

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

*Paix - Travail - Patrie*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

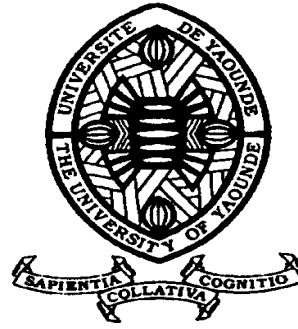
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET

PHYSIOLOGIE ANIMALES

\*\*\*\*\*

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE

ANIMALE



REPUBLIC OF CAMEROUN

*Peace - Work - Fatherland*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF ANIMAL

BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

\*\*\*\*\*

ANIMAL PHYSIOLOGY

LABORATORY

**Effet curatif de l'extrait aqueux des feuilles de *Eremomastax speciosa* (Acanthaceae) sur les ulcères gastriques chroniques impliquant une infection à *Helicobacter pylori* et profil de toxicité chez deux rongeurs**

Thèse présentée et soutenue en vue de l'obtention du Doctorat/Ph.D  
en Biologie des Organismes Animaux

Par : SIWE TCHOKOMENI Gaël

Master ès Sciences

Sous la direction de  
**TAN Paul Vernyuy**  
(Pr, UY1)

Année Académique : 2019 - 2020





DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES  
DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

ATTESTATION DE CORRECTION DE THESE DE DOCTORAT/Ph.D

Nous soussignés, membres du jury de soutenance de Thèse de Doctorat/Ph.D de Biologie des Organismes Animaux, Option Physiologie Animale, de Monsieur **SIWE TCHOKOMENI Gaël** (Matricule 12Q1332), soutenance autorisée par la correspondance N° 201930/UYI/VREPDTIC/DAAC/DEPE/SPD/CB-AP du Recteur de l'Université de Yaoundé I en date du 18 Août 2020, attestons que les corrections exigées au candidat lors de cette évaluation faite le 15 Octobre 2020 ont réellement été effectuées et que le présent document peut être déposé sous sa forme actuelle.

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

Fait à Yaoundé, le 19 7 NOV 2020

Président du Jury


NJAMEN Dieudonné

Examinatrice

MEGNEKOU Rosette

Chef de Département de BPA

*Charles Felix  
Bilong Bilong*  
Professeur

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

**ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION 12 Juin 2020**

**ADMINISTRATION**

**DOYEN** : TCHOUANKEU Jean-Claude, *Maitre de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA** : ATCHADE Alex de Théodore, *Maitre de Conférences*

**VICE-DOYEN / DSSE** : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC** : ABOSSOLO Monique, *Maitre de Conférences*

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

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR** :  
 MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

**1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)**

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

21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
22	AKINDEH MBUH NJI	Chargée de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargée de Cours	En poste
25	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

## 2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UUI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En poste
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINS NTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste
14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16	DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste

17	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En poste
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOULATEU KENFACK Omer B.	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargé de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
43	YEDE	Chargé de Cours	En poste
44	BASSOCK BAYIHA Etienne D.	Assistant	En poste
45	ESSAMA MBIDA Désirée S.	Assistante	En poste
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

### **3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (32)**

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
10	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
11	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
12	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
13	NGONKEU MAGAPTCHÉ Eddy	Maître de Conférences	En poste

14	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
15	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
16	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
17	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
18	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
19	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
20	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
21	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
22	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
23	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
24	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
25	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
26	KABELONG BANAHOU Louis- Paul-Roger	Assistant	En poste
27	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
28	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
29	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
30	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
31	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

#### 4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (35)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice-Recteur Univ, Bamenda</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ. Ngaoundéré</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Mission P.R.</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI/Chef de Département</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UD</i> s
10	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUNBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
15	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
17	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste

19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
25	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
26	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
27	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
28	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA née NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
33	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
34	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
35	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En poste

#### 5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDs
4	NKENGFACK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste
8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ Rectorat/UYI</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service DPER</i>
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
20	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
21	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>

23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
24	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
25	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
26	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
27	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
28	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
29	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
31	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
33	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste
34	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

### 6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	KAMGUEU Patrick Olivier	Chargé de Cours	En poste
13	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
14	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
15	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
16	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
18	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
19	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
20	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
21	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
22	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
23	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	En poste
24	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
25	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
26	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste



**7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)**

1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>CD Info/ Inspecteur MINESUP</i>
2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thierry	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

**8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)**

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMPM
2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste

8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistante	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

### 9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (42)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
3	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
4	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
5	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
6	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
7	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
8	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
9	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Ba
10	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
11	WOAFO Paul	Professeur	En poste
12	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
13	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
15	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Division. UN</i>
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	MINRESI
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste

30	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
38	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
39	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste
40	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
41	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
42	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

### 10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NDAM NGOUPAYOU Jules- Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
12	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>
23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste

28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

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

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (05)	3 (2)	<b>39 (16)</b>
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	<b>46 (13)</b>
BPV	06 (0)	09 (02)	9 (04)	07 (01)	<b>31 (9)</b>
CI	10 (1)	09 (02)	13 (02)	02 (0)	<b>35 (5)</b>
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	03 (0)	<b>35(7)</b>
IN	2 (0)	1 (0)	14 (01)	10 (02)	<b>26 (3)</b>
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	05 (01)	<b>30 (2)</b>
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	<b>17 (5)</b>
PHY	11 (0)	16 (01)	10 (03)	03 (0)	<b>40 (4)</b>
ST	8 (1)	14 (01)	19 (04)	02 (0)	<b>43(6)</b>
<b>Total</b>	<b>68 (4)</b>	<b>98 (27)</b>	<b>132 (29)</b>	<b>45 (10)</b>	<b>343 (70)</b>

Soit un total de **343 (70)** dont :

- Professeurs **68 (4)**
- Maîtres de Conférences **98 (27)**
- Chargés de Cours **132 (29)**
- Assistants **46 (10)**

( ) = Nombre de Femmes

# DEDICACE

*A mes parents:*

*Monsieur TCHOKOMENI Daniel, de regrettée mémoire*

*et*

*Madame TCHAGA Geneviève*

*J'ai pu compter sur vous à chaque instant de mon parcours académique et dans ma vie de tous les jours. Merci de m'avoir porté à bout de bras tout au long de mon existence et d'avoir mis toutes les chances de mon côté et ce au prix de sacrifices dont je ne saurais mesurer l'importance. Que cette œuvre soit l'expression d'une infinie gratitude à votre endroit. J'espère vous avoir rendus fiers de moi.*

## REMERCIEMENTS

Au Pr **TAN Paul** pour avoir bien voulu m'intégrer dans son unité de recherche, proposé et suivi ce travail de bout en bout. Je le sais gré pour les nombreuses discussions, les innombrables heures consacrées à la relecture des documents soumis à son appréciation et sa très grande qualité d'écoute. Sa disponibilité sans faille, sa rigueur scientifique, sa diligence et sa bonne humeur auront été des atouts inestimables tout au long de ce travail. Merci Prof !

Au Pr **CHOUDHARY Iqbal**, Directeur de l'*International Center for Chemical and Biological Sciences (ICCBS)* (Université de Karachi, Pakistan) pour m'avoir accueilli au sein de son institut et accordé toutes les facilités sollicitées lors de la réalisation de ce travail.

Au Dr **AKHTER Shakeel** (Hôpital Civil de Karachi, Pakistan) pour avoir accepté de prélever des biopsies gastriques sur patients pour le compte de ce travail. Je lui suis reconnaissant pour sa compréhension, son enthousiasme, ses conseils et encouragements.

A M. **MAHARJAN Rukesh**, pour son aide spontanée et sa collaboration sans réserve. Il aura plus que quiconque contribué à faire de mon séjour au Pakistan un plein succès.

A la *The World Academy of Science (TWAS)* et à **ICCBS** pour m'avoir octroyé une bourse de recherche et co-financé l'essentiel de ce travail.

Au Dr **ZONDEGOUMBA Ernestine** pour ses conseils et encouragements, mais surtout pour avoir suivi d'un œil attentif l'aspect chimique du présent travail.

A tous les enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales pour la qualité des enseignements dispensés tout au long de mon cursus.

Aux Prs **MEZUI Christophe**, **DONGMO Alain** et **NKENFOU Céline** pour leurs conseils et encouragements ainsi que pour les contributions matérielles apportées tout au long de ce travail.

Au Dr **KAMENI Mireille** et à M. **TAKALA Jean-Pierre** pour la réalisation des coupes histologiques ainsi que des microphotographies.

Au Pr **ENOW-OROCK Georges** pour l'interprétation des coupes histologiques.

A mes frères et sœurs, plus particulièrement à Mme **LEUDEU Florence** qui n'aura jamais ménagé ses efforts, ni lésiné sur les moyens pour mon éducation et ma formation. Merci pour tes encouragements durant toutes ces années.

A M. **DJIETCHEU René** pour tous ses conseils, ses encouragements ainsi que pour les sacrifices financiers consentis pour ma formation depuis plusieurs années. Qu'il trouve dans ce travail l'expression de ma sincère reconnaissance.

Aux Drs **AMANG Perfusion** et **KUISSU Mesmine** pour les conseils, les critiques constructives, les encouragements constants et les contributions de toutes natures apportés tout au long de ce travail.

A tous mes camarades de laboratoire, plus particulièrement MM. **EMAKOUA Joseph** et **MBAH Guy** pour leur aide et leur franche collaboration.

A tous mes camarades de promotion pour tous les moments enrichissants passés ensemble.

Aux Drs **SIMO Marguerite** et **ZEUKO'O Elisabeth** pour leur soutien, leurs encouragements et leur franche collaboration.

A mes neveux: **TCHAGA Pascaline**, **KAKO Manuel**, **OUANSI Lionel**, **TCHOKOMENI Stéphane**, **SIANI Junior**, **TCHEMENI Jason**, **GATCHOU Garrel** pour leur soutien et leur bienveillance.

A M. **TAPOKO Jacques** pour son hospitalité.

A tous ceux qui auront participé d'une quelconque façon à la réalisation de ce travail et dont les noms ne figurent dans ce document. Un immense merci à tous !

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS .....</b>	<b>i</b>
<b>DEDICACE .....</b>	<b>xi</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>xii</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xvii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xviii</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>xix</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>xx</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xxii</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE.....</b>	<b>5</b>
<b>I.1- GENERALITES SUR L'ESTOMAC .....</b>	<b>6</b>
<b>I.1.1- ANATOMIE.....</b>	<b>6</b>
<b>I.1.2- HISTOLOGIE .....</b>	<b>7</b>
<b>I.1.3- PHYSIOLOGIE .....</b>	<b>8</b>
<b>I.2- GENERALITES SUR L'ULCERE GASTRODUODENAL .....</b>	<b>12</b>
<b>I.2.1- PHYSIOPATHOLOGIE .....</b>	<b>12</b>
<b>I.2.2- MECANISMES DE CICATRISATION.....</b>	<b>22</b>
<b>I.2.3- COMPLICATIONS DES ULCERES GASTRODUODENaux.....</b>	<b>22</b>
<b>I.2.4- TRAITEMENT .....</b>	<b>24</b>
<b>I.3- STRESS OXYDANT.....</b>	<b>26</b>
<b>I.3.1- LES PRO-OXYDANTS.....</b>	<b>27</b>
<b>I.3.2- LES ANTIOXYDANTS .....</b>	<b>29</b>



I.3.3- DOMMAGES OXYDANTS .....	30
I.4- NOTIONS DE TOXICITE.....	30
I.4.1- GENERALITES SUR LA CYTOTOXICITE .....	31
I.4.2- GENERALITES SUR LA TOXICITE <i>IN VIVO</i> .....	33
I.5- GENERALITES SUR <i>Eremomastax speciosa</i> .....	42
I.5.1- DESCRIPTION ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE LA PLANTE .....	42
I.5.2- NOMS LOCAUX ET CLASSIFICATION SYSTEMATIQUE .....	42
I.5.3- DONNEES ETHNOPHARMACOLOGIQUES ET PHYTOCHIMIE QUALITATIVE .....	43
I.6- QUELQUES METHODES D'ANALYSE PHYTOCHIMIQUE.....	44
I.6.1- ANALYSE PAR INFRA-ROUGE (IR).....	44
I.6.2- ANALYSE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN) .....	44
I.6.3- ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (SM).....	44
<b>CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>46</b>
II.1- MATERIEL .....	47
II.1.1- MATERIEL VEGETAL.....	47
II.1.2- MATERIEL ANIMAL .....	47
II.1.3- MATERIEL MICROBIOLOGIQUE.....	48
II.2- METHODES .....	48
II.2.1- PREPARATION DE L'EXTRAIT .....	48
II.2.2- EVALUATION DES EFFETS ANTI- <i>Helicobacter pylori</i> DE <i>Eremomastax speciosa</i> .....	48
II.2.3- EVALUATION DES EFFETS DE <i>Eremomastax speciosa</i> SUR LES ULCERES GASTRIQUES CHRONIQUES COUPLES A UNE INFECTION A <i>H. pylori</i> .....	56

