radicaux libres et rôle des antioxydants

L'oxydation des acides gras peut être issue de plusieurs types de réactions schématisées dans la figure 12 suivante :

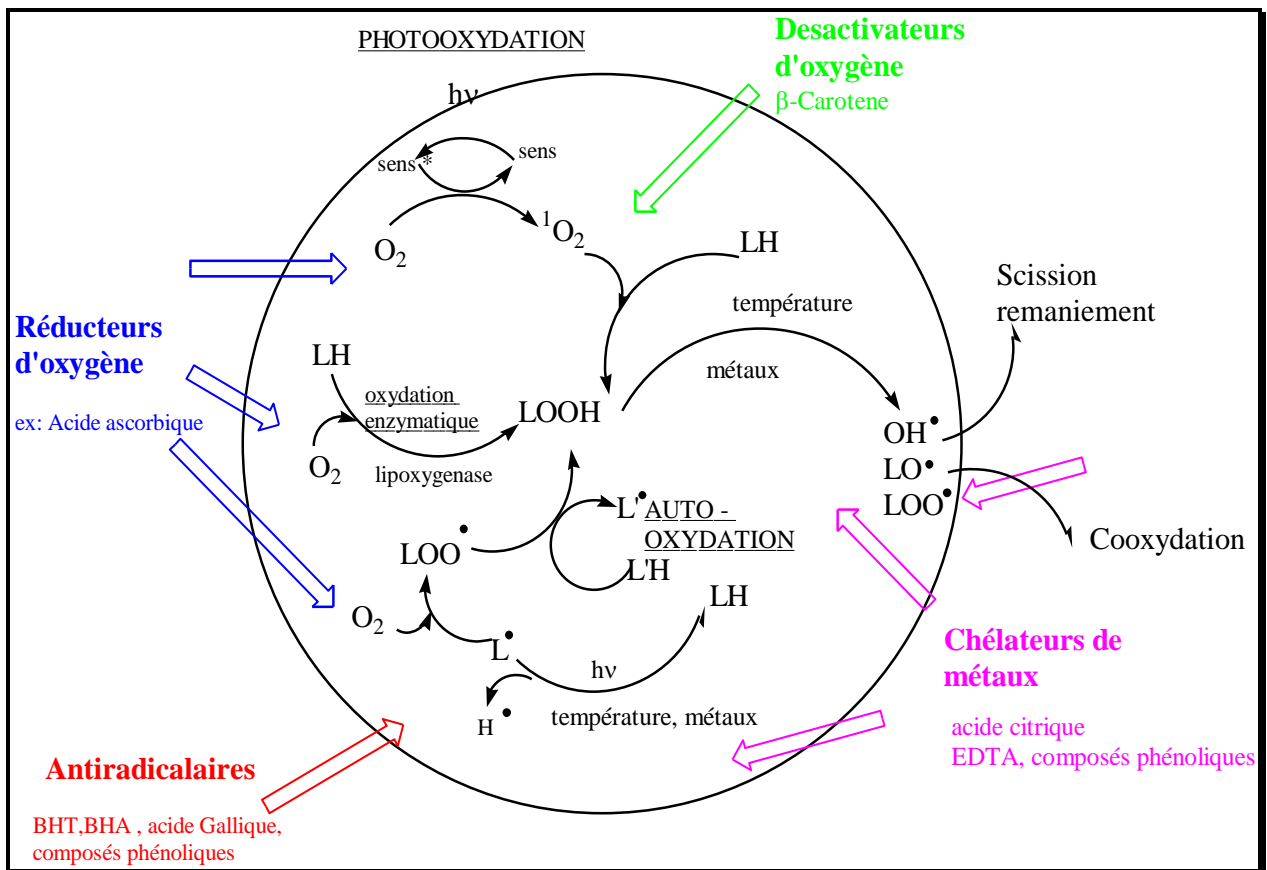


Figure 12 : Mécanisme d'action des antioxydants sur l'oxydation des acides gras (Cuvelier et Martel, 2002).

Le processus de photooxydation induit par l'énergie lumineuse conduit à des hydroperoxydes, molécules instables donnant des entités radicalaires hautement réactives qui peuvent être les EOR et les ENR, qui incluent aussi bien les radicaux libres (anion superoxyde : O_2^- ; radical hydroxyde : OH^\bullet ; peroxyde : ROO^\bullet ; peroxydinitrite : $^{\circ}ONOO^-$; oxyde nitrite : NO^\bullet), que les molécules non radicalaires (peroxyde d'hydrogène : H_2O_2 ; oxygène singlet : 1O_2 ; acide nitrique : HNO_3).

Pour faire face à ces radicaux libres et le stress oxydatif qu'ils pourraient générer, plusieurs types d'inhibiteurs interviennent à différents niveaux. Ainsi, on distingue généralement deux classes d'antioxydants (Cuvelier et Martel, 2002):

- Les antioxydants primaires ou antiradicalaires encore appelés antioxydants vrais qui sont des molécules capables d'interrompre la chaîne auto catalytique en bloquant les radicaux libres lipidiques par transfert d'un radical hydrogène. La plupart de ces molécules sont de natures phénoliques telles que le BHT, le BHA, l'acide gallique et le TBHQ.

- Les antioxydants secondaires ou préventifs sont ceux capables soit de retarder l'oxydation des lipides par des procédés autres que l'interruption de la chaîne d'autooxydation, soit d'inhiber la production de radicaux libres servant à l'initiation de ces réactions. On distingue les réducteurs d'oxygène singulet et les chélateurs de métaux :
 - Les réducteurs d'oxygène singulet sont des composés capables de désactiver l'oxygène singulet formé par photosensibilisation tel que le β - carotène ou de ceux capables de régénérer les antioxydants primaires tels que les tocophérols et l'acide ascorbique.
 - Les chélateurs de métaux forment des complexes avec les ions métalliques et permettent de réduire l'effet prooxydant des métaux dans l'initiation et la propagation de l'oxydation. On peut citer l'EDTA, l'acide citrique, l'acide phosphorique et les polyphosphates, l'acide tartrique et l'acide phytique.

L'intérêt croissant à substituer les antioxydants de synthèse par des antioxydants naturels a été un moteur dans la recherche et se poursuit activement par un screening de la matière végétale pour l'identification de nouveaux antioxydants. En effet, les dérivés phénoliques (thymol, cavacrol, eugénol) d'origine végétale possèdent des propriétés antioxydantes, d'où la possibilité d'utiliser les huiles essentielles qui sont des mélanges complexes dont certains composés sont des dérivés phénoliques (**Gulluce *et al.*, 2003 ; Botsoglou *et al.*, 2003**).

I.5 INFLAMMATIONS ET LES ANTI-INFLAMMATOIRES

I.5.1 Définition de l'inflammation

L'inflammation est une réponse non spécifique de l'organisme à une agression qui se manifeste par divers symptômes : rougeur, tuméfaction, chaleur, douleur. Elle peut être chronique ou aiguë (**Rousselet *et al.*, 2005**).

I.5.2 Inflammations aiguës

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours ou semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou après traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (**Rousselet *et al.*, 2005**).

I.5.3 Inflammations chroniques

Les inflammations n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évoluent en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. On peut distinguer deux types de circonstances de survenue des inflammations chroniques (**Rousselet et al., 2005**) :

- Les inflammations aiguës qui évoluent en inflammations prolongées subaiguës et chroniques lorsque l'agent pathogène initial persiste dans les tissus ou lorsqu'une inflammation aiguë récidive de façon répétée dans le même organe en entraînant à chaque épisode des destructions tissulaires de moins en moins bien réparées.
- Les inflammations peuvent parfois se manifester d'emblée sous une forme apparemment chronique. La phase aiguë vasculo-exsudative est passée inaperçue car brève ou asymptomatique. C'est souvent le cas de maladies auto-immunes, des affections où les mécanismes dysimmunitaires sont prépondérants (par exemple l'hépatite chronique active secondaire à une infection par le virus de l'hépatite B ou C).

L'inflammation ainsi définie se déroule classiquement en trois étapes :

- Une augmentation de la perméabilité capillaire entraînant œdème et gonflement. C'est au cours de cette étape que les substances responsables de la douleur sont libérées.
- Une prédominance des polynucléaires cellulaires dans l'infiltration puis il y a diminution de leur nombre pour faire place à des cellules mononuclées.
- Une réparation dans laquelle le fibroblaste est la cellule dominante.

Les éléments cellulaires qui interviennent dans les inflammations sont les polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles), les lymphocytes et les plasmocytes (**Rousselet et al., 2005**).

Il a été démontré que les leucotriènes, produits majeurs de la 5-lipoxygénase, sont des médiateurs biologiques actifs, très importants dans le processus de l'inflammation (**Baylac et Racine, 2003**).

I.5.4 Les anti-inflammatoires et leurs modes d'action

Un anti-inflammatoire est un médicament destiné à combattre une inflammation. On distingue deux grandes catégories de médicaments anti-inflammatoires : les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) encore appelés corticoïdes ou corticostéroïdes et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), (**Neuwingger, 1996 ; Bilan et al., 2000**).

Les premiers anti-inflammatoires sont des hormones naturelles synthétisées dans la zone corticale des glandes surrénales à partir du cholestérol. Ce sont des glucocorticoïdes utilisés soit à titre substitutif pour suppléer une déficience surrénalienne, soit à une dose pharmacologique ou leurs propriétés anti-inflammatoires immunosuppressives sont recherchées. Ils agissent en se liant à des récepteurs ou en partie à l'albumine et inhibent fortement la réaction inflammatoire précoce (**Neuwing, 1996 ; Bilan *et al.*, 2000**).

Les seconds sont des médicaments symptomatiques à action rapide ayant des propriétés analgésiques pour certains et antipyrétiques pour d'autres. Ils possèdent les mêmes propriétés pharmacologiques que l'acide acétyl salicylique (aspirine) : analgésique, antipyrétique et anti-inflammatoire. Ils permettent de réduire les signes locaux d'une réaction inflammatoire (douleur, rougeur, chaleur) et présentent des effets communs (toxicité gastro-intestinale, effets rénaux, action anti-agrégante plaquettaire et retard à l'accouchement). Ils agissent également sur le métabolisme des glucides en augmentant le taux du glucose sanguin, en diminuant le glycogène hépatique et la synthèse des lipides ainsi que leur accumulation dans les tissus enflammés (**Neuwing, 1996; Bilan *et al.*, 2000**).

Les principaux sites d'action des anti-inflammatoires sont la phospholipase A₂, les cyclooxygénases et la 5-lipoxygénase (**Le Borgne *et al.*, 2000**). Sous l'effet de divers stimuli, la phospholipase A₂ contenue dans les membranes cellulaires est activée permettant la libération d'acide arachidonique, substance métabolisée par plusieurs voies :

- La voie de la lipoxygénase qui aboutit aux lipoxynes (inhibiteurs des lymphocytes T cytotoxiques) et aux leucotriènes et accroissent la perméabilité capillaire ;
- La voie de la cyclooxygénase qui mène aux prostaglandines, à la prostacycline (PGI₂) et au Thromboxane A₂.

I.5.4.1 Inhibiteurs des cyclooxygénases

La majorité des AINS ont été découverts et utilisés en clinique bien avant que leur mécanisme d'action ne soit connu. Plusieurs études ont permis de classer les principaux inhibiteurs cyclooxygénases en fonction de leur sélectivité d'action anti cyclooxygénase. On distingue les inhibiteurs préférentiels des cyclooxygénases de type I (COX-1) par exemple l'aspirine, des inhibiteurs sélectifs des cyclooxygénases de types II (COX-2), en principe dépourvus d'effet ulcérogène (il s'agit par exemple de célébrex^R et celebid 100^R) et enfin des

inhibiteurs non sélectifs tels que l'ibuprofène et le naproxène (**Vane et Botting, 1995 ; Piret et al., 1997 ; Benjarano, 1999**).

I.5.4.2 Inhibiteurs des lipoxygénases

Les recherches s'intéressent de plus en plus à des inhibiteurs potentiels des lipoxygénases zileuton est un inhibiteur de 5-lipoxygénase qui, en inhibant la synthèse des leucotriènes correspondants, a donné des résultats intéressants dans le traitement de l'asthme. Il a une courte durée d'action du fait de sa métabolisation rapide. Son principal effet indésirable est l'élévation des transaminases avec risque d'hépatite.

La mésalazine a une activité liée à l'inhibition de la 5-lipoxygénase responsable de la synthèse du LTB₄. L'esculétine, dérivé coumarinique extrait d'*Aesculus hippocastanum*, inhibe l'activité de la lipoxygénase et a montré des effets antiprolifératifs sur certaines tumeurs expérimentales (**Piret et al., 1997**).

I.5.5 Rôle de la 5-lipoxygénase dans le processus de l'inflammation

L'inhibition de la 5-lipoxygénases représente une cible thérapeutique pour diverses maladies. Il a été démontré que les leucotriènes, produits majeurs de la 5-lipoxygénase, sont des médiateurs biologiques actifs, très importants dans le processus de l'inflammation tels que l'asthme, l'arthrite, le rhumatisme, la douleur, la réponse allergique etc (**Braga et al., 2000**). La figure 13 représente le mécanisme d'obtention des médiateurs biologiques à partir de la 5-lipoxygénase.

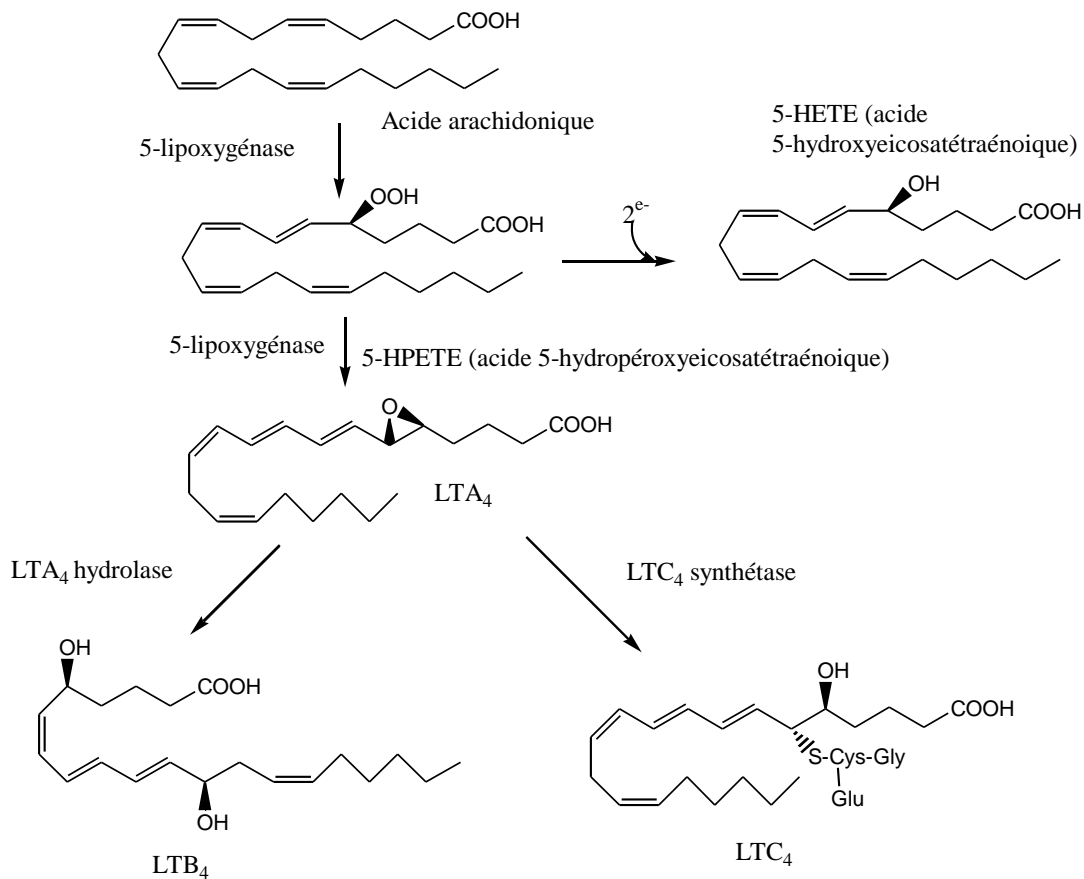


Figure 13: Mécanisme d'obtention des médiateurs biologiques à partir de la 5-lipoxygénase.

La 5-lipoxygénase catalyse l'oxydation du motif (Z), (Z)-pentadiène de l'acide arachidonique en son dérivé hydroperoxyde (Z), E conjugué. Les produits terminaux sont le 5-HETE et la leucotriène LTA_4 .

Celui-ci subit encore l'action catalytique de deux enzymes conduisant au LTB_4 (LTA_4 hydrolase) et LTC_4 (LTC_4 synthétase).

Il faut signaler qu'il existe plusieurs types de lipoxygénases avec différentes spécificités et aucun effet inhibiteur d'un type ne peut être extrapolé sur un autre. Les inhibiteurs potentiels de cette enzyme sont nombreux, ceux d'origine végétale encore plus spécialement certaines huiles essentielles (Sircar *et al.*, 1983 ; Alexander, 2001 ; Baylac et Racine, 2003).

I.5.6 Etude *in vitro* de l'inhibition des lipoxygénases

On retrouve les lipoxygénases dans tous les végétaux. Les dérivés hydroperoxydes (les acides linoléiques et linoléniques) sont les substrats les plus courants des lipoxygénases du

règne végétal. La figure 14 représente le mécanisme d'obtention des dérivés hydroperoxydes de la lipoxygénase végétale.

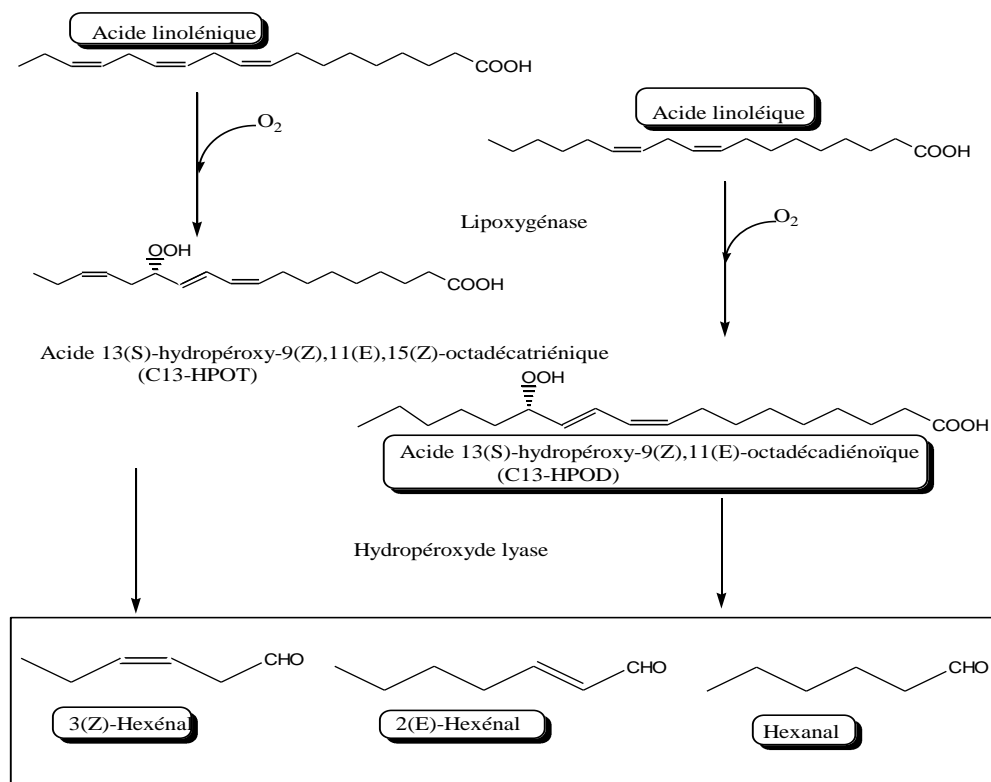


Figure 14 : Mécanisme d'obtention des dérivés hydroperoxydes de la lipoxygénase végétale.

La dégradation ultérieure des dérivés hydroperoxydes par des lyases conduit aux dérivés aliphatiques (hexanals, hexénals).

Ce processus est très semblable à celui observé sur l'acide arachidonique, ce qui justifie l'utilisation des lipoxygénases d'origine végétale (germe de soja, pomme de terre) facilement accessible comme « modèles » pour le screening d'anti-inflammatoires potentiels.

I.5.6.1 Méthode d'étude *in vitro* de l'activité inhibitrice des lipoxygénases

Il existe plusieurs techniques de mesures de l'activité inhibitrice des lipoxygénases *in vitro*. La plus utilisée est celle décrite par Sircar *et al.* (1983) ; Safayhi *et al.* (1992) ; Amano *et al.* (2003) ; celle utilisée dans notre travail.

Cette technique est basée sur le suivi de l'oxydation des acides gras contenant le motif 1'4- (Z), (Z). C'est le cas de l'acide linoléique dont la conversion en dérivé hydroperoxyde (Z), (E) catalysée par la lipoxygénase, est suivie en spectrophotométrie UV par absorption à

234 nm du motif diène conjugué. La cinétique de l'oxydation est comparée à celle obtenue à partir de l'acide NDGA qui est un inhibiteur de référence des lipoxygénases.

On peut également citer une autre méthode de screening de l'activité anti-inflammatoire potentielle d'un échantillon qui consiste à évaluer la diminution de la production de la5-HETE à partir de l'acide arachidonique, catalysée par la 5-lipoxygénase d'origine animale (leucocytes de porc) (**Wagner et Fessler, 1986**).

L'intérêt croissant pour les antifongiques, les antioxydants, anti-inflammatoires et anticancéreuses d'origine naturelle constitue un moteur dans le screening des matières végétales en vue d'identifier de nouveaux médicaments.

I.6 GÉNÉRALITÉS SUR LES PLANTES ÉTUDIÉES

I.6.1 Généralités sur les *Annonaceae*

Les *Annonaceae* constituent une grande famille végétale formée de 130 genres et de plus de 2300 espèces. On les retrouve en grande partie dans les régions tropicales et subtropicales (**Lebœuf et al., 1982**). Elles appartiennent à l'ordre des Annonales (magnoliales), classe des Dicotylédones, sous embranchement des Angiospermes, embranchement des Spermaphytes. Les plantes de cette famille sont ligneuses et on les retrouve sous formes variées : arbres, arbustes, arbrisseaux, buissons sarmenteux ou lianes. Les formes biologiques les plus abondantes sont les arbres de taille moyenne (15 à 20 m) et les arbustes (7 à 10 m) (**Le Thomas, 1969**). Leurs écorces, feuilles et fruits dégagent une odeur aromatique caractéristique (**Walker et al., 1961**). Le fruit est très important dans la séparation des genres et plus rarement dans celle des espèces (**Le Thomas, 1969**).

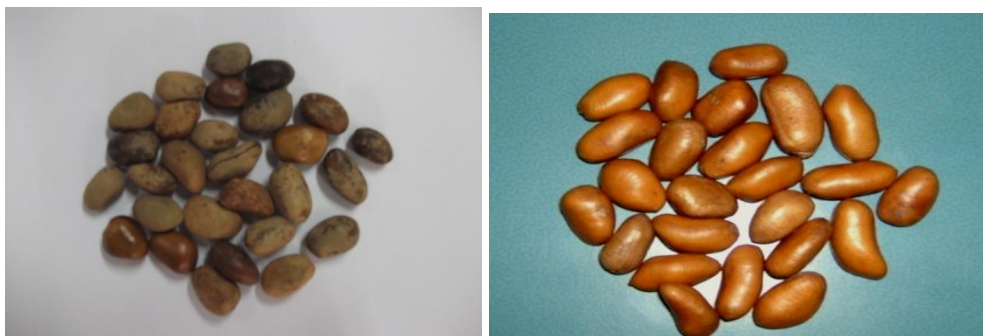
La famille des *Annonaceae* comporte plusieurs espèces intéressantes du point de vue alimentaire, économique ou thérapeutique. Les genres *Monodora* et *Xylopi*a donnent des fruits qui sont des épices utilisées par les populations tchadiennes et camerounaises.

Ce travail envisagé porte sur quatre plantes appartenant à trois genres de la famille des Annonacées, *Monodora myristica*, *Xylopi*a *aethiopica* et *Xylopi*a *parviflora* du Tchad et du Cameroun et *Uvaria angolensis* du Cameroun.

I.6.1.1 Le genre *Monodora*

Le genre *Monodora* est constitué d'arbres ou d'arbustes parfois lianescents, glabres ou à indument de poils simples. Les fleurs comportant 3 sépales, sont hermaphrodites, grandes, solitaires ou rarement géminées. Les étamines très nombreuses, sessiles, oblongues à thèques extrorses, connectifs épais, élargis tronqués au dessus des anthères. Les carpelles sont soudés en un ovaire uniloculaire à placentation pariétale. Les stigmates sont concrescents en une masse le plus souvent enroulée, dépassant à peine les étamines ; les fruits sont syncarpiques, pendants, globuleux, à ovoïdes-coniques, à péricarpe ligneux. Les graines sont nombreuses, noyées dans une pulpe, suboblongues à subellipsoïdes, à testa mince, lisse. L'embryon est petit et les cotylédons sont plans. Le genre africain comporte environ 14 espèces tropicales de sous-bois en forêt dense humide ou dans les galeries forestières (Burkill, 1985).

Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié les huiles essentielles des graines de *Monodora myristica* du Tchad et du Cameroun.



Graines de *Monodora myristica* (Tchad) Graines de *Monodora myristica* (Cameroun)

Figure 15: *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal (Photographie Bakarnga-Via, 2012)

***Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal.**

Synonymes (référence): *Monodora myristica* Gaertn(1797), *Monodora borealis* Sc. Elliott(1895), *Monodora claessensii* De Wild (1911), *Monodora grandiflora* Benth (1862)

Nom commun (référence): Faux muscadier

Noms vernaculaires : Pebé (Douala) ; Ding (Ewondo) ; ikoma (Bassa) ; ozek (boulou) ; Bamileké (medjeng, mendak mendjock) ; Tchad (Ariwo).

I.6.1.1.1 Botanique

Arbre atteignant 35m de hauteur et 50-70 cm de diamètre ; tronc à fût droit ; écorce rugueuse, grossièrement striée, à tranche mince et fibreuse ; cime largement étalée ; jeunes rameaux pruineux, glabres. **Feuilles** simples ; limbe elliptique à obové, mesurant 9-50 cm x 320 cm; membraneux ; base arrondie à subcordée, bords entiers et sommet courtement acuminé ; pétiole atteignant 14 mm de longueur. **Fleurs** odorantes, solitaires, pédicelle atteignant 25 cm de longueur, muni d'une bractéole plus ou moins ovale vers la moitié supérieure, bractéole mesurant 2-4 x 1-3 cm; calice à 3 sépales verts tachetés de rouge violacé, lancéolé, oblongs, mesurant 2-3,5 x 0,7-1,5 cm, à marges ondulées-crispées ; corolle à 6 pétales en verticille ; pétales externes jaune orangé et tachetés de rouge, largement ovés, mesurant 4-9 x 2-3,5 cm, glabres ; pétales internes blancs tachetés de rouge, largement ovés, mesurant 2,5-4,5 x 2-2,8 cm, auriculés au-dessus d'un onglet très court (3-6 mm), pubescent sur les bords et sur les oreillettes ; androcée de plusieurs étamines oblongues ; pistil à ovaire conique, atteignant 2,5 mm de diamètre. **Fruit** composé subsphérique, atteignant 15 cm de diamètre. **Graines** nombreuses noyées dans une pulpe blanche ; oblongues et légèrement comprimées, atteignant 1,8 x 1,2 cm, de couleur brun clair (**Achoundong et al., 2003**).

I.6.1.1.2 Ecologie

Espèce présente en Afrique tropicale de la Sierra Leone à l'Angola et à l'Ouganda, au Tchad ainsi qu'au Cameroun et sur les îles du Golfe de Guinée. C'est une espèce de forêt dense humide sempervirente, de basse et moyenne altitude, parfois de forêt dégradée et elle acclimata aux zones de savane (**Lebœuf et al., 1982**).

I.6.1.1.3 Ethnobotanique

Les graines sont la partie de la plante la plus utilisée. Ces graines à saveur piquante et à odeur aromatique, s'utilisent sèches (préalablement brûlées ou grillées) écrasées sous forme poudreuse comme condiments dans la confection de plusieurs mets camerounais (sauce jaune, pépé soup, mbôgô djobi, etc...). Elles s'utilisent également pour soulager la constipation, les migraines et le contrôle passif de l'hémorragie utérine chez les femmes immédiatement après la délivrance (**Burabai et al., 2009**). En République Centrafricaine, les graines sont utilisées dans le traitement de l'hypertension (**Koudou et al., 2007**).

Au Tchad, les graines servent des condiments dans la sauce et les tradipraticiens utilisent ces graines pour soigner la toux et calmer les céphalées..

I.6.1.1.4 Travaux antérieurs

Lamaty et al. (1987) ont analysé la composition chimique de l'huile essentielle des fruits de *Monodora myristica* récolté à Yaoundé (Cameroun) par la CPG et CPG/SM et ont montré qu'elle est riche en α -phellandrène (48,8%), α -pinène (15,9%), limonène (8,7%), myrcène (7,9 %), α -thujène (6,3%) et en linalol (3,0 %).

Garry et al. (1997) étudiant la corrélation entre la composition chimique et l'activité antimicrobienne ont reporté que de l'huile essentielle des fruits de *Monodora myristica* riche en ces composés majoritaires décrits précédemment par **Lamaty et al. (1987)** inhibe la croissance de *Candida albicans* à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) > 9 mg/ml.

Tatsadjeu et al. (2003) ont montré que l'huile essentielle de *Monodora myristica* récolté à Yaoundé constituée majoritairement de l' α -phellandrène (29,2 %), p-cymène (11,2%), α -pinène (9,7 %), *cis*-sabinol (6,9 %) et de limonène (6,8 %) a une activité antimicrobienne sur les souches de bactéries et de champignons testées avec des diamètres d'inhibition variant entre 11 et 30 mm à une CMI > 5000 ppm.

Kouamé et al. (2004) ont montré que les huiles essentielles des graines de *Monodora myristica* ont des propriétés désinfectantes et antiseptiques dues au p-cymène, ce qui est en faveur de leur utilisation traditionnelle dans le traitement des blessures et plaies.

Burabai et al. (2009) ont montré que les graines de *Monodora myristica* contenaient 14,7% d'eau, 9,1% de protéines brutes, 29,1% d'huile brute et 25,9 % de fibres. Une consommation adéquate de fibres alimentaires est importante pour une santé optimale, par conséquent ces graines aideraient à la prévention de la constipation et des désordres gastro-intestinaux. Ces graines contiennent également des éléments minéraux potassium (817,33 ppm), calcium (4210,12 ppm), phosphore (1034, 50 ppm), magnésium (923,40 ppm). La littérature montre que le calcium et le phosphore sont responsables de la formation des os et des dents chez les animaux, par conséquent cette graine nutritive peut être utilisée comme une source diététique pour ces éléments.

En 2013, **Alitonou et al.** ont identifié vingt quatre composés dans l'huile essentielle des feuilles de *Monodora myristica* récolté à Abomey-Calavi (Benin) dont l' α -phellandrène (65,5%) et l' α -pinène (6,2%) sont les principaux produits majoritaires. Les activités antiradicalaire et anti-inflammatoire se sont avérées être faibles.

I.6.1.2 Le genre *Xylopi*

Le genre *Xylopi* regroupe des arbres, à fût généralement étroit et relativement élevé, coiffé d'une cime à rameaux étalés horizontalement, ou alors des arbustes, glabres ou indument de poils simples.

Les boutons floraux sont ovoïdes ou le plus souvent lancéolés. Les fleurs hermaphrodites sont axillaires, solitaires, en cyme ou fasciculées. Au nombre de trois, les sépales sont valvaires, plus ou moins soudés à la base, beaucoup plus courts que les pétales. Les pétales sont au nombre de six, libres, disposés en deux cycles valvaires, épais, dressés ou étalés ou le plus souvent linéaires, élargis et concaves à la base. Les étamines sont nombreuses, linéaires, à filets courts, articulés. Les carpelles en nombre variables (3 à 34) sont libres. Les ovaires sont ovoïdes à ovoïdes-oblongs. Les fruits sont à péricarpes nombreux, cylindriques ou ovoïdes, stipités ou sessiles. On y compte 1 à 8 graines unisériées, verticales ou obliques, bisériées et horizontales (Burkill, 1985).

Le genre *Xylopi* est l'un des plus importants de la famille des Annonaceae avec environ 150 espèces. Il est représenté en Afrique par une trentaine d'espèces environ, pour la plupart en zone forestière (Burkill, 1985). Dans ce genre nous avons étudié les graines de deux espèces : *Xylopi aethiopica* (Dunal) A. Rich., *Xylopi parviflora* (A. Rich) Bentham (1862) du Tchad et du Cameroun.



Fruits de *Xylopi aethiopica* (Tchad) Fruits de *Xylopi aethiopica* (Cameroun)

Figure 16 : *Xylopi aethiopica* (Dunal) A. Rich. (Photographie Bakarnga-Via, 2012)

I.6.1.2.1 *Xylopi aethiopica* (Dunal) A. Rich.

Noms communs : Français : Poivrier de Guinée, poivrier d’Ethiopie Anglais : Ethiopian pepper, african pepper.

Noms vernaculaires: **Bangangté** : netsham, **Bassa** : ikoli **Boulou** : ekur ; **Douala** : ebondo mbonji ; **Fufuldé** : kembare ; **Ewondo** : akwi ; **Tchad**: Tchimba

➤ **Botanique**

Arbre atteignant 30 m de hauteur et 70 cm de diamètre, à petits contreforts ailés à la base ; fût droit cylindrique ; branches étalées horizontalement et ascendantes au bout ; cime conique et feuillage vert sombre ; écorce brun-grisâtre à rougeâtre, fissurée, tranche d'environ 1 cm d'épaisseur, fibreuse, brun jaunâtre à lignes claires ou foncées, odorante. **Feuilles** alternes, simples ; limbes elliptiques atteignant 20 x 9 cm, coriaces, sommet aigu ; nervures latérales peu visibles ; pétiole long de 2-6 mm. Inflorescences en fascicules de 2-6 fleurs ou fleurs solitaires. **Fleurs** trimères d'environ 5cm de longueur, de couleur blanchâtre, très odorantes, hermaphrodites ; nombreuses étamines et nombreux carpelles libres et pubescents ; pédicelle épais, long d'environ 1cm. **Fruits** : grappes de 20-30 follicules cylindriques, atteignant 6 x 1 cm, légèrement étranglés entre les graines, rouge-brun à l'extérieur, se retournant complètement après déhiscence, rouge vif à l'intérieur. Graines au nombre de 4-9, unisériées, verticales mesurant 7-5 x 4-2 mm, brun luisant avec un arille orangé, à odeur poivrée (**Burkill, 1985** ; **Achoundong et al., 2003**).

➤ **Ecologie**

Originnaire d'Afrique tropicale, le poivrier d'Ethiopie est une espèce restreinte surtout à la zone guinéenne. Présente du Sénégal à l'Angola et au Mozambique à l'Est, on la trouve au Cameroun, dans les lisières de forêt, les galeries forestières et les recrûs broussailleux dans les savanes à *Terminalia glaucescens*. C'est une espèce de milieux humides qui se rencontre en individus isolés. Elle supporte les sols légèrement salés en s'intégrant aux communautés végétales côtières (**Burkill, 1985**).

➤ **Ethnobotanique**

Les graines de *Xylopiya aethiopica* sont utilisées comme condiment aussi bien à l'état frais qu'après séchage (**Vivien et Faure, 1995** ; **Carrière, 2000**). Ces graines sont utilisées comme succédané du poivre pour épicer divers mets en Afrique. Il en est de même pour l'écorce moulue qui s'utilise chez les Banen du Cameroun pour assaisonner la pâte de banane plantain aux feuilles de macabo (**Noumi, 1984**). Les racines, aussi aromatiques que les graines, sont plutôt utilisées en décoction concentrée contre les maux de dents (**Burkill, 1985**). La décoction de feuilles s'emploie contre les rhumatismes ou comme vomitif. La pulpe et l'épicarpe du fruit sont utilisés dans la composition d'une potion contre l'herpès vaginal.

Xylopiya aethiopiya intervient également dans le traitement de l'asthme (Tabuna, 2000). Au Tchad, les fruits servent comme condiment aromatique et les tradipraticiens utilisent le décocté pour le traitement des bronchites et de la dysenterie.

➤ Travaux antérieurs

Lamaty *et al.* (1987) ont analysé la composition chimique de l'huile essentielle des fruits de *Xylopiya aethiopiya* récolté à Yaoundé (Cameroun) et ont montré qu'elle est majoritairement constituée de sabinène (23,9 %), β -pinène (17,4 %), terpinèn-4-ol (12,9 %), α -pinène (8,8 %) et de β -phellandrène (6,9 %).

Garry *et al.* (1997) étudiant la corrélation entre la composition chimique et l'activité antimicrobienne ont reporté que de l'huile essentielle des fruits de *Xylopiya parviflora* riche en ces composés majoritaires décrits précédemment par Lamaty *et al.* (1987) inhibe la croissance de *Candida albicans* à une CMI de 4 mg/ml.

Certains produits cosmétiques utilisés au Cameroun comportent les huiles essentielles de *Xylopiya aethiopiya* (Awono *et al.*, 2003). Boyom *et al.* (2003) ont montré l'activité antiplasmodiale de l'huile essentielle de *Xylopiya aethiopiya* sur *Plasmodium falciparum* W2 à une CI₅₀ de 17,80 μ g/ml. Koba *et al.* (2008) ont révélé que l'huile essentielle des fruits de *Xylopiya aethiopiya* récoltés à Lomé (Benin) dont les constituants majoritaires sont le β -pinène (23,6 %), l' α -pinène (11,0 %), le sabinène (9,6 %), le germacrène D (8,3 %) et le 1,8-cineole (8,2 %), ne présente aucun effet cytotoxique sur les lignées cellulaires (HaCaT) normales de l'épiderme à une IC₅₀ supérieure à 3000 μ g/ml.

