

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE (CRFD)
LABORATOIRE DE PHYTOBIOCHIMIE
ET D'ÉTUDE DES PLANTES
MÉDICINALES



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF
BIOCHEMISTRY

POSTGRADUATE SCHOOL OF
SCIENCE
LABORATORY FOR
PHYTOBIOCHEMISTRY AND
MEDICINAL PLANTS STUDIES

**ACTIVITÉ ANTI-DIARRHÉIQUE DE TROIS
PLANTES CAMEROUNAISES DE LA FAMILLE DES
ANNONACEAE: *Anonidium mannii* Oliv., *Xylopia africana*
(Benth) Oliv. Et *Annona senegalensis* Pers.**

Thèse

Présentée et soutenue en vue de l'obtention du
Doctorat/Ph.D en Biochimie

Par : **KENGNI YANDE hubert**
Master en Biochimie

Sous la direction de
FEKAM BOYOM Fabrice
Professeur, Université de Yaoundé I

Année Académique : 2017



<p>UNIVERSITE DE YAOUNDE I</p> <p>FACULTE DES SCIENCES</p> <p>Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques</p>		<p>The University of Yaoundé I</p> <p>Faculty of Science</p> <p>Division of Programming and follow- up of Academic Affairs</p>
<p>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</p>	<p>LIST OF PERMENENT TEACHING STAFF</p>	

ANNEE ACADEMIQUE 2016/2017

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION : (15 Novembre 2017)

ADMINISTRATION

DOYEN : AWONO ONANA, Professeur

VICE-DOYEN / DPSAA : DONGO Etienne, Professeur

VICE-DOYEN / DSSE : OBEN Julius ENYONG, Professeur

VICE-DOYEN / DRC : MBAZE MEVA'A Luc, Maître de Conférences

Chef Division Affaires Académiques, Scolarité et Recherche : ABOSSOLO Monique,
Chargée de cours

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., Maître de
Conférences.

1- DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (40)

N°	NOMS ET PRENOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BENG née NINTCHOM PENLAP V.	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	MBACHAM Wilfried	Professeur	En poste
4	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
5	OBEN Julius ENYONG	Professeur	Vice-Doyen (DSSE)
6	BIGOGA DIAGA Jude	Maître de Conférences	En poste
7	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
8	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste
9	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
10	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
11	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
12	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
1	WAKAM née NANA Louise	Maître de Conférences	En poste
14	BELINGA née NDOYE FOE Marie C. Florentine	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
15	ACHU Merci BIH	Chargé de Cours	En poste
16	AZANTSA Boris	Chargé de Cours	En poste
17	ATOGHO Barbara Mma	Chargé de Cours	En poste
18	DEMMANO Gustave	Chargé de Cours	En poste
19	DJOKAM TAMO Rosine	Chargé de Cours	En poste
20	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Chargé de Cours	En poste
21	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargé de Cours	En poste
22	EFFA ONOMO Pierre	Chargé de Cours	En poste
23	EVEHE BEBANDOUE Marie –Solange	Chargé de Cours	<i>En disponibilité</i>

24	EWANE Cécile Anne	Chargé de Cours	En poste
25	KOTUE TAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
26	MBONG ANGIE MOUGANDE Mary Ann	Chargé de Cours	En poste
27	MOFOR née TEUGWA Clautilde	Chargé de Cours	IA4/MINESUP
28	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
29	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargé de Cours	En poste
30	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KAILAH	Chargé de Cours	En poste
32	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
33	BEBEE FADIMATOU	Assistant	En poste
34	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Assistant	En poste
35	DAKOLE DABOY Charles	Assistant	En poste
36	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Assistant	En poste
37	FONKOUA Martin	Assistant	En poste
38	MANANGA Marlyse Joséphine	Assistant	En poste
39	MBOUCHE FANMOE Marcelline Joëlle	Assistant	En poste
40	TIENTCHEU DJOKAM Léopold	Assistant	En poste

2- DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (B.P.A.) (44)

1	BILONG BILONG Charles Félix	Professeur	Chef de Département
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
4	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
5	MIMPFOUNDI REMY	Professeur	En poste
6	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
7	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
8	NOLA Moïse	Professeur	En poste
9	TAN Paul Vernyuy	Professeur	En poste

10	TCHUEM TCHUENTE Louis	Professeur	<i>Coord. Progr. MINSANTE</i>
11	AJEAGAH Gidéon AGHAINDOUM	Maître de Conférences	<i>Chef Serv. /Diplomation FS</i>
12	DJIETO Lordon Champlain	Maître de Conférences	En poste
13	DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
14	ESSOMBA née NTSAMA MBALLA	Maître de Conférences	<i>VDRC/Chef dépt FMSB</i>
15	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	En poste
16	KAMGANG René	Maître de Conférences	<i>C.E. MINRESI</i>
17	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
18	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
19	MONY NTONE Ruth	Maître de Conférences	En poste
20	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste
20	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. /MINSUP</i>
21	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
22	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
23	BILANDA Danielle Claude	Chargé de Cours	En poste
24	DJIOGUE Séfirin	Chargé de Cours	En poste
25	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargé de Cours	En poste
26	JATSA MEGAPTCHE Hermine	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
27	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
28	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
29	MOUGANG NGAMENI Luciane	Chargé de Cours	En poste
30	LEKEUFACK FOLEFACK Guy Benoît	Chargé de Cours	En poste
31	NGOULATEU KENFACK Omer BEBE	Chargé de Cours	En poste
32	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Chargé de Cours	En poste
33	NGUEMBOCK	Chargé de Cours	En poste
34	NJUA Clarisse YAFI	Chargé de Cours	En poste
35	TADU Zéphirin	Chargé de Cours	En poste

36	TOMBI Jeannette	Chargé de Cours	En poste
37	YEDE	Chargé de Cours	En poste
38	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
39	KANDEDA KAVAYE Antoine	Assistant	En poste
40	KOGA MANG'Dobara	Assistant	En poste
41	METCHI DONGFACK Mireille Flore	Assistant	En poste
40	NOAH E. O. Vivien	Assistant	En poste
41	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Assistant	En poste

3-DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES (B. P. V.) (27)

1	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
2	AMBANG Zachée	Professeur	<i>DAARS / UYII</i>
3	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
4	BELL Joseph Martin	Maître de Conférences	En poste
5	DJOCGOUE Pierre François	Maître de Conférences	En poste
6	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
7	MBOLO Marie.	Maître de Conférences	<i>Coordo. Programme MINFOF</i>
8	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
9	ZAPFACK Louis	Maître de Conférences	En poste
10	ANGONI Hyacinthe	Chargé de Cours	En poste
11	BIYE Elvire Hortense	Chargé de Cours	En poste
12	MAHBOU SOMO TOUKAM Gabriel	Chargé de Cours	En poste
13	MALLA Armand William	Chargé de Cours	En poste
14	MBARGA BINDZI Marie Alain.	Chargé de Cours	<i>Inspecteur académ. N°1 MINESUP</i>
15	NGALLE Hermine BILLE	Chargé de Cours	En poste
16	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Chargé de Cours	En poste
17	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy Léonard	Chargé de Cours	En poste
18	NGOOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste

19	NSOM ZAMO Annie Claude ép. Pial	Chargé de Cours	<i>Expert national./UNESCO</i>
20	ONANA Jean Michel	Chargé de Cours	En poste
21	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste
22	TSOATA Esaïe	Chargé de Cours	En poste
23	DJEUANI Astride Carole	Assistant	En poste
24	GONMADGE Christelle	Assistant	En poste
25	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Assistant	En poste
26	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistant	En poste
27	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Assistant	En poste

4-DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (C.I.) (35)

1	KETCHA MBADCAM Joseph	Professeur	Chef de Département
2	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
3	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Doyen/ UD</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Directeur Cabinet PM</i>
5	LAMINSI Samuel	Professeur	En poste
6	MELO née CHINJE Uphie F.	Professeur	<i>Recteur/UN</i>
7	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice-Recteur/ Ubda</i>
8	NANSEU Charles Péguy	Professeur	En poste
9	NENWA Justin	Professeur	En poste
10	BABALE DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	En poste
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
12	ELIMBI Antoine	Maître de Conférences	En poste
13	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
14	NDIKONTAR Maurice KOR	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen/Ubda</i>
15	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	<i>Recteur /UB</i>
16	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste

17	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
18	CHEUMANI YONA Arnaud	Chargé de Cours	En poste
19	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
20	GWET Simon – Pierre	Chargé de Cours	En poste
21	KAMGANG YOUNBI Georges	Chargé de Cours	En poste
22	KEUMEGNE MBOUGUEM Jean Claude	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO Gustave	Chargé de Cours	. En poste
24	MBEY Jean Aimé	Chargé de Cours	En poste
25	NDI Julius NSAMI	Chargé de Cours	En poste
26	NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargé de Cours	En poste
27	NJIOMOU Chantale épouse DJANGANG	Chargé de Cours	En poste
28	NJOYA Dayirou	Chargé de Cours	En poste
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargé de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE Awaou	Chargé de Cours	En poste
31	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
32	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Assistant	En poste
33	KOUOTOU DAOUDA	Assistant	En poste
34	MAKON Thomas Beauregar	Assistant	En poste
35	NCHIMI NONO Katia	Assistant	En poste

5-DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (C.O.) (33)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/ DPSSA
2	GHOGOMU TIH ROBERT RALPH	Professeur	<i>Directeur I.B.A. Foumban</i>
3	MBAFOR Joseph	Professeur	En poste
4	NGADJUI TCHALEU B.	Professeur	<i>Chef de dépt FMBS</i>
5	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de dépt. UDs</i>

6	NKENGFACK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département
7	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Directeur /UN</i>
8	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur au MINESUP</i>
9	WANDJI Jean	Professeur	En poste
10	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ UYI</i>
11	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
15	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
16	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Vice-Recteur/ UYII</i>
17	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
18	TCHUENDEM KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
19	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
20	AMBASSA Pantaleon	Chargé de Cours	En poste
21	EYONG Kenneth OBEN	Chargé de Cours	En poste
22	FOTSO WABO Ghislain	Chargé de Cours	En poste
23	KAMTO Eutrophe Ledoux	Chargé de Cours	En poste
24	MKOUNGA Pierre	Chargé de Cours	En poste
25	NGO MBING Joséphine	Chargé de Cours	En poste
26	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Chargé de Cours	Chef Cell/ MINRESI
27	NOTE LOUGBOT Olivier	Chargé de Cours	CEA/MINESUP
28	OUAHOUE WACHE Blandine Marlyse	Chargé de Cours	En poste
29	TABOPDA KUATE Turibio	Chargé de Cours	En poste
30	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
31	ZONDEGOUMBA Ernestine	Chargé de Cours	En poste
32	NGINTEDO Dominique	Assistant	En poste
33	NGOMO Orléans	Assistant	En poste

6-DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (30)

1	FOUDA NDJODO Marcel	Professeur	<i>IGA-MINESUP/Chef Dpt ENS</i>
2	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	Chef de Département <i>Chef Division MINESUP</i>
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	CHEDOM FOTSO Donatien	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera Youth KIMBI	Chargé de Cours	En poste
6	KOUOKAM KOUOKAM Etienne Appolin	Chargé de Cours	En poste
7	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
8	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
10	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
11	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
12	ABESSOLO ALO'O Gislain	Assistant	En poste
13	AMINOUE Halilou	Assistant	En poste
14	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
15	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
16	EBELE Serge	Assistant	En poste
17	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
18	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistant	En poste
19	KAMGUEU Patrick Olivier	Assistant	En poste
20	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
21	MAKEMBE S. Fritz Oswald	Assistant	En poste
22	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistant	En poste
23	MONTHE DJIADEU Valery Martial	Assistant	En poste
24	NKONDOCK MI BAHANACK Nicolas	Assistant	En poste

25	OLE OLE David Claude	Assistant	En poste
26	TAPAMO KENFACK Hyppolite	Assistant	En poste
7-DEPARTEMENT DE MATHEMATIQUES (MA) (33)			
1	BEKOLLE David	Professeur	<i>Vice-Recteur UN</i>
2	BITJONG NDOMBOL	Professeur	En poste
3	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste
4	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
5	EMVUDU WONO Yves S.	Maître de Conférences	Dir.MINESUP
6	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
7	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
8	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	C.E. MINEPAT
9	BOGSO Antoine M	Chargé de Cours	En poste
10	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
11	DOUANLA YONTA Hermann	Chargé de Cours	En poste
12	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
13	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
14	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
15	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
16	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
17	MBEHOU Mohamed	Chargé de Cours	En poste
18	MBELE BEDIMA Martin	Chargé de Cours	En poste
19	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
20	NGUEFACK Bertrand	Chargé de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
22	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
23	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
24	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste

25	TIAYA TSAGUE N. Anne- Marie	Chargé de Cours	En poste
26	DJIADU NGAHA Michel	Assistant	En poste
27	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
28	NIMPA PEFOUKEU Romain	Assistant	En poste
29	TANG AHANDA Barnabé	Assistant	<i>Chef Serv. MINPLAMAT</i>
30	TETSADJIO TCHILEPECK Mesmin Erick	Assistant	En poste

8-DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MB) (13)

1	ETOA François-Xavier	Professeur	Recteur UDO/ Chef de Département
2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	ESSIA NGANG Jean Justin	Maître de Conférences	<i>Chef de Division recherche IMPM</i>
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	ENO Anna Arey	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain Gabriel	Chargé de Cours	En poste
11	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Assistant	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Assistant	En poste

9-DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PH) (41)

1	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
2	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
3	NJOMO Donatien	Professeur	En poste
4	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen/Ubda</i>
5	WOAFO Paul	Professeur	En poste

6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
7	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
8	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
9	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>Dir.Gén. B. MEKIM</i>
10	BEN- BOLIE Germain Hubert	Maître de Conférences	En poste
11	DJUIDJE KENMOE Gemaine épouse ALOYEM KAZE	Maître de Conférences	En poste
12	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Dépt UN</i>
13	EYEBE FOU DA Jean Sire	Maître de Conférences	En poste
14	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
15	MBANE BIOUELE	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
16	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
17	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Maître de Conférences	<i>Chef Serv. MINRESI</i>
18	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
19	OUMAROU BOUBA	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
20	SAIDOU	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
21	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
22	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
23	BODO Bernard	Chargé de Cours	En poste
24	ENYEGUE A NYAM Françoise épouse BELINGA	Chargé de Cours	En poste
25	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
26	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINADER</i>
27	HONA Jacques	Chargé de Cours	En poste
28	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En Poste
29	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
30	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
31	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	<i>Dir.acad/Univ.Int.Etat Cam-Congo</i>

32	SIMO Elie	Chargé de Cours	En poste
33	TABI Conrad Bertrand	Chargé de Cours	En poste
34	TCHOFFO Fidèle	Chargé de Cours	En poste
35	VONDOU DERBETINI Appolinaire	Chargé de Cours	En Poste
36	WAKATA née BEYA Annie	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. MINESUP</i>
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste
38	ABDOURAHIMI	Assistant	En Poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En Poste
40	MELI'I Jorelle Larissa	Assistant	En Poste
41	MVOGO Alain	Assistant	En Poste

10- DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (S.T.) (44)

1	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	Chef de Department
2	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
3	BITOM Dieudonné Lucien	Professeur	Doyen FASA/ U D
4	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Maître de Conférences	En poste
5	KAMGANG Pierre	Maître de Conférences	En poste
6	MEDJO EKO Robert	Maître de Conférences	Conseiller Technique/UYII
7	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINMIDT</i>
8	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
9	NGOS III Simon	Maître de Conférences	<i>D.A.A.C./UM</i>
10	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
11	NKOUMBOU Charles	Maître de Conférences	En poste
12	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
13	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef de Divi/ MINTP</i>
14	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Chargé de Cours	Chef DAASR FS/UYI
15	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
16	BISSO Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Dir.Projet Barage Memve'ele</i>

17	EKOMANE Emile	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
18	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
19	EYONG John TAKEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
20	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Serv D'ETAT /MINMIDT</i>
21	GANNO Sylvestre	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
22	GHOGOMU Richard TANWI	Chargé de Cours	<i>Chef de Dépt IMIP/Maroua</i>
23	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
24	MBIDA YEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
25	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Chef de Dépt IMIP/Maroua</i>
26	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
27	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
28	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
29	NGUEUTCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	<i>CEA MINRESI</i>
30	NYECK Bruno	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
31	ONANA Vincent	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
32	TCHAKOUNTE Jacqueline ép. NUMBEM	Chargé de cours	<i>CEA MINRESI</i>
33	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
34	ZO'O ZAME Philémon	Chargé de Cours	<i>DG ART</i>
35	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
36	ANABA ONANA Achille Basile	Assistant	<i>En Poste</i>
37	BINELI BETSI Thierry Olivier	Assistant	<i>En Poste</i>
38	METANG Victor	Assistant	<i>En poste</i>
39	NOMO NEGUE Emmanuel	Assistant	<i>En poste</i>
40	SABABA Elisé	Assistant	<i>En Poste</i>
41	TCHAPTCHET TCHATO De Pesquidoux I	Assistant	<i>En poste</i>
42	TEHNA Nathanaël	Assistant	<i>En poste</i>

Répartition chiffrée des enseignants permanents par Département

(15 Novembre 2017)

Département	Nombre d'enseignants				
	Pr	MC	CC	ASS	Total
BC	10 (1)	10 (3)	18 (9)	08 (4)	40 (18)
BPA	10 (0)	9 (1)	14 (6)	11 (4)	44 (11)
BPV	03 (0)	13 (4)	12 (3)	05 (5)	33 (9)
C.I.	9 (1)	7 (0)	15 (3)	4 (1)	35 (5)
C.O.	9 (0)	10 (3)	12 (3)	2 (0)	33 (6)
IN	2 (0)	1 (0)	8 (0)	15 (2)	26 (2)
MA	3 (0)	4 (0)	18 (1)	5 (0)	30 (1)
MB	1 (0)	6 (1)	4 (2)	2 (0)	13 (3)
PH	8 (0)	10 (1)	18 (2)	5 (2)	41 (5)
ST	3(0)	10 (1)	22 (4)	7 (0)	44 (5)
Total	59 (2)	80 (14)	139 (33)	67 (18)	345 (67)

Soit un total de : 345 (67) dont

- Professeurs 59 (2)

- Maîtres de Conférences 80 (14)

- Chargés de Cours 139 (33)

- Assistants 67 (18)

() = Nombre de femmes.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

DÉDICACE

À

KUITCHA épouse *KENGNI* ; mon épouse
WONKAP, FOUTSAM et *GONLEU KENGNI* ; mes enfants

REMERCIEMENTS

Ce travail réalisé au Laboratoire de Phytobiochimie et d'étude des plantes médicinales de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, est au-delà de mon effort personnel, le fruit d'une formation mais aussi d'encouragements, de conseils, de collaborations et de soutiens multiformes. Aussi m'est-il particulièrement agréable d'adresser mes vifs et sincères remerciements à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre ont contribué à son aboutissement. Plus précisément aux:

Professeur FEKAM BOYOM Fabrice, mon directeur de thèse qui a supervisé de bout en bout ce travail. Sa rigueur scientifique, son professionnalisme, sa disponibilité, son accessibilité, sa simplicité, sa noblesse, son humilité, ses conseils et ses encouragements forcent l'admiration, le respect et l'inspiration. Soyez en rassuré, monsieur le professeur de mes sentiments respectueux et tous dévoués.

Professeur MOUNDIPA FEWOU Paul, Chef de Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour ses conseils et ses encouragements.

Enseignants du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I pour la qualité de leurs enseignements.

Enseignants du Département de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I pour leurs enseignements et en particulier les **Prof. ESSIA NGANG Jean Justin et SADO KAMDEM Sylvain Leroy** pour leur orientation.

Prof. PIEME Anatole Constant de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I pour la réalisation des tests HPLC en Italie, sa disponibilité et ses conseils lors de la réalisation des tests antioxydants et anti-diarrhéiques.

Dr. HZOUNDA FOKOU Jean Baptiste et **Dr. ADAMOU Souleymanou** du Centre de Biotechnologie de Nkolbisson, à qui j'exprime ma sincère reconnaissance pour les efforts consentis lors de la réalisation des tests antioxydants.

Dr. NGOUANA Vincent pour son indéfectible soutien. Tu m'as fait admettre que je pouvais oser, au moment où j'avais perdu espoir.

Dr. KUITCHA Dorice qui a tout fait pour que ce travail arrive à son terme. Hormis ton affection, ta patience, ta persévérance, ta compréhension, tes conseils et tes

encouragements, tu es le seul véritable soutien que je n'ai jamais eu, tu as agi avec beaucoup de passion. Trouves en ce modeste travail le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Monsieur NANA Victor de l'herbier national du Cameroun qui a permis l'identification des plantes.

Frères **TOGHUEO Rufin** et **TSAKEM NANGA Jaures** pour la complicité et le soutien exceptionnel.

Prof. MBOUOBDA Hermann D, Prof. LELE Célestin, Prof. Fouépé T Alain, Dr. FOKOM Raymond, Dr. BOGNE patrice, Dr. TCHAMENI Severin, Dr. SAHA FOUOJO Brice Ulrich, Dr. ESSAMA ASSIGA pierre claver, Dr. FOUOLIFACK Ymelé Florent, OPJ AGHOFACK François, Col médecin NOUWETZEM François, CPP MBIANDA NOUMEN Yve, Mrs BOMA Henri, FEUGAING Antoine, TAGNE Innocent et Maître NGONGANG Isaac pour l'ambiance plus que chaleureuse qu'ils ont entretenue durant la réalisation de ce travail.

Aînés et cadets du Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etudes des Plantes Médicinales **Dr. TSOUH FOKOU Valère, Dr. NGOUANA KAMMALAC Thierry, Dr. DONKENG DONFACK Valérie, M. TAFFOU, Dr. DONGMO NGUEPI Mireille, Dr. ZEUKO'O MENKEM Elisabeth, Dr. BAKARNGA-VIA Issakou, Dr. TCHOKOUAHA YAMTHE Lauve Rachel, NGOUTANE MFOPA Alvine, SIMO KAMDEM Marguerite, KENFACK TSAGUE Ide Flavie, EKE Pierre, JIATSA MBOUNA Cédric, KEUMOE Rodrigue, BEDINE BOAT Marie Ampère, NGONGANG Danielle, NGO MBACK Nina, NGUEMNANG MABOU Lile, MAJOUMOUO Michelle Stella, YOUMSI Roger Ducos, CHATUE CHATUE Gaël, NJAMPA Cyrille, MARIE JESUS Arc-en-Ciel, MBEUKOU Michelle** pour votre esprit de générosité ; Vous avez été formidables et constituez pour moi une nouvelle famille.

Membres et personnels des laboratoires et institutions suivants : Centre Pasteur du Cameroun (Yaoundé), Laboratoire BEI Resources (USA), Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de la Faculté des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I, Laboratoire de Chimie Organique 1 de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, Centre de Biotechnologie de Nkolbisson, Laboratoire de Physiologie Animale de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, Hôpital Central de Yaoundé, Laboratoire du Département des Matériaux Chimiques et d'Ingénierie Environnementale de l'Université de Padova (Italie) pour leurs contributions matérielles et logistiques.

Membres de ma famille et en particulier :

- Ma **mère FOUTSAM Jeanne**, ce modeste travail et le fruit de ton exceptionnel amour, de tes bénédictions multiples et surtout de la bonne éducation que j'ai reçue de toi. Sois infiniment bénie.
- Mes frères et sœurs: **Maman Julienne KAMHOUA, Papa Isaac WAFFO, papa Siméon KOUAJIP, papa André DIFFOUO, maman Lisette MEPE, maman pauline DJOMOU, Jean NDIE, Romain PENKA, Dorothée DONGAM, Annette GUISSI, Laurentine KAMNENG, Florence KOAGNE, Calvin KOUAWO** et à tous ceux qui me portent dans leur cœur, je vous dis merci pour le soutien moral.

Révérend pasteur FOKO SOB Jilbert pour le soutien spirituel.

SOMMAIRE

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	i
DÉDICACE	xvi
REMERCIEMENTS	xvii
SOMMAIRE	xx
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xxiv
LISTE DES FIGURES	xxvii
LISTE DES PHOTOGRAPHIES	xxix
LISTE DES TABLEAUX	xxx
LISTE DES ANNEXES	xxxii
RÉSUMÉ	xxxii
ABSTRACT	xxxiv
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE	5
I-1- GÉNÉRALITÉS SUR LA DIARRHÉE	5
I-1-1- Définition.....	5
I-1-2-Syndromes cliniques de la diarrhée	5
I-1-2-1-Diarrhée sécrétoire.....	5
I-1-2-2-Diarrhée osmotique.....	6
I-1-2-3- Diarrhée exsudative	7
I-1-2-4-Diarrhée motrice	7
I-1-3- Prévalence et contexte	9
I-1-4-Étiologie de la diarrhée.....	11
I-1-4-1-Diarrhées infectieuses.....	11
I-1-4-2-Diarrhées non infectieuses ou fonctionnelles	27
I-1-5-Physiopathologie de la diarrhée.....	30
I-1-6-Diarrhée et stress oxydatif	31
I-1-7-Stratégies de contrôle de la diarrhée	32
I-1-7-1- Prophylaxie.....	32

I-1-7-2-Prise en charge thérapeutique.....	33
I-2- GÉNÉRALITÉS SUR LES OXYDANTS ET LES ANTIOXYDANTS	38
I-2-1-Oxydants.....	38
I-2-1-1- Définition.....	38
I-2-1-2- Radicaux libres	38
I-2-2- Antioxydants.....	42
I-2-2-1-Définition.....	42
I-2-2-2-Classification des antioxydants	42
I-3-MÉDECINE TRADITIONNELLE : UNE ALTERNATIVE.....	43
I-4- GÉNÉRALITES SUR LES ANNONACÉES	43
I-4-1- Genre <i>Anonidium</i>	44
I-4-1-1- <i>Anonidium mannii</i> (Photographie 1)	44
I-4-2- Genre <i>Annona</i>	46
I-4-2-1- <i>Annona senegalensis</i> Pers. (Photographie 2).....	46
I-4-3- Genre <i>xylophia</i>	50
I-4-3-1- <i>Xylophia africana</i> (Photographie 3)	50
CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES	54
II-1- CADRE D'ÉTUDE.....	53
II-2- MATÉRIEL	53
II-2-1- Animaux expérimentaux	53
II-2-2- Matériel végétal.....	54
II-2-4-Huile d'olive.....	55
II-3-MÉTHODES.....	56
II-3-1- Schéma général du travail	56
II-3-2- Préparation et caractérisation des extraits	56
II-3-2-1- Traitement des plantes et préparation des extraits bruts éthanoliques et fractions méthanoliques.....	56
II-3-2-2- Procédure d'extraction liquide-liquide.....	56
1999).....	58
II-3-3- Criblage phytochimique	58
II-3-3-1- Évaluation qualitative des métabolites secondaires	58
II-3-3-2- Criblage phytochimique quantitatif.....	60
II-3-4- Étude de l'activité antimicrobienne <i>in-vitro</i>	62

II-3-4-1- Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).....	62
II-3-4-2- Détermination des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB).....	63
II-3-5- Évaluation de l'activité anti-oxydante.....	63
II-3-5-1- Activité sur le radical DPPH	64
II-3-5-2- Détermination de la chélation du Fe ²⁺	66
II-3-5-3- Activité sur le radical Oxyde nitrique (NO).....	67
II-3-6-Évaluation du profil de toxicité aiguë par voie orale	69
II-3-6-1- Évaluation des paramètres comportementaux	70
II-3-6-2- Évaluation de la consommation alimentaire et de la croissance pondérale ...	71
II-3-6-3-Aspect macroscopique.....	71
II-3-7-Évaluation de l'activité anti-diarrhéique de la fraction méthanolique des feuilles d' <i>A. senegalensis</i>	71
II-3-7-1- Effet de la fraction d'AnsefeMeOH sur la diarrhée induite chez des rats avec l'huile de ricin	72
II-3-7-2- Détermination des mécanismes possibles impliqués dans l'activité anti- diarrhéique observée	73
II-3-7-3-Évaluation <i>in- vivo</i> des effets de la fraction d'AnsefeMeOH chez les rats infectés par <i>E.coli</i> entéropathogène (EPEC)	74
II-3-7-4- Effets de la fraction méthanolique des feuilles d' <i>A.senegalensis</i> (AnsefeMeOH) sur certains paramètres hématologiques et biochimiques des rats infestés par <i>E.coli</i> entéropatogène (EPEC)	77
II-4- Traitement et analyse statistique des données	81
CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION	83
III-1-EXTRACTION ET PARTITION	82
III-2-ANALYSE PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS BRUTS ET FRACTIONS MÉTHANOLIQUES DES PLANTES ETUDIÉES	83
III-2-1-Analyse phytochimique qualitative des extraits bruts éthanoliques	83
III-2-2-Analyse phytochimique quantitative.....	85
III-3-ÉVALUATION DES ACTIVITÉS ANTIMICROBIENNE ET ANTI-OXYDANTE IN-VITRO	89
III-3-1-Propriété antimicrobienne : Résultats des CMI et CMB.....	89
Concentrations Minimales Inhibitrices des extraits (CMI).....	89

III-3-2-Potentiel anti-oxydant des extraits bruts éthanoliques et fractions méthanoliques des organes d' <i>A. senegalensis</i>	93
III-3-2-1-Profil antiradicalaire vis-à-vis du DPPH.....	94
III-3-2-2- Profil antiradicalaire vis-à-vis du NO	95
III-3-2-3- Activité chélatrice du Fe ²⁺	97
III-4-TOXICITÉ ORALE AIGUË	99
III-4-1-Variation des paramètres généraux	99
III-4-2-Variation des paramètres comportementaux.....	99
III-4-3-Effet de la fraction méthanolique des feuilles d' <i>A. senegalensis</i> sur l'évolution pondérale des souris	100
III-4-4-Variation macroscopique des organes.....	101
III-4-5-Variation de la consommation alimentaire et hydrique	102
III-5-ACTIVITÉ DE LA FRACTION MÉTHANOLIQUE DES FEUILLES D'<i>A. SENEGALENSIS</i> SUR DEUX MODÈLES DE DIARRHÉE	105
III-5-1- Effets de la fraction méthanolique des feuilles d' <i>A. senegalensis</i> sur la diarrhée fonctionnelle	105
III-5-2- Détermination des mécanismes possibles impliqués dans l'activité anti-diarrhéique observée	114
III-5-3- Effets <i>in-vivo</i> de la fraction méthanolique des feuilles <i>A. senegalensis</i> (AnsefeMeOH) chez les rats infectés par <i>E. coli</i> entéropathogène (EPEC).....	116
III-5-3-1- Effets de la fraction AnsefeMeOH sur la charge fécale des rats infectés par EPEC	117
III-5-3-2-Effets de la fraction AnsefeMeOH sur le poids corporel des rats infectés par EPEC.....	118
III-5-3-3- Effets de la fraction AnsefeMeOH sur quelques paramètres biochimiques des rats infectés par EPEC.....	119
III-5-3-4- Effets de la fraction AnsefeMeOH sur quelques paramètres hématologiques des rats infectés par EPEC	122
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	128
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	129
ANNEXES.....	160
PUBLICATIONS	10

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A/E	Attachement-effacement
<i>A.senegalensis</i>	<i>Annona senegalensis</i>
Ansefe	<i>Annona senegalensis</i> feuille
AnsefeEtOH	<i>Annona senegalensis</i> feuille extrait brut éthanolique
AnsefeMeOH	<i>Annona senegalensis</i> feuille fraction méthanolique
AnsefeH₂O	<i>Annona senegalensis</i> feuille fraction aqueuse
Ansebr	<i>Annona senegalensis</i> brindille
AnsebrEtOH	<i>Annona senegalensis</i> brindille extrait brut éthanolique
AnsebrMeOH	<i>Annona senegalensis</i> brindille fraction méthanolique
AnsebrH₂O	<i>Annona senegalensis</i> brindille fraction aqueuse
AnseEc	<i>Annona senegalensis</i> écorce
AnseEcEtOH	<i>Annona senegalensis</i> écorce extrait brut éthanolique
AnseEcMeOH	<i>Annona senegalensis</i> écorce fraction méthanolique
AnseEcH₂O	<i>Annona senegalensis</i> écorce fraction aqueuse
<i>A.mannii</i>	<i>Anonidium manni</i>
Amfe	<i>Anonidium manni</i> feuille
AmfeEtOH	<i>Anonidium manni</i> feuille extrait brut éthanolique
AmfeMeOH	<i>Anonidium manni</i> feuille fraction méthanolique
AmfeH₂O	<i>Anonidium manni</i> feuille fraction aqueuse
Ambr	<i>Anonidium manni</i> brindille
AmbrEtOH	<i>Anonidium manni</i> brindille extrait brut éthanolique
AmbrMeOH	<i>Anonidium manni</i> brindille fraction méthanolique
AmbrH₂O	<i>Anonidium manni</i> brindille fraction aqueuse
AmEc	<i>Anonidium manni</i> écorce
AmEcEtOH	<i>Anonidium manni</i> écorce extrait brut éthanolique
AmEcMeOH	<i>Anonidium manni</i> écorce fraction méthanolique
AmEcH₂O	<i>Anonidium manni</i> écorce fraction aqueuse
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adenosine Diphosphate
ATCC	American Type Culture Collection
AMP	Adénosine mono-phosphate
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
BFP	Bundle -Forming Pili
BHT	Butyl-Hydroxy Toluene
CFA	Colonization Factor Antigen
CHU-PS	Centre Hospitalier Universitaire Pitié-Salpêtrière
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMF	Concentration Minimale Fongicide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CNR	Centre National de Référence
CP50	Concentration de piégeage 50
CT	Cholera Toxin
CI₅₀	Concentration Inhibitrice 50
CSF	Coli Surface Factor
CE50	Concentration Efficace 50

DPPH	2,2- diphényl-1-picrylhydrazine
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Eae ou EAE	Gène codant l'intimine (EPEC attachement/effacement)
EAF ou eaf	Facteur d'adhésion des EPEC
DAEC	Diffuse-Adherent <i>Escherichia coli</i>
EAST	Entero-Aggregative <i>E. coli</i> heat stable enterotoxin
EAGGEC	Entero-Aggregative <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Entero-Hemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Entero-Pathogenic <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Entero-Toxigenic <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Entero-Invasive <i>Escherichia coli</i>
EtOH	Éthanol
GEI	Gastroenterite infantile
GMP	Guanosine mono-phosphate
DMSO	DiMethyl SulfOxyde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
MeOH	Méthanol
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NIH	National Institute for Health
LPS	Lipoposaccharides
LT	Entérotoxine Thermolabile
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
SOD	Super-oxyde Dismutase
SC50	Medium Scavenging Concentration
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Acquis
NO	Oxyde Nitrique
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
PA	Pouvoir Antiradicalaire
PAI	Ilôt de pathogénicité
SHU	Syndrome Hémolytique et Urémique
SCP	Société Canadienne de pédiatrie
SLT	Shiga like toxin
<i>S. flexineri</i>	<i>Shigella flexineri</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
ST	Entérotoxine Thermostable
STEC	Shiga-toxin <i>Escherichia coli</i>
Stx	Shiga-toxine
SP	Espèce non identifiée
TIAC	Toxi-infection alimentaire collective
TNF	Tumor necrosing factor
UPEC	Uro- pathogenic <i>Escherichia coli</i>
VTEC	Vero-toxin <i>Escherichia coli</i>
VIH	Virus de l'Immuno-Déficience Humaine
<i>X.africana</i>	<i>Xylopiya africana</i>
Xafe	<i>Xylopiya africana</i> feuille
XafeEtOH	<i>Xylopiya africana</i> feuille extrait brut éthanolique
XafeMeOH	<i>Xylopiya africana</i> feuille fraction méthanolique
XafeH₂O	<i>Xylopiya africana</i> feuille fraction aqueuse

Xabr	<i>Xylopi</i> a <i>africana</i> brindille
XabrEtOH	<i>Xylopi</i> a <i>africana</i> brindille extrait brut éthanolique
XabrMeOH	<i>Xylopi</i> a <i>africana</i> brindille fraction méthanolique
XabrH₂O	<i>Xylopi</i> a <i>africana</i> brindille fraction aqueuse

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Incidence des maladies diarrhéiques selon l'âge	10
Figure 2 : Organisation schématique de la structure d'une cellule d' <i>Escherichia coli</i>	17
Figure 3 : Contribution des éléments génétiques mobiles dans l'évolution d'une <i>E. coli</i> commensale vers un caractère pathogène	19
.....	22
Figure 4 : Pathogénie associée aux six classes d' <i>E. coli</i> responsables de diarrhées	22
Figure 5 : Observations microscopiques des liaisons A/E induites par les EPEC sur des entérocytes humains.	25
Figure 6 : Enfants en situation de déshydratation sévère due à la diarrhée.....	31
Figure 7 : Oxydation de l'arginine en citruline avec formation de l'oxyde nitrique	39
Figure 8 : Dérivés de l'oxyde nitrique.....	40
Figure 9 : Différents antioxydants et quelques exemples	42
Figure 10 : Procédure d'extraction et de préparation des fractions riches en acétogénines.....	58
Figure 11 : Réaction de la réduction	66
Figure 12 : Spectre phytochimique de Ansefe MeOH	86
Figure 13 : Spectre phytochimique de AmbrMeOH	86
Figure 14 : Spectre phytochimique de AmbrEtOH.....	86
Figure 15 : Spectre phytochimique de Xafe EtOH	86
Figure 16 : Activité anti radicalaire vis-à-vis du DPPH des extraits et fractions.....	94
Figure 17 : Activité anti radicalaire vis-à-vis du NO des extraits et fractions	96
Figure 18 : Activité anti-oxydante sur le Fe ²⁺ des extraits et fractions.....	97
Figure 19 : Évolution de poids des souris pendant le traitement à la fraction AnsefeMeOH100	
Figure 20 : Variation pondérale des différents organes après traitement à la fraction AnsefeMeOH	101
Figure 21 : Consommation alimentaire en g/groupe/jour après administration de la fraction AnsefeMeOH	102
Figure 22 : Consommation hydrique en ml /groupe/jour après administration de la fraction AnsefeMeOH	102
Figure 23 : Temps de rétention de la diarrhée en fonction des concentrations en fractions .	106
Figure 24 : Pourcentage des répondants après administration de la fraction AnsefeMeOH	107
Figure 25 : Fréquence des selles après administration de la fraction AnsefeMeOH.....	108

Figure 26: Pourcentage d'inhibition de la défécation après administration de la fraction AnsefeMeOH	109
Figure 27 : Index de purge après administration de fraction AnsefeMeOH	110
Figure 28 : Masse de l'eau contenue dans les selles après administration de la fraction AnsefeMeOH	111
Figure 29: Effets de la fraction AnsefeMeOH sur la charge fécale des rats infectés par EPEC	117
Figure 30 : Effets de la fraction AnsefeMeOH sur le poids corporel des rats infectés par EPEC	118
Figure 31 : Effets de la fraction AnsefeMeOH sur le taux de protéines totales des rats infectés par EPEC	119
Figure 32 : Effets de la fraction AnsefeMeOH sur le taux de triglycérides sériques des rats infectés par EPEC.....	120
Figure 33 : Effets de la fraction AnsefeMeOH sur le taux de créatinine sérique des rats infectés par EPEC.....	121
Figure 34 : Effets de la fraction AnsefeMeOH sur le taux de NO sérique des rats infectés par EPEC	122

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 1: Branche feuillée et Fruit d' <i>A. manni</i>	45
Photographie 2 : Branches et feuilles d' <i>A. senegalensis</i> Pers.....	47
Photographie 3: Branches, Feuilles (a) et Fruits secs (b) de <i>X. africana</i>	50

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Mortalité infantile par suite de diarrhée pour 1000 enfants < 4 ans /année.....	10
Tableau II : Principaux germes mis en cause dans les diarrhées infectieuses dans les pays en développement par groupe et par ordre d'importance	13
Tableau III : Composition standard d'une solution de réhydratation Orale.....	33
Tableau IV : Quelques antibiotiques, mode d'action et cibles	35
Tableau V : Quelques antifongiques et leurs modes d'action.....	36
Tableau VI : Quelques antiviraux et leurs modes d'action.....	37
Tableau VII : Espèces végétales et organes utilisés, numéros d'identification.....	55
Tableau VIII : Composition de l'huile d'olive de marque Puget	55
Tableau IX : Protocole de dosage de NO	78
Tableau X : Protocole de dosage des protéines totales par la méthode du Biuret	79
Tableau XI : Protocole de dosage de la créatinine	79
Tableau XII : Protocole de dosage des triglycérides	80
Tableau XIII : Analyse phytochimique qualitative des extraits bruts éthanoliques.....	83
Tableau XIV : Analyse phytochimique quantitative de quelques échantillons.....	85
Tableau XV : CMI (mg/ml) des extraits et fractions d' <i>A.senegalensis</i> sur les levures et bactéries.....	90
Tableau XVI : CMI et CMB (mg/ml) des extraits et fractions d' <i>A. senegalensis</i> sur 3 souches de bactéries entéropathogènes	91
Tableau XVII : Valeurs des CI ₅₀	94
Tableau XVIII : Variation des paramètres comportementaux après administration d'AnsefeMeOH	99
Tableau XIX : Effets de la fraction AnsefeMeOH à différentes doses sur la motilité gastrointestinale chez le rat	115
TableauXX : Effets de la fraction AnsefeMeOH à différentes doses sur la masse et le volume du liquide intestinal chez le rat.....	115
Tableau XXI : Effets de la fraction AnsefeMeOH sur quelques paramètres hématologiques	123

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I : Composition par kilogramme d'aliment des souris et des rats	a
ANNEXE II: Composition des milieux de culture utilisés	b
ANNEXE III : Fiche de collecte des données sur le screening primaire de l'activité antidiarrhéique des fractions méthanoliques des organes de plantes vis-à-vis des rats de souches wistar	c
ANNEXE IV : Recette de fabrication familiale de la SRO	e
ANNEXE V : Tableau des principales classes de composés bioactifs d'origine végétale et leurs modes d'action.....	f
ANNEXE VI : Structures chimiques de quelques molécules antioxydantes	g
ANNEXE VII : Structures de quelques métabolites secondaires antimicrobiens contenus dans les extraits aux solvants.....	h
ANNEXE VIII : Résultats des tests antibactériens préliminaires.....	i

RÉSUMÉ

Les diarrhées d'origine infectieuse et non infectieuse constituent l'une des causes majeures de morbidité et de mortalité dans les pays pauvres. La diarrhée d'origine microbienne accroît le stress oxydatif par une surproduction des radicaux libres dans le sang et dont l'effet est néfaste sur l'organisme. Le contrôle de ce fléau passe entre autres par la neutralisation des agents pathogènes responsables à l'instar de certains microbes. Les mesures de contrôle des diarrhées ne sont pas toujours adéquates, et laissent des millions de patients en proie à la mort. Pour autant, les médicaments traditionnels améliorés qui pourraient être développés à partir des plantes médicinales utilisées pour le traitement des diarrhées constituent une alternative crédible pour éradiquer les diarrhées. Le présent travail consistait à explorer les feuilles, brindilles et écorces de *Annona senegalensis*, *Anonidium mannii* et *Xylopiya africana* sélectionnées sur la base d'une enquête bibliographique dans l'optique d'en déterminer à terme les propriétés antidiarrhéiques.

Les extraits bruts éthanoliques ont été préparés par macération des poudres d'organes dans de l'éthanol à 95% et ensuite testés et partitionnés de façon bio-guidée contre différents paramètres liés à la diarrhée. La partition des extraits a permis d'obtenir les fractions aqueuses et méthanoliques. Les extraits bruts ont été soumis au criblage phytochimique qualitatif selon les méthodes standards et les fractions d'intérêt (AmbrEtoH, XafeEtoH, AnsefeMeoH et AmbrMeoH) soumis au criblage phytochimique quantitatif à l'aide de la HPLC. L'activité antimicrobienne *in-vitro* des extraits et fractions a été évaluée par la méthode de micro dilution en milieu liquide. De plus, compte tenu du caractère aggravant de l'oxydation sur la diarrhée, l'activité antioxydante des extraits et fractions méthanoliques d'*A. senegalensis* a été évaluée vis-à-vis du DPPH, du NO et du Fe²⁺. Compte tenu des résultats obtenus, la fraction AnsefeMeoH qui était la plus prometteuse a été sélectionnée pour l'étude de la toxicité et de l'efficacité *in vivo* contre la diarrhée. Ainsi, la toxicité aiguë par voie orale à la dose unique de 2000 mg/kg a été évaluée chez les souris. La capacité à retenir la diarrhée induite par l'huile de ricin a été testée à des doses de 100, 200 et 400 mg/kg. Les effets *in vivo* sur les rats infectés par *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC) ont été examinés à travers la charge fécale en EPEC, la variation du poids des rats ainsi que les paramètres biochimiques et hématologiques.

Huit extraits bruts éthanoliques, 8 fractions aqueuses et 8 fractions méthanoliques ont été préparés. Les rendements d'extraction variaient de 0,003% à 16,720% par rapport au poids du matériel végétal de départ. Les classes de composés potentiellement doués d'activité

biologiques tels que les alcaloïdes, flavonoïdes, phénols, saponines, tanins, stéroïdes, triterpènes, glycosides cardiaques, anthocyanines et anthraquinones ont été détectées dans les extraits bruts. De plus, la HPLC a permis de détecter la présence des acides phénoliques et flavonoïdes entre autres, et d'indiquer les composés majoritaires présents dans les échantillons testés. Globalement, la partition des extraits bruts éthanoliques a contribué à l'accroissement de l'activité antimicrobienne des fractions, AnsefeMeoH étant la plus active sur les différentes souches de germes entéropathogènes et particulièrement sur *E. coli* (CMI égale à 2,5 mg/ml). Les extraits et les fractions d'*A. senegalensis* ont montré une activité antioxydante significative avec une CI_{50} variant de 1,5 à 167,0 $\mu\text{g/ml}$ contre le DPPH, de 0,53 à $> 200,00 \mu\text{g/ml}$ contre le NO, et de 2,07 à $> 200,00 \mu\text{g/ml}$ contre Fe^{2+} . Par ailleurs, AnsefeMeoH n'a induit aucun signe de toxicité aiguë chez les souris à la dose de 2000 mg/kg de poids corporel. Le potentiel anti-diarrhéique a montré une corrélation positive avec la dose de la fraction AnsefeMeoH, 400 mg/kg étant la dose la plus intéressante comparativement au témoin négatif. La fraction AnsefeMeOH a également provoqué un fléchissement statistiquement significatif de la courbe de la charge fécale en EPEC chez les rats traités comparativement au témoin négatif.

Au terme de ce travail, on peut retenir que la fraction AnsefeMeoH a montré des propriétés intéressantes vis-à-vis des oxydants, des microbes, et des diarrhées. De plus elle a montré une innocuité en administration aiguë à la dose de 2000 mg/kg chez les souris. Elle se distingue par conséquent comme un candidat sérieux pouvant servir comme socle pour la formulation d'un médicament traditionnel amélioré (MTA) efficace contre les diarrhées et le stress oxydatif.

Mots clés : Anti diarrhéique ; antimicrobien ; antioxydant ; *Annona senegalensis* ; *Anonidium mannii* ; *Xylopiya africana*.

ABSTRACT

Diarrhea including infectious and non-infectious is one of the major causes of morbidity and mortality in poor countries. Infectious diarrhea caused by pathogenic microorganisms increase the production of free radicals in the blood system causing serious adverse effects in the whole body through oxidative stress. Therefore, inhibition of the causative pathogens could lead to effective control of this disease. However, the control measurements directed against diarrhea are not efficient enough to limit number of annual death recorded in endemic regions. Therefore, an outstanding alternative to control diarrhea could be the use of the traditional improved formulations derived from medicinal plants used against diarrhea in endemic areas as medicines. This is why the present study was designed to explore the leaves, twigs and bark of *Annona senegalensis*, *Anonidium mannii* and *Xylopia africana* selected on the basis of the literature survey in order to study their antidiarrhoeal properties.

The crude ethanol extracts obtained by maceration of dry powders in 95% ethanol were fractionated by liquid-liquid partition guided by antidiarrhoeal activity. Partitions led to aqueous and methanolic fractions. Ethanol extracts were submitted to qualitative phytochemical screening while promising fractions (AmbrEtoH, XafeEtoH, AnsefeMeoH and AmbrMeoH) were submitted to quantitative phytochemical screening using HPLC analysis. For *in vitro* antimicrobial activity of extracts and fractions, microdilution method was used to determine the minimal inhibitory concentration. In regard to the implication of free radicals in diarrhea, the antioxidant activity of extracts and methanolic fractions was determined against DPPH, NO and Fe²⁺. From *in vitro* data, promising fraction AnsefeMeoH was selected for acute toxicity and antidiarrhoeal studies *in vivo* on rat models. Acute toxicity was studied by oral administration of a single dose of 2000 mg/kg/bw on mouse. The ability of AnsefeMeoH to retain castor oil-induced diarrhea was evaluated at doses of 100, 200 and 400 mg/kg/bw in Wistar rats. The *in vivo* effects of the AnsefeMeOH fraction on rats infected with enteropathogenic *E. coli* were examined through the faecal load in EPEC, weight variation of rats, determination of biochemical and haematological parameters at doses of 100, 200 and 400 mg/kg/bw.

Eight crude ethanolic extracts, 8 aqueous fractions and 8 methanolic fractions were prepared with extraction yields ranged from 0.003% to 16.720 %. Bioactives classes of metabolites including Alkaloids, flavonoids, phenols, saponins, tannins, steroids, triterpenes, cardiac glycosides, anthocyanins and anthraquinones, were detected crude extracts. Moreover,

HPLC analysis led to identification of phenolic acids and flavonoids in addition to major compounds in each sample analyzed. Overall, the partition of the crude ethanol extracts (MIC \geq 5mg/ml) yielded fractions with increases antimicrobial activity (MIC \leq 5mg/ml) with AnsefeMeoH being the most active on the different enteropathogenic strains particularly *E. coli* (MIC 2.5 mg/ml). Extracts and fractions of *A. senegalensis* showed significant antioxidant activity with CI_{50} ranged from 1.5-167.0 μ g/ml against DPPH, from 0.53 to >200.00 μ g/ml against NO, and from 2.07 to >200.00 μ g/ml against Fe^{2+} . *In vivo*, AnsefeMeoH didn't showed any signs of acute toxicity after 48h of administration of a single dose of 2000 mg/kg/bw. As for the antidiarrheal potential, a positive correlation between the dose and efficacy of fraction AnsefeMeoH was observed, the dose 400 mg/kg/bw being the most interesting in respect to the negative control. Moreover, AnsefeMeOH significant decrease the fecal load curve in EPEC in treated rats as compared to the negative control rats.

From the results of this investigation, we can conclude that fraction AnsefeMeoH have shown interesting antioxidant, antimicrobial and antidiarrheal properties. Moreover, this fraction was found less toxic on mouse at 2000 mg/kg/bw. Therefore, can be consider as a serious candidate for the formulation of an improved traditional medicine (ITM) effective for management of diarrhea and oxidative stress related.

Keywords: Antidiarrhoeal; antimicrobial; antioxydant; *Annona senegalensis* ; *Anonidium mannii* ; *Xylopiya africana*.



INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les problèmes de santé ont de tout temps constitués un défi majeur pour l'homme. Face à ce défi, la communauté internationale et les pouvoirs publics sont d'avantage mobilisés. Malgré cette forte mobilisation, certaines maladies demeurent un réel problème de santé publique de par leur fréquence et leur gravité (**Bourgeois, 1999; Dzoyem, 2007; Tamokou, 2010; Wong et Yuen, 2011**). C'est malheureusement le cas des diarrhées dans les pays en développement (**Dupéron, 1997; OMS, 2013**). Celles-ci arrivent en troisième position parmi les maladies infectieuses les plus meurtrières dans le monde, avec 2,5 millions de décès par an (**Thapar et Sanderson, 2004; OMS, 2013**). La littérature rapporte 400 millions des cas de diarrhées chaque jour dans le monde (**Dosso *et al.*, 1998**). Cette pathologie touche avant tout les enfants de moins de 5 ans chez qui elle a causé 1,87 million de décès en 2003. Elle est la deuxième cause de mortalité infantile (**OMS, 2017**). On dénombre environ 1,7 milliard de cas de diarrhée de l'enfant chaque année dans le monde (**OMS, 2017**). La probabilité pour un habitant du sud Sahara de contracter la diarrhée est de 39,1% contre 6,9% pour un habitant des pays développés (**OMS, 2006**).

Au Cameroun, le taux de prévalence des diarrhées est d'environ 18,9% avec une forte incidence dans les zones rurales (environ 19,7%) comparé à celui de la ville de Yaoundé (environ 14,4%) (**Nguendo *et al.*, 2008**). Les maladies diarrhéiques sont la première cause de morbidité et de mortalité infantiles au Cameroun (**Keuzata et Merlin, 1988**). Au Cameroun, on compte environ 149 décès pour 1000 nouveaux nés des suites de diarrhée (**OMS, 2006**).

Les origines des diarrhées sont diverses et variées. Elles peuvent être d'origine non infectieuses (effets secondaires de certains médicaments, intolérances alimentaires, héréditaire, radiations entéro-pathiques, émotionnelle ; les agents pathogènes ne jouant aucun rôle direct) ou infectieuses (bactérienne, virale, parasitaire ou fongique) (**Dosso *et al.*, 1998 ; Ngo Teke, 2011**). *Escherichia coli*, *Shigella* sp, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile* et *Candida albicans* sont parmi les germes les plus incriminés dans les diarrhées infectieuses bactériennes et fongiques (**Pichard, 2002 ; NIH, 2003 ; Yao *et al.*, 2012**). Toutefois, plusieurs facteurs concourent à la fréquence et la gravité des diarrhées. Il s'agit du non-respect des règles d'hygiène, des difficultés d'accès à l'eau potable, de la promiscuité, de l'immunodéficience (VIH/SIDA) et des maladies chroniques (**Dosso *et al.*, 1998 ; Mwamba *et al.*, 2010**).

Face à ce problème que constituent les diarrhées, plusieurs stratégies de contrôle et de prise en charge impliquant la prophylaxie et le traitement curatif sont adoptées (**OMS, 2009**). A défaut d'un traitement préventif fiable, la prophylaxie repose essentiellement sur le respect

des règles d'hygiène, les vaccinations anticholérique, antityphoïdique et surtout contre rotavirus ainsi que sur la prévention des effets secondaires de certains médicaments. Par contre, la prise en charge thérapeutique implique l'usage de la solution de réhydratation orale ou la pose de la perfusion dans les cas de déshydratation sévère, la chimiothérapie (cotrimoxazole, ampicilline, tétracycline, fluoroquinolones, loperamide, diphenoxylate, métronidazole ...) et la phytothérapie. Bien que prometteuses, ces méthodes présentent des limites. La chimiothérapie non seulement peut provoquer des effets secondaires plus ou moins graves, mais elle est coûteuse, contraignante et présente les risques de développement des souches résistantes. En effet, de nombreux cas de bactéries et champignons multi résistants sont rapportés dans les pays de l'Afrique subsaharienne (**Anibal *et al.*, 2001; Akoua *et al.*, 2004; Akinyemi *et al.*, 2005**). La situation socioculturelle ainsi que la pauvreté des populations des pays en développement limitent d'une part l'accès aux soins de santé et constituent d'autre part un frein pour le respect des règles d'hygiène. Par ailleurs, la vaccination, quoi qu'étant un espoir ne peut offrir une immunité totale contre les diarrhées (**Soarés-weiser *et al.*, 2010**). Les médicaments traditionnels améliorés obtenus à partir des extraits des plantes médicinales pourraient être une alternative. En effet, selon l'OMS (**2009**), près de 80% de la population africaine utilise les plantes pour se soigner. Certaines parmi ces plantes utilisées comme anti-diarrhéiques (**joyeux *et al.*, 1995 ; Adjanohoun *et al.*, 1996 ; Khan *et al.*, 1997; Ndoye *et al.*, 1998 ; Noumi et Yomi, 2001 ; Betti, 2004 ; Noumi *et al.*, 2011; Mekou *et al.*, 2011; Tsabang *et al.*, 2012 ; Alain *et al.*, 2015**) ont fait l'objet de très peu d'études pharmaco-toxicologiques. Il s'agit en occurrence des espèces de la famille des Annonacées pourtant reconnues pour leur richesse en métabolites secondaires spécifiques (acétogénines) (**Fekam, 2004**). Les acétogénines sont reconnues pour leurs diverses propriétés biologiques (**Petit *et al.*, 2008; Boyom *et al.*, 2009; De Lima *et al.*, 2012 ; Kengni *et al.*, 2015**). En effet, ces dernières, présentes en grande concentration dans les fractions méthanoliques des organes des plantes de la famille des Annonacées sont des potentiels inhibiteurs du complexe I (NADH-Ubiquinone oxydoreductase) mitochondrial et de la NADH oxydase des membranes des cellules cancéreuses (**Alali *et al.*, 1999 ; Myoshi *et al.*, 2005**).

Par ailleurs, lors de l'invasion microbienne, on note l'émergence des marqueurs du stress tels que la présence des espèces réactives oxygénées qui sont dirigées contre les pathogènes en question (**Sarah *et al.*, 2007 ; Tamokou, 2010**). Dans plusieurs pathologies graves, l'implication des radicaux libres est prouvée (**Das et Das, 2007; Foster, 2007**). C'est le cas des diarrhées dont les radicaux libres engendrés génèrent un stress oxydatif qui altère

l'état général du malade par son action paralysante du système immunitaire (**Ranjan et al., 2006 ; Debasis et al., 2009**). Par ailleurs, le stress aigu peut provoquer une stimulation de la sécrétion des ions (Cl^- , Na^+) dans la lumière intestinale, une augmentation de la perméabilité épithéliale de l'intestin et une diminution de la fonction barrière de l'intestin grêle, entraînant de ce fait la diarrhée (**Saunders et al., 1994**). Ces observations soulignent la nécessité de rechercher des nouveaux médicaments dotés à la fois des activités antimicrobienne, anti-diarrhéique et anti-oxydante.

Dans cette optique, des études ethnobotaniques descriptives (**Kerharo et Bouquet, 1950; Adjanohoun et Aké-Assi, 1979; Koné et al., 2002**) d'évaluation des propriétés biologiques et chimiques (**Djaman et al., 1998; Kamanzi et al., 2002; Koné et al., 2004; Tra Bi et al., 2008 ; Traoré et al., 2012**) ont été menées. Malgré ces travaux, beaucoup reste à faire concernant les plantes médicinales Camerounaises en général et celles de la famille des Annonacées en particulier, notamment les activités en relation avec la diarrhée et les antioxydants.

La flore camerounaise est riche et diversifiée en plantes médicinales. Parmi celles-ci, on dénombre environ 2300 espèces appartenant à la famille des Annonacées (**Lebœuf et al., 1982**). La valorisation de cette flore peut être faite à travers la standardisation des phytomédicaments, en définissant la qualité des paramètres pharmaco-toxicologiques et en validant scientifiquement leurs vertus thérapeutiques.

Fort de tout ce qui précède, il a été question de savoir si les extraits/fractions des organes des plantes de la famille des Annonacées peuvent servir comme socle pour la formulation des médicaments traditionnels améliorés (MTA), efficaces et à large spectre d'action contre les diarrhéiques et les radicaux libres, moins toxiques et moins coûteux. Ce ci se faisant par la définition des paramètres pharmacologiques. Dans ce contexte, l'hypothèse était que le fractionnement de l'extrait brut éthanolique permet une optimisation de l'activité anti diarrhéique de la fraction méthanolique.

Le présent travail vise de façon générale à contribuer à la lutte contre les diarrhées à l'aide des plantes médicinales camerounaises de la famille des Annonaceae, notamment *Anonidium mannii* (Oliv.), *Xylopiya africana* (Benth) Oliv. et *Annona senegalensis* (Pers).

Il consiste plus précisément à :

- Faire une étude phytochimique des plantes étudiées;

- Évaluer *in-vitro* les propriétés antimicrobiennes des extraits et fractions les plus actifs des trois plantes ;
- Évaluer *in-vitro* leurs propriétés antioxydantes ;
- Évaluer la toxicité de la plante la plus active ;
- Évaluer *in-vivo* l'activité de la fraction la plus active sur deux modèles diarrhéiques.

Après cette introduction générale, le présent document s'articule autour de 3 chapitres. Le premier chapitre est consacré à la revue de la littérature sur la diarrhée, les oxydants et antioxydants ainsi que sur les plantes utilisées. Le second chapitre expose les principales méthodes et techniques utilisées pendant l'étude. La présentation des résultats obtenus et leur discussion font l'objet du troisième et dernier chapitre. Une conclusion générale suivie des perspectives achève ce document.



CHAPITRE I : REVUE DE LA
LITTÉRATURE

I-1- GÉNÉRALITÉS SUR LA DIARRHÉE

I-1-1- Définition

La diarrhée se définit comme une accélération du transit intestinal avec émission anormalement fréquente de selles trop liquides.

Selon l'OMS, c'est l'évacuation d'au moins trois selles molles ou liquides en 24 heures. Ces selles peuvent être soit glaireuses et plus ou moins sanglantes, soit se présenter sous forme de diarrhée hydrique. On entend par selle molle, une selle qui prend la forme du récipient qui la contient. Des émissions fréquentes de selles bien moulées ne sont pas une diarrhée, pas plus que des selles molles, «pâteuses», pour des nourrissons allaités au sein. On définit des syndromes cliniques de la diarrhée qui reflètent chacune une pathogénie différente et justifient des prises en charge différentes (OMS, 1989 ; OMS, 1993 ; Quinet B, 1996).

I-1-2-Syndromes cliniques de la diarrhée

Sur le plan clinique, on distingue :

I-1-2-1-Diarrhée sécrétoire

Elle est due à une augmentation des sécrétions actives ou à une inhibition de l'absorption du fluide intestinal (Lawrence, 1997). Durant la diarrhée sécrétoire, il y a peu ou pas de dommage structural au niveau de la muqueuse intestinale. Ce type de diarrhée causée par les microorganismes est le fait des toxines qu'ils produisent dans la lumière intestinale (entérotoxines) ou dans les tissus. Certaines toxines microbiennes peuvent être ingérées à un état préformé dans l'eau ou les aliments souillés (Anne et Geboes, 2002 ; Fernandez *et al.*, 2005).

Les toxines microbiennes provoquent une diarrhée caractérisée par des selles liquides et très abondantes. La toxine libérée par le vibron cholérique est un exemple typique des toxines qui déclenchent une diarrhée sécrétoire à un très haut degré de sévérité. Il en est de même des toxines produites par *E. coli* entérotoxigène, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophyla*, *Vibron parahemolyticus*, *Clostridium (perfringens et botulinum)*, des *Staphylococcus sp* et rotavirus qui stimulent la sécrétion des anions et spécialement les ions chlorures (John, 2005).

Après adhésion sur la muqueuse intestinale, les toxines pénètrent dans les entérocytes et activent soit l'adénylate cyclase avec augmentation de l'AMP_C, soit la guanylate cyclase avec augmentation du GMP_C. L'une ou l'autre de ces enzymes activées déclenche et catalyse une réaction en chaîne qui aboutit à la sécrétion accrue des électrolytes (Na⁺ et Cl⁻) et de l'eau par les entérocytes dans la lumière intestinale (Bamouni, 1989 ; OMS, 1993).

Par conséquent, pour maintenir un équilibre de charge au niveau de la lumière intestinale, les ions sodium et chlorure ainsi que l'eau sont réabsorbés. L'élimination nette et progressive de l'eau et des électrolytes du corps par les selles aqueuses conduit inexorablement à la déshydratation (**OMS, 1993 ; Lawrence, 1997**).

Dans les situations d'hypersécrétion, le rôle de l'oxyde nitrique (NO) intervenant comme médiateur dans le transport du liquide intestinal et d'électrolytes est déterminant (**Mourad et al., 1999**). Les entérotoxines se trouvant dans la lumière intestinale stimulent les cellules entérochromaffines qui libèrent le 5-hydrotryptamine (5-HT). Le 5-HT ainsi libéré stimule un neurone sensoriel afférent et après une cascade d'impulsions, le système nerveux automatique commande aux cellules épithéliales de l'intestin grêle de sécréter les électrolytes. L'inhibition de la production de NO inhibe la sécrétion des électrolytes en modulant la porosité des villosités micro vasculaires.

I-1-2-2-Diarrhée osmotique

La muqueuse intestinale de l'intestin grêle est poreuse à l'eau et aux électrolytes qui peuvent traverser pour maintenir l'équilibre osmotique entre le contenu de l'intestin et le liquide extracellulaire (**Aubert et Guittard, 1995**). Si une substance est prise sous forme isotonique, la substance et l'eau passent simplement dans l'intestin sans être absorbées. Cette situation peut provoquer la diarrhée (**Aubert et Guittard, 1995**). L'incapacité de l'intestin grêle à absorber certains solutés (pris sous forme hypertonique) entraîne une augmentation de l'osmolarité du contenu intestinal. Cette situation conduit à un excès d'eau issue des fluides corporels dans l'intestin, suivant le gradient décroissant des concentrations (**Lawrence, 1997**). Ce phénomène se produit dans des conditions impliquant la malabsorption des glucides (intolérance aux monosaccharides, carence en lactase et saccharase) ou l'ingestion de saccharides non absorbés, exemple du sorbitol utilisé comme édulcorant dans la confiserie, les laxatifs et le lactulose (**OMS, 1993 ; Lawrence, 1997**). La malabsorption de ces sucres dans l'intestin grêle provoque leur fermentation par les bactéries dans le côlon, produisant des acides gras volatils et de l'acide lactique. Ces derniers sont des puissants agents osmotiques (**Rossant et Rossant-lombroso, 2000**). Trop de magnésium, de vitamine c ou de lactose non digéré peut produire la diarrhée osmotique et la distension de l'intestin. D'autres affections qui produisent des syndromes de malabsorption (maladie cœliaques), provoquent également des diarrhées en raison de la présence de solutés non absorbés dans l'intestin (**OMS, 1993**).

I-1-2-3- Diarrhée exsudative

La diarrhée exsudative survient généralement lorsque l'épithélium intestinal est endommagé. En raison de ces dommages, il en résulte une altération de l'absorption des nutriments ou une augmentation des pertes de fluides corporels dans la lumière intestinale. Les causes les plus fréquentes sont les infections intestinales (**Aubert et Guitard, 1995; Wilson, 2005**). Les toxines provenant de microorganismes se fixent à la paroi de l'intestin et pénètrent dans les entérocytes. Cette entrée des toxines provoque des lésions cellulaires caractérisées par la destruction des microvillosités et des capillaires sanguins de la paroi épithéliale (**Anne et Geboes, 2002 ; Fernand et al., 2005**).

D'autres pathogènes produisent la diarrhée suivant des mécanismes différents. Ces agents pathogènes ont la capacité de s'installer dans l'intestin. Ils se fixent à la muqueuse de l'intestin grêle, pénètrent dans les cellules épithéliales, se multiplient et provoquent finalement la destruction de ces dernières. Par exemple, la bactérie *Shigella sp* ne colonise pas seulement la surface de l'intestin grêle, mais elle pénètre et envahit aussi la muqueuse. Pendant ce processus, de nombreux entérocytes sont détruits et les vaisseaux sanguins peuvent se rompre. Certains globules blancs du mécanisme de défense du patient meurent et sont excrétés sous forme de pus mélangé à du sang et autre liquide du tissu. Il s'en suit la dysenterie, la diarrhée tandis que le microorganisme causal est encore diffusé à d'autres tissus (**Fernandez et al., 2005**).