II.2.4- CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE.....	65
II.2.5- PROFIL DE TOXICITE DE <i>Eremomastax speciosa</i> .....	66
II.2.6- ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS .....	74
<b>CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>75</b>
III.1- RESULTATS.....	76
III.1.1- EFFETS DE <i>Eremomastax speciosa</i> SUR <i>Helicobacter pylori</i> .....	76
III.1.2- EFFETS DE <i>Eremomastax speciosa</i> SUR LES ULCERES GASTRIQUES CHRONIQUES COUPLES A UNE INFECTION A <i>Helicobacter pylori</i> .....	82
III.1.3- CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE DE <i>Eremomastax speciosa</i> .....	96
III.1.4- TOXICITE DE <i>Eremomastax speciosa</i> .....	100
III.2- DISCUSSION.....	112
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>121</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>124</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>A</b>
<b>ARTICLES ISSUS DE LA THESE.....</b>	<b>I</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Divisions anatomiques de l'estomac .....	6
Figure 2: Anatomie microscopique (coupe transversale) de l'estomac .....	8
Figure 3: Différentes étapes de la vidange gastrique mesurée par scintigraphie .....	8
Figure 4: Mécanisme de sécrétion d'acide chlorhydrique par la cellule pariétale.....	9
Figure 5: Régulation de la sécrétion acide par la cellule pariétale .....	10
Figure 6: Représentation schématisée d'un ulcère gastroduodénal .....	12
Figure 7: Photographie de <i>Helicobacter pylori</i> .....	13
Figure 8: Schéma récapitulatif de l'implication de <i>Helicobacter pylori</i> dans la pathogenèse de l'ulcère gastroduodénal .....	16
Figure 9: Algorithme des trois lignes de traitement de l'infection à <i>H. pylori</i> .....	25
Figure 10: Tiges et feuilles de <i>Eremomastax speciosa</i> .....	42
Figure 11: Préparation de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Eremomastax speciosa</i> .....	48
Figure 12: Microphotographies de <i>Helicobacter pylori</i> par microscopie électronique à balayage .....	78
Figure 13: Microphotographies 2D de <i>Helicobacter pylori</i> par microscopie à force atomique .....	80
Figure 14: Microphotographies 3D de <i>Helicobacter pylori</i> par microscopie à force atomique .....	81
Figure 15: Effet de <i>Eremomastax speciosa</i> sur la charge bactérienne <i>in vivo</i> .....	82
Figure 16: Aspect macroscopique des estomacs de rats sujets à l'ulcère chronique induit avec l'acide acétique.....	83
Figure 17: Microphotographies des estomacs de rats sujets à l'ulcère chronique induit avec l'acide acétique .....	86
Figure 18: Effet de <i>Eremomastax speciosa</i> sur la charge bactérienne.....	87
Figure 19: Microphotographies des estomacs de rats sujets à l'ulcère chronique induit avec l'acide acétique.....	88
Figure 20: Aspect macroscopique des estomacs de rats sujets à l'ulcère « difficilement guérissable ».....	90
Figure 21: Microphotographies des estomacs de rats sujets à l'ulcère « difficilement guérissable » .....	93
Figure 22: Effet de <i>Eremomastax speciosa</i> sur la charge bactérienne.....	94
Figure 23: Microphotographies des estomacs de rats sujets à l'ulcère « difficilement guérissable » .....	95
Figure 24: Chromatogramme de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Eremomastax speciosa</i> .....	96
Figure 25: Effet de <i>Eremomastax speciosa</i> sur les cellules NIH-3T3 .....	100
Figure 26: Effet de <i>Eremomastax speciosa</i> sur les cellules cancéreuses Caco2.....	101
Figure 27: Effet de <i>Eremomastax speciosa</i> sur l'évolution du poids corporel en essai aigu .	102
Figure 28: Effets de <i>Eremomastax speciosa</i> sur le poids relatif des organes en essai aigu...	103
Figure 29: Effets de <i>Eremomastax speciosa</i> sur l'évolution du poids corporel .....	103
Figure 30: Effets de <i>Eremomastax speciosa</i> sur le poids relatif de quelques organes .....	104
Figure 31: Effets de <i>Eremomastax speciosa</i> sur la structure histologique de quelques organes chez les femelles .....	109
Figure 32: Effets de <i>Eremomastax speciosa</i> sur la structure histologique de quelques organes chez les mâles .....	111

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Quelques plantes médicinales à propriétés antiulcéreuses.....	26
Tableau II: Les différentes espèces réactives de l'oxygène .....	28
Tableau III: Protocole de dosage des protéines totales.....	58
Tableau IV: Préparation de la courbe d'étalonnage du dosage de la catalase .....	60
Tableau V: Pourcentages d'inhibition de différents isolats de <i>Helicobacter pylori</i> induits par <i>Eremomastax speciosa</i> et quelques antibiotiques de référence .....	76
Tableau VI : Concentrations minimales inhibitrice et bactéricide de <i>Eremomastax speciosa</i> et quelques antibiotiques de référence sur différents isolats de <i>Helicobacter pylori</i> .....	77
Tableau VII: Effets de <i>Eremomastax speciosa</i> sur quelques paramètres d'ulcération chez les animaux sujets à l'ulcère chronique induit avec l'acide acétique.....	84
Tableau VIII: Effets de <i>Eremomastax speciosa</i> sur quelques paramètres du stress oxydant chez les animaux sujets à l'ulcère chronique induit avec l'acide acétique.....	85
Tableau IX: Effets de <i>Eremomastax speciosa</i> sur quelques paramètres chez les animaux sujets à l'ulcère « difficilement guérissable ».....	91
Tableau X: Effets de <i>Eremomastax speciosa</i> sur quelques paramètres du stress oxydant chez les animaux sujets à l'ulcère « difficilement guérissable ».....	92
Tableau XI: Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse de l'extrait aqueux de <i>Eremomastax speciosa</i> .....	97
Tableau XII: Effet de <i>Eremomastax speciosa</i> sur les larves de <i>Artemia salina</i> .....	101
Tableau XIII: Effets de <i>Eremomastax speciosa</i> sur quelques paramètres hématologiques...	105
Tableau XIV: Effets de <i>Eremomastax speciosa</i> sur quelques paramètres biochimiques.....	107

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>AINS:</b> Anti-inflammatoires non stéroïdiens	<b>GSH:</b> Glutathion réduit
<b>ALAT:</b> Alanine Aminotransférase	<b>GSSG:</b> Glutathion oxydé
<b>ASAT:</b> Aspartate Aminotransférase	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> Peroxyde d'hydrogène
<b>ATP:</b> Adénosine Triphosphate	<b>HDL:</b> <i>High Density Lipoprotein</i>
<b>ANOVA:</b> <i>Analysis of Variance</i>	<b>HP:</b> <i>Helicobacter pylori</i>
<b>ATCC:</b> <i>American Type Culture Collection</i>	<b>HPLC:</b> <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>BHI:</b> <i>Brain Heart Infusion</i>	<b>iNOS:</b> <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
<b>Cag A:</b> <i>Cytotoxin associated antigen A</i>	<b>LDL:</b> <i>Low Density Lipoprotein</i>
<b>CAT:</b> Catalase	<b>LPS:</b> Lipopolysaccharide
<b>CCM:</b> Chromatographie sur Couche Mince	<b>MDA:</b> Malondialdéhyde
<b>CI<sub>50</sub>:</b> Concentration inhibitrice 50	<b>NFS:</b> Numération Formule Sanguine
<b>CL<sub>50</sub>:</b> Concentration létale 50	<b>NO•:</b> Monoxyde d'azote
<b>CMB:</b> Concentration minimale bactéricide	<b>O<sub>2</sub>••:</b> Radical superoxyde
<b>CMI:</b> Concentration minimale inhibitrice	<b>OCDE:</b> Organisation pour la Coopération et le Développement Economiques
<b>COX:</b> Cyclooxygénase	<b>OH•:</b> Radical hydroxyl
<b>DL<sub>50</sub>:</b> Dose Létale 50	<b>ONOO•:</b> Peroxynitrite
<b>DTNB:</b> Acide 5,5'-dithiobis-nitrobenzoïque	<b>O<sub>2</sub>:</b> Oxygène singulet
<b><i>E. speciosa:</i></b> <i>Eremomastax speciosa</i>	<b>RMN:</b> Résonance Magnétique Nucléaire
<b>EGF:</b> <i>Epidermal growth factor</i>	<b>RO•:</b> Radical alkoxyde
<b>ERO:</b> Espèce réactive de l'oxygène	<b>ROO•:</b> Radical peroxyde
<b>ERN:</b> Espèce réactive de l'azote	<b>SAB:</b> Sérum Albumine Bovin
<b>ESM:</b> Erreur standard sur la moyenne	<b>SGH:</b> Système de Classification Globalement Harmonisé
<b>GC-MS:</b> <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>	<b>SOD:</b> Superoxyde dismutase
<b>GPx:</b> Glutathion peroxydase	<b>TNF:</b> <i>Tumor necrosis factor</i>
<b>GR:</b> Glutathion réductase	<b>UGD:</b> Ulcère gastroduodenal
	<b>VacA:</b> Cytotoxine vacuolisante

## RESUME

Les ulcères gastroduodénaux comptent parmi les affections du tube digestif les plus recensées et touchent 8 à 10 % de la population mondiale. La survenue de ces ulcères dépend en grande partie de l'action de certains facteurs d'agression tels que l'infection à *Helicobacter pylori* et la prise des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens. Pour être efficace, le traitement doit donc tenir compte de l'étiologie de l'ulcère, d'où les schémas thérapeutiques recommandés en médecine conventionnelle consistant généralement en une tri- ou quadrithérapie. Toutefois, ces traitements conventionnels présentent des limites du fait de nombreux effets secondaires rapportés et des résistances à *Helicobacter pylori* (responsable d'environ 80 % des ulcères gastriques). La recherche de traitements alternatifs efficaces, peu coûteux, à toxicité réduite et facilement accessibles pour la population, demeure un enjeu majeur. Au vu de cette situation, l'objectif général de ce travail a été d'étudier l'effet curatif de l'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* sur les ulcères gastriques chroniques impliquant une infection à *Helicobacter pylori* et d'évaluer la toxicité liée à l'administration de cet extrait.

Les isolats de *H. pylori* utilisés pour ce travail ont été obtenus à partir de biopsies gastriques prélevées sur des patients de l'hôpital Civil de Karachi, Pakistan. Les tests d'inhibition de *H. pylori* par l'extrait ont été réalisés par la méthode de l'AlamarBlue<sup>®</sup>, suivis de l'étude morphologique des bactéries grâce aux techniques microscopiques. Un test d'éradication *in vivo* a été réalisé chez les souris et les charges bactériennes stomacales ont été calculées. Deux modèles d'ulcères gastriques chroniques ont été réalisés chez des rats préalablement infectés avec *H. pylori* à savoir; les ulcères chroniques induits avec l'acide acétique et les ulcères chroniques induits avec l'acide acétique et rendus « difficilement guérissables » par administrations répétées sous cutanée d'indométacine. A la fin des expérimentations, les charges bactériennes stomacales ainsi que quelques paramètres macroscopiques des ulcères ont été évalués, les dosages antioxydants ont été réalisés, suivis des coupes histologiques. L'innocuité de l'extrait a été évaluée grâce à des tests de cytotoxicité, suivis des tests de toxicité *in vivo* (aigu et subaigu) chez les rats.

L'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* a inhibé la prolifération de *H. pylori*, avec une concentration minimale inhibitrice évaluée à 8 mg/mL et une concentration minimale bactéricide supérieure à 32 mg/mL, ce qui le classe comme bactériostatique. Les observations microscopiques de l'effet de l'extrait sur *H. pylori* ont révélé des perturbations de la morphologie bactérienne dont la gravité était fonction de la concentration testée. Par ailleurs, l'extrait a provoqué une baisse significative ( $p < 0,05$ ) de la charge bactérienne *in vivo* chez les

souris aux doses de 200 et 400 mg/kg. Chez les rats, *E. speciosa* a baissé l'indice d'ulcère de façon significative ( $p < 0,001$ ) à toutes les doses testées et augmenté de façon significative la production de mucus (aux doses de 200 et 400 mg/kg), chez les deux modèles d'ulcères chroniques étudiés. L'administration de *E. speciosa* a provoqué une baisse significative ( $p < 0,05$ ) de la charge bactérienne stomacale, aux doses de 200 et 400 mg/kg, chez les deux modèles d'ulcères chroniques étudiés. L'extrait a globalement provoqué une hausse des marqueurs antioxydants, avec notamment une augmentation significative des nitrites quel que soit le modèle d'ulcère chronique étudié. Ces résultats ont été confirmés par les coupes histologiques qui ont illustré les effets bénéfiques de *E. speciosa* sur la réparation du tissu gastrique d'une part, et la baisse de la colonisation bactérienne des estomacs, d'autre part. L'extrait n'a pas montré d'effet cytotoxique contre les fibroblastes de souris ( $CI_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ ), les cellules cancéreuses du colon ( $CI_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ ) et les larves d'artémies ( $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ ). L'administration d'une dose unique d'extrait (2000 mg/kg) n'a entraîné aucun trouble de comportement chez les animaux en essai aigu et aucun décès n'a été enregistré jusqu'à la fin de l'expérimentation. En essai subaigu, l'extrait a provoqué une augmentation significative des globules blancs chez les femelles (400 et 1600 mg/kg) et une baisse significative des globules blancs chez les mâles à la dose de 1600 mg/kg. L'extrait a également provoqué une augmentation significative des taux d'ASAT et de bilirubine chez les femelles aux doses de 800 et 1600 mg/kg. Quelques dommages tissulaires ont été observés chez les animaux traités à l'extrait, toutefois, 14 jours après la fin du traitement, ces anomalies ont été réversibles à l'exception des hyperplasies mésangiales et des emphysèmes.

L'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* a démontré des propriétés anti-*H. pylori* de même que des effets antiulcéreux importants. Ces derniers résulteraient de la capacité de l'extrait à inhiber la croissance bactérienne, renforcer les défenses antioxydantes *in vivo*, augmenter la production de mucus qui à son tour faciliterait la re-épithélialisation et l'angiogenèse. Ces effets pourraient être attribués, au moins partiellement, à l'action de la  $\alpha$ -amyrine et de la  $\beta$ -amyrone, deux composés majoritaires dans l'extrait ayant des propriétés antimicrobiennes et antiulcéreuses établies. L'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* ne serait pas toxique pour l'organisme à la dose thérapeutique (200 mg/kg), ce qui limite considérablement les risques liés à son utilisation et renforce l'usage de cette plante à des fins thérapeutiques.

**Mots clés :** *Eremomastax speciosa* ; Ulcères gastriques chroniques ; *Helicobacter pylori* ; Toxicité ; Rats Wistar ; Souris NMRI.

## ABSTRACT

Peptic ulcers are among the most common digestive tract diseases with a world-wide prevalence of 8 to 10 people out of 100. These ulcers occur because of deleterious effects of some factors such as *Helicobacter pylori* infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs intake. An effective treatment must take into account the ulcers etiology, this explains the current therapeutic regimens recommended in conventional medicine consisting in a tri- or quadritherapy. However, these conventional treatments display some limitations because of numerous reported side effects and *H. pylori* (the main cause of about 80% of gastric ulcers) resistance to antibiotics. Elaboration of alternative treatments that are effective, inexpensive, easily accessible and with lower toxicity, remains a major challenge. This explains the general objective of this work which was to evaluate the toxicity as well as the curative effects of the aqueous extract of *Eremomastax speciosa* leaves on chronic gastric ulcers involving a *H. pylori* infection.