Soro *et al.* (2010) ont montré que les extraits naturels (la poudre et l'huile essentielle) du de *Xylopiya aethiopiya*, *in vitro* et *in vivo* sont fongicides sur le mycopathogène *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis-lycopersici* (Forl), mycopathogène tellurique qui crée le plus de dégâts et dommages en cultures de tomate par la fonte du semis et la pourriture des collets et / ou des tiges en Côte d'Ivoire à des CMI de 1 g/l et 50 ppm pour l'extrait de poudre et pour l'huile essentielle respectivement en inhibant la croissance radiale mycélienne. Ces extraits de poudre ou d'huile essentielle des fruits de *Xylopiya aethiopiya* peuvent être utilisés en lutte biologique.

Choumessi *et al.* (2012) ont montré que les extraits ethanoliques de *Xylopiya aethiopiya* du Cameroun présentent une activité anti proliférative sur les lignées des cellules

cancéreuses (HCT116 colon cancer, U937 et KG1a leukemia cells) aux CI_{50} de 12 $\mu\text{g/ml}$, 7,5 $\mu\text{g/ml}$ et supérieure 25 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

I.6.1.2.2 *Xylopi*a *parviflora* (A.Rich) Benth



Figure 17: *Xylopi*a *parviflora* (A. Rich) Benth

*Xylopi*a *parviflora* (A. Rich) Benth

Synonymes : *Uvaria parviflora* A. Rich. ; *Xylopi*a *vallotii* Chipp.

Nom commun : Poivrier de Sedhiou

Noms vernaculaires : **Bangangté :** mbatou'ou ; **Ewondo :** odjobi ; **Tchad :** Kakdoum.

➤ **Botanique**

Petit **arbre** ou arbuste atteignant 20 m de hauteur et 60 cm de diamètre ; base avec 4-8 contreforts s'élevant jusqu'à 2-3 de hauteur ; fût court, houppier avec de nombreuses branches horizontales, rameaux retombants lenticelles ; écorce brune, lisse, tranche fibreuse jaune orangé. **Feuilles** alternes, simples ; limbe elliptiques ou oblong, atteignant 10 × 4 cm, subcoriaces; sommet acuminé, à nervures latérales peu visibles ; pétiole pouvant mesurer jusqu'à 6 mm de longueur. Inflorescences en fascicules de 2-3 fleurs, ou fleurs solitaires. **Fleurs** trimères, longues de 3-5 cm, verdâtres, étamines nombreuses ; 4-6 carpelles libres, pubescentes ; pédicelle grêle pouvant mesurer jusqu'à 1,5 cm de longueur. **Fruits** avec follicules cylindriques atteignant 4 × 1,5 cm et groupés par 3-5 légèrement étranglés et plus ou moins côtelés longitudinalement, verts à l'extérieur, se retournant complètement après

déhiscence, rouges à l'intérieur. **Graines** jusqu'à 10, bisériées horizontales ; mesurant 1-1,5 × 0,5-0,7 × 0,5 cm ; vertes quand elles sont fraîches, brunes quand elles sont sèches ; poids moyen de 0,5 g par graine sèche (**Achoundong et al., 2003**).

➤ **Ecologie**

Espèce d'Afrique tropicale de la Casamance à l'Angola et du Soudan au Zimbabwe. Au Cameroun tout comme au Tchad, on la trouve au bord des rivières, en forêt dense et dans les galeries forestières (**Burkhill, 1985**).

➤ **Ethnobotanique**

La pulpe poivrée de la graine est utilisée comme condiment après séchage. *Xylopi* *parviflora* est aussi utilisé comme plante médicinale. Ses racines et ses feuilles sont efficaces dans le traitement de la toux et du rhume. Les racines entrent dans le traitement de la lèpre, du chancre syphilitique, de l'impuissance sexuelle, de la dysenterie, du kwashiorkor, de la jaunisse, etc. En association, les racines, les feuilles et les écorces soignent les céphalées, les oreillons, les otites, la conjonctivite (**Vivien et Faure, 1995 ; Arbonnier, 2004**). Au Tchad, les pulpes de graines servent de condiment et les tradipraticiens utilisent le décorté des racines, feuilles pour calmer les douleurs intestinales et soigner la rougeole.

➤ **Travaux antérieurs**

Lamaty et al. (1989) ont analysé la composition chimique de l'huile essentielle des fruits de *Xylopi* *parviflora* récolté à Bayagam (Cameroun par la CPG et CPG/SM et ont montré qu'elle est constituée majoritairement de β -pinène (40,0 %), α -pinène (14,0 %), (E)- β -ocimène (5,4 %), *trans* -pinocarvéol (2,7 %) et de myrténol (2,6 %).

Garry et al. (1997) étudiant la corrélation entre la composition chimique et l'activité antimicrobienne ont reporté que de l'huile essentielle des fruits de *Xylopi* *parviflora* riche en ces composés majoritaires décrits précédemment par **Lamaty et al. (1989)** inhibe la croissance de *Candida albicans* à une CMI de 4 mg/ml comme celle de *Xylopi* *aethiopica*.

L'écorce de *Xylopi* *parviflora* constituée des isoquinolines bioactifs quaternaires possède des propriétés analgésiques, antispasmodiques (**Nishiyama et al., 2004**).

Boyom, (2004) a étudié la composition chimique de l'huile essentielle des écorces de *Xylopi* *parviflora* et révélé qu'elle est riche en monoterpènes (50,78 %) et en sesquiterpènes (47,11 %) avec comme composés majoritaires le cypérène (20, 2 %) et le β -pinène (10,07 %)

et dotée d'une activité antiplasmodiale sur la souche W2 de *plasmodium falciparum* en culture à une CI₅₀ de 11,31 µg/ml.

Boyom et al. (2011) ont montré l'activité antiplasmodiale des extraits méthanoliques et éthanoliques de *Xylopi*a *parviflora* sur *P. falciparum* W2 avec des CI₅₀ de 3,44 et 5,86 µg/ml.

En 2011, les travaux de **Kuiate et al.** ont révélé que les extraits hydroéthanolique et éthanolique des graines de *Xylopi*a *parviflora* possèdent une forte activité antioxydante par inhibition de l'oxydation de la LDL, et de l'acide α-linoléique.

Woguem et al. (2014) ont montré que l'huile essentielle des fruits de *Xylopi*a *parviflora* récolté dans le Nde (Ouest-Cameroun) riche en β-pinène (34,0 %), α-pinène (10,3 %), *trans*-pinocarvéol (5,0 %) et myrténol (4,6 %) est dotée des propriétés antiradicalaire, anti-inflammatoire, antimicrobienne et anti-tumorale.

I.6.1.3 Le genre *Uvaria*

Le genre *Uvaria* regroupe les espèces de plantes appartenant à cette famille. Ce sont des buissons à arbustes, généralement des lianes, le plus souvent à poils étoilés. Les fleurs sont généralement bisexuées, plus rarement unisexuées et souvent caduques. Les fruits contiennent de nombreuses graines qui sont entourées d'une excroissance (**Troupin, 1982**). Notre étude porte sur l'huile essentielle des feuilles de *Uvaria angolensis* (Welwitsch ex Oliver) du Cameroun.



Figure 18: Feuilles de *Uvaria angolensis* (Cameroun); (Photographie Bakarnga-Via, 2012)

Uvaria angolensis (Welwitsch ex Oliver)

Noms communs:

Uvaria bukobensis (Engler et Diels)

Uvaria nyassensis (R.E.Fries)

Uvaria variabilis (De Wild)

Noms vernaculaires : Tchad (Kakmassi)

I.6.1.3.1 Botanique

C'est une **liane** ou un arbuste atteignant 6 m de hauteur. **Les feuilles** sont à pétiole long de 3-10 mm. Fleurs jaunes, solitaires, ou en cymes condensées. Pédicelle court, long de 4-6 mm et sépales soudés en cupule dans le bouton. **Fruits** à pédicelle long de 7-10 mm ; méricarpes cylindriques, longs de 1,3-4 cm, larges de 6-20 mm. **Graines** bisériées, de plus ou moins 1 cm de longueur à maturité, à testa brillant brun-noirâtre (**Le Thomas, 1969**).

I.6.1.3.2 Ecologie

Uvaria angolensis est une espèce de galeries forestières, de forêt dense humide et de forêts rivulaires. Elle est très largement répandue en Afrique, de la Sierra Leone à la République Centrafricaine jusqu'en Rhodésie du Nord (**Le Thomas, 1969**). Cette espèce n'a fait l'objet d'un usage traditionnel.

I.6.1.3.3. Ethobotanique

A notre connaissance l'usage ethnobotanique de *Uvaria angolensis* est très peu connue. Cependant les plantes du genre *Uvaria* sont généralement reconnues pour leur utilisation en médecine traditionnelle pour le traitement de certaines maladies telles que la dysenterie, la fatigue, la sénescence, les douleurs abdominales et la cicatrisation des plaies (**Adjanohoun et Assi, 1979**). Les tradipraticiens du Tchad et du Cameroun utilisent le décocté des feuilles racines pour combattre les furoncles, les douleurs intestinales et les convulsions.

I.6.1.3.4 Travaux antérieurs

Hufford et al. (1982) ont isolé des écorces des racines de *Uvaria angolensis* collectées au Nigéria huit dihydrochalcones C-benzylés ou C-méthylés et des flavanones.

Muhammad et Waterman (1985) ont montré que les écorces du tronc de *Uvaria angolensis* récoltées dans le Parc national de Gombe en Tanzanie contiennent du benzoate de benzyle, un nombre connu de dihydrochalcone C-benzylé et quatre indoles unique C- et N-

benzylés : uvarindoles A-D. De même en 1988, ils ont isolé trois uvarisesquiterpènes (nommés A, B et C) des écorces du tronc de cette plante.

Hufford et al. (1987) ont isolé l'angoluvarine de *Uvaria angolensis* et ont montré qu'elle possédait une activité antimicrobienne sur *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium smegmatis* avec des CMI de 0,78 µg/ml, 1,56 µg/ml et 3.12 µg/ml respectivement. **Boyom (2004)** a montré que les huiles essentielles extraites des écorces de tronc et des feuilles de *Uvaria angolensis* récolté à Mont kalla (Yaoundé) et constituées respectivement des mêmes composés majoritaires : le β-caryophyllène (19,5 % et 11,12 %) ; l'oxyde de caryophyllène (6,8 % et 10,42 %) et l'oxyde de l'humulène (6,23 % et 12,81 %) possèdent une activité antiplasmodiale sur la souche W2 de *plasmodium falciparum* à des CI₅₀ de 19.76 µg/ml et 35, 02 µg/ml respectivement.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1 MATÉRIEL

II.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans ce travail était constitué de graines de *Monodora myristica*, des fruits de *Xylopiya aethiopica* et de *Xylopiya parviflora* et des feuilles de *Uvaria angolensis* de la famille des *Annonaceae* récoltés au Tchad et au Cameroun.

Chaque plante a été identifiée à l'herbier du Centre National d'appui à la Recherche (HCNAR) du Tchad et l'Herbier National du Cameroun (HNC) suivant le lieu de récolte.

Les dates et lieux de récolte de chaque échantillon ainsi que les numéros de référence sont consignés dans le tableau III

Tableau III : Echantillons végétaux utilisés dans l'étude

Nom de la plante	Organe	Lieu de récolte	Date de récolte	Numéro de référence
<i>Monodora myristica</i> (Cameroun)	Graine	Kribi	25-03 -2012	27690/SFR/CAM
<i>Monodora myristica</i> (Tchad)	Graine	Goré	19-03-2012	6814/HCNAR/CHAD
<i>Xylopiya aethiopica</i> (Cameroun)	Fruit	Kribi	25-03-2012	28725/SFR/CAM
<i>Xylopiya aethiopica</i> (Tchad)	Fruit	Goré	19-03-2012	7563/HCNAR/CHAD
<i>Xylopiya parviflora</i> (Cameroun)	Fruit	Kribi	25-03-2012	42351/SFR/CAM
<i>Xylopiya parviflora</i> (Tchad)	Fruit	Goré	19-03-2012	7557/HCNAR/CHAD
<i>Uvaria angolensis</i> (Cameroun)	Feuille	Mont kalla	25-03-2012	16797/SRF/CAM

II.1.2 Matériel fongique

L'activité antifongique a été déterminée sur 3 champignons levuriformes :

- *Candida albicans* ATCC24433
- *Candida parapsilopsis* ATCC22019
- *Cryptococcus neoformans* IP95026)

Ces levures ont été fournies par le Centre Pasteur du Cameroun dans le cadre de la collaboration avec l'Unité des Agents Antimicrobiens du Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes Médicinales (Université de Yaounde I). L'entretien des souches et les

tests ont été effectués à température ambiante du laboratoire sur milieu Sabouraud Destrose Agar (SDA) préfabriqué (OXOIDCM004) et supplémenté au chloramphénicol (1mg/ml).

II.1.3 Les lignées cellulaires

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés respectivement sur la lignée cellulaire cancéreuse du sein MCF-7 et sur la lignée cellulaire épithéliale normale ARPE-19. Ces cellules proviennent du American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), et sont maintenues en culture continue au Laboratoire de Biochimie Métabolique et Clinique de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de l'Université de Montpellier I(France) où les tests de cytotoxicité ont été réalisés.

II.2 MÉTHODES

II.2.1 Extraction et Analyse de la composition chimique des Huiles

Essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été faite au Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes Médicinales de l'Université de Yaoundé I (Cameroun) et l'analyse de leur composition chimique au Laboratoire de Biochimie Métabolique et Clinique de l'IBMM de l'Université de Montpellier I (France).

II.2.1.1 Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été extraites par hydrodistillation à l'aide d'un appareillage de type Clevenger (Annexe 1).

II.2.1.1.1 Principe

Le principe de la méthode est basé sur l'entraînement des composés volatils contenus dans les végétaux par la vapeur d'eau du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe. Ces vapeurs sont condensées par réfrigération et l'essence séparée par décantation.

II.2.1.1.2 Mode opératoire

Le matériel végétal a été pesé (800 g) et immergé dans un réacteur contenant un volume d'eau représentant 4 fois son poids. Un appareil Clevenger y a été adapté et le réacteur porté à ébullition pendant environ six heures sur une calotte chauffante. Au cours de

cette opération, les vapeurs d'eau chargées de suspensions odorantes sont condensées par réfrigération et il se forme deux phases, une aqueuse sous-jacente constamment recyclée, et l'autre organique surnageante. A la fin de la distillation, la phase organique odorante qui est l'huile est séparée de l'eau par décantation. Enfin, l'huile recueillie est déshydratée à travers une colonne de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), pesée dans un flacon taré puis conservée à environ 4°C à l'abri de la lumière.

Le rendement de l'extraction exprimé en pourcentage est calculé par rapport à la masse du matériel végétal de départ selon la formule ci-dessous :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de l'huile essentielle}}{\text{Masse du matériel végétal}} \times 100$$

II.2.1.2 Analyse de la composition chimique des huiles essentielles

L'analyse de la composition chimique a été faite par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) puis par couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (SM).

II.2.1.2.1 Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La CPG s'est faite sur un chromatographe de type Varian CP 3380, équipé d'une colonne capillaire apolaire caractérisée par une phase stationnaire de type méthylsilicone (DB5).

Une solution diclorométhanique d'huile essentielle à 10% est préparée, et 0,5 µL microlitre est introduite en tête de colonne où il est vaporisé au niveau de l'injecteur de type SPLIT. Le détecteur est à ionisation de flamme (FID). Les conditions opératoires sont les suivantes :

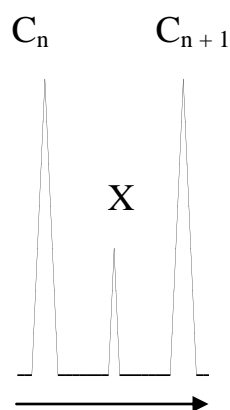
- Température de l'injecteur est 200°C
- Température du détecteur est 220°C
- Température du four : 60°C à 220°C avec un gradient de 3°C/min
- Le gaz vecteur est l'azote avec un débit de 1 mL/min

L'enregistreur de type « Star chromatography workstation » ou « STARWS » est doté d'un logiciel qui analyse les signaux du détecteur et trace les chromatogrammes.

L'analyse quantitative est effectuée par intégration des mesures des surfaces de pics et les résultats donnés en pourcentages relatifs.

Pour l'identification des composés séparés, les indices de rétention linéaire (Indices de Kovats) sont calculés par comparaison des temps de rétention (TR) avec ceux d'une série d'alcane permettant « un étalonnage » du chromatogramme, selon la formule suivante :

$$IK = 100 \left(n + \frac{TR(x) - TR}{TR(C_{n+1}) - TR(C_n)} \right)$$



TR (X) = temps de rétention du composé inconnu.

TR (Cn) = temps de rétention de l'hydrocarbure à n atomes de carbone précédant immédiatement le composé X.

TR (Cn+1) = temps de rétention de l'hydrocarbure à n+1 atomes de carbone suivant immédiatement le composé X.

Figure 19: Chromatogramme du constituant X mélangé à deux alcanes à n et (n+1) atomes de carbone.

Ces indices expérimentaux sont ensuite comparés à ceux de la littérature ainsi qu'à ceux de la banque de données du laboratoire.

II.2.1.2. 2 Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) couplée à la Spectrométrie de Masse(SM)

Pour l'analyse CPG/SM l'appareillage utilisé est de marque HEWLETT-PACKARD, type 5890 de serie II, équipé d'une colonne capillaire en silice fondue (30 m x 0,25 mm; film mince de 0,25 µm) avec une phase stationnaire greffée de type HP5 (5%-phenyl-methylpolysiloxane). Le détecteur de masse est de type quadropole (Model 5972), l'énergie d'ionisation utilisée est égale à 70 eV. Les conditions de manipulation sont les suivantes :

- Température d'injection 220°C.
- Température de transfert pour la SM 250°C

- Débit du gaz vecteur : hélium avec un débit de 0,6 mL/min.
- Volume d'injection est 1 µL d'une solution d'huile essentielle diluée à 10% dans le chlorure de méthane.

Cette analyse par CPG/SM permet à terme pour un composant, d'avoir des données de rétention linéaire en fonction du type de colonne utilisé (IK) et un spectre de masse. La comparaison de l'indice de rétention calculé et du spectre de masse avec les données de la littérature permet en général l'identification sûre de tous les constituants usuels des huiles essentielles (Adams, 2007). La comparaison des spectres de masse des constituants se fait avec ceux des composés authentiques et/ou avec les bases de données suivantes NBS75K, Wiley 7th NIST 98 EPA/NIH et FFNSC 2.

II.2.2 Détermination de l'activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles a été effectuée au Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes Médicinales de l'Université de Yaoundé I (Cameroun). Pour les tests d'activités antifongiques, nous avons utilisé le milieu liquide du Bouillon Nutritif de Sabouraud (BNS) dont la composition est donnée dans l'annexe 2.

II.2.2.1 Activité antifongique des huiles essentielles sur les champignons levuriformes

L'activité antifongique des essences sur les levuriformes (*Candida albicans* ATCC24433, *Candida parapsilosis* ATCC22019 et *Cryptococcus neoformans* IP95026) a été évaluée suivant le protocole décrit par Ngono, (1999) pour le comptage des cellules.

II.2.2.1.1 Dénombrement des cellules

Cette méthode consiste à déposer une petite quantité d'inoculum sur la cellule de Malassez et à dénombrer les cellules dans les carrés. Le comptage des colonies s'est fait à l'aide d'un microscope optique et sous objectifs 40/10. Le nombre d'Unité Formant Colonie est donné par la formule suivante :

$$N = n \times 10^5 \text{ UFC/ml.}$$

N = nombre de cellules dans la solution

n = nombre de cellule énuméré dans le carré de Malassez

10^5 = nombre de Malassez

(Ngono, 1999).

II.2.2.1.2 Evaluation de l'inhibition de la croissance fongique par la micro-méthode de dilution en milieu liquide

Nous avons utilisé le protocole M27-P décrit par la NCCLS (**National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992**) avec quelques modifications.

➤ Principe

Cette méthode est utilisée pour les levures dans le but de déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles essentielles. La CMI est la plus petite concentration en inhibiteur qui élimine toute croissance visible du micro-organisme. Elle repose sur le dosage colorimétrique des métabolites acides (acide acétique) libérés par les levures au cours de leur métabolisme. Elle consiste en la distribution du bouillon nutritif, des huiles essentielles et des souches sélectionnées dans chaque cupule d'une microplaque. Les huiles essentielles sont diluées selon une progression géométrique de raison 2. Après 48 heures, on observe la décoloration du milieu préalablement rouge, qui vire au jaune marquant la présence des métabolites acides excrétés par les levures au cours de leur développement. Ainsi, la plus petite concentration à laquelle on ne note aucune décoloration du rouge phénol est considérée comme concentration minimale inhibitrice (CMI).

➤ Mode opératoire

La détermination des concentrations minimales inhibitrices a été effectuée par la méthode de microdilution utilisant le protocole M27-P avec quelques modifications. Les essais ont été effectués dans des microplaques de 96 puits et le milieu de culture utilisé était le Sabouraud Dextrose au chloramphénicol, préparé suivant les instructions du fabricant puis supplémenté en rouge phénol comme indicateur coloré.

En bref, 150 µL de milieu de culture ont été introduits dans les douze premières cupules de la ligne A et 100 µL dans le reste des cupules de la plaque; ensuite, 50 µL d'une solution mère d'huile essentielle à 40 mg/mL ont été prélevés et ajoutés aux 150 µL des premiers puits. Une série de 6 dilutions de raison géométrique 2 a été effectuée de la ligne A à la ligne G ; par la suite, 30 µL d'une suspension de levure, préparée au titre 2×10^4 UFC/mL ont été ensemencés dans les cupules de la plaque, excepté celles des colonnes 4, 8 et 12 qui ne contenaient que le milieu de culture et servaient de blanc ; les puits de la ligne H, contenant le milieu de culture et l'inoculum ont servi de contrôle négatif. La Nystatine, témoin positif, a

été préparée dans les mêmes conditions de stérilité puis testée sur les levures à 2 mg/mL comme concentration de départ.

Les essais ont été effectués en "triplicate", soit 3 souches de levures contre une huile essentielle par plaque. Ces dernières ont été recouvertes puis incubées à 37°C pendant 48 heures. A l'issue du temps d'incubation, la plus petite concentration à laquelle aucun virage significatif de l'indicateur coloré était considérée comme la CMI de l'huile essentielle sur la levure concernée.

➤ Détermination des Concentrations Minimales Fongicides (CMF) par la subculture des colonies

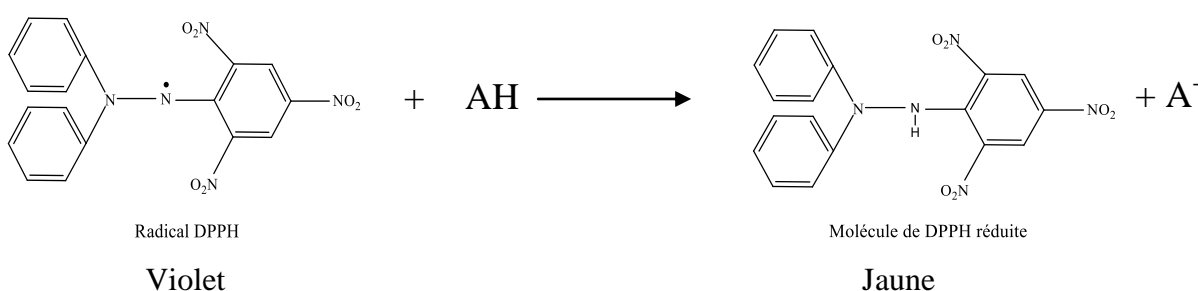
Les contenus des cupules de microplaques n'ayant pas présenté de décoloration ont été ensemencés sur milieu solide stérile Sabouraud Dextrose Agar (SDA, SIGMA de LEspagne) puis incubés à 37°C pendant 48 heures et observés pour une éventuelle croissance. La plus petite concentration à laquelle aucune croissance fongique n'était notée après subculture était considérée comme la CMF.

II.2.3 Détermination de l'activité antiradicalaire

L'activité antiradicalaire des huiles essentielles a été évaluée au Laboratoire de Biochimie Métabolique et Clinique de l'IBMM de l'Université de Montpellier I (France), par la méthode spectrophotométrique au DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) telle que décrite par **Brand-Williams et al. (1995)** et **Cuvelier (1997)**.

II.2.3.1. Principe

Ce test est basé sur le piégeage des radicaux libres de DPPH (DPPH•) par un antioxydant (AH) à travers le transfert d'un atome d'hydrogène. La réduction se traduit par une baisse de l'absorbance à 517nm due au changement de coloration de la solution qui passe du violet au jaune (**Molyneux, 2004**).



II.2.3.2 Mode opératoire

II.2.3.2.1 Préparation des solutions

Solution de DPPH (Solution mère) à 0,39 g/l : Dans 50 ml d'éthanol, 19,7 mg de DPPH[•] sont dissouts complètement à l'aide d'un agitateur magnétique (SM). A partir de cette solution, la solution à utiliser pour effectuer les mesures est préparée en prélevant 5 ml que l'on dissout dans 45 ml d'éthanol (solution SA).

Solution de BHT (Butyl-Hydroxy-Toluène) à 1 g/l : Dans 50 ml de méthanol, 50 mg de BHT sont dissouts pour constituer la solution mère.

Solutions d'huile essentielle : La solution d'huile essentielle a été préparée à 30 g/l dans le méthanol, et ensuite, une série de dilution a été réalisée de façon à obtenir 3 solutions de concentrations 5 g/l, 10 g/l et 15 g/l.

II.2.3.2.2 Evaluation de l'activité antiradicalaire

Dans chaque cuve spectrophotométrique, on introduit individuellement 100 µL des solutions d'huile essentielle préalablement préparées, puis on ajoute 1900 µL de solution de DPPH[•] (80µM). La lecture des densités optiques se fait à 517 nm toutes les dix minutes. Le témoin négatif est préparé dans les mêmes conditions et à la place de l'huile essentielle on introduit 100 µL de méthanol. De même, le témoin positif est préparé dans les mêmes conditions et l'huile essentielle est remplacée par 100 µL de BHT (1 g/l). Le calcul du pourcentage de piégeage est effectué à partir de la formule suivante :

$$\%SC = \frac{A_{ref} - A_{(mes)}}{A_{ref} - A_{(100)}} \times 100$$

A_{ref} = Absorbance à t = 60 min du témoin (solution de DPPH sans antiradicalaire)

A_{mes} = Absorbance à t = 60 min de la solution de DPPH contenant l'antiradicalaire

A_{100} = Absorbance en fin de réaction (voisine de 0) pour un piégeage total (0,015 et 0,08 suivant la coloration de la solution) (Nyegue *et al*, 2007).

II.2.3.2.3 Expression des résultats

A partir des pourcentages de piégeage des radicaux DPPH[•], les concentrations en antiradicalaire permettant de piéger 50% de radicaux libres (SC₅₀) ont été obtenus.

La SC₅₀ s'obtient à partir du graphe représentant le pourcentage de piégeage (%SC) en fonction de la concentration (g/l). Cette valeur dépend de la concentration de DPPH utilisée pour le test. Dès lors, il convient de dériver la concentration efficace à 50% (CE₅₀) et le pouvoir antiradicalaire des inhibiteurs. Elle est exprimée en mole d'inhibiteur nécessaire pour piéger une ½ mole de DPPH et calculée par la formule :

$$CE_{50} = \frac{SC_{50}}{[DPPH]}$$

Le Pouvoir antiradicalaire (PA) est l'inverse de la concentration efficace; il mesure l'efficacité de l'antiradicalaire. Plus il est élevé, plus l'antiradicalaire est efficace.

$$PA = \frac{1}{CE_{50}}$$

II.2.4 Détermination de l'activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles a été déterminée au Laboratoire de Biochimie Métabolique et Clinique de l'IBMM par la méthode enzymatique de la 5-lipoxygénase.

II.2.4.1 Principe

Cette méthode consiste à suivre l'activité inhibitrice de la 5-lipoxygénase de soja (oxydant l'acide linoléique) par la substance à tester. L'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) a été utilisé comme contrôle positif. Le protocole est celui décrit par **Safayhi (1992)** et utilisée également par **Braga et al. (2000)**.

II.2.4.2 Mode opératoire

II.2.4.2.1 Préparation des solutions

- **Tampon** : La dissolution de 13,6 g de KH₂PO₄ a été effectuée dans 900 mL d'eau distillée et ajoutée à de la NaOH (1M) pour ramener la solution au pH 9. Ensuite le volume a été complété à 1 l par de l'eau distillée.

- **Substrat (acide linoléique) à 0,03 g/l** : 3 mg d'acide linoléique ont été dissout dans 100 mL de la solution tampon préalablement préparée.
- **Enzyme (5-lipoxygénase) à 10 g/l** : 10 mg de la 5-lipoxygenase ont été dissout dans 1 mL de la solution tampon.

II.2.4.2.2 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles

Les solutions éthanoliques des huiles essentielles ont été préparées en 3 concentrations : 10, 20 et 30 ppm correspondant à 9,4µg/mL, 18,8 µg/mL, et 28,2 µg/mL respectivement. Dans chaque cuve, 2 mL de solution d'acide linoléique (substrat) sont introduits. 10 µL d'éthanol sont ajoutés au contenu de la première cuve qui sert de témoin et 10 µL de la solution d'inhibiteur à différentes concentrations sont ajoutés aux autres cuves. Les cuves sont laissées 10 min dans les portoirs multi cuves thermostatés à 30 °C puis, 50 µL de la solution d'enzyme sont ajoutés pour démarrer la réaction. Après homogénéisation rapide du contenu des cuves, l'acquisition simultanée des mesures de l'absorbance est effectuée (système multi cuves / multi cinétique) à 234 nm.

II.2.4.2.3 Expression des résultats

- **Calcul de la vitesse de la réaction** : Les constantes de vitesse sont évaluées à partir de la partie linéaire de la courbe, correspondant à la vitesse initiale de la réaction enzymatique selon la formule :

$$K = \frac{A(t) - A(0)}{t}$$

t = 10 secondes dans nos conditions expérimentales

K = constance de vitesse

A (t) = absorbance à 10 secondes

A (0) = absorbance à 0 seconde (Alitonou *et al*, 2006).

- **Calcul du pourcentage d'inhibition** : Le pourcentage d'inhibition est évalué à partir de l'expression ci-après :

$$\%I = \frac{K_0 - K_E}{K_0} \times 100$$

%I = pourcentage d'inhibition

K_0 = constante de vitesse de la réaction en absence d'inhibiteur

K_E = constante de vitesse de la réaction en présence de l'huile essentielle (**Alitonou et al, 2006**). .

La concentration correspondant à 50% d'inhibition (CI_{50}) est déterminée à partir de la courbe représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration.

II.2.5 Détermination de l'activité antinéoplasique des huiles essentielles

L'activité cytotoxique des huiles essentielles sur la souche de cellules cancéreuses du sein (MCF-7) et les cellules normales épithéliales de l'oeil (ARPE-19) et le mécanisme d'action impliqué dans la mort cellulaire ont été évalués au Laboratoire de Biochimie Métabolique et Clinique de l'IBMM. L'étude a été réalisée suivant la méthode colorimétrique au 3-(4,5-diméthylthiazolyl)-2,5-diphényl-tétrazolium bromide (MTT) telle que décrite par **Gary-Bobo et al. (2012)**. La méthode est basée sur la réduction du MTT (teinte jaune) en formazan (teinte bleue) par les enzymes (déshydrogénases) mitochondriales des cellules viables. Les essais ont été réalisés dans des conditions de stérilité sous une hotte à flux laminaire.

II.2.5.1 La culture *in vitro* des cellules

Les cellules (MFC-7, ARPE-19) ont été cultivées dans des flacons de culture de 75 et 25 cm² dans le milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) F12* (Life Technologies GIBCO, Grand Island, NY, USA) supplémenté à 10% de sérum fœtal bovin inactivé (SBF) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO), la glutamine (2mM), le rouge phénol et de la gentamycine (50 µg/mL). La culture a été maintenue dans l'incubateur à 37 °C sous atmosphère humide, à 5% CO₂. Le milieu était renouvelé toutes les 72 heures.

II.2.5.2 Test de cytotoxicité

Le test a été réalisé comme mentionné ci-dessus sur les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) et les cellules normales épithéliales de l'oeil (ARPE-19) selon la méthode colorimétrique au MTT. Les essais ont été effectués dans des microplaques de 96 puits.

La densité cellulaire utilisée était de 2000 cellules par puits dans un volume final de 200 µL de milieu de culture. Après 24 heures d'incubation à 37 °C sous une atmosphère humide et enrichie en CO₂ (5 %), le milieu a été retiré et remplacé par un milieu de culture frais.

Les cellules ont été ensuite traitées avec les différentes concentrations en huiles essentielles comprises entre 100 et 2000 µg/mL diluées dans la solution d'éthanol à 10 %. Les plaques ont été placées à l'incubateur à 37 °C, atmosphère 5 % CO₂ pendant 72 h. Chaque concentration a été testée en "triplicate". Le témoin négatif pour la concentration la plus élevée était une solution d'éthanol 2 %. Après 72 heures d'incubation, la viabilité cellulaire a été mesurée par le test au MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide].

Pour cela, une concentration finale de MTT de 0,5 mg/mL a été ajoutée dans chaque puits. Ce révélateur, en se fixant sur les mitochondries des cellules vivantes, est réduit en formazan coloré qui absorbe à 540 nm (**Lau *et al.*, 2004**). Après 4 h d'incubation à 37 °C, le milieu de chaque puits a été retiré et 150 µL de solution EtOH/DMSO (1:1) ont été ajoutés aux précipités de MTT en vue de la solubilisation des cristaux de formazan.

La densité optique (DO) de chaque puits a été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm utilisant le lecteur de microplaque de marque Multiskan. La croissance cellulaire a été calculée en pourcentage selon la formule suivante dans laquelle la moyenne des absorbance correspond à chaque inhibiteur en triplicate :

$$\text{Croissance (\%)} = \frac{\text{Moyenne Absorbance (inhibiteur)}}{\text{Moyenne Absorbance (Témoin)}} \times 100$$

Les pourcentages d'inhibition de la croissance des cellules (MCF-7 et ARPE-19) ont été calculés comme une fonction de la concentration en huile essentielle. La cytotoxicité des essences vis-à-vis des cellules à 50 % (CI₅₀) dans l'essai MTT a été définie comme la concentration de l'huile essentielle produisant 50 % de réduction de l'absorbance comparé à celles des cellules non-traitées. L'indice de sélectivité a été ensuite calculé pour chaque huile

en utilisant les valeurs de CI_{50} sur les cellules normales (ARPE-19) et les cellules de cancer du sein (MCF-7) défini par $IS = CI_{50}ARPE-19 / CI_{50}MCF-7$. Les huiles essentielles prometteuses étaient celles ayant une $IS > 1,5$.

Les contenus des puits traités par MTT ont été observés au microscope pour la caractérisation phénotypique des cellules mortes et des cellules vivantes.

II.2.5.3 Etude du mécanisme de mort par apoptose des cellules normales et cancéreuses traitées avec les huiles essentielles

Le mécanisme de mort cellulaire (MCF-7 et ARPE-19) a été analysé par la méthode de cytométrie de flux telle que décrite par **Giret *et al.* (2013)**. Cent cinquante mille (150 000) cellules épithéliales normales (ARPE-19) et les cellules de cancer du sein (MCF-7) ont étéensemencées dans des boites de Pétri de 60 mm de diamètre et ont été placées à l'incubateur dans les conditions de culture pendant 24 heures. Après incubation, les cellules ont été traitées avec une mixture homogène huile essentielle/milieu de culture de concentration finale 100 $\mu\text{g/mL}$. Après 24 heures, les cellules ont été récupérées et fixées avec de l'éthanol froid pendant 6 heures à 4°C. Les cellules ainsi fixées ont été incubées avec 1 mg/mL d'ARNase A et 40 $\mu\text{g/mL}$ d'iodure de propidium pendant 48 h dans l'obscurité à 4 °C. L'ADN cellulaire a été par la suite analysé par cytométrie de flux avec un cytomètre de flux FACSCALIBUR couplé au logiciel CellQuest (Becton Dickinson).

II.2.6 Analyses statistiques

Les résultats ont été statistiquement analysés par ANOVA utilisant le test de Fisher par LSD au seuil de probabilité 5% ($p < 0,05$) grâce au logiciel STAGRAPHICS plus 5.0 pour Windows.

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 EXTRACTION ET ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES

III.1.1 Extraction des huiles essentielles

Les rendements des extractions des huiles essentielles des graines, fruits et des feuilles de quatre plantes de la famille des *Annonaceae* sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV : Rendements d'extraction des huiles essentielles

Plante	Organe	Date et lieu de récolte	Date d'extraction	Rendement (%) m/m
<i>Monodora myristica</i> (Cameroun)	Graine	25-03 -2012 à Kribi	27-03-2012	2,72
<i>Monodora myristica</i> (Tchad)	Graine	19-03-2012 à Goré	28-03-2012	1,87
<i>Xylopi aethiopica</i> (Cameroun)	Fruit	25-03-2012 à Kribi	29-03-2012	4,86
<i>Xylopi aethiopica</i> (Tchad)	Fruit	19-03-2012 à Goré	30-03-2012	3,57
<i>Xylopi parviflora</i> (Cameroun)	Fruit	25-03-2012 à Kribi	01-04-2012	0,68
<i>Xylopi parviflora</i> (Tchad)	Fruit	19-03-2012 à Goré	02-04-2012	0,76
<i>Uvaria angolensis</i> (Cameroun)	Feuille	25-03-2012 à Mont kalla (Yaoundé)	03-04-2012	0,10

m/m= masse/masse

Il ressort du tableau IV que les rendements d'extraction en huiles essentielles varient de 0,10 à 4,86 % en fonction des organes et des espèces étudiées et le meilleur rendement a été obtenu avec *Xylopi aethiopica* du Cameroun (4,86 %). Globalement, les rendements n'ont pas présenté une variation significative en fonction de l'origine de l'échantillon traité, dénotant une homogénéité relative pour ce qui est de l'intensité de la synthèse des huiles essentielles.