Les bactéries *Salmonella* causent moins de dommages locaux mais pénètrent dans les vaisseaux sanguins, causant une bactériémie (circulation des pathogènes dans le sang) et une maladie généralisée accompagnée de fièvre et de vomissements. *Escherichia coli* entéroinvasive, *Campylobacter* et *Yersinia* sont également responsables de la diarrhée invasive (**Anne et Geboes, 2002; Fernandez et al., 2005**). Lorsque les entérocytes intestinaux (ils sécrètent la lactase dans l'intestin grêle) sont détruits, l'intolérance au lait due à la carence en lactase est évidente. C'est un symptôme particulier de l'infection à rotavirus qui peut persister pendant des semaines (**Jourdan et al., 1998 ; Ouwehand et Vesterlund, 2003**). Les autres causes de diarrhée exsudative sont les maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn et colite ulcéreuse) et d'autres formes de colite par irradiation, ischémie et maladie cœliaque (**Aubert et Guitard, 1995; Wilson, 2005**).

I-1-2-4-Diarrhée motrice

La diarrhée liée à la motilité est induite par des contractions intestinales accélérées et surtout à l'iléon. Le muscle intestinal lisse est constitué de cellules (fibres) organisées en faisceaux. Ces

cellules sont caractérisées par la variation périodique de leurs potentiels membranaires qui produisent une dépolarisation ondulatoire. Ces phénomènes de dépolarisation électrique de la membrane correspondent notamment au transfert d'ions calcium dans les cellules, déclenchant ainsi une contraction musculaire (**Aubert et Guittard, 1995**). Le mécanisme de contraction du muscle lisse se met en place grâce à la liaison entre les filaments d'actine et de myosine intracellulaires, au fur et à mesure que la concentration en calcium cytoplasmique augmente (**Aubert et Guittard, 1995**). Ces muscles sont capables de se contracter et de se relâcher continuellement, provoquant ainsi des mouvements intestinaux. Les contractions intestinales les plus courantes sont:

➤ **Contraction péristaltique**

La nourriture est propulsée par les muscles longitudinaux et circulaires internes de la paroi intestinale. Derrière le bol alimentaire, les muscles circulaires se contractent, serrant et contractant l'intestin. Devant le bol, les muscles longitudinaux se contractent, raccourcissant cette section de l'intestin et permettant au bol d'avancer progressivement. Cette activité est nettement ralentie dans le tube digestif des sujets traités par le loperamide ou l'atropine (quantité suffisante pour paralyser le plexus). Les mouvements de contraction péristaltique ont une orientation anale (**Taylor et al., 1998**).

➤ **Contraction segmentée**

Les contractions segmentées divisent l'intestin grêle en plusieurs courts segments dilatés. Elles ne propulsent pas le contenu intestinal, mais elles facilitent l'absorption en permettant au chyme de se déplacer à la vitesse de contraction intestinale. De plus, ce mouvement fragmente le chyme à environ 20 à 30 petites portions par minute (**Tortora et Evans, 1986**).

➤ **Contraction pendulaire**

Cette contraction est relativement prolongée et a pour effet d'isoler les segments de l'intestin l'un de l'autre. Ce mouvement avance de 5 cm par seconde et se produit 20 fois par minute dans le duodénum et 10 fois par minute dans l'iléon (**Ganong, 2001**). Outre les activités spontanées des muscles intestinaux, l'excitation des fibres musculaires peut être déclenchée par différents stimuli: entièrement mécanique, par des neurotransmetteurs ou des hormones intestinales qui agissent spécifiquement sur certains récepteurs cellulaires. Le contrôle du transit intestinal se fait sous les effets des nerfs et des hormones (**Schmitt, 1983**).

Si la teneur intestinale se déplace trop rapidement à travers le tractus gastro-intestinal, il n'y aura pas assez de temps pour que les nutriments et l'eau soient absorbés. Un transit rapide à travers l'intestin peut provoquer une diarrhée. On pense que ce mécanisme est important dans certaines formes d'abus de laxatifs. Certains troubles fonctionnels, tels que le syndrome du

côlon irritable, sont également associés à un transit intestinal plus rapide (**Aubert et Guittard, 1995 ; Wilson, 2005**).

I-1-3- Prévalence et contexte

Chaque année, on estime à environ 1,7 milliard le nombre de personnes qui contractent la diarrhée dans le monde. Parmi celles-ci, environ 2,5 millions décèdent (**OMS, 2013**).

Chez les enfants de moins de 5 ans, l'incidence des maladies diarrhéiques dans le monde est de 3,3 épisodes par enfant et par an soit, 1,3 milliard d'épisodes de diarrhée chaque année dans le monde chez les enfants de moins de 5 ans (**Fricker, 1993 ; OMS, 1993**). Elle est la deuxième cause de mortalité chez les personnes de cette catégorie d'âge (**OMS, 2013**). En effet, parmi 1,3 milliard d'enfants qui contractent la diarrhée chaque année, 1,5 million décèdent. Ce nombre représente 18% du nombre total de décès d'enfants de moins de 5 ans et signifie que plus de 5 000 enfants meurent chaque jour de diarrhée. En 2004, 80% des 1,5 million d'enfants morts des suites de diarrhée avaient moins de 2 ans (**OMS, 2013**). L'impact de la diarrhée est particulièrement sévère chez les enfants. La diarrhée aiguë, comme celle provoquée par le choléra, peut entraîner la mort en une journée, voire même moins, si elle n'est pas traitée.

Par ailleurs, les taux d'incidence des diarrhées varient considérablement en fonction des régions et du niveau de développement des états. Aux Etats Unis d'Amérique, l'incidence des maladies liées aux infections intestinales est de 0,44 épisode par personne et par an, soit 1 épisode par personne chaque 2,3 ans. Il en résulte qu'une personne pourra consulter un médecin à peu près tous les 28 ans pour un cas de diarrhée (**Garthwright et al., 1988**). Par contre, en 2004, la diarrhée était la troisième cause de mortalité dans les pays à faible revenu, où elle a provoqué 6,9% de l'ensemble des décès (**OMS, 2013**). En Afrique, la situation des maladies diarrhéiques varie également d'une région à l'autre, d'un pays à l'autre et parfois même à l'intérieur d'un même pays.

Ainsi, au Mali, les enfants de moins de 5 ans font au total 4 à 5 millions d'épisodes de diarrhée par an. Environ 57% des décès dans cette tranche d'âge sont associés à la diarrhée (**Pritech, 1989**). La mortalité associée à la diarrhée est de 60,8% en Mauritanie, avec une incidence de 9,8 épisodes par enfant et par an (**Pritech, 1989**).

Au Sénégal, l'incidence des maladies diarrhéiques est de 9 épisodes par enfant de moins de 12 mois et par an, elle est de 6,5 épisodes chez les enfants de 1 à 4 ans (**Pritech, 1989**).

En Côte d'Ivoire, on compte 6 épisodes par enfant et par an en milieu rural alors qu'en milieu urbain l'incidence est de 5 épisodes par enfant et par an (**Pritech, 1989**).

Au Maroc, la mortalité due aux diarrhées était de 26,7% en 1988 chez les moins de 5 ans. Chacun d'eux fait en moyenne 8 épisodes diarrhéiques par an.

Au Burkina Faso, la diarrhée constitue la deuxième cause d'hospitalisation chez les enfants de moins de 5 ans avec un taux de 21,4%. L'incidence est en moyenne de 6,8 épisodes par enfant et par an. La prévalence reste élevée (11,9%). En 1986, 32284 enfants de moins de 5 ans sont décédés des suites de diarrhée soit 36% des décès dans cette tranche d'âge (**Pritech, 1989 ; Malan, 1993**).

Au Cameroun, le taux de prévalence des diarrhées est d'environ 18,9% avec une forte incidence dans les zones rurales (environ 19,7%) comparé à celui de la ville de Yaoundé (environ 14,4%) (**Nguendo et al., 2008**). On compte environ 149 décès pour 1000 nouveaux nés des suites de diarrhée (**OMS, 2006**).

La figure 1 présente l'incidence des diarrhées suivant l'âge à l'échelle mondiale. Le Tableau I quant à lui exhibe la mortalité infantile par suite de diarrhée pour 1000 enfants de moins de 4 ans/année dans 4 régions du monde.

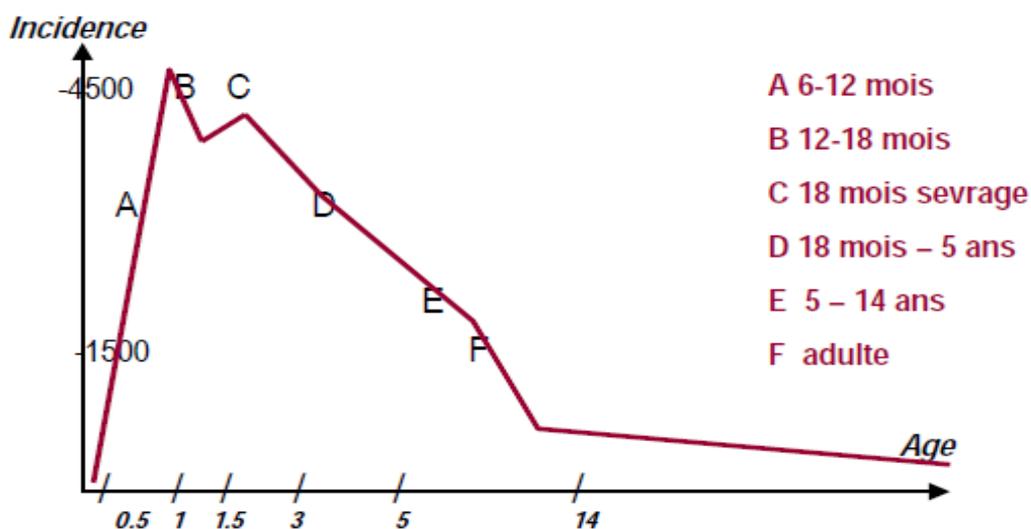


Figure 1 : Incidence des maladies diarrhéiques selon l'âge (Nelson, 2001)

Tableau I : Mortalité infantile par suite de diarrhée pour 1000 enfants < 4 ans /année (Nelson, 2001)

Régions du monde	Taux de décès / 1000 enfants
Amérique latine	4,2
Afrique Subsaharienne	10,6
Moyen Orient	5,8
Asie Pacifique	3,2
Moyenne Générale	6,8

I-1-4-Étiologie de la diarrhée

La diarrhée est un symptôme fréquent à étiologie diverse. Elle peut résulter de l'une des conditions suivantes (**Modigliani, 1990**):

- une augmentation de la quantité du fluide et d'ions dans l'intestin, supérieure à sa capacité maximale de réabsorption; Il s'agit de la diarrhée «volumogène» observée dans le syndrome de Zollinger-Ellison;
- un transit gastro-intestinal accéléré, notamment par le côlon, comme dans le cas de "motilité diarrhée " du à une augmentation de la motilité colique;
- la diarrhée osmotique due à l'ingestion de solutés non résorbables, comme dans les syndromes de malabsorption;
- la diarrhée sécrétoire due au trouble du transport du NaCl dans l'intestin; Cette diarrhée peut être d'origine bactérienne ou endocrinienne;
- la diarrhée consécutive à des anomalies morphologiques de l'intestin grêle et / ou du côlon.

La diarrhée est souvent due à l'une des situations ci-dessus, auxquelles il faut ajouter l'exsudation du sang, des mucosités et des protéines dans l'intestin (**Modigliani, 1990**). En raison de l'hétérogénéité physiologique, les risques de contracter la diarrhée varient selon l'âge. Ainsi, les nouveau-nés et les vieillards sont les plus exposés (**Ratnaite, 1999**). La cause de la diarrhée dépend aussi de l'état immunitaire de l'individu, de la situation géographique, des normes d'hygiène alimentaire, d'assainissement, d'approvisionnement en eau et de saison (**Jian et al., 2002**). Selon son origine, la diarrhée peut être infectieuse ou non infectieuse (fonctionnelle) (**Thomas et al., 2003**).

I-1-4-1-Diarrhées infectieuses

Les diarrhées infectieuses sont causées par les microorganismes comme les bactéries, les champignons, les virus ou les parasites, par consommation de l'eau et des nourritures contaminées (**NIH, 2003 ; Yao et al., 2012**). Ces microorganismes prospèrent dans l'intestin grêle et peuvent y causer des dommages et éventuellement la diarrhée. Des agents pathogènes appartenant à ces différents groupes peuvent se retrouver dans une même selle au cours d'épisodes diarrhéiques. Les diarrhées infectieuses encore appelées diarrhées aiguës ou diarrhées à court terme sont contagieuses et sont transmises le plus souvent par l'eau contaminée par les fèces. Exemple de la fuite d'eau des toilettes publiques, des latrines, des fosses septiques et des puits dans les sources et les cours d'eau utilisés par les populations.

Les excréments d'animaux contiennent également des microorganismes pouvant provoquer la diarrhée chez l'homme (NIH, 2003). Les diarrhées infectieuses sont plus courantes lorsqu'il y a des pénuries d'eau salubre pour la boisson, la cuisine, la toilette et le nettoyage.

La nourriture est une source importante des diarrhées lorsqu'elle est préparée et gardée dans les conditions non hygiéniques. L'eau peut contaminer la nourriture lors de l'irrigation ou de l'arrosage. Les poissons et d'autres produits halieutiques sortis fraîchement des eaux polluées peuvent également provoquer les diarrhées (NIH, 2003).

Les diarrhées infectieuses sont le plus souvent toxino-géniques ou invasives. Les cas les plus typiques des diarrhées toxino-géniques sont le cholera et les diarrhées induites par *E.coli* entérotoxino-gène (ETEC). Les diarrhées invasives sont abondantes et responsables des déshydratations sévères pouvant conduire à la mort. Les déshydratations constituent leur principal signe clinique ; on note une absence de la bactériémie et des lésions au niveau de la muqueuse intestinale (OMS, 2000). La diarrhée infectieuse qui dure quelques jours ou quelques semaines est dite persistante.

Les diarrhées infectieuses représentent un problème de santé majeur dans le monde, surtout dans les pays en développement où elles sévissent à l'état endémique (Dupéron, 1997). Elles représentent 30% des maladies en milieu rural et 80% de l'ensemble des cas de diarrhées (OMS, 1993).

I-1-4-1-1-Agents pathogènes responsables des diarrhées infectieuses

La liste des agents pathogènes ne cesse de s'allonger au fil des années. Le développement des techniques de laboratoire, notamment la biologie moléculaire, a permis une meilleure identification de ces agents.

Le tableau II : présente les principales étiologies en cause des gastroentérites et entérocolites par groupe et par ordre d'importance.

Tableau II : Principaux germes mis en cause dans les diarrhées infectieuses dans les pays en développement par groupe et par ordre d'importance (Fagundes-Neto et Scaletsky, 2000 ; Pichard, 2002)

Bactéries	Virus	Parasites	Champignons
<i>Escherichia coli</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Candida sp</i>
<i>Salmonella sp</i>	<i>Norwalk</i>	<i>Giardia</i>	<i>Blastocystis</i>
<i>Shigella sp</i>	<i>Norwalk like</i>	<i>Cryptosporidium</i>	
<i>Campylobacter</i>	<i>Adenovirus</i>	<i>Strongyloides</i>	
<i>Yersina</i>	Autres	<i>Trichinella</i>	
<i>Staphylococcus sp</i>		<i>Ballantidium</i>	
<i>Clostridium sp</i>		<i>Schistosoma</i>	
<i>Vibrio cholerae</i>		Autres	
<i>Aeromonasa</i>			
<i>Bacillus cereus</i>			
Autres			

➤ Bactéries

Ce sont des organismes unicellulaires, et cosmopolites. Elles sont l'une des principales causes des maladies non héréditaires. Les bactéries sont affectées par des substances antibiotiques qui agissent sur elles selon différents mécanismes (Hornby, 1985). Plusieurs types de bactéries sont ingérés par consommation des aliments ou de l'eau contaminés. Parmi les exemples les plus courants figurent les espèces *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* et *Staphylococcus sp* (Pichard ; 2002 ; NIH, 2003; Nathan et Richard, 2004).

✓ *Escherichia coli*

Paradoxalement, *E. coli*, espèce la moins virulente comparativement à *Vibrio cholerae*, à *shigella sp* et à *Salmonella sp*, est la plus incriminée comme responsable des diarrhées infectieuses dans les pays en développement (Le Minor et Richard, 1993 ; Fagundes-Neto et Scaletsky, 2000 ; Pichard, 2002 ; CHU-PS, 2003 ; Germani et Le Bouguéneq, 2008). Il fait l'objet d'un point particulier.

✓ *Salmonella*

Parmi les espèces de *Samonella* impliquées dans les diarrhées, on distingue: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella virchow*, *Salmonella typhi* et *Salmonella paratyphi* A, B et C. Ils sont responsables de la fièvre entérique et des toxi infections (SLeigh et Timbury, 1998). Si la concentration de *Salmonella* dans l'intestin grêle atteint environ 10^6 à 10^8 cellules par gramme de matières fécales fraîches, la diarrhée est susceptible de se produire dans les 24 heures. Cette diarrhée est caractérisée par des fèces aqueuses, des douleurs abdominales, des vomissements et une température corporelle élevée (39 à 40°C) (Chritian et Marc, 1993).

✓ *Shigella*

Les espèces du genre *Shigella* sont des bactéries à Gram négatif, mobiles et en forme de bâtonnets. Les espèces de ce genre se différencient par l'antigène somatique O: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* et *Shigella sonnei*. La diarrhée à *Shigella* affecte les humains et les singes (**Keusch et Bannish, 1989**). Elle est contractée par voie orale directement ou indirectement et la période d'incubation peut durer de 36 à 72 heures (**Rambaud, 2000**). Les espèces de *Shigella* envahissent l'intestin grêle et endommagent la muqueuse intestinale, où elles provoquent la dysenterie (dysenterie bacillaire). Elles sécrètent une cytotoxine (verotoxine) qui inhibe l'absorption intestinale. Les évacuations fécales d'individus infectés sont suivies de douleurs abdominales intenses (**Caeiro et Dupont, 1998 ; Rambaud, 2000**).

✓ *Campilobacter jejuni* et *C.coli*

Campilobacter jejuni et *C. coli* sont des bactéries à Gram négatif, mobiles, incurvées ou sous forme des baguettes spiralées. Ils provoquent de la fièvre et des douleurs abdominales sévères pouvant faire penser à la péritonite ou la perforation de la membrane qui enveloppe les organes abdominaux (**Caeiro et Dupont, 1998**). *Campilobacter jejuni* figure parmi les causes de diarrhées bactériennes les plus courantes dans les pays industrialisés et en développement, avec environ 400 millions de cas dans le monde (1,5 million de cas aux Etats-Unis d'Amérique seulement) (**Rivoal et al., 2005**).

✓ *Yersinia enterocolitica*

Yersinia est une bactérie à Gram négatif en forme de tige qui sécrète l'entérotoxine. Il affecte principalement les enfants et la transmission se fait par les aliments infectés. Environ 90% des cas de diarrhée de *Yersinia* provoquent une gastrite aiguë, des douleurs abdominales. Il y a également une présence du sang et du mucus dans les fèces (**Puylaert et al., 1989; Kanan et Abdulla, 2009**).

✓ *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus sont des cocci Gram positif qui causent une intoxication alimentaire. La période d'incubation est courte (3-15 heures). Ces bactéries par leurs toxines provoquent des vomissements et de la diarrhée en moins de 24 heures (**Richard, 1993; Caeiro et Dupont, 1998**).

✓ *Clostridium*

Les espèces du genre *Clostridium* comprennent: *C. difficile*, *C. perfringens* et *C. botulinum* (**Marteau et Lavergne, 1993**). La diarrhée associée au *C. difficile* est la plus fréquente et la plus grave de ces espèces, avec un taux de mortalité d'environ 25% chez les

personnes âgées. Elle affecte les patients plus âgés, fragiles, hospitalisés et aussi les patients plus jeunes qui sont immunodéprimés. *C. difficile* est une bactérie anaérobie, à Gram positif, formant des spores, qui est la principale cause identifiable de diarrhée associée aux antibiotiques (Ambrose *et al.*, 1995 ; John, 2005). *C. perfringens* provoque une diarrhée hydro-électrolytique tandis que *C. botulinum* par la toxine qu'il secrète provoque une diarrhée fugitive pouvant paralyser le système respiratoire (Mateau et Lavergne, 1993).

✓ *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae est une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet qui n'affecte que les humains. Il est transmis dans des mauvaises conditions d'hygiène et la période d'incubation est de 48 à 72 heures. *Vibrio cholerae* provoque le choléra, un véritable problème de santé dans de nombreux pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique centrale et du Sud où il est endémique. La prévalence du *Vibrio cholera* est cependant incertaine en raison des faiblesses du système de surveillance existant, des difficultés à distinguer cliniquement le cas de choléra léger ou modéré des autres diarrhées aiguës d'origine différente et des échecs à signaler des cas ou même des épidémies à l'OMS. Environ 5 à 10% seulement des cas de choléra sont réellement signalés (Cholera, 2004). Le choléra est une diarrhée aqueuse aiguë très déshydratante, accompagnée des vomissements. La forme aiguë de la maladie (choléra gravis) conduit en quelques heures à l'hypovolémie, l'acidose et la carence en potassium due à la perte de l'eau et des électrolytes (Sack *et al.*, 1980 ; Takeda et Sack, 2008).

➤ Virus

Ces dernières années, les virus entériques impliqués dans la diarrhée infantile ont été reconnus grâce au microscope électronique et la culture réussie des selles (Aftim *et al.*, 1984). Parmi les virus entériques, les rotavirus restent la principale cause de diarrhée chez les enfants dans le monde. Avant qu'un vaccin contre le rotavirus ne soit autorisé en 1998, environ 527000 enfants décédaient chaque année de diarrhées sévères causées par une infection à rotavirus, la plupart d'entre eux survenant dans des pays en développement (Asie du Sud et Afrique subsaharienne) (Kapikian, 2001). D'autres virus provoquant la diarrhée sont les adénovirus entériques, les astrovirus, les coronavirus, les virus Norwalk et les calicivirus. Les norovirus sont responsables de la plupart des épidémies d'hiver de la gastroentérite dans les pays industrialisés (Aftim *et al.*, 1984 ; Clark et Mckendrick, 2004). Aux Etats-Unis, 30 à 40 % des cas de diarrhées infectieuses sont dus à des virus (Blacklow et Greenberg, 1991).

➤ Champignons

La diarrhée fongique est principalement liée à la prolifération des levures du genre *Candida* dont la propagation la plus sauvage est due à *Candida albicans* et *Candida glabrata* (Sleigh et Timbury, 1998). Bien que ces levures soient présentes dans la flore intestinale

normale, elles deviennent pathogènes lorsque l'équilibre microbien intestinal est modifié ou en cas de déficit immunitaire (**Meeroff et al., 1980**). Quoique la diarrhée causée par une infection fongique soit rare, sa suspicion clinique est nécessaire en particulier lors de la diarrhée chronique prolongée. *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* et d'autres espèces de *Candida* sont connus comme une éventuelle cause de la diarrhée chez l'homme (**Monica, 1984; Sungkanuparth et al., 2003**). Ces levures provoquent des lésions de la muqueuse intestinale qui conduisent à la diarrhée. Le diagnostic clinique repose sur la présence d'une forte charge fécale de *Candida* et sur l'absence d'autres causes possibles (**Meeroff et al., 1980**).

➤ **Protozoaires**

Ces parasites peuvent pénétrer dans le corps par consommation de la nourriture et de l'eau contaminés ou par contact. Des exemples typiques incluent *Entamoeba histolitica* et *Giardia lamblia* qui s'installent dans l'intestin, où leurs déchets (toxines) provoquent la diarrhée (**NIH, 2003; Nathan et Richard, 2004**).

✓ *Entamoeba histolitica*

Ce microorganisme est habituellement acquis dans le tropique. Il envahit l'intestin grêle et provoque la dysenterie amibienne. La diarrhée causée par *Entamoeba histolitica* se présente souvent comme une diarrhée chronique insidieuse qui peut être confondue avec la colite ulcéreuse (**Caeiro et Dupont, 1998**). *E. histolitica* présente trois formes physiopathologiques:

- forme non pathogène végétative où le microorganisme est situé à la surface de la muqueuse du côlon de la personne en bonne santé;
- forme pathogène végétative où le microorganisme pénètre la surface de la muqueuse et crée un abcès dans la sous-muqueuse et risque d'atteindre le foie ou les poumons à travers les vaisseaux lymphatiques ou sanguins;
- la forme kystique qui peut dégager les formes végétatives mentionnées (**Aubert et Guittard, 1995**).

✓ *Giardia lamblia*

Ce protozoaire cosmopolite flagellé est la cause la plus fréquente de la diarrhée persistante du voyageur. Il existe deux formes: une forme végétative (*giardia trophozoïte*) présente dans l'intestin grêle supérieur et responsable de la diarrhée due à la malabsorption, et une forme de kystique résistant, pouvant servir pour la dissémination (**Aubert et Guittard, 1995; Caeiro et Dupont, 1998**). Les trophozoïtes ne sont pas envahissants mais provoquent des ballonnements après la consommation de la nourriture parce que les aliments non digestifs traversent l'intestin grêle supérieur et produisent une distension osmotique. Parfois, cette affection peut être asymptomatique ou associée à une diarrhée intermittente, à une anorexie, à des nausées et à une épigastrite (**Aubert et Guittard, 1995; Caeiro et Dupont, 1998**). D'autres

protozoaires comme *Crysporidium sp*, *Cyclospora sp*, *Isospora belli* et *Enterocystozoom bieneusi* sont également connus comme une éventuelle cause de la diarrhée (**Aubert et Guittard, 1995; Caeiro et Dupont, 1998**).

➤ Nématodes

La schistosomiase est causée par trois nématodes principaux: *Schistosoma mansoni* et *S. japonicum* qui ont tous deux une affinité pour l'intestin humain et d'autres viscères; *S. haematobium* qui affecte principalement la vessie humaine (**Caeiro et Dupont, 1998**). Leur répartition dépend de celle de l'escargot dans lequel se produit le cycle de vie des schistosomes. *Schistosoma mansoni* se trouve en Afrique, en Amérique et aux Caraïbes alors que *S. japonicum* se trouve en Asie. Les larves pénètrent la peau des personnes qui se baignent dans des eaux stagnantes. Les adultes s'accouplent et pondent des œufs dans l'intestin, ce qui peut provoquer une inflammation aiguë ou chronique pouvant conduire à une ulcération intestinale et à un rétrécissement de la lumière intestinale. La diarrhée chronique peut survenir chez des patients ayant une infection à long terme (**Caeiro et Dupont, 1998**).

I-1-4-1-2-E. coli commensal et acquisition du pouvoir pathogène

La figure 2 montre l'organisation schématique de cette espèce bactérienne.

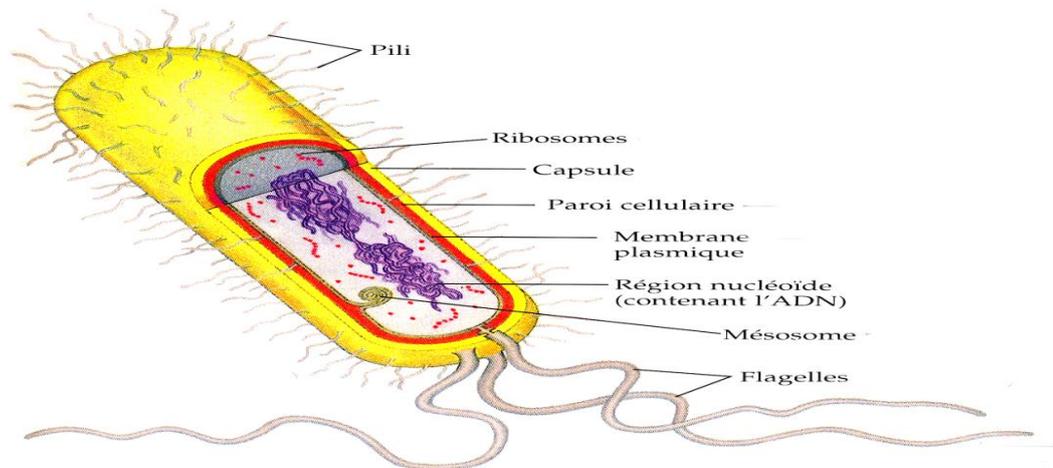


Figure 2 : Organisation schématique de la structure d'une cellule d'*Escherichia coli* (Jubelin, 2005).Echelle : 1325x1276.

Selon les considérations taxonomiques, l'espèce *E. coli* appartient au règne des Procaryotae, au domaine des Bacteria, au phylum des Proteobacteria, à la classe des Gamma proteobacteria, à l'Ordre des Enterobacteriales, à la famille des Enterobacteriaceae et au Genre *Escherichia* (**Garrity et al., 2005**).

➤ **Ecologie d'*Escherichia coli***

Escherichia coli est une bactérie commensale du tube digestif (partie distale de l'iléon et du côlon) de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud, qu'elle colonise dès les premières heures de la naissance (**Le Minor et Véron, 1989**). Fréquemment isolé de cet organe et des fèces de mammifères, *E. coli* est un bacille à Gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae. De 2 à 4 µm de long sur 0,4 à 0,6 µm de large, cocciforme ou fusiforme, parfois mobile grâce à une ciliature péritriche (**Sleigh et Timbury, 1998**), *E. coli* constitue l'espèce bactérienne dominante de la microflore anaérobie facultative de l'intestin des animaux à sang chaud. Il représente à lui seul 80% de la flore bactérienne aérobie de l'intestin, soit 10^7 à 10^9 cellules par gramme de matières fécales fraîches (**CHU-PS, 2003**). Sa présence dans l'environnement et dans l'eau est un indice de contamination récente par des matières fécales (**Edberg et al., 2000 ; Santé Canada, 2006**).

Escherichia coli fait partie du microbiote intestinal, véritable écosystème hébergeant plus de 5600 taxons différents (classification basée sur le pyro séquençage des ADNr 16s) (**Dethlefsen et al., 2008**). L'homme héberge cette bactérie qui lui rend en retour des services indispensables comme la modulation permanente du système immunitaire, la régulation de la prise de poids, la dégradation des aliments indigestes, la synthèse de certaines vitamines et la protection vis-à-vis de la plupart des infections pathogènes (**Le Minor et Véron, 1989**). De plus, ce microbiote participe au développement, à la différenciation et à l'homéostasie des muqueuses. Son implication possible est maintenant clairement proposée dans l'étiologie du cancer sporadique du côlon (**Hooper et al., 2002 ; Macdonald et Monteleone, 2005**).

Dans les conditions physiologiques normales, *E. coli* est donc une bactérie commensale. Cependant, sa nature inoffensive peut être remise en cause dans de nombreuses situations comme en présence de brèches dans l'épithélium intestinal ou en cas d'immunodépression. De plus, certaines souches peuvent occuper des niches écologiques autres que l'intestin : c'est ainsi qu'elles peuvent survivre dans le tractus urinaire. Ces souches se sont dotées d'un système d'adhésion efficace constitué de nombreux pili ainsi que d'un important système de captation du fer constitué de sidérophores indispensables pour la survie dans cet environnement (**Wiles et al., 2008**). Sa capacité d'adaptation à de nouvelles niches écologiques est donc conférée par l'acquisition de gènes spécifiques (**Blattner et al., 1997**).

La détermination des sérotypes (**Kauffmann, 1947**) est le premier système ayant permis la différenciation des souches pathogènes des souches commensales chez l'homme d'abord puis chez les animaux (**Sojka, 1965 ; Cooke, 1985 ; Kaeckenbeeck, 1993 ; Lior, 1994 ; Sussman, 1997**). En effet, certains sérotypes ne sont jamais ou sont rarement associés à des pathologies,

tandis que d'autres le sont très fréquemment. Plus tard, plusieurs chercheurs ont reconnu l'existence, pour les souches pathogènes, de propriétés particulières dites de virulence, directement ou indirectement reliées à leur pouvoir pathogène. Cette pathogénicité est la capacité d'*E. coli* à acquérir par transfert horizontal des gènes codant pour des facteurs de virulence et à les transmettre à la descendance. Ces gènes (Figure 3) sont portés par des éléments génétiques mobiles comme des transposons (l'entérotoxine ST), des plasmides (l'entérotoxine LT), des phages (la toxine Shiga) ou des îlots de pathogénicité (PAI, pathogenicity island) comme le LEE (locus d'effacement des entérocytes) (Kaper *et al.*, 2004). Ces derniers permettent aux bactéries de coloniser les surfaces muqueuses de l'hôte, de les franchir, de résister aux défenses internes ou de produire un effet toxique sur cet hôte, avec apparition de lésions et de signes cliniques (Cooke, 1985 ; Pohl, 1993 ; Lior, 1994 ; Sussman, 1997 ; Wray et Woodward, 1997). La détermination des combinaisons de propriétés particulières associées à la virulence d'une souche constitue un nouveau moyen de typage d'*E. coli*, que l'on désigne sous le néologisme de pathotypie.

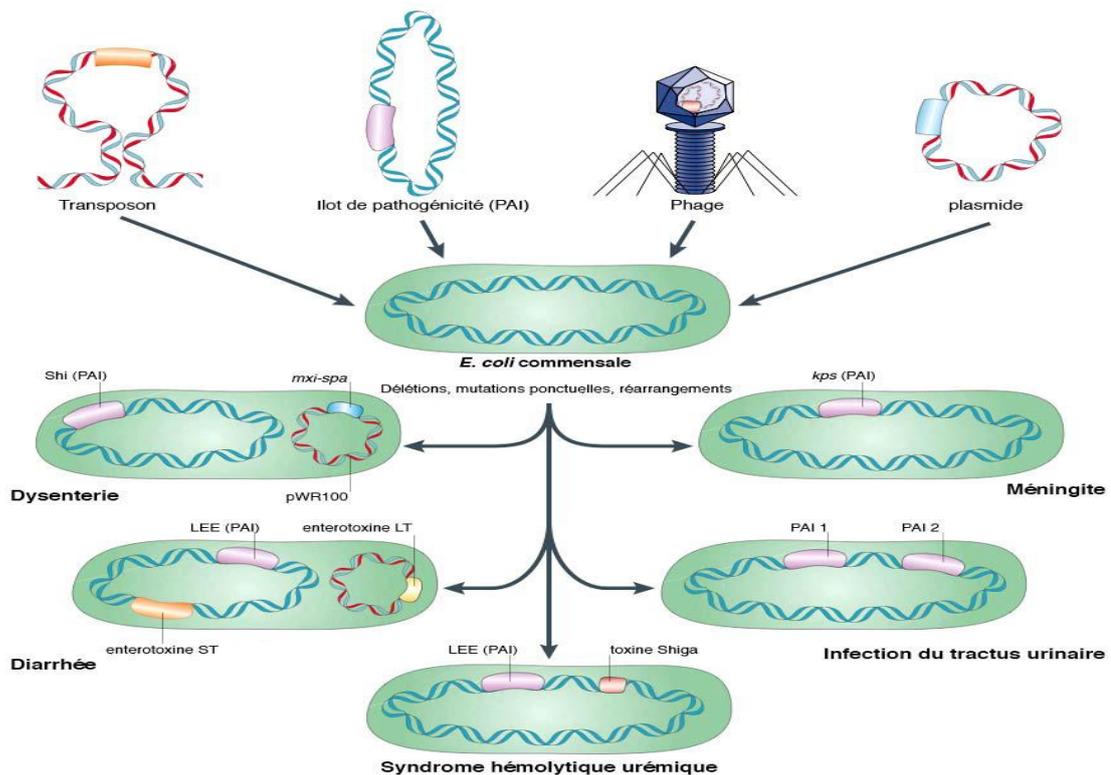


Figure 3 : Contribution des éléments génétiques mobiles dans l'évolution d'une *E. coli* commensale vers un caractère pathogène (Kaper *et al.*, 2004).

➤ **Différentes souches pathogènes d'*E. coli* et propriétés de physiopathologie**

Escherichia coli, qui est une bactérie commensale du tube digestif, peut éventuellement se comporter comme un pathogène opportuniste. Disposant des propriétés ou produisant des

facteurs spécifiques responsables de son pouvoir pathogène, cette espèce comprend de nombreuses souches pathogènes pour l'Homme et les Animaux (**Mainil et al., 2001 ; Mainil, 2003**). Les souches pathogènes rencontrées ont été classées en pathovars, groupements de souches pathogènes d'une même espèce classées, en fonction de symptômes et de caractéristiques pathogéniques propres qui dépendent des facteurs de virulence différents exprimés par la bactérie. On distingue les pathovars intestinaux responsables d'infections intestinales telles que les diarrhées et les pathovars extra-intestinaux à l'origine d'infections extra-intestinales telles que les infections urinaires et les méningites (**Germani et Sansonetti, 1999 ; Mainil, 2003**). Toutes les souches pathogènes d'*E. coli* passent par quatre étapes dans leur relation avec leur hôte avant de pouvoir véritablement exercer leur pouvoir pathogène. Ces étapes sont d'ailleurs classiques pour l'ensemble des bactéries pathogènes. Il s'agit de :

- la colonisation des surfaces muqueuses,
- franchissement de ces muqueuses,
- la résistance aux défenses internes de l'organisme,
- la production d'un effet toxique.

La première et la quatrième sont réalisées par l'ensemble des souches pathogènes entériques, entérotoxémiques, urinaires et mammaires ; les étapes deux et trois le sont par les souches envahissantes, septicémiques, bactériémiques et systémiques (**Mainil, 2003**).

✓ **Pathovars d'*Escherichia coli* extra-intestinaux**

- *Escherichia coli* uropathogène ou «Uropathogenic *E. coli*» en abrégé UPEC

Escherichia coli est la bactérie la plus fréquemment mise en cause dans les infections de l'arbre urinaire et, dans les cas plus rares, de la vésicule biliaire (**Le Minor et Véron, 1989 ; Manges et al., 2001**). Les infections à colibacille sont dues à la migration des germes de cette espèce du tube digestif vers l'arbre urinaire par voie ascendante et externe.

- *Escherichia coli* agent des méningites et des septicémies

Escherichia coli est parfois responsable de 50% des septicémies (bactériémies) dues à des bactéries à Gram négatif et de 4% des méningites bactériennes touchant principalement les nouveaux nés (**CNR, 2005**). Ces méningites à *E. coli* sont responsables d'un taux élevé de mortalité et laissent souvent des séquelles chez les survivants (**Le Minor et Véron, 1989 ; CNR, 2005**).

- ✓ **Autres pathologies liées à *Escherichia coli* (non responsables de diarrhées)**
- **Infections abdominales et bactériémies**

Certaines souches d'*E. coli* sont souvent responsables de suppurations péritonéales, biliaires, appendiculaires ou génitales et sont caractérisées par un fort pouvoir invasif. Elles ont un pouvoir cytotoxique sur les polynucléaires, occasionnent des dégâts urinaires en cas de bactériémie, opposent une résistance à la phagocytose (par la capsule) et possèdent des systèmes de captation du fer (CHU-PS, 2003).

- **Choc endotoxinique**

La fièvre, le collapsus et les hémorragies sont les principaux symptômes du redoutable choc septique qu'engendre la lyse massive dans l'organisme d'entérobactéries qui libèrent de grandes quantités de lipopolysaccharides. C'est le syndrome de réponse inflammatoire systémique provoqué par une libération massive d'IL1 (Interleukine 1) et de TNF (Tumor Necrosing Factor) (CHU-PS, 2003).

✓ **Pathovars intestinaux d'*Escherichia coli* et facteurs de virulence**

Les souches d'*Escherichia coli* agents d'entérites forment un groupe hétérogène au regard des mécanismes de pathogénicité impliqués. Ces souches représentent une cause importante de diarrhées, particulièrement chez le jeune enfant dans les régions pauvres et les régions en développement (Le Minor et Richard, 1993 ; Germani et Le Bouguéneq, 2008). Six types de souches responsables de diarrhées sont reconnus (Nataro et Kaper, 1998 ; Bopp *et al.*, 2003 ; Clarke *et al.*, 2003 ; Mainil, 2003 ; Germani et Le Bouguéneq, 2008), il s'agit des souches entérotoxigènes (ETEC), entéro-pathogènes (EPEC), entéro-agrégatives (EAaggEC), entéro-invasives (EIEC), à adhésion diffuse (DAEC) et entéro-hémorragiques (EHEC) (Figure 4).

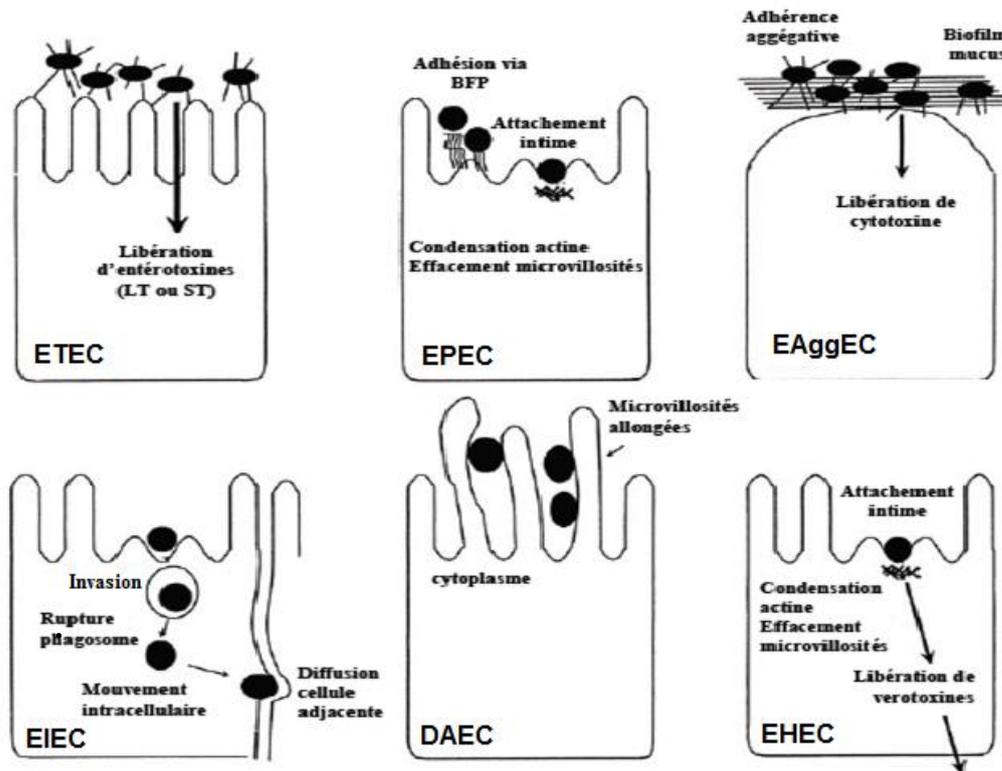


Figure 4 : Pathogénie associée aux six classes d’*E. coli* responsables de diarrhées (Nataro et Kaper, 1998)

- **Souches d’*E. coli* entérotoxigènes ou «Enterotoxigenic *E. coli*» en abrégé ETEC**

Les souches d’*E. coli* entérotoxigènes sont responsables de diarrhées infantiles dans les pays en développement à bas niveau d’hygiène. Elles représentent environ 25 % des étiologies diarrhéiques de l’enfant de moins de 3 ans et de la diarrhée dite des voyageurs ou « *tourista* » (Germani et Sansonetti, 1999 ; Clarke, 2001 ; Berche, 2003). Les eaux de boisson et la nourriture contaminées sont à l’origine de l’infestation, la dose infectante étant voisine de 10^8 bactéries/mg de matières fécales fraîches. La morbidité et la mortalité dues aux diarrhées à ETEC sont proches de celles dues au choléra en raison de la fréquence élevée des infections et de leur distribution à l’échelle du globe (Le Minor et Richard, 1993 ; Germani et Sansonetti, 1999 ; Clarke, 2001).

L’infection par des ETEC s’effectue tout d’abord par la colonisation de l’intestin grêle, qui nécessite la présence des facteurs d’adhésion sous forme de fimbriae, puis par la production d’entérotoxines thermostables (ST) et thermolabiles (LT) (Milon, 1993 ; Bopp *et al.*, 2003 ; Baraduc *et al.*, 2000 ; Berche, 2003).

Les fimbriae sont des appendices filamenteux, rigides, formés de sous-unités protéiques, et de diamètre inférieur à celui des flagelles. Ils confèrent à la bactérie un pouvoir d’adhésion spécifique (les souches humaines ne peuvent adhérer qu’aux entérocytes d’origine humaine) et

particulier, car les ETEC restent attachés au sommet des microvillosités entérocytaires qui demeurent intactes (**Darfeuille-Michaud et al., 1990**). Ces structures souvent appelées adhésines ne sont pas exclusives des ETEC. Il existe aussi des fimbriae d'adhésions spécifiques chez les EPEC. Une dizaine de facteurs d'adhésion appelés CFA (Colonization Factor Antigen) ou CSF (Coli Surface Factor), dont les antigènes F2 (CFA/I) et F3 (CFA/II), sont des pili trouvés chez l'homme (**Aubel et al., 1989**). Ils ont chacun sa propre spécificité antigénique et ses propres récepteurs sur les entérocytes et sur les hématies ; ils confèrent généralement aux bactéries des propriétés hémagglutinantes (**Baraduc et al., 2000**).

Les entérotoxines sont la cause d'une diarrhée aqueuse accompagnée d'une importante déshydratation ; les molécules thermolabiles font partie de la famille des entérotoxines cytotoxiques à laquelle appartient la toxine cholérique. Les ETEC peuvent produire une ou plusieurs toxines en combinaison.

La toxine thermolabile (LT) apparentée à celle du choléra est constituée de deux sous-unités polypeptidiques ; elle a un poids moléculaire élevé. Sa sous-unité A a la capacité d'affecter la régulation du système adénylcyclasique (adényl cyclase) des cellules (en particulier entérocytaires), ce qui accroît la concentration de l'AMP cyclique dans la muqueuse. L'augmentation de l'AMPc intracellulaire agit de deux façons qui conduisent à une fuite hydroélectrolytique (sécrétion active d'eau et électrolytes) dans la lumière intestinale. Dans les cellules villositaires, elle entraîne une diminution de l'absorption de Na^+ et donc de Cl^- et d' H_2O . Dans les cellules des cryptes, elle entraîne un effet sécrétoire direct en augmentant la sécrétion de Na^+ et donc de Cl^- et d' H_2O . Sa sous-unité B formée par un agrégat de 5 monomères est responsable de la spécificité d'adhésion de la toxine sur le ganglioside de la surface entérocytaire, le GM1 ; d'où la diarrhée aqueuse, riche en électrolytes (**Milon, 1993 ; Bopp et al., 2003**). La toxine LT est détruite en 30 minutes à 65°C .

La toxine thermostable (ST) est présente sous 2 types : STa et STb. La toxine STa ou ST1 est un petit polypeptide d'une vingtaine d'acides aminés dont le poids moléculaire est bas (environ 2000 KDa) ; elle entraîne une activation de la guanylate-cyclase des entérocytes et cause une augmentation de la guanosine-mono-phosphate (GMP) cyclique et une sécrétion hydroélectrolytique. Elle demeure toxique même après avoir été chauffée à 100°C pendant 30 minutes (**Darfeuille-Michaud et al., 1990**).

La production des toxines LT et ST est donc contrôlée par des plasmides ; cela signifie que n'importe quel sérotype d'*E. coli* peut se transformer en une souche entérotoxino-gène. Elles ne tuent pas les cellules auxquelles elles adhèrent, mais produisent des troubles de croissance

et du métabolisme à l'image de l'activité hormonale (**Germani et Sansonetti, 1999 ; Clarke, 2001**).

- **Souches d'*E. coli* entéropathogènes ou «Enteropathogenic *E. coli*» en abrégé EPEC**

Les souches EPEC sont responsables de diarrhées aqueuses et de gastro-entérites infantiles (GEI). L'infection s'effectue initialement par l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales et à posteriori par la capacité d'une protéine membranaire, l'intimine, à causer des lésions d'attachement et d'effacement aux microvillosités intestinales (**Jerse *et al.*, 1990**).

Les EPEC furent les premiers *E. coli* à être incriminées comme étant la cause des diarrhées infantiles dans les années 1940 et 1950 (**Chen et Frankel, 2005**). Elles provoquent des diarrhées aiguës accompagnées de fièvres, de malaises et de vomissements (**Levine, 1987**). De nos jours, les diarrhées à EPEC sévissent principalement dans les pays en voie de développement et ces pathogènes posent un véritable problème de santé publique car le taux de mortalité induit chez les jeunes enfants peut s'élever jusqu'à 30% (**Senerwa *et al.*, 1989 ; GSE, 2003**). Les sérogroupe principalement responsables des épidémies sont O111 et O26 (**Le Minor et Richard, 1993 ; Gismero-Ordóñez *et al.*, 2002 ; Clarke *et al.*, 2003 ; Germani et le Bouguéneq, 2008**).

La pathogénie des EPEC est leur capacité à induire des lésions histopathologiques intestinales dites lésions d'attachement et d'effacement ou A/E (**Staley *et al.*, 1969 ; Knutton *et al.*, 1987**). Ces lésions se caractérisent par un attachement des bactéries sur la membrane des entérocytes (Figure 5A) et par une destruction des microvillosités (MV) désignée par effacement de la bordure en brosse des entérocytes de la région duodéno-jéjunale (**Haslay et Leclerc, 1993 ; Clarke, 2001 ; Berche, 2003 ; Delmée, 2004**) (Figure 5B et C). Les lésions A/E sont associées à un réarrangement du cytosquelette de la cellule infectée. En effet, le réseau d'actine polymérisée est réorganisé pour permettre la formation d'un piédestal, c'est-à-dire d'une structure pouvant s'allonger jusqu'à 10 µm et ressemblant à un pseudopode (**Knutton *et al.*, 1987**). La présence du piédestal assure un attachement très intime de la bactérie à la cellule hôte (Figure 5D).

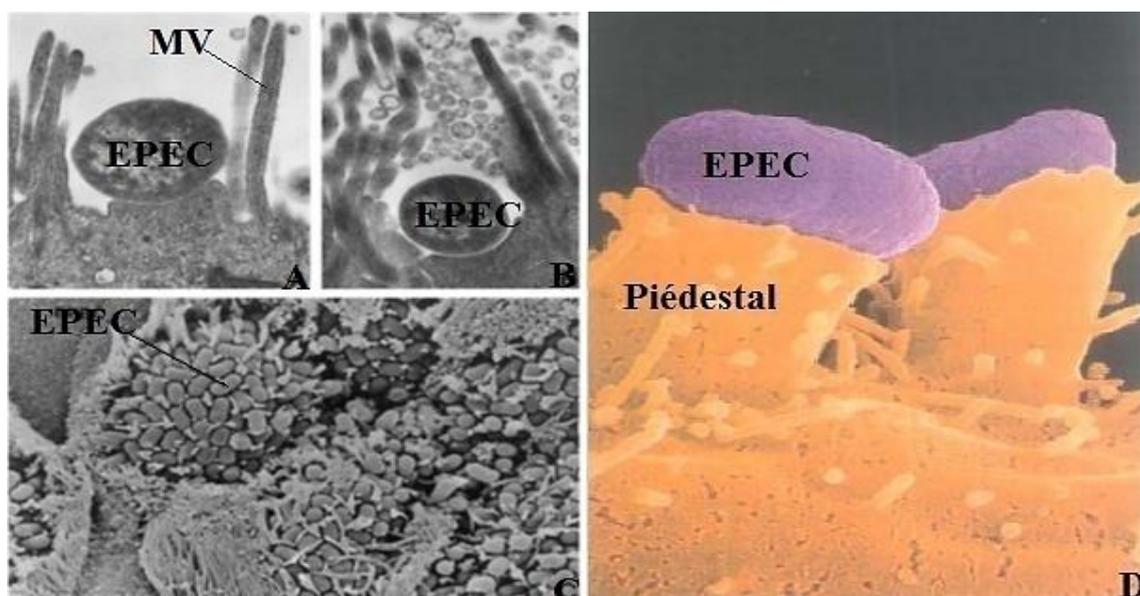


Figure 5 : Observations microscopiques des liaisons A/E induites par les EPEC sur des entérocytes humains (Rosenshine *et al.*, 1996 ; Frankel *et al.*, 1998 ; AFSSA, 2003).

L'interaction des EPEC avec les cellules en culture donne lieu à deux phénotypes d'adhésion. Les bactéries peuvent occuper toute la surface cellulaire (adhésion diffuse) ou se restreindre à quelques zones (adhésion localisée) (Scaletsky *et al.*, 1984). Cette différence du profil d'adhésion dépend de la présence du plasmide EAF. Ce dernier code pour un pili, le BFP (Bundle-Forming Pili), qui participe à l'adhésion des EPEC à la cellule épithéliale et permet la formation de micro-colonies bactériennes (Girón *et al.*, 1991).

- **Souches d'*E. coli* entéroinvasives ou «Enteroinvasive *E. coli*» en abrégé EIEC**

Les EIEC sont phylogénétiquement assez proches de *Shigella* sp. (Brenner *et al.*, 1984), et leurs mécanismes de pathogénie sont similaires (invasion de l'épithélium intestinal) (Le Minor et Richard, 1993). Ils sont responsables de syndromes dysentériques caractérisés par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnés d'une diarrhée aqueuse qui évolue rapidement en une dysenterie, c'est-à-dire des selles contenant du sang et du mucus (CHU-PS, 2003). Ces bactéries sont isolées dans des diarrhées infantiles ou d'adultes avec un fort taux de mortalité et de morbidité dans les pays en développement à bas niveau d'hygiène (Clarke, 2001).

Les EIEC et les *Shigella* sp. ont la capacité d'envahir la muqueuse intestinale au niveau du côlon, de s'y multiplier et de provoquer la mort cellulaire en déclenchant une intense réaction inflammatoire. Complexe et multifactoriel, le processus d'invasion est sous la dépendance de loci chromosomiques et d'un plasmide de virulence (Fasano *et al.*, 1990 ; Milon, 1993 ; Bopp *et al.*, 2003). Les bactéries envahissent les cellules épithéliales du gros intestin, s'y multiplient

et causent des réactions inflammatoires localisées, pouvant aboutir à des ulcérations (**Le Minor et Richard, 1993 ; Delmée, 2004**).

- **Souches d'*E. coli* entéro-hémorragiques ou «Enterohemorrhagic *E. coli*» en abrégé EHEC ou STEC**

Les EHEC sont responsables de colites hémorragiques. Le principal réservoir de ces bactéries est le tube digestif des bovins ; la contamination humaine se fait par l'intermédiaire d'aliments, essentiellement la viande de bœuf hachée et le lait cru. Le sérotype le plus fréquent O157 est responsable d'épidémies.

Parmi tous les types d'*E. coli* à l'origine de diarrhées, les souches entérohémorragiques occupent une place particulière. Elles sont dénommées différemment selon les auteurs : EHEC (*E. coli* entérohémorragiques), VTEC (*E. coli* producteurs de vérotoxines) ou STEC (*E. coli* produisant des shiga-like toxines) (**Clarke, 2001**). Les EHEC appartiennent essentiellement, mais pas exclusivement, au type sérologique O157:H7 (**Ryan et al., 1986 ; Delmée, 2004 ; Loukiadis et al., 2008**). Ce sérotype est normalement absent de la flore commensale intestinale de l'homme (**Germani et Sansonetti, 1999**).

La virulence des EHEC est due à la production de toxines caractéristiques appelées shiga-toxines, en raison de leur similitude avec la toxine produite par *Shigella dysenteriae* 1. Elles sont également appelées vérotoxines (VT) du fait de leur activité cytotoxique sur les cellules Véro ou HeLa (**Anonyme, 2001 ; AFSSA, 2003**). Ces toxines ont un effet létal sur les cellules nerveuses, rénales et sur les entérocytes, pouvant causer la mortalité du patient.

En se fixant à la surface des cellules de la muqueuse, les EHEC provoquent une diarrhée aiguë aqueuse puis hémorragique sans pus, ni fièvre (**CHU-PS, 2003**), pouvant évoluer vers une colite hémorragique plus grave (**Delmée, 2004**). Dans environ 10% des cas, surtout chez l'enfant de moins de 10 ans et chez les adultes de plus de 60 ans, le pronostic peut être sévère, surtout lorsque l'état général s'aggrave et évolue vers un syndrome hémolytique et urémique (SHU) (**Germani et Sansonetti, 1999**), le risque de mortalité étant d'environ 5% (**Tarr, 1995 ; Delmée, 2004**). Les séquelles rénales (insuffisance rénale chronique et hypertension) se manifestent dans la majorité des cas, quel que soit l'âge (**Germani et Sansonetti, 1999 ; Delmée, 2004**).

Escherichia coli O157:H7 appartient au groupe des EHEC ou des *E. coli* productrices de Shiga-toxines (**Noël et Aubé, 2001**). Ce sérotype, normalement absent de la flore commensale intestinale de l'homme dérive du clonage d'*E. coli* entéropathogènes de sérotype O55:H7 (**Germani et Sansonetti, 1999**).

Les résultats d'enquêtes sur les aliments lors des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) attestent que la contamination se fait essentiellement par la nourriture et l'eau de boisson (**Germani et Sansonetti, 1999**) ou de baignade (**OMS, 2000**), la viande bovine insuffisamment cuite, le lait non pasteurisé (**Gugnani, 1999**). Le principal réservoir de cette bactérie est le bétail apparemment en bonne santé (**Jackson et al., 1998**).

- **Souches d'*E. coli* entéroagrégatives ou «Enteroaggregative *E. coli*» en abrégé EAggEC ou EAEC**

Les souches EAggEC sont de plus en plus reconnues comme étant responsables de retards de croissance et de diarrhées persistantes chez l'enfant de moins de 3 ans, aussi bien dans les pays en voie de développement que dans ceux industrialisés (**Bhan et al., 1989**). Une adhésion agrégative sous forme d'amas de briques empilées, à l'origine de nécroses au pôle apical des villosités avec un œdème inflammatoire et hémorragique de la sous-muqueuse, due à des fimbriae I (AAF/1), codées par le gène *aff/I* situé sur un plasmide de 60 MDa les caractérise. Les souches EAggEC élaborent une entérotoxine soit thermostable appelée EAST1 ou Enteroaggregative *E. coli* heat stable enterotoxin et codée par le gène *astA*, soit thermolabile ou LT (**Kaper et al., 2004**). EAST1 possède une homologie fonctionnelle partielle de 50 % avec la toxine thermostable (ST) des ETEC. Ceci tend à confirmer les similarités pathogéniques entre les ETEC et les EAEC (**Milon, 1993 ; Baraduc et al., 2000 ; CNR, 2005**).

- **Souches d'*E. coli* à adhésion diffuse ou « Diffuse-adherent *E. coli* » en abrégé DAEC**

Les DAEC ont été récemment associées à des diarrhées aiguës et persistantes chez les enfants dans les pays développés et en voie de développement (**Clarke, 2001**). Au cours des diarrhées, les selles peuvent être aqueuses ou muqueuses (**CNR, 2005**). La capacité de ces DAEC à adhérer aux cellules épithéliales induit une virulence caractéristique (**Germani et Sansonetti, 1999 ; CNR, 2005**).

I-1-4-2-Diarrhées non infectieuses ou fonctionnelles

Les diarrhées fonctionnelles sont également appelées diarrhées chroniques ou diarrhées à long terme. Ces types de diarrhée durent plus de quatre semaines et leurs causes sont parfois difficiles à comprendre. Habituellement, elles sont liées à la nourriture, aux produits chimiques ou aux troubles fonctionnels (**Pamela et Richard, 1987**). Parmi les causes des diarrhées fonctionnelles, on distingue :

I-1-4-2-1- Intolérances alimentaires

Les allergies et les sensibilités alimentaires peuvent être des facteurs déclencheurs de la diarrhée (**James et Burks, 1996**). Par exemple, Certains nourrissons souffrent de diarrhée lorsqu'ils reçoivent une formule alimentaire à base de lait de vache. Mais cette situation s'améliore lorsqu'ils reçoivent plutôt une autre à base de soja (**Bowie et al., 1988**). Certains aliments contiennent des sucres lentement absorbables par l'intestin grêle, comme le fructose dans le jus de fruits ou de sorbitol dans la confiserie diététique et le lactose du lait par exemple. Grâce à l'osmose, ces sucres non absorbés provoquent une augmentation anormale de l'eau dans l'intestin, stimulent une hyper motilité et les crampes abdominales menant à la diarrhée (**Sue, 1994; NIH, 2003**). La maladie cœliaque causée par l'intolérance à la protéine gluten se caractérise par une surface muqueuse érodée. Cette maladie provoque une diarrhée grasse et un abdomen étendu (**Sue, 1994**). Les aliments susceptibles de causer des intolérances sont entre autres le blé, le seigle, l'écorce d'orge, les œufs, le poisson, le lait, les arachides, le chocolat et le soja (**Sue, 1994**).

I-1-4-2-2-Effets indésirables de certains médicaments

Certains médicaments sont en effet une cause fréquente de diarrhée (antimicrobiens, laxatifs, antiacides contenant du magnésium, produits contenant du lactose ou du sorbitol, anti-inflammatoires non stéroïdiens, prostaglandines, colchicines, antinéoplasiques, anti arythmiques, agent cholinergique et médiateur de la pression artérielle) (**Anne et Geboes, 2002**). Ces médicaments produisent des effets semblables à ceux de la colite infectieuse. Un exemple est la proctite associée à l'isotrétinoïne qui se caractérise par un début aigu et une diarrhée indolore avec du mucus et du sang sur les parois intestinales (**Chassany et al., 2000, Anne et Geboes, 2002**). L'incidence de la diarrhée associée aux antibiotiques varie entre 5 et 2% et diffère avec l'antibiotique utilisé. La diarrhée associée aux antibiotiques est considérée comme cliniquement significative lorsqu'il y a au moins 3 selles molles ou aqueuses par jour (**Ayyagari et al., 2003**). La diarrhée se développe de quelques heures à 2 mois après l'administration d'antibiotiques (**Ayyagari et al., 2003**). Une majorité d'antibiotiques sont impliqués dans le déclenchement de la diarrhée chez l'homme. Par exemple: vancomycine, lincomycine, céphalosporines, amoxicilline et ampicilline (**Ratnaike, 1999**). Certains nouveaux médicaments sont susceptibles d'induire la diarrhée en raison de leurs propriétés pharmacodynamiques; ceux-ci comprennent entre autres, des agents apparentés à l'antraquinone, des inhibiteurs d'alpha-glucosidase, des inhibiteurs de lipase et des inhibiteurs de la cholinestérase (**Chassany et al., 2000; Barlett, 2002**). Une cause importante de diarrhée

est iatrogénique, due à la radiothérapie et la chirurgie sur le tractus gastro-intestinal (**Ratnaïke, 1999**).

I-1-4-2-3-Entéropathie par irradiation

La diarrhée est un effet secondaire fréquent de la radiothérapie utilisée pour le traitement des tumeurs malignes telles que le carcinome du col de l'utérus, le rectum et la prostate chez les personnes âgées. Les rayonnements supra-tension entraînent une augmentation des problèmes gastro-intestinaux tels que la diarrhée (**Mennie et Dalley, 1973**).

L'intestin grêle est particulièrement vulnérable aux rayonnements ionisants, ceci du fait d'un renouvellement rapide des cellules épithéliales.

I-1-4-2-4-Syndrome du côlon irritable

Le syndrome du côlon irritable se définit comme un ensemble des symptômes chroniques ou récurrents attribuables à l'intestin et apparaissant dans des combinaisons variables mais caractéristiques de douleurs abdominales, de ballonnements (distensions) et des symptômes de défécation désordonnée (**Ratnaïke, 1999; SCP, 2003**). Le syndrome du côlon irritable est fortement associé au facteur psychosomatique et particulièrement chez les personnes âgées. En effet, des événements significatifs surviennent au cours de la vieillesse, comme le décès d'un conjoint, la mauvaise santé, l'incapacité physique ou mentale, le déménagement de la maison familiale ou la dépendance à l'égard d'un soignant (**Ratnaïke, 1999**).

I-1-4-2-5-Diarrhée causée par d'autres maladies

La diarrhée peut être un symptôme d'une maladie (**Achterrath et al., 1980**). En effet, certaines pathologies telles que le paludisme, la rougeole, la méningite, l'otite, les infections respiratoires peuvent provoquer la libération des substances comme les prostaglandines ou les neurotransmetteurs (sérotonine). Ces substances activent l'AMP-cyclique qui stimule la sécrétion hydroélectrolytique (**Bamouni, 1989 ; OMS, 2000**). Il a été également signalé que la maladie de Crohn (**Plein et Hotz, 1993**) et Ischémique (**Ratnaïke, 1999**) provoquaient la diarrhée.

I-1-4-2-6-Diarrhée causée par des produits chimiques

Le rôle inducteur de la diarrhée par des nombreux produits chimiques a été prouvé. On peut citer entre autres : l'huile de ricin, le sulfate de magnésium, la sérotonine et le zelnorm. L'action de l'huile de ricin est largement étudiée. Elle est capable de provoquer la diarrhée chez l'homme et chez les animaux (**Rouf et al., 2003**). On sait que le composant actif de cette huile

est l'acide ricinoléique, qui provoque une action irritante et inflammatoire sur la muqueuse intestinale. Cette situation conduit à la libération de la prostaglandine qui stimule les propriétés péristaltiques et sécrétoires de l'intestin grêle, provoquant des modifications de la perméabilité électrolytique (diminution de l'absorption de Na^+ et K^+) de la muqueuse intestinale. Le modèle d'huile de ricin incorpore donc à la fois une diarrhée sécrétoire et une diarrhée motrice (**Mascolo et al., 1993, Zavala et al., 1998, Rouf et al., 2003**).

Des sels comme le sulfate de magnésium et le chlorure de zelnorm agissent par leurs propriétés osmotiques en empêchant la réabsorption de l'eau et des ions (Cl^- et Na^+). Ceci conduit à un accroissement du volume liquidien du contenu intestinal. Ces sels favorisent également la libération de la cholécystokinine de la muqueuse duodénale, ce qui augmente la sécrétion intestinale et déclenche un effet moteur sur l'intestin grêle (**Galvez et al., 1993**).

Certaines diarrhées fonctionnelles sont dues à des émotions telles que la peur, le stress et la fatigue nerveuse. On les qualifie des diarrhées émotives (**Sankale, 1988**).

I-1-5-Physiopathologie de la diarrhée

La diarrhée est une condition débilitante qui peut affecter significativement la qualité de vie. La conséquence immédiate de la diarrhée est la déshydratation (**NIH, 2003**). La déshydratation se produit lorsque le corps a perdu trop de liquide et d'électrolytes (chlorure, potassium et sodium). Cette perte importante de l'eau et des électrolytes provoque un dysfonctionnement de l'organisme. Cette situation est dangereuse surtout chez les nouveau-nés et les enfants en état de malnutrition car ceux-ci peuvent mourir en quelques jours (**NIH, 2003**). En outre, il pourrait y avoir perte de sang dans l'intestin surtout à cause des microorganismes entérohémorragiques (**Hunter, 2003**).