Gastric biopsies from which we isolated *H. pylori* isolates used in this study, were obtained from patients at Civil Hospital in Karachi, Pakistan. *In vitro* inhibition tests were performed by using AlamarBlue® method, prior to morphological studies of bacteria by microscopic techniques. An *in vivo* rapid eradication test was also performed and bacterial loads in stomachs calculated. Two models of gastric chronic ulcers were induced in *H. pylori* infected rats, namely; simple acetic acid-induced chronic ulcers and “unhealed ulcers”. At the end of the treatments, bacterial loads in stomach, ulcers macroscopic parameters and some *in vivo* antioxidant parameters were measured. Histological sections of gastric tissues were also realized. The innocuousness of this extract was evaluated by using cytotoxicity tests, followed by *in vivo* toxicity tests (acute and subacute) in rats.

Aqueous extract of *E. speciosa* leaves inhibited *H. pylori* proliferation with a minimum inhibitory concentration of 8 mg/mL and a minimum bactericidal concentration above 32 mg/mL, this classifying it as bacteriostatic. Microscopic observations of *H. pylori* after *in vitro* inhibition tests revealed important disturbances of bacterial morphology, depending of the tested concentration. The extract induced a significant decrease ( $p < 0.05$ ) of *in vivo* bacterial load at the doses of 200 and 400 mg/kg. *E. speciosa* significantly decreased ( $p < 0.001$ ) the ulcer index at all the doses of extract and significantly increased mucus production (at the doses of 200 and 400 mg/kg) in both models of chronic ulcers studied. The extract generally caused an increase of antioxidant markers, including a significant increase in nitrite, irrespective of the model of chronic ulcer studied. Administration of *E. speciosa* also provoked a significant



( $p < 0.05$ ) decrease of bacterial load in stomachs, at the doses of 200 and 400 mg/kg, in both models of chronic ulcers studied. These results were confirmed by histological sections that illustrated the beneficial effects of *E. speciosa* on both ulcers healing and bacterial colonization of stomachs. *E. speciosa* did not show cytotoxic effect against mouse fibroblasts ( $IC_{50} > 1000$   $\mu\text{g/mL}$ ), human colon cancer cells ( $IC_{50} > 1000$   $\mu\text{g/mL}$ ) and *Artemia salina* larvae ( $LC_{50} > 1000$   $\mu\text{g/mL}$ ). In acute toxicity test, administration of a single dose of extract (2000 mg/kg) did not provoke any behavioral disturbance in animals and no death was recorded until the end of the experiment. In subacute assay, *E. speciosa* induced a significant increase of white blood cells count in females (400 and 1600 mg/kg) and a significant decrease of leucocytes in males at the dose of 1600 mg/kg. The extract also caused a significant increase of ASAT and bilirubin levels in females at the doses of 800 and 1600 mg/kg. Some tissue damages were observed in animals treated with extract, however, 14 days after the end of the treatment, these abnormalities were corrected excepted for mesangial hyperplasia and emphysema.

The aqueous extract of *E. speciosa* leaves demonstrated anti-*H. pylori* and antiulcer properties. These effects would result from the ability of this extract to; inhibit bacterial growth, reinforce antioxidant defenses *in vivo*, increase mucus production which in turn would facilitate re-epithelialization and angiogenesis. These effects could be attributed, at least partially, to the action of  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrone, two major compounds in the extract with established antimicrobial and antiulcer properties. The aqueous extract of *E. speciosa* leaves would not be toxic at therapeutic dose (200 mg/kg), this considerably limits the risks associated with its intake and reinforces the use of this plant for therapeutic purpose.

**Key words:** *Eremomastax speciosa* ; Chronic gastric ulcers ; *Helicobacter pylori* ; Toxicity Wistar rats; NMRI mice.

# **INTRODUCTION**

Les ulcères peptiques, désignant les ulcères gastriques et duodénaux, constituent l'affection gastrointestinale la plus répandue et sont la cause d'environ 15 000 décès par an à travers le monde (Valle, 2005). Il existe une prédominance des ulcères duodénaux sur les ulcères gastriques dans une proportion de 3/1 et une atteinte préférentielle de l'homme avec un sex-ratio de 3/1 pour les ulcères duodénaux et de 1/1 pour les ulcères gastriques (Bajer et Cazejust, 2008). Les ulcères peptiques se manifestent par plusieurs symptômes parmi lesquels: les douleurs épigastriques, la perte de poids et d'appétit, les ballonnements, nausées et vomissements. Les hématomés et méléna sont également observés dans les cas d'ulcères hémorragiques (Leslie, 1972). Il est communément établi que la survenue des ulcères peptiques résulte de la rupture de l'équilibre entre les facteurs d'agression (*Helicobacter pylori*, anti-inflammatoires non stéroïdiens, acide chlorhydrique, pepsine, reflux biliaire, leucotriènes, espèces réactives de l'oxygène) et les facteurs de défense (barrière mucus-bicarbonate, prostaglandines, microcirculation, renouvellement et migration cellulaires, antioxydants) de la muqueuse gastrique (Bandyopadhyay *et al.*, 2002 ; Bhattacharjee *et al.*, 2002). Dans les pays industrialisés, la prévalence de l'ulcère peptique est de 7 à 10 % dans sa localisation duodénale, et de 2 à 5 % dans sa localisation gastrique (Thiébaux et Demange, 2001). Au Cameroun, une étude menée par Eloumou *et al.* (2016) dans la ville de Douala a révélé une prévalence de 17,1 % pour les ulcères gastroduodénaux, dont 7,2 % pour les ulcères gastriques. Ankouane *et al.* (2016) ont quant à eux révélé, d'après une étude portant sur 4685 patients répartis dans trois hôpitaux universitaires de la ville de Yaoundé, une prévalence de 10,4 % pour les ulcères peptiques, dont 3,4 % pour les ulcères gastriques.

Durant de nombreuses années, la communauté médicale a pensé que la survenue des ulcères gastriques était liée à une mauvaise hygiène de vie (alimentation trop épicée, stress émotionnel) qui causait une surproduction d'acide gastrique, entraînant de ce fait des ulcères. La prise en charge était essentiellement chirurgicale (gastrectomie, vagotomie) accompagnée d'une diète sans épices et d'un alitement. A partir des années 1970, les progrès en pharmacologie ont permis la mise sur pied des antagonistes des récepteurs H<sub>2</sub> histaminiques (cimétidine, nizatidine) puis des inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) (oméprazole), remplaçant ainsi progressivement la chirurgie par une approche médicamenteuse (Gustafson et Welling, 2010). La découverte de l'implication de *Helicobacter pylori* dans l'étiologie et la physiopathologie de l'ulcère gastrique par Robin Warren et Barry Marshall (Warren et Marshall, 1983) a radicalement changé la perception ainsi que la prise en charge de cette pathologie. Cette bactérie, depuis lors, a été reconnue comme étant la principale cause de l'ulcère gastrique (Majumdar *et al.*, 2011). De ce fait, les schémas thérapeutiques ont été

reformulés pour mettre l'accent sur l'éradication de *H. pylori* comme première ligne de traitement de cette pathologie.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments utilisés dans le cadre d'une grande variété de pathologies incluant les arthrites et autres pathologies musculo-squelettiques. Toutefois, la prise de ces médicaments représente la seconde cause de survenue de l'ulcère gastrique du fait de leurs effets délétères sur la muqueuse gastrointestinale (Amandeep *et al.*, 2012). Il est estimé à environ 16 500 le nombre de décès par an liés à la prise des AINS à travers le monde, la plupart de ces décès étant la conséquence d'hémorragies gastrointestinales. En effet, la prise à longue durée des AINS provoque des ulcères gastriques ou duodénaux chez environ 12-15 % des patients (Brunton, 2006). En plus de leurs effets ulcérogènes vis-à-vis de la paroi gastrointestinale, les AINS ont la faculté de retarder la guérison des ulcères. Cet effet néfaste des AINS représente donc un dilemme en terme de traitement de patients souffrant d'arthrites concomitamment à un ulcère gastroduodéal. A ce jour, cette situation a été bien documentée aussi bien en pratique hospitalière que chez des modèles expérimentaux d'ulcères gastriques (Levi *et al.*, 1990 ; Elliot *et al.*, 1995). Wang *et al.* (1989) ont rapporté que les injections répétées d'indométacine pendant 2 à 4 semaines, à des rats sujets aux ulcères gastriques chroniques induits par l'acide acétique, retardaient la guérison desdits ulcères. Ces derniers ont été qualifiés d'ulcères « difficilement guérissables » du fait de leur persistance jusqu'à 12 semaines après cessation de l'administration d'indométacine (Amagase et Okabe, 1990).

La trithérapie consistant en l'administration d'un antisécrétoire et d'au moins deux antibiotiques a semblé être la bonne approche pour la prise en charge de l'ulcère gastrique, donnant de bons taux de succès. Cependant, certaines études ont révélé un déclin de l'efficacité de cette thérapie avec des taux de rechute supérieurs à 40 % dans certaines parties du monde (Gumurdulu *et al.*, 2004 ; Chuah *et al.*, 2011). Parmi les nombreuses causes de ce déclin l'on peut citer la réticence des patients face au traitement, la forte acidité gastrique, la résistance de *H. pylori* aux antibiotiques, les charges bactériennes élevées et le polymorphisme du parasite (Chuah *et al.*, 2011). Plus récemment, le recours à une quadrithérapie (un inhibiteur de la pompe à protons, un antiacide et deux antibiotiques) a produit des résultats très efficaces. Toutefois, la satisfaction née de cette approche a également été tempérée par des études qui ont conclu que la quadrithérapie augmentait non seulement la non observance du traitement par les patients, mais aussi les effets secondaires comparativement aux traitements plus simples (O'Connor *et al.*, 2010 ; Selgrad et Malfertheiner, 2011). Par ailleurs, plusieurs molécules utilisées dans le cadre des thérapies conventionnelles contre l'ulcère gastrique possèdent

d'importants effets secondaires. Par exemple, les IPP (oméprazole, lansoprazole) peuvent causer des nausées, des douleurs abdominales, des constipations, des anémies. La cimétidine peut provoquer des arythmies, l'anxiété, la dépression, une augmentation des taux sériques de transaminases et de créatinine, une gynécomastie, une perte de libido (Akhtar *et al.*, 1992 ; Srinivas *et al.*, 2013). Les limites associées aux traitements conventionnels en vigueur (récidive, réticence des patients, résistance de *H. pylori* aux antibiotiques, effets secondaires, etc.) d'une part, et la consommation sans cesse croissante des AINS d'autre part, posent donc un réel problème de prise en charge de l'ulcère gastrique. Comment formuler un régime thérapeutique capable de surmonter les limites énoncées ci-dessus et corriger l'effet retardateur des AINS sur la guérison des ulcères gastriques ? Peut-on mettre sur pied une monothérapie capable de solutionner ces différentes problématiques ?

La phytothérapie demeure une option attractive étant donné que plusieurs extraits de plantes ont révélé des propriétés antiulcéreuses prometteuses. Des travaux antérieurs menés au sein de notre unité de recherche ont démontré les effets cytoprotecteurs (Tan *et al.*, 1996 ; Amang *et al.*, 2014b), antisécrétoires (Tan *et al.*, 1996 ; Amang *et al.*, 2014a) et curatifs (Amang *et al.*, 2017a ; Amang *et al.*, 2017b) de l'extrait aqueux des feuilles de *Eremomastax speciosa* vis-à-vis des modèles expérimentaux d'ulcères gastriques chez le rat. Toutefois, les effets de cet extrait sur *H. pylori* n'ont jamais été testés. En continuité des travaux susmentionnés, nous nous sommes proposés d'évaluer les effets de cet extrait sur *H. pylori*, puis sur des modèles expérimentaux d'ulcères gastriques chroniques associés à une infection à *H. pylori*.

## **Objectif général**

L'objectif général de ce travail était d'étudier l'effet curatif de l'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* sur les ulcères gastriques impliquant une infection à *Helicobacter pylori* et d'évaluer la toxicité liée à l'administration de cet extrait.

## **Objectifs spécifiques**

Dans le cadre de ce travail, plusieurs objectifs spécifiques ont été arrêtés à savoir:

- ♣ déterminer les effets, *in vitro* et *in vivo*, de l'extrait sur *Helicobacter pylori*;
- ♣ évaluer les effets de l'extrait sur des ulcères gastriques chroniques associés à une infection à *Helicobacter pylori*;
- ♣ identifier et quantifier les composés phytochimiques présents dans l'extrait;
- ♣ évaluer la toxicité de l'extrait.

**CHAPITRE I**

**REVUE DE LA LITTERATURE**

## I.1- GENERALITES SUR L'ESTOMAC

L'estomac est l'organe du tube digestif dont la capacité est la plus importante. Situé entre l'œsophage distal et le duodénum, il se trouve entièrement dans l'abdomen sous le diaphragme. La fonction principale de l'estomac est de stocker et de mélanger ce qu'il reçoit. La nourriture est décomposée en une mixture épaisse et acide appelée chyme. Le sphincter pylorique se relâche une fois que le chyme est complètement formé, puis le chyme passe dans le duodénum (Salena et Hunt, 2005).

### I.1.1- ANATOMIE

L'estomac est la première poche du tube digestif. Il est délimité par 2 systèmes sphinctériens: à son entrée, le sphincter œsophagien inférieur (SOI) et le cardia qui permet la jonction avec l'œsophage et à sa sortie, le pylore qui fait la jonction avec l'intestin grêle (Figure 1). Le corps de l'estomac se trouve légèrement à gauche de la ligne médiane. L'antrum passe devant la colonne vertébrale entre la dixième vertèbre dorsale et la première vertèbre lombaire, le pylore quant à lui se situe à droite de la colonne vertébrale. La grande courbure de l'estomac est environ trois à quatre fois plus longue que la petite courbure. Le bord de la petite courbure forme en un point donné un angle que l'on appelle *incisura angularis* ou incisure angulaire. A ce point, dont la localisation est relativement constante, les plis muqueux saillants du corps de l'estomac font place à la muqueuse plus lisse de l'antrum (Salena et Hunt, 2005).