L'hydrodistillation des fruits de *Xylopi aethiopica* a donné un rendement de 3,57 % pour l'échantillon du Tchad et de 4,86 % pour l'échantillon du Cameroun. Le rendement de 4,86 % pour l'échantillon du Cameroun est semblable à celui précédemment obtenu par **Lamaty et al. (1987)**, à savoir 4,58 % pour des fruits de *Xylopi aethiopica* récoltés à Yaoundé.

L'extraction des huiles essentielles des fruits de *Xylopi parviflora* a donné un rendement de 0,76% pour l'échantillon du Tchad et de 0,68% pour l'échantillon du Cameroun.

Les rendements pour ces deux échantillons sont semblables à celui de **Lamaty et al. (1989)** qui ont obtenu 0,58% pour des fruits de *Xylopiya parviflora* récoltés à Bayagam (Cameroun).

Les graines de *Monodora myristica* ont donné des rendements de 1,87% et 2,72% pour les échantillons du Tchad et du Cameroun respectivement. Dans l'ensemble, ces rendements sont faibles par rapport à celui obtenu par **Lamaty et al. (1987)** qui est de 4,4 % des graines de *Monodora myristica* récolté à Yaoundé. Cette variation de rendements pourrait être liée aux facteurs climatiques et s'expliquer par la différence des sites et la période de récolte tel que soutenu par **Braga et al, (2005)**.

Les feuilles de *Uvraia angolensis* récolté à Mont kalla (Yaoundé) ont donné un rendement de 0,10%. Ce rendement est 5 fois supérieur à celui obtenu par (**Boyom, 2004**) qui a obtenu 0,02 % de la même espèce récoltée en décembre 2000. Cette variation s'expliquerait par la période de récolte. Cependant, dans un cas comme dans l'autre, ces rendements sont très faibles, et corroborent le résultat précédemment obtenu (0,08%) pour les feuilles d'une espèce apparentée, *Uvraia chamae* récolté à Abomey-Calavi (Benin) par **Ayedoun et al. (1999)**.

III.1.2 Analyse de la composition chimique des huiles essentielles

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles des fruits de *Xylopiya aethiopica*, *Xylopiya parviflora*, des graines de *Monodora myristica* du Tchad et du Cameroun et des feuilles de *Uvraia angolensis* du Cameroun a été effectuée comme décrit plus haut, et les résultats sont consignés respectivement dans les tableaux V, VI, VII et VIII.

Tableau V: Composition chimique des huiles essentielles des fruits de *Xylopiya aethiopica*

IK	Composés	<i>Xylopiya aethiopica</i> (%)		Méthodes d'identification
		Tchad	Cameroun	
	Monoterpènes	85,7	86,4	
	Monoterpènes hydrocarbonés	72,4	64,8	
926	α -thujène	1,3	1,0	IRL. GCMS
931	α -pinène	8,3	10,8	IRL. GCMS
971	sabinène	14,5	4,8	IRL. GCMS
977	β -pinène	24,6	28,2	IRL. GCMS

985	myrcène	0,3	0,3	IRL. GCMS
1002	α -phellandrène	0,6	0,5	IRL. GCMS
1014	α -terpinène	2,8	3,4	IRL. GCMS
1022	p-cymène	0,6	0,8	IRL. GCMS
1028	limonène	1,7	0,4	IRL. GCMS
1029	β -phellandrène	10,4	5,8	IRL. GCMS
1032	(Z)- β -ocimène	1,1	1,3	IRL. GCMS
1042	(E)- β -ocimène	0,2	1,3	IRL. GCMS
1055	γ -terpinène	4,9	5,7	IRL. GCMS
1085	terpinolène	1,1	1,5	IRL. GCMS
Monoterpènes oxygénés		13,3	21,6	
1095	trans-sabinene hydrate	0,4	0,3	IRL. GCMS
1119	cis-p-menth-2-en-1-ol	0,3	0,3	IRL. GCMS
1138	trans-pinocarveol	0,6	0,9	IRL. GCMS
1178	terpinèn-4-ol	10,0	15,1	IRL. GCMS
1189	α -terpinéol	1,6	3,6	IRL. GCMS
1195	myrténal	0,4	1,4	IRL. GCMS
Sesquiterpenes		12,6	11,6	
Sesquiterpènes hydrocarbonés		12,0	10,2	
1337	δ -élémente	0,9	0,8	IRL. GCMS
1340	α -cubébène	0,2	0,4	IRL. GCMS
1369	α -ylangène	0,8	0,4	IRL. GCMS
1377	α -copaène	tr	tr	IRL. GCMS

1391	β -éléémène	0,4	0,5	IRL. GCMS
1422	β -caryophyllène	0,3	tr	IRL. GCMS
1450	α -humulène	0,2	0,8	IRL. GCMS
1478	γ -muurolène	0,4	1,1	IRL. GCMS
1485	germacrène D	7,2	5,1	IRL. GCMS
1499	bicyclogermacrène	0,5	0,3	IRL. GCMS
1523	δ -cadinène	0,7	0,3	IRL. GCMS
1561	germacrène B	0,4	0,5	IRL. GCMS
Sesquiterpènes oxygénés		0,6	1,4	
1630	M=220	0,3	1,1	IRL. GCMS
1652	α -cadinol	0,3	0,3	IRL. GCMS
Total		98,3	98,0	

tr = trace (concentration < 0,1%, seuil de détection) ; IRL= indice de rétention linéaire ; GCMS= couplage chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse.

L'analyse du tableau V montre que les huiles essentielles de *Xylopiya aethiopica* du Tchad et du Cameroun sont riches en monoterpènes hydrocarbonés et leurs dérivés oxygénés dans les proportions respectives de 72,4% et 64,8% ; et 13,4% et 21,6%. Les sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés ne représentent cummulativelement que 12,6% et 11,6% des deux essences du Tchad et du Cameroun, dont 7,2% et 5,1% respectivement pour le germacrène D seul.

Parmi les monoterpènes hydrocarbonés, le β -pinène est le composé majoritaire dans ces deux huiles essentielles et représente respectivement 24,6% et 28,2% des échantillons du Tchad et du Cameroun.

Outre le β -pinène, les constituants quantitativement représentatifs dans l'huile essentielle de *Xylopiya aethiopica* du Tchad et du Cameroun sont respectivement l' α -pinène (8,3% et 10,8%), le β -phellandène (10,4% et 5,8%), le sabinène (14,5% et 4,8%), le γ -terpinène (4,9% et 5,7%), le terpinen-4-ol (10,0% et 15,1%) et le germacrène D (7,2% et 5,1%).

Ces résultats corroborent ceux de **Lamaty *et al.* (1987)** ; **keita *et al.* (2003)** et **Noudjou *et al.* (2007)** qui ont obtenu le β -pinène comme composé majoritaire dans les huiles essentielles des fruits de *Xylopi aethiopica* récoltés à Yaoundé (Cameroun) et à Bamako (Mali) dans les proportions de 7,4% ; 19,1% et 44,1%. Ces auteurs ont également mis en évidence des proportions similaires en sesquiterpenes (8,3-11%) dans leurs essences, avec une représentation comparable en germacrène D.

Tableau VI: Composition chimique des huiles essentielles des fruits de *Xylopi a parviflora*

Composés		<i>Xylopi a parviflora</i> (%)		Méthodes d'identification
		Tchad	Cameroun	
IK				
Monoterpènes		75,9	75,0	
Monoterpènes hydrocarbonés		58,5	60,7	
931	α -pinène	11,1	10,8	IRL. GCMS
971	sabinène	3,2	3,0	IRL. GCMS
977	β -pinène	35,7	32,9	IRL. GCMS
1022	p-cymène	1,2	2,8	IRL. GCMS
1028	limonène	0,3	0,5	IRL. GCMS
1029	β -phellandrène	0,6	0,7	IRL. GCMS
1030	1,8-cinéole	1,0	2,0	IRL. GCMS
1032	(Z)- β -ocimène	Tr	tr	IRL. GCMS
1042	(E)- β -ocimène	5,4	8,0	IRL. GCMS
Monoterpènes oxygénés		17,4	14,3	
1096	linalool	0,6	0,7	IRL. GCMS
1138	<i>trans</i> -pinocarvéol	4,0	3,2	IRL. GCMS
1144	<i>trans</i> -verbénol	0,7	0,4	IRL. GCMS
1163	pinocarvone	1,2	0,7	IRL. GCMS
1166	borneol	0,6	0,6	IRL. GCMS

1178	terpinèn-4-ol	0,8	0,7	IRL. GCMS
1187	p-cymèn-8-ol	1,0	0,7	IRL. GCMS
1189	α -terpinéol	1,4	1,7	IRL. GCMS
1193	myrténol	6,5	5,2	IRL. GCMS
1285	acétate de bornyle	0,6	0,4	IRL. GCMS
Sesquiterpenes		23,1	23,6	
Sesquiterpènes hydrocarbonés		10,3	10,3	
1337	δ -élémente	Tr	tr	IRL. GCMS
1340	α -cubébène	Tr	tr	IRL. GCMS
1369	α -ylangène	0,4	0,6	IRL. GCMS
1377	α -copaène	0,4	0,5	IRL. GCMS
1391	β -élémente	0,6	0,4	IRL. GCMS
1422	β -caryophyllène	Tr	tr	IRL. GCMS
1435	β -copaène	1,4	1,1	IRL. GCMS
1478	γ -muurolène	0,3	0,5	IRL. GCMS
1485	germacrène D	1,3	2,0	IRL. GCMS
1493	<i>trans</i> -muurola-4(14),5-diène	1,6	1,8	IRL. GCMS
1502	α -muurolène	0,7	0,8	IRL. GCMS
1523	δ -cadinène	3,6	3,7	IRL. GCMS
Sesquiterpènes oxygénés		12,8	13,3	
1518	cubébol	1,5	1,7	IRL. GCMS
1548	élémol	1,5	2,0	IRL. GCMS
1589	oxyde de caryophyllène	3,0	2,0	IRL. GCMS

1630	M=220	1,0	0,8	IRL. GCMS
1642	<i>epi-α-cadinol</i>	2,0	2,4	IRL. GCMS
1647	α -muurolol	2,0	2,9	IRL. GCMS
1686	germacra-4(15),5,10(14)- triene-1- α -ol	1,8	1,5	IRL. GCMS
Total		99,0	98,6	

tr = trace (concentration < 0.1%, seuil de détection); IRL= indice de rétention linéaire ; GCMS= couplage chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse.

Il ressort du tableau VI que les huiles essentielles des fruits de *Xylopiya parviflora* du Tchad et du Cameroun sont constituées majoritairement de monoterpènes (75,9% et 75,0%) repartis en dérivés hydrocarbonés (58,5% et 60,7%), oxygénés (17,4% et 14,3%) respectivement pour les essences du Tchad et Cameroun.

Globalement, ces essences sont qualitativement et quantitativement semblables. Le β -pinène en est le composé majoritaire et représente 35,7% et 32,9% pour les échantillons du Tchad et du Cameroun respectivement.

En dehors du β -pinène, d'autres monoterpènes sont quantitativement représentatifs dans ces deux huiles, et particulièrement : α -pinène (11,1% et 10,8%), (E)- β -ocimène (5,4% et 8,0%), myrténol (6,5% et 5,2%), t-pinocarvéol (4,0 % et 3,2%) et sabinène (3,2% et 3,0 %).

Les sesquiterpènes représentent dans ces huiles de *Xylopiya parviflora* du Tchad et du Cameroun 23,1% et 23,6% respectivement, et parmi ceux-ci, le t-cadina-1(6),4-diène (1,4% et 1,1%), le germacrène D (1,3% et 2,0 %), le *trans*-muurola-4(14),5-diène (1,6% et 1,8%), le cubébol (1,5% et 1,7 %), le δ -cadinène (3,6% et 3,7 %), l' élémol(1,5% et 2,0%), l'oxyde de caryophyllène (3,0 % et 2,0 %), l'*epi- α -cadinol* (2,0% et 2,4%), l' α -muurolol (2,0% et 2,9%) et le germacra-4(15),5,10(14)-triene-1- α -ol (1,8% et 1,5%) sont quantitativement les plus importants.

Les résultats de cette analyse corroborent les travaux de **Lamaty *et al.* (1989)** qui ont analysé la composition chimique de l'huile essentielle des fruits de *Xylopiya parviflora* récoltés à Bayagam (Cameroun) et ont révélé qu'elle est riche en monoterpènes et constituée majoritairement de β -pinène (40,0%), α -pinène (14,0%), (E)- β -ocimène (5,4%), *trans*-pinocarvéol (2,7%) et de myrténol (2,6%). De manière plus intéressante, il est notable que la

composition chimique qualitative et quantitative de cette essence reste homogène et stable, et ne varie pas en fonction du lieu de récolte ou qu'elle soit issue d'un échantillon du Tchad ou du Cameroun.

Ces résultats s'apparentent à ceux obtenus par **Woguem et al.(2014)** qui ont montré que l'huile essentielle des fruits de *Xylopi* *parviflora* récoltés dans le Ndé (Ouest-Cameroun) est riche en β -pinène (34,0%), α -pinène (10,3%), *trans*-pinocarvéol (5,0%) et en myrténol(4,6%).

Tableau VII : Composition chimique des huiles essentielles des graines de *Monodora myristica*

IK	Composés	<i>Monodora myristica</i> (%)		Méthodes d'identification
		Tchad	Cameroun	
	Monoterpènes	94,2	88,4	
	Monoterpènes hydrocarbonés	87,8	82,3	
926	α -thujène	2,4	1,4	IRL. GCMS
931	α -pinène	6,7	4,2	IRL. GCMS
971	sabinène	0,3	0,1	IRL. GCMS
977	β -pinène	0,5	0,3	IRL. GCMS
985	myrcène	5,1	3,8	IRL. GCMS
1002	α -phellandrène	52,7	67,1	IRL. GCMS
1014	α -terpinène	0,2	0,1	IRL. GCMS
1022	p-cymène	tr	Tr	IRL. GCMS
1028	limonène	14,9	1,8	IRL. GCMS
1029	β -phellandrène	4,2	3,0	IRL. GCMS
1032	(Z)- β -ocimène	0,3	0,3	IRL. GCMS
1042	(E)- β -ocimène	0,1	0,2	IRL. GCMS
1055	γ -terpinène	0,4	Tr	IRL. GCMS

1085	terpinolène	tr	Tr	IRL. GCMS
Monoterpènes oxygénés		6,4	3,4	
1096	linalol	2,4	2,1	IRL. GCMS
1119	<i>cis</i> -p-menth-2-en-1-ol	0,2	Tr	IRL. GCMS
1136	<i>trans</i> -p-menth-2-en-1-ol	0,1	Tr	IRL. GCMS
1189	α -terpinéol	0,5	0,6	IRL. GCMS
1195	<i>trans</i> -thujen-3-ol	2,8	0,7	IRL. GCMS
1234	<i>cis</i> -thujen-3-ol	0,1	-	IRL. GCMS
1295	thymol	0,3	-	IRL. GCMS
Sesquiterpènes		3,3	11,2	
Sesquiterpènes hydrocarbonés		1,9	6,7	
1391	β -élémente	0,1	0,1	IRL. GCMS
1422	β -caryophyllène	0,2	0,3	IRL. GCMS
1450	α -humulène	0,1	0,3	IRL. GCMS
1478	γ -muurolène	0,1	0,4	IRL. GCMS
1493	<i>trans</i> -muurola-4(14),5-diène	0,4	0,3	IRL. GCMS
1499	bicyclogermacrène	0,1	-	IRL. GCMS
1502	α -muurolène	0,1	0,4	IRL. GCMS
1515	γ -cadinène	0,1	1,7	IRL. GCMS
1523	δ -cadinène	0,7	3,2	IRL. GCMS
Sesquiterpènes oxygénés		1,4	4,5	
1578	germacrène D-4-ol	0,5	1,3	IRL. GCMS
1642	<i>epi</i> - α -cadinol	0,1	0,9	IRL. GCMS
1652	α -cadinol	0,1	0,9	IRL. GCMS

1696	shyobunol	0,7	0,3	IRL. GCMS
1698	(2Z,6Z) farnésol	-	1,1	IRL. GCMS
Total		97,5	96,9	

tr = trace (concentration < 0,1%, seuil de détection) ; - = absence ; IRL= indice de rétention linéaire ; GCMS= couplage chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse.

Il ressort du tableau VII que les huiles essentielles des graines de *Monodora myristica* du Tchad et du Cameroun sont en majorité constituées de monoterpènes (94,2 % et 88,4%) avec une prédominance des dérivés hydrocarbonés, soit 87,8% et 82,3% respectivement. Les monoterpènes oxygénés sont faiblement représentés avec 6,4% et 3,4% respectivement où ces résultats s'apparentent à ceux de **Boyom (2004)** qui a obtenu 95,5% de monoterpènes hydrocarbonés et 3,2% de monoterpènes oxygénés dans l'essence des graines de *Monodora myristica* récoltés à Bamena (Cameroun).

L' α -phellandrène est le composé majoritaire des deux huiles essentielles et représente respectivement 52,7% et 67,1% des échantillons du Tchad et du Cameroun. Ces résultats corroborent ceux obtenus par **Lamaty et al. (1987)** avec l'huile essentielle de *Monodora myristica* récolté à Yaoundé au Cameroun, et dont l' α -phellandrène était le composé majoritaire (48,8%).

L'échantillon du Tchad est caractérisé par une teneur élevée en limonène (14,9%) et une faible participation des sesquiterpènes (3,3%), ceci par rapport à l'essence du Cameroun qui en contient 1,8% et 11,2% respectivement. Globalement, ces résultats diffèrent de ceux de **Lamaty et al. (1987)** qui avaient identifié 0,4% de sesquiterpènes constitués du γ -cadinène (0,2%) et du δ -cadinène (0,2%) et de **Boyom, (2004)** qui n'avait trouvé que des traces des sesquiterpènes (concentration < 0,1%).

Tableau VIII : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Uvaria angolensis*

IK	Composés	<i>Uvaria angolensis</i> (%)	Méthodes d'identification
	Monoterpènes	12,5	
	Monoterpènes hydrocarbonés	11,3	
934	α -pinène	2,1	IRL. GCMS

979	β -pinène	2,7	IRL. GCMS
989	myrcène	0,9	IRL. GCMS
1011	δ -3-carene	0,6	IRL. GCMS
1024	p-cymène	0,8	IRL. GCMS
1029	limonène	3,1	IRL. GCMS
1032	1,8-cinéole	0,4	IRL. GCMS
1034	(Z)- β -ocimene	0,2	IRL. GCMS
1056	γ -terpinène	0,5	IRL. GCMS
Monoterpènes oxygénés		1,2	
1157	acetate benzyl	0,2	IRL. GCMS
1190	α -terpinéol	0,5	IRL. GCMS
1287	thymol	0,5	IRL. GCMS
Sesquiterpènes		50,30	
Sesquiterpènes hydrocarbonés		25,5	
1335	δ -élémente	0,2	IRL. GCMS
1350	α -cubébène	0,5	IRL. GCMS
1378	α -copaène	0,9	IRL. GCMS
1393	β -Élémente	1,3	IRL. GCMS
1424	β -caryophyllène	5,1	IRL. GCMS
1433	β -copaène	0,9	IRL. GCMS
1458	α -humulène	0,8	IRL. GCMS
1479	γ -muurolène	2,6	IRL. GCMS
1485	germacrène D	1,9	IRL. GCMS
1491	β -sélinène	2,1	IRL. GCMS
1499	α -sélinène	3,0	IRL. GCMS
1502	α -muurolène	0,8	IRL. GCMS
1517	γ -cadinène	1,0	IRL. GCMS
1525	δ -cadinène	3,5	IRL. GCMS
1544	α -calacorène	0,1	IRL. GCMS
1546	hedycaryol	0,2	IRL. GCMS
1559	germacrène B	0,6	IRL. GCMS
Sesquiterpènes oxygénés		24,8	
1583	oxyde de caryophyllène	0,4	IRL. GCMS
1633	epi- α -cadinol	2,9	IRL. GCMS
1637	epi- α -muurolol	0,7	IRL. GCMS
1646	α -muurolol	3,7	IRL. GCMS
1650	β -eudesmol	1,0	IRL. GCMS
1659	α -cadinol	7,9	IRL. GCMS
1684	eudes-4,11dien-2-ol	1,5	IRL. GCMS
1694	farnésol (2Z, 6Z)	0,7	IRL. GCMS
1838	acétate de farnezyle	6,0	IRL. GCMS

Composés aromatiques	33,3	
1774 benzoate de benzyle	32,8	IRL. GCMS
1875 salicylate de benzyle	0,5	IRL. GCMS
Composé aliphatique	0,8	
1691 hexadecen-14-al	0,8	IRL. GCMS
Total	96,9	

IRL= indice de rétention linéaire ; GCMS= couplage chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse.

Il ressort du tableau VIII que l'huile essentielle des feuilles de *Uvaria angolensis* est riche en sesquiterpènes (50,3%) par rapport aux monoterpènes qui représentent (12,5 %) marqués par la présence du limonène (3,1%), du β -pinène (2,7%) et de l' α -pinène (2,1%).

Parmi les sesquiterpènes, l' α -cadinol (7,9%), l'acétate de farnézyle (6,8%), le β -caryophyllène (5,1%), l' α -muurolol (3,7%), le δ -cadinène (3,5%), l' α -sélinène (3,0), le β -sélinène (2,1%) et le germacrène D (1,9%) sont quantitativement les plus importants.

Ces résultats corroborent ceux obtenus par **Boyom (2004)** relatifs à la richesse de cette essence en sesquiterpènes (89,72%) par rapport aux monoterpènes (7,05%°). De même, ces résultats sont semblables à ceux préalablement obtenus avec une espèce voisine, *Uvaria chamae* par **Ayedoun et al. (1999)** qui ont montré que l'huile essentielle des feuilles de cette plante récoltée à Abomey-Calavi (Benin) en octobre 1994, est riche en sesquiterpènes (93,0%) et pauvre en monoterpènes (3,1%).

Deux composés aromatiques ont été identifiés dans notre échantillon, à savoir le salicylate de benzyle (0,5%) et le benzoate de benzyle (32,8%) qui est le composé majoritaire. Ces résultats diffèrent de ceux de **Boyom (2004)** qui avait obtenu l'oxyde d'humulène (12,81%), le β -caryophyllène (11,12%) et l'oxyde de caryophyllène (10,42%) comme composés majoritaires.

Par ailleurs, **Koffi et al. (2004)** ont obtenu d'huile essentielle des écorces d'une espèce voisine, *Uvaria sp* récolté à Bouaké (Côte-d'Ivoire) en juillet 2001, le benzoate de benzyle (74,41%) comme composé majoritaire ; **Ayedoun et al. (1999)** ont identifié le germacrène D (45,0%) comme le composé majoritaire de l'huile essentielle des feuilles d'une autre espèce du même genre, *Uvaria chamae* récolté à Abomey-Calavi (Benin).

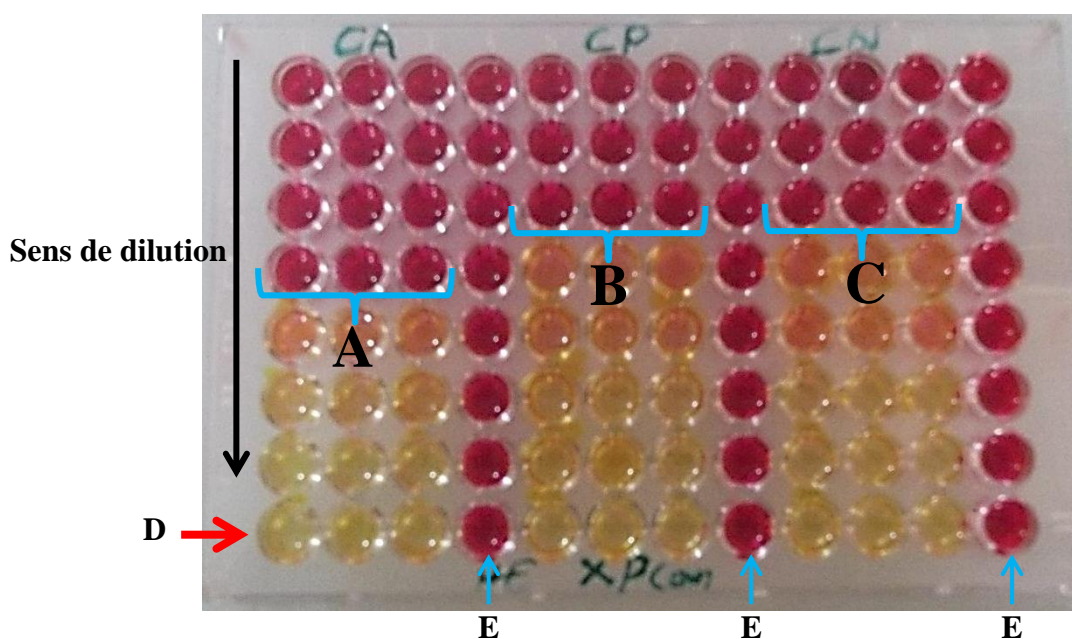
La CPG et le couplage CPG/SM ont permis de déterminer la composition chimique de 7 huiles essentielles extraites par hydrodistillation. Il ressort de cette étude que les essences de *Monodora myristica*, *Xylopi aethiopica* et *Xylopi parviflora* obtenues des graines et fruits récoltés au Tchad et au Cameroun ont montré une homogénéité tant qualitative que quantitative. Il convient dès lors d'affirmer que les processus biosynthétiques des métabolites secondaires de ces essences suivent des cinétiques similaires dans les deux types de climats tropicaux (Tchad et Cameroun).

Il est clairement établi que les huiles essentielles ont généralement de multiples activités biologiques. Celles analysées dans cette étude ont des compositions assez complexes, contenant des métabolites secondaires aux propriétés connues, tels que les terpènes et les composés aromatiques pouvant avoir des activités telles qu'antifongique, antiradicalaire, anti-inflammatoire et antinéoplasique.

III.2 ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES ÉTUDIÉES

III.2.1 Activité antifongique des huiles essentielles

L'activité antifongique des huiles essentielles des graines de *Monodora myristica*, des fruits de *Xylopi aethiopica*, *Xylopi parviflora* et des feuilles de *Uvaria angolensis* contre les levures (*Candida albicans* ATCC24433, *Candida parapsilosis* ATCC22019 et *Cryptococcus neoformans* IP95026) a été évaluée par la méthode de microdilution en milieu liquide, utilisant les microplaques de 96 puits et le rouge phénol comme indicateur de la croissance. La Figure 20 donne un exemple qui montre l'aspect des cupules après ce test et indique le niveau des CMI.



Légende : Les CMI de l'huile essentielle de *Xylopiya parviflora* (Cameroun) sur *Candida albicans*(A) ; *Candida parapsilosis* (B) et *Cryptococcus neoformans* (C) ; D= ligne du contrôle négatif ; E= contrôle de stérilité.

Figure 20 : Evaluation de la croissance des levures par décoloration du rouge phénol à différentes concentrations de l'huile essentielle de *Xylopiya parviflora* du Cameroun

La figure 20 résume le virage colorimétrique du rouge phénol au jaune dans les cupules contenant les levures en présence des huiles essentielles à différentes concentrations. Ce virage matérialise la viabilité cellulaire. Par contre, les cupules ne présentant aucune décoloration de l'indicateur ne révèle l'inhibition de la croissance ou la mort des levures. La variation de coloration entre deux cupules consécutives (rouge à jaune) a permis de déterminer les CMI des essences (définies comme la plus petite concentration en huile essentielle qui empêche le virage colorimétrique) telles que consignées dans le tableau IX.

Tableau IX: CMI des huiles essentielles vis-à-vis des levures

Huiles essentielles et Nystatine	CMI (mg/ml)		
	<i>Candida albicans</i> ATCC24433	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>X. aethiopica</i> (Tchad)	10 ±0,00	10 ±0,00	10±0,00
<i>X. parviflora</i> (Tchad)	5±0,00	5±0,00	5±0,00
<i>M. myristica</i> (Tchad)	10±0,00	10±0,00	10±0,00
<i>X. aethiopica</i> (Cameroun)	10±0,00	10±0,00	10±0,00
<i>X. parviflora</i> (Cameroun)	5±0,00	10±0,00	10±0,00

<i>M. myristica</i> (Cameroun)	10±0,00	10±0,00	10±0,00
<i>U. angolensis</i> (Cameroun)	5±0,00	10±0,00	10±0,00
Nystatine	0,039±0,00	0,062±0,00	0,125±0,00

CMI : Concentration Minimale inhibitrice

Le tableau IX montre que les huiles essentielles des plantes étudiées possèdent des propriétés antifongiques, et inhibent la croissance des trois souches fongiques (*Candida albicans* ATCC24433, *Candida parapsilosis* ATCC22019 et *Cryptococcus neoformans* IP95026) avec des CMI variant de 5 à 10 mg/ml en fonction des huiles et des levures testées.

Les huiles essentielles de *Xylopi aethiopica* et de *Monodora myristica* du Tchad et du Cameroun inhibent la croissance de *Candida albicans* ATCC24433, *Candida parapsilosis* ATCC22019 et *Cryptococcus neoformans* IP95026 à la même CMI (10 mg/ml).

Les huiles essentielles de *Xylopi parviflora* et de *Uvaria angolensis* du Cameroun ont montré une activité inhibitrice sur la croissance de *Candida albicans* à 5mg/ml. Plus particulièrement, l'essence de *Xylopi parviflora* du Tchad s'est révélée être la plus active des essences en inhibant la croissance des trois levures avec une CMI de 5mg/ml.

Globalement, l'activité antifongique des huiles essentielles des plantes étudiées reste inférieure à celle de la nystatine, molécule de référence qui inhibe la croissance des trois levures à de très faibles CMI allant de 0,031 à 0,125 mg/ml.

L'inhibition de la croissance de *Candida albicans* ATCC24433 par les huiles essentielles de *Xylopi parviflora* du Tchad et du Cameroun à 5mg/ml et *Xylopi aethiopica* à 10 mg/ml corrobore les travaux de **Garry et al. (1997)** qui ont montré que les essences de *Xylopi parviflora*, *Xylopi aethiopica* et de *Monodora myristica* récoltés à Bayagam et à Yaoundé inhibent la croissance de *Candida albicans* à 4 mg/ml et >9 mg/ml respectivement.

L'huile essentielle de *Uvaria angolensis* inhibe la croissance de *Candida albicans* ATCC24433 à une CMI de 5mg/ml et celles de *Candida parapsilosis* ATCC22019, *Cryptococcus neoformans* IP95026 à 10 mg/ml. Son activité antifongique serait due à sa richesse en sesquiterpènes (50,3%). En effet, **George et al. (2008)** ont montré qu'une huile essentielle constituée majoritairement de sesquiterpènes (87,6%) [oxyde de caryophyllène (49,6%), β-sélinène (4,1%), α-copaène (3,4%) et l'α-sélinène (3,5%) également présents dans l'essence de *Uvaria angolensis*] inhibait significativement la croissance de *Candida albicans* et *Candida glabrata*.

L'inhibition de la croissance de ces trois espèces fongiques par les huiles essentielles des plantes de la famille des Annonaceae étudiées, dont les genres *Monodora* et *Xylopi*a est soutenue par les travaux de **Tatsadjieu et al. (2003)** qui ont montré que l'huile essentielle de *Monodora myristica* récolté à Yaoundé, constituée majoritairement de l' α -phellandrène (29,2%), du p-cymène (11,2%), de l' α -pinène (9,7%), du *cis*-sabinol (6,9%) et du limonène (6,8%) et celle de *Xylopi*a *aethi*opica riche en β -pinène 18,3%), terpinèn-4-ol (8,9%), sabinène (7,2%), α -phellandrène (7,1%) et en (E)- β -ocimène (6,4%) ont une activité antimicrobienne sur les souches de bactéries (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*) et de champignons (*Aspergillus flavus*). D'autres études telles que celle de **Filipowicz et al. (2003)** ont révélé que la richesse des huiles essentielles en ces monoterpènes confère une activité inhibitrice contre *Candida albicans*.

Dans le même le sens, les travaux de **Peana et al. (1999)** et de **Pitarokili et al. (2003)** ont montré que les huiles essentielles riches en 1,8 cinéole, α -terpinéol et en linalol inhibent la croissance de *Candida albicans* et de *Fusarium solani* à une CMI de 2mg/ml. Il faut noter que ces composés ont été retrouvés dans les essences des Annonaceae étudiées. **Jazet et al. (2007)**; **Aouni et al. (2013)** et **Hzounda et al. (2014)** ont également révélé que les huiles essentielles constituées des monoterpènes oxygénés présentent des propriétés antifongiques.

La subculture des levures sur milieu SDA du contenu des cupules n'ayant présenté aucune croissance fongique visible a permis de déterminer la CMF définie comme la plus petite concentration à laquelle aucune repousse fongique n'est visible à l'issue de la subculture. Les CMF et les rapports CMF/CMI sont consignés dans le tableau X.

Tableau X: CMF et Rapports CMF/CMI

Huiles essentielles et Nystatine	Paramètres d'activité antifongique des huiles essentielles					
	<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. neoformans</i>	
	ATCC24433		ATCC22019		IP95026	
	CMF	CMF/CMI	CMF	CMF/CMI	CMF	CMF/CMI
<i>X.aethi</i> opica (Tchad)	>10	ND	10	1	10	1
<i>X. aethi</i> opica (Cam)	10	1	10	1	10	1
<i>X. parviflora</i> (Tchad)	5	1	5	1	5	1
<i>X. parviflora</i> (Cam)	5	1	10	1	10	1

<i>M. myristica</i> (Tchad)	10	1	10	1	10	1
<i>M. myristica</i> (Cam)	>10	ND	>10	ND	>10	ND
<i>U. angolensis</i> (Cam)	5	1	10	1	10	1
Nystatine	0,04	1	0,06	1	0,13	1

ND=non déterminé ; Cam= Cameroun

Selon **Carbonnelle *et al.* (1987)**, le rapport CMF/CMI permet de classer les composés à activité antifongique, en fongicides lorsque le quotient est inférieur ou égal à 4, et fongistatique s'il se révèle supérieur à 4. Ainsi il ressort du tableau X que les rapports CMF/CMI sont tous inférieurs à 4, traduisant la fongicidie des huiles essentielles des fruits de *Monodora myristica*, *Xylopi aethiopica*, *Xylopi parviflora* et des feuilles de *Uvaria angolensis* aux concentrations testées sur *Candida albicans* ATCC24433, *Candida parapsilosis* ATCC22019 et *Cryptococcus neoformans* IP95026. La molécule de référence, Nystatine a également montré un effet fongicide sur les levures testées.

Les résultats obtenus à l'issue de cette étude démontrent que les huiles essentielles, et particulièrement celles issues des Annonaceae étudiées sont dotées d'activité fongicide contre les *Candida* et *Cryptococcus neoformans* IP95026 testés, et suggèrent de futures investigations approfondies dans l'optique de leur application dans le développement de nouveaux médicaments contre les mycoses.

Les huiles essentielles étudiées dans ce travail ont présenté une activité antifongique. Plus particulièrement, l'essence de *Xylopi parviflora* du Tchad s'est révélée comme la plus active en inhibant la croissance des trois levures testées à la plus faible CMI de 5mg/ml. Son spectre d'action peut par conséquent être considéré comme large par rapport aux autres essences. Compte tenu de la composition chimique de ces huiles essentielles, aucun paramètre ne s'est distingué comme raison de cette différence d'activité. Cependant, des propriétés inhérentes à chacune de ces essences telles que l'équilibre des concentrations relatives des constituants pourrait provoquer des interactions de type synergistique résultant sur l'augmentation de l'effet cumulé de l'essence sur les microorganismes. Ce constat corrobore par ailleurs l'idée selon laquelle la complexité des huiles essentielles couplée à d'autres caractéristiques telles l'origine et la nature du matériel végétal leur confèreraient des pouvoirs spécifiques.

Préalablement, nous avons mentionné que les maladies ciblées dans ce travail génèrent des radicaux libres qui compliquent l'état des patients affectés. Par conséquent, une essence qui présenterait un pouvoir antioxydant en plus des activités contre les champignons ou les néoplasmes serait idéale. Quelle est alors leur effet sur le stress oxydatif généré par les champignons pathogènes et le cancer ?

III.2.2 Activités antiradicalaires

Les tests d'activités antiradicalaires ont été réalisés *in vitro* par la méthode de piégeage du radical libre DPPH° par les huiles essentielles, en comparaison avec un antiradicalaire de référence, le BHT. A partir des données spectrophotométriques obtenues, les pourcentages de piégeage (%SC) ont été calculés, et les concentrations correspondant à 50% de piégeage déterminées graphiquement (SC_{50}). De ces valeurs de SC_{50} , les concentrations efficaces (CE) et les pouvoirs antiradicalaires ont été déduits.

III.2.2.1 Activité antiradicalaire du BHT

Les résultats montrent que le BHT présente une activité antiradicalaire de façon dose-dépendante, l'activité maximale (100% de piégeage) étant obtenue à 0,05 g/l par rapport à la gamme testée.