Une perte de 5% du poids corporel due à la perte des liquides suite à la diarrhée peut entraîner une accélération de la fréquence cardiaque, des étourdissements, une diminution de la miction, une désorientation et même un coma. La perte de 10% du poids corporel par suite d'une diarrhée sévère (en raison de la perméabilité intestinale) peut conduire à l'acidose, l'hypokaliémie et la mort. La perméabilité intestinale est désorganisée et affaiblie par la production élevée d'oxyde nitrique qui peut conduire à une inflammation de l'intestin (**Semba et bloem, 2000, Herulf et al., 2009**). L'inflammation de l'intestin grêle et la diarrhée contribuent au stress oxydatif dans l'organisme (**Ranjan et al., 2006**).



Figure 2: A child, lying on a cholera cot, showing typical signs of severe dehydration from cholera. The patient has sunken eyes, lethargic appearance, and poor skin turgor, but within 2 h was sitting up, alert, and eating normally.



Figure 6 : Enfants en situation de déshydratation sévère due à la diarrhée

I-1-6-Diarrhée et stress oxydatif

Le stress oxydatif est un état causé par un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants dans l'organisme (Sies, 1997; Durand *et al.*, 2003). La diarrhée pathologique causée par les bactéries entérotoxigènes et invasives provoque la libération de radicaux libres. Les lipopolysaccharides et les peptidoglycanes sont des stimulants potentiels des radicaux libres liés à la production de cytokines par les macrophages (MacDonald *et al.*, 1993). Trois jours après l'infection virale (rotavirus par exemple), lorsque la sévérité de l'infection est au sommet, les taux de glutathion et de dérivés thiols sont significativement réduits. Les niveaux d'enzymes impliqués dans la défense antioxydante (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et glutathion transférase) sont également réduits tandis qu'une augmentation de la lipoperoxydation est observée (Sodhi *et al.*, 1996). La libération de radicaux libres à partir de cellules enflammées provoque des altérations sévères de l'intégrité de la muqueuse intestinale (Chiu *et al.*, 2003).

Au cours de l'infection par les bactéries entéroinvasives, le monoxyde d'azote (NO) produit par la L-arginine via "l'oxyde nitrique synthase inductible" (iNOS) à partir des cellules épithéliales peut provoquer des effets délétères sur la muqueuse intestinale (Witthoft *et al.*, 1998). Le NO peut agir directement sur les cellules épithéliales en dilatant les jonctions cellulaires étroites ou en agissant sur l'anion superoxyde libéré par la cascade inflammatoire pour donner un puissant agent oxydant (peroxynitrite, ONOO-) connu pour ses effets délétères sur les tissus (Salzman *et al.*, 1995). Ainsi, une augmentation de l'expression de l'iNOS est observée lors de l'infection par *E. coli* entéroinvasive (Tepperman, 1994). En plus de l'action des peroxynitrites, les radicaux libres et d'autres espèces réactives de l'oxygène sont liés au stress oxydatif et à d'autres maladies humaines, y compris le cancer, les maladies cardiovasculaires et

le vieillissement. Ils sont également associés à d'autres maladies liées au vieillissement telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (**Papas, 1999**). Le stress oxydatif est un syndrome à l'origine de diverses pathologies parmi lesquelles les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires (**Herrera et Barbas, 2001**). En effet, un niveau faible et constant de stress oxydatif provoque le vieillissement, un niveau moyen de stress oxydatif entraîne une carcinogénèse, un taux élevé de stress oxydatif peut entraîner les accidents vasculaires cérébraux, le traumatisme, l'irradiation ionisante et la mort (**Sie, 1997**).

I-1-7-Stratégies de contrôle de la diarrhée

I-1-7-1- Prophylaxie

La diarrhée est en général due à des mauvaises conditions d'hygiène. En effet, elle peut être acquise par l'ingestion de la nourriture cuite ou crue et d'eau contaminées. Ainsi, la viande et les produits halieutiques crus ou mal préparés, les fruits et légumes crus, l'eau du robinet, la crème glacée, le lait et les produits laitiers non pasteurisés peuvent être associés à une augmentation des risques de la diarrhée. L'accès de la population à l'eau potable ainsi que la faiblesse en assainissement sont des facteurs favorisant l'émergence des diarrhées. Les précautions doivent être prises surtout pendant les inondations, car les aliments et l'eau sont habituellement contaminés et ces conditions peuvent rapidement conduire à une diarrhée généralisée. Une bonne hygiène personnelle, une préparation alimentaire sûre et une conservation alimentaire appropriée peuvent limiter les risques liés aux diarrhées (**CDC, 2004, OMS, 2004**).

Aucun traitement préventif n'est fiable. La chimioprophylaxie est déconseillée car elle prédispose à la surinfection par une sélection des germes pathogènes tels que *Escherichia coli* entéropathogène et les *salmonelles sp* et à l'extension des résistances vis-à-vis des cyclines et des sulfamides (**Pichard, 2002**). L'incidence de la diarrhée peut être fléchie par les vaccinations anticholérique, antityphoïde et surtout contre rotavirus (**Soares-Weiser et al., 2010**). En effet, l'OMS préconise une prophylaxie en six points incluant, la vaccination contre le rotavirus, la promotion de l'allaitement exclusif au sein, la promotion du lavage des mains au savon, l'amélioration de la quantité et de la qualité de l'approvisionnement en eau, le traitement de l'eau utilisée par les ménages et sa conservation à l'abri des contaminations ainsi que la promotion de l'assainissement à l'échelle communautaire. En cas d'épidémie comme par exemple l'épidémie de choléra, on veillera à l'isolement des malades et la désinfection des déjections. On pourra également procéder au dépistage des porteurs sains et la désinfection intestinale.

Des études ont montré que la prévention de la diarrhée par l'utilisation du diphénoxylate augmenterait l'incidence des maladies diarrhéiques ainsi que l'apparition des effets indésirables. De même, une prophylaxie basée sur l'utilisation du charbon activé est inefficace pour la prévention contre la diarrhée (CDC, 2004).

I-1-7-2-Prise en charge thérapeutique

Le traitement de la diarrhée inclut la réhydratation et notamment l'usage de la solution de réhydratation orale (SRO) pour des cas des déshydratations moins sévères, des produits pharmaceutiques, la kaoline pectine et certaines plantes médicinales (SCP, 2003 ; Nathan et Richard, 2004 ; Satish et Ranjana, 2015).

I-1-7-2-1-Réhydratation orale

Lors de la diarrhée, la réhydratation orale est le premier traitement administré pour compenser les pertes en eau et en électrolytes. Le traitement par la réhydratation orale n'est pas applicable chez les patients en état de déshydratation sévère ou en état comateux. Dans ces derniers cas, le placement de la perfusion est plus efficace. Le traitement par la réhydratation orale a cependant grandement contribué à la réduction de la morbidité et de la mortalité liées aux diarrhées à travers le monde. L'osmolarité de la solution Standard de réhydratation orale a été nouvellement revue par l'OMS à 245 mOsmol/l pour les enfants des pays en voie de développement. La SRO ayant le glucose comme électrolyte de base est préférable (Semba et Bloem, 2000 ; OMS, 2001 ; Nathan et Richard, 2004).

Le tableau III présente la composition standard d'une SRO telle que préconise l'OMS, pour une composition totale en masse volumique de 20,5g/l.

Tableau III : Composition standard d'une solution de réhydratation Orale (OMS, 2001)

Composition	Quantité (g/l)
Chlorure de sodium	2,6
Glucose anhydre	13,5
Chlorure de potassium	1,5
Citrate de sodium	2,9

Selon l'OMS 2001, la supplémentation de la SRO avec du zinc lors du traitement de la diarrhée aiguë a considérablement réduit la mortalité des jeunes patients. En effet, la supplémentation en Zinc réduit la durée et la gravité de la diarrhée et prévient également des épisodes ultérieurs. Il renforce le système immunitaire. Généralement, les diarrhées infectieuses débutent par une adhésion des microorganismes pathogènes sur les muqueuses intestinales.

Cette adhésion est facilitée par la structure en carbohydrate des cellules de surface. Cette étape très importante de l'infection peut être bloquée par les récepteurs analogues des carbohydrates (**Anne et Geboes, 2002**). La SRO peut également être complétée par le jus de la carotte. En effet, les extraits aqueux de la carotte contiennent des oligosaccharides acides capables d'empêcher l'adhésion des microorganismes enthéropathogènes sur les muqueuses intestinales (**Kastner et al., 2002**).

I-1-7-2-2-Nutrition

Le soutien nutritionnel améliore les résultats de traitement de la diarrhée chez les enfants. L'utilisation d'un régime (banane, riz, bouillon de pommes et pain grillé) avec évitement des produits laitiers (car une carence transitoire en lactose peut se produire) est couramment recommandée (**Nathan et Richard, 2004**). Une alimentation complémentaire avec des fibres alimentaires extraites de pois et de carottes limite les effets moteurs du côlon et réduit probablement la motilité intestinale, ce qui augmente le temps de réabsorption de l'eau et des électrolytes à travers les parois intestinales (**Guedon et al., 1996**).

I-1-7-2-3-Thérapie à symptômes non spécifiques

La thérapie à symptômes non spécifiques implique l'utilisation de médicaments ou d'autres substances anti diarrhéiques ayant un large spectre d'action. Les médicaments anti diarrhéiques tels que le loperamide et la mépéridine réduisent la vitesse de transit intestinal et augmentent la capacité de rétention des fluides par l'intestin. Contrairement aux autres opiacés (codéine, diphénoxylate ...), le loperamide ne pénètre pas dans le système nerveux et ne présente pas de risque potentiel de toxicomanie (**Nathan et Richard, 2004**). Des composés comme le bismuth atténuent la diarrhée en particulier chez les bébés et les enfants en réduisant le volume de matières fécales et la durée de la diarrhée (**SCP, 2003**).

L'utilisation de fibres, de charbon activé et de kaolin-pectine ne réduit pas la fréquence des selles ou la durée de la diarrhée. Bien que les fibres et le charbon activé ne soient pas toxiques, ils sont désavantageux dans la mesure où ils sont capables d'adsorber les nutriments, les enzymes et les antibiotiques dans l'intestin, masquant de ce fait la gravité de la perte de fluide (**SCP, 2003**).

I-1-7-2-4-Traitement par les substances antimicrobiennes

Les antimicrobiens sont des substances naturels, synthétiques ou semi synthétiques capable d'inhiber la croissance d'un microorganisme ou de le tuer. Ils proviennent des bactéries, des champignons, des plantes ou par synthèse chimique (**Mims et al., 1993**). Une bonne substance antimicrobienne doit avoir un large spectre d'action, une de demi-vie assez longue

dans le plasma, une bonne distribution au niveau des tissus. Elle doit être non toxique. Elle ne doit pas avoir pour cible les cellules de l'organisme et doit également pouvoir être administrée par voie orale ou parentérale sans trop d'interférences avec les autres substances (**Bacq-Calberg *et al.*, 1999**).

➤ **Antibiothérapie**

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie. En effet, la connaissance du métabolisme bactérien et des interactions avec le système hôte ont permis l'identification d'un certain nombre de cibles thérapeutiques dont la tableau IV ressort quelques unes.

Tableau IV : Quelques antibiotiques, mode d'action et cibles (Mims *et al.*, 1993 ; Bacq-Calberg *et al.*, 1999)

Antibiotique	Mode d'action/ cible
Pénicilline Ampicilline Céphalosporine Carbenicilline Méthicilline	<u>Inhibition de la synthèse la paroi</u> inhibent les enzymes impliquées dans la transpeptidation et dans la construction de la chaîne polysaccharidique et peptidoglycane de la paroi bactérienne, et activent les enzymes lytiques de la paroi.
Bacitracine	inhibe la synthèse du peptidoglycane en interférant avec les lipides de transport qui transportent les précurseurs de ce polymère à travers la membrane bactérienne.
Streptomycine Gentamycine	<u>Inhibition de la synthèse protéique</u> se lie à la sous unité 30s du ribosome bactérien pour inhiber la synthèse protéique et provoque l'erreur de la lecture de la thymidine.
Chloramphénicol	se lie à la sous unité 50s du ribosome et empêche la formation de la liaison peptidique par inhibition du peptidyl transférase.
Tétracycline	se fixe de manière réversible sur la sous unité 30s du ribosome bactérien et empêche la fixation de l'aminoacyl-RNA _t au site A du ribosome.
Erythromycine	se lie à la sous unité 50s du ribosome et inhibe l'élongation de la chaîne peptidique.
Ciprofloxacine et autres quinolones	<u>Inhibition de la synthèse des acides nucléiques</u> inhibent l'ADN gyrase bactérien par interférence avec la réplication, la transcription et toutes les autres activités impliquant l'ADN.
Rifamycine	inhibe la synthèse de l'ARN en se liant à l'ARN polymérase.
Polymyxine B	<u>Destruction des cellules membranaires</u> se lie aux cellules de la membrane et perturbe sa structure et sa perméabilité.
Sulfamide	<u>Antagoniste métabolique</u> inhibe la synthèse de l'acide nucléique par compétition avec l'acide p-aminobenzoïc.
Dapsone	interfère avec la synthèse de l'acide folique.
Isoniazide	inhibe la synthèse de l'acide mycosique.
Triméthoprime	inhibe la synthèse du tétrahydrofolate en entrant en compétition avec le substrat du dihydrofolate réductase.

La prescription des antibiotiques lors des diarrhées n'est pas systématique. Certains antibiotiques provoquent la diarrhée par modification de la flore intestinale. *Clostridium difficile* est responsable de 30% à 40% des diarrhées post-antibiotique. Les diarrhées compliquent l'antibiothérapie (OMS, 2013).

➤ **Traitement par les antifongiques**

Les antifongiques sont généralement moins actifs que les autres substances antimicrobiennes, principalement parce que les cellules Eucaryotes des champignons sont plus proches des cellules humaines que les bactéries. De ce fait, des nombreux antifongiques, fongistatiques ou fongicides sont toxiques pour les cellules humaines. Néanmoins certains antifongiques sont utilisés pour traiter les mycoses. Ils agissent sur le champignon de plusieurs manières.

Le tableau V présente quelques antifongiques ainsi que leurs modes d'action.

Tableau V: Quelques antifongiques et leurs modes d'action

Famille	Représentant	Mécanisme d'action
Les polyènes	l'Amphotéricine B Nystatine	Interaction avec l'ergostérol membranaire (Carrillo-Munoz et al., 2006).
Les Pyrimidines	Flucocytosine ou 5-Fluorocytosine.	Transformation de uracile en 5-nouracyl dans la synthèse de l'ARN, et le blocage de la synthèse protéique (Carrillo-Munoz et al., 2006 ; Khatry et al., 2010)
Les Azoles	Fluconazole Itraconazole	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol par action sur la cytochrome P450 et la C-14 alpha-demethylase fongique (LEE et al., 1997)
Les Allylamines	Naftifine et la Terbinafine	Inhibiteurs de la squalène époxydase (perméabilité membranaire) (Carrillo-Munoz et al., 2006)
Autre antifongique	Griséofulvine	Agit sur la polymérisation des microtubules (Anderson, 2005)

Ces molécules synthétiques provoquent différents effets délétères après leur prise (**LEE et al., 1997; Anderson 2005; Carrillo-Munoz et al., 2006**). De plus, des résistances des microorganismes face à ces molécules sont plus que par le passé relevées. Par ailleurs, il a été démontré que certains métabolites secondaires tels que les acétogénines majoritairement présentes dans les plantes de la famille des Annonacées (**Alali et al., 1999**) avaient un potentiel antimicrobien non négligeable. En effet, les acétogénines sont des inhibiteurs du complexe I

(NADH-Ubiquinone Oxydoréductase) mitochondrial et le NADH Oxydase des membranes des cellules cancéreuses (**Myoshi *et al.*, 2005**). Ces trouvailles ouvrent une brèche dans la recherche des nouveaux médicaments antimicrobiens à partir des extraits riches en acétogénines issus des plantes de la famille des Annonacées.

➤ **Traitement par les antiviraux**

Un virus est un parasite intracellulaire obligatoire. Une fois dans la cellule hôte, il détourne la machinerie enzymatique et métabolique de l'hôte à ses propres fins. Ceci rend la thérapie virale non seulement plus complexe mais également toxique pour l'hôte. Toute fois il existe plusieurs inhibiteurs des enzymes spécifiques du cycle viral (**Mims *et al.*, 1993 ; Bacq-calbert *et al.*, 1999**). Le tableau VI donne les détails sur les modes d'action de quelques substances antivirales.

Tableau VI : Quelques antiviraux et leurs modes d'action (Mims *et al.*, 1993 ; Bacq-calbert *et al.*, 1999)

Substances antivirale	Mode d'action/Cibles
Amandine	Inhibe la pénétration et l'encapsidation des particules du virus de l'influenza
Vidarabine	Perturbe l'activité de l'ADN polymérase et de beaucoup d'autres enzymes impliqués dans le fonctionnement et la synthèse de l'ADN et l'ARN
Acyclovir	Inhibe l'ADN polymérase viral
Azidothymidine	Inhibe la transcriptase reverse et donc la multiplication des retrovirus
Interferon	Inhibition de la réplication virale

Puisque l'infection diarrhéique provoque un stress oxydatif, l'élimination des micro-organismes responsables de la diarrhée entraînera un soulagement vis-à-vis du stress oxydatif. De plus, les antioxydants jouent un rôle majeur dans la désactivation des activités des radicaux libres qui provoquent le stress oxydatif (**Sies, 1997; Durant *et al.*, 2003**).

I-2- GÉNÉRALITÉS SUR LES OXYDANTS ET LES ANTIOXYDANTS

I-2-1-Oxydants

I-2-1-1- Définition

Les oxydants sont des molécules ayant dans leur structure un déficit électronique. Cette tare électronique leur confère la capacité d'interagir avec d'autres macromolécules. Ce sont des produits normaux du métabolisme cellulaire. Mais ils peuvent être produits à des taux élevés surtout dans des conditions physiopathologiques. Encore appelés radicaux libres, les oxydants sont en fonction de leur nature de deux types : les radicaux libres primaires ou radicaux libres vrais et les radicaux libres secondaires, généralement issus de l'action des radicaux libres primaires. Les radicaux libres peuvent causer des dommages aux cellules de l'organisme en particulier à des concentrations élevées (Sies, 1997).

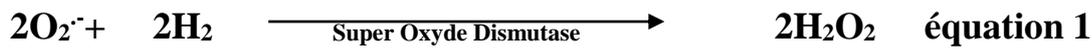
I-2-1-2- Radicaux libres

Un radical libre est une molécule indépendante ayant un ou plusieurs électrons libres (électrons non liés) sur son orbite électronique la plus externe (Vergely et Rochette, 2003). L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé « *Espèce Réactive d'Oxygène* » (Favier, 2003). Il existe une multitude de radicaux libres dans l'organisme.

I-2-1-2- 1-Principaux types de radicaux libres primaires

➤ Ion super-oxyde ($O_2^{\cdot-}$)

Au cours de la respiration cellulaire, les électrons sont transmis des coenzymes (nicotiniques ou pyridiniques et flaviniques) réduits à l'oxygène via la chaîne de transporteurs d'électrons située sur la mitochondrie. Ces électrons sont cédés à l'oxygène diatomique entraînant la formation d'un radical faiblement réactif mais ayant une courte durée de vie : c'est l'ion super-oxyde. Ce radical est aussi produit au cours de l'oxydation de la xanthine par la xanthine oxydase (Slater, 1984; Bulkley, 1987; Favier, 2003; Devasagayam *et al.*, 2004; Oliveira, 2004; Chauhan et Chauhan, 2006; Kunwar et Radiation, 2011; Cui *et al.*, 2012). Ce radical est le point de départ de formation de plusieurs autres radicaux libres ou précurseurs de radicaux libres. En effet, en présence de la Super-Oxyde Dismutase (SOD) et sous pH physiologique, l'ion super-oxyde est complexé à deux atomes d'hydrogène pour former le peroxyde (H_2O_2) (équation 1). En présence du fer ou du cuivre, l'ion super-oxyde interagit avec le peroxyde pour produire le radical hydroxyle ($HO\cdot$) : c'est la réaction de Haber-Weiss (équation2) (Oliveira, 2004; Kunwar et Radiation, 2011)



➤ Radical hydroxyle (HO[·])

Le radical hydroxyle est de loin plus réactif que le radical super-oxyde et encore plus que le peroxyde. Ce radical est à l'origine de la grande majorité des phénomènes d'oxydation intermoléculaire observés dans l'organisme. En effet, il est à l'origine de l'oxydation des lipides mono et polyinsaturés membranaires. De même, il peut se fixer de façon covalente soit aux bases azotées, soit sur le Désoxyribose (rentrant dans la constitution de l'ADN), soit encore se fixer sur les liaisons hydrogènes entre les brins d'ADN. Compte tenu du rôle capital de l'ADN, ces fixations vont entraîner un certain nombre de pathologies allant des leucémies aiguës aux arthrites rhumatoïdes en passant par les cancers, les différents types de diabètes, les maladies cardio-vasculaires et nerveuses (Parkinson, Alzheimer, scléroses multiples...) et de la peau pour ne citer que ceux-là (Cooke *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 2013).

➤ Radical Nitro-oxyde ou mono oxyde d'azote (NO[·])

Le mono-oxyde d'azote est comme l'ion super-oxyde le point de départ d'une longue cascade de réactions oxydatives dans l'organisme. Il est également produit par le métabolisme de l'oxygène avec réduction d'une molécule de NADPH en NADP⁺. Mais dans ce cas, le substrat de départ est la L-arginine et le produit final est en plus du mono-oxyde d'azote, la L-citrulline, intermédiaire métabolique dans le cycle de l'urée (Kurohane *et al.*, 2013). L'équation globale de cette synthèse peut être résumée comme suit :

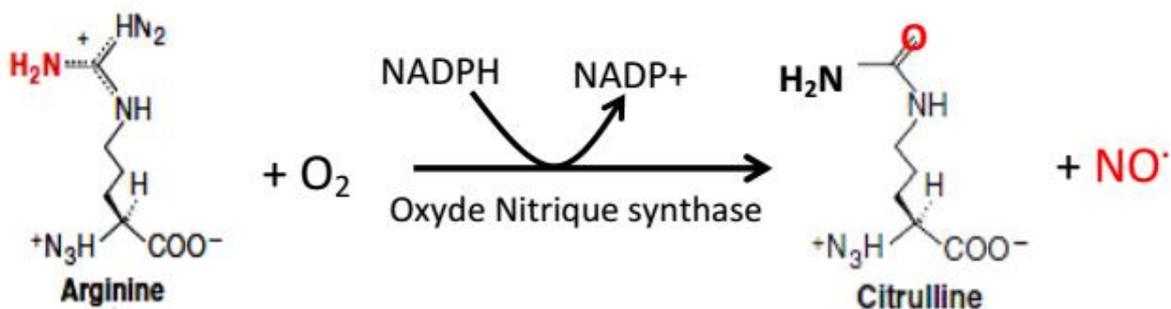


Figure 7 : Oxydation de l'arginine en citrulline avec formation de l'oxyde nitrique

L'enzyme responsable de la synthèse du NO[·] est l'oxyde nitrique synthase. Contrairement à l'ion super-oxyde, l'oxyde nitrique a une durée de vie relativement plus longue (environ 80 min) en raison de sa stabilité en milieu aérobie. Ainsi, l'auto-oxydation de ce radical

est généralement négligeable lorsqu'il est produit à faible concentration mais cette situation va progressivement changer à mesure que sa concentration sanguine augmente conduisant de ce fait à la fixation du NO[•] à l'hémoglobine ou à la formation des espèces beaucoup plus réactives comme le cation nitrosonium (NO⁺) (Oliveira, 2004; Kunwar et Radiation, 2011; Halliwell, 2012; Shinde *et al.*, 2012; Gutowski et Kowalczyk, 2013; Kurohane *et al.*, 2013).

La particularité du NO[•] est le fait qu'il est presque toujours monomérique à des températures et des pressions compatibles à la vie. Cette caractéristique particulière lui donne la capacité de réagir aisément avec l'ion super-oxyde et tous les autres radicaux. Ainsi, en présence du super-oxyde, le NO pourra produire les dérivés présentés sur la figure 8 (Kissner *et al.*, 1997).

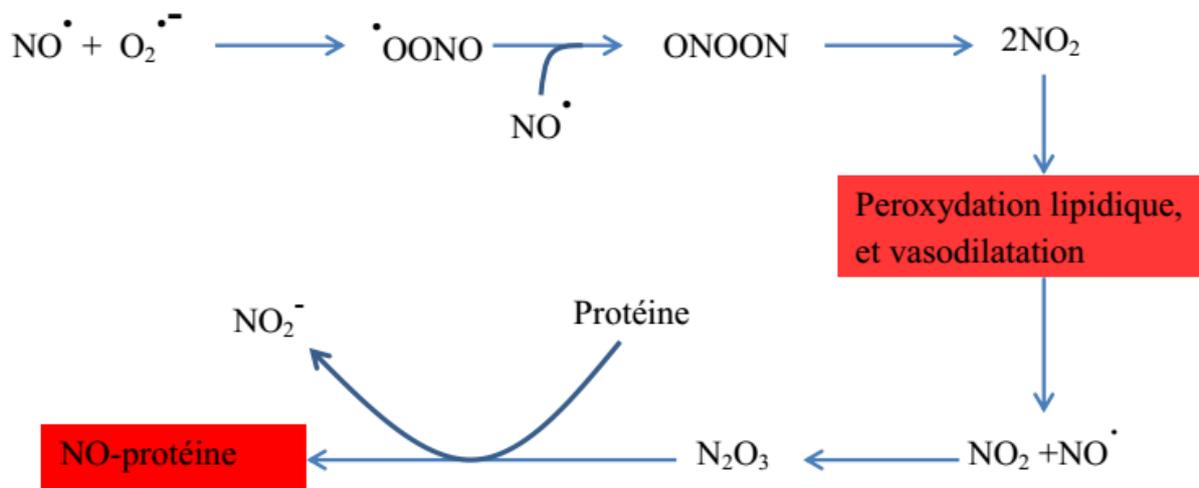


Figure 8 : Dérivés de l'oxyde nitrique

I-2-1-2-2-Radicaux libres secondaires : les dérivés des lipides

Ce sont les dérivés obtenus généralement après action des radicaux libres primaires sur les macromolécules biologiques (le plus souvent les acides gras). Ils sont moins réactifs, mais leur longue durée de vie leur permet d'entretenir l'état d'oxydation dans l'organisme. L'oxydation lipidique est une chaîne de réactions initiées par la soustraction d'une molécule d'hydrogène ou l'ajout d'une molécule d'oxygène à un acide gras (Cuvelier et Martel, 2002).

I-2-1-2-3-Origine des radicaux libres

Les radicaux libres sont d'origines diverses. Ils proviennent non seulement de l'ingestion des aliments ou des médicaments mais aussi d'autres métabolites dans les organismes vivants. Le processus d'oxydation est l'une des principales voies par lesquelles les radicaux libres sont produits (Pourmorad *et al.*, 2006). La pollution environnementale joue

également un rôle important dans la libération des radicaux libres. Sous l'action des rayons UV, les rayonnements ionisants, les effets des métaux de transition dans la réaction enzymatique, les espèces hautement réactives de l'oxygène sont produites. Les radicaux libres sont également produits par les phagocytes dans leur processus de destruction des bactéries et autres agents infectieux grâce au phénomène d'explosion oxydante au cours duquel une grande quantité d'anion superoxyde est produite (**Vergely et Rochette, 2003**).

I-2-1-2- 4-Rôle des radicaux libres

Normalement, les radicaux libres jouent un rôle bénéfique dans le fonctionnement des organismes vivants. En effet, le $\text{NO}\cdot$ et l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ agissent positivement dans le fonctionnement normal du rein et du tissu vasculaire. De plus, le $\text{NO}\cdot$ produit par les neurones sert de neurotransmetteur tandis que le $\text{NO}\cdot$ produit par les macrophages sert de médiateur pour la réponse immunitaire (**Favier, 2003**). De façon globale, les réactions biochimiques sont des séries de réaction d'oxydo-réduction. En effet, la synthèse d'énergie au niveau de la mitochondrie est une phosphorylation oxydative de l'ADP en ATP. D'autre part, la détoxification des xénobiotiques dans l'organisme par le cytochrome P450 est une oxydoréduction avec production d'un métabolite non toxique. Certains radicaux libres comme l'ion super-oxyde et le peroxyde peuvent agir comme les messagers secondaires. De plus certains radicaux libres agissent en modulant les fonctions cellulaires. C'est le cas du peroxyde qui peut mimer le facteur de croissance de l'insuline (**Devasagayam et al., 2004; Favier, 2003**). La toxicité des radicaux libres résulte d'une surproduction ou de l'emballement des mécanismes physiologiques tels que les inflammations chroniques ou l'exposition à des sources exogènes comme les U.V, le tabagisme et l'alcoolisme. Cette surproduction va engendrer un déséquilibre entre les défenses antioxydantes de l'organisme et ces espèces oxydantes en faveur de ces dernières. En excès dans l'organisme, les radicaux libres deviennent nocifs en induisant certains dommages au niveau de la structure des protéines, des lipides (**Pourrut, 2008**), des acides nucléiques (**Favier, 2003**), en entraînant un stress oxydant qui contribue aux processus de vieillissement cellulaire accéléré et au développement de pathologies humaines telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, l'artériosclérose. Des systèmes de défense dits antioxydants permettent de prévenir la formation des radicaux libres, de palier ou de limiter leurs effets délétères. Ces systèmes peuvent être endogènes ou exogènes, d'origine nutritionnelle.

I-2-2- Antioxydants

I-2-2-1-Définition

Un antioxydant est une molécule qui, présente à faible concentration dans l'organisme, peut le détoxifier de l'excès de radicaux libres. De ce fait, les antioxydants permettent à l'organisme de maintenir un équilibre de la balance antioxydant/pro-oxydant (Agarwal *et al.*, 2012).

I-2-2-2-Classification des antioxydants

La Figure 9 présente les différents types d'antioxydants avec quelques exemples illustratifs pour chaque classe (Carocho et Ferreira, 2013). A ces classes, on y ajoutera certains terpénoïdes (α et β Pinène, Germacrène A et D) et oxygénés (Carvacrol, Eugénol, Eucalyptol et Thymol).

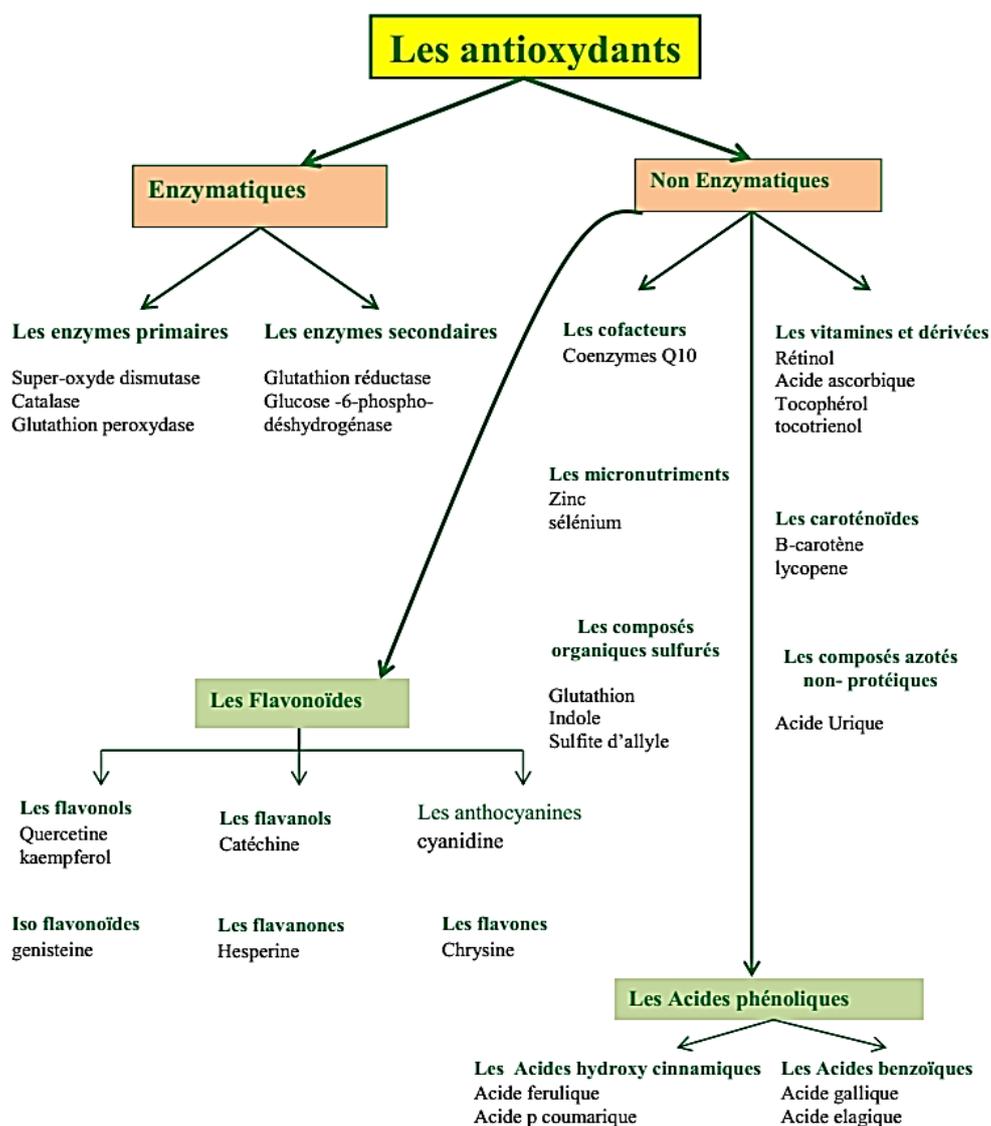


Figure 9 : Différents antioxydants et quelques exemples

Ces antioxydants sont soit des composés synthétiques soit des constituants naturels issus du règne végétal. 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 matières premières pour l'identification de nouveaux antioxydants.

I-3-MÉDECINE TRADITIONNELLE : UNE ALTERNATIVE

La médecine traditionnelle reste le socle des soins de santé dans plusieurs régions du monde et essentiellement en Afrique, et en Amérique. En effet, pour plus de 80% de la population des zones concernées, cette forme de thérapie reste le premier recours, ou tout simplement le recours (**Farnsworth et al., 1985 ; OMS, 2002**). Les plantes médicinales qui constituent l'essentiel des potions administrées aux malades ont fait la preuve de leur efficacité.

La majorité de la population des pays en voie de développement ne peut se procurer les médicaments anti diarrhéiques de première nécessité. Heureusement, il existe de nombreuses plantes utilisées dans le traitement des diarrhées. En effet, différents organes (feuilles, tiges, écorces, racines, fruits...) des plantes parmi lesquelles celles appartenant à la famille des Annonacées sont couramment utilisés en médecine traditionnelle Africaine pour traiter plusieurs maladies parmi lesquelles les diarrhées (**Adjanooun et al., 1996 ; Guillerot et al., 1996 ; Khan et al., 1997 ; Noumi et al., 2001 ; Betti, 2004 ; Mekou et al., 2011 ; Tsabang et al., 2012 ; Alain et al., 2015**).

Par ailleurs, la valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans des nombreux pays. Ainsi, l'OMS recommande l'évaluation de l'innocuité et de l'efficacité des médicaments à base des plantes en vue de standardiser leur usage et les intégrer dans les systèmes de soins conventionnels (**OMS, 2000**). La valorisation de la médecine traditionnelle africaine passe par la validation scientifique de ses vertus thérapeutiques traditionnelles. Le présent travail va permettre d'évaluer le potentiel anti microbien, antioxydant et anti-diarrhéique de trois plantes de la flore camerounaise de la famille des Annonacées : *A. mannii*, *A. senegalensis*, *X. africana*, sélectionnées sur la base de données de l'enquête ethnopharmacologiques et de la revue de littérature.

I-4- GÉNÉRALITES SUR LES ANNONACÉES

Les Annonacées 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'embranchement des Spermaphytes, sous embranchement des Angiospermes, classe des Dicotylédones, l'ordre des Annonales (magnoliales). Les plantes de cette famille sont ligneuses et sont sous formes variées: arbres,

arbustes, arbrisseaux, buissons sarmenteux ou lianes. Les formes les plus abondantes sont les arbres de taille moyenne (15 à 20 m) et les arbustes de 7 à 10m (**Le Thomas, 1969**). Leurs écorces, feuilles et fruits dégagent une odeur aromatique caractéristique (**Walker et Sillams, 1961**). Le fruit est très important dans la séparation des genres et plus rarement dans celle des espèces (**Le Thomas, 1969**). Si certaines espèces parmi ces dernières sont très largement étudiées (*Annona muricata* et *A. senegalensis*), d'autre par contre ont fait l'objet de très peu d'études (*Anonidium mannii* et *Xylopia africana*). Cependant, toutes ces plantes sont utilisées en médecine traditionnelle Africaine pour traiter plusieurs maladies parmi lesquelles les diarrhées (**Joyeux et al., 1995 ; Adjanohoun et al., 1996 ; Guillerot et al., 1996 ; Khan et al., 1997 ; Ndoye et al., 1998 ; Noumi et al., 2001 ; Betti, 2004 ; Mekou et al., 2011 ; Tsabang et al., 2012 ; Alain et al., 2015**).

I-4-1- Genre *Anonidium*

Anonidium est un genre natif d'Afrique Tropicale groupant cinq espèces parmi lesquelles *Anonidium floribundum*, *Anonidium friesianum*, *Anonidium letestui*, *Anonidium unsambarensis* et *Anonidium mannii* (**Le Thomas, 1969**). C'est cette dernière qui a fait l'objet de notre étude.

I-4-1-1- *Anonidium mannii* (Photographie 1)

Anonidium mannii (Oliv.) appartient au règne végétal, embranchement des Magnoliophyta, Classe des Magnoliopsida, Ordre des Magnoliales, Famille des Annonaceae, Genre *Anonidium*, et Espèce *A. mannii*.

Synonymes : *Uvaria crassipetela*, *Uva crassipetela*, *Annona mannii*, *Anonidium manniivar zenkeri* (**Le Thomas, 1969**).

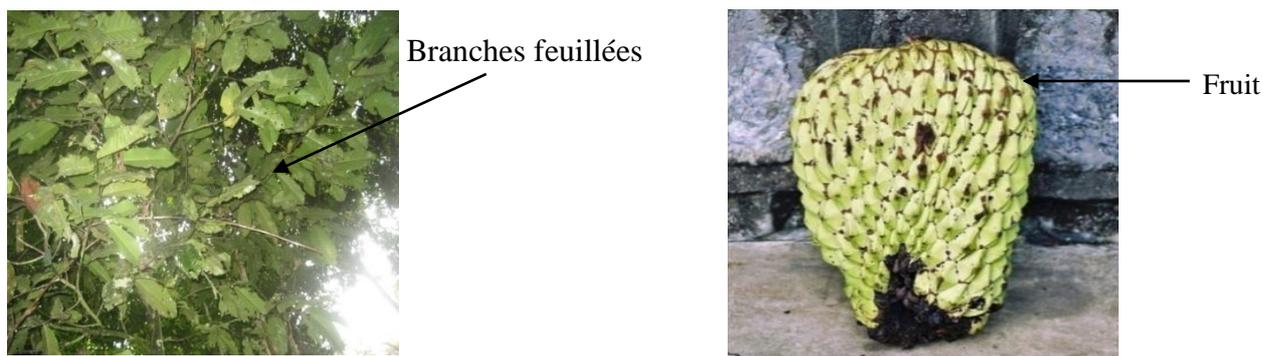
Noms Communs : Jungle Sop (Anglais) ; Corossolier sauvage (Français) (**Le Thomas, 1969**).

Noms vernaculaires : Mombou kombo (Kaka) ; Bom (Badjoue).

➤ Description botanique

A. mannii(Oliv.) est un grand arbre de 8 à 12 m de hauteur, le tronc court, légèrement tordu et cannelé a un diamètre compris entre 8 et 30 m, une cime dense à branches retombantes, des feuilles à pétiole long de 3 à 7 cm pubérulent glabre, une limbe papyracée subcoriace, elliptique oblong longue de 20 à 45 cm et large de 7 à 18 cm, une base arrondie subcordée, sommet acuminé à acument atteignant 2 à 3 cm de longueur, une nervure médiane imprimée au-dessus très proéminent, des inflorescences naissant sur le tronc ou sur les rameaux défeuillés, une cyme unipare de 3 à 4 cm de longueur pubérulente et des fleurs à pédicelles épais, longues de 1 à 7 cm. Les fruits sont des syncarpes gros de 25 à 50 cm de longueur et de 10 à 30 cm de largeur

pouvant peser 10 kg. Ils contiennent de nombreuses graines longues de 2 à 5 cm, aplaties, noyées dans une pulpe épaisse (Le Thomas, 1969).



Photographie 1: Branche feuillée et Fruit d'*A. mannii* (Photos Kengni, 2011)

➤ **Ecologie**

A. mannii est une espèce de forêt dense. Cette espèce est abondante en Afrique Centrale principalement au Cameroun, au Gabon, en Centrafrique et en Angola (Le Thomas, 1969).

➤ **Usages ethnopharmacologiques**

Les différents organes d'*A. mannii* en décocté ou en infusion sont couramment utilisés en médecine traditionnelle pour les traitements du syphilis, de la typhoïde, des diarrhées, des morsures de serpent (Ndoye *et al.*, 1998 ; Noumi *et al.*, 2001 ; Betti, 2004) et du paludisme dans les régions du Centre et du Sud du Cameroun (Tsabang *et al.*, 2012) de même qu'au Gabon (Akendengue *et al.*, 2005).

➤ **Travaux antérieurs**

A. mannii est l'une des espèces la moins étudiée de la famille des Annonacées.

Boyom *et al.* (2011) ont évalué l'activité antiplasmodiale *in vitro* et la toxicité aiguë des extraits bruts éthanoliques, des fractions méthanoliques riches en acétogénines, des fractions aqueuses, des interfaces et fractions hexaniques des feuilles et brindilles d'*A. mannii*. Ils ont montré que les fractions les plus actives sont les fractions méthanoliques avec des CI₅₀ variant de 2,04 à 2,84 µg/ml sur la souche résistante à la chloroquine du *Plasmodium falciparum* W2. Ces fractions se sont également montrées faiblement toxiques.

Les travaux d'Akendengue *et al.* (2005), ont par contre montré une absence d'activité antiplasmodiale des tiges d'*A. mannii* récoltées au Gabon sur la souche *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistante KI.

I-4-2- Genre *Annona*

Ce genre regroupe des petits arbres, des arbustes ou des arbrisseaux rhizomateux, glabres ou à indument de poils simples. *Annona* est un genre tropical groupant une centaine d'espèces pour la plupart américaines. On retrouve en Afrique et à Madagascar, seulement 4 espèces avec plusieurs sous-espèces et variétés. Les fruits des *Annona sp.* sont syncarpiques, charnus, ovoïdes ou globuleux à cylindriques. Les graines sont nombreuses et noyées dans la pulpe (Le Thomas, 1969; Burkill, 1985).

I-4-2-1-*Annona senegalensis* Pers. (Photographie 2)

Synonymes: *Annona arenaria* Thonn.ex Schum., *Annona chrysophylla* Boj., *Annona chrysophylla* Boj.var. porpetac caution, *Annona chrysophylla* var. Sillans Robyns & Chesq., *Annona porpetac* caution., *Annona senegalensis* Pers. var. *chrysophylla* Boj., *Annona senegalensis* Pers. var. *latifolia* Olive, *Annona senegalensis* var. porpetac (Bail.) Diels (Aké et Guinko, 1991; Pinto *et al.*, 2005).

Noms communs : Pomme cannelle du Sénégal; Annone de savane ; Annone du Sénégal.

Noms Vernaculaires: Kwopchoukwop(Bamoun) ; Doukoulouladé (Foulfouldé); Falo (Bamenda); Soré, Souli (Baya); Pangié (Toupouri); Doukwi (Bororo); Nkowkelok (Bagangté) ; Sabasaba (Yambetta) ; *Ebom Nlong* (Ewondo) et *Gwándàn dààjì* (Hausa) ; Doudou (Tikar).

➤ Description botanique

A. senegalensis Persoon est un arbuste de 1 à 10 m de hauteur avec un diamètre de tige allant jusqu'à 28 cm. Ses rameaux sont glabres, ses ramilles tomenteuses, roux ferrugineux. L'écorce est grisâtre noir, souvent rugueuse et ondulée. La ramification est près du sol, avec les jeunes tiges principalement ferrugineuses, veloutées de tomenteux grisâtres ou brun-rouges, devenant plus tard glabres. Les feuilles sont à pétiole long de 0,5 à 2 cm. Elles sont ovales, oblongues-elliptiques ou oblongues-ovales plus ou moins tomenteux-ferrugineuses, odorantes au froissement. Le limbe est papyracé à coriace, orbiculaire, largement ovale, oblong-ovale à elliptique, long de 6 à 20 cm, large de 5 à 12 cm, obtus, arrondi ou légèrement émarginé au sommet, cordé, subcordé, arrondi à la base; la face supérieure est finement pubérulente, la face inférieure étant couverte sur toute la surface d'un tomentum épais de poils très courts et crépus, gris argenté (Aké et Guinko, 1991; Malgras, 1992 ; Pinto *et al.*, 2005).

Les nervures latérales sont au nombre de 8 à 15 paires imprimées au-dessus, proéminentes en-dessous.

Les fleurs, hermaphrodites, de couleur verte sont solitaires ou groupées sur des tiges, on en rencontre 2 à 4 fasciculées, à pédicelle long de 1 à 2,5 cm. Les sépales sont triangulaires-ovés, concaves, obtus au sommet, longs de 10 à 15 mm, larges de 8 à 10 mm, tomenteux à l'extérieur ; les internes sont étroitement oblongs, presque triquètres, longs de 8 à 10 mm, larges de 3 mm environ, et glabres (Aké et Guinko, 1991 ; Malgras, 1992; Pinto *et al.*, 2005).

Les étamines sont linéaires étroites, longues de 2 à 2,5 mm. Les carpelles sont cylindriques, longs de 1 à 1,5 mm, pubescents.

Les fruits à pédicelle long de 1,5 à 3 cm sont pubescents ; le syncarpe est jaune orangé à maturité. Ils sont ovoïdes ou globuleux ou subgloboses mesurant 2,5 à 5 cm de longueur et 2,5 à 4 cm de largeur, légèrement tuberculés, de 3 à 5 cm de diamètre, tomenteux-ferrugineux à glabrescent. Ils contiennent de nombreuses graines oblongues, aplaties, longues de 6 à 11 mm, larges de 4 à 5 mm, à texture lisse, brun clair et pesant environ 40 g (Aké et Guinko, 1991; Malgras, 1992; Pinto *et al.*, 2005).



Photographie 2 : Branches et feuilles d'*A. senegalensis* Pers. (photo Kengni, 2014)

➤ *Écologie*

A. senegalensis tend à se développer dans les régions semi-arides à subhumides adjacentes à la côte, souvent, mais pas exclusivement, sur des roches coralliennes avec principalement de sable, les sols limoneux, à partir du niveau de la mer jusqu'à 2400 m, à des températures moyennes entre 17 et 30° C, et les précipitations moyennes comprises entre 700 et 2500 mm. C'est une plante solitaire au sein de la savane boisée sous-étage, on la rencontre également dans les forêts marécageuses ou des berges, ou sur les anciennes terres agricoles laissées en jachère pendant une période prolongée. La sous-espèce type *senegalensis* est très largement répandue dans les savanes soudano-guinéennes, et s'étend du Sénégal au Soudan

vers l'Est, et tout le long de la Côte Orientale jusqu'à Madagascar au Sud. La sous espèce *oulotricha* envahit les savanes à la limite de la forêt dense humide. Elle s'étend de la Sierra Leone à la Guinée Conakry et en Côte-d'Ivoire, avec une zone de prédilection autour du massif forestier Camerouno-congolais, au Sud du Cameroun. On la rencontre également en République Centrafricaine et dans les savanes gabonaises (Aké et Guinko, 1991 ; Malgras, 1992 ; Adjanohoun *et al.*, 1996).

➤ Usages ethnopharmacologiques

Les usages thérapeutiques d'*A. senegalensis* sont variés.

La plupart des thérapeutes utilisent les écorces pour le traitement du cancer, des convulsions, des maladies vénériennes, de la diarrhée, de la dysenterie, de la fièvre, de la filariose, de l'impuissance sexuelle chez l'homme, pour favoriser la lactation (Fatope *et al.*, 1996).

Les décoctions et les infusions des feuilles et des racines sont considérées comme étant dotées de propriétés fébrifuges, antitussives, sédatives, décontracturantes, décongestionnantes, antiseptiques, diurétiques, anti-infectieuses, antihémorragiques (internes et externes), cicatrisantes, anti diarrhéiques. La plante est utilisée pour le traitement du paludisme, des maladies respiratoires, des oreillons, des maladies oculaires, des dermatoses, des ulcères, des rhumatismes, de la blennorrhagie, de la dysenterie, de la diarrhée, des abcès, de la syphilis (Aké et Guinko, 1991; Malgras, 1992 ; Philipov *et al.*, 1995 ; You *et al.*, 1995 ; Adjanohoun *et al.*, 1996). Les décoctions des tiges et des feuilles sont utilisées en république de Côte d'Ivoire pour le traitement de la diarrhée (Alain *et al.*, 2015).

La poudre du tronc est utilisée comme vermifuge et pour le traitement des morsures de serpents (Philipov *et al.*, 1995).

➤ Travaux antérieurs

Contrairement aux espèces *A. manni* et *X. africana*, *A. senegalensis* est l'une des plantes médicinales ayant fait l'objet de plusieurs études.

Kerharo et Adam en 1974 ont isolé des feuilles d'*A. senegalensis*, la rutine, la quercétine et la querectrine. Un fractionnement bio guidé a permis d'isoler des extraits de l'écorce de tronc d'*A. Senegalensis* quatre ent-kaurenoides avec une activité cytotoxique sélective sur les cellules cancéreuses du sein et de la prostate (Fatope *et al.*, 1996). Deux nouveaux mono et tétraacétogénines cytotoxiques (Annosenegaline et annogalène) ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique de *A. senegalensis* (Sahpaz *et al.*, 1994).

Cinq di-terpènes (kauranes) possédant des activités anti-tumorales et antibactériennes ont été isolés des extraits d'écorces de racine d'*A. senegalensis* (**Kayodé et Durodola, 1976**).

Des souris infectées avec des souches de *Trypanosoma brucei brucei* 8/18 ont été traitées (voies orale et intramusculaire) avec les extraits aqueux de racines aux doses de 27,8 mg/kg et 9,5 mg/kg respectivement pour quatre jours consécutifs, en commençant à partir des 72 heures après l'infection des souris. A ces doses, l'extrait d'*A. Senegalensis* a présenté un effet thérapeutique effectif contre de *Trypanosoma brucei brucei* chez les souris (**Igweh et Onabanjo, 1989**).

Des extraits des graines d'*A. senegalensis* ont été testés pour leurs activités antiparasitaires contre *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei* et leur activité cytotoxique contre les lignées cellulaires de KB et VERO. Le fractionnement bio-guidé des extraits à travers l'essai contre *Artemia salina* a permis d'isoler les acétogénines (**Sahpaz et al., 1994**).

La (-)-roemerine, un alcaloïde connu isolé des feuilles de *A. senegalensis*, permet d'intensifier la réponse cytotoxique provoquée par la vinblastine sur les cellules KB-V1 multirésistantes (**You et al., 1995**).

Les extraits d'éther de pétrole, de dichlorométhane, méthanolique et aqueux de *A.Senegalensis* ont présenté une très bonne activité trypanocide avec une concentration inhibitrice inférieure à 1mg/ml (**Freiburghaus, et al., 1996**).

Les travaux de **Fall et al. (2003)**, ont permis de mettre en évidence une activité antiparasitaire des extraits des racines d'*A. senegalensis* sur une souche résistante de *P. falciparum*. Les mêmes auteurs ont isolé et identifié des acétogénines dans les racines de plantes, ce qui pourrait expliquer l'activité antiparasitaire de la drogue.

Les études effectuées sur l'extrait méthanolique des écorces de racines d'*A. senegalensis* ont permis de démontrer une réduction de l'hyperthermie provoquée par le venin de serpent chez les rats (**Adzu et al., 2005**). La concentration létale 50 (CL₅₀) du même extrait est de 232,7 mg/ml selon le test effectué sur *Artemia salina*.

Les plantes de la famille des Annonacées sont très étudiées pour une éventuelle application en chimiothérapie en vue du traitement du cancer (**Eparvier et al., 2006**) de par leur richesse en acétogénines, molécules douées d'activités anticancéreuses. Cependant, peu d'études visant à démontrer leurs activités anti diarrhéique et antioxydante sont menées (**Rakotomanga et al., 2004; Osario et al., 2007**).

I-4-3- Genre *xylopia*

Le genre *Xylopia* regroupe des arbres à fût généralement étroit et relativement élevé, coiffé d'une cime à rameaux étalés horizontalement, ou alors des arbustes glabres ou à indument de poils simples. Ce genre est l'un des plus importants de la famille des Annonacées avec environ 150 espèces. Il est représenté en Afrique par une trentaine d'espèces environ, pour la plupart en zone forestière (Le Thomas, 1969).

I-4-3-1-*Xylopia africana* (Photographie 3)

X. africana (Benth) Oliv. appartient au règne végétal, embranchement des Magnoliophyta, règne des plantae, Classe des Magnoliopsida, ordre des Magnoliales, famille des Annonaceae, Genre *Xylopia*, d'espèce *Xylopia africana*.

Noms communs : Poivrier d'Afrique (Français) ; Africa Pepper (Anglais).

Noms vernaculaires : N'ki (Bakossi) ; Akoui (Ewondo) ; Hikoli (Bassa) ; Netsham (Bagangté) ; Nkwendzwe (Bafoussam) ; Kembare (Foufouldé).

➤ Botanique

Xylopia africana présente les mêmes caractéristiques botaniques que *Xylopia aethiopica*. *Xylopia africana* est un arbre de taille irrégulière pouvant aller jusqu'à 25 m de hauteur et 60 cm de diamètre, ayant un fût droit cylindrique, des branches étalées horizontalement et ascendantes au bout, une cime conique et feuillage vert sombre, une écorce brun-grisâtre à rougeâtre, fissurée, une tranche d'environ 1 cm d'épaisseur, fibreuse, brun jaunâtre à lignes claires ou foncées, odorante, des feuilles alternes, simples, des limbes elliptiques atteignant 20×9 cm, coriaces, sommet aigu, des nervures latérales peu visibles, un pétiole long de 2-6 mm et des inflorescences en fascicules de 2-6 fleurs ou fleurs solidaires. *Xylopia africana* se distingue de *Xylopia aethiopica* de par ses fruits. Ces derniers, plus gros et moins courbés que ceux de *Xylopia aethiopica* sont formés de 8 à 10 méricarpes, stipités, pourprés, de 12 × 1,2 cm (photographie 3). Les graines sont noires à odeur poivrée (Achoundong, 1984).



Photographie 3: Branches, Feuilles (a) et Fruits secs (b) de *X. africana* (Photos Kengni, 2013)

➤ **Écologie**

Leurs habitats naturels sont les forêts subtropicales et tropicales. Cette espèce se retrouve au Cameroun, au Nigéria et en São tomé et Príncipe. Celle-ci, abondante au Cameroun a été retrouvée en grande densité dans la réserve forestière de Bali-Ngamba dans la région du Nord-Ouest (**Le Thomas, 1969**).

➤ **Usages ethnopharmacologiques**

Les graines de *X. africana* sont utilisées comme condiment aussi bien à l'état frais qu'à l'état sec. Ces graines sont utilisées comme succédané du poivre pour épicer divers mets en Afrique (**Noumi et Yomi, 2001**). Sur le plan thérapeutique, *X. africana* est utilisé pour le traitement des bronchites, du rhumatisme, de la diarrhée, de la dysenterie, des crises d'asthme et des maux d'estomac (**Mekou et al., 2011**).

➤ **Travaux antérieurs**

Boyom et al. (2011) ont évalué l'activité antiplasmodiale *in vitro* et la toxicité aiguë des extraits bruts éthanoliques, des fractions méthanoliques riches en acétogénines, des fractions aqueuses et des interfaces des feuilles, brindilles, écorces et racines de *Xylopia africana*. Ils ont montré que les fractions les plus actives sont les fractions méthanoliques avec des CI_{50} variant de 1,05 à 2, 83 µg/ml. Ces fractions se sont également montrées faiblement toxiques chez les souris.

A. manni, *A. senegalensis* et *X. africana* sont trois plantes de la famille des Annonaceae dont la richesse en acétogénines a été démontrée (**Naoto et Tetsuaki, 2009**).

Relation entre microorganismes, radicaux libres, antioxydants et antimicrobiens

Lors des infections microbiennes, les cellules phagocytaires activées sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe enzymatique (NADPH oxydase et NO synthase), lequel est capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire simultanément de grandes quantités de radicaux superoxydes (O_2°) et monoxydes d'azote ($^\circ NO$). Ces radicaux provoquent par la suite des dommages cellulaires importants via la formation du peroxy-nitrite (ONOO) (**Favier, 2003**) ; ce qui complique davantage la situation du patient. En effet, les espèces oxygénées réactives générées jouent un rôle crucial dans le développement de plusieurs pathologies (**Erdemoglu et al., 2006; Léophonte et al., 2006**). Les travaux récents témoignent que la colonisation microbienne et les exacerbations infectieuses interfèrent avec les médiateurs de l'inflammation et concourent à l'aggravation insidieuse de la

broncho-pneumopathie chronique obstructive par voie du stress oxydatif (**Léophonte *et al.*, 2006**). Les antioxydants peuvent ainsi jouer un rôle important dans le contrôle de plusieurs pathologies (**Erdemoglu *et al.*, 2006**). Par conséquent, tout antimicrobien capable à la fois de stopper la propagation d'espèces oxygénées réactives facilitera aussi rapidement que possible le processus de guérison (**Dickson *et al.*, 2006**). Ces observations soulignent la nécessité de rechercher des nouveaux agents aux activités antimicrobienne, antioxydante et anti-diarrhéique.

CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES

II-1- CADRE D'ÉTUDE

Ce travail, réalisé en plusieurs étapes, s'est déroulé dans différents laboratoires en fonction des expertises et de la disponibilité du matériel. Ainsi :

Au laboratoire de Chimie Organique I de l'Université de Yaoundé I ont été réalisées les extractions et la partition liquide-liquide afin d'obtenir des extraits éthanoliques et les différentes fractions utilisés pour les tests.

Le Laboratoire de Phytobiochimie et d'Études des Plantes Médicinales de l'Université de Yaoundé I a servi de cadre d'étude de la phytochimie qualitative et de la réalisation des tests d'activités antimicrobiennes *in-vitro* et *in-vivo*.

Les tests de toxicité orale aiguë et de l'activité anti diarrhéique ont été effectués au Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie de la Faculté des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I.

Au Centre de Biotechnologie de Nkolbisson, ont été effectués les tests relatifs à l'activité antioxydante.

Le Laboratoire de Physiologie Animale de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I a servi de cadre pour la réalisation des dosages biochimiques.

Le Centre Pasteur du Cameroun(CPC) ainsi que le laboratoire BEI Resources ont mis à notre disposition les souches et les isolats microbiens utilisés pour les tests antimicrobiens.

Le criblage phytochimique quantitatif (HPLC) a été effectué au Laboratoire du Département des Matériaux Chimiques et d'Ingénierie Environnementale de l'Université de Padova située en Italie.

II-2- MATÉRIEL

II-2-1- Animaux expérimentaux

L'étude des activités anti-diarrhéique (diarrhée fonctionnelle) et anti bactérienne *in-vivo* a été faite sur des rats albinos de souche *Wistar* mâles et femelles, âgés entre 8 et 9 semaines et de masses comprises entre 170 et 180 g. Ces rats étaient élevés à la température ambiante, avec un cycle photopériodique alternant 12 heures diurne et 12 heures nocturne dans l'animalerie du Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie de la Faculté des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I. Ils étaient logés dans des cages standards en plastic, la litière utilisée était la sciure, renouvelée deux fois par semaine. Ils recevaient de la

nourriture composée et de l'eau de robinet à volonté. La formule de la composition de cette nourriture se trouve en annexe 1. Cette nourriture composée était mélangée avec de l'eau du robinet à raison de 1 kg de la nourriture en poudre pour 500 ml d'eau. La pâte obtenue était ensuite conditionnée en petites boules rondes (forme de balle de tennis), puis séchées moyennement avant de servir aux rats.

Des tests préliminaires d'évaluation des propriétés biologiques des différents extraits et fractions des trois plantes permettront de sélectionner la fraction qui aura montré une plus meilleure activité aussi bien sur les microorganismes *in-vitro* que sur la diarrhée fonctionnelle pour les tests *in-vivo*. L'étude de sa toxicité orale aiguë a été faite sur les souris femelles de souche Muss Musculus Swiss âgées entre 2 et 3 mois. La masse de chacune d'elle était comprise entre 18 et 22 grammes. Elles étaient élevées dans l'enceinte décrite ci-dessus. Ces animaux ont été nourris avec un aliment dont la composition est donnée en annexe I et abreuvés à l'eau de robinet sous une humidité de 45%. De plus, ils ont subi un éclairage diurne et une obscurité nocturne. Globalement, l'utilisation des animaux pour les tests *in-vivo* était faite suivant la Directive 86/609/CEE du conseil de l'Union Européenne relative à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales, adoptée par le comité institutionnel du Ministère de la Recherche Scientifique et de l'Innovation du Cameroun.

II-2-2- Matériel végétal

Sur la base des données des enquêtes ethnopharmacologiques ainsi que de la revue de littérature, les organes des 3 plantes utilisées pour le traitement traditionnel de la diarrhée et d'autres désordres gastro-intestinaux ont été récoltés dans la région du Centre Cameroun. Les organes d'*A. mannii* et de *X. africana* utilisés ont été récoltés au Mont Kala, banlieux de Yaoundé le 27 Août 2013 entre 9 heures et 13 heures. Les organes d'*A. senegalensis* ont été récoltés à Balamba dans le département de Mbam et Inoubou le 25 Avril 2014 entre 08 heures et 09 heures 30 min. L'identification des plantes a été confirmée à l'Herbier National du Cameroun (HNC). Le tableau VII donne plus de précision sur les différents organes utilisés ainsi que les numéros d'identification des plantes.

Tableau VII: Espèces végétales et organes utilisés, numéros d'identification

Noms de plantes	N° d'identification	Lieu de récolte	Organes utilisés
1- <i>A. manni</i> .	45582/HNC	Mt Kala	Feuilles, écorces de tronc et brindilles
2- <i>A. senegalensis</i> .	32071/HNC	Balamba	Feuilles, écorces du tronc et brindilles
3- <i>X. africana</i>	38322/HNC	Mt Kala	Feuilles et brindilles

II-2-3-Matériel microbien

L'activité antimicrobienne des différents extraits et fractions obtenus a été évaluée en utilisant 4 souches d'entérobactéries soit *Escherichia coli* ATCC25922, *Shigella flexneri* NR-518, *Salmonella enterica* NR-13555, *Staphylococcus aureus* CIP 7625. Les souches fongiques étaient constituées des *Candida albicans* NR-29450, *Candida krusei* ATCC 6258 et *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Un isolat de *Cryptococcus neoformans* a été également utilisé. Ces microorganismes fournis par le laboratoire BEI Resources (USA) et le Centre Pasteur du Cameroun comptent parmi les germes les plus incriminés comme étant à l'origine des diarrhées infectieuses chez l'Homme. Ces germes ont été isolés des selles des patients. L'entretien des souches était fait sur les milieux Mueller Hinton Broth (MHB) préfabriqué (OXOIDCM004) pour les bactéries et Sabouraud Agar (SA) pour les levures. Les tests ont été effectués à température ambiante du laboratoire.

II-2-4-Huile d'olive

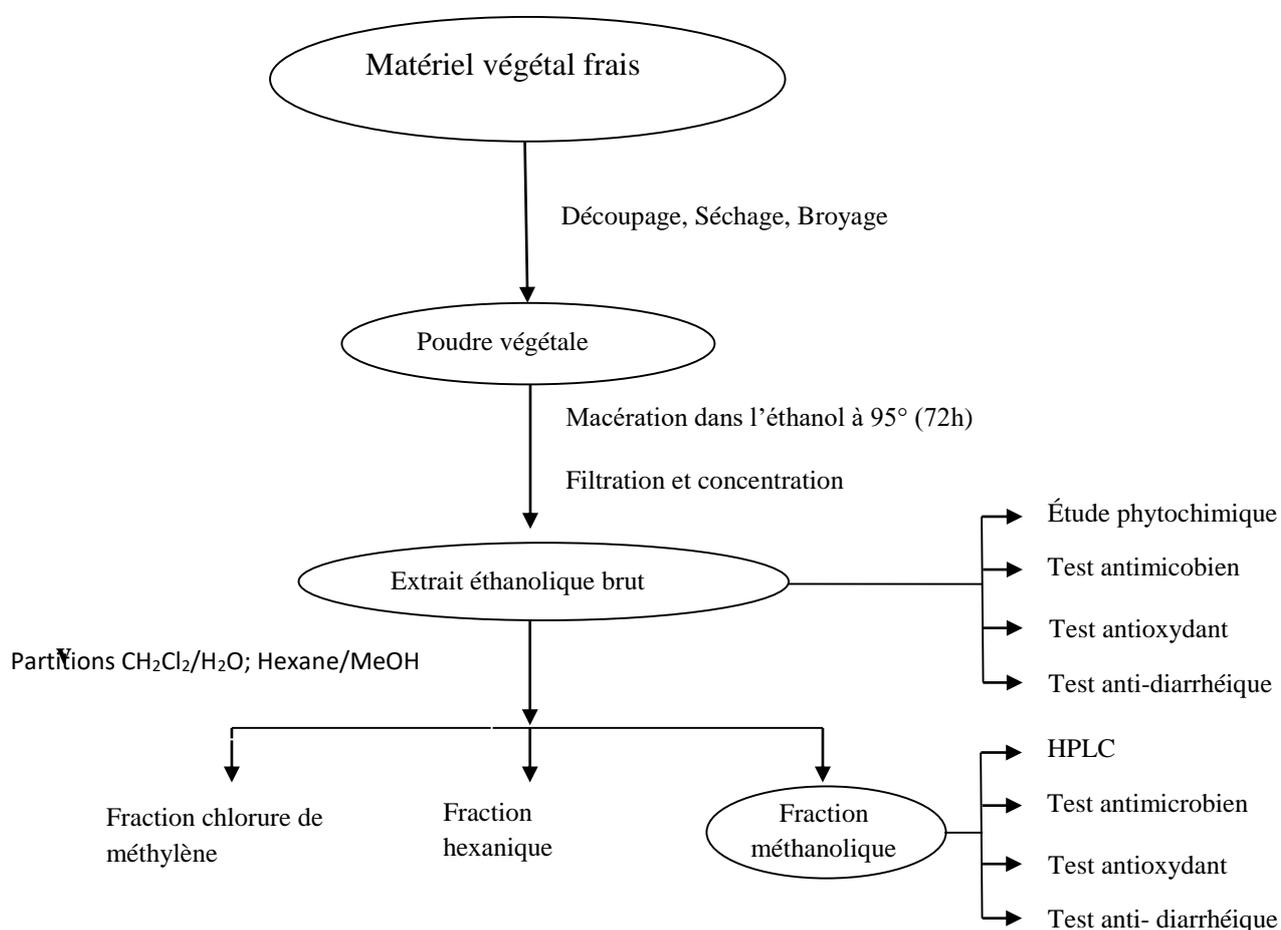
Pour la réalisation des tests *in-vivo* (tests anti diarrhéiques...), le seul solvant disponible capable de solubiliser la fraction test (AnsefeMeOH) était l'huile d'olive. La composition de l'huile d'olive de marque Puget commercialisée au Cameroun et utilisée dans le cadre de ce travail est consignée dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Composition de l'huile d'olive de marque Puget

Composé	Teneur (%)
Protéines	0,0
Glucides	0,0
Cholestérol	0,0
Total acides gras mono-insaturés	73,0
Total acides gras poly-insaturés	10,5
Total acides gras saturés	14,0
Autres (Acide gras trans, Vit E, Vit K, ...)	2,5

II-3-MÉTHODES

II-3-1- Schéma général du travail



II-3-2- Préparation et caractérisation des extraits

II-3-2-1- Traitement des plantes et préparation des extraits bruts éthanoliques et fractions méthanoliques

Les feuilles, les brindilles, les écorces du tronc découpées ont été séchées à température ambiante pendant une semaine. Par la suite, ces organes ont été broyés à l'aide d'un broyeur jusqu'à obtention d'une poudre fine. Les poudres fines des différents échantillons ont été ensuite soumises à une extraction à l'éthanol 95%.