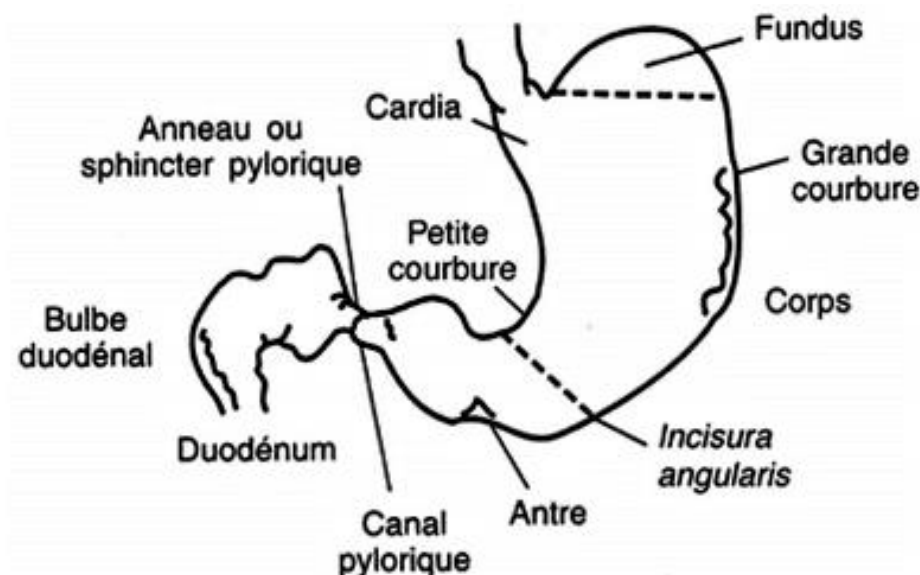


Figure 1: Divisions anatomiques de l'estomac (Salena et Hunt, 2005)

## **I.1.2- HISTOLOGIE**

La paroi gastrique est constituée de quatre couches (muqueuse, sous muqueuse, musculieuse, séreuse) réparties de la lumière vers l'intérieur (Figure 2).

### **I.1.2.1- La muqueuse**

Elle comporte l'épithélium, le chorion (ou *lamina propria*) et la musculaire muqueuse (ou *muscularis mucosae*). Il existe classiquement trois principaux types de muqueuse gastrique:

- La muqueuse de type cardinal située au niveau du cardia. Les glandes cardiales sont mucosécrétantes;
- La muqueuse de type fundique située dans la grosse tubérosité et le corps de l'estomac. Les glandes fundiques sont droites et faites essentiellement de cellules pariétales (sécrétion d'acide chlorhydrique et de facteur intrinsèque) aussi appelées cellules bordantes ou oxyntiques, de cellules principales (sécrétion de pepsinogène) et de cellules neuroendocrines (sécrétion de l'histamine) aussi appelées cellules *enterochromaffin-like* ou ECL;
- La muqueuse de type pylorique dans l'antrum. Les glandes pyloriques sont contournées et constituées principalement de cellules mucosécrétantes, de cellules neuroendocrines à gastrine ou cellules G, de quelques autres cellules neuroendocrines (cellules EC sécrétant de la sérotonine, cellules D sécrétant de la somatostatine) (Beaugerie et Sokol, 2014).

### **I.1.2.2- La sous-muqueuse**

Il s'agit d'un tissu conjonctif contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Dans la sous-muqueuse se trouve le plexus nerveux de Meissner.

### **I.1.2.3- La musculieuse**

Elle est constituée de trois couches de cellules musculaires lisses à savoir: la couche oblique interne, la couche circulaire moyenne et la couche longitudinale externe. Cette couche contient le plexus nerveux myentérique d'Auerbach et des cellules de Cajal (cellules *pacemaker* qui contrôlent le rythme du péristaltisme).

### **I.1.2.4- La séreuse**

Elle est la couche la plus externe des organes intra-péritonéaux. Elle est constituée de tissu conjonctif lâche aréolaire recouvert de mésothélium, une couche unique de cellules épithéliales squameuses (Marieb et Hoehn, 2007).



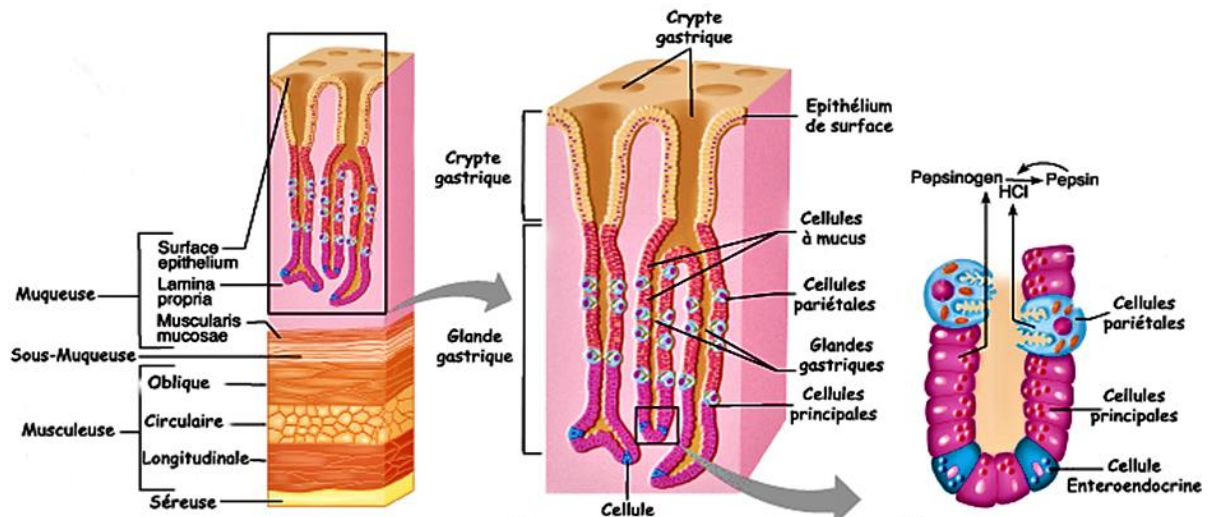


Figure 2: Anatomie microscopique (coupe transversale) de l'estomac (Marieb, 1999)

### I.1.3- PHYSIOLOGIE

#### I.1.3.1- Motilité

L'estomac est un organe creux constitué de deux zones fonctionnelles distinctes que sont l'estomac proximal et l'estomac distal. La principale fonction de l'estomac proximal (fundus et partie proximale du corps gastrique) est de former un réservoir pour les aliments. L'estomac distal (partie distale du corps gastrique et antrum) génère des contractions qui permettent de mélanger et de broyer les aliments, puis d'assurer la vidange gastrique, de façon à permettre une absorption optimale des nutriments dans l'intestin grêle (Figure 3). La vidange se fait par le sphincter pylorique qui s'ouvre par intermittence et de manière incomplète durant la phase de repos, permettant ainsi le passage de petites quantités de liquides alors que la plupart du contenu est refoulé dans le corps de l'estomac pour subir une homogénéisation plus complète (Beaugerie et Sokol, 2014).

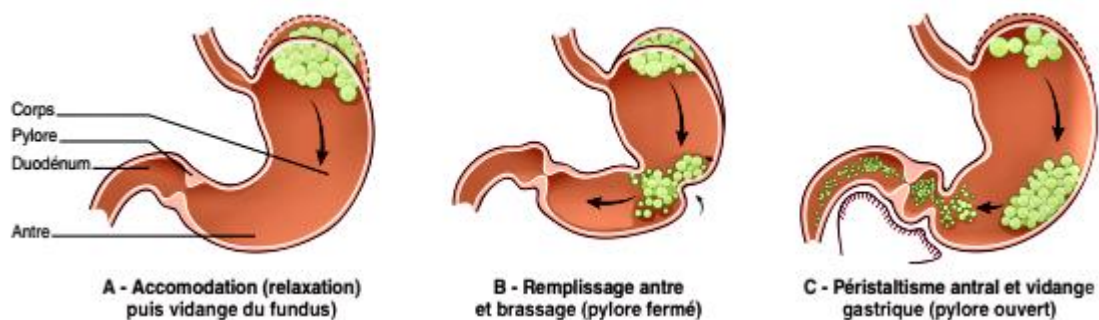


Figure 3: Différentes étapes de la vidange gastrique mesurée par scintigraphie (Beaugerie et Sokol, 2014)

### I.1.3.2- Sécrétion gastrique

La muqueuse de l'estomac sécrète le suc gastrique qui est un liquide acide, incolore et visqueux. Le volume quotidien sécrété varie entre 2 et 2,5 litres, et le débit de sécrétion est rythmé par les repas. Le suc gastrique contient deux substances clés impliquées dans la digestion: l'acide chlorhydrique et la pepsine. Ce suc contient également du mucus, du bicarbonate, de l'eau et des minéraux ainsi que le facteur intrinsèque, substance nécessaire à l'absorption de la vitamine B12 (Salena et Hunt, 2005).

#### a) Acide chlorhydrique

La sécrétion d'acide chlorhydrique détermine le débit sécrétoire gastrique. Cette sécrétion est assurée par les pompes  $H^+/K^+$ /ATPase des cellules pariétales fundiques, qui permettent de concentrer plus d'un million de fois les ions  $H^+$  entre l'intérieur (pH voisin de 7) et l'extérieur (pH entre 0,8 et 1) de la cellule pariétale. La sécrétion concomitante de chlore est permise par l'ouverture de canaux ioniques perméables au chlore et au potassium, qui amorce l'action des pompes  $H^+/K^+$ . Le mécanisme de sécrétion de l'acide chlorhydrique est illustré par la figure 4. Le dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) provenant du métabolisme énergétique s'associe avec de l'eau pour former l'acide carbonique ( $H_2CO_3$ ). La dissociation de  $H_2CO_3$  produit des ions  $H^+$  et bicarbonates ( $HCO_3^-$ ). L'ion  $H^+$  est récupéré par la pompe  $H^+/K^+$  ATPase et libéré dans la lumière gastrique. L'ion chlorure ( $Cl^-$ ) provient directement de l'espace interstitiel et au fur et à mesure que les ions  $H^+$  et  $Cl^-$  sont pompés vers la lumière, le pompage du  $HCO_3^-$  se fait vers l'espace interstitiel en échange d'ions  $Cl^-$ . Comme le  $Cl^-$  est sécrété en même temps que le  $H^+$ , il se forme le HCl (Beaugerie et Sokol, 2014).

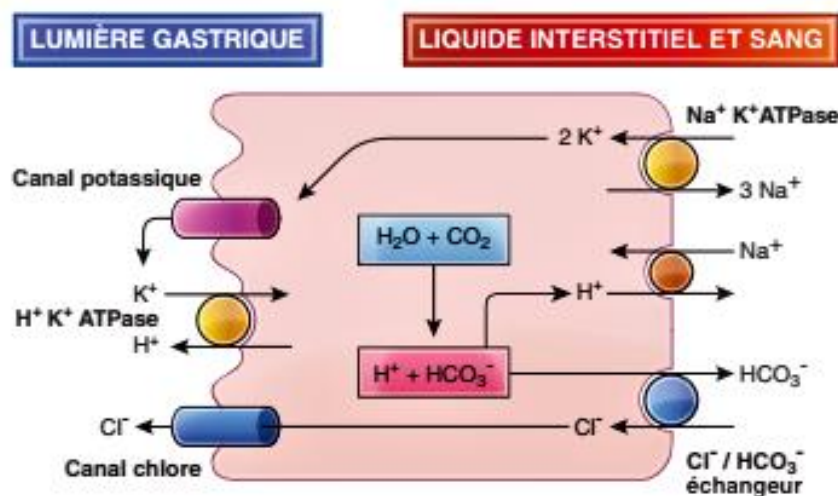


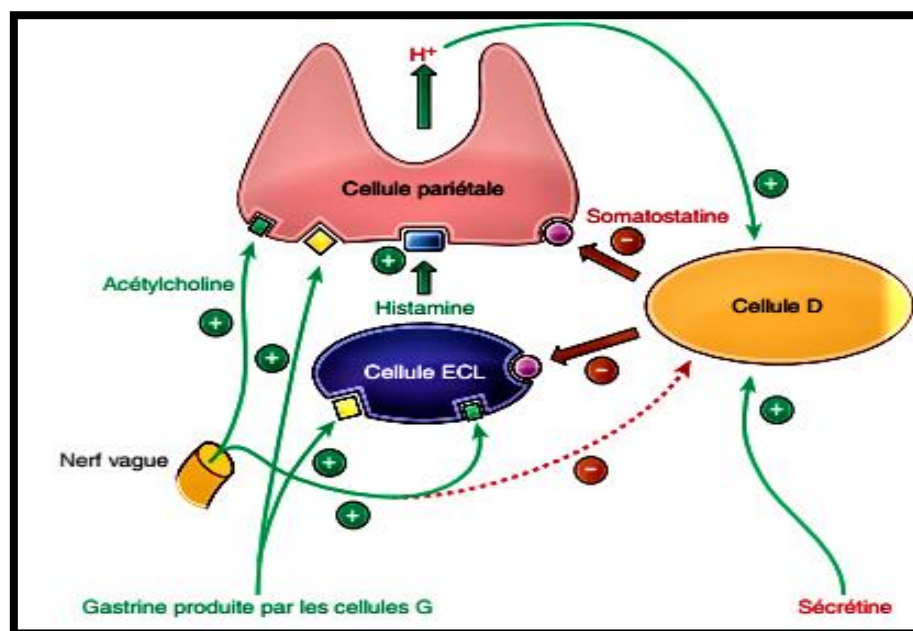
Figure 4: Mécanisme de sécrétion d'acide chlorhydrique par la cellule pariétale (Beaugerie et Sokol, 2014)

La sécrétion acide gastrique est modulée en permanence par voies: **endocrine** (gastrine), **paracrine** (histamine, somatostatine) et **nerveuse** (acétylcholine) (Figure 5).

La gastrine est sécrétée au pôle basal des cellules G des glandes pyloriques de l'antre dans la circulation sanguine. Elle agit par liaison sur des récepteurs membranaires des cellules ECL en stimulant la sécrétion d'histamine, et sur les récepteurs membranaires des cellules pariétales en stimulant la sécrétion d'acide chlorhydrique. La sécrétion de gastrine est stimulée par la distension gastrique et la présence d'aliments dans la cavité gastrique, et inhibée par l'augmentation de la concentration en ions  $H^+$  dans la cavité gastrique, via la somatostatine.

L'histamine est sécrétée par les cellules ECL, au voisinage des cellules pariétales, en réponse à la stimulation par la gastrine et par l'activation parasympathique. Cette sécrétion est inhibée par la somatostatine. L'histamine stimule la sécrétion de HCl par action sur les récepteurs histaminiques de type  $H_2$  des cellules pariétales. La somatostatine est le principal agent inhibiteur de la sécrétion acide gastrique. Sa sécrétion par les cellules D est stimulée par l'augmentation de la concentration en ions  $H^+$  dans la cavité gastrique.