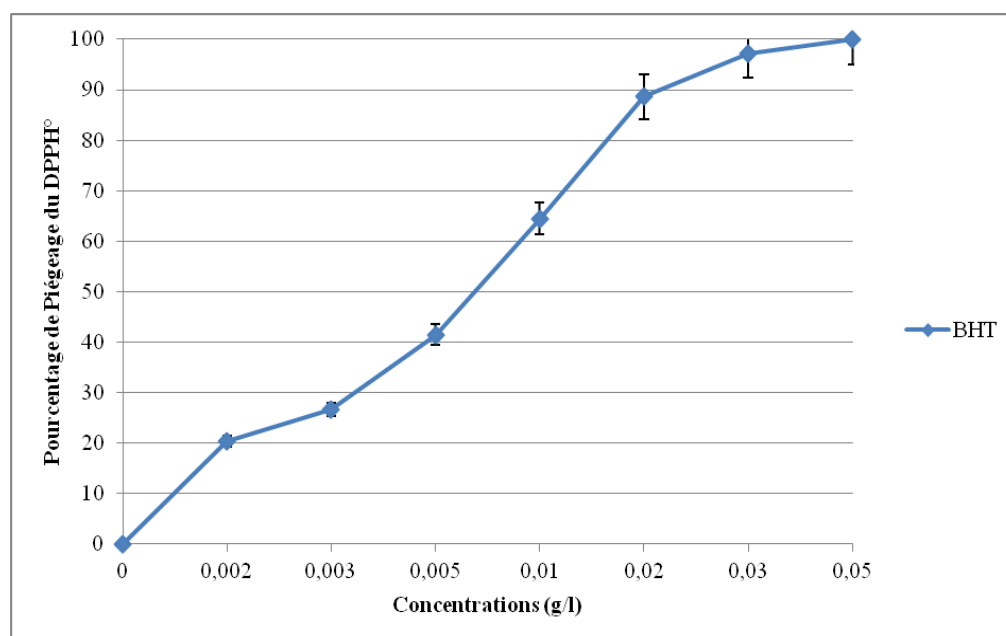
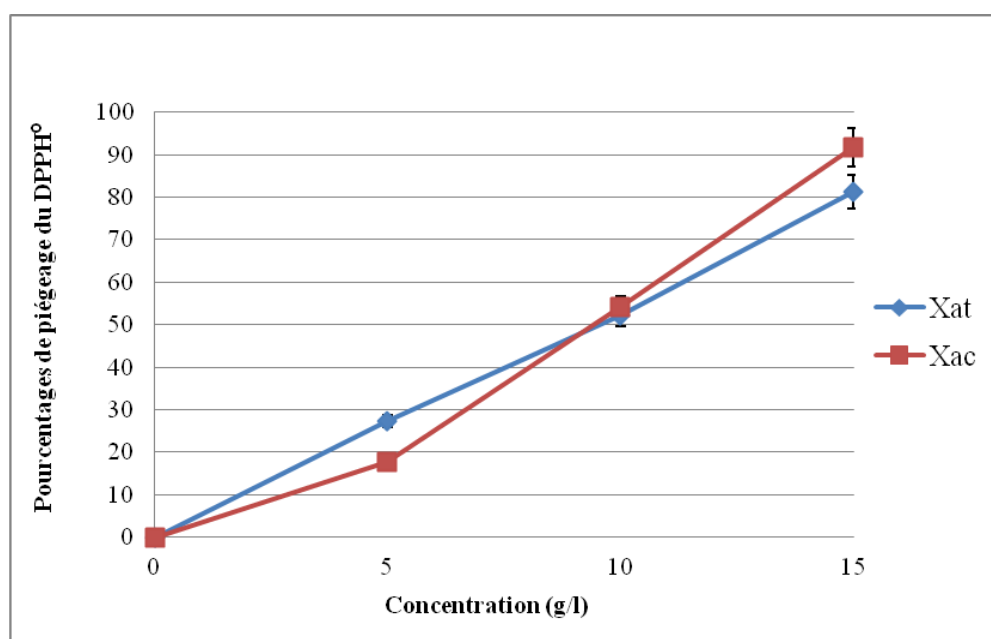


Figure 21 : Pourcentage de piégeage en fonction de la concentration en BHT

La figure 21 montre que le pourcentage de piégeage est proportionnel à la concentration en BHT nécessaire pour piéger 50% de molécules de DPPH° (SC₅₀) est de 7,02 10⁻³ g/l.

III.2.2.2 Activité antiradicalaire des huiles essentielles

Les moyennes des pourcentages de piégeage des radicaux libres des deux essais à différentes concentrations d'huiles essentielles de *Xylopia aethiopica*, *Xylopia parviflora*, *Monodora myristica* et de *Uvaria angolensis* (consignées en annexes) ont permis de tracer les courbes des figures 22, 23, 24 et 25.



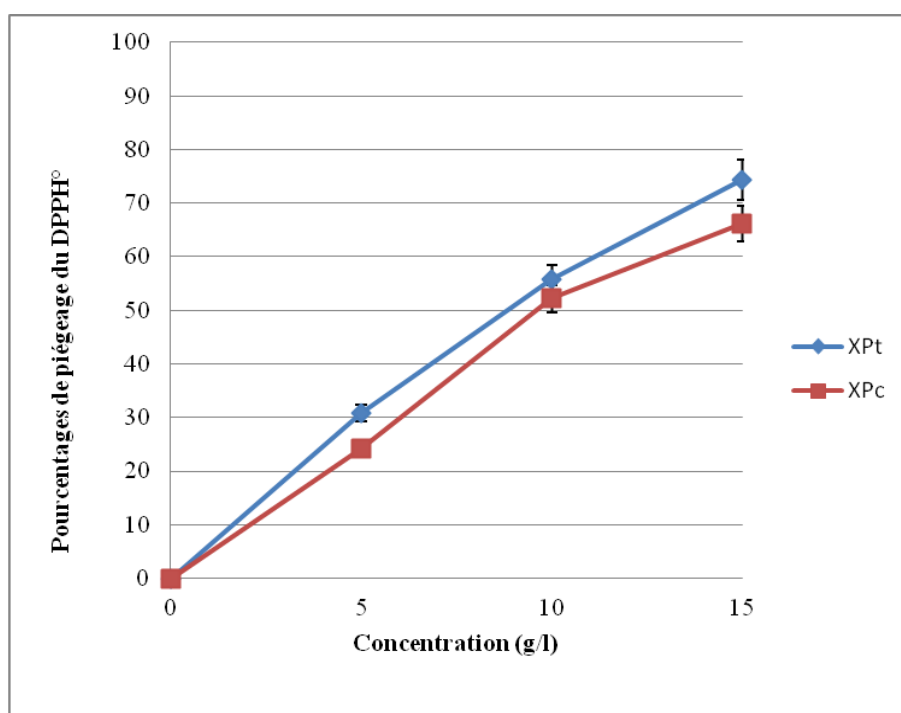
Xat= *Xylopia aethiopica* du Tchad; Xac= *Xylopia aethiopica* du Cameroun

Figure 22: Pourcentage de piégeage du DPPH° en fonction de la concentration en huiles essentielles de *Xylopia aethiopica* du Tchad et du Cameroun

Il ressort de la figure 22 que les pourcentages de piégeage (%SC) des radicaux libres de DPPH° croissent en fonction de la concentration en huiles essentielles de *Xylopia aethiopica* du Tchad et du Cameroun pour atteindre au maximum 81,3% et 91,66% respectivement à la concentration de 15 g/l. Les pourcentages de piégeage obtenus ont permis de déterminer les concentrations correspondant à 50 % de piégeage des radicaux libres de DPPH° (SC₅₀) de 9,63 ± 0,45 g/l et 9,46 ± 0,14 g/l des huiles essentielles de *Xylopia aethiopica* du Tchad et du Cameroun respectivement. Ces valeurs restent supérieures à celle

obtenue avec le BHT, et indiquent une activité antiradicalaire relativement inférieure à celle du BHT ($7,02 \cdot 10^{-3}$ g/l).

Les SC_{50} des huiles essentielles des fruits de *Xylopi*a *ethi*o*p*i*c*a issues du Tchad et du Cameroun (9,63 et 9,46 g/l respectivement) sont significativement identiques, mais inférieures à la SC_{50} de $15,0 \pm 0,8$ g/l obtenue par **Alitonou et al. (2013)** pour l'essence des feuilles de la même plante récoltée au Benin. Ceci montre que l'huile essentielle des fruits piègerait plus les radicaux libres (DPPH°) que celle des feuilles.

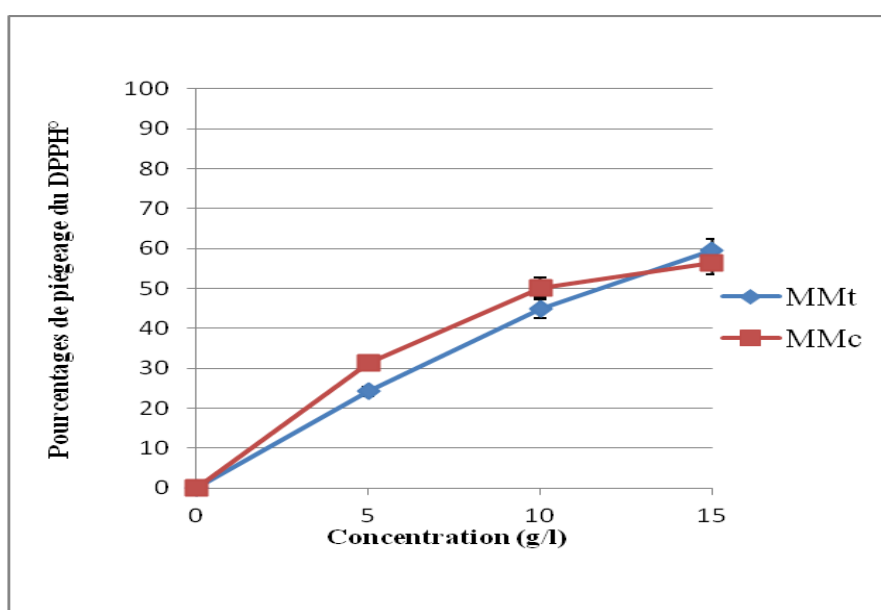


XPt= *Xylopi*a *parviflora* du Tchad ; XPc= *Xylopi*a *parviflora* du Cameroun

Figure 23: Pourcentage de piégeage du DPPH° en fonction de la concentration en huiles essentielles de *Xylopi*a *parviflora* du Tchad et du Cameroun

Il ressort de la figure 23 que les pourcentages de piégeage des radicaux libres augmentent en fonction de la concentration en huiles essentielles des fruits de *Xylopi*a *parviflora* du Tchad et du Cameroun. Les pourcentages de piégeage obtenus ont permis de déterminer les SC_{50} de $8,90 \pm 0,16$ g/l et $9,70 \pm 0,69$ g/l correspondant respectivement aux essences du Tchad et du Cameroun. Ceci montre que l'huile essentielle de *Xylopi*a *parviflora* du Tchad piègerait légèrement plus de radicaux libres (DPPH°) par rapport à celle du Cameroun et toutes les deux moins que la molécule antiradicalaire de référence le BHT.

L'activité antiradicalaire obtenue des huiles essentielles des fruits de *Xylopi* *parviflora* du Tchad et du Cameroun corrobore les travaux de **Woguem et al. (2014)** qui ont montré que l'huile essentielle des fruits de *Xylopi* *parviflora* récolté dans le Nde (Ouest - Cameroun) présente des propriétés antiradicalaires avec une SC_{50} de $590 \pm 1.5 \mu\text{g/ml}$ soit $0,59 \pm 1,5 \text{ g/l}$, piégeant plus de radicaux libres de DPPH° par rapport aux essences de *Xylopi* *parviflora* récolté à Goré (Tchad) et à Kribi (Cameroun). Cette variation dans l'activité serait due à la composition chimique de cette essence qui est légèrement riche en monoterpènes oxygénés (20,7%) tel que démontrés par **Jazet et al. (2007)** pour leurs propriétés antiradicalaires.



MMt= *Monodora myristica* du Tchad ; MMc= *Monodora myristica* du Cameroun

Figure 24 : Pourcentage de piégeage du DPPH° en fonction de la concentration en huiles essentielles de *Monodora myristica* du Tchad et du Cameroun

La figure 24 révèle que les pourcentages de piégeage des radicaux libres (DPPH°) augmentent avec la concentration en huiles essentielles des fruits de *Monodora myristica* du Tchad et du Cameroun. Les pourcentages de piégeage ont servi à obtenir les SC_{50} de $11,74 \pm 0,601 \text{ g/l}$ et $10,22 \pm 1,103 \text{ g/l}$ pour les huiles essentielles de *Monodora myristica* du Tchad et du Cameroun respectivement, attestant que l'essence du Cameroun piégerait plus les radicaux libres (DPPH°) par rapport à celle du Tchad.

Les huiles essentielles des graines de *Monodora myristica* du Tchad et du Cameroun ont une activité antiradicalaire plus élevée par rapport à l'huile essentielle des feuilles de *Monodora myristica* récolté au Benin dont la SC_{50} est de $15 \pm 0,8$ g/l (Alitonou *et al.*, 2013).

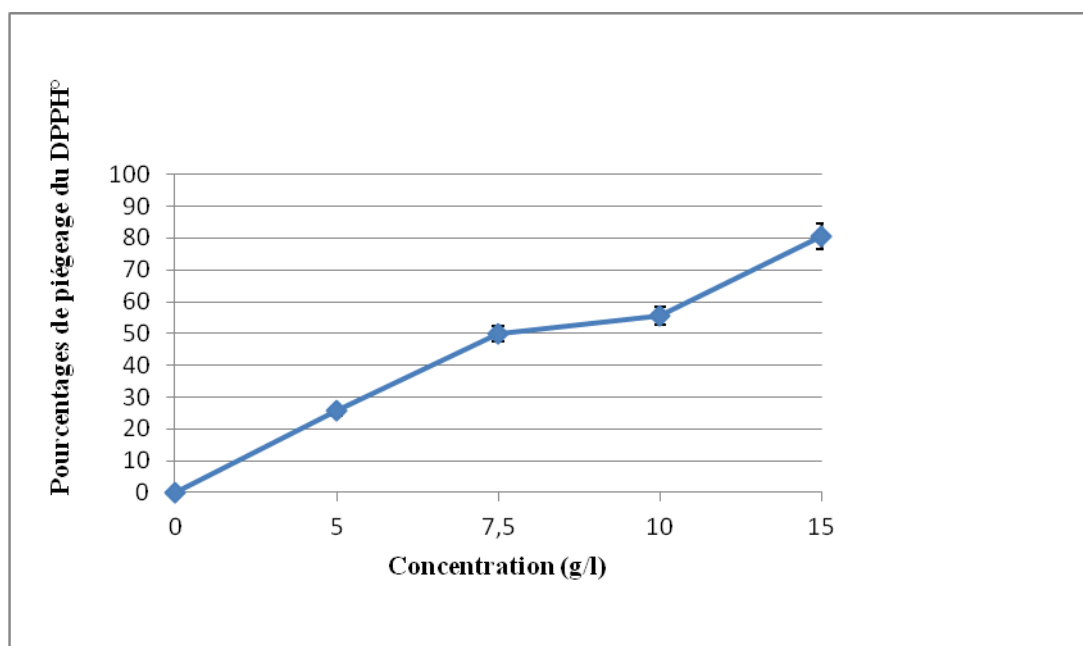


Figure 25: Pourcentage de piégeage du DPPH° en fonction de la concentration en huile essentielle de *Uvaria angolensis*

Il ressort de la figure 25 que les pourcentages de piégeage des radicaux libres (DPPH°) augmentent en fonction de la concentration en huiles essentielles des feuilles de *Uvaria angolensis*. Cette essence a une SC_{50} de $7,69 \pm 0,318$ g/l, similaire à $7,3 \pm 0,8$ g/l obtenue par Boyom *et al.* (2005) de l'huile essentielle des écorces du tronc de *Uvariadendron calophyllum* (Annonaceae), espèce voisine de *Uvaria angolensis*.

Les SC_{50} obtenues ont permis de calculer la concentration efficace 50 (CE_{50}) et le pouvoir antiradicalaire (PA) des huiles essentielles dont les résultats sont consignés dans le tableau XI.

Tableau XI: Récapitulatif des SC_{50} , CE_{50} et PA des huiles essentielles et du BHT

Echantillons	SC_{50} en g/l	CE_{50} en g/mol de DPPH	PA
BHT	$7,02 \cdot 10^{-3} \pm 0,00$	87,75	$1,13 \cdot 10^{-2}$
<i>Monodora myristica</i> (Cameroun)	$10,22^b \pm 1,10$	$12,77 \cdot 10^4$	$7,83 \cdot 10^{-6}$
<i>Mononodora myristica</i> (Tchad)	$11,74^a \pm 0,60$	$14,67 \cdot 10^4$	$6,80 \cdot 10^{-6}$

<i>Xylopi aethiopia</i> (Cameroun)	9,46 ^a ± 0,14	11,82. 10 ⁴	8,46. 10 ⁻⁶
<i>Xylopi aethiopia</i> (Tchad)	9,63 ^a ± 0,45	12,03. 10 ⁴	8,31. 10 ⁻⁶
<i>Xylopi parviflora</i> (Cameroun)	9,70 ^a ± 0,69	12,12. 10 ⁴	8,25. 10 ⁻⁶
<i>Xylopi parviflora</i> (Tchad)	8,90 ^a ± 0,16	11,12. 10 ⁴	8,99. 10 ⁻⁶
<i>Uvaria angolensis</i> (Cameroun)	7,69 ± 0,31	9,61. 10 ⁴	10,40.10 ⁻⁶

SC₅₀: scavenging concentration 50 ; CE₅₀: concentration efficace 50 ; PA : pouvoir antiradicalaire.

Il ressort du tableau XI que l'huile essentielle des feuilles de *Uvaria angolensis* du Cameroun a un pouvoir antiradicalaire plus grand (10,40.10⁻⁶) avec une SC₅₀ de 7, 69 ± 0,31 g/l par rapport aux huiles essentielles des fruits de *Monodora myristica*, *Xylopi aethiopia* et de *Xylopi parviflora* du Tchad et du Cameroun. Cependant, toutes ces valeurs sont faibles par rapport au pouvoir antiradicalaire de la molécule de référence qui est le BHT (1,13.10⁻²).

En conclusion bien que les valeurs des SC₅₀ obtenues soient différentes les unes des autres, ces différences ne sont pas statistiquement significatives entre les huiles essentielles du genre *Xylopi* (p>0.05) contrairement au genre *Monodora* (P<0.05) où on note une différence significative.

Les huiles essentielles riches en monoterpènes hydrocarbonés révélés dans les genres *Xylopi* et *Monodora* possèdent une faible activité antiradicalaire. Ces résultats corroborent à ceux obtenus par **Alitonou et al. (2013)**.

Il ressort des résultats de l'activité antiradicalaire des huiles essentielles étudiées que :

- L'huile essentielle de *Xylopi parviflora* du Tchad piège relativement plus des radicaux libres de DPPH° que celle de *Xylopi parviflora* du Cameroun avec cependant une différence non significative ;
- Les essences de *Xylopi aethiopia* du Tchad et du Cameroun ont pratiquement la même activité antiradicalaire ;
- L'huile essentielle de *Monodora myristica* du Tchad présente une activité antiradicalaire significativement plus élevée (P<0.05) que celle de *Monodora myristica* du Cameroun ;

- L'huile essentielle des feuilles de *Uvaria angolensis* du Cameroun a montré une activité antiradicalaire plus intéressante que celles des essences de *Monodora myristica*, *Xylopi aethiopica* et de *Xylopi parviflora* du Tchad et du Cameroun.

Dans la logique de notre approche, une huile essentielle dotée d'effet sur l'inflammation générée par les mycoses et les cancers, serait d'un intérêt accrue.

III.2.3 Activités anti-inflammatoires

III.2.3.1 Activité anti-inflammatoire de l'acide nordihydroguaiarétique

Dans l'optique d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire de nos essences à travers l'inhibition de la 5-lipoxygénase, la NDGA a été testé comme inhibiteur de référence. La figure 26 représente le pourcentage d'inhibition de la 5-lipoxygénase à différentes concentrations de la NDGA.

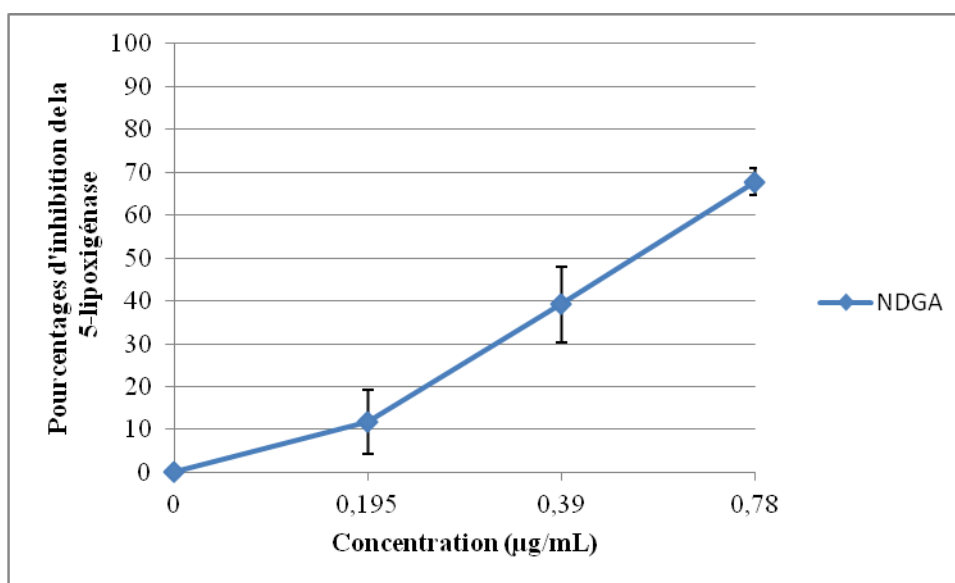


Figure 26 : Pourcentage d'inhibition de la 5-lipoxygénase par le NDGA en fonction de la concentration.

Il ressort de la figure 25 que le pourcentage d'inhibition de la 5-lipoxygénase augmente en fonction de la concentration en NDGA. Ces pourcentages ont permis de déterminer une CI_{50} de $0,53 \pm 0,03$ µg/mL pour le NDGA.

III.2.3.2 Activité anti-inflammatoire des huiles essentielles

Suivant rigoureusement le même protocole, l'activité ant-inflammatoire des huiles de *Monodora myristica*, *Xylopi aethiopica*, *Xylopi parviflora* et *Uvaria angolensis* a été évaluée. Les moyennes de pourcentages d'inhibition sont présentées dans le tableau XII.

Tableau XII: Activité anti-inflammatoire des huiles essentielles et du NDGA

Concentrations	Huiles essentielles	Pourcentage moyen	CI ₅₀
9,4	Huiles essentielles testées	0 ± 0,0	-
	<i>Xylopi aethiopica</i> (Tchad)	10,1 ± 5,6	-
	<i>Xylopi aethiopica</i> (Cam)	10,6 ± 5,0	-
	<i>Xylopi parviflora</i> (Tchad)	14,5 ± 5,2	-
	<i>Xylopi parviflora</i> (Cam)	8,5 ± 6,0	-
	18,8	<i>Monodora myristica</i> (Tchad)	9,2 ± 7,5
<i>Monodora myristica</i> (Cam)		8,8 ± 6,2	-
<i>Uvaria angolensis</i> (Cam)		0,0 ± 0,0	-
<i>Xylopi aethiopica</i> (Tchad)		12,0 ± 4,6	-
<i>Xylopi aethiopica</i> (Cam)		18,7 ± 4,4	-
<i>Xylopi parviflora</i> (Tchad)		16,0 ± 1,6	-
28,2	<i>Xylopi parviflora</i> (Cam)	15,0 ± 7,1	-
	<i>Monodora myristica</i> (Tchad)	17,3 ± 3,7	-
	<i>Monodora myristica</i> (Cam)	19,0 ± 5	-
0,78	NDGA	67,78 ± 3,12	0,53 ± 0,03

Cam= Cameroun

Il ressort du tableau XII que toutes les huiles essentielles testées ne présentent aucune action inhibitrice de la 5-lipoxygénase à la concentration de 9,4 µg/mL, même jusqu'à 18,8 µg/mL que pour l'huile essentielle de *Uvaria angolensis*.

En revanche, six huiles essentielles sur les sept étudiés provoquent une inhibition de 10% en moyenne sur l'activité de la lipoxigénase de soja à la concentration de 18,8 µg/mL, ainsi qu'une inhibition comprise entre 12% et 19% à 28,2 µg/mL.

Globalement, il ressort de cette étude que les huiles essentielles étudiées ne présentent qu'un effet très modéré par rapport à la NDGA utilisée comme référence sur l'activité de la 5-lipoxigénase aux concentrations testées. Il n'a donc pas été possible de déterminer leur CI₅₀ à ces concentrations

La faible activité anti-inflammatoire obtenue avec les huiles essentielles des Annonaceae du Tchad et du Cameroun est corroborée par les travaux de **Alitonou et al. (2013)** avec les huiles essentielles des feuilles de deux Annonaceae (*Monodora myristica* et *Xylopiya aethiopica*) récoltées au Bénin, et qui ont inhibé la lipoxigénase à moins de 30% à des concentrations variant de 9,4 µg/mL à 47 µg/mL.

En conclusion, il est à noter que les huiles essentielles issues des Annonaceae du Tchad et du Cameroun, ayant fait l'objet de cette étude ne sont pas dotées d'activité anti-inflammatoire significative tel que constaté par ailleurs par d'autres auteurs (**Alexandre, 2001 ; Baylac et Racine, 2003**). Il serait par conséquent judicieux de conclure que les essences des deux origines géographiques (pour ce qui concerne les échantillons étudiés) ont démontré une homogénéité biochimique par rapport à l'action vis-à-vis de la 5-lipoxigénase.

Au-delà de cette limite, nous nous sommes interrogés sur une éventuelle activité cytotoxique de ces essences. Il en est ressorti ce qui suit.

III.2.4 Activité Cytotoxique des huiles essentielles

III.2.4.1 Evaluation de la cytotoxicité par la méthode au MTT

L'activité cytotoxique des huiles essentielles sur les cellules humaines cancéreuses du sein (MCF-7) et les cellules épithéliales normales de l'œil (ARPE-19) a été évaluée par le test au MTT basé sur la viabilité des cellules.

Les deux lignées cellulaires (MCF-7 et ARPE-19) ont été incubées avec les huiles essentielles de *Xylopiya parviflora*, *Xylopiya aethiopica*, *Monodora myristica* et *Uvaria angolensis* issues des flores du Tchad et du Cameroun à des concentrations variant de 100 à 2000 µg/mL. Les résultats obtenus sont résumés dans les figures 27, 28, 29, 30, 31 et 33 et

dans le tableau XIII (donnant les valeurs des CI_{50} et indices de sélectivité) qui montrent les effets cytotoxiques des huiles essentielles sur les cellules en culture. Les données brutes ayant servi à tracer les graphes sont consignées dans les tableaux 10 à 16 en annexes.

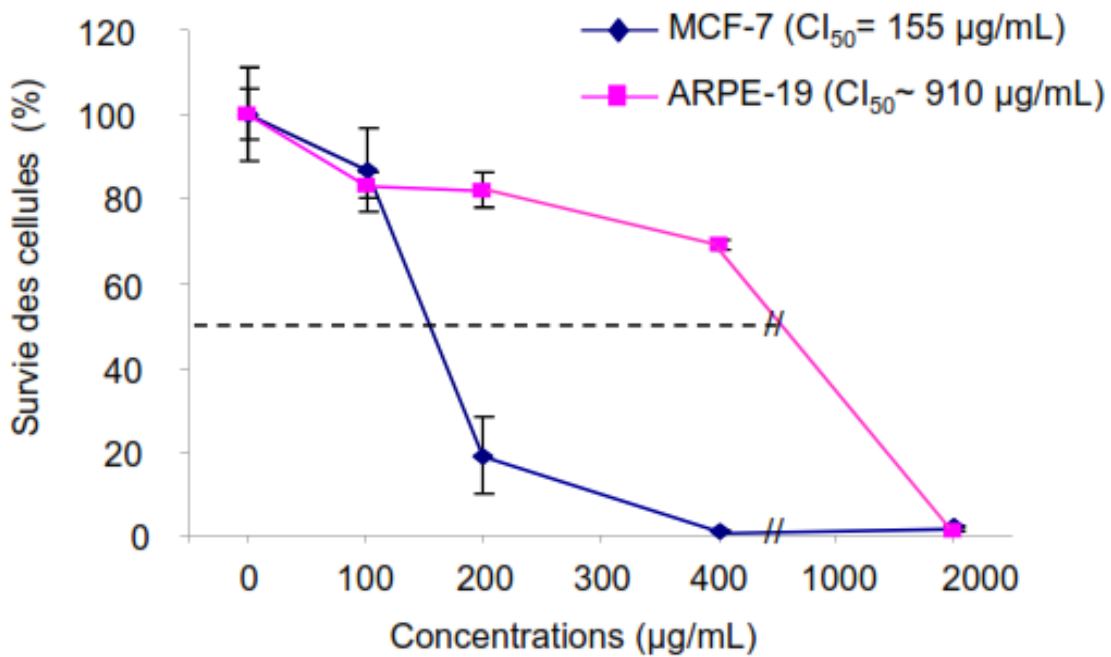


Figure 27: Effet cytotoxique de l'huile essentielle de *Xylopiaparviflora* du Tchad sur les cellules (MCF-7 et ARPE-19)

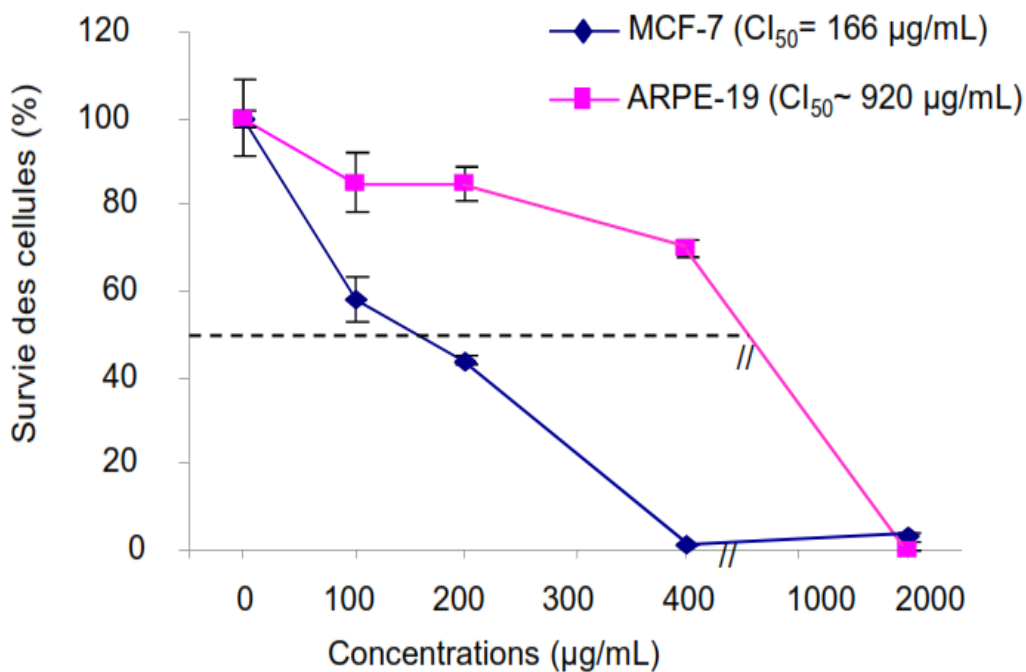


Figure 28 : Effet cytotoxique de l'huile essentielle de *Xylopiaparviflora* du Cameroun sur les cellules (MCF-7 et ARPE-19)

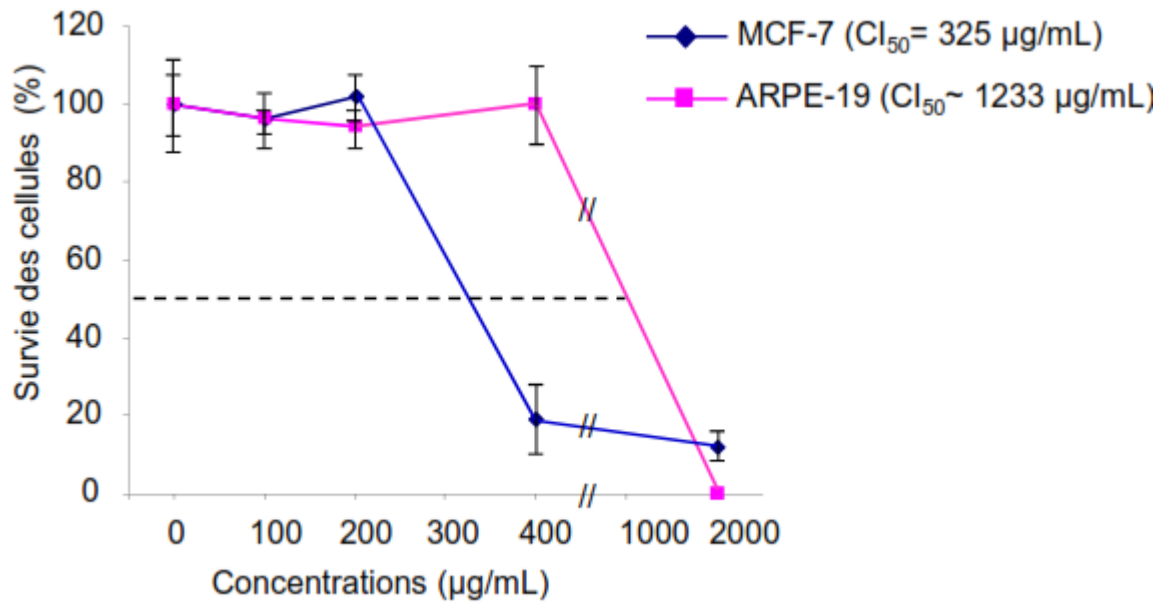


Figure 29 : Effet cytotoxique de l'huile essentielle de *Xylopiæ aethiopiæ* du Tchad sur les cellules (MCF-7 et ARPE-19)

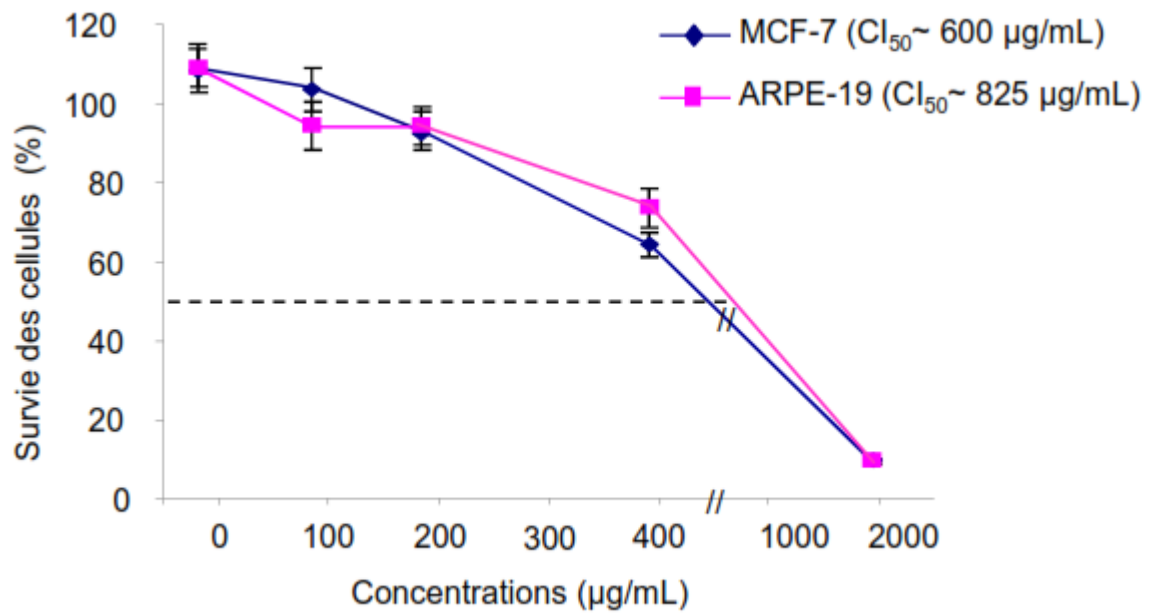


Figure 30 : Effet cytotoxique de l'huile essentielle de *Xylopiæ aethiopiæ* du Cameroun sur les cellules (MCF-7 et ARPE-19)

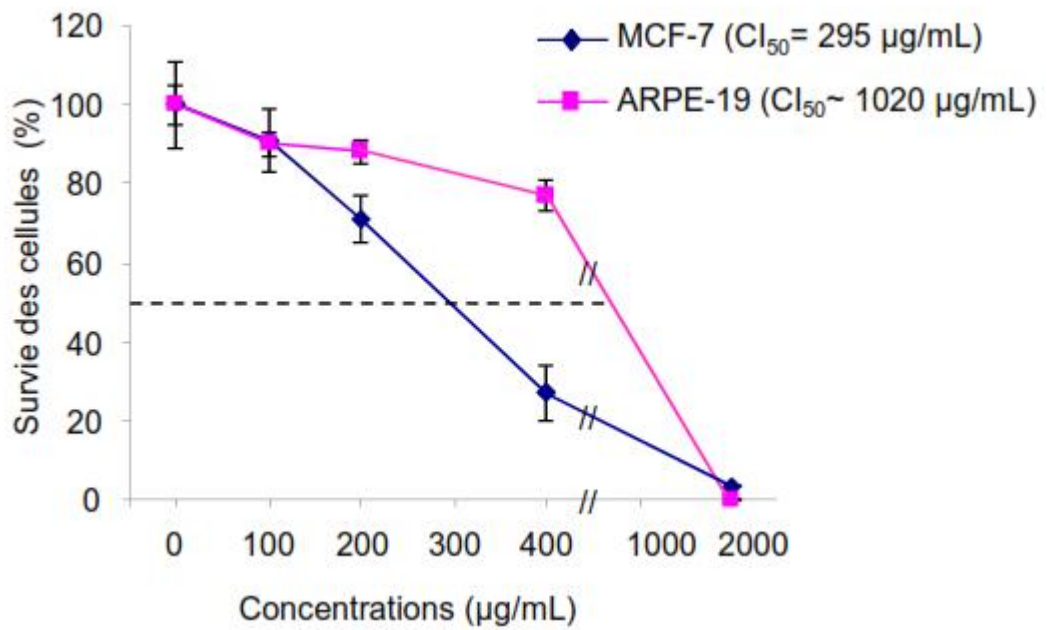


Figure 31 : Effet cytotoxique de l'huile essentielle de *Monodora myristica* du Tchad sur les cellules (MCF-7 et ARPE-19)

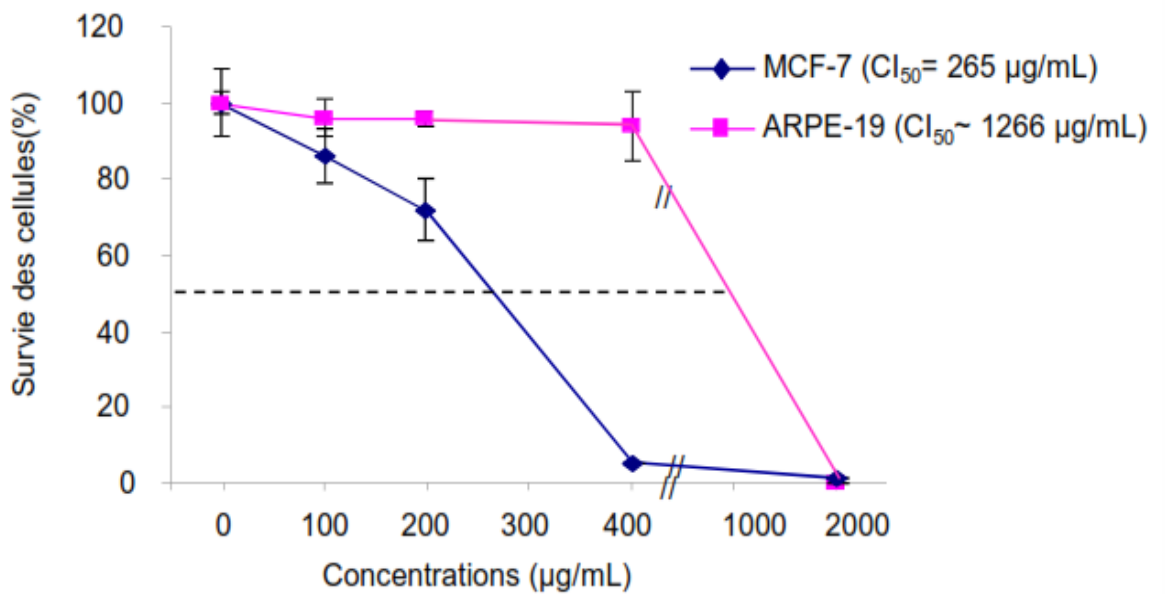


Figure 32 : Effet cytotoxique de l'huile essentielle de *Monodora myristica* du Cameroun sur les cellules (MCF-7 et ARPE-19)

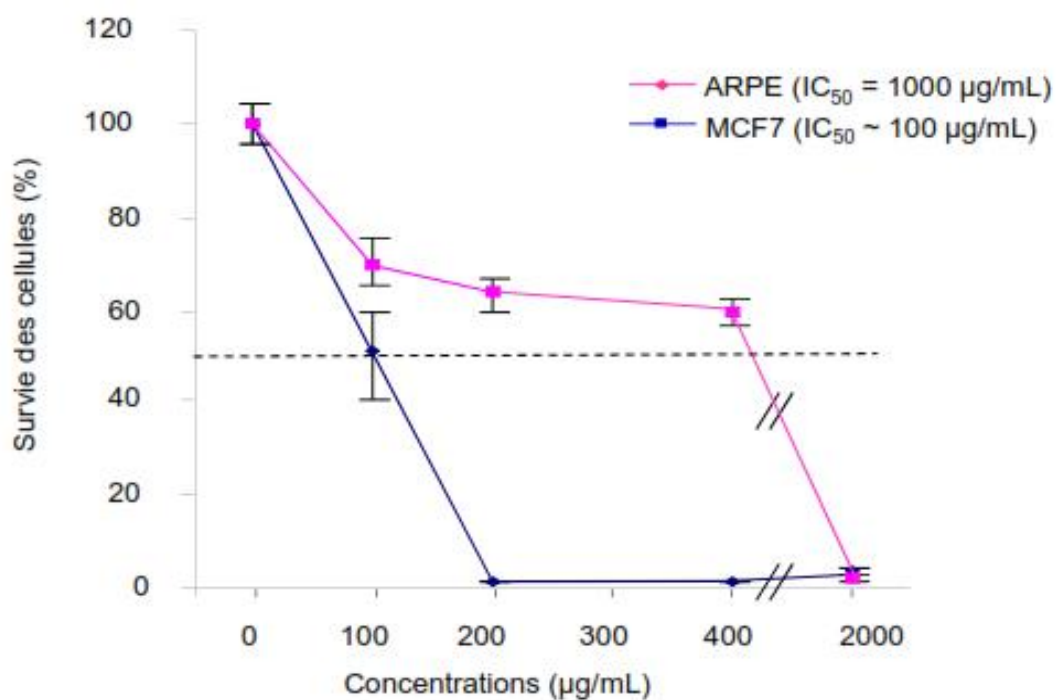


Figure 33: Effet cytotoxique de l'huile essentielle de *Uvaria angolensis* sur les cellules (MCF-7 et ARPE-19)

Tableau XIII: Activité des huiles essentielles sur la viabilité cellulaire

Huiles essentielles	CI ₅₀ (µg/mL)		
	MCF-7	ARPE-19	IS
<i>Xylopiya parviflora</i> (Tchad)	155	910	5,871
<i>Xylopiya parviflora</i> (Cameroun)	166	920	5,542
<i>Xylopiya aethiopica</i> (Tchad)	325	1233	3,794
<i>Xylopiya aethiopica</i> (Cameroun)	600	825	1,375
<i>Monodora myristica</i> (Tchad)	295	1020	3,476
<i>Monodora myristica</i> (Cameroun)	265	1266	4,777
<i>Uvaria angolensis</i> (Cameroun)	100	1000	10

IS= indice de sélectivité

Il ressort de l'analyse de l'ensemble des données que les huiles essentielles de *Xylopi* *parviflora*, *Xylopi* *aethiopica*, *Monodora* *myristica* et *Uvaria* *angolensis* présentent globalement un effet inhibiteur sur la viabilité des cellules aussi bien cancéreuses que normales.