II-3-2-2- Procédure d'extraction liquide-liquide

Au cours de ce travail, la procédure de préparation des fractions riches en acétogénines décrite par Alali *et al.* (1999) (figure 10) a été utilisée.

Un kilogramme de poudre sèche de chaque organe (feuilles, brindilles, écorces) de *A. manni*, *X. africana* et *A. senegalensis* respectivement ont été séparément macérés à température ambiante dans de l'éthanol 95% pendant 72 heures. Le mélange était remué deux fois par jour (matin et soir). Au bout de 72 heures, le mélange est décanté et filtré à l'aide du papier filtre Wattman N° 1. Le filtrat a été concentré à l'évaporateur rotatif (BÜCHI 011) à 80°C. Afin d'optimiser le rendement d'extraction, les résidus de plante ont été de nouveau macérés deux fois de suite avec le solvant récupéré. Les extraits éthanoliques obtenus après évaporation de l'éthanol ont été réunis et une partie soumise à la partition liquide-liquide. Une quantité de chaque extrait éthanolique obtenu a été partitionnée entre l'eau et le chlorure de méthylène (1 :1 v/v) aboutissant ainsi à l'obtention de la fraction aqueuse et de la fraction au chlorure de méthylène.

Après concentration à l'évaporateur rotatif à 40°C, le résidu CH₂Cl₂ a été partitionné entre le MeOH 90% et l'hexane à volume égal (1 :1 v/v) donnant ainsi la fraction hexanique et la fraction méthanolique. Cette dernière est évaporée à 75°C pour obtenir la fraction méthanolique riche en acétogénines (**Figure 10**).

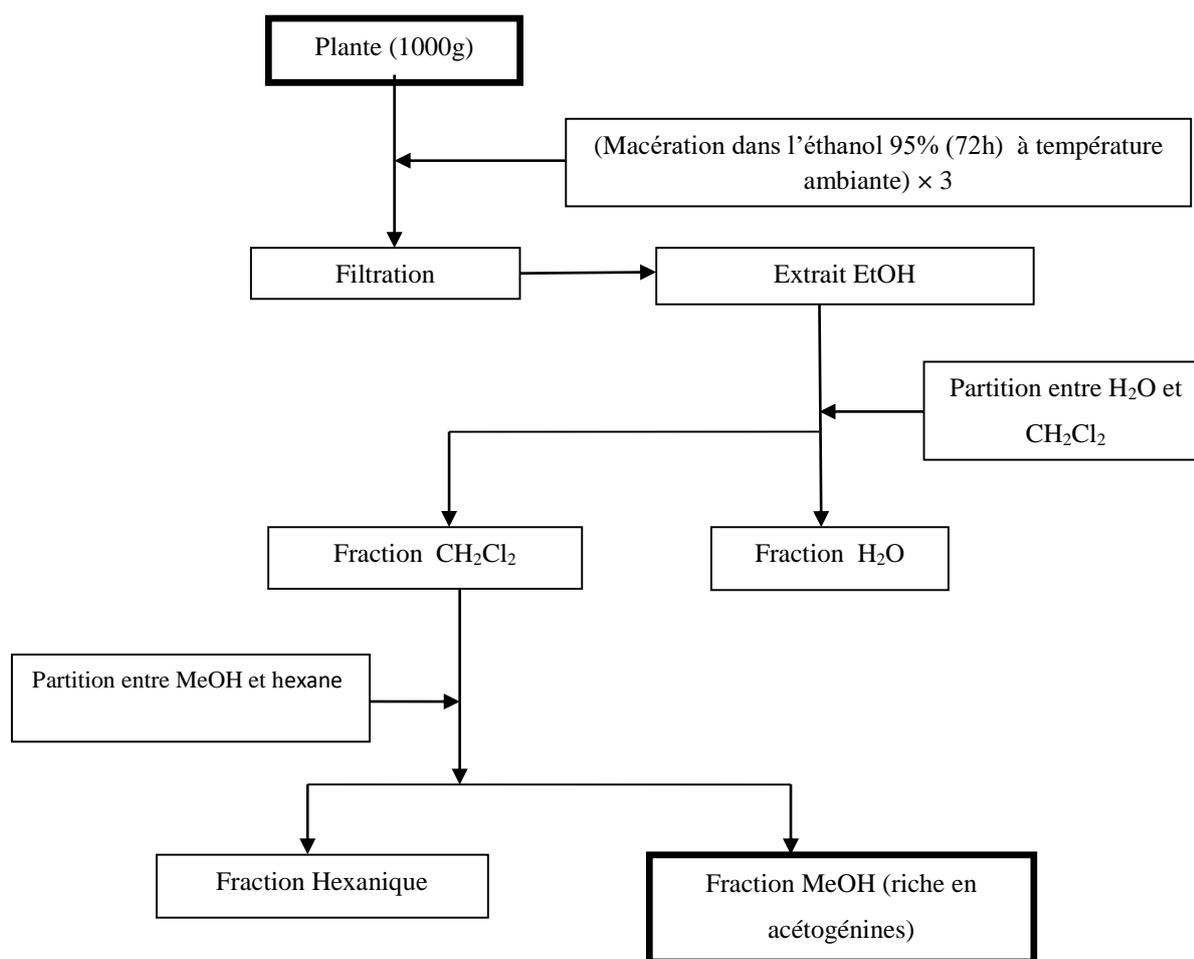


Figure 10: Procédure d'extraction et de préparation des fractions riches en acétogénines (Alali et al., 1999)

Les rendements d'extraction ont été calculés par rapport au poids du matériel végétal de départ en utilisant la formule suivante:

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de l'extrait (g)}}{\text{Masse de la matière végétale (g)}} \times 100$$

II-3-3- Criblage phytochimique

II-3-3-1- Évaluation qualitative des métabolites secondaires

Le screening phytochimique des extraits bruts a été effectué afin d'identifier la présence des composés suivants : **alcaloïdes, flavonoïdes, saponines, tanins, phénols, stéroïdes, triterpènes, glycosides, anthocyanines et anthraquinones** par des méthodes standards.

➤ **Mise en évidence des alcaloïdes**

Cinquante milligrammes d'un extrait ou d'une fraction d'extrait ont été dilués dans 10 ml de H₂SO₄ à 2% ; le mélange a été homogénéisé puis porté à ébullition pendant 2 à 3 minutes et filtré. A 1 ml du filtrat, 5 gouttes du réactif de Mayer ont été ajoutées. Le développement d'une turbidité confirme la présence des alcaloïdes (**Sofowara, 1993**).

➤ **Mise en évidence des flavonoïdes**

Cinq millilitres d'une solution d'ammoniaque diluée ont été ajoutés à 1g de filtrat aqueux de l'extrait. Au mélange, de l'acide sulfurique concentré (1 ml) a été ajouté. Une coloration jaune qui disparaît au fil du temps caractérise la présence des flavonoïdes (**Sofowara, 1993**).

➤ **Mise en évidence des saponines**

Vingt cinq milligrammes d'extrait ont été mélangés à 15 ml d'eau distillée dans un tube à essai. Après homogénéisation, l'ensemble a été porté à ébullition dans un bain-marie bouillant pendant 5 min. Après refroidissement, un volume suffisant de solution a été introduit dans un tube à essai puis agité vigoureusement pendant 10 secondes au vortex. La présence d'une mousse épaisse d'un centimètre environ qui persiste plus d'une minute après agitation matérialise la présence des saponines (**Oloyede, 2005**).

➤ **Mise en évidence des tanins**

Les tanins ont été détectés par ébullition et filtration d'une solution aqueuse à 5% p/v de l'extrait. Quelques gouttes de chlorure ferrique (0,1%) ont été ajoutées à 10 ml de la solution filtrée. La présence des tanins se manifeste par un changement de coloration de la solution qui vire au bleu-noir (tanins galliques) ou alors au vert-brun marquant la présence des tanins catéchiques (**Trease et Evans, 1996 ; Oloyede, 2005**).

➤ **Mise en évidence des phénols**

Cinquante milligrammes d'extrait ont été dissous dans 15 ml de méthanol. La solution d'extrait obtenue a été chauffée au bain marie bouillant pendant 15minutes. Après refroidissement, la suspension est filtrée. Au filtrat obtenu, on ajoute 3 gouttes d'une solution de cyanure ferrique fraîchement préparée (1ml de FeCl 1% (P/V) et 1ml de K₃Fe (CN)₆). La formation d'un précipité vert met en exergue la présence des phénols (**Harbone, 1998**).

➤ *Mise en évidence des triterpènes et des stéroïdes*

Cinquante milligrammes d'extrait sont dissous dans 2 ml de chloroforme. A ce mélange, on ajoute quatre gouttes d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. La présence des triterpénoïdes est caractérisée par la coloration rouge violacée alors que la présence des stéroïdes est caractérisée par la coloration bleue qui vire ensuite au vert foncé (Sofowara, 1993).

➤ *Mise en évidence des glycosides*

La présence de glycosides a été détectée à l'aide du test de Keller-Killiani. Un gramme d'extrait a été dissout dans 5 ml d'eau distillée. A la solution filtrée obtenue, on a ajouté 2 ml d'acide acétique glacial contenant une goutte de solution de chlorure ferrique et 1 ml d'acide sulfurique concentré. Un anneau brun s'est formé à l'interface. Un anneau violet est également apparu sous l'anneau brun tandis que la couche d'acide acétique formait un anneau verdoyant juste au-dessus de la bague brune et se répandit peu à peu dans cette couche (Oloyede, 2005)

➤ *Mise en évidence des anthocyanines*

Cinquante milligrammes d'extrait ont été mélangés à 15 ml d'HCl à 1% et l'ensemble a été porté à ébullition. La variation de coloration du rouge orangé au bleu orangé met en exergue la présence des anthocyanines (Odebeyi et Sofowora, 1978).

➤ *Test de mise en évidence des anthraquinones*

Cinquante milligrammes d'extrait ont été dilués dans 4 ml d'un mélange de chloroforme et d'éther de pétrole (v/v), homogénéisés puis filtrés ; à 1 ml de filtrat, un égal volume de NaOH à 10% a été ajouté. Le développement d'une coloration rouge est caractéristique des anthraquinones (Harbone, 1998).

II-3-3-2- Criblage phytochimique quantitatif

L'analyse des composés phénoliques présents dans les fractions et extraits bruts d'intérêt a été faite par la chromatographie liquide sous haute performance (HPLC).

➤ **Principe**

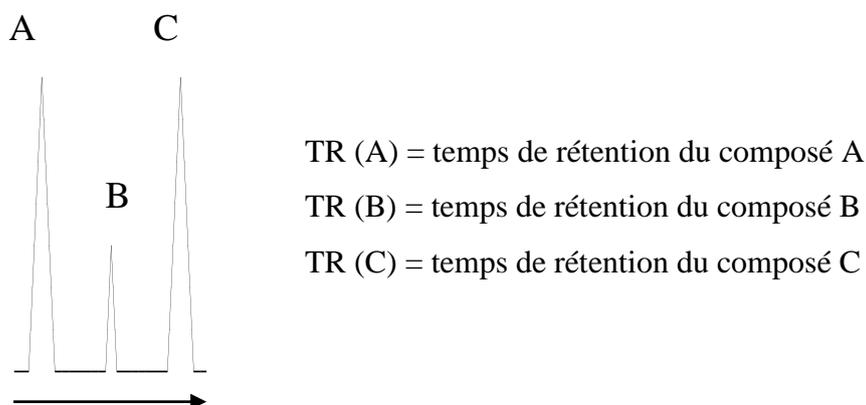
C'est une méthode d'analyse physico-chimique des constituants d'un mélange en fonction de leur hydrophobicité et de leur solubilité entre la phase mobile liquide et la phase stationnaire solide ou liquide.

➤ Mode opératoire

L'analyse par HPLC a été effectuée en utilisant Waters Corporation system USA, un système de HPLC Waters1525 équipé de pompe binaire Waters 2998 HPLC et d'un détecteur photodiode. La séparation était effectuée sur une colonne XTerra RP 18 colum (4,6x 15 mm 3,5 um, Waters, USA). Les échantillons étaient préparés dans de l'eau pure à 1 mg / ml et centrifugés à 10000 tr rpm pendant 10 min. Le surnageant obtenu était filtré à travers un filtre à membrane d'acétate de cellulose (0,45 µm, Schleicher & Schuell). 100 µl de filtrat étaient injectés dans le système HPLC et élués. La température de la colonne était réglée à 40° C.

Une élution par gradient était effectuée à 25° C avec un mélange d'une solution A (eau/acide acétique à 1%) et une solution B (5% acide acétique/méthanol) constituant la phase mobile, en suivant le gradient de 0% à 100% de solution B en 50 min. Du début jusqu'à la deuxième minute de la course, 100% de A était élué. Le débit était de 1 ml/ min et le volume d'injection était de 100 µl de filtrat, les pics ont été détectés à diverses longueurs d'onde (280, 340 et 380nm). L'identification des composés a été effectuée sur la base du temps de rétention. L'extrait était dilué dans le méthanol ainsi que les solutions standards. Vingt µl de chaque solution standard à 500 µg/ml étaient injectés dans le chromatographe suivis d'une solution contenant huit composés (impératorine, quercétine, l'acide gallique, catéchine, eriniarin, acide chlorogenic, Eugenol, l'acide vanillique) préparée à 1 mg /ml.

L'analyse quantitative est effectuée par intégration des mesures des surfaces de pics et les résultats exprimés en pourcentages relatifs. Ci-dessous la courbe représentant le chromatogramme d'un mélange de trois composés.



II-3-4- Étude de l'activité antimicrobienne *in-vitro*

Détermination des paramètres d'inhibition : CMI et CMBs des extraits et fractions d'*Annona senegalensis*

Un screening préliminaire ainsi que d'autres résultats (Kengni, 2015) des tests d'activité antimicrobienne de l'ensemble des extraits et fractions obtenus a permis de sélectionner les extraits et fractions des organes d'*A. senegalensis* qui étaient les plus actifs comparativement à ceux des autres plantes (*A. mannii* et *X. africana*) pour le test antimicrobien *in-vitro*.

II-3-4-1- Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

La méthode de micro dilution utilisant la procédure décrite par le M07-A9 et selon le protocole décrit par le CLSI (2012) a été utilisée, avec quelques ajustements.

➤ Principe

Cette méthode est basée sur l'observation visuelle du culot formé par le dépôt de bactéries et/ou du trouble dans le bouillon nutritif.

Préparation des solutions stock d'extraits

Une masse d'extrait était pesée puis dissoute dans du DMSO 10% pour une concentration requise de 5 mg/ml, dans des tubes stériles. Le chloramphénicol était préparé à la même concentration et a servi de contrôle positif.

➤ Préparation des solutions d'inocula bactériens

Les suspensions de bactéries utilisées pour les tests de sensibilité aux extraits ont été préparées au titre 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ Cellules/ml), par correspondance visuelle de turbidité vis-à-vis du standard de McFarland.

➤ Mode opératoire

Les essais ont été effectués dans des microplaques de 96 puits (12 lignes et 8 colonnes). Le milieu de culture utilisé était le Mueller Hinton Broth, préparé suivant les instructions du fabricant.

En premier, 100 µl de milieu de culture étaient introduits dans chacune des 96 cupules de la microplaque. Ensuite, 100 µl d'une solution stérile d'un extrait au titre de 5 mg/ml ont été prélevés et ajoutés aux 100 µl des puits de la première ligne, exception faite du 3ème et du 6ème puits. Dans le 6ème puits étaient déposés 100 µl de la solution de l'antimicrobien standard

au même titre que l'extrait/fraction. Une série de dilutions géométrique de raison 2 a été effectuée de la ligne 1 à la ligne 11. Enfin, 100 µl d'une suspension bactérienne à 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ cellules/ml) étaient ensemencés dans les cupules de la plaque, excepté celles de la colonne 3 ne contenant que le milieu de culture et servant de blanc. Les puits de la ligne 12, contenant le milieu de culture et l'inoculum, servaient de contrôle négatif. Les cupules de la colonne 6 servaient de contrôle positif. Ainsi, les concentrations des extraits dans les lignes de la plaque allaient de 5 mg/ml (ligne 1) à 0,00488 mg/ml (ligne 11).

Les microplaques ont été recouvertes puis incubées à 37 °C pendant 24 h. À l'issue du temps d'incubation, la plus petite concentration à laquelle aucune croissance visible n'a été notée, marquée par l'absence de turbidité ou de culot, correspondait à la CMI de l'extrait/fraction concerné.

Le même protocole suivi de quelques modifications était adopté pour la réalisation du test d'activité antifongique.

II-3-4-2- Détermination des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB)

La détermination des CMB a été effectuée par subculture en milieu liquide des préparations prélevées sur les plaques de détermination des CMI.

En effet, à l'issue du temps d'incubation des plaques de détermination des CMI, le contenu des plaques a été prélevé à raison de 25 µl de la cupule correspondant à la CMI et les quatre cupules précédentes respectivement, puis transférés dans cinq puits d'une autre plaque préalablement préparée et contenant dans chaque cupule 100 µl de milieu Mueller Hinton stérile. Ainsi, les quantités d'extraits contenues dans ces différentes cupules étaient diluées suffisamment afin d'éliminer l'effet inhibiteur de l'extrait testé.

Les lignes 6 et 7 de chaque plaque servaient de contrôle de stérilité du milieu de culture. Les plaques ont été recouvertes et incubées à 37 °C pendant 24h. Le puits comportant la plus petite concentration d'un extrait n'ayant montré aucune croissance visible de la bactérie, a vu son équivalent de la plaque de CMI correspondante considéré comme contenant la concentration Bactéricide (CMB) de l'extrait.

II-3-5- Évaluation de l'activité anti-oxydante

Sur la base des résultats obtenus à l'issue des tests d'activité antimicrobienne *in vitro* et des tests préliminaires d'activité anti diarrhéique effectués avec l'ensemble des extraits et

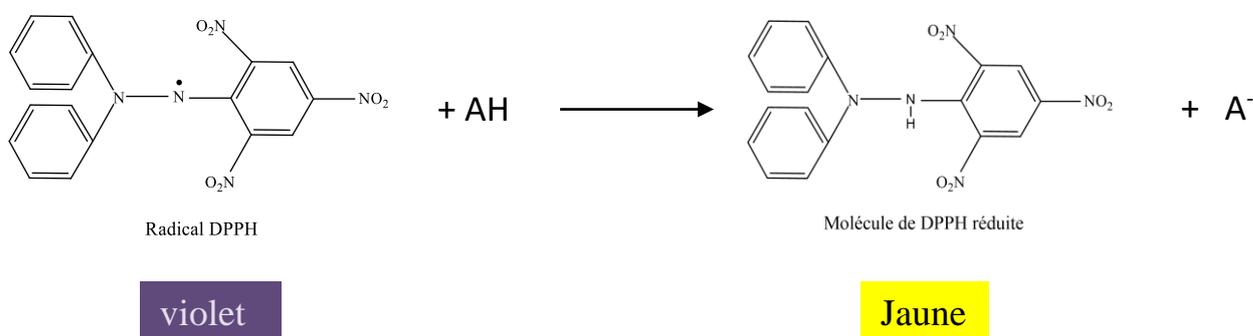
fractions des plantes disponibles, seuls ceux d'*A. senegalensis* qui avaient montré le plus d'activité ont été retenus pour les tests d'activité anti-oxydante. Ces derniers ont été effectués suivant 3 méthodes soit, l'activité antiradicalaire du DPPH, le pouvoir chélateur des ions Fe^{2+} ainsi que l'inhibition de l'Oxyde Nitrique.

II -3-5-1- Activité sur le radical DPPH

Nous avons utilisé la méthode au DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) telle que décrite par **Bassene. (2012)** avec quelques modifications. Portant notamment sur les volumes utilisés et par conséquent sur les temps d'incubations.

➤ Principe

Le DPPH est une molécule instable qui absorbe la lumière à 517 nm. Lorsqu'elle est en présence d'une substance anti-radicalaire capable de lui fournir des protons, cette molécule se stabilise. Cette stabilité est matérialisée par un changement de coloration qui passe du violet au jaune et de longueur d'onde d'absorption maximale qui varie de 517 à 470 nm (**Bassene, 2012**).



➤ Mode opératoire

Dans chaque cuve spectrophotométrique, 100 μ l de solutions d'extraits ou fractions préalablement préparés ont été introduits puis complétés par 900 μ l de DPPH• (200 mg/l). La lecture des densités optiques a été faite après 60 min d'incubation dans le noir et à température ambiante.

Les témoins ont été préparés dans les mêmes conditions avec à la place de l'extrait ou fraction, 100 μ l de méthanol pour le témoin négatif et 100 μ l d'acide gallique (1g/l) pour le témoin positif.

Le calcul du pourcentage de piégeage s'est fait à partir de la formule suivante :

$$\%SC = \frac{Abs_t - Abs_e}{Abs_t} \times 100$$

$\%SC$ = Pourcentage de piégeage du radical DPPH• par la substance à tester

Abs_t = Absorbance à t = 60 min du témoin négatif (solution de DPPH• sans antiradicalaire)

Abs_e = Absorbance à t = 60 min de la solution de DPPH• contenue dans l'extrait ou fraction

Toutes les manipulations ont été réalisées en triple et les moyennes utilisées.

Les résultats sont exprimés en CP₅₀, les CE₅₀ et PA en sont déduits.

CP₅₀ = Concentration en anti-radicalaire permettant de piéger 50% de radicaux libres

La CP₅₀ 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 ; Ce paramètre a été éliminé en ramenant ce résultat à une mole de DPPH•.

CE₅₀ = Concentration efficace 50

Dans le cas des extraits et fractions, qui correspondent à des mélanges de composés, la CP₅₀ sera seulement exprimée en g/l ; la concentration efficace exprimée en gramme d'extrait/fraction par mole de DPPH• a été calculée.

$$CE_{50} = CI_{50} = \frac{Cp_{50}}{[DPPH^{\bullet}]}$$

CI₅₀ c'est la concentration en extrait/ fraction qui inhibe la moitié des radicaux libres présents dans le milieu. $[DPPH^{\bullet}]$ est la concentration en DPPH•.

PA = Pouvoir anti-radicalaire

C'est l'inverse de la concentration efficace ; il mesure l'efficacité de l'anti-radicalaire. Plus il est élevé plus l'anti-radicalaire est efficace.

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

II -3-5-2-Détermination de la chélation du Fe²⁺

La capacité chélatrice de nos extraits et fractions est déterminée selon la méthode décrite par (Batool *et al*, 2010), basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-orthophénanthroline après traitement avec le chlorure de fer (FeCl₂).

➤ Principe de la méthode

Le 1,10-phénanthroline forme un complexe stable (ferroïne) avec le fer ferreux (Fe²⁺) de couleur rouge orangé. Mais en présence d'un extrait ayant une capacité chélatrice, on note une diminution de l'intensité de la coloration du complexe 1,10-phénanthroline-Fe²⁺. Cette baisse de la coloration est mesurée à 510 nm. L'équation de cette réduction est présentée comme suit :

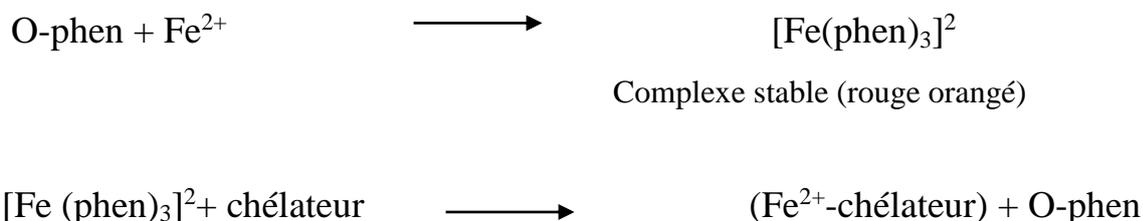


Figure 11: Réaction de la réduction

➤ Méthode

Préparation de la solution d'orthophénanthroline : peser exactement 50 mg d'orthophénanthroline et dissoudre dans 100 ml de méthanol.

Préparation de la solution de chlorure de fer : dissoudre 2,54 g de chlorure de fer dans 100 ml de méthanol et homogénéiser avec un agitateur jusqu'à dissolution complète.

Préparation des solutions d'extraits : 10 mg de chaque extrait sec sont dissous dans 5 ml d'eau distillée. Ensuite on procède à une série de dilution dans sept tubes avec pour première concentration 2 mg/ml

➤ Réalisation de l'essai

Nous avons procédé à une série de dilution dans 7 tubes différents pour chaque extrait ou fraction à tester. Ensuite à chaque dilution de volume 250 µl on a ajouté 750 µl d'ortho phénanthroline et 250 µl de solution de chlorure de fer (FeCl₂).

La solution de blanc est composée du méthanol ; le témoin négatif de 250 µl d'eau distillée, 750 µl d'ortho phénanthroline et 250 µl de FeCl₂.

Les absorbances sont lues à 510 nm.

L'activité chélatrice est exprimée en pourcentage (%) selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = (1 - (A_e / A_b)) \times 100$$

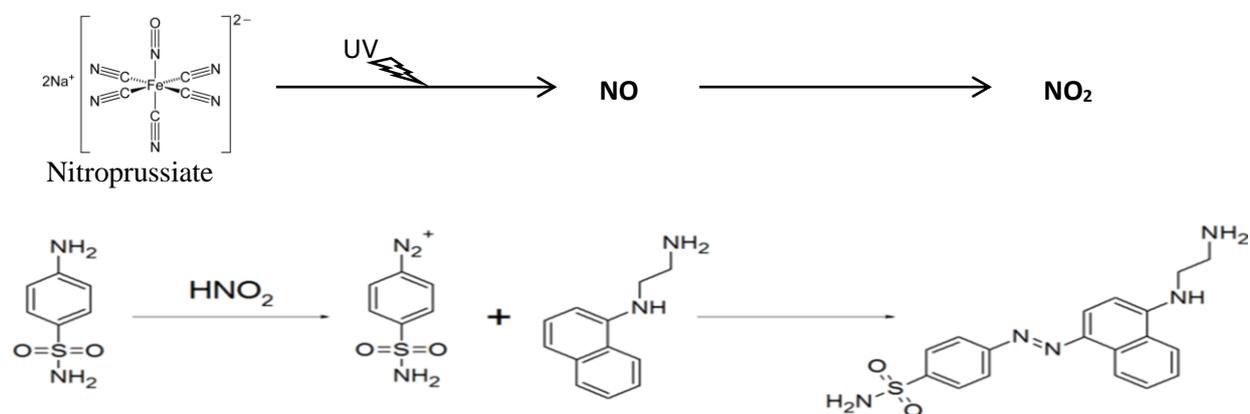
(A_e est l'absorbance de la solution contenant l'extrait ; A_b est l'absorbance de la solution du blanc).

II-3-5-3- Activité sur le radical Oxyde nitrique (NO)

Cette méthode permet de déterminer l'effet des extraits et fractions sur le radical NO au cours de l'exposition du nitroprussiate à la lumière, le NO produit est très instable et va donc fixer une molécule d'oxygène pour former le NO₂. Le protocole utilisé ici est celui décrit par **Garat. (1997)**. Avec quelques modifications portant notamment sur la nature même de l'anti-radicalaire hydrophobe utilisé.

➤ Principe

En milieu aqueux, aérobie et en présence de la lumière, le nitroprussiate ([Fe(CN)₅NO]) libère le monoxyde d'azote (NO) qui va se convertir en dioxyde d'azote (NO₂). En milieu acide, le dioxyde d'azote produit peut se fixer sur l'acide sulfanilique ou acide 4-aminobenzenesulfonique (C₆H₇NO₃S) pour former un sel de diazonium. Dans les mêmes conditions, ce sel de diazonium peut se complexer à une molécule de N-(1Naphtyl) ethylènediamine (C₁₂H₁₄N₂) pour former un complexe azo coloré qui absorbe à 540 nm et dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de dioxyde d'azote initialement présent dans le milieu. L'équation de la réaction peut être résumée comme suit :



Acide sulfanilique

Sel de diazonium

Naphtyl Ethylènediamine

Complexe Azo Rose

➤ **Méthode**

~ **Préparation des solutions**

Solution de nitroprussiate de sodium 10 mM

Peser exactement 1,4849 g de nitroprussiate de sodium et diluer dans 500 ml d'eau distillée puis homogénéiser jusqu'à disparition complète des cristaux. Le mélange est recouvert d'un papier aluminium et conserver à 4°C. La solution peut rester stable pendant une semaine.

Le tampon Phosphate 120 mM

Peser exactement 8,165 g de phosphate mono sodique et dissoudre dans 500 ml d'eau distillée puis homogénéiser jusqu'à disparition complète des cristaux de sel. Y ajouter 12,5 ml de polysorbate 40 puis homogénéiser jusqu'à dissolution complète du polysorbate. Ramener le pH de la solution à 7,04. Sceller le flacon puis le conserver à 4°C jusqu'à son utilisation. Cette solution peut rester stable pendant un mois.

L'acide sulfanilique

Prélever 100 ml d'une solution d'acide acétique glaciale et dissoudre dans 400 ml d'eau distillée homogénéiser et conserver à 4°C. Dans la solution précédente, étaient dissous exactement 2,5 g d'acide sulfanilique puis, homogénéiser jusqu'à disparition complète des poudres d'acide sulfanilique à l'aide d'un agitateur magnétique ayant un barreau aimanté. Sceller le flacon puis le conserver à 4°C. La solution ainsi préparée peut rester stable pendant un mois.

Le dichloro-Naphtyl éthylène diamine

Prélever exactement 500 mg de N-(1-Naphtyl) éthylène diamine et dissoudre dans 500 ml d'eau puis homogénéiser jusqu'à disparition complète des poudres de Naphtyl éthylène diamine sceller, emballer dans du papier aluminium et conserver à 4°C. Dans ces conditions cette solution peut rester stable pendant 1 mois.

Les solutions des extraits et fractions

Les extraits et fractions sont préparés dans l'éthanol 90% à raison de sept concentrations par extrait ou fraction. Ces concentrations obéissent à une progression géométrique de raison 2 de premier terme 20 µl/ml et de dernier terme 0,31µl/ml.

➤ Essai proprement dit

Dans les tubes en propylène propres et secs, introduire 1 ml de nitroprussiate de sodium puis 250 µl de tampon phosphate, homogénéiser l'ensemble puis ajouter 250 µl de chaque solution d'extrait ou fraction, homogénéiser et laisser incuber pendant 150 min sur la paillasse du laboratoire. Pour les témoins négatifs les extraits et fractions sont remplacés par 250 µl d'éthanol 90%. Le blanc contient 1ml d'eau distillée, 250 µl d'éthanol 90% et 250 µl de tampon phosphate. Les contrôles des extraits et fractions contiennent 1ml d'eau distillée, 250 µl de tampon et 250 µl de chaque solution d'extrait ou fraction. Après incubation, 500 µl de chaque tube précédemment préparé sont prélevés et introduits dans des nouveaux tubes propres et secs (soigneusement étiquetés) puis 1 ml de la solution d'acide sulfanilique y sont ajoutés. L'ensemble est homogénéisé et laissé pour incubation pendant 5 à 10 min. 1ml de Naphtyl éthylène diamine est ajouté dans chaque tube et l'ensemble est homogénéisé doucement et incubé à nouveau pendant 30 min. La densité optique de chaque tube est lue à 540 nm, avec une prise d'essai de 400 µl, une stabilisation d'une minute à 37°C est nécessaire. Les pourcentages d'inhibition sont calculés à partir de la formule suivante.

$$\%I_{NO} = \left(\frac{DO_t - (DO_{Et} - DO_{Ec})}{DO_t} \right) \times 100$$

%INO est le pourcentage d'inhibition du radical nitro-oxyde, **DO_t** est la densité Optique du témoin négatif, **DO_{Et}** est la densité Optique de l'essai en présence de l'échantillon testé, **DO_{Ec}** est la densité optique du contrôle sans eau oxygénée.

II-3-6-Évaluation du profil de toxicité aiguë par voie orale

Sur la base des résultats des activités antimicrobiennes *in-vitro* ainsi que du résultat du screening préliminaire de l'activité anti diarrhéique (diarrhée fonctionnelle) (annexe III), la fraction la plus active a été sélectionnée. C'est cette fraction qui a été utilisée pour les tests *in-vivo*. Le profil toxicologique aiguë par voie orale de la fraction d'intérêt a été évalué sur les souris suivant la procédure décrite par le protocole de l'**OECD (2001)**. Les animaux ont été repartis au hasard en trois groupes de 3 animaux chacun, puis acclimatés aux conditions du test. Après une période de jeûne de 12 heures, les souris ont été pesées et le volume de la fraction à administrer a été déterminé par rapport au poids corporel de chacune. La fraction était mise en suspension dans l'huile d'olive. Une dose limite de 2000 mg/kg de poids corporel de la fraction d'intérêt a été administrée à chacune des 3 souris femelles du groupe 1, tandis que les 3 autres

souris femelles constituant le groupe témoin négatif (groupe 0) recevait chacune 2 ml/100g de poids corporel du véhicule (huile d'olive). Après le traitement, les souris ont été observées continuellement pendant 3 heures sans recevoir de nourriture ou d'eau. Par la suite, les animaux étaient observés pendant 8 heures par jour, durant les 13 prochains jours suivants le traitement. Toutes les observations étaient systématiquement enregistrées avec des enregistrements individuels conservés pour chaque souris. Les animaux survivants ont été pesés et des observations visuelles concernant la mortalité, le comportement, les changements dans l'apparence physique, les blessures, les douleurs et les signes de maladie ont été effectuées quotidiennement pendant toute cette période de 14 jours.

Les volumes administrés ont été déterminés selon la formule :

$$V \text{ (ml)} = \frac{D \times P}{C}$$

Avec : D : dose administrée en mg/kg
P : poids de l'animal en kg
C : concentration de la préparation d'extrait en mg/ml

II-3-6-1- Évaluation des paramètres comportementaux

Les variations comportementales suivantes étaient enregistrées:

- Intensité des mouvements dans la cage. Elle était évaluée par la réaction de l'animal à un chatouillement par une baguette : la réaction immédiate, après une seconde et après plus d'une seconde.
- sensibilité au bruit : elle était évaluée par la spontanéité avec laquelle les animaux réagissent à un claquement des mains (un, deux, trois claquements sont-ils nécessaires pour provoquer le déplacement du rat dans la cage ?).
- Sensibilité à la douleur: au pincement de la queue, l'animal réagit-il en cherchant à se débarrasser de la source de la douleur? Cette réaction pouvant être instantanée, timide ou nulle.
- Rythme respiratoire: la respiration pouvant avoir un rythme normal, rapide ou saccadé.
- Acuité visuelle: le mouvement d'un objet devant l'animal peut provoquer son déplacement dans un coin plus sûr ou le mouvement de la tête vers l'objet qui se déplace. Cette réaction peut être spontanée, lente ou nulle.

II-3-6-2- Évaluation de la consommation alimentaire et de la croissance pondérale

Durant cette période d'observation de 14 jours, les consommations alimentaires ont été évaluées en faisant la différence entre les quantités d'aliments (g) déposées et celles restantes au prochain jour et à la même heure. Les poids des animaux ont également été enregistrés durant la même période et le taux de croissance pondérale a été évalué à l'aide de la formule:

$$\%P = \frac{P_f - P_0}{P_0} \times 100$$

%P : pourcentage de croissance au jour x

P_f : poids corporel de l'animal au jour x

P₀ : Poids corporel initial de l'animal (le premier jour du traitement)

II-3-6-3-Aspect macroscopique

Les principaux organes concernés en premiers par la toxicité ont été prélevés après dissection des souris. Ils ont été pesés et analysés macroscopiquement. La consistance des organes (mollesse, élasticité) et leurs couleurs ont été évaluées (**Kuiaté, 2005**).

II-3-7-Évaluation de l'activité anti-diarrhéique de la fraction sélectionnée

Sur la base du résultat du screening préliminaire des tests d'activité antidiarrhéique et du résultat des tests antimicrobiens *in vitro*, la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* qui était la plus active (annexe III), a été sélectionnée pour le test contre la diarrhée fonctionnelle d'une part et d'autre part contre *E. coli* entérotoxigène (EPEC). L'induction de la diarrhée avec l'huile de ricin a été faite suivant la méthode décrite par **Awouters et al. (1978)** avec quelques modifications. Le potentiel anti-diarrhéique de la fraction d'intérêt à (100, 200 et 400 mg/kg) a été examiné contre la diarrhée induite par l'huile de ricin chez les rats wistar. Les paramètres tels que la période de latence, la variation du poids corporel, l'index diarrhéique ont été examinés, comparativement aux effets produits par la substance de référence (le lopéramide à 2,5 mg/kg).

II-3-7-1- Effet de la fraction sélectionnée sur la diarrhée induite chez des rats avec l'huile de ricin

Les animaux étaient privés de nourriture pendant 18 heures avant les expériences et répartis de façon aléatoire en 5 groupes de 6 (3 mâles et 3 femelles) par dose de la substance d'essai. La substance était administrée par voie orale aux rats des trois premiers groupes par gavage aux doses 100, 200 et 400 mg/kg de la fraction méthanolique, doses arrêtées à l'issue du screening préliminaire. Les rats du groupe 4 (témoin positif) ont reçu le loperamide (Imodium) à 2,5 mg/kg de poids corporel en tant que médicament de référence tandis que les animaux du groupe 5 (contrôle négatif) ont reçu l'huile d'olive. Soixante minutes après le traitement médicamenteux, chaque animal a été administré par voie orale par de l'huile de ricin (1 ml/ 100g de poids corporel). La période de latence (le temps entre l'administration de l'huile de ricin et l'apparition de la première selle diarrhéique) était enregistrée. L'observation de la défécation a été suivie pendant 6 h sur un papier filtre placé sous les cages perforées de rats. Le papier est remplacé toutes les heures. Le papier-filtre contenant les selles fraîches a été pesé (M_1). Enfin, le papier filtre a été exposé dans le laboratoire à sécher pendant une période de 14 h et il a été repesé (M_2). La teneur en eau des matières fécales était calculée comme $(M_1 - M_2)$ g. Le pourcentage de rats qui ont présenté la diarrhée, la période de latence, la fréquence moyenne des selles, la fréquence des gouttes diarrhéiques et la teneur en eau ont été enregistrés. Les index de purge (**Mohd *et al.*, 2004**), les pourcentages d'inhibition de la défécation et de baisse diarrhéiques (**Ezekwesili *et al.*, 2004**) ont été évalués comme suit:

Index de purge = (% répondants x nombre moyen de selles) / (période moyenne de latence)

Inhibition de la défécation (%) = $(M_c - M_d) / M_c \times 100$

Inhibition de gouttes diarrhéiques (en%) = $((M_o - M_e) / M_o) \times 100$

M_c : nombre moyen de défécation causée par l'huile de ricin

M_d : nombre moyen de défécation causée par le médicament ou l'extrait

M_o : nombre moyen de baisses de la défécation causées par l'huile de ricin

M_e : nombre de baisses de la défécation causées par le médicament ou par la fraction

II-3-7-2- Détermination des mécanismes possibles impliqués dans l'activité anti-diarrhéique observée

➤ Effet de la fraction sélectionnée sur la motilité gastro-intestinale

La méthode utilisée dans ce test a été décrite par **Akah *et al.* (1998)**. Un autre ensemble de 15 rats a été mis à jeûne pendant 18 h, mais ont eu libre accès à l'eau. Ils ont été répartis de façon aléatoire en 5 groupes de 3 animaux chacun. Les animaux des trois premiers groupes de test ont reçu la fraction d'intérêt par voie orale à des doses respectives de 100, 200 et 400 mg/kg de poids corporel, doses arrêtées à l'issue d'un screening préliminaire. Les rats du groupe 4 ont reçu le loperamide à 10 mg/kg de poids corporel par voie orale en tant que composé de référence. Les rats du groupe 5 (contrôle négatif) ont reçu l'huile d'olive (1ml/100g). Après 60 minutes, tous les animaux ont reçu 1ml de la farine de charbon végétal (lot de 0148 AJ) comme traceur de la nourriture préparée à 5% dans une solution saline normale (chlorure de sodium 0,9%). Après une période d'observation de 60 minutes, chaque rat a été sacrifié et disséqué. L'intestin grêle a été retiré et sa longueur totale mesurée (cm). La distance parcourue par le charbon intestinal du pylore a également été mesurée (cm). Le front de progression intestinale de la farine de charbon a été exprimé en pourcentage de la distance parcourue par le charbon de bois à la longueur totale entre le pylore et le caecum suivant la formule ci-après :

Front de progression (%) = ((distance parcourue par le charbon) / (longueur de l'intestin du sphincter du pylore)) x 100

Le pourcentage d'inhibition de la progression du charbon a été également déterminé suivant la formule

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{DC - DT}{DC} \times 100$$

DC : distance moyenne parcourue chez le groupe témoin négatif

DT : distance parcourue chez le groupe test

➤ Effet de la fraction de plante sur « enteropooling »

L'accumulation de fluide intraluminal a été déterminée suivant le protocole décrit par **Murugesan *et al.* (2000)**. Pour cette évaluation, les rats privés de nourriture et d'eau pendant 18 h ont été répartis au hasard en 5 groupes de 3 rats chacun et placés dans des cages en plastic. Les trois premiers groupes ont reçu la fraction sélectionnée à 100, 200 et 400 mg/kg respectivement. Les rats du groupe 4 (contrôle positif) ont reçu le loperamide (à 10 mg/kg de

poids corporel) comme composé standard tandis que ceux du cinquième groupe (contrôle négatif) ont reçu de l'huile d'olive (1 ml/100mg) chacun. Trente minutes après l'administration d'huile de ricin, chaque rat a été sacrifié et les extrémités de l'intestin grêle liées (à la fois le caecum et le pylore). Cette section a été isolée, sa longueur mesurée et sa masse initiale enregistrée (M_0). Cette section intestinale a été vidée de son contenu et sa nouvelle masse (M_1) enregistrée. Le contenu intestinal obtenu a été introduit dans un tube gradué et son volume (ml) a été lu directement à partir de la graduation. Sa masse a été obtenue en faisant la différence ($M_0 - M_1$) g. Le pourcentage d'inhibition de la sécrétion intestinale a été déterminé suivant la formule :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{VC - VT}{VC} \times 100$$

VC : volume moyen du contenu intestinal chez le groupe contrôle négatif

VT : volume du contenu intestinal chez le groupe test.

II-3-7-3-Évaluation *in-vivo* des effets de la fraction sélectionnée chez les rats infectés par *E.coli* entéropathogène (EPEC)

E. coli est paradoxalement le germe le plus incriminé comme agent en cause de la diarrhée infectieuse dans les pays en voie de développement. *In-vitro*, *E.coli* a été plus sensible à l'une des différents échantillons (extraits et fractions) testés. Par ailleurs, l'une des fractions a montré une activité considérable sur la diarrhée fonctionnelle induite chez les rats avec l'huile de ricin.

Les effets *in-vivo* de la fraction sélectionnée sur *E. coli* entéropathogène (EPEC) ont été évalués chez les rats infectés par EPEC comparativement au témoin négatif, suivant le protocole décrit par **Kamgang et al. (2005)** avec quelques modifications. L'évaluation *in-vivo* de l'activité anti EPEC de la fraction sélectionnée chez le rat a été faite en examinant d'une part la charge fécale d'EPEC cultivé sur le milieu Eosine Méthylène Blue (EMB) agar et d'autre part les paramètres biochimiques et hémathologiques des rats traités comparativement au témoin négatif.

Méthode

➤ Préparation des solutions

-Préparation de l'extrait : La solution d'extrait de concentration 20 mg/ml était préparée par solubilisation de 200 mg de la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* (AnsefeMeOH) dans 10 ml d'huile d'olive. Une partie de cette solution était diluée au 1/2 permettant d'obtenir une deuxième solution de concentration 10 mg/ml. Connaissant la dose D (mg/kg), le poids P (kg) de l'animal et la concentration C (mg/ml) de l'extrait, le volume V (ml) à administrer à un rat était déterminé à partir de la formule suivante:

$$V (mL) = \frac{P (kg) \times D \left(\frac{mg}{kg}\right)}{C \left(\frac{mg}{ml}\right)}$$

V : volume de la solution à administrer ; **D :** dose de l'extrait à administrer ; **C :** concentration de la fraction; **P :** poids de l'animal.

—Préparation du nifuroxazide : Le nifuroxazide était administré aux rats à la dose de 10 mg/kg. Le contenu d'une capsule de 10 mg était dissout dans 5 ml d'eau distillée. Le volume à administrer à chaque rat était déterminé de la même façon que celui de la fraction d'AnsefeMeOH tenant compte de la concentration (2 mg/ml) et de la dose.

-Le Réactif de Griess: Le réactif de Griess était préparé à partir du mélange des solutions A et B. Pour ce faire, une solution A de NED (Naphtyl Etylène Diamine) 1 % a été préparée par dissolution de 0,1 g de NED dans 100 ml d'eau distillée. Une solution B de sulfanilamide 1 % a été obtenue après dissolution de 1 g de sulfanilamide dans 100 ml d'acide phosphorique à 2,5 %. Les solutions A et B sont mélangées dans un flacon sombre (V:V).

-Solution standard de nitrate de sodium (1 mM): une masse de 0,69 g de nitrate de sodium (NaNO₂) a été dissoute dans 10 ml d'eau distillée. Cette solution a permis de construire la courbe d'étalonnage.

-Solution d'acide phosphorique 2,5 %: un volume de 2,125 ml d'acide phosphorique 85 % a été introduit dans un bécher de 100 ml, puis le volume a été complété avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

—Solution de Sérum Albumine Bovin (SAB) : La solution de SAB (3 mg/ml) a été préparée en dissolvant 150 mg de SAB dans 50 ml d'eau distillée.

—**Réactif de Biuret** : Le réactif de Biuret a été préparé en dissolvant 0,75 g de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) et 3 g de tartrate de sodium et de potassium dans 100 ml d'eau distillée (solution A). Ensuite, 15 g d'hydroxyde de sodium ont été dissous dans 100 ml d'eau distillée (solution B). Les solutions A et B ainsi obtenues ont été mélangées et le volume final complété à 500 ml avec de l'eau distillée.

➤ **Essai proprement dit**

L'inoculum était préparé à la charge $1,5 \times 10^8$ UFC / ml correspondant à 0,5 McFarland standard. Vingt et cinq rats femelles dont l'âge variait entre 6 et 8 semaines ont été mis à jeune 12 h avant le test. Chacun des 25 animaux avait reçu par gavage 1ml d'inoculum bactérien préparé. Vingt-quatre heures après administration de l'inoculum aux rats, ils ont été répartis au hasard en 5 groupes de 5 animaux chacun, chaque animal étant placé dans une cage dont le fond est garni d'un grillage qui permet aux matières fécales de passer par un gabarit de manière à minimiser la réinfection par la matière fécale. Ils ont été traités par voie orale comme suit : un lot de rats traités à l'huile d'olive servant de témoin négatif, un autre lot traité au nifuroxazide, substance antibactérienne standard à la dose de 10 mg/kg, utilisé pour comparer l'activité de la fraction de plante à côté du contrôle négatif ne recevant que le véhicule. Trois lots de 5 rats chacun traités à la fraction sélectionnée respectivement aux doses croissantes de 100, 200 et 400 mg/kg de poids corporel. En dehors des 5 groupes de rats, un autre groupe constitué des rats normaux n'ayant rien reçu (bactéries, huile d'olive, fraction et antibiotique) était mis en place. La fraction de plante a été mise en suspension dans de l'huile d'olive et administrée par voie orale aux rats. L'évaluation des effets de la fraction a été faite par l'examen fécal de la charge d'*E.coli* des cultures de selles sur le milieu de culture EMB agar. Les selles ont été recueillies 3 jours consécutifs avant l'administration de *E. Coli* entéropathogène aux rats et ce jusqu'au 7^{ème} jour après. A cet effet, 0,5 g de fèces de chaque échantillon a été homogénéisé dans 4,5 ml d'eau physiologique stérile suivi des dilutions en série. Ensuite, 200 µl de chaque dilution ont étéensemencés sur le milieu de culture EMB agar contenu dans des boîtes de Pétri de 90 mm (**Islam et al., 1997**). Les colonies de *E.coli* qui sont apparues dans les boites après incubation à 37 °C pendant 24 h ont été comptées et exprimées en UFC / gramme de matière fécale.

Pendant l'expérimentation, l'évolution pondérale des animaux ainsi que la fréquence des selles étaient enregistrées quotidiennement. Vingt-quatre heures après l'arrêt d'un traitement de 6 jours d'affilée, tous les animaux ont été anesthésiés à l'éther et sacrifiés par décapitation puis leur sang a été prélevé ; 200 µl ont été introduits dans les tubes héparinés pour

l'évaluation des paramètres hématologiques et le reste introduit dans les tubes secs et centrifugé à 3000 trs/min pendant 15 min à 4° C et le sérum a été collecté pour le dosage des triglycérides, de la créatinine et de l'Oxyde nitrique (NO) à l'aide des kits standards. Le foie a été également prélevé, 0,4 g a été broyé dans 2 ml de tampon tris puis centrifugé pendant 25 min à 3000 trs/min, le surnageant récupéré a été conservé à -30° C pour le dosage des protéines totales.

II-3-7-4- Effets de la fraction sélectionnée sur certains paramètres hématologiques et biochimiques des rats infestés par *E.coli* entéropatogène (EPEC)

➤ Paramètres hématologiques

Le sang recueilli dans les tubes héparinés a été acheminé au laboratoire d'hématologie de l'hôpital du jour de l'Hôpital Central de Yaoundé. Les paramètres hématologiques des rats infectés par EPEC ont été évalués à l'aide d'un automate de marque «MindrayBc 3000». Cet automate fonctionne en aspirant du sang contenu dans un tube EDTA et effectue de manière automatique la numération des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes sanguines. Une lyse différentielle des globules rouges est effectuée et le décompte des leucocytes et des différentes populations leucocytaires est réalisé grâce à une activité enzymatique qui leur est spécifique. Les différents paramètres mesurés et calculés sont transcrits sur un graphique qui est par la suite imprimé.

➤ Paramètres biochimiques

Dosage de NO

Le dosage du monoxyde d'azote (NO) a été réalisé à partir du réactif de GRIESS dont la préparation a été faite à l'abri de la lumière. Le sulfanilamide (1%) et le naphthyl éthylènediamide (0,1%) ont été dilués (v/v) dans de l'acide phosphorique (2,5%). La solution standard utilisée était une solution de nitrite de sodium (NaNO₂) de concentration 1mM.

-Principe

Le dosage du NO a été fait par la méthode de Griess qui repose sur deux réactions de diazotation. En présence de l'amino-4-benzènesulfonamide (sulfanilamide) et le dichlorure de N- (naphthyl-1) diamino-1,2-éthane (N-1-naphthyléthylènediamine) en milieu acide, les nitrites subissent une réaction de diazotation. Le produit obtenu est proportionnel à la quantité de nitrites présente dans l'échantillon (Fermor *et al.*, 2001).

-Mode opératoire

Pour la détermination du taux de NO, 100 µL d'homogénat ont été dilués avec 400 µL d'eau distillée et mélangés à 400 µL du réactif de Griess. Les tubes ont été préparés suivant le protocole du Tableau IX.

Tableau IX: Protocole de dosage de NO

N° tube	0	1	2	3	4	5	6	X1.....Xn
Blanc	Etalons							Echantillons
Concentration de NaNO ₂ (µmol)	0	0,0312	0,0625	0,125	0,250	0,5	1	-
Volume de NaNO ₂ (µL)	100	100	100	100	100	100	100	-
Echantillon (µL)	-	-	-	-	-	-	-	100
Eau distillée (µL)	400	400	400	400	400	400	400	400
Réactif de Griess (µL)	500	500	500	500	500	500	500	500
Les tubes ont été incubés à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 5 minutes								
NED 0,1% (µL)	400	400	400	400	400	400	400	400
Les tubes ont été incubés à l'abri de la lumière pendant 5 minutes. La densité optique (DO) a été lue contre le blanc à 546 nm au spectrophotomètre.								

La concentration de NO a été déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage (Annexe VI).

Dosage des protéines totales

-Principe

En milieu basique (NaOH), le tartrate forme avec le sel cuivrique un complexe bleu violet absorbant à 540 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en protéines dans la solution (**Gornal et al., 1949**).

-Mode opératoire

Les différents réactifs ont été additionnés comme indiqué dans le tableau X. Après dissolution de tous les produits, les tubes ont été agités et incubés à 25°C pendant 30 minutes, puis la densité optique a été lue au spectrophotomètre (GENESYS 20) à 540 nm contre le blanc.

Tableau X : Protocole de dosage des protéines totales par la méthode du Biuret

N° tubes	0	1	2	3	4	5	6	X1.....Xn	
	Témoin		Etalons					Tests	
SAB (mg/mL)	0	50	100	150	200	250	300	0	0
Eau distillée (mL)	600	550	500	450	400	350	300	590	590
Réactif de Biuret (mL)	400	400	400	400	400	400	400	400	400
Echantillon (µL)	0	0	0	0	0	0	0	10	10
Quantité de protéines (mg)	0	0,15	0,30	0,45	0,60	0,75	0,90	?	?

La quantité de protéines dans chaque tube test a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe VII).

Dosage de la créatinine

-Principe

En milieu alcalin, la créatinine forme avec l'acide picrique un complexe rouge qui absorbe à 505 nm. L'augmentation de l'absorbance optique est proportionnelle à la concentration de créatinine présente dans le milieu réactionnel.

-Mode opératoire

Le dosage a été réalisé selon le protocole décrit par le kit VITAL. Le réactif de dosage est obtenu en mélangeant à volume égal, l'acide picrique et la soude en fonction du nombre d'échantillon à doser (Tableau XI).

Tableau XI : Protocole de dosage de la créatinine

	Echantillon	standard	blanc
Réactif de travail	400µl	400µl	480µl
Echantillon	80µl	/	/
standard	/	80µl	
Mélanger, incuber pendant 1 min à 37°C. Lire les absorbances de l'échantillon et du standard à 1 min et à 2 min			

Le taux de créatinine sérique a ensuite été déterminé par la formule suivante :

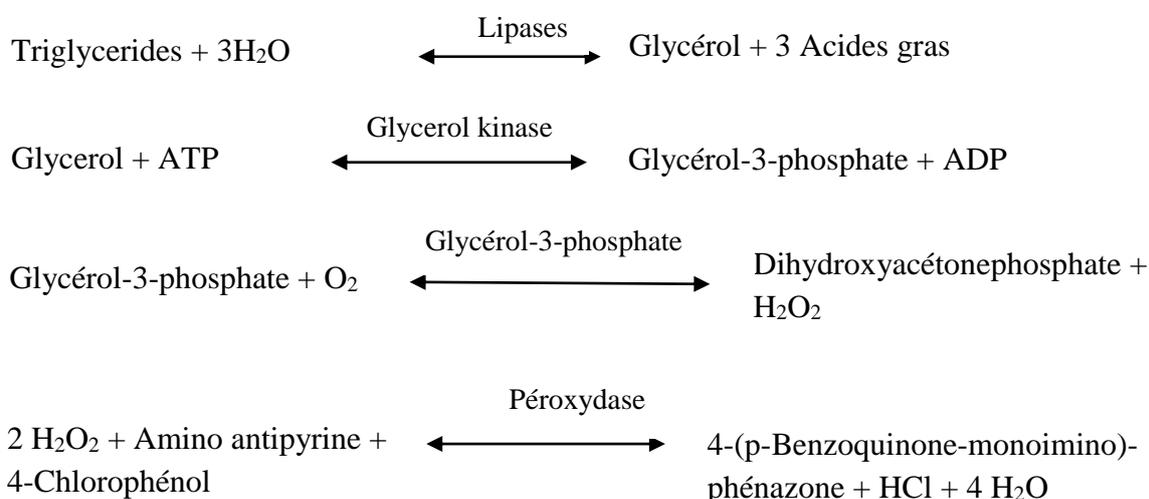
$$\text{créatinine } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\Delta\text{absorbance échantillon}}{\Delta\text{absorbance standard}} \times 177$$

$\mu\text{mol/L}$: micromole par litre ; $\Delta\text{absorbance}$: différence entre l'absorbance lue à 1 min et à 2 min ; 177 : facteur multiplicateur donné par le kit (concentration du standard).

Dosage des triglycérides

➤ Principe

Sous l'action des lipases, les triglycérides (TG) sont hydrolysés en glycérol et acides gras. Le glycérol sera ensuite transformé en peroxyde d'hydrogène sous l'action successive de la glycérol-kinase et de la glycérol-3-phosphate oxydase. La quinonéimine qui sert d'indicateur, renseigne sur la formation de peroxyde d'hydrogène, de l'aminopyrine et du 4 chlorophénol sous l'action catalytique de la peroxydase.



➤ Mode opératoire

Les différents tubes ont été complétés comme indiqué dans le tableau XII. Le dosage a été réalisé à l'aide du kit SGM Italia.

Tableau XII: Protocole de dosage des triglycérides

	Blanc réactif	Echantillon/standard
Echantillon/standard	-	10 μL
Eau distillée	10 μL	-
Réactif de travail	1000 μL	1000 μL

Les tubes ont été agités à l'aide d'un agitateur de marque Heildolph, puis incubés à 37 °C pendant 5 min dans un bain-marie de marque Fisher. Les densités optiques ont été lues au spectrophotomètre de marque HACH DR 3900 contre le blanc à 510 nm.

La concentration des triglycérides a été calculée par la formule suivante:

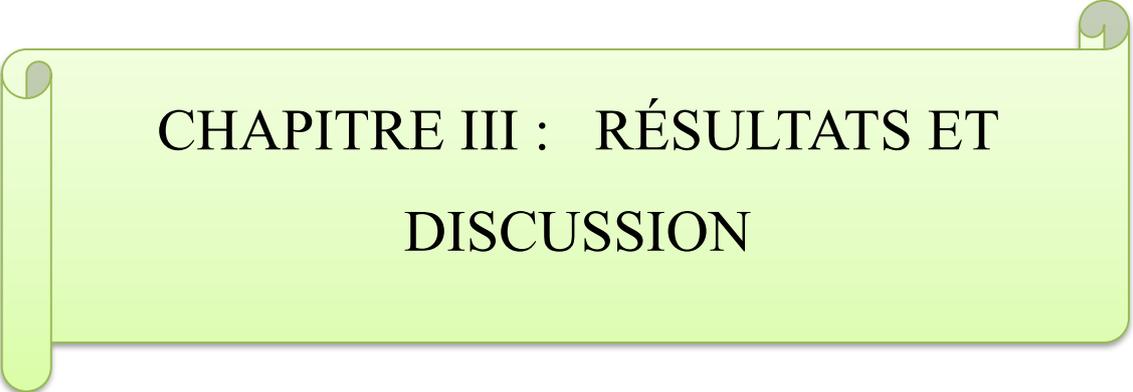
$$[\text{Triglycérides}](\text{mg/dL}) = \frac{\Delta \text{absorbance échantillon}}{\Delta \text{absorbance standard}} \times \text{Conc. STD}$$

[**Triglycérides**]: Concentration des triglycérides.

Conc STD: Concentration du standard égale à 200 mg/dL.

II-4- Traitement et analyse statistique des données

Les résultats ont été présentés sous forme de moyenne \pm écart- type d'une part et de fréquence d'autre part. Les données ont été analysées en utilisant ANOVA couplé au test de TURKEY pour des comparaisons multiples. Le logiciel Graphpad prism 5.03 a été employé pour conduire l'analyse statistique au seuil critique de 5%. Les graphes ont été effectués en utilisant Excel 2013 et Graphpad prism.



CHAPITRE III : RÉSULTATS ET
DISCUSSION

III-1-EXTRACTION ET PARTITION

Les rendements d'extraction réalisée à partir des poudres sèches d'organes des différentes plantes sont consignés en annexe X.

Les rendements d'extraction par rapport au poids de matière végétale sèche varient de 0,003 à 16,72% respectivement pour la fraction méthanolique des brindilles de *X. africana* (XabrMeOH) et l'extrait éthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* (AnsefeEtOH). Dans l'ensemble, les feuilles donnent les rendements les plus élevés comparativement aux autres organes. Les organes d'*A. senegalensis* donnent des rendements les plus élevés alors que les organes d'*A. mannii* donnent les rendements les plus faibles. Ces rendements varient de façon significative selon l'espèce, l'organe et le solvant de partition. Ceci met en exergue la variabilité de l'intensité des voies biosynthétiques dans la plante, en fonction de l'organe considéré. De même que l'affinité des métabolites secondaires par rapport à un solvant ou un système solvant donné.

Les feuilles ont les rendements les plus élevés pour *A. senegalensis*. **Boyom et al. (2011)** ont également obtenu pour *A. muricata*, plante de la famille des Annonacées le rendement le plus élevé avec les feuilles. D'après **Pinto et al. (2005)**, de tous les organes des plantes du genre *Annona*, les feuilles seraient les plus concentrées en divers métabolites secondaires. En effet, c'est à ce niveau que l'essentiel des métabolites des plantes sont usinés à travers les artères de la photosynthèse. Le rendement obtenu pour l'extrait éthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* (16,72%) est supérieur à ceux obtenus par **Tchokouaha (2015)** (11,85%), **Fatoumata (2005)** (7,34%) et par **Magadula et al. (2009)** (8,4%) respectivement pour des échantillons d'*A. senegalensis* récolté au Cameroun, Mali et Tanzanie. Cette variation de rendement au sein de la même espèce peut être attribuée aux facteurs intrinsèques ou extrinsèques (polymorphisme, sol, période de récolte, âge de la plante, etc.). La variation pourrait aussi s'expliquer par la différence du protocole d'obtention de l'extrait. En effet, **Fatoumata (2005)** a utilisé l'extraction au soxhlet alors que **Magadula et al. (2009)** ont macéré pendant 48 heures et le résidu de la plante a été de nouveau macéré une fois de plus contrairement à notre protocole où la macération a été faite pendant 72 heures, et afin d'optimiser le rendement d'extraction, le résidu de plante a été de nouveau macéré deux fois de suite avec le solvant récupéré. **Tchokouaha (2015)** a récolté en pleine saison des pluies (juillet) alors que pour cette étude, la récolte d'*A. senegalensis* a été faite au début de la saison des pluies (Avril).

Des observations ci-dessus, il ressort que le solvant d'extraction et l'organe de la plante pourraient influencer non seulement le rendement d'extraction mais aussi et surtout leurs activités biologiques (Mortier, 1991). Par ailleurs, les organes de la plante *Annona senegalensis* devraient être sélectionnés si le rendement d'extraction était le critère de choix. Mais la connaissance des rendements permet d'envisager la quantité d'organes à prélever en cas de besoin pour une éventuelle étude. Ce qui rend rationnelle l'utilisation des espèces végétales (Eyana, 2007).

III-2-ANALYSE PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS BRUTS ET FRACTIONS MÉTHANOLIQUES DES PLANTES ETUDIÉES

Afin de déterminer l'origine des activités biologiques des extraits éthanoliques et fractions méthanoliques, les criblages phytochimiques ont été effectués.

III-2-1-Analyse phytochimique qualitative des extraits bruts éthanoliques

L'analyse phytochimique qualitative a montré que les extraits bruts éthanoliques des organes des plantes testés contenaient les métabolites secondaires (Tableau XIII).

Tableau XIII : Analyse phytochimique qualitative des extraits bruts éthanoliques

Organe	Alcaloïdes	Flavonoïdes	Saponines	Tanins cat	Phénols	Glycosides	Triterpenes	Stéroïdes	Antho cyanines	Anthraquinones
Ansebr	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Ansefe	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
AnseEc	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Amfe	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
AmEc	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Ambr	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
Xabr	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Xafe	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

Légende:(+): présent, (-): absent, Tanins cat : Tanins catéchiques

Ansebr : *Annona senegalensis* brindille ; Ansefe : *Annona senegalensis* feuille ; AnseEc : *Annona senegalensis* écorce ; Amfe : *Anonidium mannii* feuille ; AmEc : *Anonidium mannii* écorce ; Ambr: *Anonidium mannii* brindille ; Xabr : *Xylophia africana* brindille ; Xafe : *Xylophia africana* feuille

Du tableau XIII, il résulte que la composition chimique des extraits varie en fonction des différents organes des plantes. Les extraits renferment une grande diversité de métabolites secondaires. En effet, les résultats obtenus révèlent la présence des **alcaloïdes, flavonoïdes, saponines, tanins catéchiqness, phénols, stéroïdes, triterpènes, glycosides, anthocyanines et anthraquinones** dans les extraits. Les extraits bruts éthanoliques des feuilles de *X. africana* et d'*A. mannii* contiennent le plus grand nombre de métabolites secondaires testés (8/9). Les extraits bruts des brindilles d'*A. senegalensis* possèdent le plus petit nombre de métabolites secondaires testés (5/9). Entre ces extrêmes, on retrouve les extraits des feuilles d'*A. senegalensis*, puis les extraits des écorces d'*A. mannii* qui possèdent sept métabolites secondaires sur les neuf testés. Mais dans l'ensemble, les feuilles renferment le plus grand nombre de métabolites secondaires parmi ceux testés. Excepté l'extrait des feuilles de *X. africana*, tous les autres extraits possèdent les triterpènes. En outre, tous les extraits bruts contiennent les phénols, les glucosides et les tanins catéchiqes connus pour leurs activités antimicrobiennes.