L'acétylcholine, libérée par les neurones postganglionnaires du système parasympathique, stimule la sécrétion des cellules pariétales, la sécrétion de gastrine et la sécrétion d'histamine. La sécrétine, hormone digestive duodénale, participe également à l'inhibition de la sécrétion pariétale acide. Elle est libérée dans la circulation sanguine en réponse à l'arrivée de nutriments dans le duodénum (Beaugerie et Sokol, 2014).



**Figure 5: Régulation de la sécrétion acide par la cellule pariétale (Beaugerie et Sokol, 2014)**

*Les facteurs stimulants sont en vert (gastrine, acétylcholine, histamine), les facteurs inhibiteurs en rouge (ions  $H^+$ , somatostatine, sécrétine)*

## **b) Pepsinogène**

Le pepsinogène, un précurseur de la pepsine, est produit par les cellules principales situées à proximité de la base des glandes gastriques au niveau de l'estomac et du duodénum. Il existe deux sortes de pepsinogènes, le pepsinogène A et le pepsinogène B, chacun ayant une structure moléculaire différente. Les pepsinogènes sont stockés dans des granules intracellulaires et libérés par exocytose. La stimulation de la sécrétion de pepsinogène enclenche sa propre synthèse selon un processus d'autorégulation. Lorsque les pepsinogènes sont libérés par les cellules principales et ce, dans des conditions acides à un pH inférieur à 5, ils sont convertis en pepsine, une enzyme protéolytique impliquée dans la digestion. La sécrétion de pepsinogène est également régulée par les voies nerveuse et cellulaire paracrine. La sécrétion de pepsinogène est stimulée par l'acétylcholine, la CCK (cholécystokinine) et la substance P via l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  alors que la sécrétine, le VIP (*vasoactive intestinal peptide*), l'histamine et l'agent bêta-adrénergique causent une augmentation de la synthèse de l'AMPc. A l'opposé, la prostaglandine  $\text{E}_2$  et la somatostatine diminuent la sécrétion de pepsinogène en inhibant la synthèse de l'AMPc (Salena et Hunt, 2005).

## **c) Mucus**

Le mucus est sécrété par les cellules muqueuses de l'épithélium gastrique. Il est constitué majoritairement de glycoprotéines hydrophiles non digestibles (insensibles donc à l'action de la pepsine présente dans le suc gastrique) qui forment une couche d'environ 1 mm d'épaisseur à la surface de la paroi gastrique. Elles possèdent un fort pouvoir tampon qui leur permet de neutraliser les changements de pH observés en phase prandiale. La sécrétion de mucus est stimulée par les prostaglandines (Hazell *et al.*, 1986).

## **d) Le bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ )**

Le bicarbonate est l'un des principaux électrolytes sécrétés par les cellules à mucus de l'estomac. Ces cellules peuvent prélever le  $\text{HCO}_3^-$  au niveau de la membrane basolatérale et le sécréter au niveau de la membrane apicale. En plus, l'anhydrase carbonique qui génère le  $\text{HCO}_3^-$  est localisée au pôle apical de la cellule à mucus. Le transfert du bicarbonate se fait par la pompe ATPase  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  contre l'échange d'un ion chlorure. Le bicarbonate produit se trouve séquestré au sein du mucus lié où il contribue d'une part à la formation de la barrière muqueuse, et d'autre part au maintien du gradient de pH entre la lumière gastrique (pH = 2) et l'épithélium de la muqueuse gastrique (pH = 7) (Dudek, 2007). Le système nerveux

parasympathique, la présence de l'acide dans la lumière gastrique et les prostaglandines accroissent la sécrétion du bicarbonate.

#### e) Facteur intrinsèque

Encore appelé facteur de Castle, c'est une glycoprotéine sécrétée par les cellules pariétales de la muqueuse de l'estomac. Il est nécessaire à l'absorption intestinale de la vitamine B<sub>12</sub> (ou cobalamine). Dans l'espèce humaine, le facteur intrinsèque est codé par le gène GIF (Pocock et Richards, 2006). Son pH optimum d'action est voisin de 7 et sa concentration dans le suc gastrique est indépendante de la quantité d'acide chlorhydrique ou de pepsine présente. Le fait que le facteur intrinsèque humain soit physiologiquement produit en quantité restreinte limite l'absorption de vitamine B<sub>12</sub> à 2 µg par repas environ, ce qui correspond à un apport journalier suffisant en vitamine B<sub>12</sub> (Watanabe, 2007).

## I.2- GENERALITES SUR L'ULCERE GASTRODUODENAL

L'ulcère gastroduodénal se définit comme une perte de substance de la paroi gastrique ou duodénale atteignant en profondeur la musculature et s'accompagnant d'une réaction inflammatoire, des lésions vasculaires et une hypertrophie nerveuse (Calop *et al.*, 2008). Il se différencie des abrasions, érosions, exulcérations (ulcères superficiels) qui n'atteignent pas la couche musculaire et qui guérissent sans cicatrice (Figure 6).

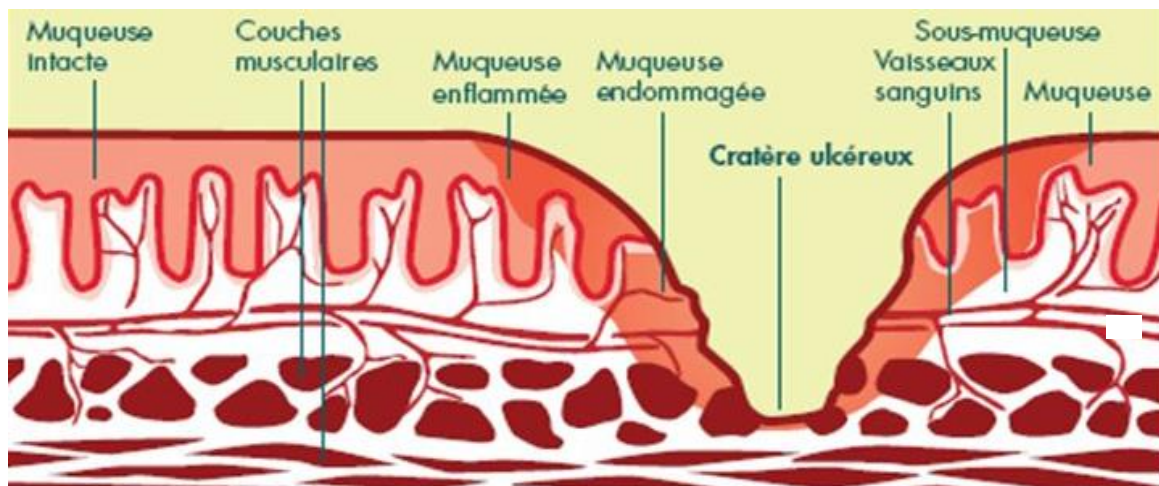


Figure 6: Représentation schématique d'un ulcère gastroduodénal (Rambaud, 2005)

### I.2.1- PHYSIOPATHOLOGIE

La survenue de l'ulcère gastroduodénal est la conséquence d'un déséquilibre entre les facteurs d'agression (infection à *Helicobacter pylori*, anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), hypersécrétion d'acide, tabagisme, alcool, stress, café) et les mécanismes de défense

(sécrétion de mucus, production de bicarbonate, flux sanguin muqueux, réparation cellulaire) de la muqueuse, en faveur des facteurs d'agression.

### **I.2.1.1- Facteurs d'agression**

#### **a) *Helicobacter pylori***

*Helicobacter pylori* (Figure 7) est un bacille hélicoïdal à Gram négatif, avec une forme spiralée, de 3 à 5 µm de long et 1 µm de diamètre. Il est mobile grâce à 4 à 6 flagelles polaires et engagés. Lorsque la bactérie est cultivée sur un milieu solide, elle perd son aspect spiralé et ressemble à un bâtonnet légèrement incurvé (coccoïde) (De Korwin et Lehours, 2010).



**Figure 7: Photographie de *Helicobacter pylori* (Crédit photo, Getty Images®)**

#### **i) Prévalence, incidence et réinfection**

L'infection à *H. pylori* atteint plus de 50 % de la population dans le monde. La prévalence de l'infection est beaucoup plus importante dans les pays en voie de développement (80-95 %) que dans les pays industrialisés (15-30 %). Cependant, cette séparation devient de moins en moins claire avec l'augmentation rapide du niveau socio-économique de certaines sous-populations des pays en voie de développement et l'utilisation de plus en plus répandue des antibiotiques. Ces dernières années, la prévalence de l'infection a diminué de façon importante à la fois dans les pays développés et les pays en voie de développement. Cette baisse devrait continuer dans le futur, conséquence de l'amélioration des conditions de vie et d'hygiène dans le monde (Frenck et Clemens, 2003 ; Azevedo *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2009). L'infection par *H. pylori* est acquise essentiellement durant l'enfance. L'incidence chez les enfants est de 3 à 10 % par an dans les pays en voie de développement et de 1 % par an dans les pays industrialisés (Ernst et Gold, 2000). La récurrence (réinfection ou infection mal traitée) d'une infection à *H. pylori* après éradication de la bactérie au niveau de l'estomac semble rare dans les pays développés contrairement aux pays en voie de développement (Gisbert 2005).

## ii) Mode de transmission

La bactérie se transmet le plus souvent au sein d'une même famille, essentiellement par voie directe oro-orale via la salive contaminée et lors de régurgitations (Bommelaer et Stef, 2009 ; Delchier *et al.*, 2014). C'est ce mode de transmission qui est le plus retrouvé, à la fois dans les pays en voie de développement et dans les pays développés. La transmission féco-orale directe (*via* les mains sales) ou indirecte (*via* l'eau souillée et les aliments contaminés) serait rare et retrouvée plutôt dans les pays en voie de développement. En effet, la bactérie est très fragile et ne survit que très peu de temps en dehors de l'estomac (Mégraud, 2003). Une fratrie nombreuse, la fréquentation d'une crèche ou la vie en institution augmenteraient le risque d'infection. La sensibilité des nourrissons et des enfants à l'infection par *Helicobacter pylori* serait expliquée par l'immaturation de l'épithélium gastrique, ainsi que par le fait de tout porter à la bouche. En absence d'éradication par des antibiotiques, l'infection persiste toute la vie (Mégraud, 2003).

## iii) Physiopathologie

Le modèle physiopathologique de *H. pylori* est très diversifié et implique l'intervention de plusieurs facteurs de virulence inhérents à la bactérie.

### ❖ L'uréase

*H. pylori* exprime une métalloenzyme à nickel de localisation cytoplasmique, l'uréase, produite en quantité abondante (6 à 10 % des protéines totales bactériennes). Elle hydrolyse l'urée présente dans l'environnement gastrique en permettant la production d'ammoniac et de dioxyde de carbone. L'ammoniac produit par l'uréase capte un proton pour former l'ammonium, ce qui permet à la bactérie de maintenir son pH intracellulaire proche de la neutralité. La production d'ammonium participerait également à l'endommagement de la barrière épithéliale gastrique afin de récupérer des nutriments et des ions essentiels (Smoot *et al.* 1990). L'activité enzymatique de l'uréase dépend indirectement du gène *ureI* codant pour une porine membranaire qui forme un canal dont l'ouverture est contrôlée par le pH externe. Un pH acide induit l'ouverture du canal permettant le passage de l'urée hydrolysée par l'uréase dans le cytoplasme bactérien. L'augmentation du pH provoque la fermeture du pore et empêche le passage de l'urée (Weeks *et al.*, 2000; Toledo *et al.*, 2002).

### ❖ Les flagelles et le chimiotactisme

La mobilité de *H. pylori* est un facteur indispensable à la colonisation de la muqueuse gastrique par la bactérie. Des mutants aflagellés de *H. pylori* sont incapables de persister dans la muqueuse gastrique de porcelets mais génèrent une réponse immunitaire témoignant de leur

survie transitoire dans l'estomac (Eaton *et al.* 1992). *H. pylori* possède 5 à 7 flagelles polaires engagés de 3 µm de long et une morphologie spiralée qui lui permettent, lors de son ingestion, d'abrégier son séjour dans le suc gastrique, de pénétrer dans la couche de mucus et de s'y mouvoir. La mobilité de *H. pylori* dans le mucus gastrique est assurée par la machinerie flagellaire dont la fonctionnalité requiert l'expression d'une quarantaine de gènes identifiés dans le génome de *H. pylori* (Tomb *et al.* 1997).

#### ❖ Le lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS est un constituant de la paroi qui est ancré dans la membrane externe par sa partie lipidique, appelée lipide A. A ce lipide A, est greffée une partie centrale courte composée de sucres. Cette partie centrale fait elle-même le lien entre le lipide A et de longues chaînes glycosidiques formant l'antigène O. La majorité des souches de *H. pylori* expriment le LPS qui contient des antigènes oligosaccharidiques fucosylés structurellement similaires aux antigènes du groupe sanguin humain. Ces antigènes bactériens (Lewis) présentent des variations antigéniques permettant à *H. pylori* d'échapper à la réponse immunitaire (Kusters *et al.*, 2006).

#### ❖ Les adhésines

Les capacités d'adhérence bactérienne sont indispensables à une bonne colonisation et à la persistance de l'infection. En effet, *H. pylori* doit adhérer aux cellules épithéliales gastriques pour éviter d'être éliminé par les mouvements péristaltiques gastriques et le renouvellement du mucus. L'adhérence bactérienne constitue ainsi la première étape de pathogénicité en mettant intimement en contact la bactérie et la cellule cible et permet des interactions directes entre bactéries et cellules hôtes. La présence de ces adhésines, et leur capacité à être exprimées ou non en fonction de l'environnement, permet au pathogène de moduler son adhérence et son profil de protéines de surface et ainsi d'échapper aux mécanismes de défenses de l'hôte (White *et al.*, 2015).