Cependant, l'intensité de l'effet inhibiteur s'est montrée variable d'un cas à un autre. Plus particulièrement, il a été noté que:

1) L'huile essentielle de *Uvaria angolensis* est la plus active contre les cellules cancéreuses du sein (MCF-7), avec une viabilité réduite à 1% à 200 µg/mL. La CI₅₀ de cette essence a été déterminée comme étant 100 µg/mL. Par contre cette huile a démontré une innocuité relative hautement significative contre les cellules normales (ARPE 19) avec une CI₅₀ de 1000 µg/mL, soit 10 fois moins active que sur les cellules cancéreuses avec un indice de sélectivité de 10.

2) Les essences de *Xylopi parviflora* des deux origines se sont montrées également très actives, mais moins que celle de *Uvaria angolensis*. En effet, les deux essences ont présenté des valeurs de CI₅₀ presque similaires (155 µg/mL et 166 µg/mL respectivement pour le Tchad et le Cameroun) et des indices de sélectivité dans le même ordre (5,871 et 5,542 respectivement). Il faut noter qu'à 200 µg/mL, l'essence du Tchad a montré un effet inhibiteur plus accru que celle du Cameroun, avec des viabilités cellulaires de 19% et 44% respectivement. Leurs effets sur les cellules normales se sont révélés être similaires à toutes les concentrations testées.

3) Dans l'ordre d'activité décroissante, les essences de *Monodora myristica* des deux origines ont présenté des CI₅₀ significativement comparables de 295 µg/mL et 265 µg/mL avec indices de sélectivité de 3,476 et 4,777 respectivement pour les huiles essentielles du Tchad et du Cameroun. Cependant, aux concentrations de 400 µg/mL et 2000 µg/mL l'essence du Cameroun a démontré un effet plus accentué sur les cellules cancéreuses dont la viabilité a été réduite à 5% et 1% respectivement, par rapport à 27% et 3% pour l'essence du Tchad. Par ailleurs, un effet similaires de ces deux essences a été observé sur les cellules normales qui sont restées hautement viables jusqu'à la concentration de 400 µg/mL.

4) Enfin, les essences relativement moins actives se sont révélées être celles de *Xylopi aethiopica* du Tchad et du Cameroun, qui ont présenté des CI₅₀ de 325 µg/mL et 600 µg/mL respectivement contre les cellules cancéreuses avec des indices de sélectivité de 3,794

et 1,375 respectivement. A 200 µg/mL, les cellules se sont montrées hautement viables. Cependant il est à noter qu'à cette concentration, les cellules cancéreuses ont montré une viabilité de 102% sous l'effet de l'essence du Tchad. Ceci dénoterait d'un effet promoteur de cette huile essentielle sur la croissance des cellules cancéreuses. Des études ultérieures permettront de clarifier cette observation. A 400 µg/mL, cette essence s'est révélée être environ 3 fois plus active sur les cellules cancéreuses par rapport à celle du Cameroun, et à 2000 µg/mL, la tendance a été inversée, avec 12% de viabilité des cellules cancéreuses contre 1% pour l'essence du Cameroun.

5) dans l'ensemble, les cellules normales ont été presque complètement inhibées à la concentration en huile essentielle de 2000 µg/mL, avec des pourcentages de viabilité inférieurs à 3.

En conclusion, les essences des deux origines ont montré des profils d'activité antinéoplasique comparable, dénotant une homogénéité biochimique relative avec cependant des disparités non significatives.

L'effet cytotoxique moindre des huiles essentielles de *Xylopiya aethiopica* sur les cellules normales (ARPE-19) est dans une certaine mesure en accord avec les travaux de **Koba et al. (2008)** qui ont révélé que l'huile essentielle des fruits de *Xylopiya aethiopica* récoltés à Lomé (Benin) ne présentait aucun effet cytotoxique sur les lignées cellulaires (HaCaT) normales de l'épiderme à une CI₅₀ supérieure à 3000 µg/mL. Cette essence, tout comme celles analysées dans cette étude contenait principalement le β-pinène (23,6%), l'α-pinène (11,0%), le sabinène (9,6%), le germacrène D (8,3%) et le 1,8-cineole (8,2%).

Globalement, de nombreux rapports ont été publiés sur l'effet cytotoxique des extraits de plantes de la famille des Annonaceae sur des lignées de cellules humaines cancéreuses et non cancéreuses, mais peu d'informations sont disponibles sur l'effet cytotoxique des huiles essentielles de *Xylopiya aethiopica*, *Xylopiya parviflora* et de *Monodora myristica*. **Choumessi et al. (2012)** et **Kuete et al. (2011)** ont rapporté l'activité antiproliférative de l'extrait hydroéthanolique de *Xylopiya aethiopica* avec des CI₅₀ de 12 µg/mL sur les cellules cancéreuses du côlon HCT116 ; 7,5 µg/mL et > 25 pg / mL sur les cellules leucémiques U937 et KG1a ; 6,86 pg/mL et 3,91 ng/mL sur les cellules MiaPaCa-2 (cancer pancréatique) et CCRF-CEM (cellules leucémiques). **Adaramoye et al. (2011)** ont également montré l'effet antiprolifératif de l'extrait de *Xylopiya aethiopica* sur les cellules cancéreuses du col utérin humain. D'autre part, il a été signalé que des constituants tels que le terpinène-4-ol et le α-

cadinol qui se trouvent dans toutes les huiles essentielles testées ont une activité anticancéreuse contre le cancer du sein, du côlon, de l'estomac, du poumon, de l'ovaire et des lignées cellulaires de cancer du larynx (**Ren et Gould, 1998**). En outre, le β -pinène, qui est l'un des monoterpènes les plus naturellement courants dans les essences des espèces du genre *Xylopi*a, a une activité cytotoxique significative contre le cancer du sein et les lignées de cellules de cancer de l'épiderme de la peau (**Helen et al., 2012**).

De même, il a été démontré que le limonène peut améliorer l'activité cytotoxique des huiles essentielles contre les tumeurs par induction de l'apoptose et action sur les phases 1 et 2 du métabolisme enzymatique des cancérogènes (cytochrome P450) qui métabolisent des substances cancérogènes en formes moins toxiques et prévient l'interaction de produits chimiques cancérogènes avec l'ADN (**Sun, 2007**). Bien que, l'huile de *Monodora myristica* du Tchad se soit révélée riche en limonène (14,9%), son effet cytotoxique ne s'en est pas trouvée meilleure contre les cellules MCF-7. En définitive, il est à relever qu'aucun travail antérieur n'a décrit l'activité antinéoplasique de l'essence de *Uvaria angolensis*, cependant sa forte teneur en sesquiterpènes oxygénés justifierait son activité et sa sélectivité relativement meilleures contre les cellules cancéreuse MCF-7.

D'après **Sibanda et al. (2004)**, d'autres composés tels que l'oxyde de caryophyllène contribueraient à l'activité globale au vu de leur action contre des lignées cellulaires (SK-MEL-28, MDA-MB-231 et Hs 578T, et 5637) des cancers de la peau, du sein et de la prostate respectivement. Ils ont également constaté que l'oxyde de caryophyllène à 100 pg/mL était cytotoxique sur les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) et de la prostate (PC-3) avec 89,67% et 96,75% de mort cellulaire, respectivement.

Ces résultats corroborent les travaux de **Woguem et al. (2014)** qui ont montré que l'huile essentielle des fruits de *Xylopi*a *parviflora* récolté dans le Nde (Ouest –Cameroun), riche en β -pinène (34,0%), α -pinène (10,3%), *trans*-pinocarvéol (5,0%), myrténol (4,6%) et en sesquiterpènes (11,7%) aurait une activité cytotoxique sur trois lignées de cellules cancéreuses (HCT116, MDA-MB 231 et A375) responsables des cancers du colon, du sein et du mélanome respectivement à des CI_{50} de 6,63 μ g/mL , 6,56 μ g/ml de 7,47 μ g/mL.

La teneur monoterpénique élevée dans les huiles de *Xylopi*a *aethiopi*c*a* et *Monodora myristica* et la présence d'un composé anticancéreux puissant tel que le limonène dans ces extraits n'a pas influencé leur cytotoxicité contre les cellules MCF-7, contrairement aux conclusions de **Miller et al. (2013)** qui affirmaient que la présence de ce composé dans une

essence lui confèrerait une activité anticancéreuse. Au contraire, les huiles essentielles de *Xylopi*a *parviflora* qui ne contiennent pas ce composant ont montré l'une des meilleures activités contre les cellules cancéreuses. Ceci est une indication que l'activité anticancéreuse ne serait pas due à un constituant exclusif, mais plus probablement le fait d'une coalition d'actions de constituants qui agiraient alors en synergie ou par additivité (**Bakkali et al., 2008**).

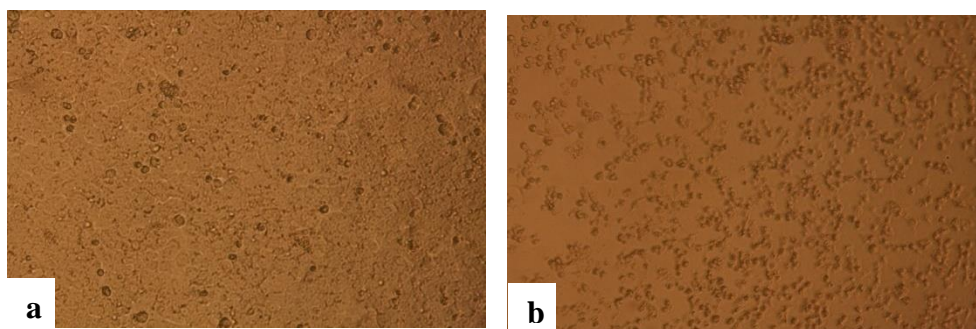
Compte tenu de la potentialité des essences de *X. parviflora* du Tchad et du Cameroun contre les cellules cancéreuses, elles ont été choisies pour la caractérisation phénotypique du mode d'action contre les cellules cancéreuses (MCF-7).

III.2.4.2 Caractérisation phénotypique de l'effet des huiles sur les cellules cancéreuses

En résumé, ce test a permis l'observation microscopique et la quantification rapide et sensible de la prolifération et de la viabilité cellulaires basées sur l'activité d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase en présence du substrat (révélateur) MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide). Le sel de tétrazolium du substrat est transformé en cristaux insolubles de formazan (colorés en bleue) grâce à l'activité de la succinate déshydrogénase. Les cupules des plaques de culture colorées en jaunes indiquent que les cellules sont mortes aux concentrations correspondantes.

Par observation au microscope, les cellules cancéreuses mortes par apoptose étaient caractérisées par le bourgeonnement de la membrane sans perte d'intégrité ou par un bouillonnement de la membrane plasmique; ces résultats ont corroboré les observations de **Cohen (1993)** sur ce type de cellules.

Les contenus des microplaques observés au microscope pour la caractérisation phénotypique (morphologique) que des cellules cancéreuses (MCF-7) mises en contact avec l'huile essentielle de fruits de *Xylopi*a *parviflora* du Cameroun aux concentration de 10 µg/mL à 400 µg/mL, avant et après traitement par MTT et après 4 heures d'incubation sont indiqués par la figure 34.



a- Contrôle: cellules viables de MCF-7; **b-** Cellules (MCF-7) mortes exposées à l'huile essentielle de *Xylopiaparviflora* du Cameroun à 400 µg/mL.

Figure 34 : Caractérisation phénotypique des cellules MCF-7 en absence de MTT

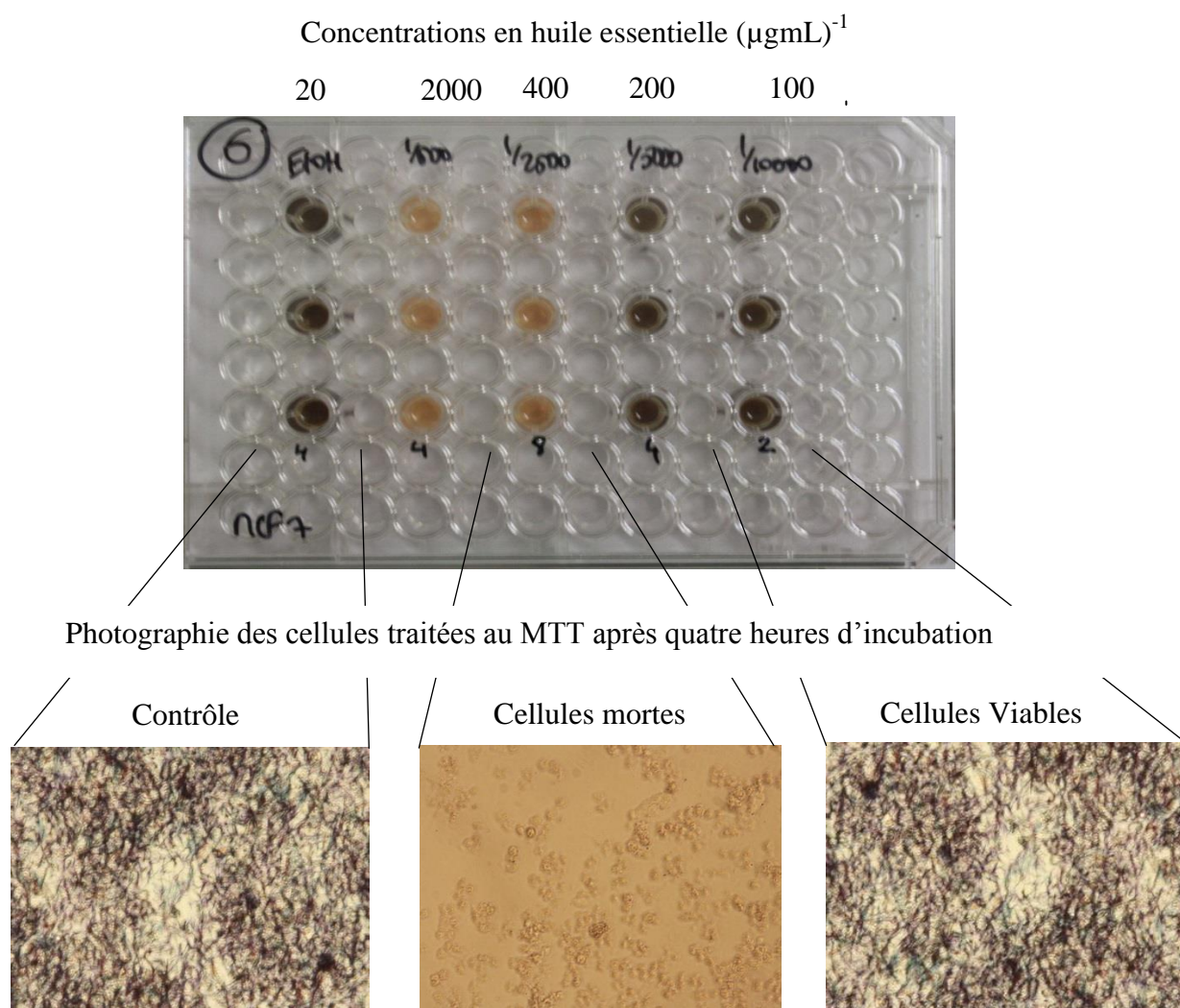
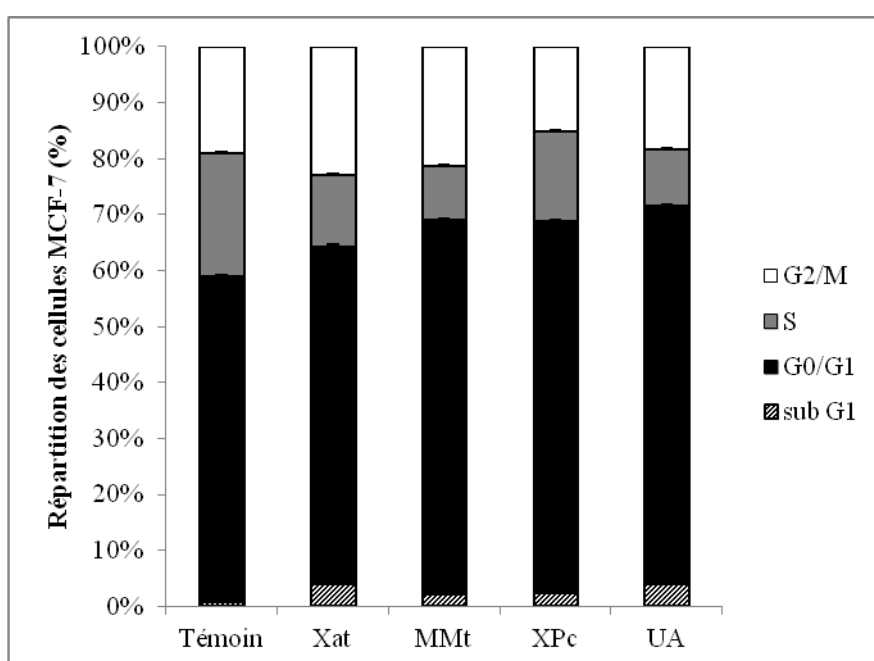


Figure 35: Caractérisation phénotypique de la viabilité cellulaire en présence du MTT

III.2.4.3 Cycle cellulaire : Mécanisme d'action impliqué dans la mort cellulaire

Sur la base de leurs CI_{50} , les huiles essentielles de *Xylopiya aethiopyca*, *Monodora myristica* du Tchad, *Xylopiya parviflora* et *Uvaria angolensis* du Cameroun ont été sélectionnées pour effectuer cette étude. Les résultats de l'étude par cytométrie de flux de l'effet des huiles essentielles sur le cycle cellulaire des cellules cancéreuses (MCF-7) et épithéliales normales (ARPE-19) à la concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sont consignés dans les tableaux 17 et 18 en annexes. Ils ont permis de déterminer le mécanisme d'action impliquant la mort de ces cellules tel que représenté dans les figures 36 et 37.



Xat= *Xylopiya aethiopyca* (Tchad), MMt= *Monodora myristica* (Tchad),

XPc= *Xylopiya parviflora* (Cameroun), UA= *Uvaria angolensis*

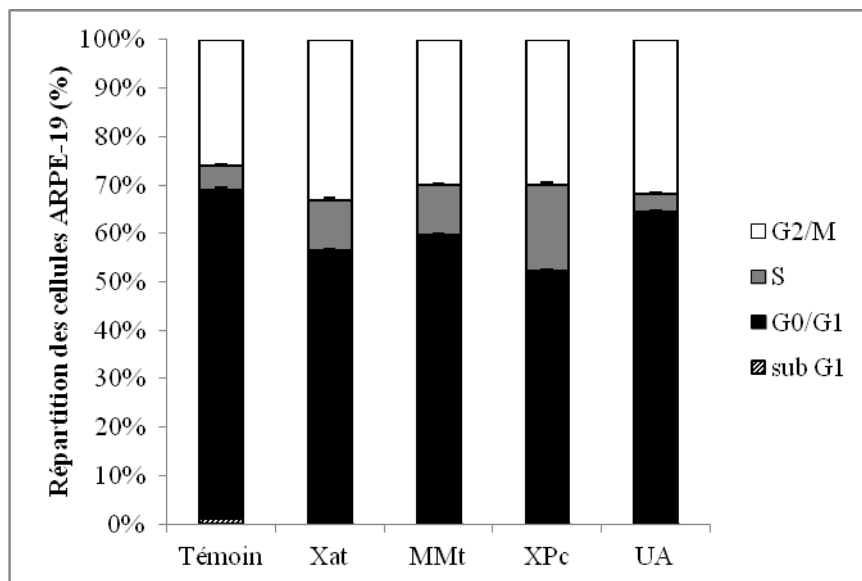
G2/M: Phase de la mitose (M),

S : Phase de synthèse correspondant à la replication de l'ADN

G0/G1 : Phase d'activation des cellules,

SubG1 : Phase d'apoptose

Figure 36 : Analyse du cycle cellulaire des cellules (MCF-7) traitées avec l'éthanol (Témoin) pendant 24 heures ou supplémentées avec les huiles essentielles à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$



Xat= *Xylopi aethiopica* (Tchad), MMt= *Monodora myristica* (Tchad),

XPc= *Xylopi parviflora* (Cameroun), UA= *Uvaria angolensis*

G2/M: Phase de la mitose (M),

S : Phase de synthèse correspondant à la replication de l'ADN

G0/G1 : Phase d'activation des cellules,

SubG1 : Phase d'apoptose

Figure 37: Analyse du cycle cellulaire des cellules (ARPE-19) traitées avec l'éthanol (Témoin) pendant 24 heures ou supplémentées avec les huiles essentielles à 100 µg/µL

Il ressort des figures 36 et 37 que les huiles essentielles des fruits de *Xylopi aethiopica* (Tchad), *Xylopi parviflora* (Cameroun), et des graines de *Monodora myristica* (Tchad) et des feuilles de *Uvaria angolensis* (Cameroun), incubées pendant 24 heures avec les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) induisent un arrêt du cycle cellulaire à la phase G0/G1 et une émergence significative de l'apoptose pendant la phase sub-G1. Cette conclusion découle de l'apparition d'un 3^e pic du cycle cellulaire avec 1 à 4 % de cellules (MCF-7) mortes par apoptose. Ce pic correspond à des cellules dont le contenu en ADN est diminué par perte de fragments d'ADN clivés au cours de l'apoptose (Leers *et al.*, 1999; Szmit *et al.*, 2002).

Quand aux cellules épithéliales normales (ARPE-19), l'arrêt du cycle cellulaire s'observe en phase S avec les huiles essentielles de *Xylopi aethiopica*, *Xylopi parviflora*, *Monodora myristica*, puis en phase G2/M pour l'huile essentielle de *Uvaria angolensis*.

Ces observations suggèrent une différence fondamentale entre les cellules normales et les cellules cancéreuses du fait que les cellules normales (ARPE-19) sont capables de rester

en vie pendant la phase S (réplication de l'ADN) ou G2/M (pre-mitotique) correspondant à la synthèse de l'ARN alors qu'on observe un arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses (MCF-7) en phase G0/G1 et autodestruction par apoptose. De plus, le fait que les cellules normales (ARPE-19) soient capables de rester en vie pendant la phase S sous l'effet des huiles essentielles démontre qu'elles peuvent réparer leur ADN endommagé au cours de l'apoptose par excision tel que démontré antérieurement par **Sarasin (1994)** chez les cellules eucaryotes traitées par des inhibiteurs de croissance.

L'arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses (MCF-7) et des cellules épithéliales normales (ARPE-19) en phases G0/G1 et S et leur mort par apoptose par les effets cytotoxiques des huiles essentielles testées est corroboré par les travaux de **Cha et Kim (2012)** qui ont montré que l'huile essentielle des feuilles de *Cryptomeria japonica* contenant des composés présents dans nos essences tels que α -pinène (6,07%), sabinène (8,86%), terpinèn-4-ol (9,97%), et α -terpinéol (6,13%) induirait l'apoptose de cellules cancéreuses (KB) de l'épiderme buccal. En effet, ces auteurs ont révélé que cette huile essentielle activerait les caspases (Caspases 3) et provoquerait les variations de la teneur mitochondriale en protéines de la famille Bcl₂ et le rapport Bax/Bcl₂, induisant ainsi la libération du cytochrome c dans le cytosol dont l'ensemble constitue un modèle moléculaire caractéristique de l'apoptose.

De même, **Wei et al. (2008)** ont montré que l'huile essentielle extraite des aiguilles de pin (*Pinus sylvestrus*) induirait l'apoptose en inhibant l'activité de la télomérase et l'expression du gène Bcl₂ des cellules cancéreuses hépatiques (HepG2).

Au terme de cette étude sur le mécanisme de mort cellulaire, il ressort que toutes les huiles essentielles induisent l'apoptose à 100 µg/mL. Cependant il est à noter que les essences de *Xylopiya aethiopica* du Tchad et *Uvaria angolensis* du Cameroun induiraient 2 fois plus de mort cellulaire par apoptose des cellules cancéreuses que toutes les autres huiles. D'autre part, l'effet apoptotique des huiles essentielles est plus prononcé vis-à-vis des cellules cancéreuses (MCF-7) que des cellules normales (ARPE-19).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion

Au terme de cette étude donc l'objectif général était de rechercher les substances naturelles ayant des propriétés antifongiques, antiradicalaires, anti-inflammatoires et antinéoplasiques des huiles essentielles des graines, fruits et feuilles de quatre plantes sélectionnées de la famille des *Annonaceae* du Tchad et du Cameroun, les résultats saillants suivants ont été obtenus :

- 1- Les rendements d'extraction des huiles essentielles ont varié de 0,10 à 4,86% en fonction des organes et des espèces de la famille des *Annonaceae* étudiés et issues du Tchad et du Cameroun ; le meilleur rendement était celui des fruits de *Xylopia aethiopica* du Cameroun (4,86 %). La similarité des compositions chimiques des huiles essentielles globalement riches en monoterpènes (75 à 94,2%) dans les genres *Monodora* et *Xylopia* avec comme composés majoritaires l' α -phellandrène (52,7 à 67,1%) et le β -pinène (24,6 à 35,7%) respectivement a marqué une homogénéité biochimique intraspécifique à travers les deux zones tropicales où poussent ces plantes ; le cas particulier de l'essence de *Monodora myristica* du Tchad qui s'est montrée significativement riche en limonène (14,9%) par rapport à celle du Cameroun qui n'en contenait que 1,8% a été relevé. L'huile essentielle des feuilles de *Uvaria angolensis* du Cameroun s'est révélée riche en sesquiterpènes (50,3%) par rapport aux monoterpènes (12,5%). Cette essence était majoritairement constituée de benzoate de benzyle (32,8%).
- 2- Les huiles essentielles des fruits de *Xylopia aethiopica*, *Xylopia parviflora* et des graines de *Monodora myristica* du Tchad et du Cameroun et celle des feuilles de *Uvaria angolensis* du Cameroun ont inhibé la croissance de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* et *Cryptococcus neoformans* à des CMI comprises entre 5 et 10 mg/ml et se sont montrées toutes fongicides sur les 3 souches de levures.
- 3- L'huile essentielle des feuilles de *Uvaria angolensis* du Cameroun a montré un pouvoir antiradicalaire légèrement élevé ($10,40 \cdot 10^{-6}$) avec une SC_{50} de $7,69 \pm 0,31$ g/l par rapport aux huiles essentielles des graines de *Monodora myristica*, et fruits de *Xylopia aethiopica* et *Xylopia parviflora* du Tchad et du Cameroun dont les

SC₅₀ sont comprises entre 8,90 et 11,74 g/l. Néanmoins, cette différence apparue n'est pas significative.

- 4- Dans l'ensemble, toutes les essences ont montré une faible activité anti-inflammatoire, avec une inhibition de la 5-lipoxygénase de soja inférieure à 50%.
- 5- Les huiles essentielles testées ont montré un effet significatif de mort sur les cellules cancéreuses (MCF-7), avec des indices de sélectivité comprises entre 1,375 et 10. La sélectivité d'action de ces huiles essentielles a aussi été démontrée à travers l'inhibition préférentielle du cycle cellulaire des cellules cancéreuses (MCF-7) en phase G0/G1 par rapport aux cellules épithéliales normales (ARPE-19) dont le cycle s'arrête en phase S. Leur effet cytotoxique plus élevée sur les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) par rapport aux cellules épithéliales normales de l'œil (ARPE-19) marque un effet sélectif de celles-ci mortes par apoptose, et met en évidence le potentiel de ces essences comme source de thérapie éventuelle contre le cancer du sein.

L'ensemble de ces résultats démontre que les huiles essentielles des plantes de la famille des Annonaceae du Tchad et du Cameroun ayant fait l'objet de l'étude sont dans une certaine mesure comparables des points de vue de leur teneur dans les organes de plantes, de leur composition chimique, et de leurs activités antifongiques, antiradicalaires, anti-inflammatoires, et anticancéreuses. Elles ont par conséquent prouvé une homogénéité remarquable et pourraient, au Tchad comme au Cameroun, être la source de traitements de nombreuses maladies à l'instar des infections fongiques, les cancers, et les affections liées au stress oxydatif.

Perspectives

Considérant ce qui précède, ce champ d'intérêt devra être exploré davantage. Nous envisageons par conséquent :

- D'étendre nos recherches à d'autres espèces de la famille des *Annonaceae* y compris *Uvaria angolensis* du Tchad ;
- Etudier les activités antioxydantes et anti-inflammatoires complémentaires ;
- D'étudier la toxicité *in vitro/in vivo* des essences qui auront montré un profil biochimique prometteur ;

- De déterminer le/les mécanisme(s) d'action additionnels des essences ayant montré de bonnes activités et un profil toxicologique acceptable comme source de médicaments ;
- De réaliser des études précliniques dans de modèles animaux ;
- Et subsidiairement, d'explorer l'effet promoteur de la croissance des cellules cancéreuse tel que observé avec l'essence de fruits de *Xylopi*a *aethi*opica du Tchad.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Accoceberry I., Noel T. (2006).** Antifungals cellular targets and mechanisms of resistance. *Therapie*, **61**(3): 195-199.
- Achoundong G., Guedje N., Nkuinkeu R., Onana J.M. (2003).** Les fruitiers forestiers comestibles du Cameroun: Aspects botaniques et écologiques in *Les Fruitiers Forestiers Comestibles du Cameroun*. IPGRI **2006**. ISBN-13: 978-92-9043-707-9, ISBN-10: 92-9043-707-3, 205 p.
- Ackah J., Bognan A.A., Kra A.K.M., Zirihi G.N., Guede-Guina F. (2008).** Évaluation et essais d'optimisations de l'activité anticandidosique de *Terminalia catappa* Linn (Tekam3), un extrait de *Combretaceae* de la pharmacopée ivoirienne. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, **77** : 120-136.
- Adamczyk E. (2011).** Les Antifongiques en Médecine Vétérinaire. *Thèse de doctorat en Médecine Vétérinaire. Université Claude-Bernard - Lyon I*. pp.20-107.
- Adams R. P. (2007).** Identification of essential oils by gas chromatography quadrupole 420 mass spectrometry. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, USA. 801 p.
- Adaramoye O.A., Sarkar J., Singh N., Meena S., Changkija B., Yadav P.P., Kanojiya S., Sinha S. (2011).** Antiproliferative action of *Xylopiya aethiopica* fruit extract on human cervical cancer cells. *Phytotherapy Research*, **25**(Suppl 10) :1558–1563.
- Adeoye A.O., Oguntimein B.O., Clark A.M., Hufford C.D. (1986).** Dimethylallylindole: an antibacterial and antifungal metabolite from *Monodora tenuifolia*. *Journal of Natural Products*, **49** :534-537.
- Adjanohoun E. et Assi L.A. (1979).** Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte-d'Ivoire. Centre national floristique, 32 p.
- Adjanohoun J.E., Aboubakar N., Dramane K., Ebot M.E., Ekpere J.A., Enoworock E.G., Focho D., Gbile Z.O., Kamanyi A., Kamsu K.J., Keita A., Mbenkum T., Mbi C.N., Mbiele A.C., Mbome J.C., Muberu N.K., Nancy W.L., Kongmeneck B., Satabie B., Sofowara A., Tamze V. et Wirmum C.K, (1996).** Traditional Medicine and Pharmamacopoeia: Contribution to Ethnobotanical and Floristic Studies in Cameroon. Organisation of African Unity; Scientific Technical and Research Comity, Addis Ababa, pp.194-201.
- AFNOR (2000).** *Recueil des normes Françaises sur les huiles essentielles*. tome 2, 1 : 79-86.
- Ahmedin J., Rebecca S., Jiaquan X., Elizabeth W. (2001).** Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*, **60** (5): 277-300.