III-2-2-Analyse phytochimique quantitative

L'analyse par la chromatographie liquide haute performance a permis de déterminer non seulement la masse de certains constituants de nos composés, mais également les spectres HPLC.

Cette analyse a permis de constater que les différents extraits et fractions analysés contenaient les acides gallique, syringique, vanillique O- coumarique, p- coumarique ainsi que la catéchine, l'eugénol et la quercétine à des quantités variables.

Les résultats de l'analyse phytochimique quantitative des échantillons sont consignés dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Analyse phytochimique quantitative de quelques échantillons des 3 plantes étudiées

Standards		Anse feMeOH		AmbrMeOH		AmbrEtOH		XafeEtOH	
Caractéristiques	TR	Aire (muA)	Conc (mg/g) ps	Aire (muA)	Conc (mg/g) ps	Aire (muA)	Conc (mg/g) ps	Aire (muA)	Conc (mg/g) ps
Acide gallique	14,380			53,19409	1,363			37,987	0,974
Acide benzoïque	19,100								
Acide caféique	25,670								
Acide syringique	25,550	163,677	4,058						
Acide vanillique	25,270	131,111	4,188			204,425	6,531	751,210	23,998
Apigénine	33,490								
Catéchine	23,480							268,200	19,494
Eugénol	29,430							4624,566	136,889
O-Coumarique	25,110	225,713	6,968					468,511	14,463
P-Coumarique	30,520	186,233	3,646	1365,07898	26,729			4729,873	92,614
O-tyrosol	21,910								
Quercétine	42,190			653,64825	61,411				
Rutine	29,450								
Tyrosol	21,770								

Du tableau XIV, il ressort que les échantillons testés renferment les acides gallique, syringique, vanillique, O-Coumarique, P-Coumarique ainsi que de la Quercétine à des concentrations variables. L'acide O-Coumarique, la Quercétine, l'acide vanillique et l'Eugénol sont des composés majoritairement présents dans AnsefeMeOH, AmbrMeOH, AmbrEtOH et XafeEtOH respectivement et comme l'attestent les spectres des figures 12, 13, 14 et 15.

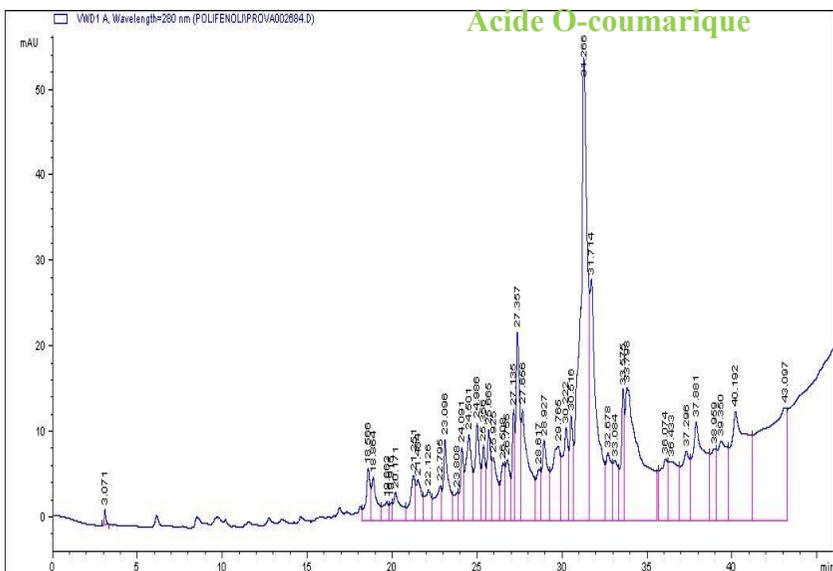


Figure 12 : Spectre phytochimique de Ansefe MeOH

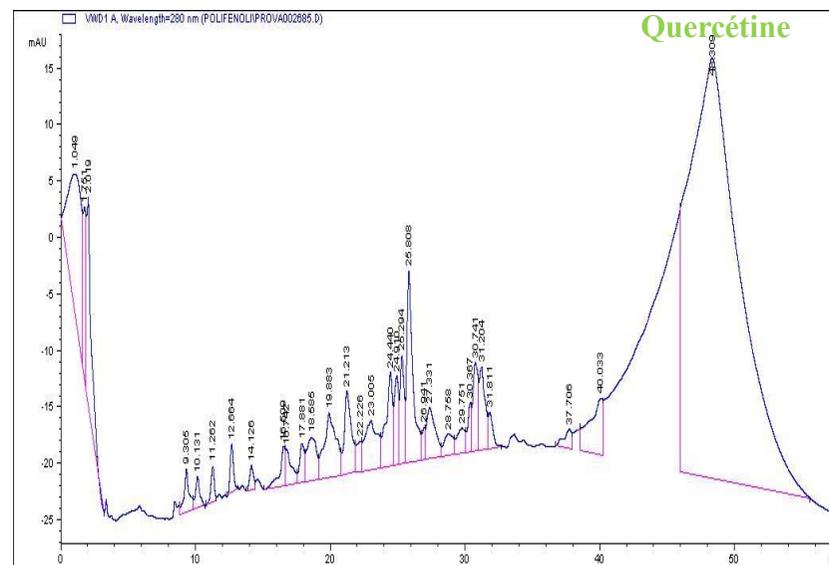


Figure 13 : Spectre phytochimique de AmbrMeOH

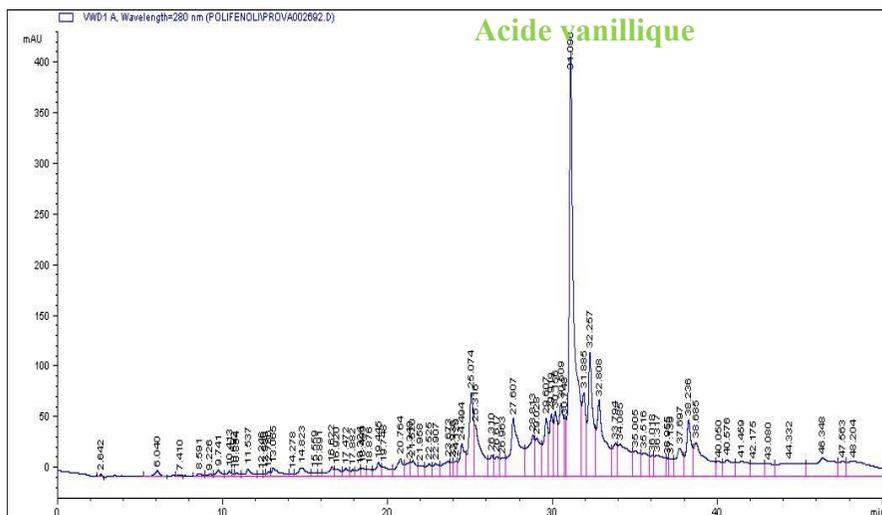


Figure 14 : Spectre phytochimique de AmbrEtOH

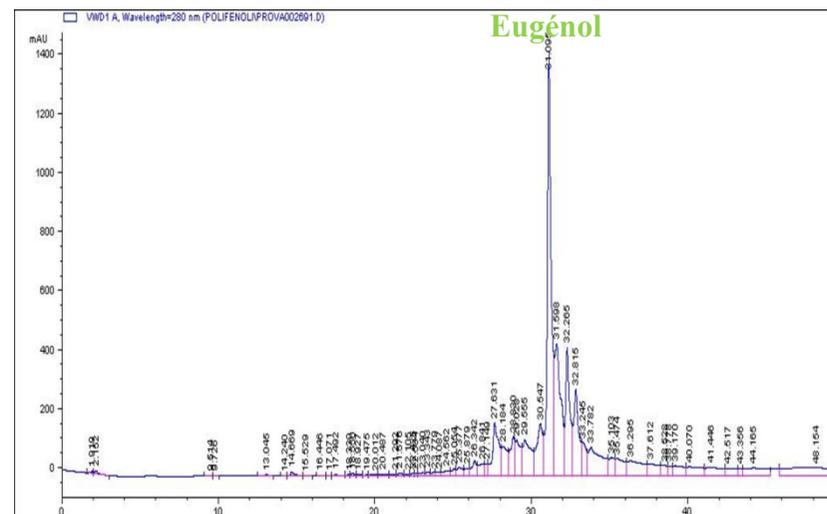


Figure 15 : Spectre phytochimique de Xafe EtOH

La détection des métabolites dans les extraits et fractions justifie clairement pourquoi ces derniers (extraits et fractions) possèdent des propriétés biologiques. En effet, plusieurs composés appartenant aux classes de métabolites détectés présentent des activités antimicrobiennes (Cowan, 1999; Bruneton, 1999 ; Kueté et Efferth, 2010). Certains de ces métabolites ont des fonctions claires telles que les tanins qui agissent en se liant aux protéines et aux adhésines, en inhibant les enzymes et en perturbant les membranes plasmiques des microorganismes (Ya *et al.*, 1988 ; Cowan, 1999 ; Paolini *et al.*, 2003 ; Djabou, 2006). Ils possèdent des activités antioxydante, anti-diarrhéique ainsi qu'un grand pouvoir antibactérien (Ioan, 1982 ; Bassene *et al.*, 1995 ; Baba Moussa, 1998 ; Kolodziej, 1999 ; Paolini *et al.*, 2003; Hennebelle, 2006). Les tanins se retrouvent chez tous les végétaux et dans tous les organes (écorces, feuilles, racines, tiges, fruits...) (Paolini *et al.*, 2003). Les flavonoïdes sont présents dans toutes les plantes vasculaires au niveau des feuilles, racines, tiges et fruits (Bruneton, 1999). Ils ont la capacité de se complexer avec des protéines extracellulaires et solubles présentes sur la paroi microbienne. Les flavonoïdes forment des complexes irréversibles principalement avec des acides aminés nucléophiles et conduisant à l'inactivation des protéines et à la perte de leur fonction (Cowan, 1999 ; Ferreira *et al.*, 2011) . Les flavonoïdes (quercétine, catéchine) sont ainsi réputés pour leurs activités antibactériennes, mais aussi pour leur pouvoir anti-péroxydative et antioxydant (Anderson *et al.*, 1996 ; Kahraman *et al.*, 2003). Plus de 8000 flavonoïdes sont connus comme pouvant piéger les radicaux libres et interrompre les réactions radicalaires en chaînes (Hertog *et al.*, 1993). Leurs propriétés antioxydantes dérivent non seulement de leur capacité à donner des électrons ou des hydrogènes, mais aussi à chélater les ions métalliques de transition (Groff et Gropper, 2000). Il en est de même des coumarines (impératorine et haraclénol), issues du métabolisme de la phénylalanine via l'acide cinnamic, reconnues pour leurs activités antimicrobiennes (Bruneton, 1999 ; Hennebelle, 2006 ; Widelski *et al.*, 2009). D'autres ont des propriétés antioxydantes et contribuent à la fluidité du sang (Widelski *et al.*, 2009). Les saponines agissent en perturbant l'intégrité membranaire des cellules microbiennes (Zhang *et al.*, 2006 ; Tasleem *et al.*, 2009). Les anthraquinones contenus dans l'extrait brut éthanolique des feuilles de *X. africana* exercent un effet irritant et laxatif sur le gros intestin (Djabou, 2006). Certains anthraquinones tel que le 1,8-dihydroxy-3-méthylantracènedione contenus dans l'extrait brut éthanolique des feuilles de *X. africana* possèdent des propriétés antimicrobiennes (Karlina *et al.*, 2006).

Les alcaloïdes sont solubles dans les solvants organiques de faible polarité et sont utilisés pour l'anesthésie locale et comme antipaludéen (**Omulokoli *et al.*, 1997**). Certains alcaloïdes détectés dans les extraits des feuilles de 3 plantes étudiées telle que la Berberine et ses dérivés ont des propriétés antibactériennes (**Faizi *et al.*, 2003 ; Gonzaga *et al.*, 2003**). Les terpènes et terpénoïdes ont des propriétés antibactériennes. En effet, ils sont capables de détruire la membrane cellulaire de la bactérie (**Tene *et al.*, 2009**). Les plantes renferment essentiellement des mono et sesquiterpènes terpènes (**Kuiaté, 2005**), doués des propriétés antiseptiques (**Djabou, 2006**).

Cette multitude d'activités biologiques des composés phénoliques dépend de leur structure chimique. En effet, Les relations structure-activité anti oxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont démontré que l'activité anti oxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation (**Anderson *et al.*, 1996; Bossokpi, 2003**). Ces composés bioactifs pourraient également agir en combinaison en produisant des effets synergiques, additifs ou antagonistes (**Williamson, 2001**). Les extraits bruts contiennent une grande majorité de métabolites parmi lesquels certains masquent la présence d'autres et masquent leur activité contre les microorganismes, le fractionnement est nécessaire pour réduire et séparer certains de ces composants. La séparation des extraits bruts implique la partition et la chromatographie en utilisant différents solvants et systèmes solvants.

III-3-ÉVALUATION DES ACTIVITÉS ANTIMICROBIENNE ET ANTI-OXYDANTE *IN-VITRO*

Les résultats d'un screening préliminaire d'activité antimicrobienne *in-vitro* ont montré que les échantillons de la plante *A. senegalensis* étaient les plus actifs comparativement à ceux des autres plantes (*X. africana* et *A. manni*). Sur cette base, les extraits et fractions des organes d'*A. senegalensis* ont été retenus pour les tests dont les résultats sont présentés ci-dessous.

III-3-1-Propriété antimicrobienne : Résultats des CMI et CMB

Le potentiel antimicrobien des extraits bruts éthanoliques, fractions méthanoliques et hydro éthanoliques des différents organes d'*A. senegalensis* a été évalué sur quelques levures et bactéries, agents responsables des gastroentérites (*Candida sp*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Cryptococcus neoformans*, *Shigella flexineri* et *Esherichia coli*).

Concentrations Minimales Inhibitrices des extraits (CMI)

La localisation des CMI des extraits est faite comme illustré en anexe IX.

La croissance des levures testées à différentes concentrations en extrait/fraction est marquée par l'augmentation de la turbidité et/ou dépôt de culot au fond de la cupule. Par contre, les cupules ne présentant aucune turbidité et/ou dépôt de culot révèlent l'inhibition de la croissance ou la mort des levures. La différence de turbidité et/ou dépôt de culot entre deux cupules consécutives a permis de déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices des extraits consignées dans le tableau XV.

Tableau XV : CMI (mg/ml) des extraits et fractions des feuilles, brindilles et écorces d'*A.senegalensis* sur les levures et bactéries

	Levures				Bactéries			
	<i>C. albicans</i> NR-29450	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>Cr.</i> <i>neoformans</i>	<i>S. flexineri</i> NR 518	<i>S. enterica</i> NR 13555	<i>S. aureus</i> CIP 7625	<i>E. coli</i> ATCC 25922
EcHEtOH	2,500	5,000	1,250	2,500	1,250	2,500	2,500	2,500
EcH ₂ O	1,250	1,250	0,312	>5,000	>5,000	>5,000	>5,000	>5,000
BrHEtOH	5,000	2,500	2,500	5,000	5,000	2,500	5,000	2,500
BrH ₂ O	1,250	2,500	1,250	0,625	>5,000	5,000	5,000	5,000
FeHEtOH	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
FeH₂O	>5,000	>5,000	>5,000	>5,000	>5,000	>5,000	>5,000	>5,000
Fluconazole	0,032	0,032	0,032	0,032	-	-	-	-
Chloramphenicol	-	-	-	-	0.00488	0.00488	0.00488	0.00488

Légende : *C. albicans*: *Candida albicans* ; *C. parapsilosis* : *Candida parapsilosis* ; *C. krusei*: *Candida krusei* ; *Cr. neoformans*: *Cryptococcus neoformans* ;

S. flexineri: *Shigella flexineri*; *S. enterica* : *Salmonella enterica* ; *S. aureus* : *Staphylococcus aureus* ; *E. coli* : *Escherichia coli*.

EcHEtOH: écorces solution hydro éthanolique; EcH₂O : écorces solution aqueuse. BrHEtOH : brindilles solution hydro éthanolique ; BrH₂O : brindilles solution aqueuse ; FeHEtOH : feuilles solution hydro éthanolique; FeH₂O : feuilles en solution aqueuse.

Tableau XVI : CMI et CMB (mg/ml) des extraits et fractions des feuilles, brindilles et écorces d'*A. senegalensis* sur 3 souches de bactéries entéropathogènes

Souche Extraits et fractions	<i>S. enterica</i> NR 13555		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>S. flexineri</i> NR518	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Anse feEtOH	5	>5	5	>5	>5	>5
Anse fe MeOH	2,5	>5	2,5	>5	5	>5
Anse brEtOH	5	>5	>5	>5	5	>5
Anse br MeOH	2,5	>5	5	>5	5	>5
AnseEcEtOH	>5	>5	5	>5	>5	>5
AnseEcMeOH	5	>5	5	>5	5	>5
Chloramphénicol	0.00488	0.00488	0.00488	0.00488	0.00488	0.00488

Légende : CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CMB : Concentration Minimale Bactéricide ; Anse feEtOH : *Annona senegalensis* feuille éthanolique ; AnsefeMeOH : *Annona senegalensis* feuille méthanolique ; AnsebrEtOH : *Annona senegalensis* brindille éthanolique ; AnsebrMeOH : *Annona senegalensis* brindille méthanolique ; AnseEcEtOH : *Annona senegalensis* écorce éthanolique ; AnseEcMeOH : *Annona senegalensis* écorce méthanolique ; *S. flexineri*: *Shigella flexineri*; *S. enterica* : *Salmonella enterica* ; *E. coli* : *Escherichia coli*

Il ressort du tableau XVI que les CMI varient de 2,5 à >5 mg/ml, en fonction de l'extrait/fraction, de l'organe et du microorganisme. Les CMB des différents extraits/fractions sont toutes supérieures à 5 mg/ml, quelque soit le microorganisme testé. Vis-à-vis d'*E. coli*, agent pathogène le plus incriminé comme étant à l'origine des diarrhées, seule la fraction méthanolique des feuilles a montré une activité inhibitrice à 2,5 mg/ml. Elle a été de ce fait retenue pour le test anti *E. coli* entéropathogène *in-vivo*. Les feuilles d'*Annona senegalensis* ont montré le plus d'activité avec des CMI de 2,5, 2,5 et 5 mg/ml respectivement sur les trois souches bactériennes *S. enterica* NR13555, *E. coli* ATCC 25922 et *S. flexineri* NR158. L'extrait des écorces de tronc était le moins actif. La souche la plus sensible aux extraits était *S. enterica* et la plus résistante était *S. flexineri*. Globalement, les extraits d'*A. senegalensis* ont été potentialisés après fractionnement.

De manière générale, on observe que les extraits et fractions d'*A. senegalensis* possèdent une activité antimicrobiennene. Ils inhibent la croissance microbienne, y compris ceux impliqués dans la diarrhée humaine. Cette activité antimicrobienne se justifie par la présence dans les extraits et fractions, de plusieurs métabolites secondaires potentiellement actifs. C'est le cas avec la présence des flavonoïdes (Fairouz *et al.*, 2010), des polyphénols (Okoro *et al.*, 2010), des coumarines (Widelski *et al.*, 2009 ; Aziz *et al.*, 2010 ; Basanagouda *et al.*, 2010)

ainsi que des tanins (**Selime *et al.*, 2010**) dont les activités antimicrobiennes ont été démontrées. L'habileté des tanins à complexer les enzymes et d'autres protéines membranaires des microorganismes inhibe leur croissance (**Haslam, 1996**). Les tanins sont des composés polyphénoliques utilisés contre les saignements et les infections microbiennes (**Ya *et al.*, 1988 ; Djabou, 2006**). L'inhibition de la croissance microbienne par les composés phénoliques serait due aux liaisons hydrogènes qu'ils établissent avec les protéines vitales telles que les enzymes microbiennes (**Scalbert, 1991**). Les triterpènes détectés dans presque tous les extraits éthanoliques, sont reconnus pour leurs activités antibactériennes contre les bactéries gram positif et les bactéries gram négatif (**Faizi *et al.*, 2003 ; Gonzaga *et al.*, 2003**). Ils détruisent la membrane de la cellule bactérienne (**Mendoza *et al.*, 1997**). Les alcaloïdes présents dans les feuilles d'*A. senegalensis* ont l'aptitude de s'intercaler entre les différents constituants des molécules d'ADN microbiens, inhibant de ce fait la croissance du microorganisme (**Phillipson and O'Neill, 1987**). Les acétogénines, contenues en grande quantité dans la fraction méthanolique, sont des potentiels inhibiteurs du complexe I (NADH-Ubiquinone oxydoreductase) mitochondrial et de la NADH oxydase des membranes cellulaires (**Myoshi *et al.*, 2005**).

Avant d'exercer leurs activités microbicides comme cela est observé dans cette étude, les composés potentiellement actifs seraient parvenus à l'intérieur des microorganismes via des récepteurs spécifiques se trouvant sur leurs surfaces. Outre les récepteurs spécifiques des différents groupes de composés identifiés se trouvant sur les surfaces des membranes cellulaires des microorganismes, la destruction de ces dernières aurait certainement facilité l'afflux de ces métabolites secondaires dans le cytoplasme et au niveau du noyau pour leur action inhibitrice de croissance microbienne. Les différents groupes de composés identifiés, avec leurs modes d'action combinés, auraient dû aboutir à des activités antimicrobiennes très élevées de nos extraits. Mais les activités antimicrobiennes des extraits étaient modérées, suggérant par là des effets antagonistes parmi les constituants des extraits végétaux. L'activité antimicrobienne variait pour la même substance testée d'un microorganisme à l'autre. En fait, certaines bactéries gram-négatif à l'instar d'*E. coli* développent facilement de résistance contre de nombreux médicaments (**Alonso *et al.*, 2000; Sader *et al.*, 2002**). La variabilité de la résistance relative entre les microorganismes vis-à-vis d'un même extrait/fraction pourrait être attribuée aux différences dans la constitution morphologique des membranes externes de ces microorganismes. *E. coli* a une membrane phospholipidique externe portant les composants structurels des lipopolysaccharides. Cela rend la paroi cellulaire imperméable aux substances

chimiques antimicrobiennes. D'autres microorganismes par contre sont plus susceptibles, n'ayant qu'une couche de peptidoglycan externe qui n'est pas une barrière de perméabilité efficace. Généralement, les levures sont moins sensibles aux extraits bruts et fractions que les bactéries. Les levures sont des cellules eucaryotes qui sont plus complexes dans leurs structures que les cellules bactériennes procaryotes. Leur membrane cellulaire contient des stérols qui contribuent à réduire la fluidité de la membrane, ce qui les rend moins sensibles aux agents antimicrobiens (Mims *et al.*, 1993 ; Bacq-Calberg *et al.*, 1999).

L'activité antimicrobienne d'un échantillon varie d'un microorganisme à l'autre. Il est donc probable que dans chaque échantillon, les métabolites qui agissent soient différents ou bien que les microorganismes développent des mécanismes de défense différents. Par ailleurs, la partition des extraits bruts éthanologiques en fractions méthanoliques n'a pas permis d'améliorer les activités bactéricides de ces derniers sur les trois souches testées (CMB > 5 mg/ml). Cependant, elle a permis d'améliorer l'activité inhibitrice des extraits. En effet, dans le cadre de ce travail, les fractions méthanoliques obtenues sont riches en acétogénine. Les propriétés antimicrobiennes de cette dernière ont été prouvées (Bermejo *et al.*, 2005). Des 3 organes testés, les feuilles ont été les plus actives. *S. enterica* NR était la souche la plus sensible et *S. flexneri* NR518 était la plus résistante. Bien que ayant montré une activité antibactérienne, les extraits/fractions des organes d'*A. senegalensis* ont été moins actifs que le chloramphénicol (CMI 0,0048 mg/ml). Une analyse approfondie des CMI, des CMB et des CMF obtenues en ce qui concerne les extraits et les fractions sur certains microorganismes a révélé que les rapports CMB / CMI et CMF / CMI étaient ≤ 4 . Les valeurs de ces rapports ≤ 4 sont indicatives de la nature bactéricide ou fongicide des échantillons testés (Mims *et al.*, 1993; Lalitagauri *et al.*, 2004). Ainsi, un effet significatif des substances testées pourrait être attendu sur ces microorganismes.

III-3-2-Potentiel anti-oxydant des extraits bruts éthanologiques et fractions méthanoliques des organes d'*A. senegalensis*

Les extraits et fractions d'*A. senegalensis* qui ont montré le plus d'activités antimicrobienne et antidiarrhéique ont été retenus pour les tests d'activités antiradicalaires vis-à-vis des radicaux DPPH, NO et Fe²⁺. Les différentes valeurs des CI₅₀ obtenues sont consignées dans le tableau XVII.

Tableau XVII : Valeurs des CI₅₀

Echantillon	Activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH CI ₅₀ (µg/ml)	Activité antiradicalaire vis-à-vis du N0 CI ₅₀ (µg/ml)	Activité chélatrice du Fe ²⁺ CI ₅₀ (µg/ml)
AnsefeMeOH	6,40 ± 1,13	1,23 ± 0,00	>200
AnsebrMeOH	22,40 ± 1,41	0,92 ± 0,02	>200
AnseEcMeOH	167,00 ± 8,20	>200	>200
AnsefeEtOH	1,50 ± 0,10	0,89 ± 0,19	2,07 ± 0,86
AnseEcEtOH	5,10 ± 0,14	>200	>200
AnsebrEtOH	4,50 ± 0,14	0,53 ± 0,00	49,51 ± 0,41
Acide gallique	0,77 ± 0,01	**	**

**non testé

AnsefeEtOH : *Annona senegalensis* feuille éthanolique ; AnsefeMeOH : *Annona senegalensis* feuille méthanolique ; AnsebrEtOH : *Annona senegalensis* brindille éthanolique ; AnsebrMeOH : *Annona senegalensis* brindille méthanolique ; AnseEcEtOH : *Annona senegalensis* écorce éthanolique ; AnseEcMeOH : *Annona senegalensis* écorce méthanolique

III-3-2-1-Profil antiradicalaire vis-à-vis du DPPH

La figure 16 présente l'activité anti radicalaire vis-à-vis du DPPH

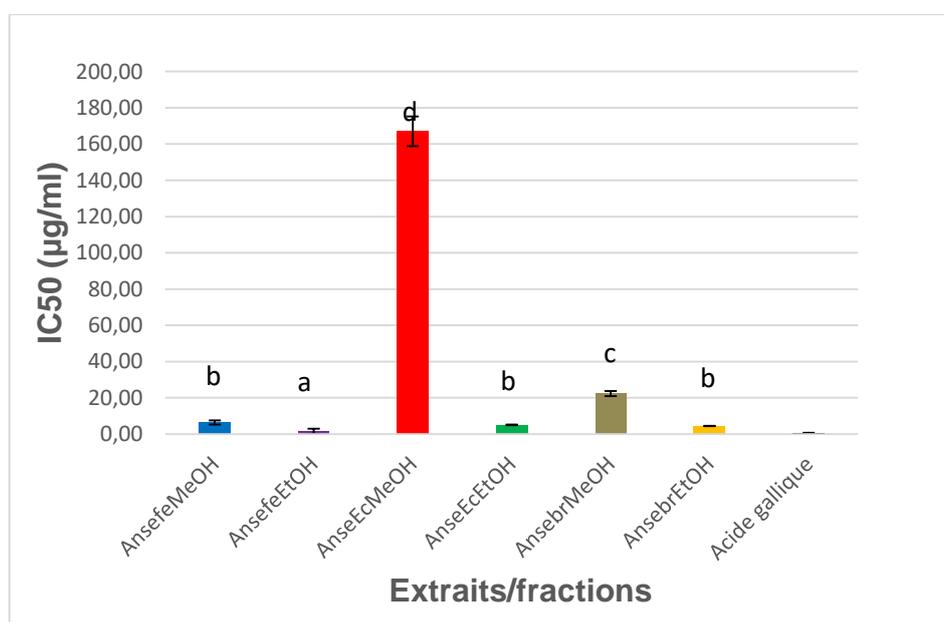


Figure 16: Activité anti radicalaire vis-à-vis du DPPH des extraits et fractions

Légende : Les lettres a, b, c et d montrent qu'il y a une différence significative entre les activités des extraits et fractions ; a, a, a montrent qu'il n'y a pas de différence significative
 AnsefeEtOH : *Annona senegalensis* feuille éthanolique ; AnsefeMeOH : *Annona senegalensis* feuille méthanolique ; AnsebrEtOH : *Annona senegalensis* brindille éthanolique ; AnsebrMeOH : *Annona senegalensis* brindille méthanolique ; AnseEcEtOH : *Annona senegalensis* écorce éthanolique ; AnseEcMeOH : *Annona senegalensis* écorce méthanolique

De de la figure 16, il ressort que la fraction méthanolique des écorces présente la plus faible activité. En effet, la CI_{50} obtenue avec cette fraction est la plus grande ($p < 0,05$). Les fractions méthanoliques des brindilles et du tronc ont une activité moyenne car leurs CI_{50} sont les secondes moins grandes des échantillons testés. La fraction méthanolique des feuilles ainsi que les extraits bruts éthanoliques des écorces du tronc, des brindilles et du tronc ont présenté les secondes plus grandes activités ($p < 0,05$). De tous les échantillons testés, celui qui a présenté la meilleure activité ($CI_{50} = 1,505\mu\text{g/ml}$) est de loin l'extrait brut éthanolique des feuilles ($p < 0,05$).

Une comparaison transversale entre les extraits bruts éthanoliques et les fractions méthanoliques permet d'observer qu'exception faite de la fraction méthanolique des feuilles, ($CI_{50} = 6,4 \mu\text{g/ml}$) toutes les autres fractions présentent une activité anti-radicalaire relativement faible ($22,4 \leq CI_{50} \leq 167$) $\mu\text{g/ml}$ comparée à celle des extraits bruts éthanoliques ($1,505 \leq CI_{50} \leq 7,8$) $\mu\text{g/ml}$ sur le radical DPPH.

Une comparaison des activités suivant les organes révèle que les feuilles présentent les meilleures activités comparées aux autres organes.

De façon globale, les activités obtenues avec les différents échantillons testés sont plus faibles ($p < 0,05$) comparativement à celle de l'acide gallique ($CI_{50} = 0,77\mu\text{g/ml}$), polyphénol naturel utilisé dans ce test comme témoin positif. A la concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$, tous les échantillons testés ont atteints 60% d'inhibition alors qu'à la même concentration, l'acide gallique a atteint 94,85% d'inhibition.

III-3-2-2- Profil antiradicalaire vis-à-vis du NO

Au cours des infections diarrhéiques, plusieurs radicaux libres sont produits dont le radical oxyde nitrique (NO). De ce fait, nos extraits et fractions ont été testés pour leur capacité à piéger ce radical.

La figure 17 présente l'activité anti radicalaire des échantillons sur le radical NO.

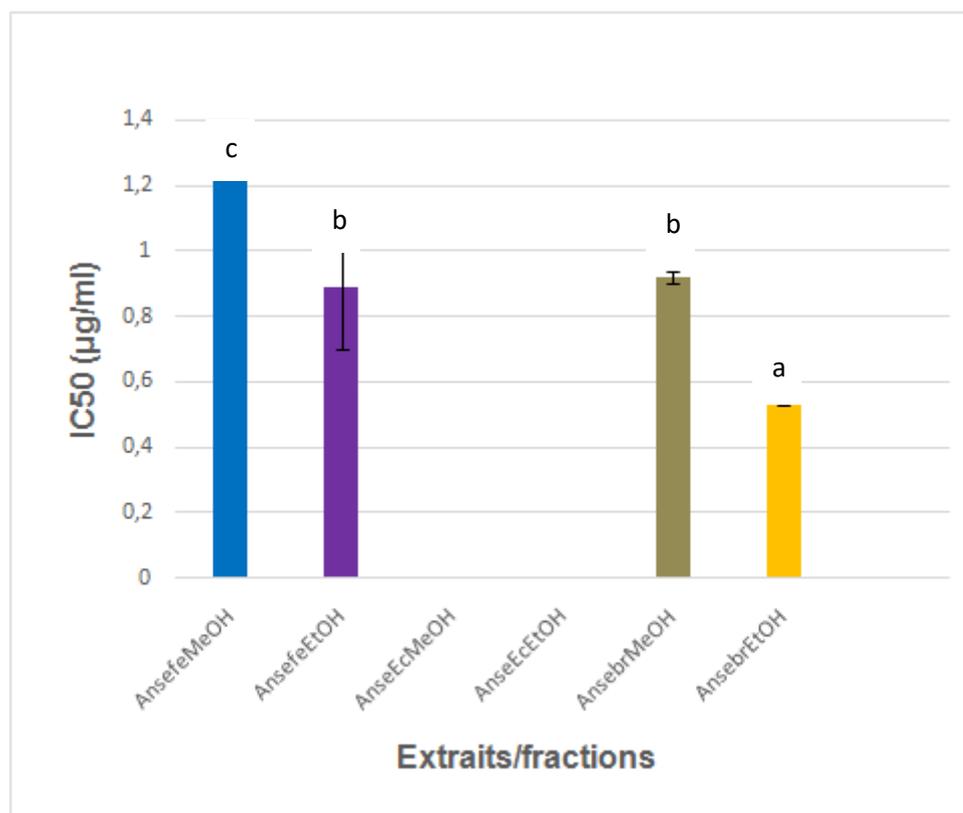


Figure 17: Activité anti radicalaire vis-à-vis du NO des extraits et fractions

Légende : les lettres a, b et c montrent qu'il y a une différence significative entre les activités des extraits et fractions ; b, b montrent qu'il n'y a pas de différence significative

AnsefeEtOH : *Annona senegalensis* feuille éthanolique ; AnsefeMeOH : *Annona senegalensis* feuille méthanolique ; AnsebrEtOH : *Annona senegalensis* brindille éthanolique ; AnsebrMeOH : *Annona senegalensis* brindille méthanolique ; AnseEcEtOH : *Annona senegalensis* écorce éthanolique ; AnseEcMeOH : *Annona senegalensis* écorce méthanolique

De la figure 17, il ressort que seuls les extraits bruts éthanoliques des brindilles, des feuilles, du tronc ainsi que la fraction méthanolique des feuilles ont présenté une activité antiradicalaire sur le radical oxyde nitrique.

De façon plus spécifique, la fraction méthanolique des feuilles a présenté la plus faible activité ($CI_{50} = 1,23 \mu\text{g/ml}$). Les extraits bruts éthanoliques des feuilles et des brindilles ont présenté des activités intermédiaires ($CI_{50} = 0,89$ et $0,91 \mu\text{g/ml}$) respectivement. L'extrait brut éthanolique des brindilles est le plus actif ($CI_{50} = 0,53 \mu\text{g/ml}$) des échantillons testés.

III-3-2-3- Activité chélatrice du Fe²⁺

Le Fe²⁺ à faible concentration est utile à l'organisme à plusieurs titres. Une très forte concentration en Fe²⁺ dans l'organisme entraîne des perturbations de processus biologiques normaux parmi les quelles les diarrhées. Au regard de ce fait, l'activité de nos extraits et fractions sur la chélation du Fe²⁺ a été évaluée. Les résultats sont représentés par la figure 18.

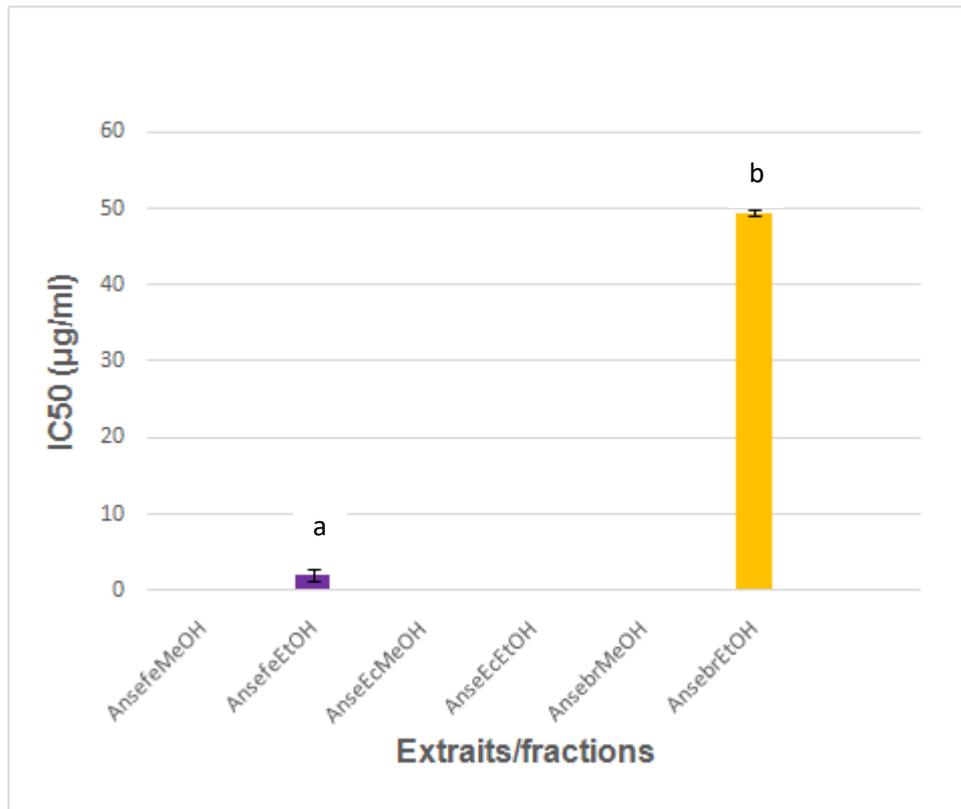


Figure 18 : Activité anti-oxydante sur le Fe²⁺ des extraits et fractions

Légende : les lettres a et b montrent qu'il y a une différence significative entre les activités des extraits
AnsefeEtOH : *Annona senegalensis* feuille éthanolique ; AnsefeMeOH : *Annona senegalensis* feuille méthanolique ; AnsebrEtOH : *Annona senegalensis* brindille éthanolique ; AnsebrMeOH : *Annona senegalensis* brindille méthanolique ; AnseEcEtOH : *Annona senegalensis* écorce éthanolique ; AnseEcMeOH : *Annona senegalensis* écorce méthanolique

Il ressort de cette figure que de tous les extraits et fractions testés, seuls les extraits bruts éthanoliques des feuilles et des brindilles ont présenté une activité quantifiable. AnsefeEtOH présentant une activité supérieure (IC₅₀ = 2,07µg/ml) à celle de AnsebrEtOH (IC₅₀ = 49,51µg/ml).

Les résultats ci-dessus révèlent que les extraits éthanoliques des feuilles, écorces et brindilles d'*A. senegalensis* ont chacune des activités antioxydantes supérieures à celles de sa fraction méthanolique vis-à-vis du DPPH, du NO et du Fe²⁺. La partition a réduit le pouvoir antioxydant des extraits éthanoliques comparativement à celui de leur fraction méthanolique riche en acétogénine. Il n'y a pas de corrélation positive entre la forte teneur en acétogénine d'une fraction et son activité antioxydante vis-à-vis des trois radicaux (DPPH, NO et Fe²⁺). Par ailleurs, **Tankeu et al. (2016)** ont montré que l'activité antioxydante des extraits des plantes augmente proportionnellement avec la teneur en polyphénols. Ainsi, la partition par les différents systèmes solvants aurait occasionné une diminution des polyphénols responsables de l'activité antioxydante. En effet, l'analyse phytochimique des extraits éthanoliques des feuilles, brindilles et écorces d'*A. senegalensis* a montré la présence des flavonoïdes et tanins, puissants antioxydants (**Ioan, 1982 ; Anderson et al., 1996**). La fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* renferme les phénols (O/P coumarine, Acide syringique) qui seraient responsables de l'activité antioxydante observée (**Widelski et al., 2009**).

Le mécanisme de réduction du DPPH est lié à sa capacité à céder un proton. Cette activité étant corrélée à la présence des groupements hydroxyles dans la molécule antioxydante. Par conséquent, la très bonne activité de l'extrait brut éthanolique des feuilles (AnsefeEtoH) est probablement due à la présence des substances renfermant dans leur structure un groupement hydroxyle. Cette exigence structurelle se justifie par la présence des composés phénoliques. Cette présence a été confirmée par le criblage phytochimique et l'analyse par HPLC. Ces derniers ont d'ailleurs permis de décélérer la présence de plusieurs composés phénoliques dans les extraits des feuilles. L'activité antioxydante vis-à-vis de l'oxyde nitrique et du Fe²⁺ serait liée à leur capacité à capter les électrons.

À notre connaissance, aucune étude n'a été faite dans ce sens. Néanmoins, ces résultats se rapprochent de ceux trouvés par **Ajboye et al. (2010)** qui ont montré une activité antioxydante des extraits méthanoliques des écorces d'*A. senegalensis* vis-à-vis du DPPH, du NO et du Fe²⁺. De tout ce qui précède, l'extrait brut éthanolique des brindilles d'*A. senegalensis* est le meilleur candidat pour la formulation d'un MTA antioxydant, ensuite l'extrait éthanolique des feuilles et en fin la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis*.

III-4-TOXICITÉ ORALE AIGUË

III-4-1-Variation des paramètres généraux

Quatorze jours après administration de la dose unique de 2000 mg/kg de poids corporel de la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* aux souris femelles, aucun effet toxique n'a été observé ni sur l'apparence, ni sur le comportement général des souris. Aucune mortalité, aucun symptôme toxique n'a été observé chez les animaux qui ont survécu 14 jours après l'administration de la fraction AnsefeMeOH. Le comportement des animaux a été observé les six premières heures. Cette observation s'est poursuivie pendant 14 jours après l'administration de la fraction. Les animaux ayant reçu la fraction étaient normaux et n'ont pas montré de changements significatifs dans le comportement tels que le tremblement, la diarrhée, la respiration, les troubles visuels, la surdité, les effets cutanés, la perte d'appétit, les troubles de la consommation d'eau, les anomalies posturales, la perte des poils, le sommeil, la léthargie, l'agitation ou l'apparence physique telle que la couleur des yeux, la salivation, la perte continue de poids, la blessure, l'irritation ou sécheresse de la muqueuse bucale et nasale par rapport au contrôle au bout de 14 jours d'observation générale.

III-4-2-Variation des paramètres comportementaux

Le tableau XVIII présente la variation des quelques paramètres comportementaux observés chez les souris d'essai comparativement aux souris témoin après traitement à la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* (AnsefeMeOH).

Tableau XVIII: Variation des paramètres comportementaux après administration d'AnsefeMeOH

Groupe	Jour	Nombre de mortalités	Mobilité	Sensibilité au bruit	Sensibilité au toucher	Agressivité	Aspect des fèces	Horripilation
Témoin 2ml/100g	De 0 à 5 jours	0	N	N	N	N	S	N
	De 6 à 14 jours	0	N	N	N	N	S	N
2000mg/kg	De 0 à 5 jours	0	D	N	N	D	S	H
	De 6 à 14 jours	0	N	N	N	N	S	N

Légende : N : normal, D : diminué, S : solide, H : hérissé

Les manifestations comportementales des souris lors de cette étude de la toxicité orale aiguë de la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* sont résumées dans le tableau XVIII. Le comportement général des souris traitées est comparé à celui des souris du lot témoin. Chez les souris d'essai, certains paramètres ont été brièvement affectés après administration de la fraction. Ainsi, on a noté une légère baisse de la mobilité, de l'agressivité. On a également observé un hérissément des poils des souris du groupe test. Avant la sixième journée, ces comportements étaient redevenus normaux, comparativement au témoin. Cette situation peut être imputable au stress provoqué par l'administration orale de la fraction.

Tout comme chez les souris du groupe témoin, aucune mortalité n'a été enregistrée chez les souris du groupe test durant les quatorze jours d'observation.

III-4-3-Effet de la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* sur l'évolution pondérale des souris

Les poids corporels des souris ont été déterminés et sont exprimés dans la figure 19 ci-dessous.

La Figure 19 montre l'évolution de poids des souris d'essai comparativement à ceux des souris du lot témoin en fonction du temps après le gavage, pendant les 14 jours d'observation.

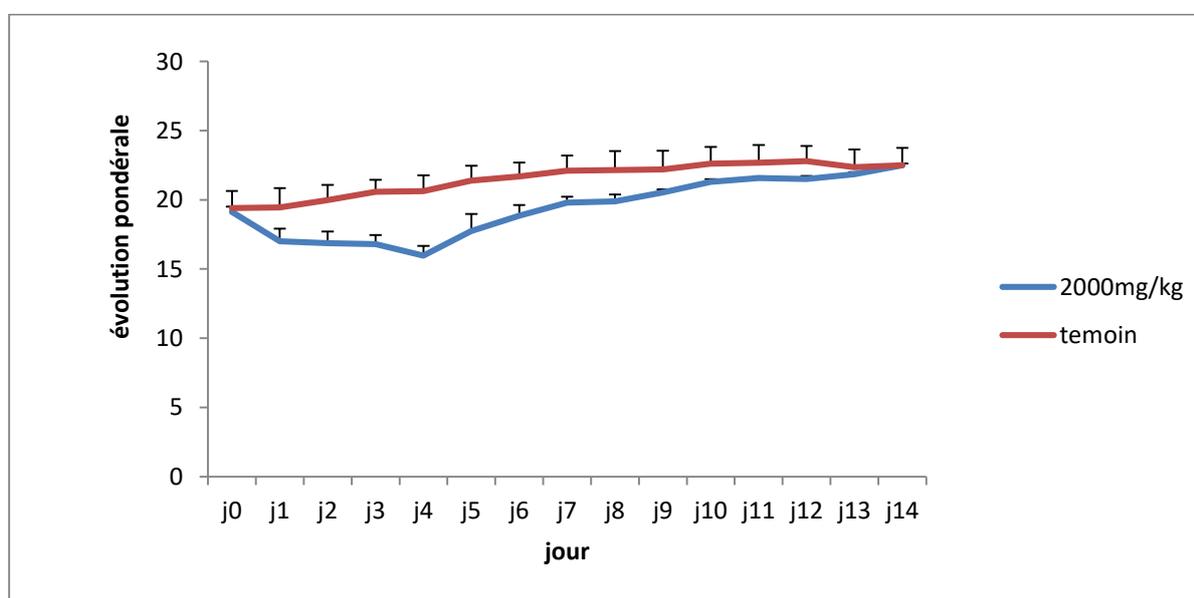


Figure 19 : Évolution de poids des souris pendant le traitement à la fraction AnsefeMeOH

Cette figure indique une légère baisse de poids corporels des souris d'essai pendant les 5 premiers jours après administration de la fraction. A partir de la sixième journée, l'évolution de poids corporels des souris traitées est redevenue normale, comparativement à celle observée chez les souris témoin. Cette légère chute de poids corporels observée chez les souris d'essai au début de l'expérience serait probablement due au stress occasionné par l'administration de la fraction.

III-4-4-Variation macroscopique des organes

Après 14 jours d'observation, les souris ont été sacrifiées et disséquées. Les différents organes à savoir : le foie, les reins, la rate, les poumons ainsi que le cœur des animaux des différents lots ont été récupérés, examinés macroscopiquement puis pesés.

L'examen macroscopique des organes des animaux traités avec la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* n'a montré aucun changement par rapport au contrôle.

La figure 20 présente la variation pondérale des différents organes après l'expérience.

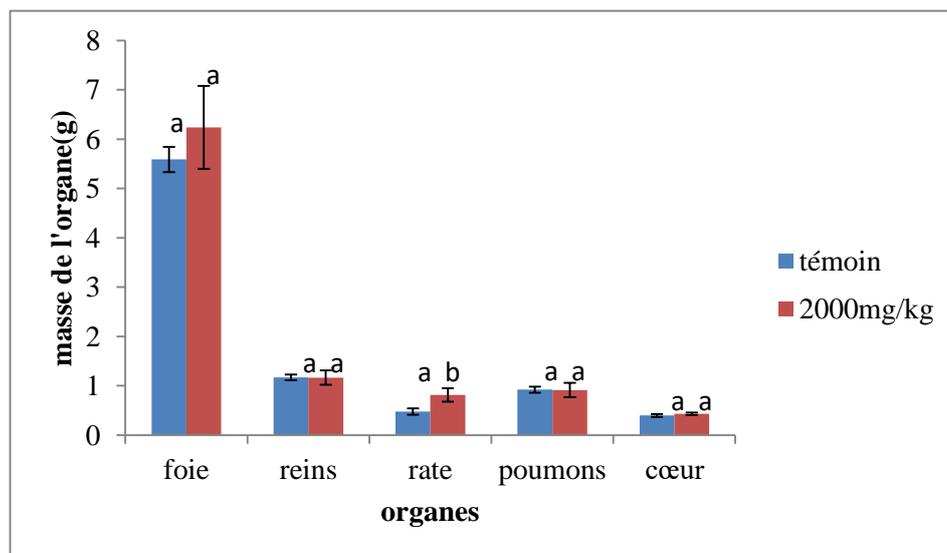


Figure 20 : Variation pondérale des différents organes après traitement à la fraction AnsefeMeOH

Légende : a, b indiquent qu'il y a une différence significative entre les groupes

a, a indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les groupes

De cette figure, il ressort qu'exception faite de la rate, aucune différence significative n'est observée entre le poids moyen des foies, des reins, des poumons ainsi que des cœurs des

souris test et des souris témoin. En effet, ces organes sont les premiers concernés en cas de toxicité d'une substance dans l'organisme animal vivant.

III-4-5-Variation de la consommation alimentaire et hydrique

Chaque jour et pendant les 14 jours qu'avait duré le traitement, la quantité de nourriture et de l'eau consommé par les animaux était déterminée et soigneusement enregistrée.

➤ Consommation alimentaire

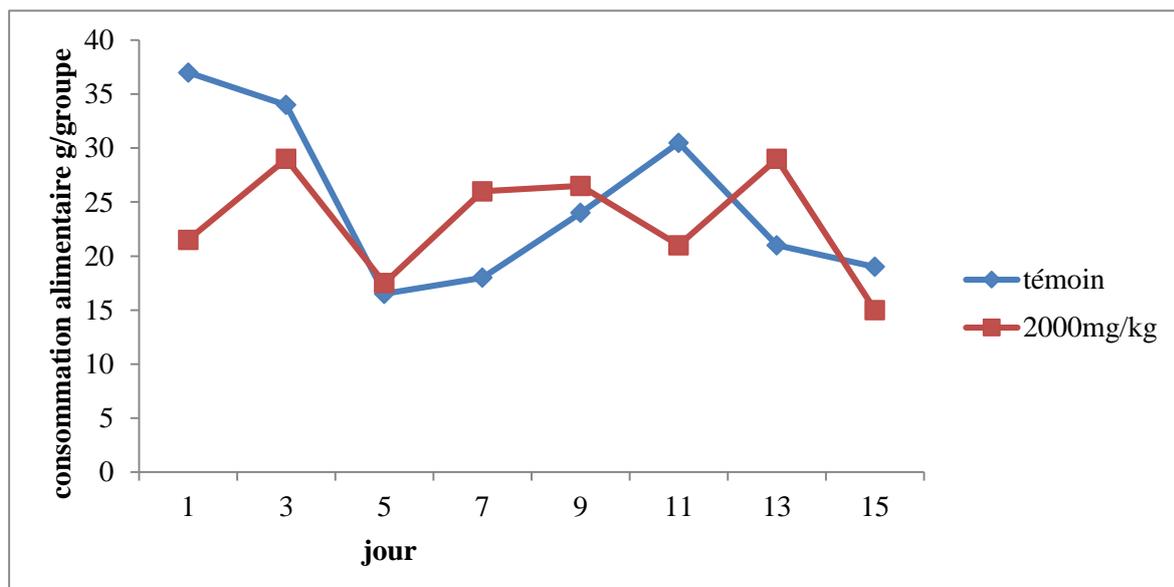


Figure 21 : Consommation alimentaire en g/groupe/jour après administration de la fraction AnsefeMeOH

➤ Consommation hydrique

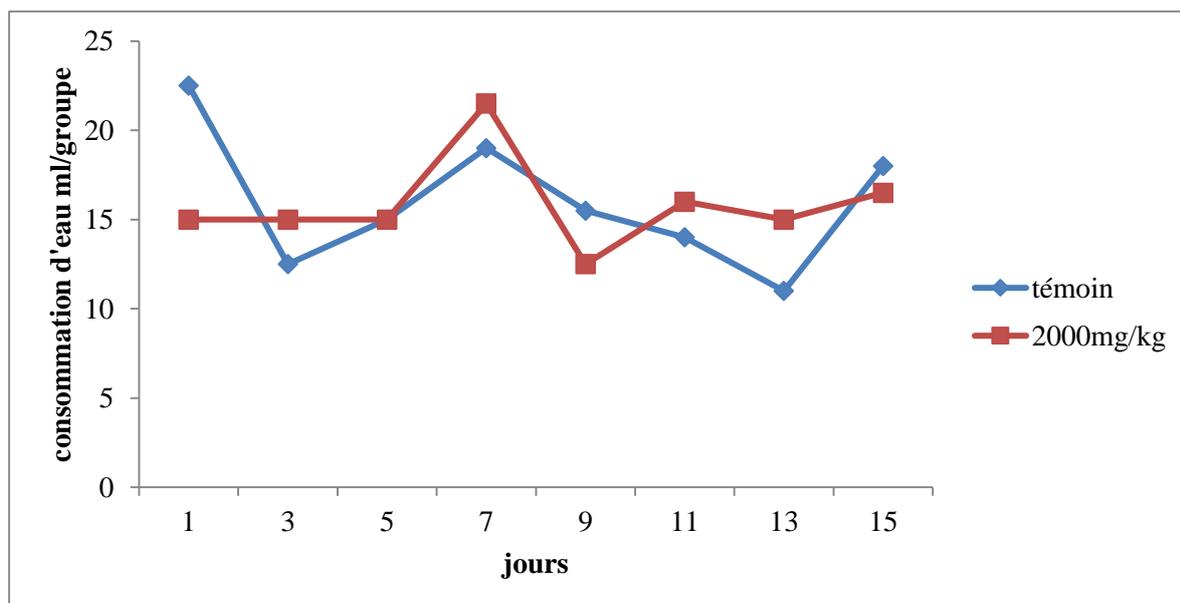


Figure 22 : Consommation hydrique en ml /groupe/jour après administration de la fraction AnsefeMeOH

Des observations rapportées ci-dessus, il résulte globalement qu'aucune différence significative n'a été observée entre les souris témoin et les souris test en ce qui concerne la mortalité, les manifestations cliniques, la présentation macroscopique des organes prélevés, les poids moyens des différents organes (sauf en ce qui concerne celui de la rate). Des légères différences ont été notées au début (avant le sixième jour) des 14 jours d'observation quotidienne, quant à l'évolution de poids corporels, de la consommation d'aliment et de l'eau, de la motricité et de l'horripilation. Ces différences passagères observées entre les souris test et les souris témoin peuvent être dues au stress provoqué par la prise orale de la fraction d'AnsefeMeoH. Le poids moyen de la rate des souris du lot test est faible par rapport à celui des souris du lot témoin. Mais le faible poids de la rate, organe lymphoïde dont les rôles premiers sont immunitaire et de filtration du sang, ne saurait permettre de conclure à une toxicité orale aiguë de la fraction. Le symptôme clinique est l'un des principaux indicateurs des effets de toxicité sur les organes des groupes traités (**Eaton et Klaassen, 1996**). Au cours des 14 jours d'observation, les souris ayant reçu par voie orale une dose unique de 2000 mg / kg de poids corporel, de fraction d'AnsefeMeoH n'ont montré aucun signe manifeste de détresse et aucun symptôme observable de toxicité ou de décès. Toutes les souris ont pris du poids notamment à partir de la sixième journée et n'ont montré aucun changement de comportement significatif. Les caractéristiques de l'apparence physique telles que la peau, la fourrure et les yeux se sont révélées normales, alors que le poids corporel des souris a dans l'ensemble subi une augmentation. Cela indique que l'administration de la fraction, à la dose reçue présente un niveau de toxicité négligeable sur la croissance de la souris. En outre, la détermination de l'apport alimentaire et de la consommation d'eau est importante dans l'étude de la sécurité d'un produit ayant un but thérapeutique, car l'apport approprié de nutriments est essentiel au statut physiologique de l'animal et à l'accomplissement de la réponse appropriée à la fraction testée (**Steven et Mylecrdfaine, 1994 ; Iversen et Nicolaysen, 2003**). Dans cette étude, l'apport alimentaire et la consommation d'eau n'ont pas été dans l'ensemble affectés par l'administration de la fraction. L'appétit des souris ainsi que leur consommation d'eau n'ont pas été globalement réduits, pendant toute la période d'expérience. Cela indique qu'il n'y a pas eu de perturbation dans le métabolisme des glucides, des protéines ou des graisses (**Klaassen, 2001**). En général, les altérations prolongées du gain de poids corporel ainsi que de poids des organes internes des souris reflètent la toxicité après exposition aux substances toxiques (**Carol, 1995**). La chute continue de poids corporel est un indicateur des effets néfastes des médicaments et des produits chimiques. Cela est plus significatif si la perte de poids corporel engendrée est supérieure à 10% par rapport au poids initial (**Rajaet al., 2002; Teo et al., 2002**). Cependant, une

augmentation du poids corporel a été observée avec les groupes testés. Le poids des organes est également un indice important du statut physiologique et pathologique chez les animaux. Le poids relatif de l'organe est fondamental pour diagnostiquer si l'organe a été exposé à la blessure ou non. Le cœur, le foie, le rein, la rate et les poumons comptent parmi les principaux organes affectés par une réaction métabolique causée par un toxique (**Dybing et al., 2002**). Dans cette étude, le poids relatif et absolu des organes dans les groupes témoins et traités a augmenté de manière significative. Mais la faible augmentation du poids de la rate observée chez les souris test comparativement aux souris témoin relèverait plutôt d'une anomalie congénitale ou d'une infection microbienne que toxicologique, les autres organes concernés en premier lieu par la toxicité n'étant pas affectés. De toute façon une autre étude pourra permettre de confirmer cette hypothèse. Par ailleurs, le gain de poids corporel était identique dans les deux groupes témoins et traités, notamment à partir de la sixième journée après administration de la fraction ; la différence n'était pas statistiquement significative. L'administration de la fraction d'AnsefeMeoH n'a pas montré d'effet néfaste sur le poids de tous les organes importants prélevés. Cette étude estime que la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* testée ne provoque pas d'effets toxicologiques aigus à la valeur de la DL50 égale ou supérieure à 2000 mg / kg de poids corporel, indiquant par là que la fraction est pratiquement non toxique. En principe, la méthode d'essai limite n'est pas destinée à déterminer une valeur de la DL50 précise, mais elle sert de suggestion pour classer la fraction ou l'extrait en fonction de l'attente à laquelle le niveau de dose des animaux devrait être (**Roopashree et al., 2009**).

Selon l'étiquetage chimique et la classification de la toxicité systémique aiguë recommandée par l'OCDE, la fraction d'AnsefeMeoH peut être classée dans le statut de classe 5 ($DL50 > 2000$ mg / kg), qui est la classe de toxicité la plus basse. Selon une étude effectuée par **Kennedy et al. (1986)**, les substances ayant des valeurs de DL50 supérieures à 2000 mg / kg par voie orale sont considérées comme étant sûres ou pratiquement non toxiques. Le résultat de cette étude concorde avec ceux de **Theophine et al. (2012)** et d'**Onwusonye et al. (2014)** qui ont obtenu pour des différents organes d'*Annona senegalensis* récoltés au Nigéria, des valeurs limites des DL50 de 3808 mg/kg et de 5000 mg/kg respectivement, chez les souris. En effet, bien qu'ayant suivi des démarches protocolaires différentes de celles utilisées dans le cadre de ce travail, **Theophine et ses collaborateurs** ont enregistré une DL50 supérieure ou égale à 3808 mg/kg de la fraction méthanolique des écorces des racines d'*Annona senegalensis*. Il en est de même d'**Onwusonye et ses collaborateurs** qui ont obtenu une DL50 supérieure ou égale à 5000 mg/kg de poids corporel de la fraction méthanolique des feuilles d'*Annona*

senegalensis. Selon **Hodge et Sterner, (2005)**, toute substance dont la DL50 par voie orale est égale ou supérieure à 5000 mg/kg peut être considérée comme pratiquement non toxique pour l'homme.

III-5-ACTIVITÉ DE LA FRACTION MÉTHANOLIQUE DES FEUILLES D'A. SENEGALENSIS SUR DEUX MODÈLES DE DIARRHÉE

Les effets de la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* ont été évalués sur la diarrhée fonctionnelle.

III-5-1- Effets de la fraction méthanolique des feuilles d'A. senegalensis sur la diarrhée fonctionnelle

L'huile de ricin a été utilisée pour induire la diarrhée chez les rats et les propriétés anti-diarrhéiques de la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* ont été évaluées. Cette évaluation a été faite suivant les caractéristiques des selles et la motilité gastro-intestinale. Les paramètres tels que la période de latence (temps de rétention), le pourcentage des rats répondant, l'index de purge, le pourcentage des inhibitions de la défécation, la fréquence des selles liquides ainsi que la teneur en eau des selles ont été évalués.

➤ Période de latence

Le temps de rétention de la diarrhée a été significativement prolongé par la fraction à différentes doses, comparativement au témoin négatif. La figure 23 renseigne sur les temps de rétention en fonction des concentrations en fractions.

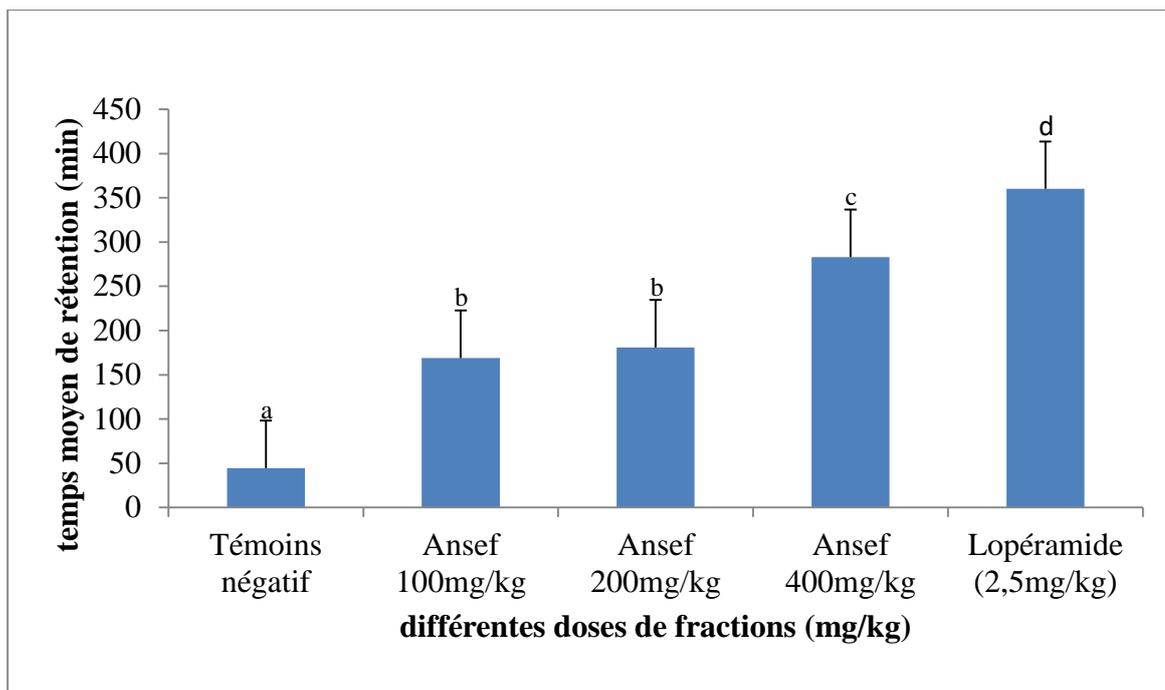


Figure 23 : Temps de rétention de la diarrhée en fonction des concentrations en fractions

Légende : a, b,c,d indiquent qu'il y a une différence significative ; b, b indiquent qu'il n'y a pas de différence significative. Ansef : *Annona senegalensis* feuille

Cette figure montre une augmentation significative des temps de rétention en fonction de la concentration en fraction. Suivant les temps de rétention, l'activité de la fraction aux concentrations testées restent nettement inférieure à celle du lopéramide. Le temps de rétention de la diarrhée augmente avec la concentration en fraction. La fraction à la dose de 100 mg/kg entraîne un temps de rétention faible (175 min), tandis qu'à la dose 400 mg/kg, le temps de rétention est élevé (275 min) par rapport à celui du témoin négatif (48min). Il n'y a pas de différence significative entre les temps de rétention de la fraction à la dose 100 et 200 mg/kg. Les temps de rétention engendrés par la fraction restent inférieurs à celui induit par la substance de référence (le lopéramide ; temps rétention de la diarrhée supérieur à 360 min).

➤ Pourcentage des répondants

La figure 24 donne le pourcentage des rats répondants au traitement par la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis*.

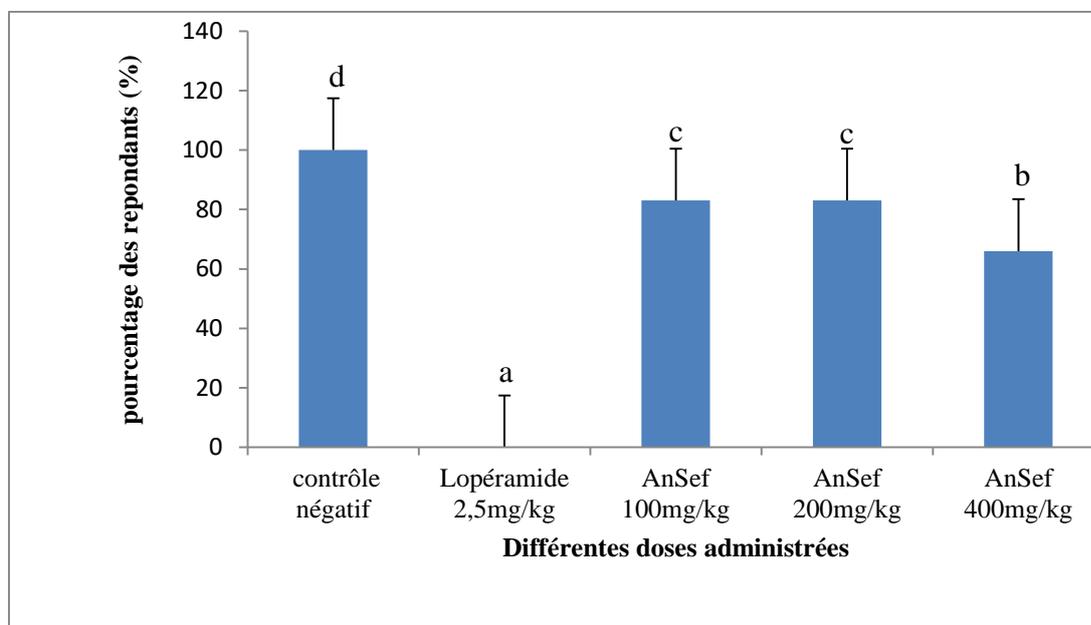


Figure 24 : Pourcentage des répondants après administration de la fraction AnsefeMeOH

Légende : a, b, c indiquent qu'il y a une différence significative ; b, b indiquent qu'il n'y a pas de différence significative

En général, la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* à différentes doses ; 100, 200 et 400 mg/kg a engendré une réduction du pourcentage des répondants par rapport au contrôle négatif (100% des répondants). On observe que tous les rats du contrôle négatif ont présenté la diarrhée. Aucun rat du contrôle positif (rats ayant reçu le composé standard) n'a présenté la diarrhée après 6 heures d'observation (0% des répondants). Par ailleurs, l'augmentation de la concentration en fraction augmente l'activité antidiarrhéique. L'activité la plus élevée correspondant à la fraction de concentration 400 mg/kg (66 %). Il n'y a aucune différence statistiquement significative d'activité entre la fraction à 100 et à 200 mg/kg (82 % des répondants).