#### ❖ La cytotoxine vacuolisante (VacA)

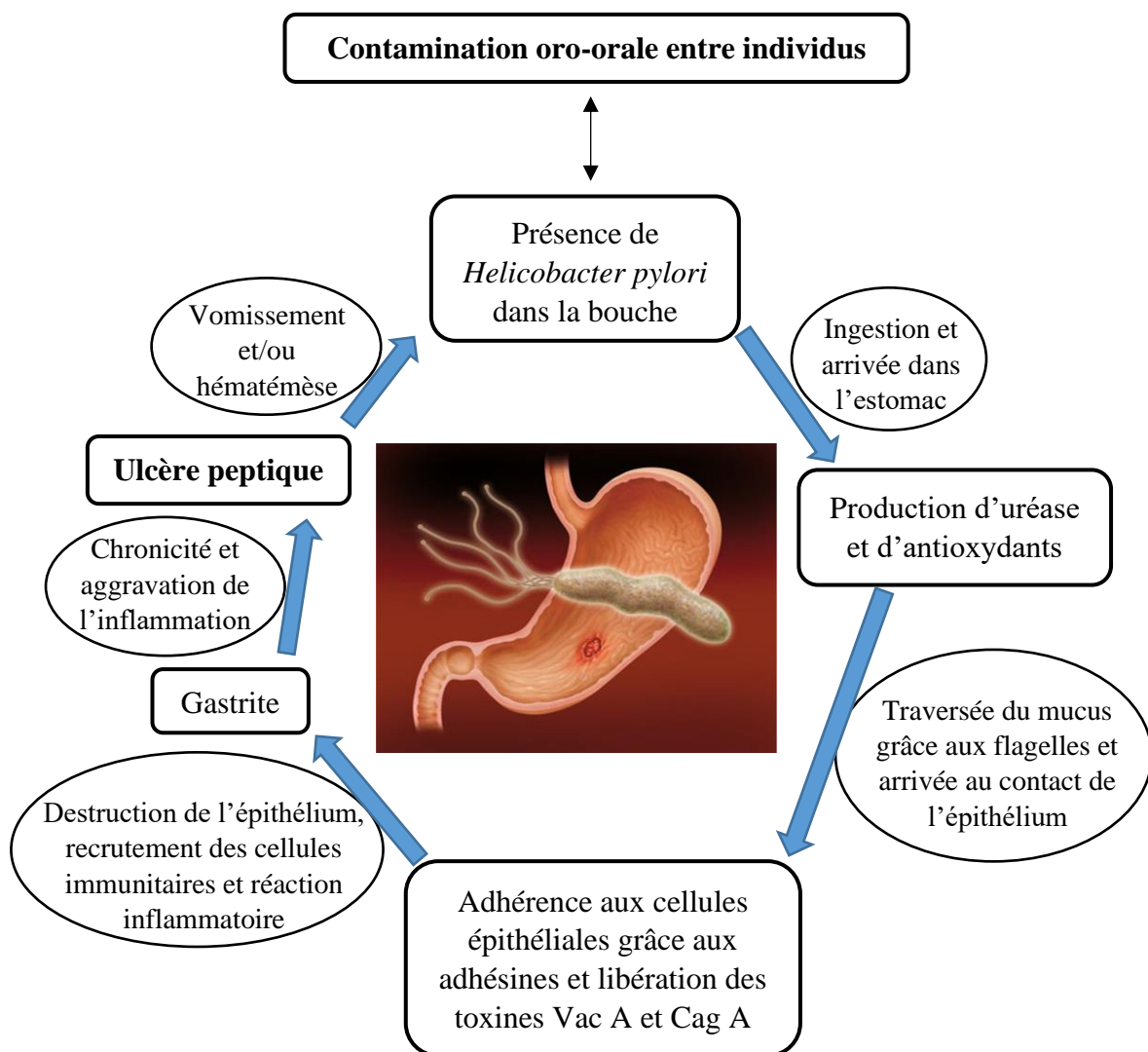
La cytotoxine VacA est une protéine de 81 à 91 kDa présente chez toutes les souches de *H. pylori*. Cette protéine a la particularité d'être une cytotoxine multifonctionnelle. Elle entraîne une perturbation de la signalisation cellulaire incluant entre autres une vacuolisation cellulaire, la formation de canaux membranaires, la perturbation des fonctions endosomales/lysosomales, l'apoptose et un effet immunosuppresseur. La capacité de la toxine à former des pores anioniques est également une caractéristique importante de son mécanisme d'action (Isomoto *et al.*, 2010).



### ❖ La cytotoxin associated antigen A (CagA)

Le gène CagA code pour la protéine CagA, de 120 à 140 kDa, qui est présente à la surface de *Helicobacter pylori*. La protéine CagA est injectée, par *H. pylori*, dans les cellules épithéliales gastriques mais aussi dans les cellules phagocytaires. La protéine CagA induit ainsi des réponses cellulaires de l'hôte telles qu'une perturbation des jonctions serrées et adhérentielles, une perte de polarité cellulaire et une activité mitogène et pro-inflammatoire (Backert et Selbach, 2008).

Le modèle physiopathologique de l'ulcère gastroduodéal dû à *H. pylori* peut être résumé par la figure 8.



**Figure 8: Schéma récapitulatif de l'implication de *Helicobacter pylori* dans la pathogenèse de l'ulcère gastroduodéal**

#### iv) Diagnostic

La détection de la présence de *Helicobacter pylori*, que ce soit pour le diagnostic de l'infection ou pour le contrôle de l'éradication, repose sur des méthodes invasives et non invasives (Delchier *et al.*, 2014).

- **Méthodes non invasives**

- **Test respiratoire à l'urée marquée**

Ce test repose sur l'activité uréasiqye de *H. pylori*. Il consiste à faire ingérer par le patient de l'urée marquée au carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ) (isotope stable, donc non radioactif). Le  $^{13}\text{CO}_2$  qui résulte de l'hydrolyse de l'urée est détecté dans l'air expiré 30 minutes après l'ingestion. La détection du  $^{13}\text{CO}_2$  se fait par spectrométrie infra-rouge ou spectrométrie de masse.

- **Méthodes immunologiques**

Ces méthodes utilisent la technique ELISA pour détecter les anticorps (IgG) produits contre la bactérie. Les IgG apparaissent parfois plusieurs semaines après la primo-infection, leur taux reste élevé durant l'infection et diminue progressivement 4 à 6 mois après l'éradication, ce qui explique que ces tests ne peuvent pas être utilisés pour contrôler précocement la bonne éradication après traitement.

- **Test antigénique dans les selles**

Cette méthode est basée sur l'immunochromatographie ou sur la technique ELISA faisant appel à des anticorps monoclonaux. Elle consiste à détecter des antigènes de *Helicobacter pylori* dans les selles. Ce test sert principalement au contrôle de l'éradication et peut servir aussi au diagnostic primaire. Il remplace le test respiratoire lorsque celui-ci ne peut pas être fait. La sensibilité et la spécificité sont presque aussi bonnes qu'avec le test respiratoire à l'urée marquée (Delchier *et al.*, 2014).

- **Méthodes invasives**

- **Examen anatomo-pathologique**

Avec une sensibilité et une spécificité supérieures à 90 %, l'examen anatomo-pathologique constitue l'examen de référence. Il permet à la fois de mettre en évidence *H. pylori* après fixation et coloration de la biopsie et d'identifier les lésions. Il n'est satisfaisant que s'il est réalisé par un praticien spécialisé.

### **- Test à l'uréase**

Le principe du test à l'uréase repose sur l'activité uréasique importante de *H. pylori*. La biopsie est mise en contact avec un milieu contenant de l'urée et un indicateur coloré. L'ammoniac libéré augmente le pH et provoque un changement de coloration de l'indicateur qui peut être observé après 10 minutes, 30 minutes, 1 heure ou 24 heures. Ce test présente une sensibilité de 80 % et une spécificité de 95 % après 1 heure. Ce test n'est pas utilisable pour vérifier l'éradication en raison d'une diminution de sensibilité en cas de population bactérienne réduite.

### **- Examen bactériologique**

L'examen bactériologique consiste en la mise en culture de *H. pylori*. Il présente une excellente sensibilité (80 à 95 %). Il est considéré comme l'examen le plus spécifique. C'est le seul examen qui permet de déterminer la sensibilité de *H. pylori* aux antibiotiques, la culture nécessitant 3 à 4 jours en moyenne. Les conditions strictes d'acheminement constituent un autre obstacle. Si le délai d'acheminement est supérieur à 4 heures, il convient d'utiliser un milieu de transport adapté qui assure une microaérobiose à 4° C (Delchier *et al.*, 2014).

### **- Amplification génique par "Polymerase Chain Reaction" (PCR)**

L'extraction d'ADN à partir d'une biopsie gastrique va pouvoir révéler les séquences d'ADN spécifiques de *H. pylori* par la PCR simple ou la PCR en temps réel. Comme la culture, cette technique est utilisée pour le diagnostic en cas d'échec au traitement de première intention. Son intérêt principal est l'obtention des résultats en 2 à 24 heures, ce qui est bien plus rapide que la culture. De plus, cette méthode permet également de déceler une éventuelle résistance aux macrolides (clarithromycine), aux fluoroquinolones (lévofloxacine) et les conditions de transport et de conservation sont relativement faciles puisque l'ADN est stable à température ambiante. Sa sensibilité est supérieure à 80 % (Delchier *et al.*, 2014).

## **b) Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

Les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) font partie des médicaments les plus largement prescrits à titre antalgique et anti-inflammatoire. Cependant, il est largement reconnu que l'utilisation des AINS est responsable d'effets indésirables gastro-intestinaux (GI) tels que la dyspepsie, les douleurs abdominales, les nausées, la gastro-duodénite érosive, les ulcères, les perforations et les hémorragies. Presque tous les patients qui prennent de l'aspirine ou des AINS conventionnels développeront à un moment donné des lésions aiguës asymptomatiques des voies digestives supérieures (érosions ou ulcères) (Salena et Hunt, 2005).

Les mécanismes complexes qui entrent en jeu dans la défense de la muqueuse gastroduodénale dépendent largement des prostaglandines endogènes (PG) synthétisées au niveau de la muqueuse GI. Les deux isoformes connues de la cyclo-oxygénase (COX), COX-1 et COX-2 régulent la synthèse des PG à partir de l'acide arachidonique. COX-1 est exprimée constitutionnellement dans la plupart des cellules de l'organisme et joue un rôle important dans le cadre de la protection de la muqueuse GI, la régulation du flux sanguin rénal, et la fonction plaquettaire physiologique. En revanche, COX-2 est largement inductible en cas d'inflammation, et serait à l'origine de la production des prostaglandines qui sont responsables de la douleur et de l'inflammation. En règle générale, les AINS non sélectifs inhibent à la fois les voies métaboliques de COX-1 et COX-2 et entraînent simultanément des effets bénéfiques et toxiques (Hawkey et Langman, 2003). On suppose que les effets toxiques des AINS sont liés à l'inhibition de COX-1, à la perte de la protection muqueuse au niveau gastro-intestinal et également au risque accru de saignement en raison de l'inhibition de la fonction plaquettaire. Il existe une corrélation entre le risque de complications gastro-intestinales et le degré relatif d'inhibition des isoenzymes COX-1 et COX-2. Un AINS ayant une sélectivité plus marquée vis-à-vis de COX-2 que de COX-1 aura une toxicité gastro-intestinale moins prononcée que d'autres AINS non sélectifs. Le concept selon lequel une inhibition préférentielle de COX-2 maintiendrait le bénéfice thérapeutique des AINS traditionnels au prix d'une toxicité gastro-intestinale moindre (en épargnant COX-1) a entraîné le développement d'inhibiteurs plus sélectifs de COX-2, les coxibs. Les coxibs de première (célécoxib et rofécoxib) et de seconde (étoricoxib, valdécoxib, parécoxib et lumiracoxib) génération sont mieux tolérés sur le plan digestif et présentent moins d'effets indésirables d'après différentes méthodes d'évaluation de l'innocuité GI. Au cours d'essais cliniques, les coxibs ont démontré une réduction significative du risque d'ulcères et de complications ulcéreuses par rapport aux AINS non sélectifs (Hunt *et al.*, 2002).

### **c) Syndrome de Zollinger-Ellison**

Il s'agit d'une maladie caractérisée par des ulcères gastriques et duodénaux graves, souvent multiples et récidivants, résistant aux traitements usuels, avec hypersécrétion et hyperacidité importante de la muqueuse gastrique. Ces ulcères sont secondaires à un gastrinome, une tumeur endocrine généralement située dans le duodénum ou le pancréas, sécrétant de la gastrine, qui à son tour stimule la sécrétion gastrique acide (Zollinger et Ellison, 1955).

#### **d) Alcool**

Les mécanismes d'induction des ulcères gastriques par l'éthanol sont variés. Ils incluent une baisse de la production de mucus et de bicarbonates dans l'estomac, une inhibition de la microcirculation gastrique, médiée par l'augmentation du taux d'endothéline 1 dans le sang, ainsi qu'une nécrose des cellules épithéliales (Szabo *et al.*, 1998).

#### **e) Tabac**

Le tabac augmente la sécrétion acide, il augmente également l'incidence des ulcères ainsi que leur taux de rechutes et retarde la cicatrisation. Il semble diminuer les défenses de la muqueuse gastrique et permettrait alors à *Helicobacter pylori* de se développer dans un milieu plus propice (Ko et Cho, 2000).

#### **f) Stress**

L'activation du système nerveux sympathique par le stress conduit à l'augmentation de la libération de catécholamines, à la vasoconstriction et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : quand ces effets persistent, ils causent des dommages en brisant les défenses de la muqueuse gastrique, conduisant ainsi à l'ulcération (Martindale *et al.*, 2005). La diminution de la circulation sanguine et la baisse de l'apport en oxygène, due à la vasoconstriction, induisent une hypoxie. Cette dernière provoque une acidification du milieu intracellulaire et des lésions des cellules épithéliales de surface, plus sensibles à l'hypoxie, qui séparent le contenu de la lumière gastrique avec le milieu intérieur de l'organisme. Ceci entraîne une augmentation de la perméabilité et de la rétrodiffusion de protons et de la pepsine qui provoquent des dommages sur la muqueuse (Fennerty, 2002).

#### **g) Génétique**

Le terrain génétique serait aussi un facteur pouvant favoriser les ulcères. Les personnes de groupe sanguin O auraient un risque d'ulcère duodéal environ 2 fois plus élevé. En effet, *H. pylori* possède des adhésines capables de se fixer sur l'antigène Lewis associé au groupe O, qui s'exprime à la surface des cellules gastriques (Bouarioua *et al.*, 2007).