- Akharaiyi F.C., Ilori R.M., Adesida J.A. (2011).** Antibacterial effect of *Terminalia catappa* on some selected pathogenic bacteria. *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research*, **2** (2): 64-67.
- Alexander M. (2001).** Aromatherapy and immunity: how the use of essential oil in aids immune potentiality. Part 3: Immune response to inflammation and essential oils useful in inhibiting them. *International Journal of Aromatherapy*, **11** (4): 220–224.
- Alitonou G.A., Avlessi F., Sohounhloue D.K., Agnagniet H., Bessiere JM., Menut C. (2006).** Investigations on the essential oil of *Cymbopogon giganteus* from Benin for its potential use as an anti-inflammatory agent. *International Journal of Aromatherapy*, **16**:37-41.
- Alitonou G.A., Tchobo F.P., Sessou P., Avlessi F., Menut C., Sohounhloue D.C.K. (2013).** Chemical composition, antiradical anti-inflammatory activities of four *Annonaceae* from Benin. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, **3** (3) : 914-923.
- Almirante B., Rodriguez D., Cuenca-Estrella M., Almela M., Sanchez F., Ayats J., Alonso-Tarrés C., Rodriguez-Tudela J.L., Pahissa A. (2006).** Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**(5): 1681-1685.
- Amano H., Hayashi I., Endo H., Kistasato H., Yamashina S., Mauyama T. Kobayashi M., Satoh K., Narita M., Sugimoto Y., Murata T., Yoshimura H., Narumiya S Et Majima M. (2003).** Host prostaglandin E2-EP3 Signaling Regulates Tumor-Associated Angiogenesis and tumor Growth. *The journal of Experimental Medicine*, **197** (2):221-232.
- Aminimoghadamfarouj N., Nematollahi A., Wiart C. (2011).** Annonaceae: bio-resource for tomorrow's drug discovery. *Journal of Asian Natural Products Research*, **13**(5):465-476.
- ANOFEL : Association des Enseignants de Parasitologie (2002).** Parasitologie Mycologie. *Format utile. Angers*, **7** : 301-373.
- Aouni M., Pelen F., Soulimani R. (2013).** Etude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. *Phytothérapie*, **11**: 225-236.
- Arbonnier M. (2004).** *Trees, shrubs and lianas of West African dry zones*. CIRAD, Paris, France; Margraf, Weikersheim, Germany; MNHN, Paris, France.

- Aromedee C., Wichitchote P., Jantakun N. (2005).** Spectrophotometric Determination of Total Lactones in *Andrographis paniculata* Nees. *Songklanakarin Journal of science Technology*, **27**(6): 1227-1231.
- Association Française des Enseignants de Parasitologie-Mycologie (2002).** *Mycologie Médicale*, In : *AFEP, ANOFEL*, Parasitologie Mycologie, Format Utile, Pp299-378.
- Astani A., Paul Schnitzler P. (2014).** Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus in vitro. *Iranian Journal of Microbiology*, **3** (6) :149-155.
- Aurousseau B. (2002).** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : Conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Production Animale*, **15** : 67-82.
- Avlessi F., Dangou J., Wotto V.D., Alitonou G.A., Sohounhloue D.K., Menut C. (2004).** Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook : Les substances chimiques biologiquement actives extraites des plantes médicinales et les huiles essentielles des plantes aromatiques de la sous-région Ouest-Africaine. *Comptes rendus. Chimie*, **7** : 1057-1061.
- Awono F. A., Ndoye, O., Minlo, Y., Lema Ngonu D. (2003).** Les Fruitiers Forestiers Comestibles du Cameroun: aspect utilisation in *Les Fruitiers Forestiers Comestibles du Cameroun*. IPGRI 2006. ISBN-13: 978-92-9043-707-9, ISBN-10: 92-9043-707-3, 205 p.
- Ayedoun M.A., Moudachirou M., Adeoti B.S., Menut C., Lamaty G., Bessière J-M. (1999).** Aromatic plants of Tropical West Africa.VIII.Essential oil of leaf and root bark of *Uvaria chamae* (P.Beauv) from Benin. *Journal of Essential Oil Research*, **11**: 23-26.
- Bachelot C., Blaise A., Corbel T., et Le Guernic A. (2006).** *Les Huiles Essentielles*. U.C.O Bretagne Nord, 20 p.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008).** Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, **46** : 446-475.
- Bassetti M., Righi E., Costa A., Fasce R., Molinari M.P., Rosso R., Pallavicini F.B., Viscoli C. (2006).** Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infectious Diseases*. **6**: 6-21.
- Baylac S. et Racine P. (2003).** Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oil and other natural fragrant extract. *International Journal of aromatherapy*, **13** (2): 138-142.

- Benjarano P.F. (1999).** Management of inflammatory pain with selective COX-2 inhibitors: promises and facts. *Current Review of Pain*, **3**: 432-439.
- Bernades-Genisson V., Bernadou J., Berque-Bestel I., Brion J.D., Couquelet J., Cussac M., Debaert M., Duval O., Giorgi-Renault S., Huet J., Lacroix R., Laronze J., Laronze J.Y., Le Baut G., Loiseau P., Nuhrich A., Plat M., Poisson J., Robert-Piessard S., Tournaire-Arellano C., Uriac P., Varache-Lembege M. (Eds.) (2003).** *Traité de chimie thérapeutique – Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers* Lavoisier.
- Bilan H., Jouzeau J.Y., Netter P., Jeandel C. (2000).** Les anti-inflammatoires inhibiteurs de la cyclo-oxygenase. *Revue de la Médecine interne*, **21** (11): 978-988.
- Boiron P. (2008).** http://ispb.univLyon1.fr/mycologie/Site_labo_myc/Enseignement/uv_pathologie_tropicale/mycologies_medical.htm. Consulté le 13/04/08 à 18 heures.
- Bossche H. U., Mackenzie D. W. R., Cauwenbergh C., Cutsem J. V., Drouhet E., Dupont B., (1990).** *Mycoses in aids patients*. New-York : Plenum Press, pp.27-53.
- Botsoglou N.A., Govaris A., Botsoglou N.E., Grigoropoulou S.H and Papageorgiou G. (2003).** Antioxidant dietary organ essential oil and α -tocopherol acetate supplementation in long term frozen stored Turkey meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51** (10): 2930-2936.
- Bourgeois A. (1999).** Les MST/SIDA au Cameroun. Diagnostic et traitement. In Biodiagnostic and Therapy Knowledge for Health. *Magazine Bilingue de Santé Publique au Cameroun*, **4** : 38 p.
- Bourguerra R., Essai O., Sebaï N.L., Salem B., Amari H., Kammoun M. R., Chaker E., Zidi B., Slama B.C. (2004).** Prévalence et aspects cliniques des mycoses superficielles chez les le diabétique en milieu hospitalier en Tunisie. *Médecines des maladies infectieuses*, **34** : 201-205.
- Boyom F.F. (2004).** *Huiles essentielles d'annonacées camerounaises: Analyses chimiques, Activités antioxydantes et Antiplasmodiales*. Thèse de Doctorat d'Etat en Biochimie, Université de Yaoundé I, Cameroun. 194 p.
- Boyom F.F., Amvam Zollo P.H., Agnanié H., Menut C., Bessière J.M. (2005).** Aromatic plants of tropical central Africa. XL. Essential oils from *Uvariadendrom calaphyllum* R.E. Fries growing in Cameroon. *Journal of Essential oils Research*, **17**:128-129.
- Boyom F.F., Ngouana V., Amvam-Zollo P.H., Menut C., Bessiere J.M, Gut J., Rosenthal P.J. (2003).** Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from Cameroonian medicinal plants. *Phytochemistry*, **64**: 1269-1275.

- Boyom F.F., Tsouh F.P.V., Tchokouaha Y.L.R., Ngoutane M.A., Madiesse E. K., Wilfred Fon Mbacham W.F., Tsamo E., Amvam Zollo P.H., Gut J., Rosenthal P.J. (2011).** Potent antiplasmodial extracts from Cameroonian *Annonaceae*. *Journal of Ethnopharmacology*, **134**:717-724.
- Braga F.C., Wagner H., Lombardi J.A., Braga D.O.A. (2000).** Screening brazilian plant species for in vitro inhibition of 5-lipoxygenase. *Phytomedicine*, **6** (6): 447 - 452.
- Braga M. E.M., Ehlert P.A.D., Ming L.C., Meieles M.A.A. (2005).** Super critical fluid extraction from *lippia alba*: global yields, kinetic data and extract chemical composition. *Journal of supercritical fluids*, **34**: 149-156.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995).** Use of free radical method to evaluate antioxydant activity. *Lebensm-Wiss. U.-technology*, **28**: 25-30.
- Bruneton J. (1987).** Eléments de phytobiochimie et de Pharmacognosie *Technique de documentation*, Lavoisier, Paris, 3-585.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} édition. *Technique de documentation*. Lavoisier, Paris, France, 1120 p.
- Burabai W., Amula E., Daworiye P., Suowari T. and Nimame, P. (2009).** Proximate composition and some technological properties of African Nutmeg (*Monodora myristica*) seeds. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **8** (5): 396-402.
- Burkill, H. M. (1985).** The Useful plants of West Tropical Africa. 2nd edition. Vol. 1, Families A-D-Royal Botanic Garden Kew, Richmond, United Kingdom. 960 p.
- Byrnes III E.J., Bartlett K.H., Perfect J.R., Heitman J. (2011).** *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes and Infection*, **13**(11): 895–907.
- Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., Pinong G., Vague R., (1987).** Bactériologie médicale, technique usuelle. *Edition SIMPEP, Paris*, 330 p.
- Carriere M. (2000).** Flore de Guinée : Appellations vernaculaires et usages traditionnels de quelques plantes. 130 p.
- Cha J.-D. and Kim Ji.-Y. (2012).** Essential oil from *Cryptomeria japonica* induces apoptosis in human oral epidermoid carcinoma cells via mitochondrial stress et activation of caspases. *Molecules*, **17**: 3890-3901.
- Chabasse D., Bouchara J.P., De gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P. (2002).** *Les moisissures d'intérêt médicales*. Laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU d'Anger, **25**: 157 p.

- Chabasse D., Bouchara J.P., De gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P. (2004).** Les Dermatophytes. *Laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU d'Anger*, 31 :143 p.
- Chabasse D., Robert R., Marot A., Pihet M. (2006).** *Candida pathogène*. Monographies de microbiologie, Lavoisier, Paris, 196 p.
- Chen S., Sorrel T., Nimmo G., Speed B, Curie B., Ellis D. (2000).** Epidemiology and host and variety dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zeland. *Clinical Infectious Diseases*. **31**: 499-508.
- Chen M., Pan W.H ., Teun B. (2013).***Cryptococcus gattii* infections in China: extent of the problem? *Chinese Medical Journal*, **126**(2): 203-205.
- Choumessi A.T., Danel M., Chassaing S., Truchet I, Penlap V.P., Pieme A.C., Tazoacha AT., Ducommun B., Valette A. (2012).** Characterization of the antiproliferative activity of *Xylopiya aethiopica*. *Cell Division*, **7**:1-8.
- Cohen J. (1993).** Apoptosis. *Immunology Today*, **14** (3) :126-130.
- Constantin E., 1996.**Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec & Doc, Paris.p : 1-14.
- Craveiro, A.A., Matos, F.T.A, Alencar, J.W. (1989).** Microwave oven extraction of essential oil, *Flavour and Fragrance Journal*, 4: 43-44.
- Cuvelier M.E. et Martel P. (2002).** *Additifs antioxygènes*. Dans : *Multon J.L. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires*. Edition Technique et Documentation. Lavoisier, Paris, pp .207- 231.
- Cuvellier M.E. (1997).** Molécules antioxydantes, relation structure-activité. *Rivista Italiana EPPOS, numéro spécial*, pp. 201-211.
- Dannaoui E. (2007).** *Principaux antifongiques systémiques. Mécanismes d'actions et resistance, spectre, indications*. Centre National de Référence de la Mycologie et antifongiques, Institut Pasteur Paris, 38 p.
- De Billerbeck G. (2000).** *Activité fongique de l'huile essentielle de Cymbopogon nardus sur Aspergillus niger. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur*. Thèse de Doctorat, Faculté des sciences pharmaceutiques, Institut national polytechnique de Toulouse, 236 p.
- Duan X., Zhang W., Li X., Wang B. (2006).** Evaluation of antioxidant proprieties of extract and fraction obtained from a red alga, *Polysiphona urceolata*. *Food Chimstry*, **95** :37-43.

- Dulger B., Gonuz A., Aysel A. (2006).** Inhibition of clotrimazole-resistant *Candida albicans* by some endemic Sideritis species from Turkey. *Fitoterapia*, **77**: 404-405.
- Dupont B. (2002).** An epidemiological review of systemic fungal infections. *Journal de Mycologie Médicale*, **12**(4) : 163-173.
- Duschatzky1 C.B., Possetto M.L., Talarico L.B., García C.C., Michis F., Almeida N.V., Lampasona M.P., Schuff C., Damonte E.B. (2005).** Short communication: Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, **16**:247–251.
- Dzoyem J.P., Kechia F.A., Ngaba G.P., Lunga P.K., Lohoue P.J. (2012).** Prevalence of cryptococcosis among HIV-infected patients in Yaounde, Cameroon. *African Health Sciences*, **12**(2): 129-133.
- El-Kirat-Chatel S. (2010).** *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.* Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université Victor Segalen Bordeaux 2, pp.14-36.
- Enow O.G.E., Ndom P., Doh A.S. (2012).** Current cancer incidence and trends in Yaounde, Cameroon. *Oncology.Gastroenterology and Hepatology. Reports*. **1**(1):58-63.
- Etoundi E., (1982).** Les mycoses ou maladies provoquées par les champignons pathogènes au Cameroun. *Edition CEPER, Yaoundé*, 7-68.
- Eyana K.A. (2007).** *Les Anacardiaceae du Togo : Études botaniques, Écologiques et propriétés antifongiques.* Thèse de Doctorat en Pharmacie de l'Université de Reims Champagne- Ardenne et de l'Université de Lomé, 198 p
- Favier A. (2003).** Le stress oxydant intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension de mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, pp.108-115.
- Filipowicz N., Kaminski M., Kurlenda J., Asztemborska M., Ochocka J.R. (2003).** Antibacterial and antifungal activity of Juniper berry oil and selected components. *Phytotherapy Research*, **17**: 227-231.
- Franchomme P., Jollois R. Pénoël D. (1990).** Matière médicale aromatique fondamentale ; L'aromathérapie exactement, Roger Jollois, éditeur, Limoges, France. pp. 44-48
- Gargni G. et Pini G. (1992).** Caractères mycologiques et sensibilité aux antifongiques des souches de *Cryptococcus neoformans* isolées de patients atteints du SIDA ou d'autres provenances. *Journal of Mycology and Medicine* : 140-143.

- Garnero J. (1992).** *Procédés d'extraction des huiles essentielles. Actifs et additifs en cosmétologie édition technique de documentation.* Lavoisier, Paris, pp.563-592.
- Garry R.P., Chalchat J.C., Menut C., Lamaty G., Malhuret R., Chopineau J. (1997).** Correlation between chemical composition and antimicrobial activity of some African essential oils. *Journal of Essential oils Research*, **9** : 67-75.
- Gary-Bobo M., Brevet D., Benkirane-Jessel N., Raehm L, Maillard P., Garcia M., Durand J.O. (2012).** Hyaluronic acid-functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient photodynamic therapy of cancer cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **9(3):256–260.**
- George V., Gopan R., Pradeep N.S., Sethuraman M.G. (2008).** Chemical composition and antimicrobial activity of the leaf oil from *Syzygium gardneri* ThW. *Journal of Essential oils Research*, **20:72-74.**
- Ghannoum M.A. and Rice L.B. (1999).** Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**: 501-517.
- Giret S., Théron C., Gallud A., Maynadier M., Gary-Bobo M., Garcia M., Wong M.C. M., Carcel C. (2013).** A Designed 5-Fluorouracil-Based Bridged Silsesquioxane as an Autonomous Acid-Triggered Drug-Delivery System. *Chemistry European Journal.*, **19** :12806-12814.
- GLOBOCAN. (2010).** Global Burden of Cancer, *International Agency for Research on Cancer* Lyon, France, pp16.
- Gloor A. (2009).** Comparaison de méthode de deux antifongogrammes : ATB FUNGUS3® et Carte Vitek AST-YS01®. *Laboratoire de Bactériologie, Sion, Travail de diplôme*, pp.1-21.
- Guenther E. (1948).** *The essential oil.* Van nostrand Reinhold, New York, **1** : 1-228.
- Gulluce M., Sokmen M., Dafera D., Agar G., Ozkan H. Karfal N., Polission M., Sokmen A., Sahin F. (2003).** *In Vitro* antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and mentol extracts of herbal parts and cultures of *Satureja hortensis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51(14)** : 3958-3965.
- Hamoir J., Goret M., Mignon B. et Gustin P. (2001).** Actualité sur les antifongiques enregistrés en Belgique dans le cadre de traitement des dermatophytoses chez les carnivores domestiques. *Annual of Medical Veternary*, **145** : 226-232.
- Hanahan D. and Weinberg R. (2000)** The Hallmarks of Cancer. *Cell*, **100** :57-70.
- Hengartner M.O.(2000).**The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407:770-76.**

- Helen M.P.A., Vargheese T. A., Kumari J.J., Abiramy M.R., Sajina N., Sree J.S. (2012).** Phytochemical analysis and anticancer activity of essential oil from *Myristica fragrans*. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 2 (4):188-198.
- Hossein S. (1998).** Vitamin E deficiency in early HIV Infection. *Treatment update*, 10 (3): 4-5.
- Hufford C.D., Babajide O.O., James S.N. (1987).** Angoluvarin, an antimicrobial dihydrochalcone from *Uvaria angolensis*. *Journal of Organic Chemistry*, 52 (23): 5286-5288.
- Hufford C.D. and Oguntimein B.O. (1982).** New dihydrochalcones and flavanones from *Uvaria angolensis*. *Journal of Natural Products*, 45 (3): 337-342.
- Husain C., Wagener M.M., Singh N, (2001).** *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome. *Emerging Infectious Diseases*, 7: 375-38.
- Hzounda F.J.B., Jazet D.P.M., Bakarnga V.I., Ngo Mback M.N.L., Zeuko'o M.E., Fall A.D., Bassene F., Fekam B.F. (2014).** Optimized combinations of *Ocimum* essential oils inhibit growth of *Candida albicans*. *International Journal of Drug Discovery*, 6(1):198-206.
- Jazet D.P.M., Tchoumboungang F., Tchinda S.E., Manedong K. S., Amvam Zollo P.H., Menut C. (2008).** Antioxidant and anti-inflammatory potential of essential oils of some *Zanthoxylum (Rutaceae)* of Cameroon. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 2: 82-88.
- Jazet D.P.M., Tatsadjieu N.L., Tchinda S.E., Kuate J., Amvam zollo P.H., Menut C. (2008).** Antiradical potential and antifungal activities of essential oils of the leaves of *Citrus latifolia* against *Phaeoramularia angolensis*; *African Journal of Biotechnology*, 7 (22): 4045-4050.
- Jazet D.P.M., Tatsadjieu N.L., Tchoumboungang F., Sameza M.L., Ndongson D.B., Amvam zollo P.H., Menut C. (2007).** Chemical composition, antiradical and antifungal activities of essential oil of the leaves of *Cinamomum zeylanicum* Blum from Cameroun. *Natural Product Communications*, 2 (12): 1287-1290.
- Kah N. (2011).** *Dermatophyties, candidoses et autres mycoses superficielles : rôles du pharmacien d'officine*. Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Université Henri Poincaré - Nancy 1, pp.30-45.

- Kaplan M., Mutlu EA., Benson M., fields J.Z., Banan A., Keshavarwian A. (2007).** Use of the herbal preparations in the treatment of oxidant-mediated inflammatory disorders. *Complementary Therapies in Medicine*, 15 (3): 207-216.
- Karp (2010).** *Biologie cellulaire et moléculaire*. De Boeck Université.
- Keita B., Sidibe L., Figueredo G., Chalchat J.C. (2003).** Chemical composition of the essential oil of *Xylopiya aethiopia* (Dunal) A Rich from Mali. *Journal of Essential Oil Research*, 15 (4):267–269.
- Kim R., Emi M., Tanabe K. (2005).** Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage. *Oncology Reports*, 14:595-99.
- Koba K., Sanda K., Raynaud C., Guyon C., Chaumont J.P., Nicod L. (2008).** Chemical composition and *in Vitro* cytotoxic activity of *Xylopiya aethiopia* (Dun.) A. Rich. (*Annonaceae*) fruit essential oil from Togo. *Journal of Essential Oil Research*, 20:354-367.
- Koenig H. (1995).** *Guide de mycologie médicale*. Marketing. S.A., Paris, 268 p
- Koffi A.M., Kanko C., Ramiarantsoa H., Figueredo G., Chalchat J-C., Bessière J-M., Koukoua G., N'Guessan Y.T. (2004).** Dérivés phénoliques et benzéniques des huiles essentielles de trois *Uvaria* (*Annonaceae*) de Côte- d'Ivoire : *Uvaria chamae* (P.Beau), *Uvaria afzelii* (Sc.Elliot) et *Uvaria sp.* (Aké Assi). *Comptes rendu de Chimie*, 7: 997-1002.
- Kouamé, R. O., Coffi, K., Guessend, N., Seri, Y., Koukoua, G., Dosso, M., Yoa, T. N., Figueredo, G., Chalchat J-C. (2004).** Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-D'ivoire. *Comptes rendu de Chimie*, 7: 1081-1086.
- Koudou, J., Ossibi, A. W., Aklikokou, K., Gbeassor, M., Abena, A. A., Bessiere, J. M. (2007).** Chemical composition and hypotensive effects of essential oil of *Monodora myristica* (Gaertn). *Journal of Biological Science*, 7(6): 937-942.
- Kuete V., Krusche B., Youns M., Voukeng I., Fankam A.G., Tankeo S., Lacmata S., Efferth T. (2011).** Cytotoxicity of some Cameroonian spices and selected medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 134:803–812.
- Kuiate D., Etoundi O.B.C., Soukontoua Y.B., Ngondi J.L., Oben E. J. (2011).** Comparative study of the antioxidant free radical scavenging activity and human LDH oxidation inhibition of three extracts from seeds of a Cameroonian spice

- Xylopi* *parviflora* (A.Rich) Benth. (*Annonaceae*). *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, **5** (1) :18-30.
- Lamaty G., Menut C., Bessiere J.M., Amvam Zollo P.H., Boyom F.F. (1989).** The essential oil of *Xylopi* *parviflora* (A. Rich) Benth. from Cameroon. *Journal of Essential Oil Research*, **1**: 247-248.
- Lamaty G., Menut C., Bessiere J.M., Amvam Zollo P.H., Boyom F.F. (1987).** Aromatic plants of Tropical Central Africa. Volatile components of two *Annonaceae* from Cameroon: *Xylopi* *aethiopica* (Dunal) A. Richard and *Monodora myristica* (Gaertn). *Flavour and Fragrance Journal*, **2** : 91-94.
- Lamoureux Y. (2003).** *La revue des annis du jardin botanique de montréal*, **17** (3): 30-33.
- Lau C.B.S., Ho C.Y., Kim C.F., Leung K.N., Fung K.P., Tse T.F., Chan H.H.L., Chow M.S.S. (2004).** Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis. *Life Sciences*, **75**:797–808.
- Le Borgne M., Duflos M., Le Baut, Nicholls P.J., Hartmann R.W. (2000).** Dérivés indoliques à activités anti-inflammatoire ou antitumorale, *Annuaire de Pharmacopée Française*. Masson, Paris France. **58**: 316 – 320.
- Le Thomas A. (1969).** *Flore du Gabon, Muséum National d'histoire naturelle ; Laboratoire de Phanérogamie*, Paris, **16**: 22-343.
- Lebœuf M., Cave A., Bhaumik B.K., Muker R. (1982).** The Phytochemistry of the *Annonaceae*, *Phytochemistry*, **21**: 2783-2793.
- Lechat, P. (2006).** Pharmacologie - DCEM1. In *Faculté de médecine Pierre et Marie Curie: Paris-VI*.
- Leers M.P., Kolgen W., Bjorklund V., Bergman T., Tribbick G., Persson B., Bjorklund P., Ramaekers FC., Bjorklund B., Nap M., Jornvall H., Schutte B. (1999).** Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *Journal of Pathology*, **187**: 567-572.
- Leroy O., Gangneux J.P., Montravers P., Mira J.P., Guoin F., Sollet J.P., Carlet J., Reynes J., Rosenheim M., Regnier B., Lortholary O. (2009).** Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Critical Care Medicine*, **37**:1612-1618.
- Leyral G., Vierling E., (2001).** Microbiologie et toxicologie des aliments: Hygiène et sécurité alimentaire. 3^{ème} édition, Paris, Doin Bordeaux : CRDP d'aquitaine, 280 p.

- Lin C.T., Chen C.J., Lin T.Y., Tung J.C., Wang S.Y. (2008).** Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* (Hayata). *Bioresource Technology*, **99**: 8783–8787.
- Lohoué J.P., Angwafo III F.F., Kechia F.A., Noukeu N.D. (2005).** Candiduria in HIV Infected Patients in Yaoundé, Cameroon. *African Journal of Urology*, **11**(1): 61-65.
- Lohoué J.P., Lando J., Kaptue A., Tchinda L.V., Folefack M. (2004).** Superficial mycoses and HIV infection in Yaounde. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **18**: 301–304.
- Longevialle P. (1981).** Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson, Paris. pp.32-35.
- Mailhebiau P. (1994).** La nouvelle aromathérapie : biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs ; Lausanne, 635 P.
- Marcotte J., Ouimet R., Landry G. (2008).** *Les nouvelles connaissances usuelles : le cancer*. 2^{ième} édition. SISCA, 40 p.
- Maruyama J., Juvvadi P.R., Ishi K., Kitamoto K. (2005).** Three-dimensional image analysis of plugging at the septal pore by Woronin body during hypotonic shock inducing hyphal tip bursting in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochemical and Biophysical Responses Communication*, **331**(4): 1081-1088.
- Maxwell-Hudson, C. (1995).** *Le bien-être par les huiles essentielles*. Edition Hachette, 112p.
- Mbassi D.B., Ndom P., Eloundou A., Um G, Enow O.G., Anderson D.A., Huo D. (2010).** Characterization of Lung Cancer: A 10-Year Experience from a Tertiary Hospital in Yaounde, Cameroon. *North American Journal of Medicine and Science*, **3**(4):208-211.
- Miller J.A., Lang J.E., Ley M., Nagle R., Hsu CH., Thompson P.A., Cordova C., Waer A., Chow H.H. (2013).** Human breast tissue disposition and bioactivity of limonene in women with earlystage breast cancer. *Cancer Prevention Research*, **6**:577-584.
- Modzelewska A., Sur, S., Kumar K.S., Khan S.R. (2005).** Sesquiterpenes: Natural products that decrease cancer growth. *Current Medicinal Chemistry- Anti-cancer Agents*, **5**: 477-499.
- Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical Diphenyl picryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, **26**: 211-219.
- Monteiro L., Bastos K.X., Barbosa-Filho J.M., Filgueiras de Athayde-Filho P., Margareth de Fátima F.M. D., Sobral M.V. (2014).** Medicinal Plants and Other

Living Organisms with Antitumor Potential against Lung Cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 15 p.

- Moussard C. (2010).** *Biologie moléculaire et Biochimie des communications cellulaires*. De Boeck, Paris, Paris, pp.265-295.
- Muhammad I., Waterman P.G. (1985).** Chemistry of the *Annonaceae*, 18. Benzylated indoles and dihydrochalcones in *Uvaria angolensis* from Tanzania. *Journal of Natural Products*, 48(4): 571 p
- Naganuma M., Hirose S., Nakayama Y., Nakajima K., Someya T. (1985).** A study of the phototoxicity of lemon oil. *Archives of Dermatological Research*, 278:31-36.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, (1992).** Reference method for broth microdilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Proposed Standard Document M27-P. Vilanova, PA: NCCLS.
- Neuwinger H.D. (1996).** African ethnobotany, poison and drug. *Chemistry-pharmacology toxicology*. Edition Chapman, Germany, 435 p.
- Ngamskulrungraj P., Price J., Sorrell T., Perfect J.R., Meyer W. (2011).** *Cryptococcus gattii* Virulence Composite: Candidate Genes Revealed by Microarray Analysis of High and Less Virulent Vancouver Island Outbreak Strains. *PLoS ONE* 6(1): e16076.
- Ngono N.R.A. (1999).** *Contribution à l'étude des propriétés antifongiques et analyse photochimique de cinq plantes médicinales camerounaises*. Thèse de doctorat Université de Reims Champagne – Ardenne et de l'Université de Yaoundé I, Cameroun, 103 p.
- Nishiyama Y., Moriyasu M., Ichimaru M., Iwasa K., Kato, A., Mathengue S.G., Patrick B., Mutiso C., Juma, F.D. (2004).** Quaternary isoquinoline alkaloids from *Xylopiaparviflora*. *Phytochemistry*, 65: 939-944.
- Nobili S., Lippi D., Witort E., Donnini M., Bausi L., Mini E. and Capaccioli S. (2009).** Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, 59 (6) : 365-378.
- Noudjou F., Kouninki H., Hance T., Haubruge E., Ngamo L.S.T., Maponmestsem P.M., Ngassoum M., Malaisse F., Marlier M., Lognay G. (2007).** Composition of *Xylopiathiopica* (Dunal) A. Rich essential oils from Cameroon and identification of a minor diterpene: ent-13-epi manoyl oxide. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 11(3) :193-199.
- Noumi E. (1984).** Les plantes à épices, à condiments et à aromates du Cameroun. *Thèse de troisième cycle, Université de Yaoundé, Cameroun*. 166 p.

- Nyegue M., Nguikwie K.S., Ndoye F., Amvam Zollo P.H., Etoa F.X., Agnaniet H., Menut C. (2007).** Chemical composition, antiradical and antifungal activities of essential oil of fresh leaves of *Clerodendrum bucholzii* (Gurke) from Cameroon. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **10**:510-18.
- Odds F.C. (1998).** *Candida and candidosis*. Ed. Baillière Tindall, London, 468 p.
- OMS (2006).** *Le cancer*. Aide-mémoire. W. H. Organisation, World Health Organisation. 297 : 1-4.
- Paris R., Godon M. (1979).** *Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles*. Ed. Masson, Paris.
- Park B.J., Wannemuehler K.A., Marston B.J., Govender N., Pappas P.G., Chiller T.M. (2009).** Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, **23** : 525-530.
- Peana A.T., Moretti M.D.L., Juliano C. (1999).** Chemical composition and antimicrobial action of essential oils of *Salvia desoleana* and *Salvia sclarea*. *Planta Medica*, **65**:752-754.
- Pereira G.H., Muller P.R., Szesz M.W., Levin A.S., Melhem M.S. (2010).** Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of *non-C. albicans*, *Candida* species. *Medical Mycology*, **48**(6): 839-842.
- Peterson J.R., Mitchison T.J. (2002).** Small molecules, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chemistry and Biology*, **9**: 1275-1285.
- Pfaller M.A., Diekema D.J. (2004).** Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**: 4419-4431.
- Pibiri M.C. (2005).** *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles*. Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne. 161 p
- Pincemail J., Defraigne J.O., Meurisse M., Limet R. (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, **4** (5): 1-7.
- Piret M., Van Rijn J., Mauz A. (1997).** Differential inhibition of COX-1 and COX-2 by NSAIDs: a summary of result using various test systems. In Vane J. et Botting J. Eds. *Selective COX-2 inhibitors: Pharmacology, clinical effects and therapeutic potential* Dordrecht Kluwer Academic Press, **3**: 27-46.

- Pitarokili D., Tzakou O., Loukis A., Harvala C. (2003).** Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**:3294-3301.
- Pradeau D., Cohen Y. (1992).** L'analyse pratique du médicament, Ed.médicales internationales. pp.418-428.
- Rajendran R., Mowat E., McCulloch E., Lappin D.F., Jones B., Lang S., Majithiya J. B., Warn P., Williams C., Ramage G. (2011).** Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilm is partly associated with efflux pump activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**: 2092-2097.
- Rastogi T., Hildesheim A., Sinha R. (2004).** «Opportunities for cancer epidemiology in developing countries ». *Nature Reviews Cancer*, **4**(11): 909-917.
- Rathmell J.C and Thompson C.B. (2002).** Pathways of apoptosis in lymphocyte development,homeostasis, and disease. *Cell* **109**:97-107.
- Rebecca S., Deepa N., Ahmedin J.(2012).** Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*. 62:10-29.
- Ren Z. and Gould M.N. (1998).** Modulation of small G protein isoprenylation by anticancer monoterpenes *in situ* mammary gland epithelial cells. *Carcinogenesis*, **19**: 827–832.
- Repentigny L., Lewandowski D., Jolicoeur P. (2004).** Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clinical Microbiology Reviews*, **17**(4) :729-759.
- Rock E. (2003).** *Stress oxydant, micronutriments et santé*. INRA-CRNH, Université d'été de nutrition-Clemont-Ferrand, pp .37-42.
- Rohdich F., Kis K., Bacher A., Eisenreich W. (2001).** The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. *Elsevier Science, chemical Biology*, **5**: 535-540.
- Rousselet M.C., Vignaud J.M., Hofman P., Chatelet F.P. (2005).** *Inflammation et pathologie inflammatoire*. Copyright AFECAP, pp. 1-75.
- Ruan S.Y., Lee L.N., Jerng J.S., Yu C.J., Hsueh P.R. (2008).** *Candida glabrata* fungaemia in intensive care units. *Clinical Microbiology Infectious*, **14**:136-140.
- Ryder N., Fabre B. (1997).** Antifungal activity and mechanism of Terbinafine. *Review Chemotherapy and Pharmacotherapy*. **8**:175-187.
- Safayhi H., Mack T., Sabiaera J.J., Anazodo M.I., Subramanian L.R., Ammon H.P.T. (1992).** Bosswelic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *Journal of Pharmacology*, **26** (3):1143-1146.

- Salle J.L. (1991).** *Les huiles essentielles : Synthèse d'Aromathérapie et introduction à la Sympathicothérapie*, Edition Frison-Roche, Paris, 167 p.
- Sanglard D., Odds F.C. (2002).** Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms clinical consequences. *Infectious diseases*, **2** : 73-85.
- Sarasin L. (1994).** Les gènes humains de la réparation de l'ADN. *Médecine/Sciences*, 10 : 43-54.
- Sell C.S. (2006.)** **The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer.** 2nd edition. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 329 p.
- Sganga G. (2009).** Clinical aspects of invasive candidiasis in the surgical patient. *Drugs*, **69** (1): 29-32.
- Sganga G. (2011).** Fungal infections in immunocompromised patients. *Mycoses, Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*, **54** (4): 1-3.
- Sibanda S., Chigwada G., Poole M., Gwebu E.T., Noletto J.A., Schmidt J.M., Reac A.I., Setzer W.N. (2004).** Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacol*, **92**:107-111.
- Sircar J.C., Schwender C.F., Johnson E.A. (1983).** Soybean lipoxygenase inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Prostaglandins*, **25** (3): 393-396.
- Skoog D.A., Holler F.J. and Nieman T.A., 2003.** *Principes d'analyse instrumentale*. 1^{ère} édition, Ed. De Boeck Université, 945 p.
- Smith C.K., Moore C.A., Alahi E.N., Smart Â.T., Hotchkiss S.A. (2000).** Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **168**:189-99.
- Soro S., Ouattara D., Zirihi G.N., Kanko C., N'guessan E.K., Kone D., Kouadio J.Y., Ake S. (2010).** Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* de l'extrait de poudre et de l'huile essentielle de *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. Rich.(Annonaceae) sur *Fusarium oxysporum* sp *Radici-lycopersici* (Forl), Champignon Parasite des Cultures de Tomate. *European Journal of Scientific Research*, **39** (2) : 279-288.
- Souguir S., Chaieb I., Zohra B.C., Laarif A. (2013).** Insecticidal activities of essential oils from some cultivated aromatic plants against *Spodoptera littoralis* (Boisd). *Journal of Plant Protection Research*, **4** (53):388-391.
- Sun J. (2007).** D-Limonene: Safety and Clinical Application. *Alternative Medicine Review*, **12**: 259-264.

- Svoboda H.J.B. (1999).** *Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants : antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities.* Plant biology Department, sac auchincruive, Scotland UK.
- Szepetowski P.,Perucca-Lostanlen D.,Patrick Gaudray P.(1991).** Amplification, proto-oncogènes et cancers humains. *médecine/sciences*, 7 : 14-21.
- Szmit E., Trzonkowski P., Mysliwska J., Foester J., Mysliwski A.(2002).** *Ex vivo* apoptotic potential of peripheral blood mononuclear cells of the elderly human subject. *Cell Biology International*, **26**: 517-27.
- Tabuna H. (2000).** Evaluation des échanges des produits forestiers non ligneux entre l’Afrique subsaharienne et l’Europe, FAO et CARPE, Rome.
- Taggart L.M., Richardson S.E., Seah C., Hoang L., Fothergill A., Zhang S.X. (2011).** Rapid Identification of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans*, and *C. gattii* by Use of Rapid Biochemical Tests, Differential Media, and DNA Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**(7): 2522-2527.
- Tatsadjieu L.N., Essia N. J.J., Ngassoum M.B., Etoa F-X. (2003).** Antibacterial and antifungal activity of *Xylopi aethiopica* , *Monodora myristica* , *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leperieurii* from Cameroon. *Fitoterapia*, **74**: 469-472.
- Tortorano A.M., Peman J., Bernhardt H., Klingspor L., Kibbler C.C., Faure O., Biraghi E., Canton E., Zimmermann K., Seaton S., Grillot R. (2004).** Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **23**(4): 317-322.
- Tranchant J. (1995).** *Manuel pratique de chromathographie en phase gazeuse.* Ed. Masson. Paris.
- Troupin G. (1982).** Flore des plantes ligneuses du Rwanda. *Musée Royal de l’Afrique Centrale, Tervuren (Belgique)*, 107 p.
- Vane J.R., Botting R.M. (1995).** New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflammation Research*, 44: 1-10.
- Vaya J., Aviram M. (2001).** Nutritional antioxidant: mechanism of action, analyses of activities and medical application. *Current Medicinal Chemistry – Immunology, Endocrine and Metabolic Agents*, **1**: 99-117.