➤ Fréquence totale des selles

La figure 25 présente la fréquence des selles chez les différents groupes de rats soumis à l'étude.

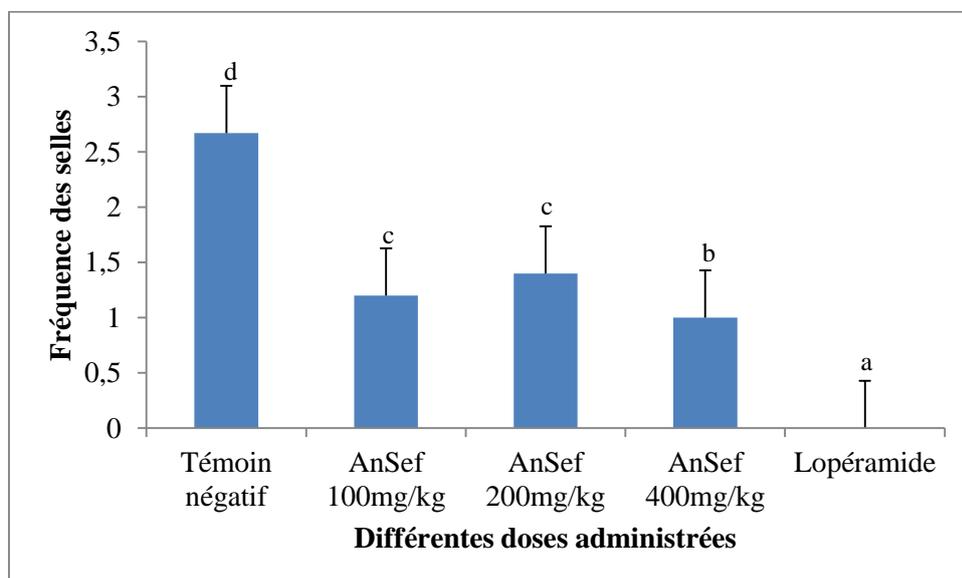


Figure 25 : Fréquence des selles après administration de la fraction AnefeMeOH

Légende : a, b, c, d indiquent qu'il y a une différence significative

c, c indiquent qu'il n'y a pas de différence significative

AnSef : *A. senegalensis* feuille méthanolique

De la figure 25, il ressort que la fraction méthanolique des feuilles d'*Ansenegalensis* à différentes doses ; 100, 200 et 400 mg/kg a engendré une réduction significative ($p < 0,05$) de la fréquence des selles par rapport au contrôle négatif (2,6). Toutefois, la fréquence des selles est restée largement supérieure à celle des rats du témoin positif (0,0). On observe que la fréquence de selles à la dose 400 mg/kg (1,0) est inférieure à celles obtenues aux doses 100 mg/kg (1,2) et 200 mg/kg (1,4). En somme, on constate une corrélation positive entre la concentration de la fraction méthanolique et la fréquence des selles chez les rats traités. En effet, plus la concentration de la fraction était élevée, moins les selles étaient fréquentes.

➤ Pourcentage d'inhibition de la défécation

La figure 26 présente le pourcentage d'inhibition de la défécation.

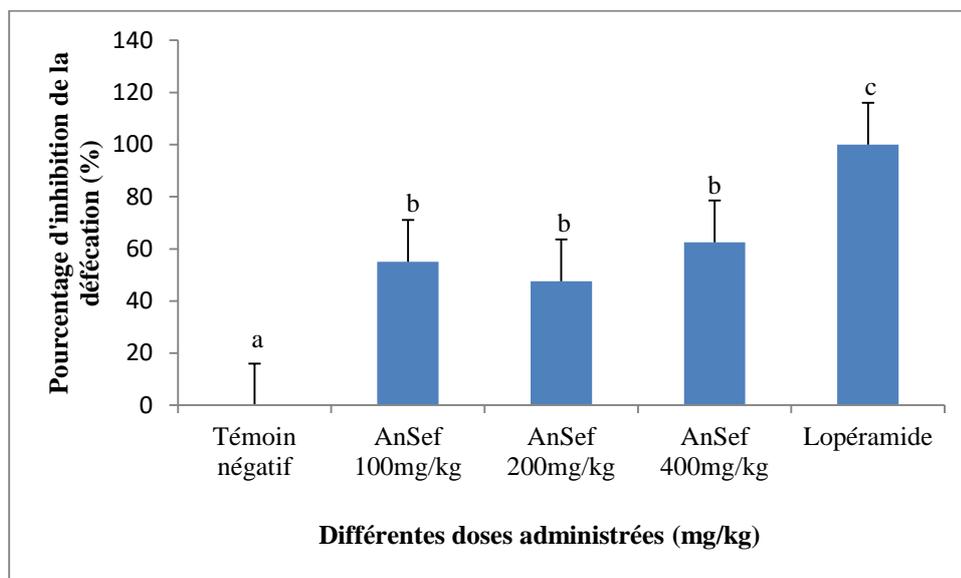


Figure 26: Pourcentage d'inhibition de la défécation après administration de la fraction AnsefeMeOH

Légende : a, b,c indiquent qu'il y a une différence significative. a, a indiquent qu'il n'y a pas de différence significative

AnSef : *A. senegalensis* feuille méthanolique

La réduction de la fréquence des selles provoquée par la fraction AnsefeMeOH à différentes doses reflète l'observation faite au niveau de l'inhibition de la défécation. Le pourcentage d'inhibition augmente avec la concentration en fraction tandis que la fréquence des selles diminue. Chez les rats du témoin négatif, on enregistre un pourcentage d'inhibition de la défécation de 0%. Le lot constitué des rats traités à la dose de 400 mg/kg présente un pourcentage de défécation de l'ordre de 60% tandis que ceux traités aux doses 100 et 200 mg/kg présentent un pourcentage de 54%. Il n'y a pas de différence significative entre l'activité de la fraction à la dose 100 mg/kg et celle à la dose 200 mg/kg observée pour ce paramètre. La fraction à la dose 400 mg/kg de poids corporel est la plus active comparativement au témoin négatif et aux deux autres doses (100 et 200 mg/kg).

➤ **Index de purge**

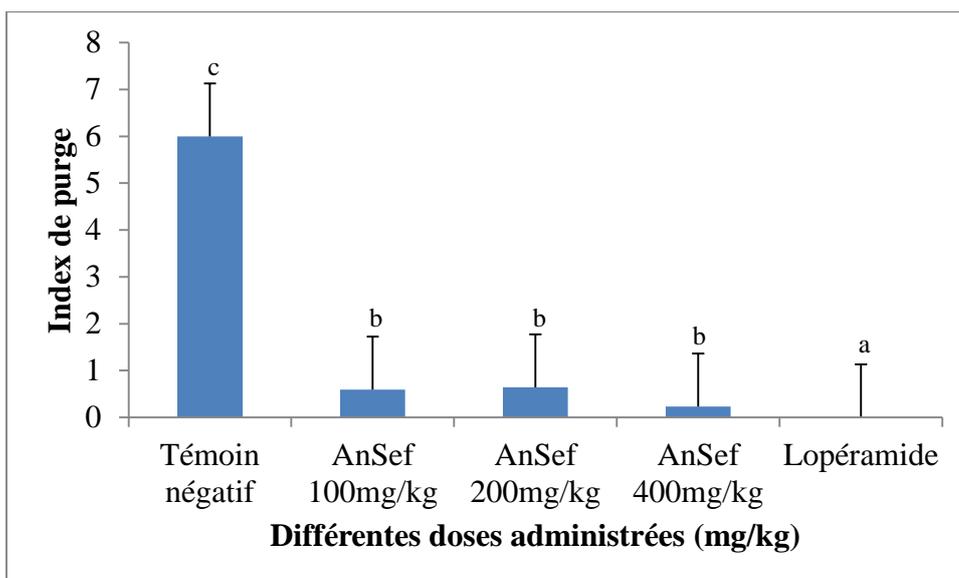


Figure 27 : Index de purge après administration de fraction AnsefeMeOH

Légende : a, b,c indiquent qu'il y a une différence significative. b, b indiquent qu'il n'y a pas de différence significative

AnSef : *A. senegalensis* feuille méthanolique

La sévérité de la diarrhée induite par l'huile de ricin chez les rats peut être appréciée à travers l'index de purge. La fraction AnsefeMeOH à différentes doses réduit de façon significative l'index de purge. La sévérité de la diarrhée est considérablement réduite avec l'augmentation de la dose de traitement. La dose 400 mg/kg est la plus active (index 0,2) par rapport au témoin négatif (index 6). L'activité de la fraction AnsefeMeOH, quoique statistiquement significative par rapport au témoin négatif, reste relativement faible comparativement à celle du composé de référence (le lopéramide).

➤ **Masse de l'eau contenue dans les selles**

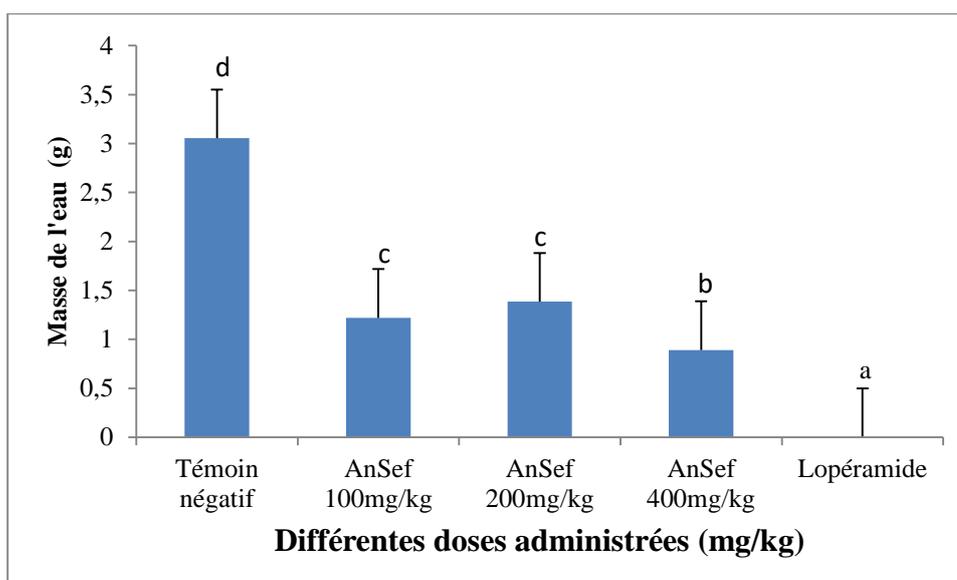


Figure 28 : Masse de l'eau contenue dans les selles après administration de la fraction AnsefeMeOH

Légende : a, b, c indiquent qu'il y a une différence significative b, b indiquent qu'il n'y a pas de différence significative

AnSef : *A. senegalensis* feuille méthanolique

La fraction AnsefeMeOH a provoqué une réduction significative de la teneur en eau des selles chez les rats traités. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre l'activité de la fraction à la dose 100 mg/kg et celle à la dose 200 mg/kg. La fraction à la dose 400 mg/kg est la plus efficace (0,8%) comparativement au témoin négatif (3%).

La fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* (AnsefeMeOH) a montré une activité anti diarrhéique statistiquement significative contre la diarrhée induite par l'huile de ricin chez le rat. L'huile de ricin en tant qu'agent cathartique a été choisie par rapport à ses multiples mécanismes impliqués dans la causalité des diarrhées (**Izzo et al., 1996**). L'action des lipases sur l'huile de ricin libère l'acide ricinoléique et la glycérine. Cet acide produit une action irritante et inflammatoire sur la muqueuse intestinale, conduisant à la libération de prostaglandines (**Yoshio et al., 1999**). Les prostaglandines induisent une augmentation de la perméabilité des cellules de la muqueuse et des changements dans le transport des électrolytes, entraînant une réponse hypersécrétoire et une stimulation de la diarrhée (**Pierce et al., 1971 ; Masco et al., 1993 ; Zavala et al., 1998**). L'échantillon d'AnsefeMeOH testé à différentes doses (100, 200 et 400 mg/kg du poids corporel de l'animal) a entraîné une augmentation des périodes de latence et une diminution des index de purge chez les rats diarrhéiques, comparativement

aux rats du groupe témoin négatif. Ceci traduit un retard dans l'induction de la diarrhée par l'huile de ricin chez les rats traités. Globalement et de façon claire, une corrélation positive entre la dose et l'efficacité de la fraction est établie. Dans cette étude, la fraction AnsefeMeOH à la dose 400 mg/kg est la plus efficace contre la diarrhée fonctionnelle induite par l'huile de ricin chez les rats. Les inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines sont connus pour leur capacité à retarder la diarrhée induite par l'huile de ricin (**Awouters et al., 1978**). L'effet inhibiteur de l'échantillon testé peut alors être compris. La fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* (AnsefeMeOH) a occasionné une augmentation de la période de rétention de la diarrhée comparativement au témoin négatif. Probablement, la fraction AnsefeMeOH augmente la réabsorption du NaCl et de l'eau au niveau de la muqueuse intestinale. L'activité antidiarrhéique de la fraction peut également être due à la dénaturation des protéines de la muqueuse intestinale et la formation des protéines tanâtes, par établissement d'une liaison entre les protéines et les tanins qui rendent celle-ci plus résistante, réduisant la sécrétion. En effet, certains métabolites secondaires tels que les tanins présents dans les plantes dénaturent les protéines de la muqueuse intestinale par formation des protéines tanâtes, lesquelles rendent la muqueuse intestinale plus résistante aux altérations chimiques et réduisant de ce fait les sécrétions (**Di Carlo et al., 1993; Tripathi, 1994**). Il est par conséquent possible de suggérer que les propriétés antisécrétoires des métabolites secondaires présents dans nos échantillons contribueraient aux activités anti diarrhéiques observées. La diarrhée sécrétoire est associée à une activation de la pompe à chlorures, engendrant un efflux des ions Cl⁻ des cellules vers la lumière intestinale. Cette situation a pour corrolaire une sécrétion massive de l'eau dans la lumière intestinale et la formation de la diarrhée liquide (**Ammon et Soergel, 1985**). AnsefeMeOH inhiberait la sécrétion de l'eau dans la lumière intestinale par le mécanisme inverse. En général, les propriétés antidiarrhéiques des plantes médicinales sont dues à la présence de tanins, d'alcaloïdes, de saponines, de flavonoïdes, de stéroïdes, de terpénoïdes et des sucres reducteurs (**Galvez et al., 1993; Otshudi et al., 2000; Longang et al., 2000 ; Havagiray et al., 2004**). Par conséquent, la propriété relaxante des substances testées décrite dans cette étude peut être attribuable à ces groupes chimiques de constituants identifiés dans nos extraits et fractions. Pailleurs, les résultats obtenus lors des tests préliminaires utilisant l'ensemble des fractions méthanoliques (annexe III) ont montré que la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* était plus active comparativement aux fractions des autres organes. Ceci permet de comprendre que l'activité d'un extrait et/ou fraction varie en fonction de la plante et de l'organe (**Mortier, 1991**), conformément à sa teneur en métabolite secondaire responsable de cette activité. La fraction méthanolique des organes des plantes de la famille des

Annonacées est riche en acétogénines (**Alali et al., 1999 ; Kengni et al., 2015**) , qui participeraient à l'expression de l'activité observée. Les acétogénines sont des métabolites secondaires spécifiques doués d'importantes propriétés biologiques (**Alali et al., 1999**). Aux meilleures de nos connaissances, l'activité anti diarrhéique des acétogénines (senegalène) n'est pas encore établie. La fraction méthanolique renferme également d'autres métabolites secondaires tels que les acides coumariques qui agiraient en parfaite synergie avec les acétogénines pour induire l'activité anti-diarrhéique observée. Quoique le mécanisme d'action des acétogénines vis-à-vis de la diarrhée ne soit pas encore illucidé, il se peut qu'elles réduisent les sécrétions intestinales.

La fraction AnsefeMeOH a entraîné une réduction marquée du poids et du volume des teneurs intestinales sur l'enteropooling induit par l'huile de ricin. Le modèle diarrhéique induit par l'huile de ricin est connu comme incorporant à la fois la diarrhée sécrétoire et de motilité (**yegnanarayan et shrotri, 1982**). Les observations ci-dessus suggèrent que cette fraction en doses graduées a réduit la diarrhée en inhibant la porosité des villosités intestinales induite par l'huile de ricin, tout comme le médicament standard (le loperamide). Il est possible que la fraction AnsefeMeOH ait provoqué une absorption accrue de l'eau et de l'électrolyte du tractus gastro-intestinal; Car il a retardé le transit gastro-intestinal chez les rats par rapport au contrôle, ce qui a permis un meilleur temps d'absorption des liquides. Les acétogénines présentes dans la fraction ont peut-être participé à la réduction des sécrétions intestinales. Il est possible de suggérer que les propriétés antisécrétoires des acides phénoliques et des acétogénines dans la fraction auraient contribué aux activités antidiarrhéiques observées. Aucun rapport sur l'activité de cette fraction contre la diarrhée induite par l'huile de ricin dans la littérature n'a été trouvé. Néanmoins, ce premier rapport démontre que cette fraction possède une activité antidiarrhéique associée à des propriétés antibactériennes et antifongiques qui soutiennent l'utilisation de leurs feuilles traditionnellement pour traiter la diarrhée.

Ces résultats corroborent ceux de **Souleiman et al. (2008)** qui ont montré une activité antidiarrhéique de l'extrait méthanolique des écorces d'*A. senegalensis* chez les rats. Les plantes riches en tanins sont utilisées comme antidiarrhéique et contre le stress oxydatif du fait de leurs propriétés antioxydantes (**Ioan, 1982**). De même, plusieurs autres chercheurs et notamment **Kamgang et al. (2005)**, **Kouitcheu et al. (2006)**, (**Ngo Teke, 2011**) ont mis en exergue la capacité des extraits des plantes à lutter contre la diarrhée induite par l'huile de ricin chez les rats.

III-5-2- Détermination des mécanismes possibles impliqués dans l'activité anti-diarrhéique observée

➤ **Effet de la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* sur la motilité gastro-intestinale**

Les effets de la fraction méthanolique des feuilles d'*Annona senegalensis* sur la vitesse du transit intestinal sont consignés dans le tableau XIX. L'administration de la fraction AnsefeMeOH aux rats après administration de la farine de charbon 5 % a entraîné une diminution significative ($p < 0,001$) de la progression de la farine de charbon tout au long du tractus gastro-intestinal aux doses de 100 ; 200 et 400 mg/kg en comparaison au groupe témoin avec un effet plus prononcé à la dose de 200 mg/kg. L'inhibition de la progression du charbon était de 43,3% ; 58,74% et 55,31% respectivement aux doses de 100 ; 200 et 400 mg/kg. L'administration du Lopéramide à la dose de 10 mg/kg a également entraîné une inhibition significative ($p < 0,001$) de la progression de la farine de charbon de 61,25% par comparaison au contrôle négatif.

Tableau XIX: Effets de la fraction AnsefeMeOH à différentes doses sur la motilité gastrointestinale chez le rat

Traitement	Doses (mg/kg)	Front de progression intestinal du charbon (%)	% d'inhibition de la progression du charbon (%)
T négatif	0	71,37 ± 3,59 ^a	
Lopéramide	10	33,54 ± 3,58 ^b	61,25 ± 3,24 ^a
AnSef	100	47,81 ± 1,14 ^c	43,34 ± 1,35 ^b
AnSef	200	34,82 ± 1,84 ^c	58,74 ± 1,90 ^b
AnSef	400	36,71 ± 3,68 ^c	55,31 ± 3,54 ^b

Légende : a, b, c indiquent qu'il y a une différence significative b,b,b et c,c,c indiquent qu'il n'y a pas de différence significative. AnSef : *A. senegalensis* feuille méthanolique: T négatif : témoin négatif

➤ **Effet de la fraction de plante sur « enteropooling »**

Le tableau XX présente les effets de la fraction méthanolique des feuilles de *Annona senegalensis* sur la masse et le volume du liquide intestinal après induction de la diarrhée par l'huile de castor. Il en ressort que l'administration de l'huile de ricin à des rats sains a entraîné une accumulation de l'eau et des électrolytes ainsi qu'une augmentation de la masse de ce liquide dans la lumière intestinale. Le traitement des animaux à différentes doses de la fraction a diminué significativement ($p < 0,001$) le volume et la masse du liquide intestinal avec un pourcentage d'inhibition de la sécrétion intestinale de 35,45% ; de 56,90% et de 51,88% respectivement pour des doses de traitement de 100, 200 et 400 mg/kg en comparaison au témoin négatif. L'administration du lopéramide à la dose de 10 mg/kg comme substance standard de traitement, a également entraîné une inhibition de la sécrétion intestinale de 68,75%.

TableauXX : Effets de la fraction AnsefeMeOH à différentes doses sur la masse et le volume du liquide intestinal chez le rat

Traitement	Doses (mg/kg)	Masse du liquide intestinal (g)	Volume du liquide intestinal (ml)	% d'inhibition du liquide intestinal
T négatif	0	1,21 ± 0,07	1,77 ± 0,09	0,00 ^a
Lopéramide	10	0,59 ± 0,08	0,30 ± 0,01	68,75 ± 2,15 ^b
AnSef	100	0,97 ± 0,11	1,01 ± 0,05	35,45 ± 3,61 ^c
AnSef	200	0,62 ± 0,02	0,41 ± 0,01	56,09 ± 2,90 ^b
AnSef	400	0,54 ± 0,07	0,41 ± 0,04	51,88 ± 1,72 ^b

Légende : a, b, c indiquent qu'il y a une différence significative b,b,b indiquent qu'il n'y a pas de différence significative. AnSef : *A. senegalensis* feuille méthanolique: T négatif : témoin négatif

Les propriétés antidiarrhéiques de la fraction méthanolique des feuilles d'*Annona senegalensis* ont été également évaluées à travers plusieurs autres paramètres. Quant à l'évaluation du transit intestinal utilisant du charbon, le Lopéramide (10 mg/kg) était utilisé comme composé standard de référence. Le Lopéramide est connu pour ses effets inhibiteurs sur le transit intestinal probablement à cause de son pouvoir anticholinergique (Izzo *et al.*, 1999). En effet, le lopéramide est un antidiarrhéique analogue structurel des opiacés. Il possède une activité antisécrétoire par augmentation du flux hydro-électrolytique de la lumière intestinale vers le pôle plasmatique de l'entérocyte et réduction du flux inverse. Il provoque un ralentissement du transit colique avec augmentation des contractions segmentaires. Ses effets sont rapides et durables.

La fraction AnsefeMeOH a agit sur toutes les portions de l'intestin. Ainsi ; cette fraction a réduit le mouvement de propulsion intestinal dans le model du traitement à la farine de charbon. Ces resultats montrent que la fraction a inhibé la propulsion de la farine de charbon qui dès lors a augmenté le temps d'absorption de l'eau et des électrolytes probablement par un mécanisme semblable à celui du Lopéramide. La fraction d'*Annona senegalensis* a également démontré une activité relativement bonne sur l'inhibition de la sécrétion du liquide intestinale dans la diarrhée induite par l'huile de ricin. Cette fraction agirait certainement par inhibition de la contraction du muscle intestinal à l'instar de différents types de stimulants tels que la charbamylcholine, le KCL et le BaCL₂ (Yuji *et al.*, 2007), via l'inhibition de la phosphodiesterase III. L'activité antidiarrhéique des plantes medicinales est généralement due à la présence des métabolites secondaires tels que les tanins, les alcaloïdes, les saponines, les flavonoïdes, les stérols et les terpenoïdes (Galvez *et al.*, 1993 ; Otshudi *et al.*, 2000 ; Havagiray *et al.*, 2004). Les fractions méthanoliques des organes des plantes de la famille des Annonacées à l'instar d'AnsefeMeOH sont riches en acétogénines (Alali *et al.*, 1999 ; Kengni *et al.*, 2015). Ceci suggère que les acétogénines, métabolites secondaires spécifiques contribueraient à l'activité antidiarrhéique observée. Aux meilleures de nos connaissances, cette autre activité des acétogénines n'est pas encore élucidée.

III-5-3- Effets *in-vivo* de la fraction méthanolique des feuilles de *A. senegalensis* (AnsefeMeOH) chez les rats infectés par *E. coli* entéropathogène (EPEC)

E. coli est l'agent infectieux le plus incriminé à l'origine des diarrhées infectieuses, dans les pays en voie de développement. Il a été par ailleurs l'agent microbien le plus sensible à la

fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis in-vitro*. Ces deux paramètres ont guidé sa sélection pour le test d'utilité et d'efficacité de la fraction d'intérêt (AnsefeMeOH) vis-à-vis de la diarrhée infectieuse.

Les effets *in-vivo* de la fraction AnsefeMeOH chez les rats infectés par EPEC ont été évalués à travers l'évolution de la charge fécale des rats en EPEC, la variation de leur poids corporel ainsi que l'évolution de quelques paramètres biochimiques et hématologiques, après leur traitement à différentes doses de la fraction.

III-5-3-1- Effets de la fraction AnsefeMeOH sur la charge fécale des rats infectés par EPEC

Des rats infectés par EPEC ont été traités à différentes doses (100, 200 et 400 mg/kg) de la fraction AnsefeMeOH pendant 6 jours d'affilée. L'évolution de la charge fécale en EPEC enregistrée durant le traitement est contenue dans la figure 29.

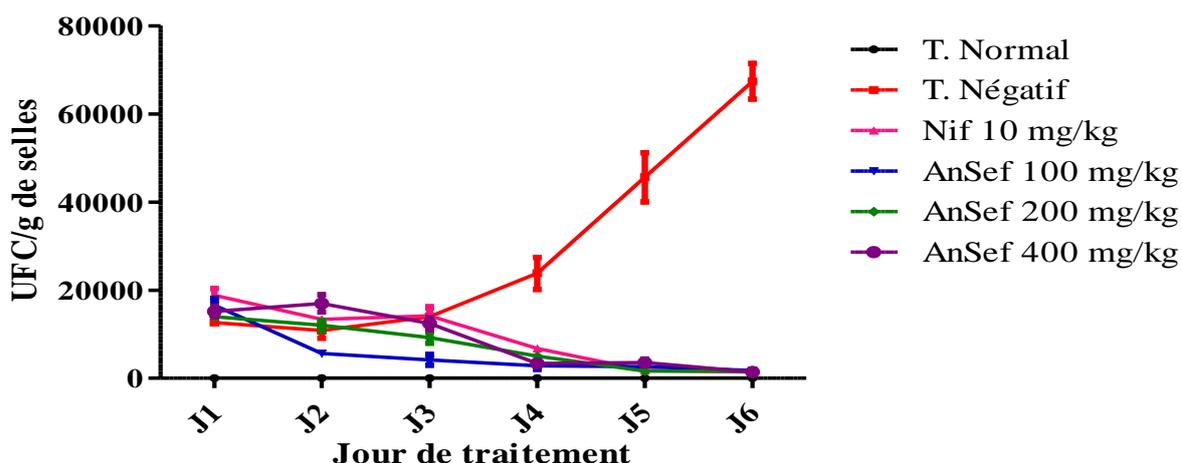


Figure 29: Effets de la fraction AnsefeMeOH sur la charge fécale des rats infectés par EPEC

Légende : T.Normal = Témoin normal, T. Négatif = Témoin négatif (rats infectés par EPEC et ayant reçu uniquement l'huile d'olive), Nif 10 = rats infectés par EPEC et traités au Nifuroxazide à 10 mg/kg (Témoin positif), AnSef. 100, 200 et 400 mg/kg = rats infectés par EPEC et traités à la fraction AnsefeMeOH aux doses respectives de 100, 200 et 400 mg/kg. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm ESM, n=5.

De cette figure 29, il ressort que la fraction AnsefeMeOH a significativement ($p < 0,001$) baissé la charge fécale en EPEC chez les rats traités, comparativement au témoin négatif (rats non traités, ayant reçu le véhicule et la charge bactérienne d'*E. coli*). Dès le premier jour du traitement, un fléchissement des courbes traduisant la baisse de la charge fécale en EPEC est observé chez les animaux traités comparativement au témoin négatif. Cette situation qui

continue jusqu'à la fin du traitement, traduit l'activité *in-vivo* de la fraction AnsefeMeOH à différentes doses (100, 200 et 400 mg/kg) sur EPEC. Les effets du traitement sont nettement visibles à partir de la 4^{ème} journée. L'activité de la fraction à la dose 400 mg/kg est plus proche de celle induite par le Nifuroxazide (antibiotique de référence). En général, cette activité observée est indépendante de la dose de la fraction administrée, notamment à partir du 4^{ème} jour de traitement. La courbe du témoin normal est masquée par celle du témoin positif.

III-5-3-2-Effets de la fraction AnsefeMeOH sur le poids corporel des rats infectés par EPEC

Vingt quatre heures après l'administraion de l'inoculum bactérien chez les rats, ils ont été soumis à un traitement de 6 jours par la fraction AnsefeMeOH à différentes doses (100, 200 et 400 mg/kg). Les variations journalières de poids corporels des animaux ont été enregistrées. La figure 30 présente l'évolution de poids corporels relatifs des rats traités comparativement aux rats des groupes témoins négatif et normal.

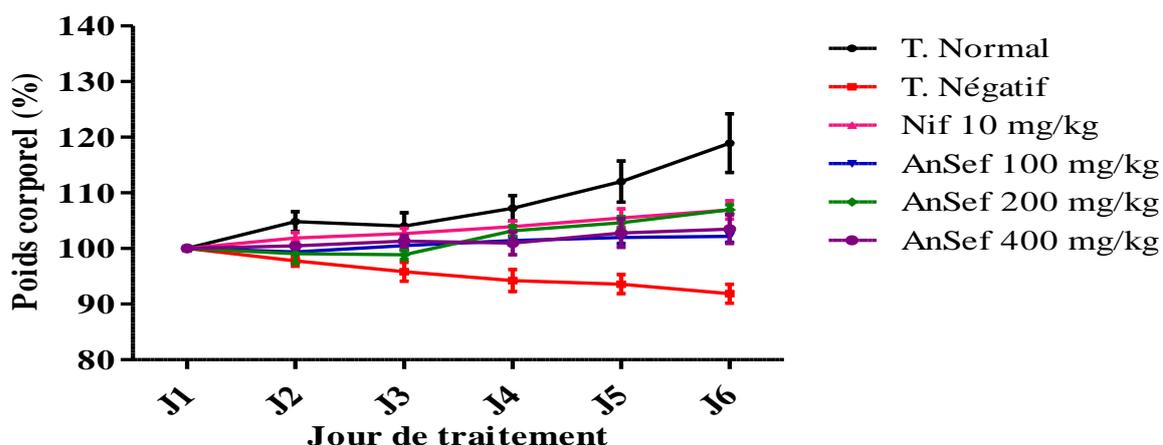


Figure 30 : Effets de la fraction AnsefeMeOH sur le poids corporel des rats infectés par EPEC

Légende : T.Normal = Témoin normal, T. Négatif = Témoin négatif (rats infectés par EPEC et traités avec de l'huile d'olive), Nif. 10 = rats infectés par EPEC et traités au Nifuroxazide à 10mg/kg (Composé standard servant de témoin positif), AnSef. 100, 200 et 400 mg/kg = rats infectés par EPEC et traités à la fraction AnsefeMeOH aux doses respectives de 100, 200 et 400 mg/kg. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm ESM, n=5.

La variation de poids corporels des rats traités augmente durant le traitement, comparativement au témoin négatif. Les animaux du groupe témoin négatif perdent du poids tandis que ceux traités, à l'instar du témoin normal prennent du poids. À partir du 3^{ème} jour du traitement, il n'existe pas de différence significative quant à l'évolution de la variation de poids des rats traités. La fraction AnsefeMeOH à différentes doses inhibe l'effet de EPEC sur le poids

des animaux traités, notamment après 3 jours de traitement. Ceci confirme l'activité anti *E.coli* entéropathogène *in-vivo* de la fraction AnsefeMeOH chez les rats.

III-5-3-3- Effets de la fraction AnsefeMeOH sur quelques paramètres biochimiques des rats infectés par EPEC

➤ Sur le taux hépatique de protéines totales

L'administration de la charge bactérienne aux rats a entraîné une diminution significative ($p < 0,05$) du taux de protéines chez le témoin négatif en comparaison aux animaux sains (Figure 31). Le traitement de ces animaux pendant 6 jours à la fraction AnsefeMeOH a provoqué une augmentation significative de ces protéines totales en comparaison au témoin négatif. Ce taux de protéines chez les animaux traités aux doses de 100 et 400 mg/kg et au Nifluroxazide (10 mg/kg) était proche de celui du témoin normal.

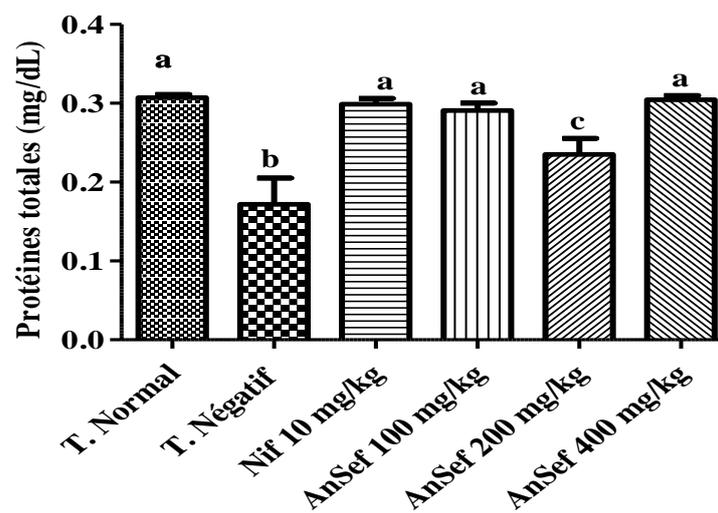


Figure 31 : Effets de la fraction AnsefeMeOH sur le taux hépatique de protéines totales des rats infectés par EPEC

Légende : T. Normal = Témoin normal, T. Négatif = Témoin négatif (rats infectés par EPEC et traités avec de l'huile d'olive), Nif 10 = rats infectés par EPEC et traités au Nifuroxazide à 10 mg/kg (Témoin positif), AnSef. 100, 200 et 400 mg/kg = rats infectés par EPEC et traités à la fraction AnsefeMeOH aux doses respectives de 100, 200 et 400 mg/kg. Chaque barre représente la moyenne du taux de protéines totales dans chaque lot \pm ESM, $n=5$: a, b, c indiquent qu'il y a une différence significative. a,a,a indiquent qu'il n'y a pas de différence significative. AnSef : *A. senegalensis* feuille méthanolique:

➤ Sur le taux des Triglycérides sériques

La figure 32 montre la variation du taux des triglycérides sériques chez les rats en fonction des traitements.

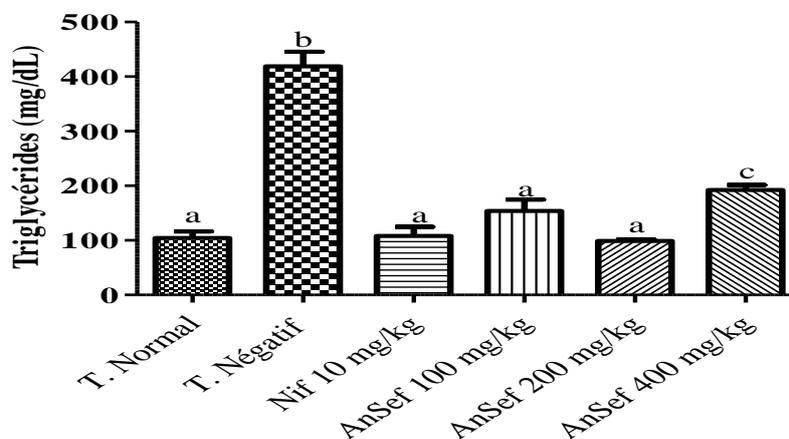


Figure 32 : Effets de la fraction AnsefeMeOH sur le taux de triglycérides sériques des rats infectés par EPEC

Légende : T.Normal = Témoin normal, T. Négatif = Témoin négatif (rats infectés par EPEC et traités avec de l'huile d'olive), Nif 10 = rats infectés par EPEC et traités au Nifuroxazide à 10 mg/kg (Composé standard utilisé pour le témoin positif), AnSef.100, 200 et 400 mg/kg = rats infectés par EPEC et traités à la fraction AnsefeMeOH aux doses respectives de 100, 200 et 400 mg/kg. Chaque barre représente la moyenne du taux de protéines totales dans chaque lot \pm ESM, n = 5: a, b, c indiquent qu'il y a une différence significative. a,a,a,a indiquent qu'il n'y a pas de différence significative. AnSef : *A. senegalensis* feuille méthanolique:

Il ressort de cette figure que l'administration d'une charge bactérienne d'EPEC aux animaux a entraîné une élévation significative du taux des triglycérides sériques en comparaison au témoin normal. Le traitement des animaux à la fraction méthanolique des feuilles d'*Annona senegalensis* à différentes doses de 100, 200 et 400 mg/kg a entraîné, comparativement au lot non traité une baisse significative du taux sérique des triglycérides (Figure 32). La baisse de la concentration des triglycérides sériques observée chez les rats traités est indépendante de la dose de la fraction administrée. Les résultats montrent qu'il n'y a statistiquement aucune différence significative quant à la concentration des triglycérides sériques chez les rats traités à des doses graduées de la fraction AnsefeMeOH. L'administration de la Nifluroxazide à la dose de 10 mg/kg a également provoqué une baisse significative des triglycérides sériques par rapport au témoin négatif. Les différents traitements à la fraction AnsefeMeOH et au composé de référence administrés aux rats ont ramené à la normale le taux de triglycérides sériques.

➤ Sur le taux de créatinine sérique

L'effet de la fraction AnsefeMeOH en traitement curatif sur le taux de créatinine sérique des rats infectés par EPEC est présenté par la figure 33.

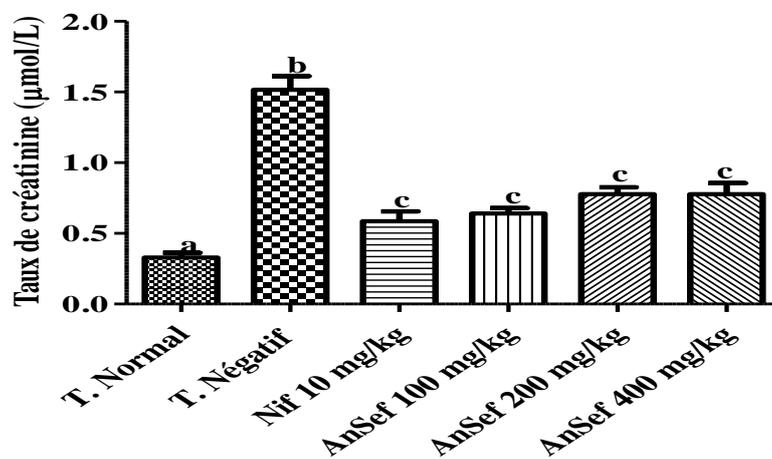


Figure 33 : Effets de la fraction AnsefeMeOH sur le taux de créatinine sérique des rats infectés par EPEC

Légende : T. Normal = Témoin normal, T. Négatif = Témoin négatif (rats infectés par EPEC et traités avec de l'huile d'olive), Nif 10 = rats infectés par EPEC et traités au Nifuroxazide à 10 mg/kg (Témoin positif), AnSef.100, 200 et 400 mg/kg = rats infectés par EPEC et traités à la fraction AnsefeMeOH aux doses respectives de 100, 200 et 400 mg/kg. Chaque barre représente la moyenne du taux de protéines totales dans chaque lot \pm ESM, n = 5: a, b, c indiquent qu'il y a une différence significative. c ; c ; c ; c indiquent qu'il n'y a pas de différence significative. AnSef : *A. senegalensis* feuille méthanolique:

Cette figure montre une augmentation significative ($p < 0,001$) du taux sérique de créatinine chez les animaux infectés par EPEC et non traités (témoin négatif). Après 6 jours de traitement, les animaux traités à la fraction AnsefeMeOH aux doses de 100, 200 et 400 mg/kg ont tous présenté une baisse significative ($p < 0,001$) du taux sérique de créatinine en comparaison aux animaux non traités. Cette baisse est indépendante de la dose de la fraction AnsefeMeOH administrée. Aucune différence significative n'est observée quant à la concentration de la créatinine sérique chez les rats infectés et traités à des doses graduées de la fraction AnsefeMeOH. Le lot témoin positif a également présenté une baisse significative du taux de créatinine sérique après traitement, en comparaison au témoin négatif.

➤ Sur le taux de NO

Le taux sérique d'Oxyde nitrique (NO) 6 jours après infection des animaux par EPEC est résumé par la figure 34.

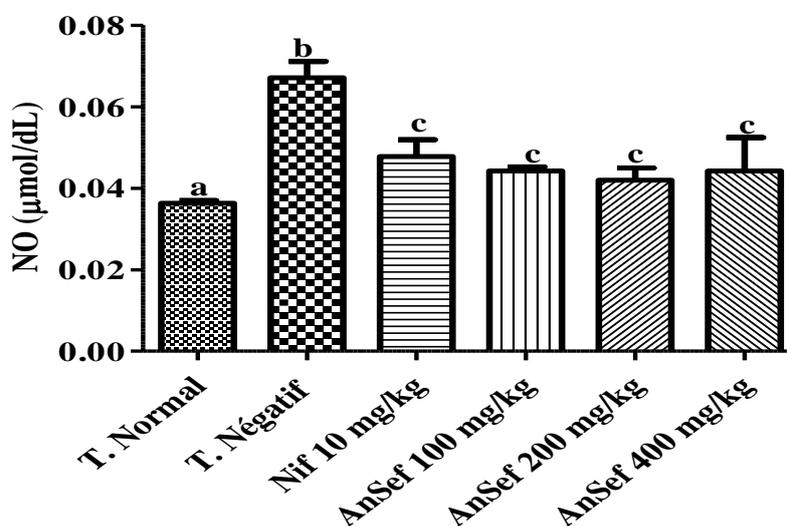


Figure 34 : Effets de la fraction AnsefeMeOH sur le taux de NO sérique des rats infectés par EPEC

Légende : T.Normal = Témoin normal, T. Négatif = Témoin négatif (rats infectés par EPEC et traités avec de l'huile d'olive), Nif 10 = rats infectés par EPEC et traités au Nifuroxazide à 10 mg/kg (Témoin positif), AnSef.100, 200 et 400 mg/kg = rats infectés par EPEC et traités à la fraction AnsefeMeOH aux doses respectives de 100, 200 et 400 mg/kg. Chaque barre représente la moyenne du taux de protéines totales dans chaque lot \pm ESM, n = 5: a, b, c indiquent qu'il y a une différence significative. c ; c ; c ; c indiquent qu'il n'y a pas de différence significative. AnSef : *A. senegalensis* feuille méthanolique:

L'infection des animaux par *E. coli* entéropathogène a entraîné chez le témoin négatif, une hausse significative du taux sérique d'Oxyde Nitrique de 42,16% par rapport aux rats normaux. Chez les animaux infectés et traités pendant 6 jours avec la fraction méthanolique des feuilles d'*Annona senegalensis*, il a été observé une diminution significative ($p < 0,05$) du taux de monoxyde d'azote aux doses de la fraction AnsefeMeOH de 100, 200 et 400 mg/kg en comparaison au contrôle négatif. Une baisse bien que non significative du taux d'oxyde nitrique a également été observée chez les animaux traités à la Niflurosazide à la dose de 10 mg/kg comparé au témoin négatif.

III-5-3-4- Effets de la fraction AnsefeMeOH sur quelques paramètres hématologiques des rats infectés par EPEC

Les paramètres hématologiques incluent les globules rouges, les hémoglobines, les globules blancs, les lymphocytes, les monocytes, les granulocytes et les plaquettes sanguines.

Les effets de la fraction AnsefeMeOH à différentes doses sur certains paramètres hématologiques sont consignés dans le tableau XXI.

Tableau XXI : Effets de la fraction AnsefeMeOH sur quelques paramètres hématologiques

Éléments	T. Normal	T. Négatif	Nif. 10 mg/kg	AnSef 100 mg/kg	AnSef. 200mg/kg	AnSef. 400mg/kg
GR (10⁶/mm³)	7,56 ± 0,97 ^a	5,14±0,51^b	5,98±0,78 ^b	5,80±0,67 ^b	6,36±0,80 ^c	5,98 ± 0,76 ^c
HGB (g/dl)	12,66±0,92 ^a	10,41±0,89^b	11,94±1,1 ^a	13,31±0,79 ^a	12,4±1,49 ^a	10,92±1,94 ^b
GB (10³/mm³)	12,24±1,13 ^a	7,96±0,77^b	10,9±1,12 ^a	10,62±0,58 ^a	11,92±0,89 ^a	11,36±0,86 ^c
LYM (10³/mm³)	6,72±0,60 ^a	12,88±1,30^b	4,62±1,03 ^c	8,82±0,59 ^a	7,04±0,81 ^a	7,72±0,52 ^a
MON (10³/mm³)	0,80±0,09 ^a	3,38±0,36^b	1,37±0,27 ^c	1,30±0,19 ^c	1,9±0,39 ^c	1,82±0,47 ^c
GRA (10³/mm³)	0,94±0,12 ^a	3,94±0,55^b	1,54±0,26 ^c	1,68±0,41 ^c	1,39±0,20 ^c	1,76±0,17 ^c
PLA (10³/mm³)	502±43,2 ^a	216±44,2^b	423±44,7 ^a	370±61,2 ^c	387±63,5 ^c	397±46,7 ^c

Légende : T.Normal = Témoin normal, T. Négatif = Témoin négatif (rats infectés par EPEC et traités avec de l'huile d'olive), Nif 10 = rats infectés par EPEC et traités au Nifuroxazide à 10 mg/kg (Composé standard servant de témoin positif), AnSef. 100, 200 et 400 mg/kg = rats infectés par EPEC et traités à la fraction AnsefeMeOH aux doses respectives de 100, 200 et 400 mg/kg. GR= globules rouges ou hématies, HGB= Hémoglobine, GB= Globules blancs ou Leucocytes, LYM= Lymphocytes, MON= Monocytes, GRA= Granulocytes, PLA= Plaquettes sanguines ou thrombocytes. Chaque barre représente la moyenne du taux de protéines totales dans chaque lot ± ESM, n = 5: a, b, c indiquent qu'il y a une différence significative. a,a,a,a ; b,b ; et c ; c ; c indiquent qu'il n'y a pas de différence significative. AnSef : *A. senegalensis* feuille méthanolique:

Il ressort de ce tableau que l'infection des animaux par EPEC a entraîné chez le témoin négatif, une baisse significative du nombre d'érythrocytes (GR), du taux d'hémoglobine (HGB), de leucocytes (GB) et de plaquettes sanguines (PLA) respectivement de 31,87% ; 17,77% ; 39,08% et 63,15% en comparaison au témoin normal. Une augmentation significative du taux de lymphocytes (LYM) ($p < 0,05$), de monocytes (MON) ($p < 0,001$), et de granulocytes (GRA) a été enregistrée chez le témoin négatif en comparaison au témoin normal. L'administration des différentes doses de la fraction AnsefeMeOH et du Nifuroxazide en prise unique quotidienne pendant 6 jours a entraîné chez les animaux infectés, une augmentation du taux de GR, de l'HGB, des plaquettes sanguines comparativement au témoin négatif. Chez ces animaux traités, une réduction significative du taux des LYM, des MON, et des GRA a été observée comparativement au témoin négatif. Chez le témoin positif, il a été noté une diminution non significative des taux de GB, de LYM, de MON, et de GRA en comparaison au témoin négatif. Globalement, la fraction à la dose 400 mg/kg permet de conserver une valeur des paramètres étudiés proche de la valeur affichée par le standard (Nifuroxazide).

Les résultats de l'analyse hématologique montrent une augmentation significative du nombre des lymphocytes, monocytes et des granulocytes chez les rats non traités, traduisant une infection bactérienne. EPEC en se proliférant a exercé une immunostimulation des macrophages. Une diminution du nombre des globules rouges, des hémoglobines, des globules blancs et des plaquettes sanguines chez le témoin négatif comparativement au témoin normal. En effet, le premier événement de l'infection est vasculosanguin (**Read, 1995**). La variation de ces paramètres atteste de la pathogénécité d'*E.coli* administré aux rats. Le résultat de l'activité de la fraction AnsefeMeOH *in-vivo* chez les rats infectés par EPEC reflète celui enregistré pour l'activité antimicrobienne *in-vitro* ainsi que celui obtenu pour l'étude du profil toxicologique aigu. Sur un modèle expérimental utilisant des rats infectés par EPEC, leur traitement par l'administration orale de AnsefeMeOH à différentes doses (100, 200 et 400 mg/kg) a permis d'inhiber *in-vivo*, la prolifération des bactéries pathogènes, sans aucun signe de toxicité. Cette inhibition est caractérisée par une diminution significative des colonies d'EPEC dans les selles des rats traités ainsi que la protection des microvillosités intestinales contre les agressions par EPEC. Les résultats confirment l'hypothèse selon laquelle les effets antidiarrhéiques de cette fraction végétale sont en partie dus à leur activité antibactérienne.

La perte de poids enregistrée chez les rats infectés par EPEC et non traités comparativement au témoin normal témoigne de l'infection induite par EPEC. L'infection aurait entraîné une perte d'appétit et un trouble métabolique important chez les rats, entraînant la perte de poids et un retard de la croissance (**Alireza et al., 2008**).

L'inoculation par gavage d'une charge bactérienne d'EPEC aux rats a entraîné une augmentation significative du taux sérique de créatinine et de triglycérides ainsi qu'une baisse significative du taux sérique de protéines totales en comparaison au groupe contrôle normal. La baisse de la protéinémie totale observée après infection pourrait être la résultante d'une baisse de la synthèse des protéines, d'une augmentation de leur catabolisme et/ou d'une protéinurie, signe clinique d'une néphropathie associée aux complications de l'infection bactérienne gastrointestinale engendrant un déséquilibre électrolytique (**Balamurugan et al., 2014**). Quant à la hausse du taux de créatinine sérique, elle serait la résultante d'un dysfonctionnement rénal dû à l'infection caractérisée par un défaut d'excrétion des déchets de l'organisme (**Claire, 2008**). En effet, la créatinine provient de la dégradation musculaire de la créatine. La hausse significative du taux de triglycérides sériques chez le témoin négatif serait probablement due à l'augmentation de la mobilisation des acides gras à partir du tissu adipeux (**Watcho et al., 2012**). *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* Sp et d'autres entéropathogènes opportunistes provoquent

une augmentation des triglycérides sériques chez les sujets qu'ils infectent (**Keusch et Farthing, 1990**). Il a été signalé que *E. coli* provoque le dépôt de gouttelettes fines de matière grasse dans le cytoplasme des hépatocytes (**Makoto, 1980**). Cela explique pourquoi les rats infectés et traités avec la fraction AnsefeMeOH ont des taux normaux de triglycérides sanguins comparativement à ceux des rats traités avec la substance classique (Nifuroxazide).

L'administration orale de la fraction méthanolique des feuilles d'*Annona senegalensis* à différentes doses pendant 6 jours d'affilée, a induit une baisse significative de la créatininémie et de la triglycéridémie, une augmentation de la protéinémie et une protection structurale du rein. La fraction AnsefeMeOH aurait donc favorisé la lipolyse au niveau des tissus adipeux et maintenu l'intégrité de parenchyme rénal. Cette fraction posséderait par conséquent, des propriétés néphroprotectrices. Ces propriétés seraient probablement dues aux métabolites secondaires (alcaloïdes, flavonoïdes, terpènes et phénols) présents dans la fraction, dont les effets hépatoprotecteurs et néphroprotecteurs ont été démontrés (**Iwalokun et al., 2006**). Les acétogénines majoritairement présentes dans la fraction méthanolique agiraient en synergie avec les autres métabolites secondaires pour exprimer les activités observées.

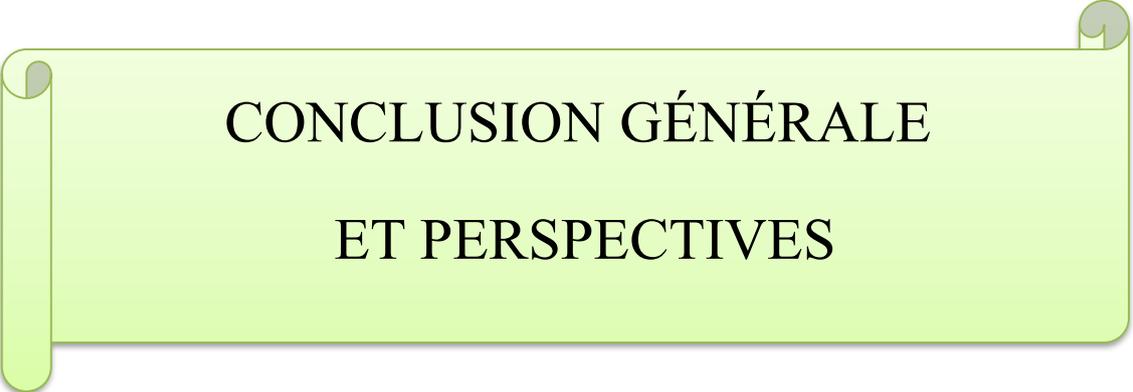
Les rats infectés par EPEC et non traités (contrôle négatif) ont présenté une importante production sanguine du médiateur monoxyde d'azote (NO) durant l'infection à *E. coli* entéropathogène par rapport aux rats sains. En effet, le NO est une molécule signalitique qui régule plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques dans l'organisme des animaux. Ces processus font intervenir la pression sanguine et circulatoire, la fonction plaquettaire, la défense immunitaire et la neurotransmission dans le système nerveux central et périphérique (**Korhonen et al., 2005**). La synthèse du NO est catalysée par trois enzymes NOS : le NOS neuronal (nNOS, NOS I) exprimé dans les neurones cérébrales et périphériques ; le NOS endothélial (eNOS, NOS III) principalement présent dans les cellules endothéliales (**Förstermann et Sessa, 2012**). Le eNOS et le nNOS sont les isoformes constitutifs. La troisième isoforme de la famille des NOS est le NOS inductible (iNOS, NOS II). Le taux élevé de NO chez les rats témoins diarrhéiques serait dû aux facteurs proinflammatoires impliqués dans l'infection tels que les lipopolysaccharides et les cytokines. En effet, l'exposition aux produits microbiens tels que les lipopolysaccharides (LPS) ou les cytokines proinflammatoires tels que l'interleukine 1 (IL-1 β) les *tumoral necrosis factors* (TNF- α) et les interféron- γ (IFN- γ) induisent l'expression des gènes iNOS dans plusieurs tissus et cellules inflammatoires favorisant l'augmentation de la synthèse du NO (**Korhonen et al., 2005**). Après 6 jours de traitement à la fraction AnsefeMeOH, le taux sérique de NO a significativement baissé.

Parceque le nNOS et le eNOS étant activés par le calcium intracellulaire, la fraction aurait bloqué les canaux calciques ou inhibé la production de l'inositol triphosphate (IP3) entraînant la baisse du taux sérique du NO comme observé.

Les paramètres hématologiques ont révélé une baisse du nombre de globules rouges, d'hémoglobine et une augmentation du nombre de globules blancs, monocytes, lymphocytes et granulocytes chez les animaux infectés par EPEC. *E. coli* entéropathogène induit l'apoptose des macrophages; ces derniers libèrent alors les IL-1 β qui vont activer le recrutement des neutrophiles et des monocytes à travers l'épithélium intestinal, ce qui aurait conduit à une augmentation des taux de monocytes et de granulocytes dans le sang (**Tarr *et al.*, 2009**). Le traitement des animaux a réparé le désordre sanguin engendré par le pathogène témoignant des effets stimulateurs de l'érythropoïèse et les effets immunomodulateurs de la fraction AnsefeMeOH.

Les animaux ayant reçu un traitement anti infectieux connaissent une augmentation du taux de protéines totales dans leur sang. Les infections ont généralement une influence négative sur la synthèse protéique (**Ross *et al.*, 2001**). L'augmentation du taux de protéines sériques chez les rats traités comparativement au témoin négatif permet de comprendre que la fraction d'AnsefeMeOH a contribué à l'empêchement de l'infection. Parmi les protéines synthétisées se retrouvent celles ayant des activités antibactériennes. **Rubhana *et al.* (2006)** ont signalé que certaines protéines telles que le peptide CAP-18 étaient capables de neutraliser les bactéries lors du traitement de la diarrhée. Ces protéines par leurs activités ont contribué à l'élimination des EPEC au niveau de la muqueuse intestinale.

Les résultats ci-dessus mettent en exergue la capacité de la fraction AnsefeMeOH à inhiber *in-vivo* la prolifération d'EPEC chez les rats. Cet agent infectieux responsable de la diarrhée chez les humains peut être neutralisé par AnsefeMeOH.



CONCLUSION GÉNÉRALE
ET PERSPECTIVES

La présente étude avait pour objectif général de contribuer à la lutte contre les diarrhées à l'aide des plantes médicinales de la famille des Annonacées. De cette étude il en ressort que :

Relativement à l'étude phytochimique, les plantes étudiées renferment une grande variété des métabolites secondaires potentiellement actifs et inégalement repartis dans les différents organes des plantes.

Quants aux propriétés antimicrobiennes, les extraits et fractions des 3 plantes et encore plus ceux d'*A. senegalensis* sont dotés d'importantes propriétés antimicrobiennes y compris contre les microbes responsables de la diarrhée chez l'homme.

Par ailleurs, les extraits et fractions d'*A. senegalensis* ont une activité antioxydante significative et variée vis-à-vis du DPPH, du NO et du Fe²⁺.

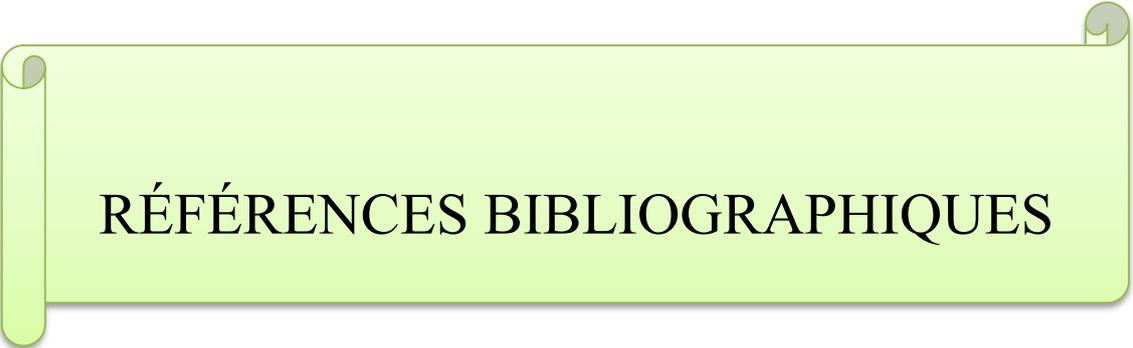
S'agissant de la toxicité, la fraction AnsefeMeOH administrée par voie orale à la dose limite de 2000mg/kg est presque sans danger pour les souris.

La fraction AnsefeMeoH au-delà de ses propriétés antimicrobienne et anti oxydante, possède non seulement une propriété anti diarrhéique contre la diarrhéea induite par l'huile de ricin mais elle a également une activité significative vis-à-vis de la diarrhée infectieuse induite par EPEC.

En définitive, la partition permet une optimisation de l'activité anti diarrhéique de la fraction méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* (AnsefeMeoH) qui apparaît comme un candidat potentiel pouvant servir comme socle pour la formulation d'un médicament traditionnel amélioré (MTA) efficace contre la diarrhée. Pour cette formulation, on pourra associer les extraits bruts éthanoliques des feuilles et brindilles d'*Annona senegalensis* (AnsefeEtOH et AnsebrEtOH) qui ont montré une activité antioxydante significative vis-à-vis des 3 radicaux tests ou les extraits/fractions des 2 autres plantes étudiées.

Ce travail constituant le socle pour la formulation d'un médicament traditionnel amélioré à la fois anti-diarrhéique et anti-stress, nous nous proposons dans un futur proche :

- De réaliser une étude du profil toxicologique, subaigu et chronique de la fraction et extraits d'intérêt ;
- D'évaluer l'activité anti oxydante chez les rats;
- De réaliser la formulation d'un médicament traditionnel amélioré à double usage, préventif et curatif contre la diarrhée et le stress oxydatif à partir des extraits et fractions de 3 plantes étudiées.



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achoundong. (1984).** Etude écologique et floristique de la végétation des collines de Yaoundé au-dessus de 1000 m. “Thèse de Doctorat 3^{ème} cycle de spécialité Sciences Biologiques“. Université de Yaoundé p 11-32.
- Achterrath-Tuckerman U., Kunde R., Flaskamp E., Isaac O. and Thiemer. (1980).** Pharmacological investigations with compounds of chamomile. V. Investigations on the spasmolytic effect of compounds of chamomile and Kamillosan^R on isolated guinea pig ileum. *Planta Medica* 39: 38-50.
- Adjanohoun E. et Aké Assi L. (1979).** Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d’Ivoire, Centre National de Floristique, Abidjan, 359 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., Sofowor A., Tamze V. and 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, P 194-201.
- Adzu B., Abubakar M.S., Izebe K.S., Akumka D.D. and Gamaniel K.S. (2005).** Effect of *Annona senegalensis* rootbark extracts on *Naja nigricotlis nigricotlis* venom in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 96 (3):507-513.
- Aftim A., Zeina R. and Yester. (1984).** Solar disinfection of drinking water and oral rehydration solutions. Guidelines for household application in developing countries.
- Agarwal A., Aponte-Mellado A., Premkumar B. J., Shaman A. and Gupta S. (2012).** The effects of oxidative stress on female reproduction. In *Reproductive Biology Endocrinology*, pages 10-49.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). (2003).** Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteur de Shiga-toxines (STEC). 220p.
- Ajboye T. O., Yakubu M. T., Salau A. K., Oladiji A.T., Akanji M. A. and Okogun J. I. (2010).** Antioxidant and drug detoxification potential of aqueous extract of *Annona senegalensis* leaves in carbon tetrachloride induced hepatocellular damage. *Pharmaceutical Biology*, 48 (12): 1361- 1370.

- Akah P. A., Orisakwe O.E, Gamaniel K. S. and Shittu A. (1998).** Evaluation of Nigerian traditional medicines II: Effects of some Nigerian folk remedies on peptic ulcer. *Journal of Ethnopharmacology* 62: 123-127.
- Aké Assi L. et Guindo S. (1991).** Plantes utilisées dans la médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest. Edition Roche, Basel, Switzerland, 147 p.
- Akendengue B., Ngou-Milama E., Roblot F., Laurens A., Hocquemiller R., Grellier P. et Frappier F. (2005).** Activité antiplasmodiale d'Annonaceae du Gabon. *Ann. Univ. M. NGOUABI.* 6 (1) : 190-196.
- Akinyemi K. O., Oladapo O., Okwara C. E., Ibe C. C. and Fasure K. A. (2005).** Screening of crude extracts of six medicinal plants used in South-West Nigerian unorthodox medicine for antimethicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. *BMC Complementary and Alternative*
- Akoua Koffi C., Guessennnd N., Gbonon V., Faye-Kette A. Y. H. and Dosso M. (2004).** Methicillin resistant of *staphylococcus aureus* in Abidjan (1998-2001): A new hospital problem. *Medicines et maladies infectieuses* 34 (3) : 132-136.
- Alain S.A. AMBE., Djakalia OUATTARA., Marie-Solange TIEBRE., Bi T.A. VROH., Guédé Noël ZIRIHL., Kouakou E. N'GUESSAN. (2015).** Diversité des plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel de la diarrhée sur les marchés d'Abidjan (Côte d'Ivoire). *Journal of Animal & Plant Sciences* 26(2): 4081-4096.
- Alali F.Q., Liu X.X. and McLaughlin J.L. (1999).** Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Journal of Natural Products*,62: 504-540.
- Alizeza H.J., Ian S. D., Chris G. W. and V. (2008).** Acute renal failure secondary to oxalosis in a recipient of a simultaneous kidney-pancreas transplant: was mycophenolate the cause? *Nephrology Dialysis Transplantation* 23: 2409-2411.
- Alonso R., Fernandez-Aranguiz A., Colom K., Herrera A. and Cisterna R. (2000).** Profile of bacterial isolates and antimicrobial susceptibility: multicenter study using a one-day cut-off. *Revista Espanola de Quimioterapia* 13: 384-393.
- Ambrose N. S., Johnson M, Burdon D. W. and keighly M. R. B. (1995).** The influence of single dose intravenous antibiotics on faecal flora and emergence of *Clostridium difficile*. *Journal Antimicrobial chemotherapy* 15: 319-326.
- Ammmon H.V. and Soergel K.H. (1985).** *Diarrhoea in Berk J. E.* (eds), Bockus Gastroenterology, Philadelphia, Saunders, 125-141.

- Amvam Zollo P.H., Gut J. and Rosenthal P. J. (2009).** Antiplasmodial activity of extracts from seven medicinal plants used in malaria treatment in Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*, 123: 483-488.
- Anderson C.M., Hallberg A. and Hogberg T. (1996).** Advances in the development of pharmaceutical antioxidants. *Advance Drug Research*, 28: 65-180.
- Anderson J. B. (2005).** *Evolution of antifungal-drug resistance: Mechanisms and pathogen fitness. Nat rev. Microb* 3(7):547–56.
- Anibal de J.S., Denis K.B.C., Amabile C., PO R. H., Samuel K. and Iruka N.O. (2001).** *Antimicrobial Resitance in Developing Countries*. Benbachir, 347: 177-198.
- Anne J. and Geboes. (2002).** Infectious colitis. *Acta endoscopica* 32: 2.
- Anofel B. (2004).** Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicale. Laboratoire de Parasitologie –Mycologie, CHU 4, rue Lanrey, Angers –France.
- Anonyme. (2001).** Diagnostic actuel de *Escherichia coli* producteur de vérotoxine. *Epidémiologie et Maladies Infectieuses*. Bulletin 2, 27-30.
- Aubel D., Darfeuille-Michaud A., Forestier C. et Joly B.(1989).** Propriétés d’adhésion des colibacilles responsables de diarrhées. *Revue francophone des laboratoires*, 195 : 51-57.
- Aubert F. et Guittard P. (1995).** L’essentiel Médical de poche, 2^{ème} éd. Edition Marketing/Ellipses; 488-494, 796-797.
- Awouters F., Niemegeers CJE., Lenaerts FM. and Janseen PAJ. (1978).** Delay of castor oil diarrhea in rats; anew way to evaluate inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Journal of pharmacology*;30: 41-45.
- Ayyagari A., Agarwal J. and Garg A. (2003).** Antibiotic associated diarrhoea: Infectious causes. *Indian Journal of Medical Microbiology* 21: 6-11.
- Aziz B., Kozeta V. and Islam K. (2010).** Antibacterial Activity of Coumarin Derivatives Synthesized from Hydroxy-4-2H-(1)-Benzopyran-2-one. The Comparison with Standard Drug. *Journal of Internet Environmental Application & Science* 5(2): 247-252.
- Baba Moussa F., Akpagana K. et Bouchet P. (1998).** Comparaison de l’activité antifongique des feuilles et écorces de tronc de *Pteleopsissuberosa* G. Don (Combretaceae). *Acta botanica gallica*, 145 (3), 223-288.