### **I.2.1.2- Facteurs de défense**

#### **a) La barrière mucus-bicarbonate**

Le mucus est un gel adhérent, formé de glycoprotéines, qui recouvre l'épithélium de surface gastrique et duodéal. Il est capable, dans les conditions normales, de réduire par un

facteur 10 la diffusion des ions  $H^+$ . Chez l'ulcéreux gastrique, le gel de mucus est structurellement plus faible, moins résistant à l'érosion aboutissant ainsi à une augmentation de sa perméabilité aux ions  $H^+$ . Cette dégradation du mucus est corrélée avec le débit de pepsine et avec l'évolution de l'ulcère (Pospai *et al.*, 1997). Ainsi en étant imperméable à la pepsine et en empêchant la rétrodiffusion des protons  $H^+$ , cette barrière joue un double rôle de protection physique et chimique.

#### **b) La barrière épithéliale**

Elle constitue la deuxième ligne de défense de l'estomac. Elle est constituée par une couche continue de cellules épithéliales qui sécrètent le mucus, le bicarbonate et les prostaglandines. La membrane luminale des cellules de la muqueuse est imperméable aux ions  $H^+$ . Les faces latérales des cellules sont réunies près de la lumière gastrique par des jonctions étanches de sorte que l'acide ne peut traverser la muqueuse et gagner la sous-muqueuse par diffusion entre les cellules. En plus, les cellules de la muqueuse se renouvellent entièrement tous les trois jours, ce qui leur évite d'être exposées longtemps aux conditions agressives de l'estomac. L'imperméabilité relative du tissu gastrique est donc un équilibre qui dépend à la fois de l'adhérence des cellules les unes aux autres et de leur renouvellement régulier (Laine *et al.*, 2008 ; Tulassay et Herszényi, 2010).

#### **c) Le flux sanguin muqueux**

Le flux sanguin est un facteur important dans la défense de la muqueuse. Il assure l'épuration des éléments rétrodiffusés. Il existe un seuil de réduction de flux sanguin muqueux gastrique critique pour l'apparition des lésions induites par l'acide. Cette réduction du flux, surtout incriminée dans la genèse de l'ulcère gastrique, entraîne une altération des défenses muqueuses, le déficit de l'apport d'oxygène et de nutriments, la formation de radicaux libres directement délétères. Le monoxyde d'azote (NO) joue également un rôle important dans la guérison de l'ulcère gastro-duodéal en modulant le flux sanguin muqueux de par son action sur les capillaires gastriques (Prucksunand *et al.*, 2001).

#### **d) Les prostaglandines**

Les prostaglandines sont des métabolites de l'acide arachidonique. Elles sont synthétisées par la plupart des cellules et sont particulièrement abondantes dans le tube digestif. Les prostaglandines inhibent la sécrétion acide gastrique et stimulent la production de mucus qui est un facteur important de défense de la muqueuse gastrique (Bonfils, 1990).

## I.2.2- MECANISMES DE CICATRISATION

La guérison d'un ulcère se traduit par la formation d'une cicatrice. Ce processus de cicatrisation s'effectue comme décrit ci-après (Stevens et Lowe, 1997).

❖ **La formation d'un tissu de granulation vasculaire:** les capillaires du tissu sain entourant la lésion pénètrent dans la zone endommagée qui est colonisée par des macrophages, des fibroblastes, et des myofibroblastes. Ces macrophages phagocytent l'exsudat inflammatoire et les tissus morts. Un tissu de granulation vasculaire, constitué de capillaires, des macrophages et de cellules de soutien remplace la zone endommagée.

❖ **La mise en place d'un tissu de granulation fibro-vasculaire:** les fibroblastes et les myoblastes se multiplient et la zone lésée est comblée par un réseau de capillaires, les fibroblastes en croissance et quelques macrophages. Pendant que la croissance des fibroblastes et la synthèse de collagène se poursuivent, une grande partie des capillaires de la zone lésée et les tissus sains voisins véhiculent les produits de nutrition des fibroblastes. Les parois des vaisseaux persistantes acquièrent les cellules musculaires lisses et deviennent des artérioles et des veinules fonctionnelles.

❖ **L'établissement du tissu de granulation fibreux:** les espaces entre les vaisseaux se remplissent de fibroblastes synthétisant le collagène. Ces fibroblastes s'agencent de manière régulière, amenant une orientation du collagène dans le sens de l'attraction physique exercée; cette disposition procure une plus grande résistance au tissu. Des phénomènes de contraction apparaissent dans la zone lésée grâce à la présence de myoblastes. Ceux-ci contribuent à diminuer la surface de la zone lésée.

❖ **La formation d'une cicatrice collagène:** la production d'un collagène dense par les fibroblastes est à l'origine d'une cicatrice collagène. Lorsque les fibroblastes ont synthétisé suffisamment de collagène, ils deviennent inactifs et possèdent alors un noyau entouré d'un cytoplasme peu abondant et sont appelés fibrocytes.

## I.2.3- COMPLICATIONS DES ULCERES GASTRODUODENAUX

L'évolution de la maladie ulcéreuse peut être émaillée de complications qui transforment cette pathologie bénigne en un accident grave mettant en péril la vie du malade (SNFGE, 2009).

### **I.2.3.1- Hémorragie digestive**

L'hémorragie digestive représente 30 à 40 % des hémorragies digestives hautes, c'est la complication la plus fréquente des ulcères gastroduodénaux. Ce risque est aggravé si l'on est en présence d'une personne âgée de plus de 65 ans, d'antécédent d'ulcères gastroduodénaux compliqués ou non, et de la prise d'aspirine ou d'AINS, de corticoïdes, d'antiagrégants ou d'anticoagulants. L'hémorragie peut être chronique et entraîner une carence en fer et une anémie microcytaire arégénérative ferriprive, mais elle est le plus souvent aiguë et se manifeste par une hématomèse, un méléna, des rectorragies. Ces manifestations peuvent être le mode de révélation de l'ulcère (SNFGE, 2009).

### **I.2.3.2- Perforation ulcéreuse**

La perforation ulcéreuse entraîne initialement une douleur épigastrique intense et très violente accompagnée de nausées et de vomissements. Puis, la douleur se généralise lors de la formation de la péritonite. Il peut arriver que la perforation se fasse à l'endroit où un autre organe est accolé, notamment le pancréas, on parle alors d'ulcère « perforé-bouché ». Dans ce cas, les douleurs sont moins prononcées mais il peut se former un abcès visible au scanner (SNFGE, 2009).

### **I.2.3.3- Sténose ulcéreuse**

La fréquence des sténoses ulcéreuses a diminué avec la prise en charge plus précoce des ulcères, c'est aujourd'hui une complication rare. On la trouve au niveau des zones étroites (antre, pylore, bulbe). Elle se caractérise par des vomissements post-prandiaux tardifs et des douleurs abdominales. La prise en charge de la sténose se fait par dilatation avec un ballonnet (SNFGE, 2009).

### **I.2.3.4- Cancer gastrique**

Seuls les ulcères gastriques peuvent se Cancériser, les ulcères duodénaux n'évoluant généralement pas vers un cancer. C'est grâce aux biopsies réalisées lors de la fibroscopie qu'il est possible de voir si l'ulcère se Cancériser ou non. Bien que l'incidence du cancer gastrique tende à diminuer aujourd'hui parallèlement à la diminution du nombre de personnes infectées par *Helicobacter pylori*, le cancer gastrique reste un problème de santé publique. De plus, il reste un cancer de mauvais pronostic puisque le taux de survie est de 25 % après 5 ans (Delchier *et al.*, 2014).



## **I.2.4- TRAITEMENT**

### **I.2.4.1- Traitement médicamenteux conventionnel**

Les objectifs du traitement sont la suppression rapide des symptômes, la cicatrisation et la prévention des récives et complications.

#### **a) Médicaments utilisés**

Il s'agit principalement des antibiotiques, antisécrétoires, antiacides et antiulcéreux topiques (Thiébaux et Demange, 2001).

##### **i) Antibiotiques**

Les  $\beta$ -lactamines (amoxicilline), les imidazolés (métronidazole) et les macrolides (clarithromycine) sont les plus recommandés, les autres antibiotiques étant d'activité moindre.

##### **ii) Antisécrétoires**

Les antisécrétoires favorisent l'action de certains antibiotiques (amoxicilline, clarithromycine) dont l'activité diminue en pH acide. L'effet de ces antibiotiques est d'autant meilleur que le pH intragastrique est proche de la neutralité. Les antisécrétoires sont constitués de trois grands groupes de médicaments à savoir: les inhibiteurs de la pompe à protons ou IPP (oméprazole, lansoprazole, pantoprazole, rabéprazole), les antagonistes de l'histamine H<sub>2</sub> (cimétidine, ranitidine, famotidine) et les anticholinergiques (atropine, pirenzépine).

##### **iii) Antiacides**

Ils sont généralement prescrits dans le traitement symptomatique des douleurs de la maladie ulcéreuse évolutive en association avec un anti sécrétoire (Exemple: bismuth salicylate basique). Dans ce but, ils doivent être pris après le repas et éventuellement au moment des douleurs, la durée de leur prescription se limitant à la seule période douloureuse.

##### **iv) Antiulcéreux topiques**

Cette classe de médicaments antiulcéreux agit principalement en formant un écran protecteur à la surface de la muqueuse, empêchant ainsi le contact direct de cette dernière avec l'acide et la pepsine, ce qui favorise la guérison. Parmi ces médicaments cytoprotecteurs l'on peut citer: le sucralfate, le misoprostol (analogue de la prostaglandine E<sub>1</sub>) et les analogues de la somatostatine.

## b) Stratégie thérapeutique

La stratégie thérapeutique est fonction de l'étiologie, elle doit donc prendre en compte les causes directes de la survenue des ulcères (Thiébaux et Demange, 2001).

### i) En cas d'ulcère gastroduodéal associé à *Helicobacter pylori*

Le traitement recommandé repose sur une trithérapie, allant de 7 à 14 jours, associant un inhibiteur de la pompe à protons et deux antibiotiques. En cas d'échec du traitement de 1<sup>ère</sup> intention, des traitements de 2<sup>e</sup> voire de 3<sup>e</sup> ligne peuvent être envisagés (Figure 9).

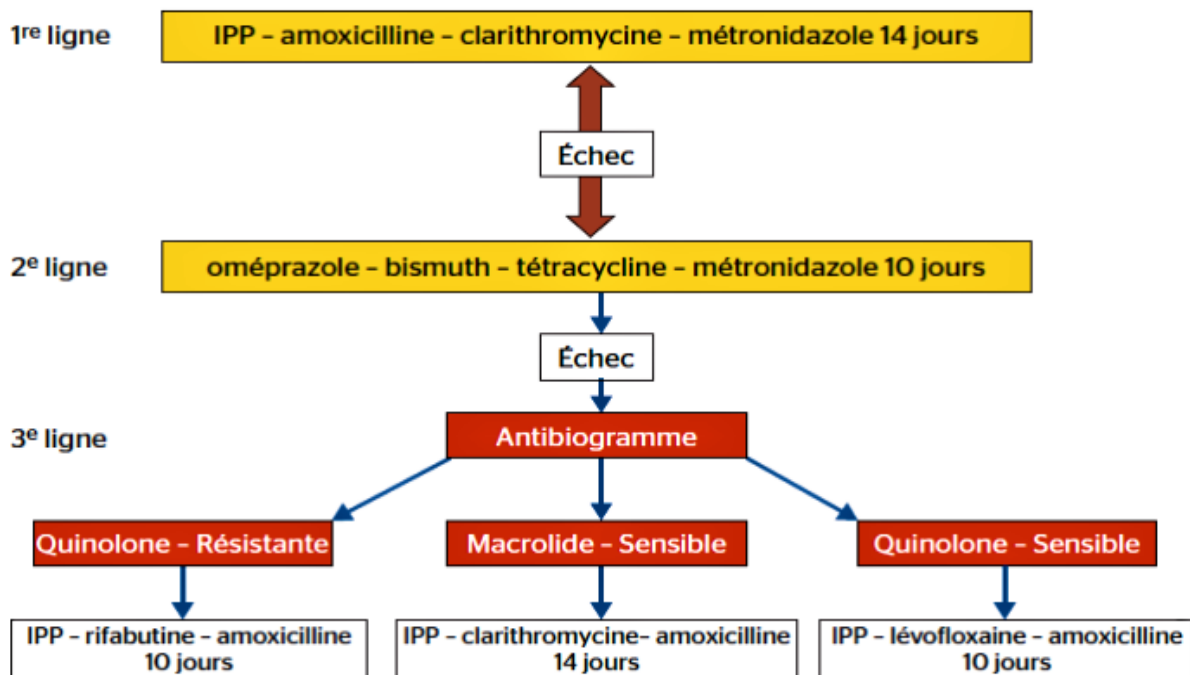


Figure 9: Algorithme des trois lignes de traitement de l'infection à *H. pylori* (Delchier, 2012)

### ii) En cas d'ulcère gastroduodéal induit par les AINS

Le traitement par IPP est prescrit pendant 4 semaines (ulcère duodéal) ou 8 semaines (ulcère gastrique). Si la prise des AINS est indispensable, elle peut être maintenue sous IPP. Un traitement d'éradication de *H. pylori* est associé en début de traitement chez les sujets combinant les deux facteurs de risque.

### iii) En cas d'ulcère gastroduodéal non lié à *H. pylori* et à la prise d'AINS

Après avoir éliminé un syndrome de Zollinger-Ellison, une maladie de Crohn, un lymphome ou un cancer gastrique, il est recommandé, en cas d'ulcère gastrique, un traitement antisécrétoire par IPP pendant 4 à 8 semaines suivi d'un contrôle endoscopique avec biopsies.

En l'absence de cicatrisation, un nouveau traitement est proposé. Au terme de ce traitement, la persistance de l'ulcère gastrique doit faire envisager une intervention chirurgicale.

#### I.2.4.2- Phytothérapie

Bien que les schémas thérapeutiques conventionnels soient efficaces, leurs multiples effets secondaires sont souvent inévitables et limitent leur utilité clinique (Xiao *et al.*, 2013). Des études cliniques et précliniques ont démontré que les formulations à base de plantes médicinales présentent un bénéfice thérapeutique certain contre les ulcères gastriques avec moins d'effets secondaires (Srivastava *et al.*, 2011). Quelques plantes ayant des propriétés antiulcéreuses démontrées ont été répertoriées et classées dans le tableau I.