- Vila R., Mundina M., Tomi F., FurSan R., Zacchino S., Casanova J., Canigüreal S. (2002).** Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. *Planta Medica*, **68**: 164-167.
- Vivien J., Faure J.J. (1995).** *Fruitiers sauvages d'Afrique - Espèces du Cameroun*. Editions NGUILA-KEROU, France, 416 p.
- Wagner H., Fessler B. (1986).** *In vitro* 5-Lipoxygenase Hemmung durch *Eclipta alba* extracte und das Coumestanderivate Werdolacton. *Planta Medica*, **52**: 374-377.
- Walker A., Sillams (1961).** *Les plantes utiles du Gabon*, Paris, 16 p.
- Wallace R.S., Meyer W., Wanke B., Costa S.P.S.E., Trilles L., Nascimento J.L.M., Medeiros R., Morales B.P., Bezerra C.C.F., Macêdo R.C.L., Ferreira S.O., Barbosa G.G., Perez M.A., Nishikawa M.M., Lazéra M.d.S. (2008).** Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **103**(8): 813-818.
- Wei F.X., Li M.Y., Li H.Z. (2008).** Apoptosis and activity changes of telomerase induced by essential oil from pine needles in HepG2 cell line. *Zhong Yao Cai*, **31**(8): 1197-1200.
- Wildiers H., Stordeur S., Vlayen J., Scholten R., Wetering F.V., Bourgain C., Carly B., Marie-Rose Christiaens M-R., Cocquyt V., Lifrange E., Schobbens J-C., Goethem M.V., Villeirs G., Limbergen E.V., Neven P. (2013).** *Cancer du sein chez la femme : diagnostic, prise en charge et suivi –synthèse*. KCE REPORT 143Bs – 3^{ième} EDITION, 36 p.
- Winter J.S., Drew R.H., Perfect J.R. (2009).** Posaconazole's impact on prophylaxis and treatment of invasive fungal infections: an update. *Expert Reviews of Antimicrobial infectious Therapy*. **7**(2), 165-181.
- WHO (2013).** *Cancer Fact Sheet No. 297*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Woguem V., Fogang H.P.D., Maggi F., Tapondjou L.A., Womeni H.M., Quassinti L., Bramucci M., Vitali L.A., Petrelli D., Lupidi G., Papa F., Vittori S., Barboni L. (2014).** Volatile oil from striped African pepper (*Xylopiya parviflora*, *Annonaceae*) possesses notable chemopreventive, anti-inflammatory and antimicrobial potential, *Food Chemistry*, **149** : 183–189.
- Yildirim A., Oktay M., Bilaloglu V. (2001).** The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris* Turk. *Journal of Medicinal Science*, **31**: 23-27.
- Yokota J. (2000).** Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* **21**(3), 497-503.

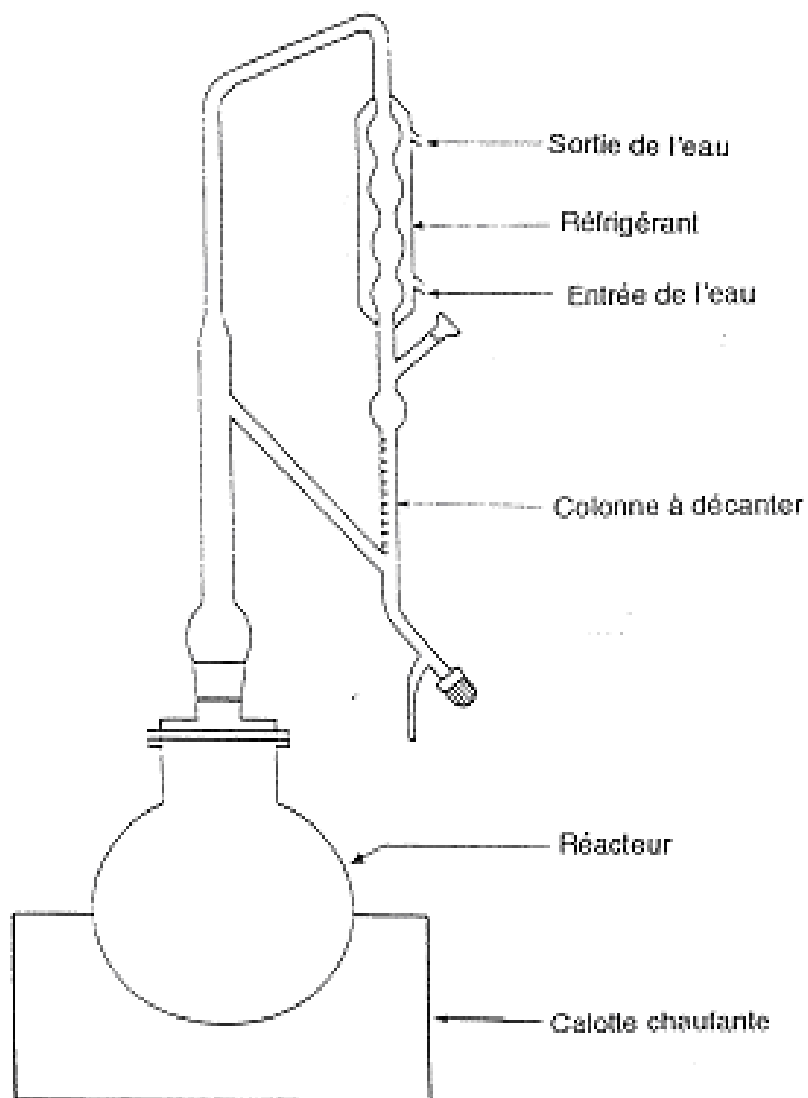
Yongabi K.A., Mbacham W.F., Nubia S.K.K., Singh R.M. (2009). Yeast strains isolated from HIV-seropositive patients in Cameroon and their sensitivity to extracts of eight medicinal plants. *African Journal of Microbiology Research*, **3**(4) 133-136.



ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1: Appareillage de type Clevenger



Annexe 2 : Composition des milieux de cultures utilisés

Bouillon nutritif de Sabouraud.

Peptone mycologique	13g
Glucose	20g
Rouge phénol	0,024%
Chloramphénicol	0,5g
Eau distillée qsp	1 litre
PH final	7,2

Sabouraud Dextrose Agar

Néopeptone difco	10g
Glucose	20g
Agar	20g
Eau distillée	Qsp 1000ml
pH	5-5,6

DMEMF-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) F12 supplémenté

Sérum bovin fœtal inactivé (SBF) à 10%

Glutamine (2mM),

Rouge phénol

Gentamycine (50 µg/mL).

Atmosphère humide, à 5% CO₂ à 37⁰ C

Annexe 3 : les résultats bruts

Tableau 1: Pourcentage de piégeage du radical libre par le BHT

Conc (g/l)	% SC Essai 1	% SC Essai2	Moyenne (%)	Ecart-type
0,000	0,00	0,00	0,00	0,00
0,002	21,24	19,48	20,36	1,24
0,003	26,07	27,16	26,62	0,77
0,005	42,38	40,55	41,46	0,38
0,01	64,79	64,25	64,52	0,38
0,02	90,50	86,77	88,64	2,64
0,03	97,69	96,77	97,23	0,65
0,05	100	100	100	0,00

Tableau 2: Moyenne du pourcentage de piégeage du DPPH de deux essais à chaque concentration en huile essentielle de *Xylopiya aethiopica* du Tchad

Conc (g/l)	%SC Essai 1	%SC Essai 2	Moyenne	Ecart type
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,00	29,51	25,3	27,405	2,97
10,00	50,38	54,1	52,24	2,63
15,00	80,45	82,15	81,3	1,20
SC₅₀	9,96	9,31	9,63	0,45

Tableau 3 : Moyenne du pourcentage de piégeage du DPPH de deux essais à chaque concentration en huile essentielle de *Xylopiya aethiopica* du Cameroun

Conc (g/l)	%SC Essai 1	%SC Essai 2	Moyenne	Ecart type
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,00	18,5	17,05	17,77	1,02
10,00	53,03	55	54,01	1,39
15,00	93,13	90,2	91,66	2,07
SC₅₀	9,56	9,36	9,46	0,14

Tableau 4 : Moyenne du pourcentage de piégeage du DPPH de deux essais à chaque concentration en huile essentielle de *Xylopi*a *parviflora* du Tchad

Conc (g/l)	%SC Essai 1	%SC Essai 2	Moyenne	Ecart type
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,00	28,8	32,74	30,77	2,78
10,00	57,02	54,35	55,68	1,88
15,00	75,58	73,2	74,39	1,68
SC₅₀	8,79	9,02	8,90	0,16

Tableau 5: Moyenne du pourcentage de piégeage du DPPH de deux essais à chaque concentration en huile essentielle de *Xylopi*a *parviflora* du Cameroun

Conc (g/l)	%SC Essai 1	%SC Essai 2	Moyenne	Ecart type
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,00	24,00	24,47	24,235	0,33
10,00	55,00	49,32	52,16	4,01
15,00	64,16	68,2	66,18	2,85
SC₅₀	9,21	10,19	9,70	0,69

Tableau 6: Moyenne du pourcentage de piégeage du DPPH de deux essais à chaque concentration en huile essentielle de *Monodora myristica* du Tchad

Conc (g/l)	%SC Essai 1	%SC Essai 2	Moyenne	Ecart type
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,00	25,56	23,00	24,28	1,81
10,00	43,51	46,32	44,91	1,98
15,00	58,43	60,5	59,46	1,46
SC₅₀	12,17	11,32	11,74	0,60

Tableau 7: Moyenne du pourcentage de piégeage du DPPH de deux essais à chaque concentration en huile essentielle de *Monodora myristica* du Cameroun

Conc (g/l)	%SC Essai 1	%SC Essai 2	Moyenne	Ecart type
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,00	32,76	30,1	31,43	1,88
10,00	52,16	48,32	50,24	2,71
15,00	55,65	57	56,32	0,95
SC₅₀	9,44	11,00	10,22	1,10

Tableau 8 : Moyenne du pourcentage de piégeage du DPPH de deux essais à chaque concentration en huile essentielle de *Uvaria angolensis* du Cameroun

Conc (g/l)	%SC Essai 1	%SC Essai 2	Moyenne	Ecart type
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,00	24,45	26,8	25,62	1,66
7,50	49,5	50,36	49,93	0,60
10,00	54,7	56,4	55,55	1,20
15,00	80,16	81,12	80,64	0,67
SC₅₀	7,92	7,47	7,69	0,31

Tableau 9: Moyennes du pourcentage d'inhibition de la 5-lipoxygenase par le NDGA à différentes concentrations.

Conc(µg/mL)	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moy (% CI)	Ecart type
0,00	0,00	0,00	0,00	0 ,00	0,00
0,195	11,96	19,14	4,28	11,79	7,43
0,39	34,14	49,27	34,14	39,18	8,73
0,78	71,24	66,95	65,16	67,78	3,12

Tableau 10: Pourcentages de survie des cellules en fonction de la concentration en huile essentielle de *Xylopi*a *parviflora* du Tchad

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Survie des cellules (%)	
	MCF-7	ARPE-19
Contrôle: Ethanol (20)	100 \pm 11	100 \pm 6
100	87 \pm 15	83 \pm 1
200	19 \pm 16	82 \pm 4
400	1 \pm 0,03	69 \pm 1
2000	2 \pm 0	1 \pm 0

Tableau 11: Pourcentages de survie des cellules en fonction de la concentration en huile essentielle de *Xylopi*a *parviflora* du Cameroun

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Survie des cellules (%)	
	MCF-7	ARPE-19
Contrôle: Ethanol (20)	100 \pm 17	100 \pm 2
100	58 \pm 5	85 \pm 7
200	44 \pm 1	85 \pm 4
400	1 \pm 0	70 \pm 2
2000	3 \pm 1	0 \pm 0

Tableau 12: Pourcentages de survie des cellules en fonction de la concentration en huile essentielle de *Xylopi*a *aethiopica* du Tchad

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Survie des cellules (%)	
	MCF-7	ARPE-19
Contrôle: Ethanol (20)	100 \pm 8	100 \pm 21
100	96 \pm 3	96 \pm 7
200	102 \pm 6	94 \pm 5
400	19 \pm 9	100 \pm 15
2000	12 \pm 4	0 \pm 0

Tableau 13: Pourcentages de survie des cellules en fonction de la concentration en huile essentielle de *Xylopiya aethiopica* du Cameroun

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Survie des cellules (%)	
	MCF-7	ARPE-19
Contrôle: Ethanol (20)	100 \pm 6	100 \pm 5
100	95 \pm 6	86 \pm 6
200	84 \pm 5	86 \pm 5
400	56 \pm 3	65 \pm 5
2000	1 \pm 0	0 \pm 0

Tableau 14: Pourcentages de survie des cellules en fonction de la concentration en huile essentielle de *Monodora myristica* du Tchad

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Survie des cellules (%)	
	MCF-7	ARPE-19
Contrôle : Ethanol (20)	100 \pm 5	100 \pm 11
100	91 \pm 8	90 \pm 3
200	71 \pm 6	88 \pm 3
400	27 \pm 7	77 \pm 4
2000	3 \pm 0	0 \pm 0

Tableau 15: Pourcentages de survie des cellules en fonction de la concentration en huile essentielle de *Monodora myristica* du Cameroun

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Survie des cellules (%)	
	MCF-7	ARPE-19
Contrôle : Ethanol (20)	100 \pm 9	100 \pm 3
100	86 \pm 7	96 \pm 5
200	72 \pm 8	96 \pm 2
400	5 \pm 0	94 \pm 9
2000	1 \pm 0	0 \pm 0

Tableau 16 : Pourcentages de survie des cellules en fonction de la concentration en huile essentielle de *Uvaria angolensis*

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Survie des cellules (%)	
	MCF-7	ARPE-19
Contrôle : Ethanol (20)	100 \pm 4	100 \pm 4
100	50 \pm 9	70 \pm 5
200	1 \pm 0	63 \pm 4
400	1 \pm 0	59 \pm 3
2000	4 \pm 1	3 \pm 1

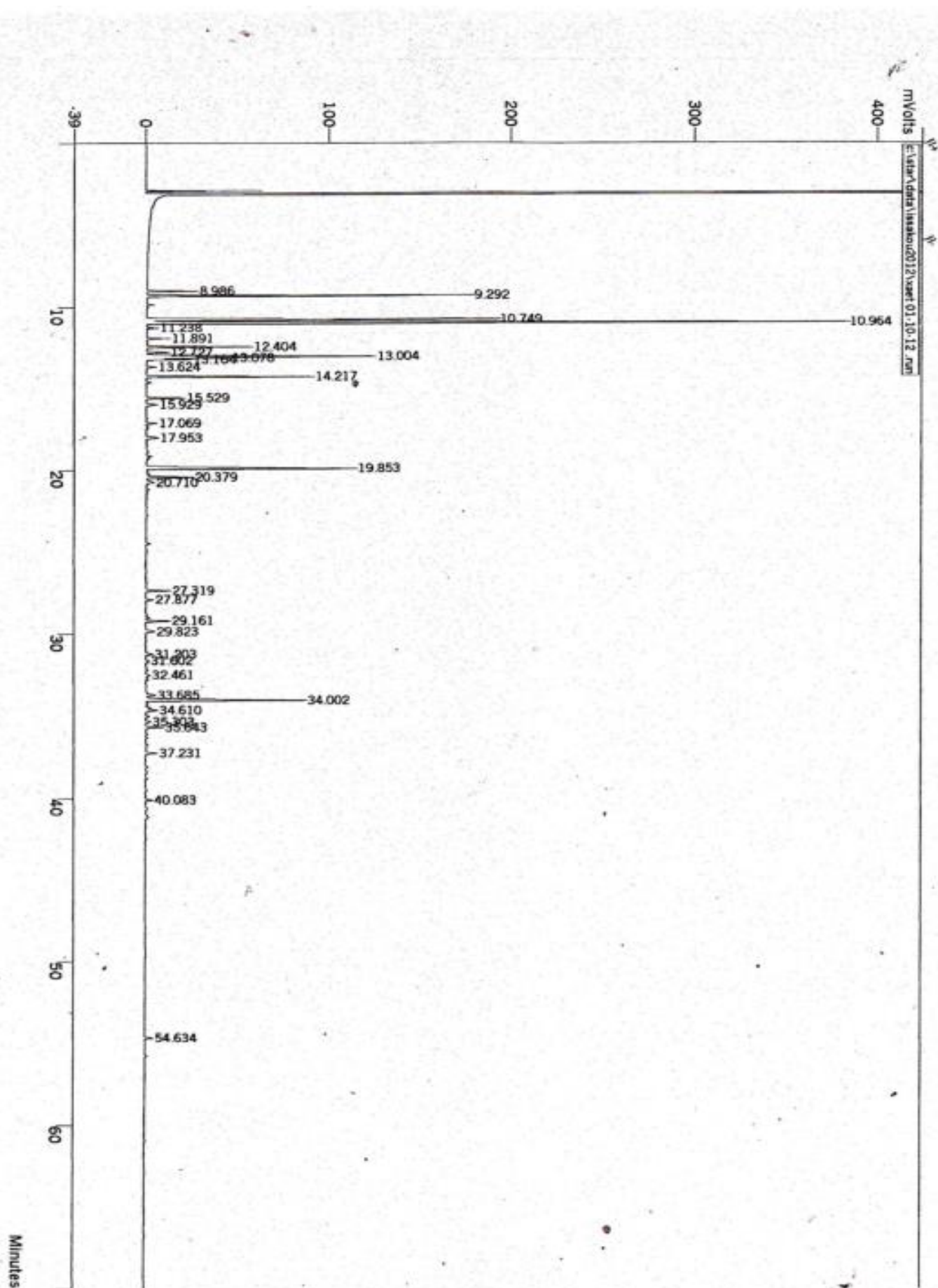
Tableau 17 : Cycle cellulaire des cellules (MCF-7)

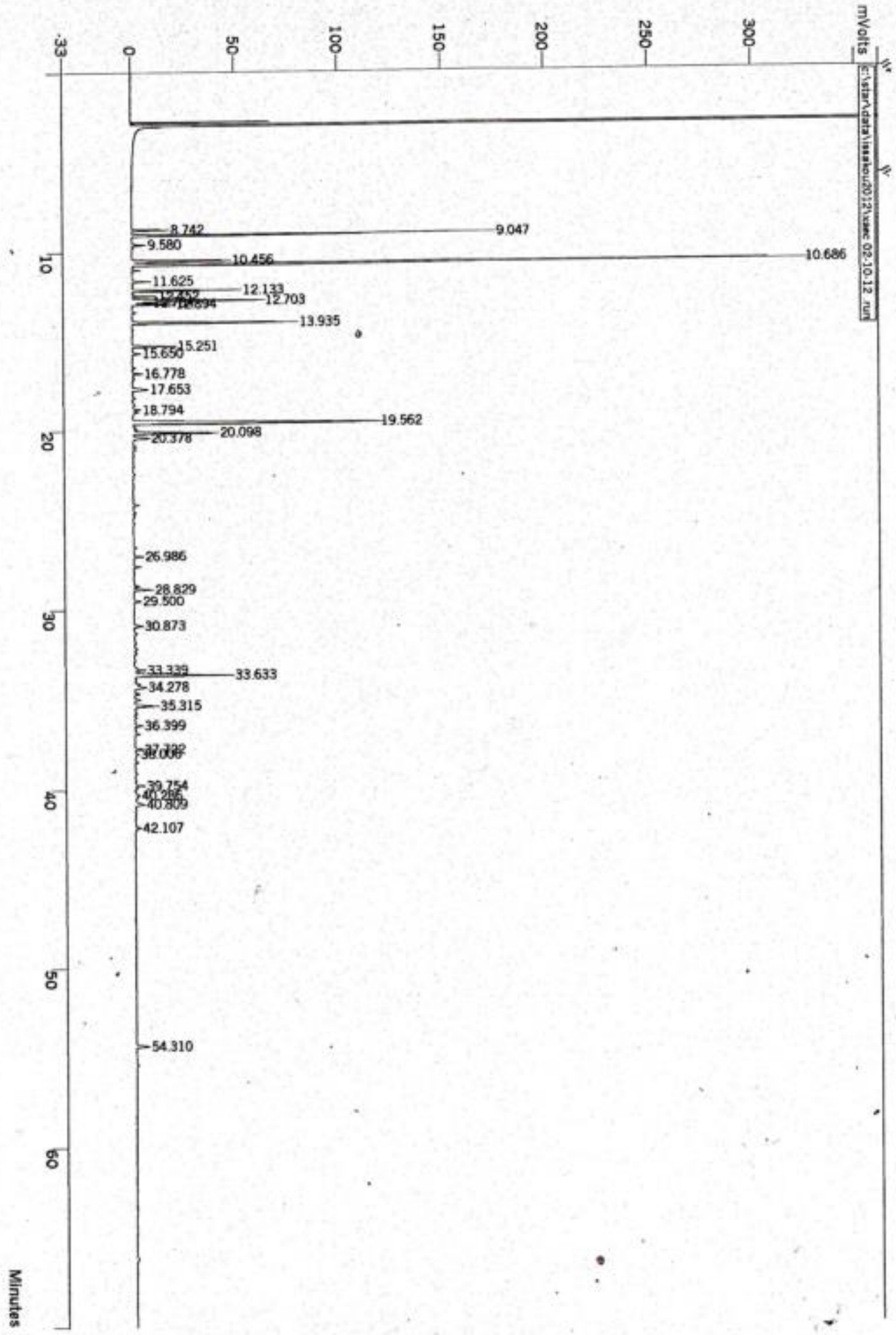
MCF-7 (%)	sub G1	G0/G1	S	G2/M
Témoin	1	58	22	19
XAt	4	60	13	23
MMt	2	67	10	21
XPc	2	67	16	15
UA	4	68	10	18

Tableau 18: Cycle cellulaire des cellules (ARPE-19)

ARPE-19 (%)	sub G1	G0/G1	S	G2/M
Témoin	1	68	5	26
XAt	0	56	11	33
MMt	0	59	10	30
XPc	1	52	18	30
UA	1	65	4	30

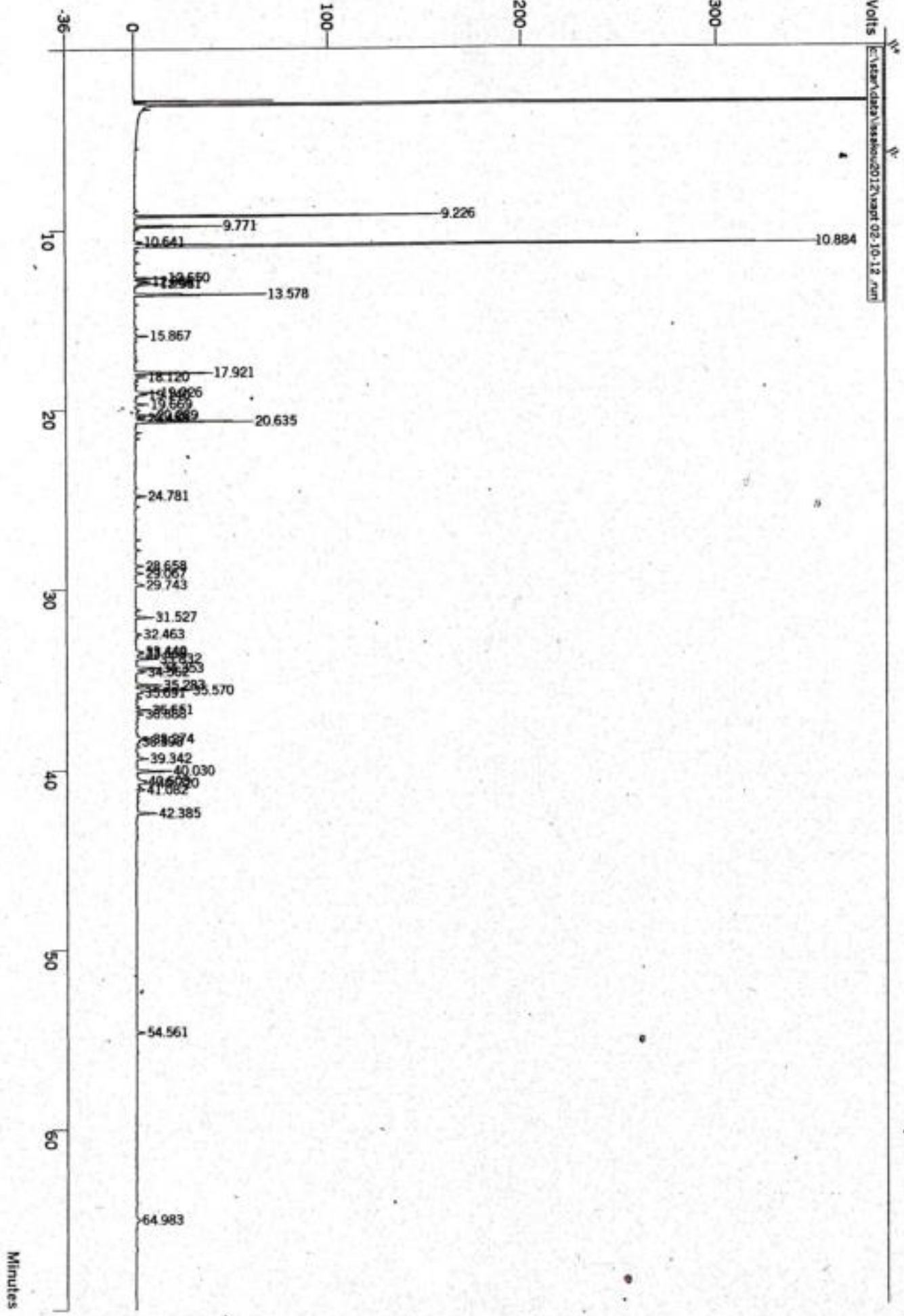
Annexe 4: Les chromatogrammes



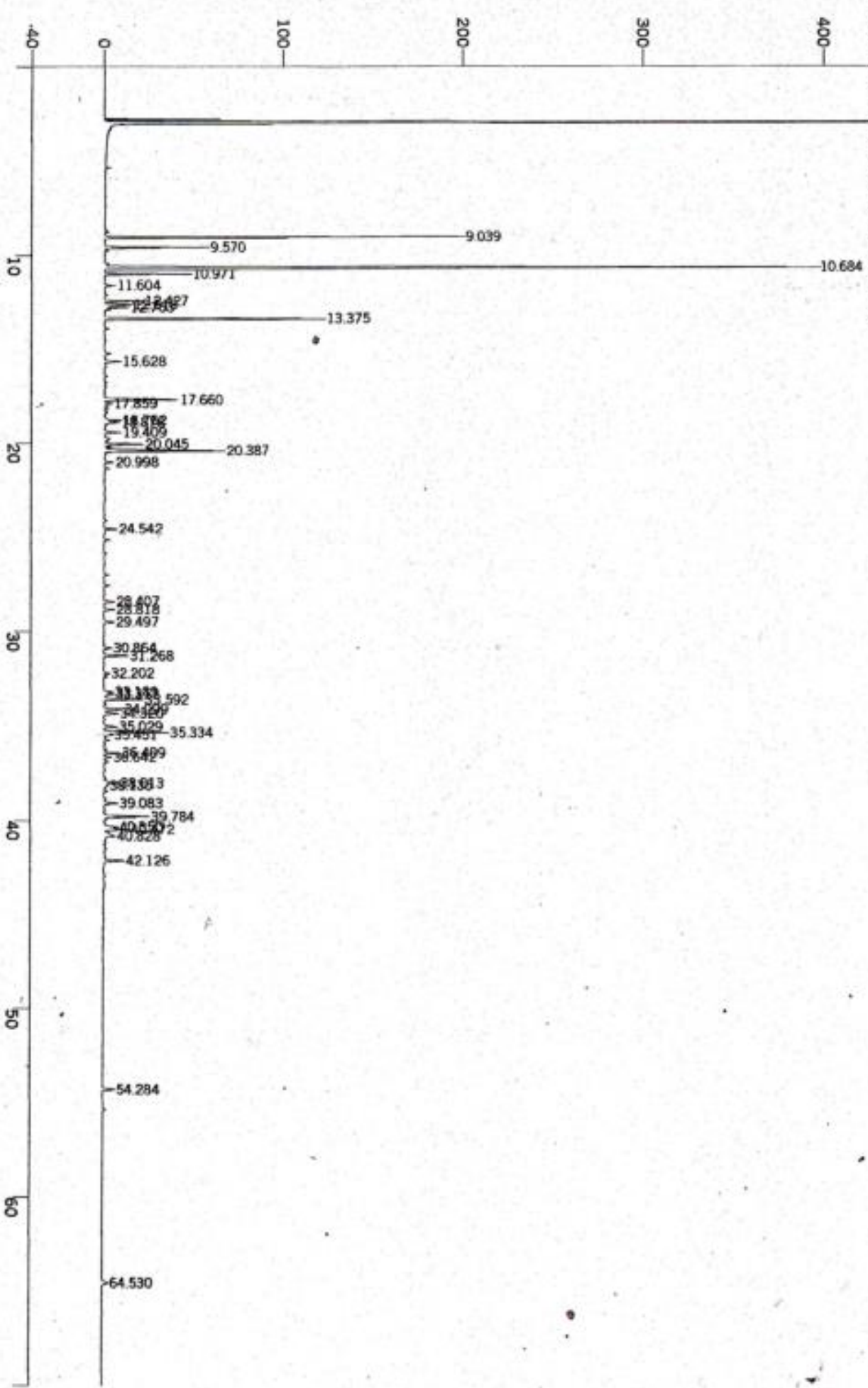


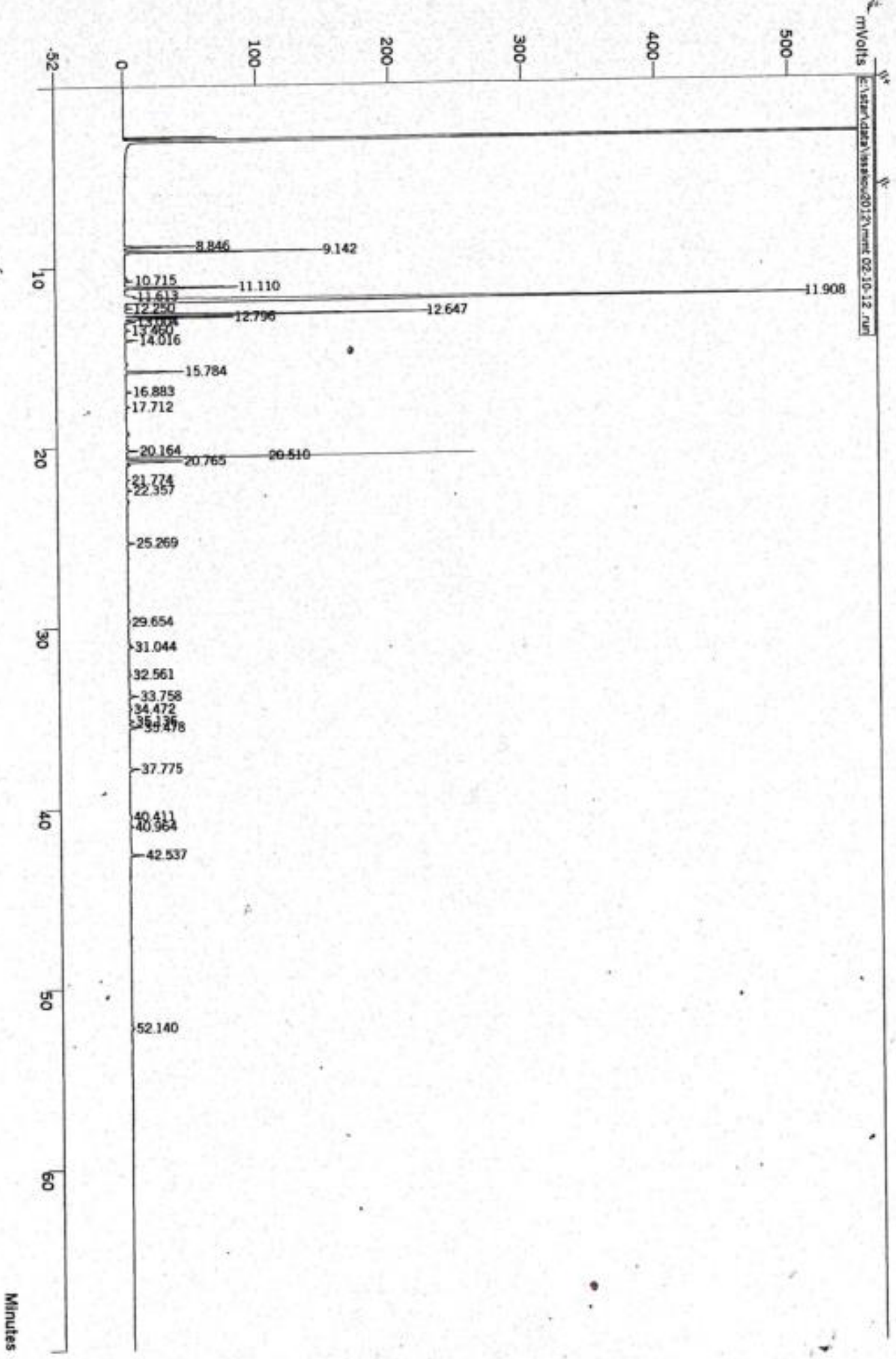
mVolts
 C:\star\data\issahouj0212\data\02_10_12_run

Minutes



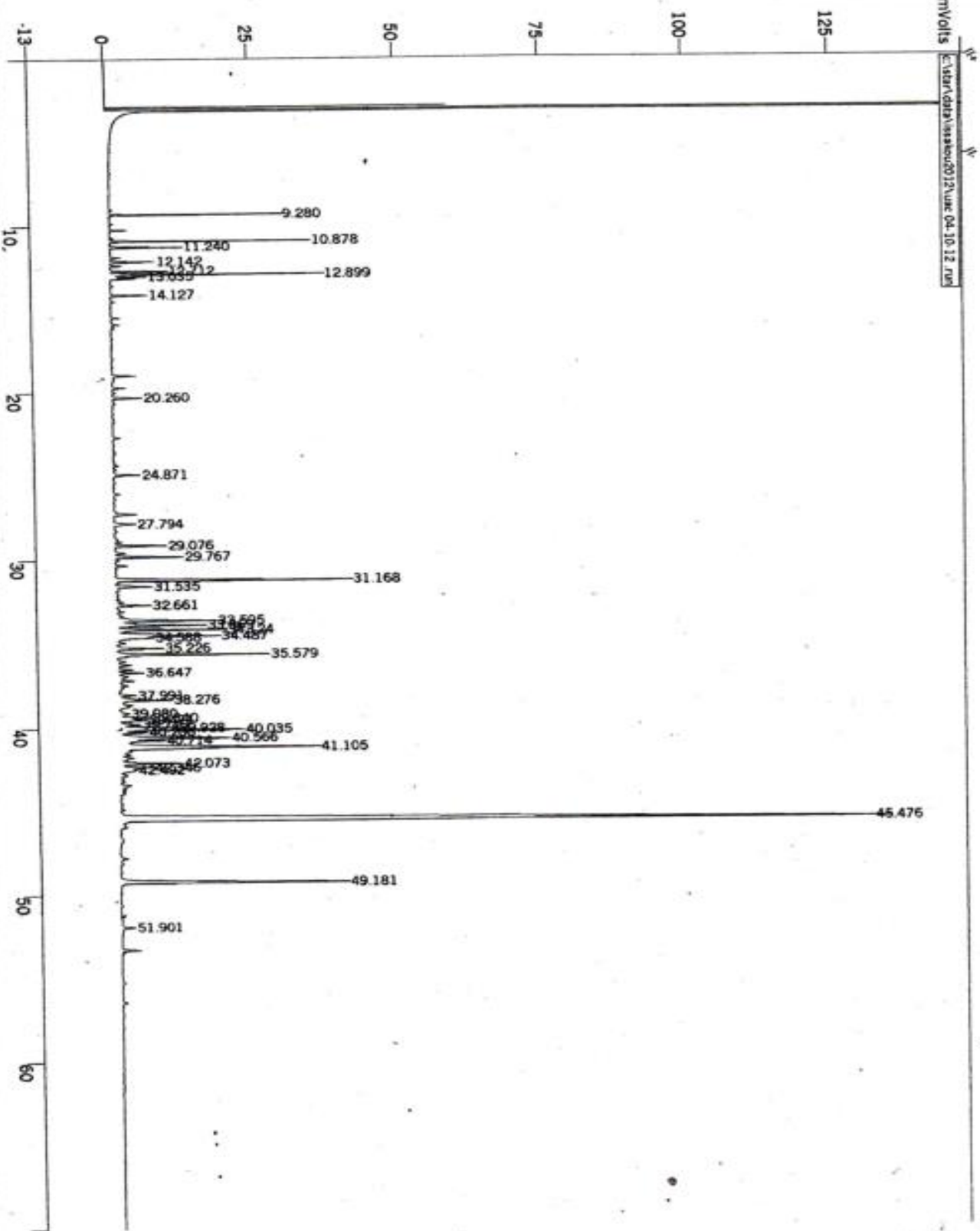
mVolts
C:\msd\data\11111111\2012\11\02 02:10:12 run

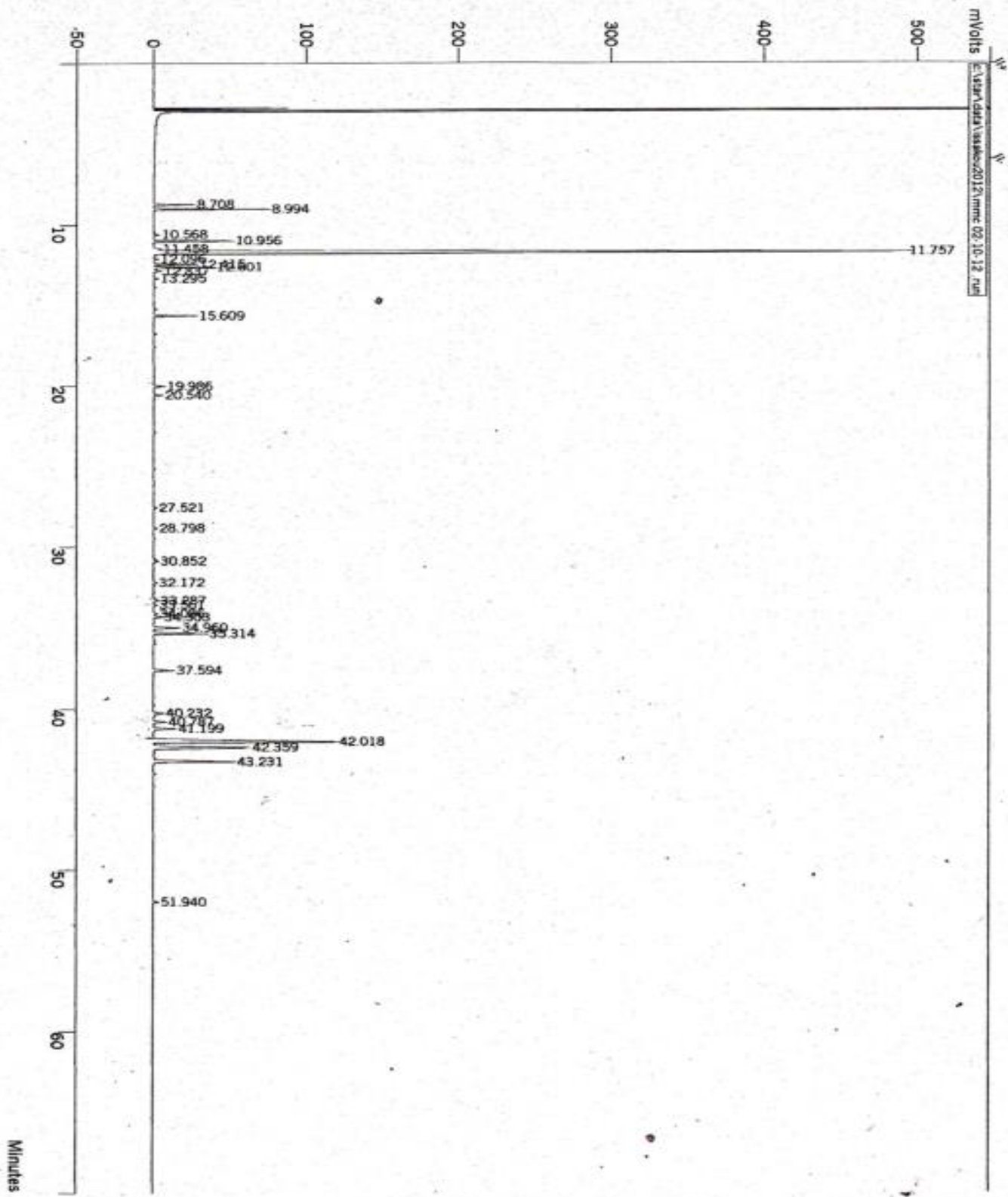




mVolts
 C:\stn\data\11556\0012\1min02_10_12.run

Minutes





Legendes: xaet = *Xylopi aethiopica* (Tchad) ; xaec = *Xylopi aethiopica* (Cameroun) ; xapt = *Xylopi parviflora* (Tchad) ; xpc = *Xylopi parviflora* (Cameroun); mmt = *Monodora myristica* (Tchad); mmc = *Monodora myristica* (Cameroun) ; uac: = *Uvaria angolensis* (Cameroun).