- Bacq-Calberg C.M., Coyotte J., Hoet P. et Nguvem-Disteche M. (1999).** Microbiologie, Boeck et Larcier. Bruxelles ; 338 p.
- Balamurugan K., Nishanthini A. and Molan R., (2014).** Antidiarrheal and antihyperlipidaemic activity of ethanol extract of *Melastoma malabathricum* Linn. Leaf in alloxan induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (1): 442-448.
- Bamouni B.A. (1989).** Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques des diarrhées aiguës de nourrissons à l'hôpital de Bobo-Dioulasso (Bourkina Faso). Université de Ouagadougou: *Thèse de Doctorat*.
- Baraduc R., Darfeuille-Michaud A., Forestier C., Jallat C., Joly B. et Livrelli V. (2000).** *Escherichia coli* et autres *Escherichia*, *Shigella*. *Précis de Bactériologie Clinique*, 59: 1115-1129.
- Barlett J.G. (2002).** Antibiotic associated diarrhoea. *The New England Journal of Medicine* 346: 334-339.
- Basanagouda M., Shivashankar K., Kulkarni M. V., Rasal Vijaykumar P., Patel H., Mutha S. and Mohite A.A. (2010).** Synthesis and antimicrobial studies on novel sulfonamides containing 4-azidomethyl coumarin. *European journal of medicinal chemistry* 45: 1151-1157.
- Bassene E. (2012).** *Initiation à la recherche sur les substances naturelles*. Presse Universitaire de Dakar : 147 p.
- Bassene E., Mahamat B., Lo M., Boye C.S. and Faye B. (1995).** Comparaison de l'activité antibactérienne de trois Combretaceae : *C. micranthum*, *Guiera senegalensis* et *Terminalia avicennioides*. *Fitoterapia*, 66(1), 86-87.
- Batool F, Sabir MS, Rocha JB, Shah AS, Saify SZ. and Ahmed DS. (2010).** Evaluation of antioxidant and free radical scavenging activities of fruit extract from *Zanthoxylum alatum*: A commonly used spice from Pakistan. *Pak.J.Bot.* 42: 4299-4311.
- Berche P. (2003).** Les bactéries des diarrhées aiguës. Faculté de Médecine Necker- Enfants malades. In *Bactériologie Systématique (DCEMI)*, pages 31-47.
- Bermejo A., Figadere B., Zafra-Polo M.C., Barrachina I., Estornell E. and Cortes D. (2005).** Acetogenins from Annonaceae: Recent Progress in Isolation, Synthesis and Mechanisms of Action. *Natural Products Reports*, 22: 269-303.
- Betti J.L. (2004).** An ethnobotanical study of medicinal plants among the Baka Pygmies in the Dja Biosphere Reserve, Cameroon. *African Study Monographs*. 25(1): 1-27.

- Bhan M.K., khoshoo V., Sommerfelt H., Raj P., Sazawal S. and Srivastava R. (1989).** Enteroaggregative *Escherichia coli* and *Salmonella* associated with nondysenteric persistent diarrhea. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 8: 499-502.
- Blacklow N. R. and Greenberg H. B. (1991).** Viral gastroenteritis. *The New England Journal of Medicine* 325: 252-264.
- Blattner FR., Plunkett G. 3rd, Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davies N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B. and Shao Y.(1997).** The complete genome sequence of *Escheirichiacoli* K-12. *Science*, 277(5331): 1453-1462.
- Bopp C.A., Brenner F.W., Fields P.I., Wells J.G. and Strockbine. (2003).** *Escherichia, Shigella* and *Salmonella*. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H., eds. *Manual of clinical microbiology*, (8th ed). ASM Press, Washington, DC, USA, 654p.
- Bossokpi I.P.L. (2003).** Etude des activites biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae). *Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Université de Bamako*, Mali, 123p
- 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. N° 004 Mars (1999) 38 p.*
- Bowie M.D., Hill I.D. and Mann M.D. (1988).** Response of severe infantile diarrhea to soya-based feeds. *South African Medicinal Journal* 73: 343-345.
- Boyom F.F, Tsouh F.P.V., Tchokouaha Y.L.R, Ngoutane M.A, Madiesse K.A.E, Mbacham F.W., Tsamo E., Amvam Z.PH., Jiri G. and Rosenthal P.J. (2011).** Potent antiplasmodial extracts from Cameroonian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 134:717-724.
- Boyom F.F., Madiesse K.E., Tepongning R., Mbacham F.W., Tsamo E., Amvam Z. P.H., Gut J. and Rosenthal P.J. (2009).** Antiplasmodial Activity of Extracts from Seven Medicinal Plants Used in Malaria Treatment in Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*, 123: 483-488.
- Brenner D.J. (1984).** Facultatively anaerobic Gram-negative rods. Family I: *Enterobacteriaceae*. In: Krieg N.R., Holt J.G. (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 1. Williams & Wilkins : Baltimore, 408-420.

- Bruneton. (1999).** Minimal inhibitory concentrations of Sertaconazole, Miconazole and Clotrimazole against 14 strains of *Scopulariopsis brevicaulis* isolated from onychomycoses. *Journal of Medical Mycology*, 4: 225-228.
- Bulkley G. B. (1987).** Free radical-mediated reperfusion injury: A selective review. *Br. J. Cancer*, 55: 66–73.
- Burkill H.M. (1985).** *The Useful Plants of West Tropical Africa*, 2nd Ed., Royal Botanic Gardens Kew, London, UK. 98-135.
- Caeiro J. P. and Dupont H. L. (1998).** Management of traveller's diarrhoea. *Drugs* 56: 73-80.
- Carocho M., and Ferreira I. C. F. R. (2013).** A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology : Ind. Biol. Res. Ass*, 51: 15–25.
- Carol SA. (1995).** Acute, Subchronic and Chronic Toxicology. In *CRC Handbook of Toxicology*; Michael, J.D., Mannfred, A.H., Eds.; CRC Press Inc.: Boca Raton, FL, USA, 51-104.
- Carrillo-Munoz A.J., Giusiano G., Ezkurra P. A. and Quindós G. (2006).** Review antifungal agents : Mode of action in yeast cells, *Rev. Esp.Quimioter.*19:130-139.
- Centre Hospitalier Universitaire Pitié-Salpêtrière (CHU-PS). (2003).** Bactériologie DCEM1. Université Paris-VI Pierre et Marie Curie, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière. Service de Bactériologie, 122 p.
- Centre National de Référence (CNR). (2005).** CNR des *Escherichia coli* et *Shigella* : Les *Escherichia coli* pathogènes. Portail Institut Pasteur. 3p.
- Centres for Disease Control and Prevention (CDC). (2004).** Emergency, Preparedness and Response: Tsunami.
- Chassany O., Michaux A. and Bergmann J.F. (2000).** Drug induced diarrhea. *Drug Safty* 22(1): 53-72.
- Chauhan A. and Chauhan V. (2006).** Oxidative stress in autism. *Pathophys* : 13(3), 171–81.
- Chen H.D. and Frankel G.(2005).** Enteropathogenic *Escherichia coli*: untraveling pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 83-98.

- Chiu M. Guarner C., Peralta C., Lovet T., Gomez G., Soriano G. and Balenzo J. (2003).** Intestinal mucosa damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 15(2): 145-150.
- Cholera. (2004).** Wkly Epidemiol Rec 2005, 80 : 261-268.
- Christian M. and Marc C. (1993).** Diarrhées à Shigelles, à colibacilles entéroinvasifs et entérohémorragiques. *Diarrhées aiguës infectieuses*. Dion : Paris , 82p.
- Claire C-P. (2008).** La créatine sur medine. *Antenne médicale de prevention du dopage du Languedoc Roussillon*. [Http://www.chu-montpellier.fr/fr/site_dopage_index.html](http://www.chu-montpellier.fr/fr/site_dopage_index.html).
- Clarck B. and Mckendrich M. (2004).** A review of viral gastroenteritis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 17: 461-469.
- Clarke S.C. (2001).** Diarrhoeagenic *Escherichia coli* - an emerging problem? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 41: 93-98.
- Clarke S.C., Haigh R.D., Freestone P.P.E. and Williams P.H.(2003).** Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3): 365-378.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. (CLSI). (2012).** Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility. Approved Standard, 19th edition M07-A9.
- Cooke E.M. (1985).** *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Hygiene Cambridge*, 95: 523-530.
- Cooke M. S., Evans M. D., Dizdaroglu M. and Lunec J. (2003).** Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Am. Soci. Exp. Biol*, 17(10):195–214.
- Côte d’Ivoire, Centre National de Floristique, Abidjan, 359 p.
- Cowan MM.(1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12:564 – 582.
- Cui H., Kong Y., and Zhang H. (2012).** Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Jour. Sign. Transd*: 13p.
- Cuvelier M.-E. et Martel P. (2002).** *Additifs antioxygènes. Dans : Multon J.-L. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires*. Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris, 207- 231.

- Darfeuille-Michaud A., Aubel D., Chauvière G., Rich C., Bourges A., Servin A. and Joly B. (1990).** Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Infection and Immunity*, 58: 893-902.
- Das S., Das D. K. (2007).** Resveratrol : A therapeutic promise for cardiovascular diseases. *Recent Patents cardiovascular drug discovery* 2 (2). 133-138.
- De Lima J.P.S., Pinheira M.L.B., Santos A.M.G., Peeriu J.L.S., Santos D.M.F., Barison A., Silva Jardim I. and Costa E.V. (2012).** *In vitro* antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Revista Virtual de Química*, 4 (6): 692-702.
- Debasis Panda R.C., Patra S.N. and Swarup D. (2009).** Oxidative stress indices in gastroenteritis in dogs with canine parvoviral infection. *Research in Veterinary Science* 86 (1): 36-42.
- Delmée M. (2004).** Les microorganismes impliqués dans les infections du tractus digestif. Dans *Microbiologie Médicale*, Université Catholique de Louvain, Faculté de Médecine. 176p.
- Dethlefsen L., Huse S., Sogin M.L. and Relman D.A. (2008).** The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*, 6: 280p.
- Devasagayam T. P, Tilak J. C., Bloor K. K., Sane K. S., Ghaskadbi S. S., and Lele R. D. (2004).** Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Jour. Ass. Phy. Ind*, 52:794–804.
- Di Carlo G., Autore G., Izzo A.A., Maibline P., Mascolo N., Viola P., Diurno M. V. and Capasso F. (1993).** Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: Structure activity attention relationship. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 45: 1054-1059.
- Dickson R.A., Houghton P.J. Hylands P.J. and Gibbons S. (2006).** Antimicrobial, resistance-modifying effects, antioxidant and free radical scavenging activities of *Mezozoneuron benthamianum* Bail., *Securinega virosa* Roxb. & Wild. and *Microglossa pyrifolia*. *Phytotherapy research*, 20:41-45.
- Djabou N. (2006).** *Sambucus nigra L.*, une plante de la pharmacopée traditionnelle nord africaine. *Thèse de Magistère en Chimie*. Université d'Abou Bekr Belkaid-Tlemcen ; 38-50.

- Djaman A. J., Dje M. K., et Guédé Guina F. (1998).** Evaluation d'une action anti-plasmodiale de *Olax subscorpioidea* sur les souches chloroquino-résistantes de *Plasmodium falciparum*. *Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines* (11-12) pp. 177-182.
- Dosso. M., M. Coulibaly et A. Kadio. (1998).** Place des diarrhées bactériennes dans les pays en développement. Manuscrit n°PF02. Journée en Hommage au professeur Dodin, accepté le 07 décembre 1998.
- Dupeyron C. (1997).** Les diarrhées aiguës bactériennes : causes et mécanismes. *Développement et santé*, n° 128.
- Durand G., Polidori A et Pucci B. (2003).** La vectorisation de pièges à radicaux libres : nouvelle stratégie thérapeutique. *Molécules et Matériaux d'Intérêt Médical* : 1-4.
- Dybing E., Doe J., Groten J., Kleiner J. and O'Brien J. (2002).** Hazard characterization of chemicals in food and diet: dose response, mechanism and extrapolation issues. *Food Chemistry and Toxicology*, 42: 237-282.
- Dzoyem J.P. (2007).** Etude de l'activité antifongique de deux plantes médicinales camerounaises: *Diospyros crassa* iflora Kivern et *Diospyros canaliculata* De Wildman (Ebenacees). *Thèse de Doctorat PhD de biochimie, Université de Yaoundé I, Cameroun*, 167p.
- Eaton DL. and Klaassen CD. (1996).** Principles of toxicology. In Casarett and Doull's Toxicology: *The Basic Science of Poisons*, 5th ed; Klaassen, C.D, Ed; McGraw-Hill: New York, NY, USA, 13.
- Edberg S.C., Rice E.W., Karlin R.J. and Allen M.J. (2000).** *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 106-116.
- Eparvier V., Nguyen V.H., Thoison O., Martin M.T., Sévenet T. and Guerille F. (2006).** Cytotoxic Monotetrahydrofuran. Acetogenins from *Disepalum plagioneurum*. *Journal of Natural Products*, 69: 1289-1294.
- Erdemoglu N., Turan N.N., Cakici I., Sener B. and Aydm A. (2006).** Antioxidant activities of some lamiaceae plants extracts. *Phytotherapy research*, 20:9-13.
- Eyana K.A. (2007).** Les Anacardiaceae du Togo : Etudes botaniques, Écologiques et propriétés antifongiques. *Thèse de Doctorat en Pharmacie de l'Université de Reims Champagne Ardenne et de l'Université de Lomé*, 198p.

- Ezekwesili C., Obiora K. and Ugwu O. (2004).** Evaluation of anti-diarrhoea property of crude aqueous extract of *Occimum gratissimum* L. (Libiatae) in rats. *Biokemistri* 16: 122-131.
- Fagundes-Neto U., and Scaletsky C. (2000).** The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. *Sao paulo Med J.* 2000 ; 118(1) : 21-29.
- Fairouz M., Amar Z., Narimane S., Ahmed T. and Salah R. (2010).** Flavonoid constituents from Algerian *Launaea resedifolia* (O.K) and their antimicrobial activity. *Records of Natural Products*4(1): 91-95.
- Faizi S., Khan R.A., Azher S., Khan S.A., Taussef S. and Ahmad A. (2003).** New antimicrobial alkaloids from the roots of *polyalthia longifolia var. pendula*. *Planta medica* 69: 350-355.
- Fall D., Badiane M., Ba D., Loiseau P, Bories C., Gleye, Laurens A. and Hocquemiller R. (2003).** Activité antiparasitaire d'Annonaceae du Sénégal utilisées en médecine traditionnelle. *Dakar Médical*, 48 (2): 112-116.
- Farnsworth N. R., Akerele O., and Bingel A. S. (1985).** Medicinal plants in therapy. Bull World Health Organization; 63: 965-981.
- Fasano A., Kay B.A., Russel R.G., Maneval D.R. and Levine M.M. (1990).** Enterotoxin and cytotoxin production by enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 58: 3717-3723.
- Fatope M.O, Audu O.T, Takeda Y, Zeng L, Shi G, Shimada H. and McLaughlin JL. (1996).** Bioactive ent-kaurene diterpenoids from *Annona senegalensis*. *Journal of Natural Product*, 59 (3):301-303.
- Fatouma Oumar Ouattara (2005).** Traitement traditionnel des infections sexuellement transmissibles au Mali: Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Annona senegalensis* (Annonaceae) et de *Stachytarpheta angustifolia* VALH. (Verbenaceae). *Thèse de Doctorat en Pharmacie*, Université de Bamako, Mali PP 163-168.
- Favier A. (2003).** Le stress oxydant intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension de mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité Chimique*, 108-115.

- Fekam B.F. (2004).** Huiles essentielles d'Annonacées camerounaises : Analyse chimique, activités antioxydantes et antiplasmodiales. *Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Yaoundé de I, Cameroun.* 150p.
- Fermor B, Weinberg J, Pisetsky D, Misukonis M, Banes A. and Guilak F. (2001).** The effects of static and intermittent compression on nitric oxide production in articular cartilage explants. *Journal of Orthopaedic Research*, 19: 729-737.
- Fernandez M. E., Pistone V. C., Uzal F. A., McClane B. A. and Ibarra C. (2005).** *Clostridium perfringens* enterotoxin damages the human intestine *in vitro*. *Immunity and infection* 73(12): 8407-8410.
- Ferreira. (2011).** “Morphoanatomy, histochemistry and phytochemistry of *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae) Leaves, *Journal of Pharmacy Research*, 4(4): 942–944.
- Förstermann U and Sessa WC (2012).** Nitric oxide synthases : regulation and function. *European Heart Journal*; 33(7):829–837.
- Foster H. D. (2007).** A role for the antioxidant defense system in preventing the transmission of HIV. *Medical Hypotheses* 69:16. 1277-1280.
- Frankel G., Phillips A.D., Rosenshine I., Dougan G., Kaper J.B. and Knutton S. (1998).** Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Molecular Microbiology*, 30: 911-921.
- Freiburghaus F., Kaminsky R., Nkunya M.H. and Brun R. (1996).** Evaluation of African medicinal plants for their *in vitro* trypanocidal activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 55(1):1-11.
- Fricker J. (1993).** Halte aux maladies diarrhéiques. *L'enfant en milieu tropical* ; 204 : 67p
- Fryer M.J. (1992).** The antioxidant of thylakoid vitamin E. *Plant, Cell and Environment*, 15:381-392.
- Galvez J., Zarzuelo A., Crespo M.E., Lorente M.D., Ocete M.A. and Jimenez J. (1993).** Antidiarrhoeal activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoide constituent. *Planta Medica* 59: 333-336.
- Ganong W. F. (2001).** Physiologie Médicale : Traduction de la 19^{ème} édition par Michel J.O. Press : Université Laval ; 445-490.
- Garat C, Jayr C, Eddahibi S, Laffon M, Meignan M. and Adnot S. (1997).** Effects of inhaled nitric oxide or inhibition of endogenous H₂O₂ formation on hyperoxic lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 155:1957–1964.

- Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. and Staley J.R. (2005).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, volume 2 : The Proteobacteria, part B : The Gammaproteobacteria. (2nd ed.), Williams & Wilkins (ED.), XXVIII, 1108p.
- Garthwright W.E., Archer D.L. and Kvenberg J.E. (1988).** Estimates of incidence and costs of intestinal infectious diseases in the United States. *Public Health Reports* 103: 107-115.
- Germani Y. et Le Bouguéneq C. (2008).** Diagnostic des *Escherichia coli* agents de diarrhée chez l'homme. *Revue francophone des laboratoires*, 38 (400) : 67-76.
- Germani Y. et Sansonetti P. (1999).** *Escherichia coli* en pathologie digestive. *Encycl. Méd. Chir.* (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses, 8-027-B-10, Pédiatrie, 4-284-A-10.9 p.
- Girón J.A., Ho A.S. and Schoolnik G.K. (1991).** An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 254: 710-713.
- Gismero-Ordoñez J., Dall'Agnol M. and Girón J.A. (2002).** Expression of the bundle-forming pilus by enteropathogenic *Escherichia coli* strains of heterologous serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (6) : 2291-2296.
- Gonzaga W.A., Weber A.D., Glacomeli S.R., Dalcol I.I., Hoelzel S.C. and Morel A.F. (2003).** Antibacterial alkaloids from *zanthoxylum rhoifolium*. *Planta medica* 69: 371-374.
- Gornall A, Bardawill C. and David M. (1949).** Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biology and Chemistry*, 177: 167-182.
- Groff J. and Gropper S. (2000).** *Advanced nutrition and human metabolism*. 3rd Ed., Belmont: Wadsworth.
- Groupe Scientifique sur l'eau (GSE). (2003).** *Escherichia coli*, dans : Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine. Institut national de santé publique du Québec, 4p.
- GSE (Groupe Scientifique sur l'eau), (2003).** *Escherichia coli*, Dans Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine. Institut national de santé publique du Québec, 4p.
- Guedon C., Ducrotte P., Antoine J.M., Denis P., Collin R. and Lerebours E. (1996).** Does chronic supplementation of the diet with dietary fibres extracted from pea and carrot affect colonic motility in man? *British Journal of nutrition* 76: 51-61.
- Gugnani H-C. (1999).** Some emerging food and water borne pathogens. *Journal of Communicable Diseases*, 31(2): 65-72.

- Gutowski M. and Kowalczyk S. (2013).** A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta. Biochim. Pol*, 60(1):1-16.
- Halliwell B. (2012).** Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nut. Rev*, 70(5): 257–65.
- Harbone J.B. (1998).** *Phytochemical Methods*. A Guide to Modern Techniques of plant Analysis. 3rd edition. Chapman and Hall, Newyork. 1-198.
- Haslam E. (1996).** Natural polyphenols as drug: possible mode of action. *Journal of Natural Products* 59: 205-212.
- Haslay C. et Leclerc H. (1993).** Microbiologie des eaux d'alimentation. Technique et Document. Lavoisier éd., Paris. Health Organisation 60, 604–613.
- Hennebelle T. (2006).** Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota Pseudodictamnus*(Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). *Thèse de Doctorat Chimie Organique et Macromoléculaire*. Université des Sciences et Technologique de Lille, Lille 1. Ecole Doctorale Sciences de la Matière du rayonnement et de l'Environnement. France.
- Herrera E. and Barbas C. (2001).** Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal of Physiological Biochemistry* 57: 43-56.
- Hertog M.G.L., Festkens E.J.M., Hollman P.C.H., Katan M.B. and Mhout D. (1993).** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart diseases: The zupthen elderly study. *The lancet*, 342:1007-1014.
- Herulf M., Svenungsson B., Lagergren, Ljung T., Morcos E., Wiklund N. P., Lundberg J. O. N. and Weitzberg E. (2009).** Increased Nitric Oxide in Infective Gastroenteritis. *The Journal of Infectious Diseases*; 180:542–545
- Hodge A. and Sterner B. (2005).** Toxicity Classes In: Canadian Centre for Occupational Health and safety. 1997-2010.
- Hooper L.V., Midtvedt T. and Gordon J.I. (2002).** How host-microbial interactions shape thenutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, 22: 283-307.
- Hornby A.S. (1985).** Oxford Advance Learners Dictionary of Current English; 57.
- Hunter P.R. (2003).** Drinking water and diarrhea disease due to *Escherichia coli*. *Journal of water and Health* 1(2): 65-72.

- Igweh A.C. and Onabanjo A.O. (1989).** Chemotherapeutic effects of *Annona senegalensis* in *Trypanosoma brucei brucei*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 83 (5):527-534.
- Ioan C. (1982).** Methodology for the analysis of vegetable drugs. *Practical manual on the industrial utilization of medicinal and aromatic plants*; 53-62.
- Islam D., Veress B., Bardhan P. K., Lindberg A. and Christensson B. (1997).** *In situ* characterization of inflammatory responses in the rectal mucosae of patients with Shigellosis. *Infection and Immunity* 65: 739-749.
- Iversen PO. and Nicolaysen G. (2003).** Water for life. *Journal of Norwegian Medical Association*, 123: 3402-3405.
- Iwalokun B., Efedede B., Alabi-Sofunde J., Oduala T., Magbagbeola O. and Akinwande A. (2006).** Hépatoprotective and antioxidant activities of *Vernonia amygdalina* on acetaminophen-induced hepatic damage in mice. *Journal of Medicinal Food*, 9 (4): 524-530.
- Izzo A. A., Gaginella T.S., Mascolo N., Borrelli F. and Capasso F. (1996).** NG-nitro-L-arginine methyl ester reduces senna-and cascara-induced diarrhea and fluid secretion in the rat. *European Journal of pharmacology* 301 (1-3): 137-142.
- Jackson S.G., Goodbrand R.B., Johnson R.P., Odorico V.G., Alves D., Rahn K., Wilson J.B., Welch M.K. and Khakhria R. (1998).** *Escherichia coli* O157:H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. *Epidemiology and Infection*, 120: 17-20.
- James J.M. and Burks A.W. (1996).** Food-associated gastrointestinal disease. *Current Opinion in pediatrics* 8: 471-475.
- Jerse A.E., Yu J., Tall B.D. and Kaper J.B. (1990).** A genetic locus of Enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87: 7839-7843.
- Jian Z.D., Lowe B. and Verenkar M.p. (2002).** Prevalence of enteric pathogens among international travelers with diarrhea acquired in Kenya (Mombasa), India (Gao) or Jamaica (Montego Bay). *Journal of Infectious Diseases* 85: 497-502.
- John S. (2005).** *Clostridium difficile* associated diarrhea: diagnosis and treatment. *British Medical Journal* 331: 498-501.

- Jourdan N., Brunet J.P. and Sapin C. (1998).** “Rotavirus infection reduces sucrase-isomaltase expression in human intestinal epithelial cells by perturbing protein targeting and organization of microvillar cytoskeleton”. *Journal of Virology* 72(9): 7228-7236.
- Joyeux M., Mortier F. and Fleurentin J. (1995).** Screening of Antiradical, Antilipoperoxidant and Hepatoprotective Effects of Nine Plant Extracts Used in Caribbean Folk Medicine. *Journal of Phytotherapy Research*, 9 (3): 228-230.
- Jubelin G. (2005).** Formation de biofilms par *Escherichia coli* K-12 : rôle des systèmes à deux composants dans la synthèse des curli. *Thèse de Doctorat* de l’institut National des Sciences Appliquées de Lyon. 66p.
- Kacou-N’Douba A., Bouzid S. A., Guessenned K. N., Kouassi M. Bengue A. A. et Faye-Kaackenbeeck A. (1993).** Le diagnostic des souches pathogènes d’*Escherichia coli* : petites et grandes histoires. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 137, 337-340.
- Kahraman A., Erkasap N., Köken T., Serteser M., Aktepe F. and Erkasap S. (2003).** The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology*, 183 (1-3):133-142.
- Kamanzi Atindehou K., Koné M., Terreaux C., Traoré D., Hostettamann K. and Dosso M. (2002).** Evaluation of the antibacterial potential of medicinal plants from the Ivory Coast. *PhytotherapyResearch* 16 pp. 497- 502.
- Kamgang R, Pouokam K, Fonkoua M, Penlap N. and Biwole S. (2005).** Shigella dysenteriae type1-induced diarrhoea in rats. *Journal of Infectious Diseases*; 58:335-337.
- Kanan T. A. and Abdulla Z.A. (2009).** Isolation of *Yersina sp.* From cases of diarrhoea in Iraqi infants and children. *La Revue de Santé de la Méditerranée Orientale* 15(2): 276-284.
- Kaper J.B., Nataro J.P. and Mobley H.L. (2004).** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews Microbiology* 2: 123-140.
- Kapikian A. Z. (2001).** “A rotavirus vaccine for prevention of severe diarrhea of infants and young children: development, utilization and withdrawal”. *Novartis Foundation Symposium* 238: 153-171.
- Karlina G.S., Ninibe V.A., Petra L. and Luis M.P. (2006).** Chrysophanol, an Antimicrobial Anthraquinone from the Root Extract of *Colubrina greggii*. *Journal of Mexican Chemical Society* 50(2): 76-78.

- Kastner U., Glasl S., Follrich B., Guggenbichler J.P. and Lurenitsch J. (2002).** Acid oligosaccharides as the active principle of aqueous carrot extracts for prevention and therapy of gastrointestinal infections. *Wien Med Wochenschr* 152 (15-16): 379-381.
- Kauffmann F.(1947).** The serology of the *E. coli* group *Journal of Immunology* 57:71-100. Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*, 141:1173-1177.
- Kayode Adesogan E. and Durodola J.I. (1976).** Antitumor and antibiotic principles of *Annona senegalensis*. *Phytochemistry*, 15: 1311-1312.
- Kengni Y.H., Tshouh F. P. V., Hounda F. J. B., Tchokouaha Y. L. R., Zeuko'o M. E., Ngouana V. and Fekam B.F. (2015).** *In-vitro* Antifungal Activity of Methanolic Fractions of Two Cameroonian Medicinal Plants: *Anonidium Mannii* and *Xylopia Africana* (Annonaceae). *Advances in Natural and Applied Sciences*, 9(15): 12-16.
- Kennedy G.L., Ferenz R.L.J. and Burgess B.A. (1986).** Estimation of acute toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than LD50. *Journal of Applied Toxicology*, 6: 145-148.
- Kerharo J. et Adam J.G. (1974).** *La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques*. Ed. Vigot et Frères, Paris, 1011p.
- Keusch G. T. and Bannish M. (1989).** Shigella in enteric infection. Farthing MJG, Keusch G.T(edn). Chapman and Hall Medical: London; 265-282.
- Keuzeta J-J. et Merlin. (1988).** « Mortalité et morbidité par les maladies diarrhéiques en Afrique centrale ». *Les Annales de l'IFORD*, vol. 12.
- Khan M.R., Kornine K., and Omoloso A.D. (1997).** Antibacterial Activity of Some *Annonaceae* Part I. *Fitoterapia*, 69 (4): 367-369.
- Khatry S., Nalini S. and Sadanandam M. (2010).** Novel drug delivery systems for antifungal therapy. *Indian Journal of Experimental Biology* 47 (5): 4-7.
- Kissner R, Nauser T, Bugnon P, Lye PG. and Koppenol WH. (1997).** Formation and properties of peroxy nitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chemical Research in Toxicology*. 10:1285-1292.
- Klaassen C.D. (2001).** Principles of Toxicology. In *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 5th ed.*; McGraw-Hill: New York, NY, USA, 13.

- Knutton S., Lloyd D.R. and McNeish A.S. (1987).** Adhesion of Enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infection and Immunity*, 55: 69-77.
- Kolodziej H., Kayser O., Latte k.P. and Ferreira D. (1999).** Evaluation of the antimicrobial potency of tannins and related compounds using themicrodilution both method. *Planta Medica*, 65(5): 444-446.
- Koné M.W., Kamanzi Atindehou K. et Traoré D. (2002).** Plantes et médecine traditionnelle dans la région de Ferkessédougou (Côte d'Ivoire). *Annales de Botanique de l'Afrique de l'Ouest 2* : pp 13-23.
- Koné W. M., Kamanzi Atindehou K., Terreaux C., Hostettmann K., Traoré D. and Dosso M. (2004).** Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 93. 43-49.
- Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H. and Moilanen E. (2005).** Nitric oxide production and signaling in inflammation. Current drug targets. *Inflammation and allergy*; 4(4): 471–479.
- Kouitchou Mabeku Laure B., Penlap Beng V., Kouam J., Ngadjui Bonaventure T., Fomum Z. T. et Etoa F. X. (2006).** Evaluation of antidiarrhoeal activity of the stem bark of *Cylicodiscus gabunensis* (mimosaceae). *African Journal of Biotechnology*, 5 (11): 1062-1066.
- Kueté V. et Efferth T. (2010).** Cameroonian medicinal plants: Pharmacology and derived natural products. *Frontiers in Pharmacology*, 1:1-19.
- Kuiaté J.R. (2005).** Caractérisations biologiques et chimiques des dermatophytes et plantes médicinales à «effets antifongiques» dans deux localités de la province de l'Ouest Cameroun. *Thèse de Doctorat d'Etat en Biochimie, Université de Yaoundé I*, 170p.
- Kunwar A. et Radiation K. I. P. (2011).** Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medicine and Allied Science* 1(2):53–60.
- Kurohane K. and Ishikawa T. (2013).** Dual role of nitric oxide in pancreatic β -Cells. *Jour. Pharmacol. Scie*, 123(4):295–300.
- Lalitagauri D., Paul R., Thomas R., Helio S. and Ronald N. (2004).** Bactericidal activity of BAL9141, a novel parenteral cephalosporin against contemporary Gram-positive and Gram-negative isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 50: 73-75.

- Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martínez MB. and Reeves PR. (2004).** "Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp". *Infect Immun.*; 72(9):5080–5088.
- Lawrence R. S. (1997).** Secretory diarrhea. *Current Gastroenterology Reports* 1(5): 389-397.
- Le Minor L. et Richard C. (1993).** Méthodes de Laboratoire pour l'Identification des Entérobactéries, éd : Institut Pasteur, 217p.
- Le Minor L. et Véron M. (1989).** *Bactériologie médicale*. Flammarion éd., Paris. 1107p.
- 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., and Muker R. (1982).** The Phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, 21: 2783-2793.
- Lee Y.P., Morton G. and Donald G. V. (1997).** The Role of azole antifungalagents for systemic antifungal therapy. *Clevel. Clin. Jour. Med*, 64(2):99–106.
- Léophonte P., Guérin J.C., Lebas F.X., Liard F. et Boulanger P. (2006).** Stress oxydatif et BPCO. Rôle des infections. Prévention. *Médecine et maladies infectieuses*, 36:245-252.
- Levine M.M. (1987).** *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohaemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of Infectious Disease*, 155: 377-389.
- Lior H. (1994).** Classification of *Escherichia coli*. In: Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International: *Wallingford*, 31-72.
- Longanga O.A., Vercruysse A. and Foriers A. (2000).** Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhea in Lomela area, Democratic Republic of Congo (RDC), *Journal of Ethnopharmacology* 71(3), 411-423.
- Loukiadis E., Nobe R., Herold S., Tramuta C., Ogura Y., Ooka T., Morabito S., Kérouédan M., Brugère H., Schmidt H., Tetsuya H. and Oswald E. (2008).** Distribution, functional expression, and genetic organization of Cif, a phage-encoded type III-secreted effector from Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190(1): 275-285.

- Macdonald T.T. and Monteleone G. (2005).** Immunity, inflammation and allergy in the gut. *Science*, 307: 1920-1925.
- Macdonald T.T., Murch S.H., Nicholls S.W. and Breese E.J. (1993).** Diarrheal disease: current concepts and future challenges. Intestinal cytokines in inflammatory bowel disease and invasive diarrhea. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 87: 23-26.
- Magadula J. J., Ester I. and Otieno J. N. (2009).** Mosquito larvicidal and cytotoxic activities of 3 *Annona* species and isolation of active principles. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(9): 674-680.
- Mainil J. (2003).** Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : I) Les adhésines et facteurs de colonisation. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 147: 105-126.
- Mainil J., Wilbaux M., Jacquemin E., Oswald E., Imberechts H. et Van Bost S. (2001).** Les souches pathogènes d'*Escherichia coli* chez les chiens et les chats : III) Données bactériologiques et cliniques sur les souches nécrotoxigènes et sur celles positives pour des adhésines. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 145: 343-354.
- Makoto Y. (1980).** Effect of *Shigella flexneri* endotoxin on ureagenesis and liver ultrastructure in rabbits. *Experimental and Molecular pathology* 32(3): 253-263.
- Malan A.N. (1993).** Causes infectieuses des diarrhées aiguës chez les enfants de moins de 5 ans hospitalisés dans le service de pédiatrie de l'hôpital Yalgado OUEDRAOGO. Burkina Faso. *Thèse de Médecine Ouagadougou* 1993 ; 205p.
- Malgras D. (1992).** *Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes*. Éditions Karthala et ACCT, 479P.
- Manges A.R., Johnson J.R., Foxman B., O'Bryan T.T., Fullerton K.E. and Riley L.W. (2001).** Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *New England Journal of Medicine*, 345(14): 1007-1013.
- Marteau P. et Lavergne A. (1993).** *Clostridium difficile*. Diarrhée Aigue Infectieuse. Dion : Paris ; 115p.
- Mascolo M., Izzo A.A., Barbato F. and Capasso F. (1993).** Inhibition of nitrate oxide synthetase prevent castor oil induced diarrhoea in the rat. *Bristish Journal of pharmacology* 108: 861-864. *Medecine*, 5 1-6.

- Meeroff J. C., Schreiber D. G., Trier J. S. and Blacklow N. R. (1980).** Abnormal gastric motor function in viral gastroenteritis. *Annals of Internal Medicine* 92: 370-373.
- Mekou Y. B., Derek A. F., Enow A. E. and Bindeh G. C. (2011).** Ethnobotanical survey of the uses of Annonaceae around mount Cameroon. *African Journal of Plant Science*, 5(4):237-247
- Mendoza L., Wilkens M. And Urzua A. (1997).** Antimicrobial study of the resinous exudates of diterpenoids and flavonoids isolated from some chilean pseudognaphalium (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 58: 85-88.
- Mennie T. and Dalley V. (1973).** Aspirin in radiation induced diarrhoea. *Lancet* 1: 1131.
- Milon A. (1993).** Mécanismes moléculaires de pathogénicité des *Escherichia coli* inducteurs de diarrhées chez l'homme et l'animal. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 144 : 857-878.
- Mims C.A., Playfair J.H.L., Roitt I.M., Wakelin D. and Wakelin R. (1993).** Antimicrobials and chemotherapy. Mims CA et al. (eds.). *Medical Microbiology Review* 35: 1-34.
- Miyoshi H., Abe M., Murai M. and Ichimaru N. (2005).** Dynamic Function of the Alkyl Spacer of Acetogenins in their Inhibitory Action with Mitochondrial Complex I (NADH-Ubiquinone Oxidoreductase). *Biochemistry*, 44: 4898-4906.
- Modigliani R. (1990).** Physiopathologie de la diarrhée. *La revue du praticien* 39(29) : 2577-2581.
- Mohd A. K., Naeem A. K., Iqbal A. Q., Ghufraan A. and Shadab Z. (2004).** Protective effect of Arque-Ajeeb on acute experimental diarrhea in rats. *Complimentary and Alternative Medicine* 4: 8.
- Monica C. (1984).** Medical Laboratory Manual for Tropical Countries: Microbiology (vol.2). University Press: Cambridge; 479p.
- Mortier F. (1991).** Préparation des extraits destinés à l'évaluation pharmacologique. In: *Ethnopharmacologie: sources, méthodes, objectifs*, J. et Coll Fleurentin, Ed., pp199-209, ORSTOM et Société Française d'Ethnopharmacologie, Paris – Metz, France.
- Mourad F. H., Turvill J. L. and Farthing M. J. G. (1999).** Role of nitric oxide in intestinal water and electrolyte transport. *Gut* 44: 143-147.
- Murugesan T., Iopamudra G., Kakali M., Das J. and Pal M. (2000).** Evaluation of anti-diarrhoea profile of *Jussiaea suffruticosa* Linn extracts in rats. *Phytotherapy Research* 14: 381-383.

- Mwambete KD. and Joseph R. (2010).** Knowledge and perception of mothers and caregivers on childhood diarrhea and its management in Temeke municipality, Tanzania. *Tanzania Journal Health Resources*, 12: 1-9.
- Naoto K. and Tetsuaki T. (2009).** Medicinal Chemistry of Annonaceous Acetogenins: Design Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Analogues. *Molecules*, 14: 3621-3661
- Nataro J.P. and Kaper J.B. (1998).** Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 142-201.
- Nathan M.T. and Richard L.G. (2004).** Acute infectious diarrhea. *The New England Journal of Medicine* 350: 38-47.
- National Institute of Health (NIH) Publication. (2003).** No. 04-2749.
- Ndoye O., Ruiz-Perez M., Mamoun A.D. et Ngono D.L. (1998).** Les effets de la crise économique et de la dévaluation sur l'utilisation des plantes médicinales au Cameroun. Implications pour la gestion durable des forêts. *Séminaire FORAFRI de Libreville - Session 1: états populations et forêts*. 12p.
- Ngo Teke G.(2011).** Antidiarrhoeal, antimicrobial and antioxidant properties of two Cameroonian medicinal plants : *Trilepisium madagascariens* DC. Leuwen Berg (Moraceae) and *Entada abyssinica* Steud. EXA. Rich. (Mimosaceae). *Thèse de Doctorat/PhD, Université de Dschang, Dschang, Cameroon*, 157p.
- Ngouana V. and Fekam B. F. (2015).** *In-vitro* Antifungal Activity of Methanolic Fraction of two Cameroonian Medicinal Plants: *Anonidium mannii* and *Xylopia Africana* (Annonaceae). *Advances in Naturel and Applied Sciences*, 9(15) November 2015, pages: 12-16.
- NguendoYonsi H .B., Gérard Salem. et J.C Bruneau. (2008).** Épidémiologie géographique des maladies diarrhéiques à Yaoundé (Cameroun). *M@ppemonde* 89 (2008.1) [http:// mappemonde. Mgm.fr/num 17/articles/art 08102. Html](http://mappemonde.Mgm.fr/num 17/articles/art 08102. Html).
- Noël G.E. et Aubé M-H. (2001).** Les infections entériques à *E. coli* O157 :H7. Diagnostic et traitement Deuxième partie. *Le Clinicien*, 131-140.
- Noumi E. et Yomi A. (2001).** Medicinal plants use for intestinal disease in Mbalmayo region. Center Cameroon. *Fitotherapia*, 72: 446-454.
- Odebeyi O.O. and Sofowora F.H. (1978).** Antimicrobial alkaloids from a Nigerian Chewing Stick (*Fagara zanthoxyloides*), *Planta Medica*, 36: 204-207.

- Okoro I.O., Khan B. and Edith O.A. (2010).** Antioxydant and antimicrobial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 9(20): 2989-2993.
- Oliveira A. R. D. (2004).** Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Rev. Bras. Med. Esporte*, 10(4), 314–318.
- Oloyede OI.(2005).** Chemical profile of unripe pulp of *Carica papaya*. *Pakistan Journal of Nutrition*,4: 379 – 381.
- Omulokoli E., Khan B. and Chabra S.C. (1997).** Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 56: 133-137.
- Onwusonye J. C., Uwakwe A. A., Iwuanyanwu P. and Iheagwam U. (2014).** Oral acute toxicity (LD50) study of methanol extract of *Annona senegalensis* leaf in albino mice. *Sky Journal of Biochemistry Research* Vol. 3(5), 46 – 48.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (1993).** Cours sur la diarrhée: Manuel de l'étudiant. Genève : Sadag, p.147.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2000).** Directives de qualité pour l'eau de boisson ; Vol. 2 – critères d'hygiène et documentation à l'appui. Organisation mondiale de la santé, 2^e édition, 1050p.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2001).** Reduced Osmolarity Oral Rehydration Salts (ORS) formulation-Report from a meeting of experts jointly organized by UNICEF and WHO. Department of child and adolescent health development. New York.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2002).** Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. Genève, WHO/EDM/TRM/2002.1: 1-63.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2003).** <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003fs134/index.html>.2007.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2004).** Flooding and Communicable Disease Fact Sheet: Risk Assessment and Preventive Measures.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2006).** Mortality Country fact sheet: World Health Statistics.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2013).** Maladies diarrhéiques. Aide-mémoire N°330.

- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2017).** Maladies diarrhéiques.
http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs_330/fr
- Organisation Mondiale de la santé (OMS). (1989).** Programme de lutte contre les maladies diarrhéiques. Bulletin OMS 1989;4: 1-5.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD).(2001).** The OECD Guideline for Testing of Chemical.The Organization of Economic Co-O peration Development, Paris, 1-14.
- Osorio E., Arango G.J.A., Jimenez N., Alzate F., Ruiz G., Gutierrez D., Paco M.A., Gimenez A. and Robledo S. (2007).** *Journal of Ethnopharmacology*,111:630.
- Otshudi A. L., Vercrease A. and Foriers A. (2000).** Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhea in Lomela area (DRC). *Journal of Ethnopharmacology* 71: 411-423.
- Pamela C. and Richard A. (1987).** Lippincott's Illustrated Review: Biochemistry. Lippincott Jp (edn). *Lippincott Company*: Philadelphia-New York; 51-53.
- Paolini V., Dorchie Ph. et Hoste H. (2003).** Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. *Alter. Agri.*, 17-19.
- Papas A. (1999).** Diet and antioxidant status: *In antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health.* Andreas M. Papas (ed). CRC Press: New York; 89-106.
- Petit J.R., F.S.Huand. and W.C.Dick. (2008).** Forests of the Part: A Window to futur changes. *Revue Science Magasine*,320 (5882):1450-1452.
- Philipov S., Kandé K.M. and Machev K.K. (1995).** Alkaloids of *Annona senegalensis*. *Fitoterapia*, 66 (3): 275-276.
- Phillipson J.D. and O'Neill J.D. (1987).** New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. *Acta Pharmaceutica Nordica* 1: 131-144.
- Pichard E.(2002).** Diarrhées infectieuses. Malin Trop afrique : *Manuel des maladies infectieuses pour l'Afrique*589p.
- Pierce N.F., Carpenter C.C.j., Elliot H.Z. and Greenough W.B. (1971).** Effet of prostaglandins, theophylline and cholera exotoxin upon transmucosal waer and electrolyte movement in canine jejunum, *Gastroenterology*, 60, 22-32

- Pinto A.C., Andrade S.R., Ferreira F.R. and Kinpara D.I. (2005).** *Annona* species. International Center for Underutilised Crops, *University of Southampton, Southampton, SO171BJ, UK.* PP 1-281.
- Plein K. and Hotz J. (1993).** Therapeutic effects of *Saccharomyces* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea, a pilot study. *Z Gastroenterol.* 31: 129-134.
- Pohl P. (1993).** Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 137: 325-333.
- Pourmorad F., Hosseinimehr S. J. and Shahabimajd N. (2006).** Antioxydant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 5: 1142-1145.
- Pourrut B. (2008).** Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. *Thèse de Doctorat* à l'Institut National Polytechnique de l'Université de Toulouse spécialité : Ecotoxicologie. France.
- Pritech/Sahel. (1989).** Les maladies diarrhéiques dans le Sahel : données épidémiologiques et premiers résultats des programmes de lutte Pritech.
- Puylaert J. B., Vermaijden R. J., Van Der Werf S. D. J., Doorknobs L. and Komans R. K. J. (1989).** Incidence and sonographic diagnostic of bacterial ileocaecitis masquerading as appendicitis. *Lancet* 2: 84-85.
- Quinet B. (1996).** Les diarrhées infectieuses de l'enfant et du nourrisson. *Rev prat* 1996; 46 : 177-183.
- Rakotomanga M., Razakantoanina V., Raynaud S., Loiseau P.M., Hocquemiller R. and Jaureguiberry G. (2004).** Antiplasmodial Activity of Acetogenins and Inhibitory Effect on *Plasmodium falciparum* Adenylate Translocase. *Journal of Chemotherapy*, 16: 350-356.
- Rambaud J. C. (2000).** *Traité de gastroentérologie.* Flammarion, Paris; 27.
- Ranjan R., Naresh R., Patra R. and Swarup D. (2006).** Erythrocyte Lipid Peroxides and Blood Zinc and Copper Concentrations in Acute Undifferentiated Diarrhoea in Calves, *Veterinary Research Communication* 30 (3): 249-254.
- Ratnaike. (1999).** Diarrhoea and aging. *Journal of Postgraduate Medicine* 45: 60.
- Raza M., Al-Shabanah OA., El-Hadiyah TM. and Al-Majed A.A. (2002).** Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in

plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70:135-145.

Read M.A. (1995). Flavonoids: Naturally occurring anti-inflammatory Agents. *American Journal of Pathology*, 147(2): 235-237.

Richard C. (1993). Salmonelles et toxi-infections alimentaires. *Diarrhées Aigues Infectieuses*. Dion : Paris ; 80-81.

Rivoal K., Ragimbeau C., Salvat G., Colin P. and Ermel G. (2005). Diversity of *Campylobacter jejuni* isolates recovered from free-range broiler farms and comparison with isolates of various origins. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 6216-6227.

Roopashree TS, Raman D, Rani RHS. and Narendra C. (2009). Acute oral toxicity studies of antipsoriatic herbal mixture comprising of aqueous extracts of *Calendula officinalis*, *Momordica charantia*, *Cassia tora* and *Azadirachta indica* seed oil. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33:74-83.

Rosenshine I., Ruschkowski S., Stein M., Reinscheid D.J., Mills S.D. and Finlay B.B. (1996). A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *The Embo Journal*, 15: 2613-2624.

Ross J.H., Vinood B.P., John H.W., Jaspaul S.M. and Peter J. R. (2001). Diarrhoea reduces the rates of cardiac protein synthesis in myofibrillar protein fraction in rats *in vivo*. *The Journal of Nutrition* 131: 1513-1519.

Ross R. (1994). The role of T-lymphocytes in inflammation, *Proc. Natl. Acad.Sci. U S A*, 91: 2947p.

Rossant L . et Rossant-Lumbrosso J. (2000). Diarrhées aigues de l'adulte. *Doctissimo* 1-6.

Rouf A.S., Islam M.S. and Rahman M.T. (2003). Evaluation of antidiarrhoeal activity of *Rumex maritimus* roots. *Journal of Ethnopharmacology* 84: 307-310.

Rubhana R., Protim S., Peter B., Gul A., Monica L. and David A. (2006). Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic. *Proceeding of National Academy of Science USA* 103: 9178-9183.

Ryan C.A., Tauxe R.V., Hosek G.W., Wells J.G., Stoez P.A., McFadden H.W., Smith P.W., Wright G.F. and Blake P.A. (1986). *Escherichia coli* O157: H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological and pathological findings. *Journal of Infectious diseases*, 154: 631-638.

- Sack D. A., Islam S., Brown K. H., Islam A., Kabir A. K. and Chowdhury A. M. (1980).** Oral therapy in children with cholera: a comparison of sucrose and glucose electrolyte solutions. *Journal of Pediatric*, 96: 20-25.
- Sader H.S., Jones R.N. and Silva J.B. (2002).** Skin and soft tissue infections in Latin American Medical Centers: four-year assessment of the pathogen frequency and antimicrobial susceptibility patterns. *Diagnostic Microbiology of Infectious Diseases* 44: 281-288.
- Sahpaz S., Bories Ch., Loiseau P.M., Cortès D., Hocquemiller R., Laurens A. and Cavé A. (1994).** Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis*. *Planta Medica*, 60: 538-540.
- Salzman A.L., Menconi M.J., Unno N., Ezzell R.M., Casey D.M. and Fink M.P. (1995).** Nitric oxide dilates tight junctions and deplets ATP in cultures Caco-2 Bbe intestinal epithelial monolayers. *American Journal of Physiology* 368: 361-373.
- Santé Canada. (2006).** Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : document technique. Les bactéries pathogènes d'origine hydrique : micro-organismes préoccupants courants et émergents. Bureau de la qualité de l'eau et de la santé, Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs, Santé Canada, Ottawa (Ontario). 43p.
- Sarah M., Leona T.C. and Jennifer K. L. (2007).** *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. *Current Opinion in Microbiology*, 10: 320-325.
- Satish E. and Ranjana S. (2015).** Antidiarrheal activity of ethanolic extract of *Manihot esculenta crantz* leaves in Wistar rats. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine* 6 (1): 35-40.
- Saunders P.R., Kosecka U., McKay D.M. and Perdue M.H. (1994).** Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 267: 794-799.
- Scalbert A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 3875-3883.
- Scaletsky I.C., Silva M.L. and Trabulsi L.R. (1984).** Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infection and Immunity*, 45: 534-536.
- Schmitt H. (1983).** Les récepteurs et la digestion. *Pharmacologie Humaine* (2^{ème} éd.). Flammarion : Paris 5 ; 245-264.
- Selime M.C., Binnur M.Y. and Ali N.Y. (2010).** Determination of antimicrobial activity of tannic acid in pickling process. *Romanian Biotechnological Letters* 15(3): 5325-5330.

- Semba R. and Bloem M. (2000).** *Nutrition and Health in Developing Countries*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Senerwa D., Olsvik O., Mutanda L.N., Lindqvist K.J., Gathuma J.M., Fossum K. and Wachsmuth, K. (1989).** Enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O111: HNT isolated from preterm neonates in Nairobi, Kenya. *Journal of Clinical Microbiology*, 27: 1307-1311.
- Shimizu E., Hoshino R., Nomura K., Danilov V. I. and Kurita N. (2013).** DFT study on reaction mechanism of DNA base pair with hydroxyl radical. *Jour. Mod. Phy*, 4 (3), 442–451.
- Shinde A., Ganu J. and Naik P. (2012).** Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress : A review. *Jour. Dent. All. Scie*, 1(2): 63–66.
- Sies H. (1997).** Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* 215: 213-219.
- Slater T.F. (1984).** Free-radical mechanisms in tissue injury, *Biochem. Jour*, 222 (1): 1–15.
- Sleigh D. J. and Timbury M. C. (1998).** Note on Medical Bacteriology (5th edn). Churchill: Livinstone; 199-203, 482p.
- Snyder J.D. and Merson M.H. (1982).** The magnitude of the global problem of acute
- Soares-Weiser k., MacLehose H., Ben-Aharon I., Goldberg E., Pitan F. and Cunliffe N. (2010).** Vaccines for preventing rotavirus diarrhea: vaccines in use. *Cochrane Database of Systematic Reviews Issue 5*. Art. No.: CDOO8521.
- Société Canadienne de la Pédiatrie (SCP). (2003).** Le traitement de la diarrhée. *Pediatric Child Health* 8(7): 463-466.
- Sodhi C.P., Katyal R., Rana S.V., Attri S. and Singh V. (1996).** Study of oxidative stress in rotavirus infected infant mice. *Indian Journal of Medicinal Research* 104: 245-249.
- Sofowora A. (1993).** Medicinal plants and Traditional Medicinal in Africa. 2nd edition. Spectrum Book Ltd. Ibadan. Oweri, Kaduna, Lagos, 2-15, 20-70.
- Sofowora A. (1996).** *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d’Afrique*. Ed. Karthala, 1-80.
- Sojka W.J. (1965).** *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Part I: General characteristics and biochemical behavior of *Escherichia coli*. Commonwealth Agricultural Bureau: Farnham Royal, 1-63.

- Staley T.E., Jones E.W. and Corley L.D. (1969).** Attachment and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs. *American Journal of Pathology*, 56: 371-392.
- Steven K.R. and Mylecrdfaine L. (1994).** *Issues in Chronic Toxicology*. In Principles and Methods of Toxicology, 3rd ed.; Hayes AW, Ed.; Ravan Press: New York, NY, USA, 673.
- Sue R.W. (1994).** Essentials of Nutrition and Diet Therapy (6th edn). *Mosby cy*: St. Louis; 521p.
- Suleiman M. M., Dzenda T. and Sani C. A. (2008).** Antidiarrhoeal activity of the methanol stem-bark extract of *Annona senegalensis* pers. (Annonaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 116 (1), 125– 130.
- Sungkanuparh S., Tanphaichitra D. and Prachartam R. (2003).** Chronic diarrhoea caused by *Cryptococcus neoformans* in a non- human immunodeficiency virus infected patients. *Scandinevian Journal of Infectious Diseases* 32(3): 211-212.
- Sussman M. (1997).** *Escherichia coli* and human disease. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. *Cambridge University Press*: Cambridge, 3-48.
- Tacket C. O. and Sack D. A. (2008).** Cholera vaccines. In vaccine (5th edn). Plotkin SA, Oenstein WA, Offit PA. Saunders-Elsevier ; 127-138.
- Tamokou J.D.D. (2010).** *Albizia adianthifolia, Coula edulis et Vismia rubescens* : étude phytochimique et évaluation des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. *Thèse de Doctorat PhD, Université de Dschang*, 168p.
- Tankeu N.F., Pieme A.C., Biapa N.C.P., Njimou R.J., Moukette M. B., Angelo Chianese A. and Ngogang Y.J. (2016).** *In vitro* organo-protective effect of bark extracts from *Syzygium guineense* var macro carpum against ferric-nitrilo triacetate induced stress in wistar rats homogenates. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16:315.
- Tarr P.I. (1995).** *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clinical Infectious Diseases*, 20: 1-8.
- Tarr PI, Bass DM. and Hecht GA (2009).** Bacterial, viral, and toxic causes of diarrhea, gastroenteritis, and anorectal infections. In T. Yamada. *Textbook of Gastroenterology*. Fifth Ed. Blackwell publishing, , Chap 48, 1157–1224.
- Tasleem Arif, Bhosale JD, Naresh Kumar, Mandal TK, Bendre RS, Lavekar GS. and Rajesh Dabur. (2009).** Natural products – antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11(7): 621-638.

- Taylor D., Green N. and Stout G. (1998).** Biological Science (3rd edn). Cambridge Low price Edition: Cambridge; 235-263.
- Tchokouaha Y.L.R. (2015).** Evaluation de l'activité antiplasmodiale et antileishmaniale de trois plantes du genre *Annona*. *Thèse de Doctorat Ph.D, Université de Yaoundé I*, 199p.
- Tene M., Tane P., Tamokou J.D., Kuate J.R. and Connolly J.D. (2009).** Antimicrobial diterpenoids and triterpenoids from the stem bark of *Croton macrostachys*. *International Journal of Biological and Chemical Science* 3: 538-544.
- Teo S., Strlig D., Thomas S., Hoberman A., Kiorpes A. and Khetani V.(2002).** A 90 days oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*.79, 183 - 196
- Tepperman B.L., Brown J.F., Korolkiewicz R. and Whittle B.J. (1994).** Nitric oxide synthase activity, viability and cyclic GMP levels in rat colonic epithelial cells: effect of endotoxin challenge. *Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics* 271: 1477-1482.
- Thapar N. and Sanderson I.R. (2004).** «Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries». *The Lancet*, n° 363, p. 641-653.
- Theophine C. O., Peter A. A., Adaobi C. E., Maureen O.O., Collins A. O., Frankline N., Ejike O. and Lovelyn I.(2012).** Evaluation of the acute and sub acute toxicity of *Annonasenegalensis* root bark extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*5(4): 277-282.
- Thomas C., Stevenson M. and Riley T.V. (2003).** Antibiotics and hospital acquired *Clostridium difficile* associated diarrhea: a systematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 : 1339-1350.
- Totora G. and Evants L. (1986).** Principles of Human Physiology (2nd edn). Happer and Row publishers: New York-Cambridge; 761.
- Tra BI F. H., G. M. IRIÉ., K. C.C. N'GAMAN et C.H.B. MOHOU. (2008).** Études de quelques plantes thérapeutiques utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle et du diabète : deux maladies émergentes en Côte d'Ivoire. *Sciences & Nature* Vol. 5 N°1 : 39 - 48.
- Traoré Y., Ouattara K., Yéo D., Doumbia I. et Coulibaly A. (2012).** Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *Journal of Applied Biosciences* 58: 4234– 4242.

- Trease GE. and Evans WC. (1996).** *A textbook of Pharmacognosy.14th Edn, Bailliere Tindall Ltd, London, 60-75.*
- Tripathi K.D. (1994).** *Essentials of Medical Pharmacology, Jaypee Brothers Medical Publishers (P), New Delhi, 775.*
- Tsabang N., Tsouh F.P.V., Yamthe T.L.R., Noguem B., Bakarnga-Via I., Dongmo N.M.S. and Boyom F.F. (2012).** Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*,139: 171-180.
- Vergely C. et Rochette L. (2003).** Stress oxidant dans le domaine cardiovasculaire. *Médecine thérapeutique Cardiologie* 1 : 131-139. Volume 5, Issue 4, Pp 277-282.
- Walker A. et Sillams. (1961).** *Les Plantes Utiles du Gabon, Paris.16 p.*
- Widelsky J., Popova M., Graikou K., Glowniak K. and Chinou I. (2009).** Coumarins from *Angelica lucida* L. Antibacterial activities. *Molecule* 14: 2729-2734.
- Wiles T.J., Kulesus R.R. and Mulvey M.A. (2008).** Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*,85: 11-19.
- Williamson EM. (2001).** Synergy and other interactions in phytomedicines.*Phytomedicine*, 8:401–409.
- Wilson M. E. (2005).** “Diarrhea in non-travelers: risk and etiology”. *Clinical Infectious Diseases* 41 (Suppl 8): 541-546.
- Witthoft T., Eckmann L., Kim J.M. and Kagnoff M.F. (1998).** Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells. *American journal of Physiology* 275: 564-571.
- Wong S.S.Y. and Yuen K.Y. (2011).** Changing Epidemiology of Human Mycoses-China and Beyond. *Mycopathologia*, 171(6):383-386.
- Wray C. and Woodward M.J. (1997).** *Escherichia coli* infections in farm animals. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli: mechanisms of virulence. Cambridge University Press: Cambridge, 49-84.*
- Ya C., Gaffney S.H., Lilley T.H. and Hasllam E. (1988).** Carbohydrate-polyphenol complexation. Chemistry and significance of condensed tannins. *Hemingay and karchesy* (eds); 553.
- Yao P. H., Komlan B., Koffi A. G., Damintoti S. K., Yaovi A et Comlan S. (2012).** Evaluation des propriétés antimicrobiennes de quatre plantes de la flore togolaise

utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement des diarrhées infantiles. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 6(6): 3089-3097, December 2012.

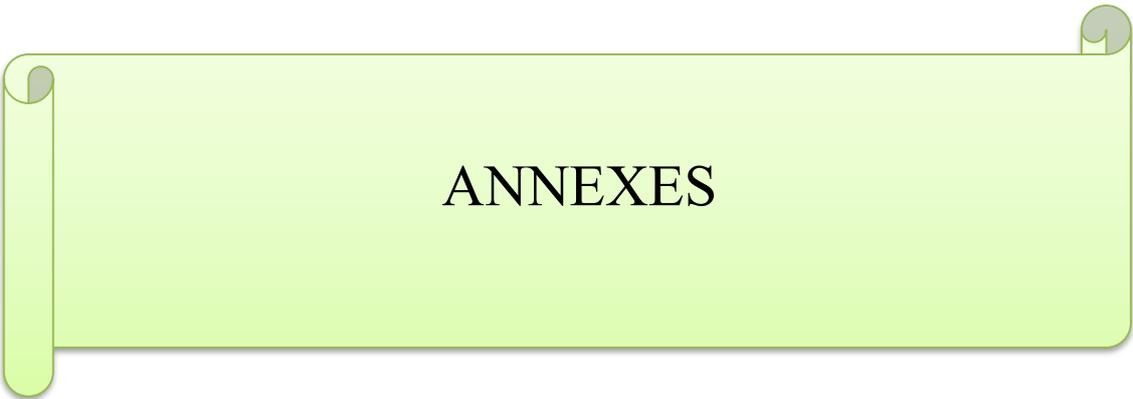
Yegnanarayan R. and Shrotri D. S. (1982). Comparison of antidiarrhoeal activity of some drugs in experimental diarrhea. *Indian Journal of Pharmacology* 14: 293-299.

Yoshio K., Kazuko S., Bunsyo M., Kazunori H., Atsushi I. and Yasuhiro K. (1999). Relationship between antidiarrhoeal effects of Hange shashin-to and its active components. *Phytotherapy Research* 13: 468-473.

You M., Wickramaratne D.\B. M., Silva G.L., Chai H., Chagwedera T.E. and Farnsworth J.M. (1995). Roemerine an aprocaine alkaloid from *Annona senegalensis* that reverses the multidrug resistance phenotype. With cultured cells. *Journal of Natural Products*, 58(4): 598-604.

Zavala M., Pérez C., Vargas R. and Pérez M. (1998). Antidiarrhoea activity of *Waltheria Americana*, *Commelina coelestis* and *althernan repens*. *Journal of Ethnopharmacology* 61: 41-47.

Zhang J-D, Xu Z, Cao Y-B, Chen H-S, Yan L, An M-M, Gao P-H, Wang Y, Jia X-M. and Jiang Y-Y. (2006). Antifungal activities and action mechanisms of compounds from *Tribulus terrestris* L. *Journal of Ethnopharmacology*,103: 76-84.



ANNEXES

ANNEXE I :

COMPOSITION PAR KILOGRAMME D'ALIMENT DES SOURIS ET DES RATS (LANAVET)

Ingrédients	Quantité (g)	Pourcentage (%)
Farine de maïs	600	60,0
Farine de Soja grillé	200	20,0
Farine de poisson	100	10,0
Farine de blé	50	5,0
Farine des squelettes	25	2,5
Poudre de noix de palme	13	1,3
Sel de cuisine	10	1,0
Complexe vitaminé	1	0,1
Huile de table Oilio	1	0,1

ANNEXE II:

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS

Sabouraud Agar

Néopetonedifco	10g
Glucose	20g
Agar	20g
Eau distilléeqsp	1000ml
pH	5-5,6

Eosine Méthylène Blue (EMB) agar

Peptone	10g
Lactone	10g
Eosine	0,4g
Bleu de Méthylène	0,0625g
Hydrogenophosphate de Potassium	2,0g
PH final	7,2
Agar	15,0g

Mueller Hinton

Extrait de viande de boeuf	2,0g
Peptone de Caséine	17,5g
Amidon de maïs	1,5g
Agar	17,0g
pH	7,4

ANNEXE III :

FICHE DE COLLECTE DES DONNÉES SUR LE SCREENING PRIMAIRE DE L'ACTIVITÉ ANTIDIARRHÉIQUE DES FRACTIONS MÉTHANOLIQUES DES ORGANES DE PLANTES VIS À VIS DES RATS DE SOUCHES WISTAR

Groupe/extrait	Poids des rats(g)	H.A.V./E.	H.A.I.	H.Ap.P.D.	T.M.Ap.D. (min)
Contrôle négatif	72	09 H 24	09 H 54	10 H 39	45,00±11,00
	60	09 H 24	09 H 54	10 H 28	
	58	09 H 25	09 H 56	10 H 52	
Amfe	70	12 H 52	13 H 25	14 H 04	48,66±10,59
	59	12 H 53	13 H 26	14 H 13	
	56	12 H 54	13 H 27	14 H 27	
Xabr	64	12 H 56	13 H 28	17 H 38	162,33±96,46
	64	12 H 57	13 H 28	14 H 27*	

	60	13 H 00	13 H 30	16 H 28	
Ambr	80	13 H 05	13 H 36	15 H 04	77,00±15,55
	85	13 H 06	13 H 37		
	84	13 H 07	13 H 37	14 H 43	
Xafe	77	13 H 09	13 H 39	17 H 32	177,33±48,95
	72	13 H 11	13 H 42	16 H 20	
	69	13 H 13	13 H 43	16 H 04	
AnseEc	74	10 H 53	11 H 27	12 H 15	46,33±11,59
	66	10 H 53	11 H 28	12 H 02	
	71	10 H 54	11 H 29	12 H 26	
Ansefe	56	10 H 56	11 H 29	15 H 23	219,50±20,51
	77	10 H 57	11 H 30	14 H 55	
	52	10 H 58	11 H 31	Mortalité 13 H 31	
Ansebr	67	11 H 00	11 H 31	13 H 07	64,00±45,25
	57	11 H 01	11 H 32		
	50	11 H 01	11 H 33	12 H 05	
Lopéramide	50	11 H 51	12 H 23		
	57	11 H 52	12 H 24		
	56	11 H 53	12 H 24		

H.A.V./E. : Heure d'Administration du Véhicule ou de l'Extrait ; H.A.I. : Heure d'Administration de l'Inducteur ; H.Ap.P.D. : Heure d'Apparition de la Première Diarrhée ; T.M.Ap.D. : Temps Moyen d'Apparition de la Diarrhée.

ANNEXE IV :

RECETTE DE FABRICATION FAMILIALE DE LA SRO (Pichard, 2002)

Composition	g/l	Mmol/l	Equivalent
Glucose	20	111	4 cuillers à soupe de sucre
Chlorure de Sodium	3,5	Na : 90	¾ de cuiller à café de sel fin
Chlorure de Potassium	1,5	K : 20	1 verre de jus d'orange ou de banane
Bicarbonate	2,5	Hco ₃ : 30	1 cuiller à café de bicarbonate de cuisine
Eau bouillie 1 l			

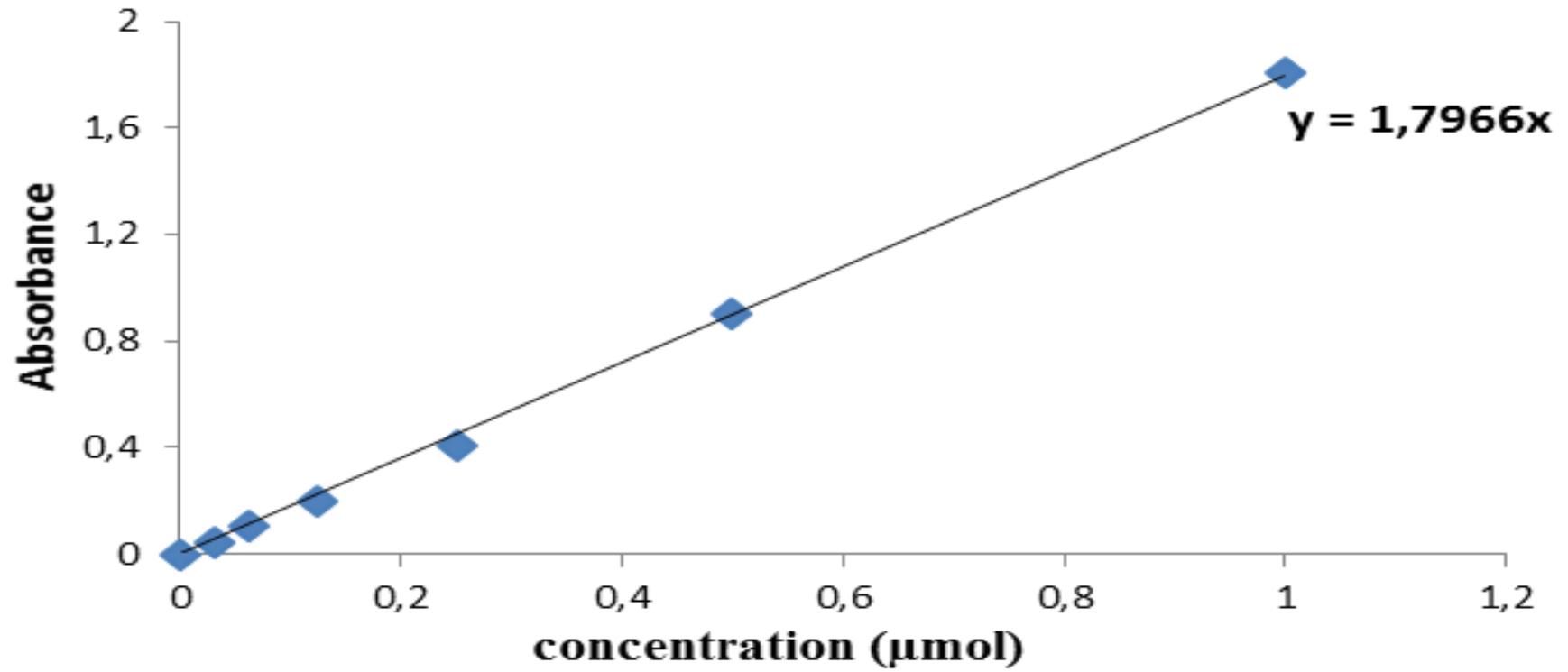
ANNEXE V :

TABLEAU DES PRINCIPALES CLASSES DE COMPOSÉS BIOACTIFS D'ORIGINE VÉGÉTALE ET LEURS MODES D'ACTION (COWAN, 1999)

Classes	Sous-classe	Exemple	Mécanisme d'action
Composés phénoliques	Phénols simples	- Catéchol - Epicothéchine	- Rupture des membranes - liaison à l'adhésine
	Acides phénoliques quinones	-Acide cinnamique - Hypericine	- inactivation des enzymes - Complexe la paroi cellulaire
	Flavonoïdes	-Chryisine	-Complexe la paroi cellulaire
	Flavones		- liaison à l'adhésine
	Tanins	Ellagitanine	- Rupture des membranes - Liaison à l'adhésine - Inhibition enzymatique - Liaison aux protéines - Complexe la paroi cellulaire
Coumarines	Wafarine	- Interaction avec le DNA eucaryote (activité antivirale)	
Alcaloïdes		Berberine piperine	- Action sur la paroi cellulaire et /ou le DNA
Terpénoïdes huiles essentielles			- Rupture des membranes

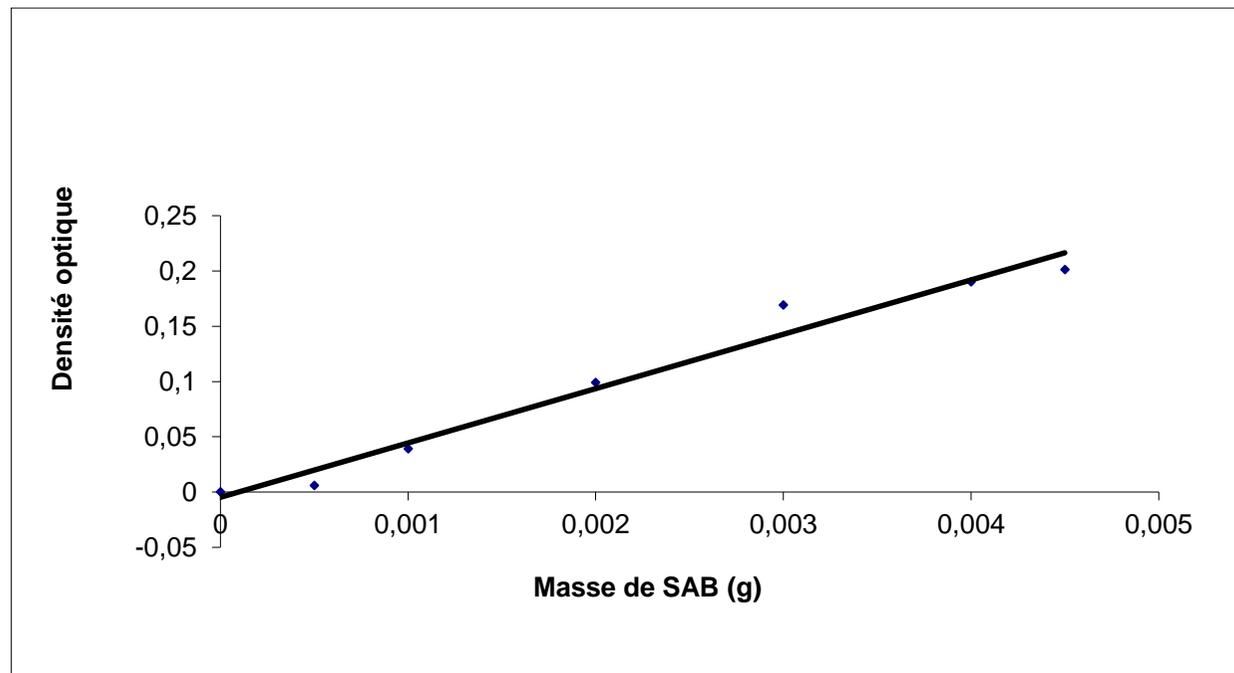
ANNEXE VI :

Courbe d'étalonnage du dosage de NO



ANNEXE VII :

Courbe d'étalonnage des protéines



ANNEXE VIII :
RÉSULTATS DES TESTS ANTIBACTÉRIENS PRÉLIMINAIRES

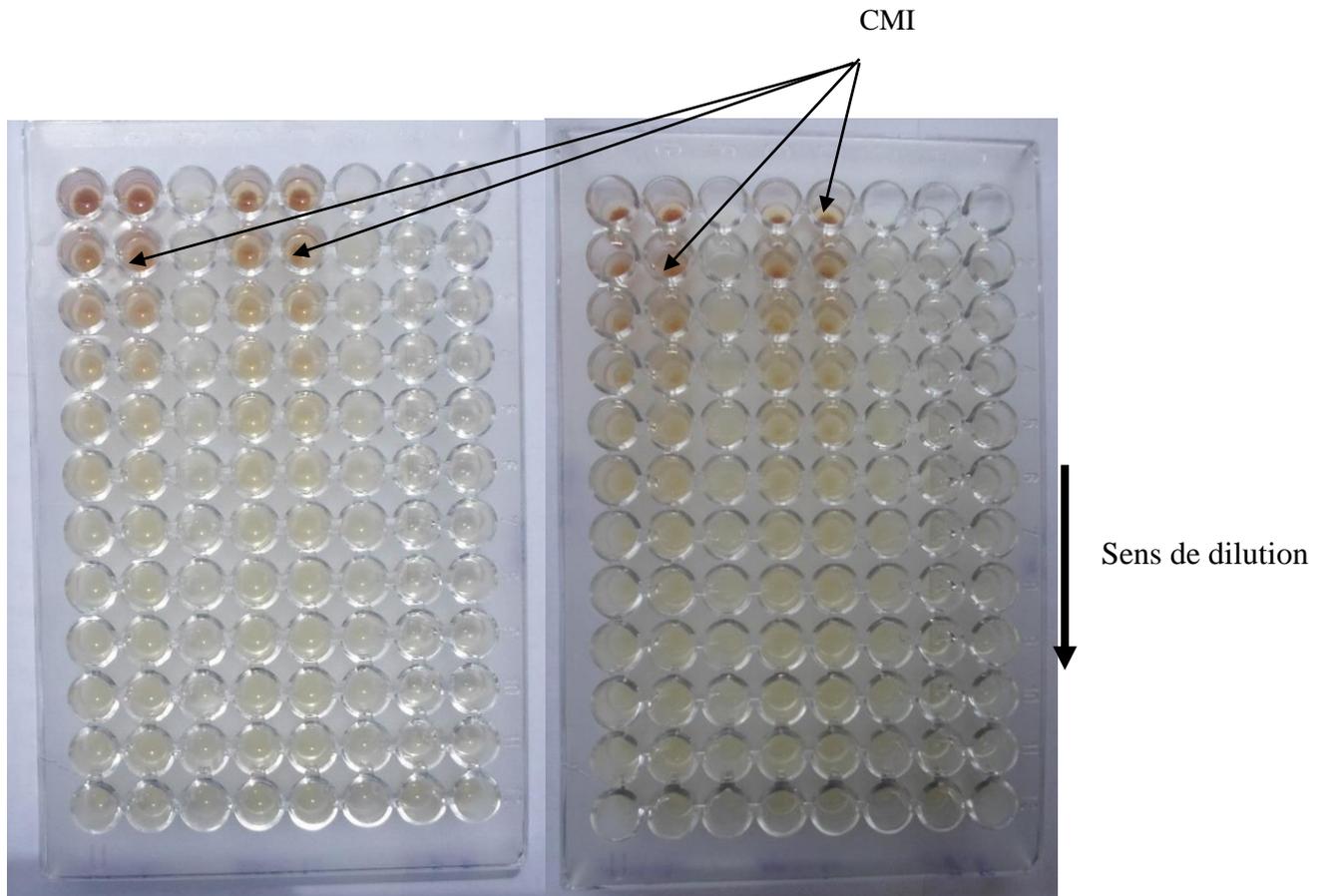
Souches testées	Diamètre des zones d'inhibition															
	Gm	Xafe etoh	Xabretoh	Ambretoh	Amfe etoh	AmEceetoh	Ambr Meoh	Xafe Meoh	Ambr Meoh	Ansefe Meoh	Amfe Meoh	Ansefe CH2Cl2	XafeMeOH	Anse brMeOH	AmEcMeOH	Anse EcMeOH
<i>E.coli</i>	23/24/24	-	18/18/17	12/13/14	-	-	22/24/23	11/11/10	12/11/13	24/25/26	-	11/11/11	11/13/11	22/24/22	17/18/17	23/23/21
<i>Klebsielle pneumoniae</i>	29/28/28	-	10/11/11	11/13/12	10/10/10	-	15/14/15	-	-	15/15/15	-	-	11/11/11	19/18/20	16/17/17	15/16/17
<i>Acinetobacter calcoacilicus</i>	28/28/29	-	-	10/10/10	-	11/10/10	13/14/12	-	13/13/14	12/13/13	-	-	-	15/14/15	-	16/16/16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24/25/25	-	10/10/10	12/11/11	09/09/08	-	15/14/15	08/08/09	08/08/09	18/19/17	-	-	10/11/12	15/15/15	09/09/09	15/15/16
<i>Staphylococcus aureus</i>	25/25/24	-	-	-	-	-	10/10/09	-	-	10/10/10	-	-	-	12/13/12	09/10/11	11/12/10

Gm : Gentamicine(-) : Absence des zones d'inhibition Concentration : 50 µg/ml

Masse d'extrait déposée sur chaque disque : 500 µg ; Méthode de disque utilisée

ANNEXE IX :

Détermination des CMI des levures sur 2 microplaques



ANNEXE X :

Rendements d'extraction des différents organes d'*A. senegalensis*, *A. mannii* et *X. africana*

Plantes	Organes	Nature	Codes	Rendement (%)
<i>A. senegalensis</i>	Feuilles	Extrait éthanolique	AnsefeEtOH	16,720
		Fraction aqueuse	AnsefeH ₂ O	1,690
		Fraction méthanolique	AnsefeMeOH	0,050
	Brindilles	Extrait éthanolique	AnsebrEtOH	9,230
		Fraction aqueuse	AnsebrH ₂ O	2,170
		Fraction méthanolique	AnsebrMeOH	0,028
	Ecorces	Extrait éthanolique	AnseEcEtOH	8,170
		Fraction aqueuse	AnseEcH ₂ O	0,830
		Fraction méthanolique	AnseEcMeOH	0,024
<i>A. mannii</i>	Feuilles	Extrait éthanolique	AmfeEtOH	5,300
		Fraction aqueuse	AmfeH ₂ O	0,540
		Fraction méthanolique	AmfeMeOH	0,016
	Brindilles	Extrait éthanolique	AmbrEtOH	2,960
		Fraction aqueuse	AmbrH ₂ O	0,680
		Fraction méthanolique	AmbrMeOH	0,009
	Ecorces	Extrait éthanolique	AmEcEtOH	1,380
		Fraction aqueuse	AmEcH ₂ O	0,140
		Fraction méthanolique	AmEcMeOH	0,004
<i>X. africana</i>	Feuilles	Extrait éthanolique	XafeEtOH	6,840
		Fraction aqueuse	XafeH ₂ O	0,700
		Fraction méthanolique	XafeMeOH	0,020
	Brindilles	Extrait éthanolique	XabrEtOH	1,050
		Fraction aqueuse	XabrH ₂ O	0,100
		Fraction méthanolique	XabrMeOH	0,003

An= *Annona*; *Ansefe* =*Annona senegalensis* feuilles; *Ansebr* = *Annona senegalensis* brindilles; *AnseEc* =*Annona senegalensis* écorces; *Am* = *Anonidium mannii*; *Amfe* =*Anonidium mannii* feuilles; *Ambr* =*Anonidium mannii* brindilles; *AmEc*= *Anonidium mannii* écorces; *Xa* = *Xylophia africana*; *Xafe* = *Xylophia africana* feuilles; *Xabr* = *Xylophia africana* brindilles; *EtOH* = *Ethanol*; *MeOH*= *méthanole*; *H₂O*= *Eau*.



PUBLICATIONS



ISSN (E): 2320-3862
ISSN (P): 2394-0530
NAAS Rating 2017: 3.53
JMPS 2017; 5(5): 289-294
© 2017 JMPS
Received: xx-07-2017
Accepted: xx-08-2017

Kengni Yande H

Antimicrobial and Biocontrol Agents Unit (AmBeAU), Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal Plants Studies, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon.

Toghueo KRM

Antimicrobial and Biocontrol Agents Unit (AmBeAU), Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal Plants Studies, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon.

Hounda Fokou JB

Antimicrobial and Biocontrol Agents Unit (AmBeAU), Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal Plants Studies, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon.

Adamou Souleymanou

Laboratory of Biotechnology, Biotechnology center, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon. Nkolbisson, Cameroon.

Ngouana V

Antimicrobial and Biocontrol Agents Unit (AmBeAU), Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal Plants Studies, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon.

Fekam Boyom F

Antimicrobial and Biocontrol Agents Unit (AmBeAU), Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal Plants Studies, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon.

Correspondence

Kengni Yande H

Antimicrobial and Biocontrol Agents Unit (AmBeAU), Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal Plants Studies, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon.

Phenol content and Antioxydant activity of crude extracts and fractions from *Annona senegalensis*

Kengni Yande H, Toghueo KRM, Hounda Fokou JB, Adamou Souleymanou, Ngouana V and Fekam Boyom F

Abstract

This study was designed to analyse the antioxidant potential and phenol content of ethanol extract and fractions from *Annona senegalensis*, a medicinal plant used worldwide against several oxidative stress mediated disorders. The antioxidant activities were determined by three methods namely DPPH radical scavenging assay, ferric reducing antioxidant power (FRAP) and nitric oxide inhibition (NO). The antioxidant activities ranged from IC₅₀ 1.5 to 167.00µg/ml for DPPH, from 0.53->200µg/ml for nitric oxide and from 2.07->200µg/ml for ferric chelation power. Phytochemical screening of leaves ethanol extract demonstrated the presence of alkaloids, phenol, terpenoids, tannins, steroids, flavonoids and glucosides while the HPLC profile revealed the presence of phenolic acids (o/p-coumaric acid; syringic acid) and flavonoids (vanillic acid). Overall, the results of this investigation demonstrated that the extracts from *Annona senegalensis* are potential sources of antioxidant metabolites needed to manage stress mediated disorders.

Keywords: *Annona senegalensis*, antioxidant activities, polyphenol contents, HPLC.

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are relatively unstable oxygen-bearing free radicals having a single unpaired electron in an outer orbit. They have been taught to be generated through exogenous factors such as tobacco smoke, ionizing radiation, and environmental pollutants as well as endogenous factors in nearly all eukaryotic cells during the course of normal metabolism, or disease development, and in response to tissue injury [1, 2].

In healthy individuals, the production of free radicals is balanced by the antioxidant defence system. They are formed at a reasonable concentration as necessary intermediates in a variety of normal biochemical reactions and are involved in defence mechanisms against pathogenic microorganisms and detoxification of harmful molecules [3, 4]. However, oxidative stress is generated when equilibrium between antioxidant and oxidant is broken and this lead to free radical or other reactive ROS generation as a result of a depletion of antioxidant levels [5, 2].

In almost all physio pathological conditions the amount of free radical produced is very high and the oxidative stress that results from this overproduction cause damage on vital biomolecule such as DNA, protein and lipid. In this condition, internal antioxidants become insufficient for balancing of free radicals so external antioxidants are needed to prevent the oxidative damages by directly reacting with ROS, scavenging them and/or chelating catalytic metal ions [6]. External antioxidants from natural origin are growing interest in preventing the destructive processes caused by oxidative stress. They are the alternative to synthetic antioxidants in counteracting the free radicals associated diseases [7] such as cancer, inflammation, Alzheimer and others [8, 9]. The interest in plants-based human health care emanates from their long use in folk medicines as well as their prophylactic properties, especially in developing countries. Plant extracts or their putative secondary metabolites have served as antioxidants in phytotherapeutic medicines to protect against various oxidative related diseases for centuries [10]. These trends have motivated the current tendency to replace synthetic phenols like Butylated hydroxyanisole (BHA), Butylated hydroxyl toluene (BHT) etc. with phenolic compounds extracted from natural sources with comparable antioxidant power and better safety attributes [11].

Nowadays, a large number of medicinal plants have been investigated for their antioxidant properties. Studies on herbal plants, vegetables, and fruits have indicated the presence of antioxidants such as, flavonoids, tannins, and proanthocyanidins. This chemical abundance of

medicinal plants may be responsible for their curative effect against several diseases [12]. Numerous reports have revealed positive and significant correlation between the polyphenol content of given plant extracts and their antioxidant properties [13, 14]. *A. senegalensis* used in ethnomedicine against diarrhea, joints and respiratory diseases, conjunctivitis, wounds, snakebites, trypanosomiasis, jaundice, hemorrhoids, feminine barrenness, convulsions, ovarian cancer, fever, and asthenia [15]. Moreover, the phytochemical investigation of extracts from these Annonaceae species, widely distributed in Cameroon [16] has revealed a great diversity of phenolic compounds including epicatechin, catechin, rutin, isoquercitrin, anthocyanosides, tannins, as well as some saponosides, carotenoids, sterols, triterpenes, alkaloids, and cardiac glycoside, known for their antioxidant potential [17, 13, 14]. As mean to unveil the antioxidant profile as well as potent related bioactive phenolic, this study was designed to determine the antioxidant and the phenolic content of ethanol extracts and fractions from *A. senegalensis*.

2. Materials and methods

2.1 Plant collection and extracts preparation

Leaves, twigs, and bark of *A. senegalensis* were collected at Balamba (Mbam and Inoubou Division) centre region of Cameroon, on the 25th April 2015 and identified at the National Herbarium of Cameroon where voucher specimens were deposited under the identification numbers 32071/HNC. Each plant part was cut into small pieces, dried at room temperature and ground to fine powder. One thousand grams of powders for each plant part were macerated in 95% ethanol for 72 hours at room temperature. The ethanol extracts were evaporated to dryness under vacuum using a rotary evaporator (Rotavapor Buchi, Switzerland) and the solid residue was weighed. The crude extracts were subjected to liquid-liquid partition following the protocol described by Alali *et al.* [18]. The extraction yields were calculated as a ratio of plant extracts and plant powder. Crude extracts and fractions were stored at 4 °C until use.

2.2 Preparation of stock solution

Prior to each experiment, a stock solution of 1 mg/mL was prepared by dissolving the above prepared crude extracts and fraction in appropriated amount of 10% DMSO. From the stocks, serial dilutions were made to yield 25, 50, 100 and 200 µg/mL. The total phenolic content as well as the antioxidant properties of extracts was assessed at 1 mg/mL.

2.3 Phytochemical screening of crude extracts

Phytochemical screening of extracts for the presence of alkaloids, anthocyanines, anthraquinones, glycosides, flavonoids, saponins, tannins, phenols, steroids and terpenoids was carried out following Harbone *et al.* [19] protocol.

2.4 Determination of the polyphenolic content by HPLC

Polyphenolic content was analysed by HPLC Waters 1525 system, fitted with a XTerra RP 18 column (4.6x 15mm 3.5µm, Waters, USA). Samples were prepared in pure water at 1mg/ml and centrifuged at 10000 rpm for 10 min. The obtained supernatant was filtered through a cellulose acetate membrane filter (0.45 µm, Schleicher & Schuell). 100 µL of extracts filtrate and standards (Gallic acid, Benzoic acid, Caffeic acid, Syringic acid, Vanillic acid, Apigenin, Catechin, Eugenol, O-Coumaric, P-Coumaric, O-tyrosol, Quercetin, Rutin, Tyrosol) were injected into the HPLC system. The column temperature was set at 40 °C. The mobile phase

consisted of acetic acid at 1 % in pure water (solvent A) and 5% acetic acid in pure methanol (solvent B). The elution was performed following the gradient 0% to 100% of solvent B in 50 minutes.

2.5 Antioxidant activity of crude extracts and fractions

The antioxidant activity of ethanol extracts and methanol fractions was investigated using the DPPH scavenging assay, the ferric reducing power assay and the nitric oxide (NO) radical scavenging assay.

2.5.1 DPPH radical scavenging assay

The radical-scavenging activity of crude extracts, fractions and standard antioxidant compound was measured using 1,1-diphenyl-2-picryl hydroxyl (DPPH). Briefly, 100 µL of each fraction (dissolved in methanol or DMSO) was mixed with 900 µL DPPH solution (dissolved in methanol). The mixture was homogenized, incubated for 1 hour at room temperature and reading was taken at 517 nm. The inhibition percentage was calculated using the following formula:

$$\text{DPPH Scavenging activity (\%)} = (A-B)/A \times 100$$

Where, A is the absorbance of control and B is the absorbance of sample at 517 nm.

2.5.2 Ferric reducing antioxidant power assay

The capacity of each plant extracts to reduce the ferric–ferricyanide complex to the ferrous - ferricyanide complex was determined as described by Batool *et al.* [20] with slight modifications. Briefly, 2.5 ml of different plant extract solutions were mixed with 2.5 ml of phosphate buffer (PH-6.6) and 2.5 ml of 1% potassium ferricyanide. The mixture was incubated at 50°C for 20 min. After incubation 2.5 ml of 10% TCA was added to the mixture and centrifuged at 10000 rpm for 10 min. 2.5 ml of supernatant was mixed with 2.5 ml of distilled water and 0.5 ml of 0.1% ferric chloride. Then, the absorbance was measured at 510 nm by using UV spectrophotometer. Increment of the absorbance of the reaction mixture indicates increased reducing power. Similar method was adopted for Ascorbic acid used as a positive control. All the tests were performed in triplicates.

2.5.3 Nitric oxide (NO) radical scavenging assay

The nitric oxide radical scavenging assay was performed following the procedure afforded by Panda *et al.* [21]. Griess reagent was prepared by mixing equal amounts of 1% sulphanilamide in 2.5% phosphoric acid and 0.1% naphthylethylenediaminedihydrochloride in 2.5% phosphoric acid immediately before use. A volume of 0.5 mL of 10 mM sodium nitroprusside in phosphate buffered saline was mixed with 1 mL of the different concentrations of extracts (25, 50, 100 and 200 µg/mL) and incubated at 25°C for 180 minutes. Extracts were mixed with an equal volume of freshly prepared Griess reagent. Control without extracts with an equal volume of buffer were prepared in a similar manner. The colour tubes contained ethanol extracts at the same concentrations with no sodium nitroprusside. A volume of 150 µL of the reaction mixture was transferred to a 96-well plate. The absorbance was measured at 546 nm using a SpectraMax Plus UV-Vis microplate reader (Molecular Devices, GA, USA). Gallic acid was used as the positive control. The percentage inhibition of the extract and standard was calculated and recorded. The percentage nitrite radical scavenging activity of the ethanol extracts and gallic acid were calculated using the following formula:

Nitrite oxide Scavenged (%) = (A-B)/A × 100

Where A is the absorbance of control and B is the absorbance of sample or standard.

3. Results

3.1 Antioxidant results

DPPH scavenging activity of extracts

The dose-response curve of DPPH radical scavenging activity of crude ethanol extracts and methanol fractions of *A. senegalensis*, compared to gallic acid is shown in figure 1. It is observed that ethanol extract of leaves of *A. senegalensis*

(AnsefeEtOH) exhibited higher radical scavenging activity as compared to the overall tested extracts. At 200µg/ml, a 60% scavenging ability activity could be registered with all tested extracts while at the same concentration, that of the gallic acid culminated at 94.85%. Moreover, the scavenging IC₅₀ values represented in table 1 show the same tendency, by pointing out the ethanol extract from leaves (IC₅₀1.50µg/ml) of *A. senegalensis*, as the outstanding one followed by ethanol extract of twigs (IC₅₀4.50µg/ml) and bark (IC₅₀5.10µg/ml). Overall, ethanol extracts of all plant parts were found more potent than their methanol counterparts (p≤0.05).

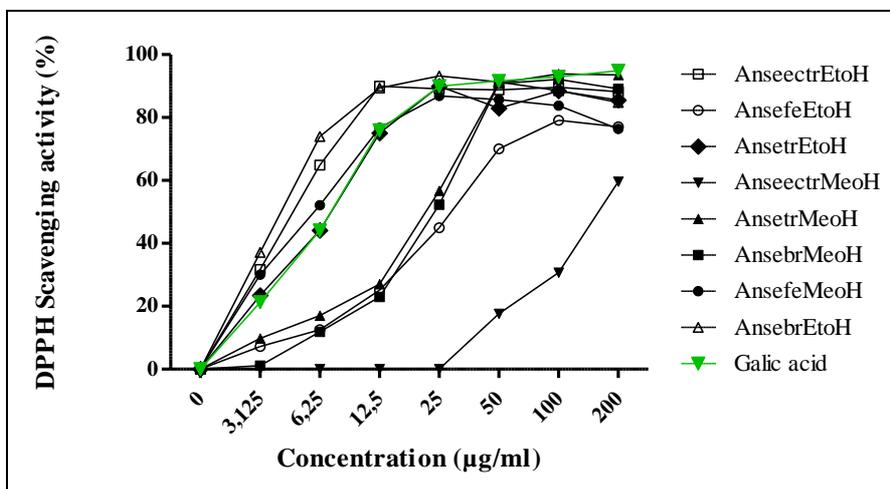


Fig 1: Free radical scavenging potential of *A. Senegalensis* extracts

3.2 Nitric oxide scavenging and ferric chelation potentials of extracts

The nitric oxide activity of tested extracts was expressed by mean of IC₅₀. These ranged from 0.53->200µg/ml. The Least Significant Different (LSD) test revealed that ethanol extract of twig of *A. Senegalensis* with IC₅₀ of 0.53 µg/ml was the most efficient followed by ethanol extract of leaves (IC₅₀ 0.89 µg/ml) (p≤0.05).

3.3 Ferric chelation potentials of extracts

It's obvious from Table 1 that the tested extracts could successfully chelate ferric ions in reaction mixture. The chelation responses being variable from a given extract to another at 5% significance level. Overall, the chelation power ranged from 2.07->200µg/ml. Ethanol extract of leaves being once more the most active. Overall, methanol fractions were found very less potent than their respective crude extracts (P> 0.05).

Table 1: DPPH, Nitrite radical scavenging and Ferric chelating activities of *A. senegalensis* extracts.

Extracts	DPPH scavenging activity IC ₅₀ (µg/ml)	Nitricoxide scavenging activity IC ₅₀ (µg/ml)	Fe ²⁺ chelationactivity IC ₅₀ (µg/ml)
AnsefeMeOH	6.40±1.13	1.23±0.001	>200
AnsebrMeOH	22.40±1.41	0.92±0.02	>200
Anse EctrMeOH	167.00±8.20	>200	>200
AnsefeEtOH	1.50±0.10	0.89±0.19	2.07±0.86
Anse Ectr EtOH	5.10±0.14	>200	>200
AnsebrEtOH	4.50±0.14	0.53±0.0007	49.51±0.41
galicacid	0.77±0.01	**	**

**not tested

Phytochemical screening of crude extracts

Table 2: Phytochemicals screening of *Annona senegalensis* extracts.

Phytochemicals	Ansebr EtOH	Ansefe EtOH	AnseEctrEtOH
Alkaloids	-	+	-
Glucosides	+	+	+
Flavonoids	+	+	+
Steroids	-	+	-
Tannins	+	+	+
Saponins	-	-	-
Terpenoids	+	+	+
Phenol	+	+	+
Anthocyanins	-	-	-
Anthraquinons	-	-	-

Phytochemical screening of potent extracts revealed the presence of alkaloids, phenol, terpenoids, anthocyanins, saponins, tannins, steroids, flavonoids and glucosides.

3. HPLC analysis of extracts

The quantification of phenolic compounds content in plant extracts was done via calibration with standards. Results are

expressed in mg/100g of dry sample. As outlined on HPLC profile exemplified in Fig. 2 and Table 2, ethanol extract from leaves of *A. senegalensis* demonstrated the presence of phenolic acids (o/p-coumaric acid; syringic acid, vanillic acid) and flavonoids (vanillic acid) at different concentration. Coumaric acid was found to be the most abundant in the tested extract.

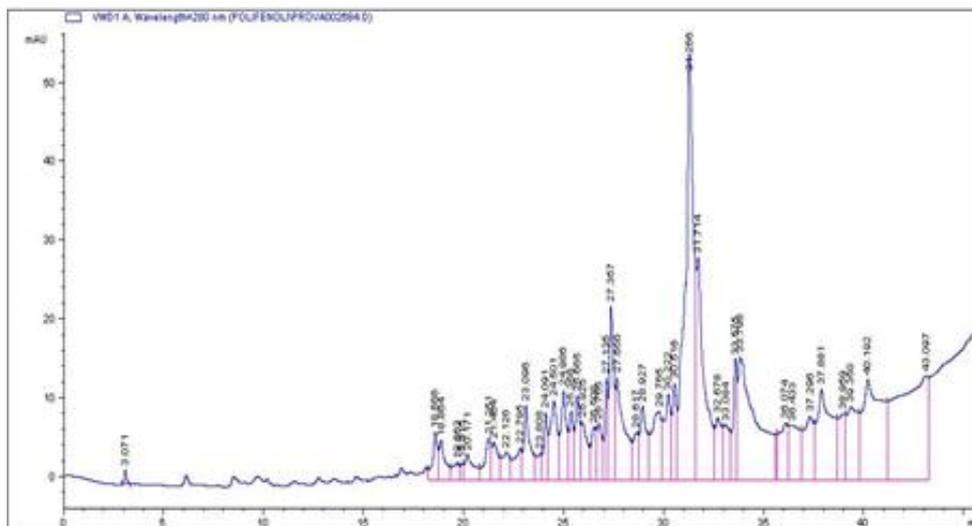


Fig 2: HPLC profile of extracts of AnsefeMeOH

Table 2: Amount of phenolic compounds in methanol fraction of leaves of *A. senegalensis*

Phenols standard		AnsefeMeOH	
Names	Retention time (min)	Area (mUA)	Concentration (mg/g DW)
Gallicacid	14.380	**	**
Benzoicacid	19.100	**	**
Caffeicacid	25.670	**	**
Syringicacid	25.550	163.677	4.058
Vanillicacid	25.270	131.111	4.188
Apigenin	33.490	**	**
Catechin	23.480	**	**
Eugenol	29.430	**	**
O-Coumaric	25.110	225.713	6.968
P-Coumaric	30.520	186.233	3.646
O-tyrosol	21.910	**	**
Quercetin	42.190	**	**
Rutin	29.450	**	**
Tyrosol	21.770	**	**

**not found

Discussion

Medicinal plants and other herbs which contain biological active compounds are widely used in food and cosmetic and drug industries, or as precursors in the synthesis of new products with specific bioactive properties [22]. *A. senegalensis*, a multipurpose medicinal plant found to exhibit several biological activities including antimicrobial can be an interesting candidate for phytomedicine formulation [15]. Therefore, this study was designed to investigate the antioxidant potential of ethanol extracts and methanol fractions using DPPH radical scavenging, nitric oxide scavenging and ferric chelation assay.

The screening of plant extracts using the DPPH free radical method have proved to be effective for the selection of those which could have an antioxidant activity [23]. The extracts involved in this study had revealed some scavenging potentials in function of the plant part. The ethanolic crude

extract was the most efficient. These results go in the same line than that of Ajboye *et al* [24]. In fact, these authors had obtained an IC₅₀ of 400 µg/ml for DPPH scavenging activity from the aqueous extracts from leave of *A. senegalensis*. This difference in the results can be attributed to the extraction solvent. Furthermore, it can be suggested that the antioxidant compound from the leaves of this plants are non-polar as the activity were loose during fractionation. The phytochemical screening reveals the presence of Terpenoids, Polyphenols and Heterosides in all the plant parts. The alkaloids were detected only in the leaves extract. These results are close similar to that reported by Okoye *et al* [25] on methanol-methylene chloride extract from the roots bark of *A. senegalensis*.

The DPPH scavenging mechanism of extracts, thought to be due to their hydrogen donating ability is correlated with the presence of hydroxyl groups on the antioxidant molecule [26]. In the present study among all the extracts and fractions tested, ethanol extract of leaves (AnsefeEtOH) showed significantly higher inhibition percentage and positively correlated with total phenolic content. Nitric oxide is a potent pleiotropic mediator of various physiological processes. It is a diffusible free radical, which plays many roles as an effectors molecule in diverse biological systems [27]. Nitric oxide radical scavenging activity of various extracts of *A. senegalensis* was presented in table 1. All the extracts tested effectively reduced the generation of nitric oxide from sodium nitroprusside. AnsebrEtOH (IC₅₀ 0.53 µg/ml) showed highest nitric oxide radical inhibition followed by AnsefeEtOH (IC₅₀ 0.89 µg/ml) and AnsebrMeOH (IC₅₀ 0.92 µg/ml).

Iron is essential for life as it is required for oxygen transport, respiration and for activity of many enzymes. The ferric reducing power of extracts/compounds is determined by the decrease in the red color ferrozine-Fe²⁺ complex indicating high radical scavenging activity of the compound. Fe (III) reduction is often used as an indicator of electron donating activity, which is an important mechanism of phenolic antioxidant action [28]. The reducing ability of a compound

generally depends on the presence of reductones (antioxidants), which exert the antioxidant activity by breaking the free radical chain by donating a hydrogen atom [29]. Overall, from this study, the tested extracts showed chelation power with IC₅₀ ranged from 2.07->200µg/ml, Ethanol extract of leaves being the most active. This potent extract can therefore be used to inhibit lipid peroxidation by stabilizing the transition metals [30] and stabilized the oxidized form of the metal ion [31].

The above antioxidant potentials of ethanol extracts of leaves of *A. senegalensis* can relate to the phenolic content. In fact, the phytochemical screening and HPLC analysis revealed the presence of several phenolic compounds including phenol (o/p-coumaric acid; syringic acid), anthocyanins, tannins, and flavonoids (vanillic acid). Moreover, he has been reported that the antioxidant activity of plant extracts increased proportionally to the polyphenol content [32].

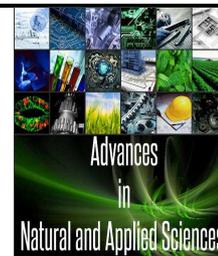
Conclusion

The results of this study suggest that the plant extract from *A. senegalensis* contains phytochemical constituents that are capable of donating hydrogen to a free radical to scavenge the potential damage.

References

- Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL, Dikalov S, Chilian W, Chen YR *et al.* Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: A scientific statement from the American Heart Association. *Circ. Res.* 2016; 119:e39-e75.
- Areti A, Ganesh V, Naidu V, Kuma A. Oxidative stress and nerve damage: Role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. *Redox Biol.* 2014; 2:289-95.
- Verbon E, Post J, Boonstra J. The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. *Gene.* 2012; 511:1-6.
- Rizzo A, Berselli P, Zava S, Montorfano G, Negroni M, Corsetto P *et al.* Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complement Altern Med.* 2012; 12:221-32.
- Aprioku JS. Pharmacology of Free Radicals and the Impact of Reactive Oxygen Species on the Testis. *J. Rep. Infert.* 2013; 14:158-172.
- Buyukokuroglu ME, GulcinI, OktayM, Kufre- viogluOI. *In vitro* antioxidant properties of dantrolene sodium, *Pharmacological Research.* 2001; 44(6):491-495.
- Zengin G, Cakmak YS, Guler GO, Aktumsek A. Antioxidant properties of methanolic extract and fatty acid composition of *Centaurea urvillei* DC. subsp. *hayekiana* Wagenitz. *Rec Nat Prod.* 2011; 5:123-132.
- Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2003; 48:1-19.
- Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr.* 2003; 133(Suppl 3):933S-940S.
- Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 1996; 16:33-50.
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Sineiro J, Dominguez H *et al.* Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry.* 2001; 72:145-171.
- Gulcin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol.* 2012; 86:345-391.
- Abotoalebian Mehrdad, Javad Keramat, Mahdi Kadivar, Farhad Ahmadi, Mahnaz Abdinian. Comparison of total phenolic and antioxidant activity of different *Mentha spicata* and *M. longifolia* accessions *Annals of Agricultural Science.* 2016; 61:175-179.
- Fitriansyah SN, Irda Fidrianny, Komar Ruslan. Correlation of Total Phenolic, Flavonoid and Carotenoid Content of Sesbaniasesban (*L. Merr*) Leaves Extract with DPPH Scavenging Activities. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research.* 2017; 9(1):89-94.
- Alqasim Mustapha. *Annona senegalensis* Persoon: A Multipurpose shrub, its Phytotherapeutic, Phytopharmacological and Phytomedicinal Uses. *International Journal of Science and Technology.* 2013; 2:12.
- Leboeuf M, Cave A, Bhaumik BK, Mukherjee R. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry.* 1982; 21:2783-2793.
- Potchoo Y, Guissou I, Lompo M, Sakie E, Yaro B. Antioxydant activity of aqueous, methanol and ethyl acetate extract of leaves of *Annona senegalensis* Pers from Togo versus the one originates from Burkina Faso. *Inte. J of Pharmacology.* 2008; I(1):1-5.
- Alali FQ, Lui XX, McLaughlin JL. Annonaceous acetone: Recent progress. *JNatProd.* 1999; 62:504-540.
- Harbone JB. *Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plants analysis.* 2nd edition. Chapman and Hall, London. 1984; 1(19):37-168.
- Batool F, Sabir MS, Rocha JB, Shah AS, Saify SZ, Ahmed DS *et al.* Evaluation of antioxidant and free radical scavenging activities of fruit extract from *Zanthoxylum alatum*: A commonly used spice from Pakistan. *Pak. J Bot.* 2010; 42:4299-4311.
- Panda BN, Raj AB, Shrivastava NR, Prathani AR. The evaluation of nitric oxide scavenging activity of *Acalypha indica* Linn Root, *Asian Journal Research Chemistry.* 2009; 2(2):148-150.
- Ana-Viorica Pop, Maria Tofană, Sonia A Socaci, Dan Vârban, Melinda Nagy, Maria-Doinița Borș *et al.* Evaluation of Antioxidant Activity and Phenolic Content in Different *Salvia officinalis* L. Extracts. *Bulletin UASVM Food Science and Technology,* 72(2):20
- Benzie IFF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1999; 47(2): 633-636.
- Ajboye TO, Yakubu MT, Salau AK, Oladiji AT, Akanji MA, Okogun JI *et al.* Antioxidant and drug detoxification potential of aqueous extract of *Annona senegalensis* leaves in carbon tetrachloride-induced hepatocellular damage. *Pharmaceutical Biology.* 2010; 48(12):1361-1370. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.483247>.
- Okoye TC, Akah PA, Okoli CO, Ezike AC, Omeje EO, Odoh UE *et al.* Antimicrobial Effects of a Lipophilic Fraction and Kaurenoic Acid Isolated from the Root Bark Extracts of *Annona senegalensis*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/831327>
- Dudonné S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Merillon M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(5):1768-74.

27. Miller MJ, Sadowska-Krowicka H, Chotinaruemol S, Kakkis JL, Clark DA. Amelioration of chronicileitis by nitricoxide synthase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993; 264:11-16.
28. Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Fazelian M, Eslami B. *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of *Diospyros lotus* and *Pyrusboissierian* a growing in Iran. *Pharmacognosy Magazine.* 2009; 4:123-127.
29. Meir S, Kanner J, Akiri B, Hadar SP. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative systems of various senescing leaves. *J Agric Food Chem.* 1995; 43:1813-1817.
30. Angelo AJ. Lipidoxidation in food, ACS Symposium Series, American Chemical Society Washington DC: 1992; 500.
31. Gordon MH. The mechanism of antioxidant action *in vitro*, In: Hudson BJB (editor), *Food antioxidants.* Elsevier Applied Science London. 1990, 1-18.
32. Tankeu Francine Nzufu, Constant Anatole Pieme, Cabral Prosper Biapa Nya, Romain Jacques Njimou, Bruno Moukette Moukette, Angelo Chianese *et al.* *In vitro* organo-protective effect of bark extracts from *Syzygium guineense var macrocarpum* against ferric-nitrilo triacetate induced stress in wistar rats homogenates. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2016; 16:315.



In-Vitro Antifungal Activity of Methanolic Fractions of Two Cameroonian Medicinal Plants: *Anonidium Mannii* and *Xylopia Africana* (Annonaceae)

Kengni Yande Hubert,¹ Tsouh Fokou Patrick Valere,¹ Hzounda Fokou Jean Baptist,^{1,2} Tchokouaha Yamthe Lauve Rachel,¹ Zeuko'o Menkem Elisabeth,¹ Ngouana Vincent,¹ Fekam Boyom Fabrice

¹Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal Plants Studies, Department of Biochemistry, University of Yaoundé1, Cameroon P.O Box 812 Yaoundé, Cameroon

²Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies (IMPM), Yaoundé, Cameroon

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 October 2015

Accepted 22 November 2015

Available online 29 November 2015

Keywords:

Anonidium manii, *Xylopia africana*, acetogenins, antifungal, methanolic fractions.

ABSTRACT

The increase in fungal infections, the development of resistances and limited access of the population to antifungal drugs make fungal infections a real public health problem. Therefore, there is an urgent need to develop new bioactive substances. This work aimed at evaluating the *in vitro* antifungal activities of the polar fractions of *Anonidium manii* and *Xylopia africana*. These fractions were obtained by maceration of the leaves and twigs in 96 % ethanol, followed by liquid-liquid partition to yield the methanolic fraction. *Trichophyton rubrum* A&B, *Trichophyton soudanense* and *Trichophyton violaceum* isolates susceptibility testing were determined using the agar dilution method while for the two *Candida albicans* isolates, the microdilution method was used. The tested fractions of *Xylopia africana* and *Anonidium manii* exhibited fungistatic effect on all the tested *Trichophyton* isolates with MIC ranging from 12.5 mg/ml to 15 mg/ml. Moreover, none of these fractions exhibited inhibitory activity against *Candida albicans* at the concentration of 50 mg/ml. The methanolic fractions of *A. manii* and *X. africana* could be potential metabolites with antifungal properties.

© 2015 AENSI Publisher All rights reserved.

ToCite This Article: Kengni Yande Hubert, Tsouh Fokou Patrick Valere, Hzounda Fokou Jean Baptist, Tchokouaha Yamthe Lauve Rachel, Zeuko'o Menkem Elisabeth, Ngouana Vincent, Fekam Boyom Fabrice. In-Vitro Antifungal Activity of Methanolic Fractions of Two Cameroonian Medicinal Plants: *Anonidium Mannii* and *Xylopia Africana* (Annonaceae). *Adv. in Nat. Appl. Sci.*, 9(15): 12-16, 2015

INTRODUCTION

Opportunistic fungal infections are a growing problem as larger populations have become immunocompromised due to chemotherapy, organ transplant conditioning or infections such as HIV (Williamson *et al.*, 2008). In Morocco, there is a change in the rate of infection of tinea leather hair due to anthropophilic species of *Trichophyton* and the emergence of infections with *C. albicans* (Ouaffack *et al.*, 2003; Chabasse *et al.*, 2004). In the North West region of Cameroon (Bamenda), *C. albicans* was the only yeast isolated in oral swabs (100%). This implies that oral thrush was very high amongst HIV/AIDS patients in Cameroon (73%) and implying that *C. albicans* strains are highly prevalent amongst HIV/AIDS patients in Cameroon (Yongabi *et al.*, 2009). Also, oral swabs had the highest prevalence of *C. albicans* followed by vaginal/urethral samples (52.6% vs. 29.7% respectively). Forty (30.8%) subjects had *C. albicans* infection at more than one collection site (Njunda *et al.*, 2012) in the littoral region of Cameroon.

In addition, the increase in fungal infections is frequently encountered in diabetic patients, AIDS patients and pregnant women (30%) (WHO, 1999; Bouguerra *et al.*, 2004). These infections are

associated with other factors such as certain surgical practice, the poverty of the population, the fall of the immune response due to the misuse of chemotherapy, steroids, and stress conditions (Sandglard and Odds, 2002).

Many antifungal drugs such as Ketoconazole, Amphotericin B, Nystatin, are available and sometimes produce harmful side effects and resistance to these pathogens (Sandglard and Odds, 2002) renders the search for new substances essential. Moreover, WHO encourages the rational use of improved fractions of medicinal plants for the treatment of infections (WHO, 1991; WHO, 2003).

Cameroon has a rich and diversified flora whose exploration is still limited. There is a growing interest in the Annonaceae family based on its wide variety and on its rich secondary metabolites such as specific acetogenins (Fekam, 1986). These are potential inhibitors of complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase) and mitochondrial NADH oxidase membranes of cancer cells (Miyoshi *et al.*, 2005). Also, acetogenins are known for their antitumor, pesticidal, immunosuppressive, antimicrobial and antiplasmodial properties (Petit *et al.*, 2008; Boyom *et al.*, 2009).

Thus, the aim of this study was to evaluate *in vitro* the antifungal properties of methanolic fractions

enrich in acetogenins of two medicinal plants of the Annonaceae family: *X. africana* and *A. mannii*.

MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material:

The leaves and twigs of *Anonidium mannii* Engl. & Diels and *Xylopiya africana* (Benth) Oliv were harvested in March 9, 2010 at Mount Kalla (Yaoundé) and were identified at the National Herbarium of Cameroon with identification numbers of 45582/HNC and 38322/HNC respectively where specimens have been preserved.

2.2. Fungal material:

Six fungal isolates from the Centre Pasteur of Cameroon, Yaoundé were used: four dermatophytes (*Trichophyton rubrum* A&B, *Trichophyton soudanense* and *Trichophyton violaceum*) and two *Candida albicans*. The maintenance of these strains was performed on Sabouraud Maltose Agar medium (SMA).

2.3. Preparation of extracts:

The leaves and twigs collected were cut and dried at room temperature for 7 days and were ground to fine powder. The samples were macerated in 96% ethanol. The crude extracts obtained were subjected to liquid-liquid partition for the preparation of fractions enriched in acetogenins following the protocol described by Alali *et al.*, (1999). The yields of extraction were calculated using the following formula: plant extract/ plant material x 100.

2.4. Test of lactonic compounds characterization:

The methanolic fractions enriched in acetogenins were used to characterize lactonic compounds according to the protocol described by Aromdee *et al.*, (2005). The methanolic fractions enriched in acetogenins were evaluated for their potential to inhibit the growth of fungal isolate.

2.5. Antifungal activity of the extracts against dermatophytes:

The antifungal activity against *T. rubrum* A & B, *T. violaceum* and *T. soudanense* was evaluated using the agar dilution method as described by De Billerbeck, (2000). A concentration 100 mg/ml of stock solution was prepared in 10% DMSO for the different extracts. From the stock solution, each extract dilutions were performed aseptically in supercooled medium maintained at 45 °C.

Various plant extract concentrations were prepared from stock solutions at final concentration of 10, 12.5, 15 and 17.5mg/ml in SMA medium. Ketoconazole (Janssen-Cilag Farma ceutica Lda) stock solution was prepared at 200mg/ml and used as the positive control. The stock solution of extracts previously prepared were diluted in the SMA medium to obtain final concentration of 10, 12.5, 15 and 17.5mg/ml. 10 ml of the prepared media were poured into Petri dishes of 55 mm diameter and allowed to cool under the hood until complete solidification.

Thereafter, explants of 7mm diameter were seeded at the centre of the Petri dish that was sealed and incubated at 25°C for eight days. Extract-free SMA medium was also prepared, inoculated and incubated in the same conditions to serve as negative control. Three trials were performed for each concentration. The radial mycelium growth was monitored by measuring the diameters in millimeters. The inhibition percent was then calculated according to Zacchino *et al.*, (1998).

$$\%I = \frac{Dc - Dx}{Dc} \times 100$$

Where Dc = diameter of the inoculum in the control plate; Dx = diameter of the inoculum in the test plate; I% = inhibition percentage.

❖ Determination of Minimum and Fungicidal Inhibitory Concentrations (MIC and MFC):

After preliminary tests, new concentrations of extracts were prepared from concentrations that completely inhibited the radial growth of the fungi. These concentrations were tested using the same protocol. After 8 days of incubation at 25°C, the lowest concentration that completely inhibited visible growth was considered the MIC. The inoculum whose growth was completely inhibited were collected and inoculated on to another medium free from inhibitor and incubated for 8 days at 25°C for the determination of the MFC. The lowest concentration that inhibited the growth of microorganisms was considered as the MFC.

2.6. Antifungal activity of the extracts against *C. albicans*:

The extracts were tested on the *C. albicans* isolate using the protocol described by Ngono (1999) for counting cells and by the microdilution method in liquid medium for the activity (Tchoumboungang, 1997). 80 µl of medium previously prepared were distributed in each well of a 96 wells microtitre plate, and then 80 µl of each extract at 100mg/ml (XAF, XAb AMf, AMb) dissolved in 10% DMSO were added. Then, a series of eight serial dilutions was performed with concentrations ranging from 50 to 0.78 mg / ml. Subsequently, 20µl of a yeast suspension containing 2.5 x10⁵ cells / ml were added to 100 µl final volume per well. The positive control consisting of Nystatin (Zeneca; stock solution at 100 mg / ml) was prepared as that of the extracts. The control consisted of wells in which the extracts were replaced by 10% DMSO and distilled water. The negative control contained only the media and the yeast strain. The plates were incubated at 37 °C and the results were recorded after 48 hours. The shift in the red phenol color from red color to yellow reflects the growth of *C. albicans*.

2.7. Statistical Analysis:

The data were statistically analyzed using the software STATGRAPHICS Plus 5.0 for Windows. ANOVA using the F-test and the LSD (Least Sensitive Difference) was used to conduct a two-by-

two comparison of the means at the risk level of 5% ($P < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Extraction of fractions rich in acetogenins:

The yields of extraction from the leaves and twigs of plants are given in Table 1.

Analysis of Table 1 showed that the yields of extraction ranged from 0.28 to 9.22%. Those of the leaves of *X. africana* and *A. mannii* (XAf and AMf) are higher compared to that of the twigs. These results show that yields vary according to the organ highlighted by the variability of the intensity of biosynthetic pathways. The leaves have the highest yields of methanolic fractions 1.65% (*A. mannii*) and 9.22% (*X. africana*). It is at this level that most plant metabolites are synthesized through the process of photosynthesis.

3.2. Characterization-rich fractions acetogenins:

The characterization test of lactonic compounds present in methanolic fractions showed after addition of Kedde's reagent variability in the intensity of the pink color of the samples. The variability observed in the intensity of the color can be assigned to different classes of lactonic compounds such as acetogenins present at various concentrations (Champy *et al.*, 2009).

3.3. Antidermatophytic activity:

The results of antifungal activities carried out on 4 dermatophytes: *T. rubrum* A & B, *T. violaceum* and *T. soudanense* are shown in figures 1, 2, 3&4 and table 2.

It appears from the above figures that isolates of dermatophytes exhibit significant sensitivity to fractions tested. MICs (concentration of extract inhibiting 100 % of visible mycelial growth) of *X.*

africana and *A. mannii* vary from 12.5 to 15 mg / ml (Table 2). Generally the growth inhibition varies with the concentration of the extract. XAb seems to be more active with total growth inhibition at 12.5mg/ml on the four isolates (figure 1, 2, 3&4). While XAf, showed total inhibition at 12.5 on *T. violaceum* and *T. rubrum* A and 15mg/ml on *T. soudanense* and *T. rubrum* B. As well AMf exert total inhibition at 12.5 mg / ml only on *T. rubrum* A and at 15 mg / ml on *T. violaceum*, *T. soudanense*, and *T. rubrum* A. AMb totally inhibit mycelia growth of *T. soudanense* and *T. rubrum* B at 12.5 mg / ml when that of *T. violaceum* and *T. rubrum* A occurred at 15 mg / ml. However, even though we observed a variation in activity of fractions no significant difference ($p < 0.05$) between the responses of isolates to concentrations of fractions used was noticed. Growth of inoculum was observed 8 day after subcultures suggesting a fungistatic effect of fractions on dermatophytes isolates at the tested concentrations. The anti-dermatophytes activity observed could be due to the presence of acetogenins that might act by inhibiting the growth and development of *Trichophyton* species. In fact, Yuan *et al.*, (2003) showed inhibitory activity of acetogenins against dermatophytes by stopping the cell cycle between G1 and S phases.

3.4. Anti Candida activity:

At 50 mg / ml, there was a change in the color of red phenol from red color to yellow reflecting the growth of *C. albicans*. The fractions enriched with acetogenins of leaves and twigs of *X. africana* and *A. mannii* were poorly active on the two isolates of *C. albicans*. This result failed to confirm the ethnopharmacological use of *A. mannii* and *X. africana* as treatment against candidiasis (Tsabang *et al.*, 2012) and dysentery conditions (Bele *et al.*, 2011) respectively.

Table 1: Yields of extraction of *A. mannii* and *X. africana* fractions.

Plants	Organs	Codes	Yields (%)
<i>A. mannii</i>	Leaves	AMf	1.65
	Twigs	AMb	1.60
<i>X. africana</i>	Leaves	XAf	9.22
	Twigs	XAb	0.28

AMf = *A. mannii* leaves; AMb = *A. mannii* twigs; XAf = *X. africana* leaves ; XAb = *X. africana* twigs.

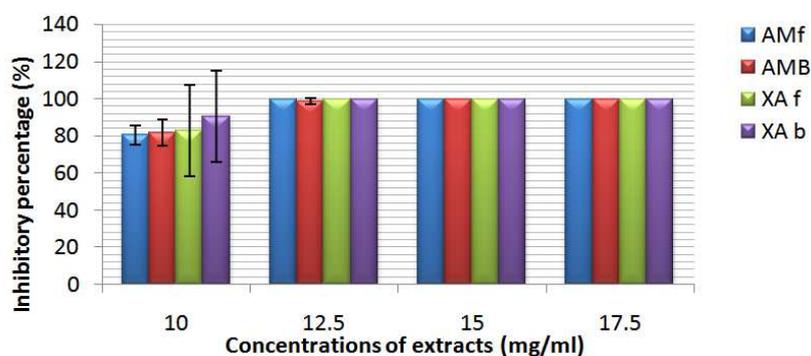


Fig. 1: Antifungal activity of fractions on *T. rubrum* isolate A. AMf = *A. mannii* leaves; AMb = *A. mannii* twigs; XAf = *X. africana* leaves ; XAb = *X. africana* twigs.

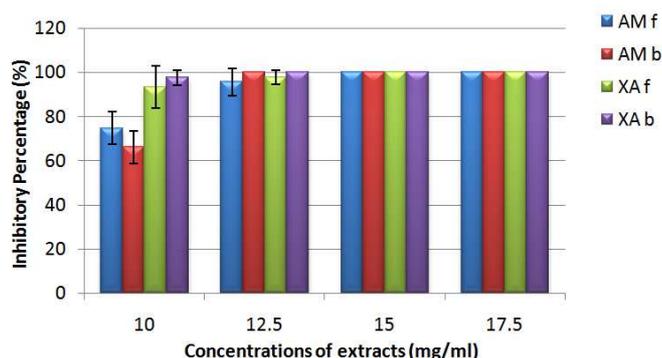


Fig. 2:Antifungal activity of fractions on *T. rubrum* isolate. B. AMf = *A. mannii* leaves; AMb = *A. mannii* twigs; XAf = *X. africana* leaves ; XAb = *X. africana* twigs.

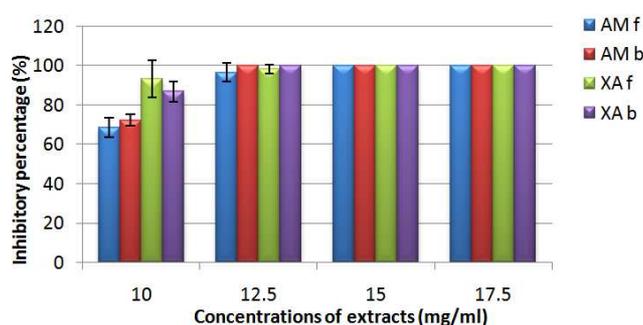


Fig. 3: Antifungal activity of fractions on *T. soudanense* isolate. AMf = *A. mannii* leaves; AMb = *A. mannii* twigs; XAf = *X. africana* leaves ; XAb = *X. africana* twigs.

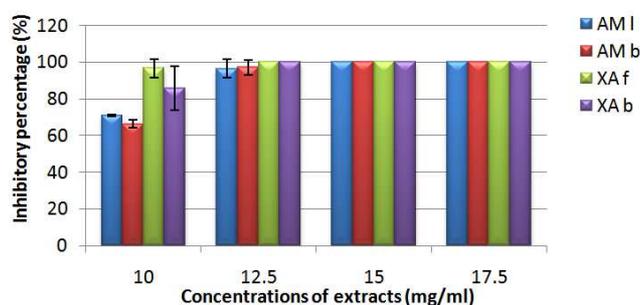


Fig. 4:Antifungal activity of fractions on *T. violaceum* isolate. AMf = *A. mannii* leaves; AMb = *A. mannii* twigs; XAf = *X. africana* leaves ; XAb = *X. africana* twigs.

4. Conclusion:

Overall, the methanolic fractions rich in acetogenins plants of the Annonaceae family possess antifungal properties on dermatophytes that required further investigations to isolate the active principles and eventually proposed their mechanism of action toward the development of a new anti-dermatophytes drug.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the practical help of Mr. Victor Nana of the Cameroon National Herbarium for his assistance with the collection and identification of plant materials.

REFERENCES

- Alali, F.Q., X.X.Liu, J.L.McLaughlin, 1999. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *JNat Prod*, 62: 504-540.
- Aromdee, C., P.Wichitchote, N.Jantakun, 2005. Spectrophotometric Determination of Total Lactones in *Andrographis paniculata* Nees. *Songklanakarin Journal of Science Technology*, 27(6): 1227-1231.
- Bele, M.Y., D.A.Focho, E.A.Egbe, B.G.Chuyong, 2011. Ethnobotanical survey of the uses of Annonaceae around mount Cameroon. *African Journal of Plant Science*, 5(4): 237-247.
- Bouguerra, R., O.Essaï, N.L.Sebaï, B.Salem, H.Amari, M.R.Kammoun, E.Chaker, B.Zidi,

- B.C.Slama, 2004. Prévalence et aspects cliniques des mycoses superficielles chez les diabétiques en milieu hospitalier en Tunisie. *Médecines des Maladies Infectieuses*, 34: 201-205.
- Boyom, F.F., K.E.Madiesse, R.Tepongnig, F.W.Mbacham, E.Tsamo, Z.P.H.Amvam, J.Gut,P.J.Rosenthal, 2009. Antiplasmodial Activity of Extracts from Seven Medicinal Plants Used in Malaria Treatment in Cameroon. *JEthnopharmacol*,123: 483-488.
- Boyom, F.F., F.P.V.Tsouh, Y.L.R.Tchokouaha, M.A.Ngoutane, M.E.Kemgne, F.W.Mbacham, E.Tsamo, Z.Amvam, J.Gut, J.P.Rosenthal, 2011. Potent Antiplasmodial extracts from Cameroonian Annonaceae. *JEthnopharmacol*, 134: 711-724.
- C.P.C. (Centre Pasteur Cameroun), 2001. Rapport d'activité 2000-2001 Réseau International des Instituts Associés, Yaoundé/Cameroun.
- Chabasse, D., J.P.Bouchara, L.De gentile, S.Brun, B.Cimon, P.Penn, 2004. Les dermatophytes. Cahier de Formation en Biologie Médicale.
- Champy, P., V.Guérineau,O.Laprèvote, 2009.MALDI-TOF MS Profiling of Annonaceous Acetogenins in *Annona muricata* Products for Human Consumption. *Molecules*,14: 5235-5246.
- De Billerbeck, G., 2000. Activité antifongique de l'huile essentielle de *Cymbopogonardus* sur *Aspergillus niger*. Evaluation d'un bioréacteur pour étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur. Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Fekam, B.F., 1986. Extraction et analyse des huiles essentielles de deux épices de la famille des anonacées: *Monodora myristica* (Gaertn.) DUNAL et *Xylopi aethiopic a* (Dunal) A. RICHARD. Mémoire de Maitrise en Biochimie Université de Yaoundé.
- Miyoshi, H., M.Abe, M.Murai, N.Ichimar, 2005. Dynamic Function of the Alkyl Spacer of Acetogenins in their Inhibitory Action with Mitochondrial Complex I (NADH-Ubiquinone Oxidoreductase). *Biochemistry*,44: 4898-4906.
- Ngono, N.A., 1999. Contribution à l'étude des propriétés antifongiques et analyse photochimique de cinq plantes médicinales camerounaises.Thèse de doctorat l'Université de Reine Champagne – Ardenne et de l'Université de Yaoundé I, Cameroun.
- Njunda, A.L., S.N.Dickson, J.C.N.Assob, H.L.Kamga,P.Teyim, 2012. In vitro antifungal susceptibility patterns of *Candida albicans* from HIV and AIDS patients attending the Nylon Health District Hospital in Douala, Cameroon. *Journal of Public Health in Africa*, 2:e2.
- Ouaffack, L.,A.Zellon, B.Zain,M.Lyagoubi, 2003. Flore fongique pathogène des bains moures de Rabat (Maroc). *Journal de Mycologie*,13(1):13-23.
- Petit, J.R., F.S.Huand,W.C.Dick, 2008.Forests of the Part:A Window to futur changes.*Revue Science Magazine*,320(5882):1450-1452.
- Sandglard, D., C.F.Odds, 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal: molecular mechanism and clinical consequences. *Journal of Infectious Diseases*,2:73-85.
- Tchoumboungang, F., 1997.Contribution à la détermination des ténieurs des caractéristiques chimiques de l'activité antifongique des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques condimentaires et médicinales du Cameroun. Thèse de Doctorat 3^{ème}Cycle en Biochimie, Université de Yaoundé I, Cameroun.
- Tsabang, N., P.V.Tsouh Fokou, Y.L.R.Tchokouaha, B.Noguem, I.Bakarnga-Via, N.M.S.Dongmo, F.F.Boyom, 2012. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*, 139:171-180.
- Williamson, P.R., Z.Shirong, J.Panepinto, H.Guowu, S.R.Waterman,P.Yoon-Dong,S.Soowan, 2008. Drug target discovery through analysis of laccase regulatory networks of *Cryptococcus neoformans*. *Current Enzyme Inhibition*, 4:186-193.
- WHO, 1991. Traditonal medicine and modern health care. Progress Report by General Director. Doc N° A 14/10 Marel.
- WHO, 1998. Guideline of appropriate use of herbal medicine. WHO regional office for Western Pacific, Manila.
- WHO, 1999. Maladies opportunistes liées au VIH-SIDA. Actualisation ONUSIDA.
- WHO, 2003.<http://www.who.int/medicentre/factsheets/2003fs134/index.html>.2007.
- Yongabi, K.A., F.W.Mbacham, K.K.Nubia,R.M.Singh, 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.
- Yuan, S.S., H.L.Chan, H.W.Chen, Y.T.Yeh, Y.H.Kao, K.H.Lin, Y.C.Wu, J.H.Su, 2003. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran Acetogenin, Arrests Cancer Cells at the G Phase and Causes Cytotoxicity in a Bax- and Caspase-3 Related Pathway. *Life Sciences* 72: 2853-2861.
- Zacchino, S., C. Santecchia, S.Lopez, S.Gattuso, J.Munoz, Cruanesm, A.Salinas, R.E.De Ruiz,S.Ruiz, 1998. In vitro antifungal evaluation and studies of mode of actions of eight selected species from the Argentine flora. *Phytomedicine*,5(5): 389-395.