PUBLICATION

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich, *Xylopia parviflora* (A. Rich) Benth.) and *Monodora myristica* (Gaertn) growing in Chad and Cameroon

Issakou Bakarnga-Via^{1,2,4}, Jean Baptiste Houndou¹, Patrick Valere Tsouh Fokou¹,
Lauve Rachel Yamthe Tchokouaha^{1,5}, Magali Gary-Bobo⁴, Audrey Gallud⁴, Marcel Garcia⁴, Lucain Walbadet²,
Youssef Secka², Pierre Michel Jazet Dongmo³, Fabrice Fekam Boyom^{1*} and Chantal Menut^{6*}

Abstract

Background: Cancer has become a global public health problem and the search for new control measures is urgent. Investigation of plant products such as essential oils from *Monodora myristica*, *Xylopia aethiopica* and *Xylopia parviflora* might lead to new anticancer therapy. In this study, we have investigated the antineoplastic activity of essential oils from fruits of these plants growing in Chad and Cameroon.

Methods: The essential oils obtained by hydrodistillation of fruits of *Monodora myristica*, *Xylopia aethiopica* and *Xylopia parviflora* collected in Chad and Cameroon were analyzed by GC-FID and GC-MS and investigated for their antiproliferative activity against the breast cancer cell line (MCF7).

Results: Overall, monoterpenes were mostly found in the six essential oils. Oils from *X. aethiopica* and *X. parviflora* from Chad and Cameroon mainly contain β -pinene at 24.6%, 28.2%, 35.7% and 32.9% respectively. *Monodora myristica* oils from both origins contain mainly α -phellandrene at 52.7% and 67.1% respectively. The plant origin did not significantly influence the chemical composition of oils. The six essential oils exerted cytotoxic activity against cancer (MCF-7) and normal cell lines (ARPE-19), with more pronounced effect on neoplastic cells in the majority of cases. The highest selectivity was obtained with the essential oils of *X. parviflora* from Chad and Cameroon (5.87 and 5.54) which were more cytotoxic against MCF-7 than against normal cell line (ARPE-19) with IC_{50} values of 0.155 μ L/mL and 0.166 μ L/mL respectively.

Conclusions: Essential oils from fruits of *Monodora myristica*, *Xylopia aethiopica* and *Xylopia parviflora* have shown acceptable antineoplastic potency, and might be investigated further in this regard.

Keywords: Essential oils, Cytotoxicity, MCF-7 cells, ARPE-19 cells, Monoterpene, Sesquiterpene

Background

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of cancer death among women, and is the second cause of mortality in sub-Saharan countries [1,2]. According to the GLOBOCAN 2010 estimates, the most

common cancer sites in Africa indicate that Cameroon and Chad are highly burdened by breast cancer which is the most frequent cancer in women before the cervical cancer with an incidence rate of 27.9 per 100,000 [3]. These statistics indicate that urgent strategies should be implemented to slowdown the increase of cancer incidence in Africa.

Although there are many therapeutic strategies including chemotherapy, radiation and combination therapies to treat cancer, high systemic toxicity and drug resistance limit the successful outcomes in most cases [4]. Natural products and their synthetic derivatives may be considered as a potential source of novel compounds for

* Correspondence: fabrice.boyom@fulbrightmail.org;
chantal.menut@univ-montp2.fr

¹Antimicrobial Agents Unit, Faculty of science, University of Yaoundé I, P.O.
Box 812, Yaoundé, Cameroon

⁶IBMM, UMR 5247, Equipe Glyco et nanovecteurs pour le ciblage
thérapeutique, Université de Montpellier 1, Faculté de Pharmacie, 15 Avenue
Charles Flahaut, BP 14491, 34093 Montpellier, France

Full list of author information is available at the end of the article

the treatment of numerous diseases, comprising over 60% of the approved anticancer drug candidates developed between 1981 and 2002 [5]. Particular attention has been set on the use of essential oils from tropical origin for their cytotoxic activity [6]. Essential oils have shown cytotoxic activity generally without being mutagenic in various organisms [7,8].

The biological properties of aromatic plants such as Annonaceae plants are partially attributed to their essential oils [9]. Aromatic plant such as *Xylopi aethiopia* are used as spices (fruits) all over central and western Africa, and as a component of herbal medicines for the treatment of skin infections, cough, bronchitis, dysentery, female sterility and fever [10,11]. The essential oil of *Xylopi aethiopia* stem bark was investigated by Boyom et al. [12] and showed activity against the W2 strain of *Plasmodium falciparum* in culture. *Monodora myristica* grows naturally in evergreen forests from Liberia to Nigeria and Cameroon, Angola and also Uganda and west Kenya. The fruits and seeds are dried and sold whole or ground to be used in stews, soups, cakes and desserts; they are used as stimulants, stomachic, against headaches, sores and also as insect repellent. In medicine, the bark is used in treatments of stomach-aches, febrile pains, eye diseases and haemorrhoids [13].

Monoterpenes, found in a wide variety of plants including Annonaceae, may be prominent in plant essential oils. In this chemical class, limonene was shown to prevent carcinogen-induced breast cancer at the initiation and the promotion/progression stages. This terpene also causes the complete regression of the majority of advanced rat mammary cancer when added to the diet [14]. In the context of our previous investigations on aromatic plants from tropical areas, the chemical analyses of essential oils obtained by hydrodistillation of fruits of *X. aethiopia*, *X. parviflora* and *M. myristica* collected in Cameroon showed that all of them were dominated by monoterpenes [15,16]. We therefore hypothesized that these essential oils could show potent cytotoxic activity against human breast cancer cells (MCF-7). This led us to carry out further chemical investigations on the essential oils of their fruits collected in Chad and Cameroon and to evaluate their antiproliferative activity by MTT assay.

Methods

Plant material and extraction procedure

The fruits of *Monodora myristica*, *Xylopi aethiopia*, and *Xylopi parviflora* (Annonaceae) were collected from Gore (Chad) and Kribi (Cameroon) in March 2012 following the guidelines for biodiversity exploration and preservation in both countries, filed at the National Herbarium of Yaoundé-Cameroon and at the National Center for Research of Chad, where voucher specimens were identified and deposited. Reference identification numbers for voucher specimens at the National Herbarium in Yaoundé are

27690/SFR/CAM, 28725/SFR/CAM, and 42351HNC respectively for *Monodora myristica*, *Xylopi aethiopia*, and *Xylopi parviflora*.

Essential oils were extracted by hydrodistillation using a Clevenger type apparatus. The fruits were hydrodistilled for 5 h, dried over anhydrous sodium sulfate and then preserved at 4°C free from the light until used. The yields of extraction were calculated in percentage (w/w) relative to the weight of the starting plant material.

Chemical analysis

The determination of the chemical composition of oils was achieved by gas chromatography and by gas chromatography coupled with mass spectrometry.

Gas chromatography analysis

Gas chromatography (GC) was performed on a Varian CP-3380 apparatus equipped with flame ionization detector fitted with a fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm coated with DB5, film thickness 0.25 μm); temperature program 60-220°C at 3°C/min, injector temperature 200°C, detector temperature 220°C, carrier gas N₂ 1 mL/min. 0.5 μL of essential oil diluted at 10% in dichloromethane was injected manually. The linear retention indices of the components were determined relatively to the retention times of a series of *n*-alkanes and the percentage compositions were obtained from electronic integration measurements without taking into account relative response factors.

Gas chromatography-mass spectrometry

GC/MS analyses were performed using a Hewlett-Packard GC 5890 series II equipped with a HP5 (5%-phenylmethylpolysiloxane) fused silica column (30 m × 0.25 mm; film thickness 0.25 μm) interfaced with a quadrupole detector (Model 5972) applying the same temperature program as for the GC/FID analyses; injector temperature, 220°C; MS transfer line temperature, 250°C; carrier gas, helium at a flow rate of 0.6 mL/min; injection type, split, 1:10 (1 μL 10:100 CH₂Cl₂ solution); ionization voltage, 70 eV; electron multiplier 1460 eV; scan range 35-300 amu; scan rate, 2.96 scan/s. The identification of the constituents was based on comparison of their relative retention indices with either those of authentic samples or with published data in the literature [17] and by matching their mass spectra with those obtained with authentic samples and/or the NBS75K, Wiley 7th NIST 98 EPA/NIH, and FFNSC 2 libraries spectra.

Evaluation of the cytotoxic activities of essential oils on cancer and normal cell lines

Human breast cancer (MCF-7) and normal epithelial (ARPE-19) cell lines used for cytotoxic activities were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). They were maintained in Dulbecco's

Modified Eagle Medium (DMEM) F12 (Life Technologies GIBCO, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO), glutamine, phenol red and 50 µg/mL gentamycin, in humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂.

For the cytotoxic study, cells were seeded in 96-well plates at the density of 2,000 cells/well in 200 µL of culture medium and allowed to grow for 24 h. Then serially diluted concentrations of essential oils in 10% absolute ethanol were added to the cells culture at final concentrations ranging from 0.1 to 2 µL/mL and were incubated at 37°C for 72 h. Each concentration was tested in triplicate.

The cell viability was measured by using MTT assay as previously described [18]. The assay detects the reduction of MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] by mitochondrial dehydrogenase to blue formazan product, which reflects the normal functioning of mitochondrial and cell viability [19]. After 72 h incubation of cells with essential oils, 20 µL of MTT reagent at 0.5 mg/mL was added to each well and incubated for additional 4 h. Then, the medium was removed and 150 µL EtOH/DMSO (1:1) was added to MTT precipitates in each well to solubilize the formazan crystals. The plates were read for optical density at 540 nm, using a microplate reader (Multiskan). Percent inhibition of MCF-7 and ARPE-19 cells was calculated using optical density. The value of cell cytotoxicity at 50% (IC₅₀) in the MTT assay was defined as the concentration of test oil resulting in a 50% reduction of absorbance compared with untreated cells. Selectivity indices were calculated for individual oil from the IC₅₀ values against normal (ARPE-19) and breast cancer (MCF-7) cell lines as SI = IC₅₀ARPE-19/IC₅₀MCF-7. Safer essential oils were considered as those with SI > 1.5.

Results and discussion

Yields of essential oils extraction

The hydrodistillation of fruits afforded essential oils with 3.57% and 4.68% yields for *X. aethiopica* from Chad and Cameroon respectively. These results are comparable to those previously obtained by Lamaty et al. [15]. The fruits of *X. parviflora* from Chad and Cameroon afforded essential oils with much lower yields (0.76% and 0.68% respectively), close to previous description [16]. Finally, the hydrodistillation of fruits of *M. myristica* collected in Chad and Cameroon gave essential oils with yields of 1.87% and 2.72%, respectively. These yields are lower than those already observed [15]. These yield variations could be inherent to many factors such as site and period of plant collection.

Chemical composition of the essential oils

The chemical compositions of the essential oil samples are shown in Table 1. All of them contain a majority of monoterpenes (75.0-94.2%) with nevertheless important

qualitative and quantitative variations according to the botanical species, while no significant difference was observed according to the geographical origin.

The essential oils of *X. aethiopica* from Chad and Cameroon were rich in monoterpene hydrocarbons with contents of 72.4% and 64.8% respectively. The main constituents were β-pinene (24.6-28.2%), sabinene (4.8-14.5%), β-phellandrene (5.8-10.4%) and γ-terpinene (4.9-5.7%). Oxygenated monoterpenes were significantly represented (13.3-21.6%) dominated by terpinen-4-ol (10.0-15.1%). These results corroborate those obtained by Lamaty et al. [15,16] as well as those reported more recently by Keita et al. [20] and Noudjou et al. [21]. Of note, the stem bark oil previously investigated by Boyom et al. [12] was qualitatively distinct with β-pinene (10.07%), myrtenol (6.4%), spathulenol (6.33%), and γ-ylangene (5.32%) as major constituents.

The essential oils obtained by hydrodistillation of fruits of *X. parviflora* collected in Chad and Cameroon were also dominated by pines (43.7 to 46.8), but they differ from the samples of *X. aethiopica* oils by a minor content of sabinene (3.0 to 3.2%) and β-phellandrene (0.6 to 0.7%), while (*E*)-β-cimene accounted for 5.4 to 8.0% of the volatile extracts. They were also characterized by high content of sesquiterpenes (23.1 to 23.6%), dominated by cadinene and muurolane skeletons (i. e. δ-cadinene, α- and γ-muurolenes, *trans*-muurola-4(14),5-diene, *epi*-α-cadinol, α-muurolol) representing 10.2% and 12.1% of the whole oils from Chad and Cameroon respectively. These results corroborate those obtained by Lamaty et al. [16] from essential oil of fruits of *X. parviflora* collected in the Bayagame area (Cameroon).

The essential oils obtained from fruits of *M. myristica* collected in Chad and Cameroon predominantly consisted of monoterpene hydrocarbons (87.8% and 82.3% respectively), the oxygenated derivatives representing only 6.4% and 3.4% of the whole oils. Both samples contained α-phellandrene as major compound with 52.7% and 67.1% respectively. The sample from Chad is characterized by a high content of limonene (14.9%); on the other hand the oil from Cameroon differs by more than 10% of sesquiterpenes (mainly cadinane derivatives). This result is comparable to that of Lamaty et al. [15] who found 48.8% of α-phellandrene in a sample collected in Yaoundé area (Cameroon).

Cell cytotoxicity of essential oils

The cytotoxic activity of all essential oils was evaluated on human breast cancer (MCF-7) and normal epithelial (ARPE-19) cell lines using the MTT assay based on cell viability. Cells were exposed to the oils at concentrations ranging from 0.1 to 2 µL/mL.

The cytotoxic effects of the essential oils on human normal or cancer cell lines are shown in Figure 1. The

Table 1 Relative percentages of constituents of essential oils from fruits of *X. aethiopica*, *X. parviflora* and *M. myristica*

Components	<i>X. aethiopica</i>		<i>X. parviflora</i>		<i>M. myristica</i>		Identification methods
	Chad	CMR	Chad	CMR	Chad	CMR	
Monoterpenes	85.7	86.4	75.9	75.0	94.2	88.4	
Monoterpenes hydrocarbons	72.4	64.8	58.5	60.7	87.8	82.3	
926 α -thujene	1.3	1.0	-	-	2.4	1.4	LRI, GCMS
931 α -pinene	8.3	10.8	11.1	10.8	6.7	4.2	LRI, GCMS
971 sabinene	14.5	4.8	3.2	3.0	0.3	0.1	LRI, GCMS
977 β -pinene	24.6	28.2	35.7	32.9	0.5	0.3	LRI, GCMS
985 myrcene	0.3	0.3	-	-	5.1	3.8	LRI, GCMS
1002 α -phellandrene	0.6	0.5	-	-	52.7	67.1	LRI, GCMS
1014 α -terpinene	2.8	3.4	-	-	0.2	0.1	LRI, GCMS
1022 p-cymene	0.6	0.8	1.2	2.8	tr	tr	LRI, GCMS
1028 limonene	1.7	0.4	0.3	0.5	14.9	1.8	LRI, GCMS
1029 β -phellandrene	10.4	5.8	0.6	0.7	4.2	3.0	LRI, GCMS
1030 1,8-cineole	-	-	1.0	2.0	-	-	LRI, GCMS
1032 (<i>Z</i>)- β -ocimene	1.1	1.3	tr	Tr	0.3	0.3	LRI, GCMS
1042 (<i>E</i>)- β -ocimene	0.2	1.3	5.4	8.0	0.1	0.2	LRI, GCMS
1055 γ -terpinene	4.9	5.7	-	-	0.4	tr	LRI, GCMS
1085 terpinolene	1.1	1.5	-	-	tr	tr	LRI, GCMS
Oxygenated monoterpenes	13.3	21.6	17.4	14.3	6.4	3.4	
1095 trans-sabinene hydrate	0.4	0.3	-	-	-	-	LRI, GCMS
1096 linalool	-	-	0.6	0.7	2.4	2.1	LRI, GCMS
1119 cis-p-menth-2-en-1-ol	0.3	0.3	-	-	0.2	tr	LRI, GCMS
1136 trans-p-menth-2-en-1-ol	-	-	-	-	0.1	tr	LRI, GCMS
1138 trans-pinocarveol	0.6	0.9	4.0	3.2	-	-	LRI, GCMS
1144 trans-verbenol	-	-	0.7	0.4	-	-	LRI, GCMS
1163 pinocarvone	-	-	1.2	0.7	-	-	LRI, GCMS
1166 borneol	-	-	0.6	0.6	-	-	LRI, GCMS
1178 terpinen-4-ol	10.0	15.1	0.8	0.7	-	-	LRI, GCMS
1187 p-cymen-8-ol	-	-	1.0	0.7	-	-	LRI, GCMS
1189 α -terpineol	1.6	3.6	1.4	1.7	0.5	0.6	LRI, GCMS
1193 myrtanal	-	-	6.5	5.2	-	-	LRI, GCMS
1195 mytenal	0.4	1.4	-	-	-	-	LRI, GCMS
1195 trans-thujen-3-ol	-	-	-	-	2.8	0.7	LRI, GCMS
1234 cis-thujen-3-ol	-	-	-	-	0.1	-	LRI, GCMS
1285 bornyl acetate	-	-	0.6	0.4	-	-	LRI, GCMS
1295 thymol	-	-	-	-	0.3	-	LRI, GCMS
Sesquiterpenes	12.6	11.6	23.1	23.6	3.3	11.2	
Sesquiterpene hydrocarbons	12.0	10.2	10.3	10.3	1.9	6.7	
1337 δ -elemene	0.9	0.8	tr	Tr	-	-	LRI, GCMS
1340 α -cubebene	0.2	0.4	tr	Tr	-	-	LRI, GCMS
1309 α -ylangene	0.8	0.4	0.4	0.6	-	-	LRI, GCMS
1377 α -copaene	tr	tr	0.4	0.5	-	-	LRI, GCMS
1391 β -elemene	0.4	0.5	0.6	0.4	0.1	0.1	LRI, GCMS

Table 1 Relative percentages of constituents of essential oils from fruits of *X. aethiopica*, *X. parviflora* and *M. myristica* (Continued)

1422	β -caryophyllene	0.3	tr	tr	Tr	0.2	0.3	LRI, GCMS
1435	β -copaene	-	-	1.4	1.1	-	-	
1450	θ -humulene	0.2	0.8	-	-	0.1	0.3	LRI, GCMS
1478	γ -muurolene	0.4	1.1	0.3	0.5	0.1	0.4	LRI, GCMS
1485	germacrene D	7.2	5.1	1.3	2.0	-	-	LRI, GCMS
1493	trans-muurola-4(14),5-diene	-	-	1.6	1.8	0.4	0.3	LRI, GCMS
1499	bicyclogermacrene	0.5	0.3	-	-	0.1	-	LRI, GCMS
1502	θ -muurolene	-	-	0.7	0.8	0.1	0.4	LRI, GCMS
1515	γ -cadinene	-	-	-	-	0.1	1.7	LRI, GCMS
1523	δ -cadinene	0.7	0.3	3.6	3.7	0.7	3.2	LRI, GCMS
1561	germacrene B	0.4	0.5	-	-	-	-	LRI, GCMS
Oxygenated sesquiterpenes		0.6	1.4	12.8	13.3	1.4	4.5	
1518	cubebol	-	-	1.5	1.7	-	-	LRI, GCMS
1548	elemol	-	-	1.5	2.0	-	-	LRI, GCMS
1578	germacrene D-4-ol	-	-	-	-	0.5	1.3	LRI, GCMS
1589	caryophyllene oxide	-	-	3.0	2.0	-	-	LRI, GCMS
1630	M = 220	0.3	1.1	1.0	0.8	-	-	GCMS
1642	epi- θ -cadinol	-	-	2.0	2.4	0.1	0.9	LRI, GCMS
1647	θ -muurolol	-	-	2.0	2.9	-	-	LRI, GCMS
1652	θ -cadinol	0.3	0.3	-	-	0.1	0.9	LRI, GCMS
1680	germacra-4(15),10(14)-triene-1- θ -ol	-	-	1.8	1.5	-	-	LRI, GCMS
1690	shyobunol	-	-	-	-	0.7	0.3	LRI, GCMS
1698	(2Z,6Z)-farnesol	-	-	-	-	-	1.1	LRI, GCMS
Total identified		98.3	98.0	99.0	98.6	97.5	96.9	
EO extraction yields (%)		3.57	4.8	0.7	0.68	1.87	2.7	

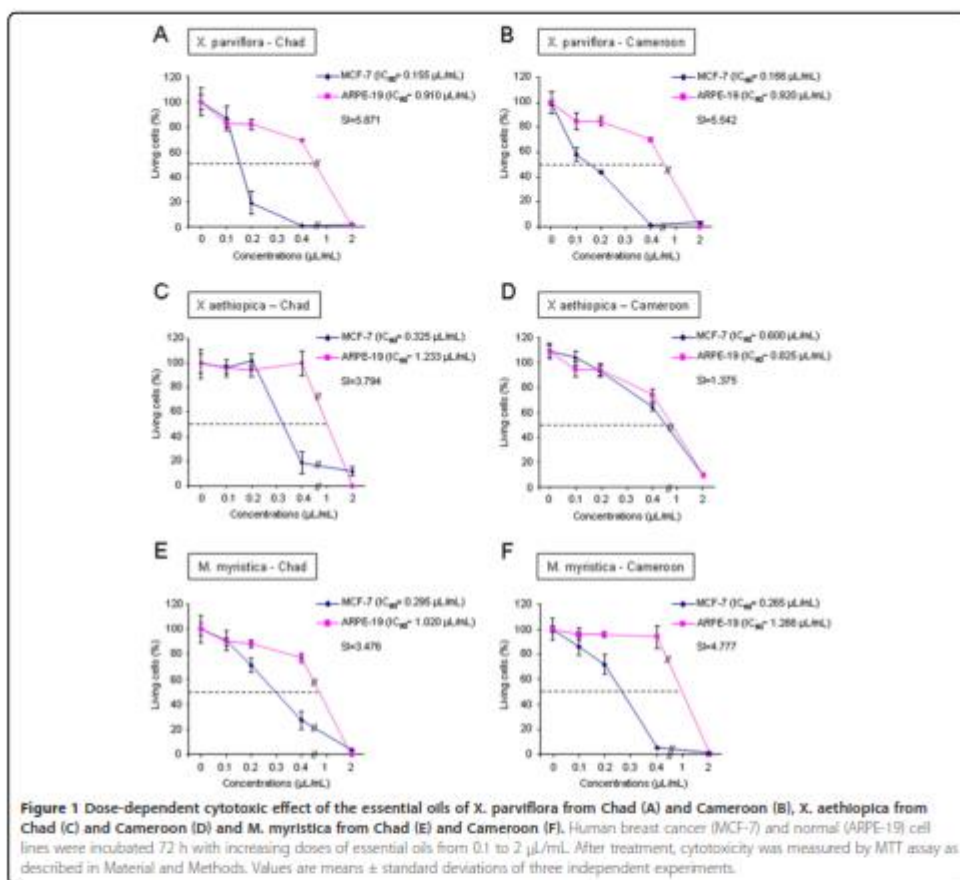
CMR = Cameroon; LRI = linear retention indices on a HP-5 column; - = not found, tr = trace (relative concentration < 0.1%); EO = essential oil.

IC₅₀ values and the selectivity indices were given in each case. The essential oils from fruits of *X. aethiopica*, *X. parviflora* and *M. myristica* produced a highly significant ($p < 0.005$) decrease in living cancer cells (MCF-7) after 72 h of incubation. Importantly, the effects on normal epithelial cells (ARPE-19) were mainly less pronounced.

The fruit essential oils of *X. parviflora* from Chad and Cameroon were the most active on the cancer MCF-7 cells with IC₅₀ values of 0.155 and 0.166 μ L/mL while on normal ARPE-19 cells they showed IC₅₀ values of 0.910 and 0.920 μ L/mL, expressing a selective cytotoxic effect (SI = 5.871 and 5.542 respectively). These oils showed the best profile as potential sources for cancer therapy development. On the other hand, *X. aethiopica* oils from Chad and Cameroon were less cytotoxic and they exhibited different activity according to their origin. Only the essential oil of *X. aethiopica* from Chad showed a higher cytotoxic effect on cancer cells than on normal cells with a SI = 3.794. The same essential oil coming from Cameroon presented comparable effects on neoplastic and normal cells.

Finally, *M. myristica* essential oil appeared also to be more cytotoxic on cancer cells than on normal cells with a SI = 3.476 for the oil from Chad and SI = 4.777 for the oil from Cameroon.

Many reports have been published on the cytotoxic effect of different Annonaceae plant extracts on human cancer and non-cancer cell lines, but few is known about the cytotoxic effect of the essential oils of *X. aethiopica*, *X. parviflora*, and *M. myristica*. Choumessi et al. [22] and Kuete et al. [23] reported the antiproliferative activity of hydro-ethanolic extract of *X. aethiopica* against cancer cell lines with IC₅₀ values of 12 μ g/mL against HCT116 colon cancer cells, 7.5 μ g/mL and >25 μ g/mL against U937 and KG1a leukemia cells, 6.86 μ g/mL and 3.91 μ g/mL against MiaPaCa-2 and CCRF-CEM cells. Adaramoye et al. [24] also showed the antiproliferative effect of *X. aethiopica* extract on human cervical cancer cells. On the other hand, it was reported that components such as terpinen-4-ol and α -cadinol which are found in all the tested essential oils presented activity against breast, colon, gastric, lung,



ovarian and laryngeal cancer cell lines [25]. In addition, β -pinene which is one of the most naturally occurring monoterpene found in the oil of *Xylopi*a species, has shown a significant cytotoxic activity against breast cancer and epidermal skin cancer cell lines [26].

Besides, it has been shown that limonene can improve the cytotoxic activity of essential oils against neoplasms through induction of apoptosis and phase 1 and phase 2 carcinogen metabolizing enzymes (cytochrome P450) that metabolize carcinogens to less toxic forms and prevent the interaction of chemical carcinogens with DNA [27]. Though, the *M. myristica* oil from Chad which was rich in limonene (14.9%) did not present the best cytoxic efficiency against MCF-7 cells. The best results obtained for the two *X. parviflora* oils and for the *M. myristica* sample

from Cameroon, could be due to their content of oxygenated sesquiterpenes.

Finally, the significant cytotoxic activity against MCF-7 cells of *X. parviflora* fruits oils could be explained by the presence of caryophyllene oxide which was not present in the other samples. Sibanda [28] previously demonstrated the antiproliferative effect of caryophyllene oxide against SK-MEL-28, MDA-MB-231, Hs 578 T, and 5637 cancer cell lines. They also found that caryophyllene oxide (100 $\mu\text{g/mL}$) was cytotoxic on breast cancer (MCF-7) and prostate cancer (PC-3) cells with 89.67% and 96.75% of cell death respectively.

Definitely, the high monoterpenic content in *X. aethiopia* and *M. myristica* oils and the occurrence of potent anticancer compounds such as limonene in these extracts

did not influence their cytotoxicity against MCF-7 cells, contrary to the findings of Miller et al. [29]. In the contrary, the essential oils from *X. parviflora* lacking this component showed the best activity against the cancer cells. This is an indication that anticancer activity might be rather related to a sum of interactions between oils components [30], or to the occurrence of different or trace elements.

Conclusion

The results from this work showed that essential oils of *X. aethiopica*, *X. parviflora* and *M. myristica* fruits from Chad and Cameroon were qualitatively comparable, within the same botanical species with modest quantitative variations. Their higher cytotoxic effect on breast cancer cells (MCF-7) than on normal cells (ARPE-19 cells) highlighted their potential as source of eventual therapy against human breast cancer. Further detailed investigations are required to light on specific components that elicit cytotoxic activity and identify their mechanisms of action.

Abbreviations

GC/MS: Gas chromatography-mass spectrometry; MIT: [3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]; GC: Gas chromatography; CMR: Cameroon; LRI: Linear retention indices on a HP-5 column; -: not found; Tr: Trace (concentration < 0.1%); EO: Essential oils.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

FFB, FMJD, IB-V, JBHF, VPFT, LRYT, MGB, and YS designed the study and participated in plant selection and collection, spectral analyses and in the drafting and correction of the manuscript. IB-V, MG, LW, AG, and CM performed GC, GC/SM analyses of the essential oils and carried out the cytotoxicity assay. They also contributed to data analysis and critically revised the manuscript. IB-V, JBHF, VPFT, and LRYT extracted the essential oils. All the authors read and approved the final manuscript version.

Acknowledgements

This work received funding from the University of Adam Barka of Abeche (Chad) to Bakamga-Via Isakou. We are mostly grateful to Mr Victor Nana from Cameroon National Herbarium and Mr Secka Youssouf from National Center Research of Chad for their assistance with the collection and identification of plant materials.

Author details

¹Antimicrobial Agents Unit, Faculty of science, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon. ²Department of Biology, Faculty of Science, University of Adam Barka-Abeche, P.O. Box 1173, Abeche, Chad. ³Faculty of Science, University of Douala, P.O. Box 24157, Douala, Cameroon. ⁴IBMM, UMR 3247, Equipe Glyco et nanovecteurs pour le ciblage thérapeutique, Université de Montpellier 1, Faculté de Pharmacie, 15 Avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier, France. ⁵Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies (IMPM), Yaounde, Cameroon.

Received: 3 February 2014 Accepted: 27 March 2014
Published: 4 April 2014

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics.** *C1 Cancer J Clin* 2011, **61**:69-90.
2. Ahmedin J, Rebecca S, Jlaquan K, Elizabeth W: **Cancer Statistics.** *C1 Cancer J Clin* 2001, **60**(Suppl 5):277-300.

3. GLOBOCAN: *International Agency for Research on Cancer.* France: Lyon; 2010:16.
4. Buchholz M, Gress TM: **Molecular changes in pancreatic cancer.** *Expert Rev Anticancer Ther* 2009, **9**:1487-1497.
5. Nobili S, Lippi D, Wron E, Domini M, Bauli L, Mini E, Capaccioli S: **Natural compounds for cancer treatment and prevention.** *Pharmacol Res* 2009, **59**(Suppl 6):365-378.
6. Unlu M, Ergene E, Vardar UG, Zeytinoglu HS, Vural N: **Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from Cinnamomum zeylanicum Blume (Lauraceae).** *Food Chem Toxicol* 2010, **48**:3274-3280.
7. Prasher A, Locke IC, Evans CS: **Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells.** *Cell Prolif* 2004, **37**:221-229.
8. De Sousa AC, Alviano DS, Blank AF, Alves PB, Alviano CS, Gattass CR: **Melissa officinalis L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities.** *J Pharm Pharmacol* 2004, **56**:77-81.
9. Aminmoghaddamfarouj N, Nematollahi A, Wani C: **Annonaceae: bio-resource for tomorrow's drug discovery.** *J Asian Nat Prod Res* 2011, **13**(Suppl 3):465-476.
10. Faulkner DF, Lebbey D, Waterman PG: **Chemical studies in the Annonaceae. Part 19. Further diterpenes from the stem bark of Xylopius aethiopicus.** *Planta Med* 1983, **4**:354-355.
11. Ghana Herbal Pharmacopoeia: **Policy Research and Strategic Planning Institute (PORSPI).** In *The Advent Press.* Accra; 1992:150-152.
12. Boyom FF, Ngouana V, Amvam Zollo PH, Menut C, Bessiere JM, Gué I, Rosenthal P: **Composition and antiparasitic activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants.** *Phytochemistry* 2003, **64**:1269-1275.
13. Weiss EA: **Spice Crops.** Oxon: CAB Publishing; 2002:103-105.
14. Gould MN: **Prevention and therapy of mammary cancer by monoterpenes.** *J Cell Biochem Suppl* 1990, **22**:139-144.
15. Lamaly G, Menut C, Bessiere JM, Amvam Zollo PH, Boyom FF: **Aromatic plants of Tropical Central Africa. I. Volatile components of two Annonaceae from Cameroon: Xylopius aethiopicus (Dunal) A. Richard and Monodora myristica (Gaertn).** *Flavour Frag J* 1987, **2**:91-94.
16. Lamaly G, Menut C, Bessiere JM, Amvam Zollo PH, Boyom FF: **The essential oil of Xylopius parviflorus (A. Rich) Benth. from Cameroon.** *J Essent Oil Res* 1989, **1**:247-248.
17. Adams RP: **Identification of essential oils by gas chromatography quadrupole mass spectrometry.** Carol Stream: Allured Publishing Corporation; 2007.
18. Gay-Bobo M, Brevet D, Benkane-Jeoud N, Raehm L, Mallard P, Garcia M, Durand JO: **Hyaluronic acid-functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient photodynamic therapy of cancer cells.** *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2012, **9**(Suppl 3):258-260.
19. Lau CBS, Ho CY, Kim CF, Leung KN, Fung KP, Tse TF, Chan HHL, Chow MSS: **Cytotoxic activities of Coniolum versicolor (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis.** *Life Sci* 2004, **75**:797-808.
20. Keta B, Sidibe I, Figueroa G, Chelchat JC: **Chemical composition of the essential oil of Xylopius aethiopicus (Dunal) A Rich from Mali.** *J Essent Oil Res* 2003, **15**(Suppl 4):267-269.
21. Noudjou F, Koussinli H, Hance T, Haubruge E, Ngamo LST, Mporomsem PM, Ngassoum M, Malaise F, Marlier M, Lognay G: **Composition of Xylopius aethiopicus (Dunal) A. Rich essential oils from Cameroon and identification of a minor diterpene: ent-13-epi manoyl oxide.** *Biotechnol. Agron Soc Environ* 2007, **11**(3):193-199.
22. Chourmessi AT, Danel M, Chessaing S, Truchet L, Penlap VP, Preme AC, Tazouache AT, Ducommun B, Valette A: **Characterization of the antiproliferative activity of Xylopius aethiopicus.** *Cell Div* 2012, **7**:1-8.
23. Kuethe V, Ktische B, Youns M, Voukeng I, Fankam AG, Tanko S, Lacmatta S, Effertz T: **Cytotoxicity of some Cameroonian spices and selected medicinal plant extracts.** *J Ethnopharmacol* 2011, **134**:809-812.
24. Adaramoye GA, Sarkar J, Singh N, Meena S, Changlija B, Yadav PP, Karolija S, Sirha S: **Antiproliferative action of Xylopius aethiopicus fruit extract on human cervical cancer cells.** *Phytother Res* 2011, **25**(Suppl 10):1558-1563.
25. Ren Z, Gould MN: **Modulation of small G protein isoprenylation by anticancer monoterpenes in situ mammary gland epithelial cells.** *Carcinogenesis* 1998, **19**:827-832.
26. Helen MP, Vargheese TA, Kumari JJ, Abiramy MR, Sajina N, Sree JS: **Phytochemical analysis and anticancer activity of essential oil from Myristica fragrans.** *Int J Curr Pharm Res* 2012, **2**(Suppl 4):188-198.
27. Sun J: **D-Limonene: Safety and Clinical Application.** *Alternative Med Rev* 2007, **12**:259-264.

28. Sibanda S, Chigwada G, Poole M, Gwebu ET, Noletto JA, Schmidt JM, Resc AI, Setzer WN: **Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe.** *J Ethnopharmacol* 2004, **92**:107-111.
29. Miller JA, Lang JE, Ley M, Nagle R, Hsu CH, Thompson PA, Cordova C, Warr A, Chow HH: **Human breast tissue disposition and bioactivity of limonene in women with early-stage breast cancer.** *Cancer Prev Res* 2013, **6**:577-584.
30. Bakali F, Averbeck S, Averbeck D, Idrohar M: **Biological effects of essential oils.** *Food Chem Toxicol* 2008, **46**:446-475.

doi:10.1186/1472-6882-14-125

Cite this article as: Bakarrnga-Via et al.: Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Xylocopa aethiopica* (Dunal) A. Rich, *Xylocopa parviflora* (A. Rich) Benth. and *Monodora myristica* (Gaertn) growing in Chad and Cameroon. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014 **14**:125.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