**Tableau I: Quelques plantes médicinales à propriétés antiulcéreuses (Borelli et Izzo, 2000)**

Plantes	Parties utilisées	Type d'extrait	Modèle d'ulcère	Références
<i>Artemisia herba-alba</i>	Feuilles	Aqueux	Ethanol	Gharzouli <i>et al.</i> , 1999
<i>Tanacetum vulgare</i>	Parties aériennes	Chloroforme	Ethanol	Tournier <i>et al.</i> , 1999
<i>Eremomastax speciosa</i>	Feuilles	Aqueux	Ethanol, ligature du pylore, HCl,	Tan <i>et al.</i> , 1996
<i>Diodiasar mentosa</i>	Plante entière	Ethanol	Aspirine, ligature du pylore	Akah <i>et al.</i> , 1998
<i>Pluchea indica</i>	Racine	Méthanol	Ethanol, aspirine Indométacine	Sen <i>et al.</i> , 1992
<i>Zingiber officinalis</i>	Racines	Méthanol	HCl/éthanol	Yamahara <i>et al.</i> , 1988
<i>Atractylodis lancea</i>	Rhizome	Acétone	Ethanol, HCl	Matsuda <i>et al.</i> , 1998

### I.3- STRESS OXYDANT

D'une manière générale, le stress oxydant peut être défini comme un déséquilibre de la balance des espèces pro-oxydantes et des systèmes de défense dits antioxydants avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (Poncelet et Sifer, 2011). En effet, les cellules des êtres aérobies produisent, en permanence et en faible quantités, des espèces réactives oxygénées (ERO) et azotées (ERN) à l'issue de nombreux processus cellulaires. Le rôle exact de cette production basale d'espèces réactives n'est pas totalement connu mais certaines de ces molécules, lorsqu'elles sont produites en faibles quantités,

pourraient avoir un rôle de messagers secondaires dans l'activation de diverses voies de signalisation intracellulaire (comme l'apoptose). Produites en trop grandes quantités, ces espèces réactives sont délétères et vont réagir avec les constituants de la cellule, menaçant leur intégrité structurale (Wu *et al.*, 2015).

### **I.3.1- LES PRO-OXYDANTS**

#### **I.3.1.1- Les différentes espèces réactives de l'oxygène (EROs)**

Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres dérivés de l'oxygène ont une propriété caractéristique commune, qui est celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène. Une première origine des cascades radicalaires est la formation initiale à partir de l'oxygène moléculaire de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le plus courant des radicaux oxygénés libres. L' $O_2^-$  est alors dismuté très rapidement de façon spontanée ou par action de la superoxyde dismutase (Tarpey et Fridovich, 2001) entraînant la production du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

La molécule de ( $H_2O_2$ ) ainsi formée, ayant tous ses électrons appariés, est plus un intermédiaire qu'un radical en tant que tel. Cependant, il a un fort potentiel toxique en présence de cations métalliques, ce qui lui confère une place importante dans les réactions oxydantes. Dans la réaction de Haber-Weiss ou réaction de Fenton, des métaux de transition tel que le  $Fe^{3+}$  sont réduits par l' $O_2^-$  en  $Fe^{2+}$ . Dès lors, l'ion métallique réduit réagit avec  $H_2O_2$  pour générer de l' $OH^-$ , un radical très réactif. Le radical  $OH^-$  est largement considéré comme le plus impliqué dans les dommages cellulaires au niveau protéique, lipidique ainsi que sur les hydrates de carbone et l'ADN (Leeuwenburgh et Heinecke, 2001). Certaines caractéristiques de ces différentes espèces radicalaires de l'oxygène sont récapitulées dans le tableau II.

**Tableau II:** Les différentes espèces réactives de l'oxygène (Leeuwenburgh et Heinecke, 2001)

Symbole	Désignation	Effets	Demi-vie	[ <i>in vivo</i> ]
$O_2$	oxygène moléculaire	Bi-radical, stable, faible pouvoir oxydant	-	-
$O_2^-$	anion superoxyde	Radical peu réactif, mais toxique, oxyde les catécholamines, peut former OH	Ne peut être calculé sans connaissance des concentrations locales en SOD ( $\sim 10^{-6}$ sec.)	$10^{-10}$ M
$^1O_2$	oxygène singulet	Non radical, très réactif	$10^{-6}$ à $10^{-5}$ sec.	-
$H_2O_2$	peroxyde d'hydrogène	Non radical, stable, faiblement toxique, diffusible, antiseptique, peut former OH	$10^{-3}$ sec	$10^{-7}$ M
$OH^\cdot$	radical hydroxyle	Très réactif, peu diffusible, initiateur de la lipoperoxydation. Altère protéines, ADN	$10^{-9}$ sec	$10^{-15}$ M

### I.3.1.2- Les espèces réactives de l'azote (ERNs)

Les espèces réactives de l'azote issues du métabolisme de l'azote (*via* les NO synthases) (NOS) (Cooke *et al.*, 2006) sont représentées principalement par l'oxyde nitrique ( $NO^\cdot$ ) qui est un radical, les oxydes de l'azote comme l'anhydride nitreux  $N_2O_3$  et l'ion peroxydinitrite ( $ONOO^-$ ). La présence en excès de ces ERNs semble avoir des effets carcinogènes.

$NO^\cdot$  provient notamment de la réaction catalysée par la NOS mitochondriale (mtNOS) entre l'atome d'azote appartenant à la L-Arginine et une molécule d'oxygène.  $NO^\cdot$  est peu réactif et diffusible dans les milieux biologiques. Sa durée de vie est de l'ordre de quelques secondes en système aérobie et de plus de 15 secondes lorsqu'il se trouve dans un milieu pauvre en  $O_2$ . Il est oxydable en ion nitrosonium  $NO^+$  et peut être réduit en ion nitroxyle  $NO^-$ . De plus,  $NO^\cdot$  peut être produit par la NOS endothéliale et possède dans ce cas des capacités vasodilatatrices au niveau cardiovasculaire. De plus, il a de nombreux autres rôles (notamment dans la signalisation intra et intercellulaire ou dans l'apoptose, dans les mécanismes de défense et dans la relaxation des cellules musculaires lisses) (Ghafourifar et Cadenas, 2005). Cependant, le  $NO^\cdot$  n'est pas dénué de toxicité car lorsqu'on se trouve en présence d'un excès de  $NO^\cdot$ , on parle souvent de « *stress nitrant* ». La réaction de  $NO^\cdot$  avec  $O_2^-$  entraîne la formation de l'ion peroxydinitrite ( $ONOO^-$ ). L'ion  $ONOO^-$  est considéré comme une espèce réactive de l'azote mais aussi de l'oxygène. Sa protonation en acide peroxydinitreux ( $ONOOH$ ) donne une espèce très oxydante.

Ainsi, chaque ERN possède une réactivité qui lui est propre et peut agir sur divers constituants cellulaires (Dedon et Tannenbaum, 2004).

### **I.3.2- LES ANTIOXYDANTS**

Les antioxydants peuvent être définis comme des substances qui sont capables, à concentration faible par rapport à celle du substrat oxydable, de retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. La littérature distingue deux principaux groupes d'antioxydants : les enzymatiques et les non enzymatiques (Powers et Lennon, 1999).

#### **I.3.2.1- Système non enzymatique**

Les antioxydants non enzymatiques piègent directement les radicaux libres et les désactivent. Ils ont principalement une action antilipoperoxydante (vitamines C, E ( $\alpha$ -tocophérol), caroténoïdes ( $\beta$ -carotène)). Ils sont localisés dans les membranes cellulaires et la mitochondrie, intégrés dans la bicouche lipidique pour les formes liposolubles ( $\beta$ -carotène et vitamines E) et dans le cytosol intracellulaire ou dans les fluides extracellulaires pour les vitamines hydrosolubles (vitamine C) (Halliwell et Gutteridge, 1999).

#### **I.3.2.2- Système enzymatique**

Ce système regroupe plusieurs familles d'enzymes antioxydantes. Ces dernières sont associées en partie à des oligo-éléments agissant comme cofacteurs et sont situées à proximité des sites de production de EROs (Halliwell et Gutteridge, 1999).

##### **a) La superoxyde dismutase (SOD)**

Elle convertit l'anion superoxyde  $O_2^-$  en  $H_2O_2$ . Plusieurs isoformes de la SOD existent et diffèrent par leur séquence protéique et leurs cofacteurs (Fridovich, 1995). Ainsi, la MnSOD comprend 4 sous-unités contenant chacune un atome de manganèse. Elle est localisée dans la mitochondrie. On distingue également la Cu-ZnSOD sous forme d'un dimère dont chaque unité possède 1 atome de cuivre et 1 atome de zinc. Elle est présente chez la plupart des espèces au niveau du cytoplasme. La formation de la MnSOD est inductible par un stress oxydant, contrairement à celle de la Cu-ZnSOD (Murley *et al.*, 2001).

##### **b) La catalase (CAT)**

Elle assure la réduction du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en libérant de l'oxygène. C'est une enzyme majeure de détoxification radicalaire qui est présente majoritairement dans les peroxysomes et dans les mitochondries de cœur.

### c) Les glutathions peroxydases (GPX)

Elles se définissent comme des enzymes de structure très proche ayant la propriété de réduire les peroxydes. Il existe une forme de GPX cytosolique, une forme plasmatique, une forme gastro-intestinale ainsi qu'une iso-enzyme réduisant directement les phospholipides oxydés, la HPGPx (hydroperoxyde-glutathion peroxydase) (Ursini *et al.*, 1999). Les GPX nécessitent un cofacteur : le glutathion sous forme réduite (GSH) comme donneur d'électron.

### I.3.3- DOMMAGES OXYDANTS

Les radicaux libres peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes, pour aller altérer des composants cellulaires éloignés de leur site de production ou encore pour atteindre d'autres cellules (Boveris *et al.*, 1972). En effet, l'attaque des composants organiques des cellules (lipides, protéines ou glucides) engendre la transmission d'une cascade radicalaire à l'intérieur d'une même cellule ou d'un même tissu en agissant d'une cellule à une autre. En absence d'équipement antioxydant tissulaire efficace pour stopper cet enchaînement radicalaire, le phénomène de dégradation connaît une progression rapide, qui, après interaction avec les autres systèmes tissulaires, devient très vite exponentielle. Cette transmission extrêmement rapide peut alors conduire au transfert de l'agression radicalaire sur plusieurs centimètres au sein d'un tissu en une fraction de seconde (Neuzil *et al.*, 1993).

### I.4- NOTIONS DE TOXICITE

La toxicité peut être définie comme la propriété qu'a une substance (médicamenteuse ou non) de nuire ou de tuer un organisme vivant (Cheftel *et al.*, 1989). La définition de la toxicité doit tenir compte de la quantité de substance absorbée, du mode d'administration (voie orale, intraveineuse, intra-péritonéale, anale, trans-muqueuse) (Allain, 2000), mais aussi du type et du degré de lésions, du temps nécessaire pour qu'apparaissent les lésions (WHO, 1992).

Il existe plusieurs méthodes qui permettent d'évaluer les effets d'un toxique. On peut les classer en quatre grandes catégories (Lapointe, 2004):

- ❖ les études épidémiologiques qui comparent plusieurs groupes d'individus;
- ❖ les études *in vitro*, effectuées sur des cultures de tissus ou des cellules;
- ❖ les études expérimentales *in vivo*, qui utilisent les animaux (rat, lapin, souris);
- ❖ les études théoriques par modélisation, faisant appel à la comparaison entre les données moléculaires déjà répertoriées et les structures moléculaires des composés présents dans la substance à tester.

## **I.4.1- GENERALITES SUR LA CYTOTOXICITE**

La cytotoxicité est la propriété d'un agent toxique à détruire des cellules vivantes. Elle est caractérisée par une modification moléculaire initiale et une altération fonctionnelle des cellules pouvant être qualifiées de rupture d'homéostasie. Ce dysfonctionnement peut engendrer des lésions cellulaires et dans le cas extrême conduire à la mort de la cellule. La lésion cellulaire est l'atteinte fonctionnelle et structurelle des cellules liée à une séquence d'événements apparaissant lorsque la cellule a dépassé ses possibilités d'adaptation face à un stimulus. Les lésions cellulaires peuvent être réversibles (cas de la dégénérescence cellulaire) ou irréversibles (cas de la mort cellulaire) (Ader *et al.*, 2006).

### **I.4.1.1- Cibles biologiques de l'action des cytotoxiques**

Les membranes cellulaires peuvent être le siège d'altérations diverses telles que la peroxydation lipidique, la perte de la perméabilité sélective de la membrane plasmique. Au niveau des mitochondries, ces toxiques inhibent la phosphorylation oxydative, la bêta-oxydation des acides gras, la respiration cellulaire, et par conséquent, entraînent une chute de la concentration en ATP. Au niveau des lysosomes, ils inhibent les capacités de dégradation de la cellule. Le patrimoine génétique quant à lui peut être altéré par les génotoxiques (Lacave *et al.*, 2005).

### **I.4.1.2- Mécanismes impliqués dans la mort cellulaire**

L'un des mécanismes est lié à l'élévation de la concentration cytosolique en  $Ca^{2+}$  qui était maintenue grâce à un contrôle très strict du transport membranaire et par des réserves internes situées dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Une rupture de cette régulation est souvent le premier événement du développement de la toxicité cellulaire.

Un autre mécanisme est la déplétion en ATP et/ou la diminution du rapport ATP/ADP. Ces événements sont consécutifs à des atteintes mitochondriales directes ou indirectes. Ils entraînent des troubles de l'anabolisme, un arrêt de la plupart des fonctions cellulaires essentielles, une élévation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire par inhibition des ATPases contrôlant l'homéostasie calcique. Un autre mécanisme possible est une altération de l'état d'oxydoréduction lié à l'effondrement du taux de glutathion réduit (GSH), ainsi que les activités enzymatiques de la superoxyde dismutase et la catalase qui déterminent le statut antioxydant des cellules (Ader *et al.*, 2006).



### **I.4.1.3- Méthodes d'étude de la cytotoxicité**

Il existe plusieurs groupes de méthodes d'étude de la cytotoxicité (Ader *et al.*, 2006):

- Les méthodes fondées essentiellement sur des perturbations de la perméabilité membranaire;
- Les méthodes fondées sur des altérations de la prolifération cellulaire;
- Autres méthodes.

#### **a) Méthodes fondées essentiellement sur des perturbations de la perméabilité membranaire**

On en distingue deux types; les méthodes de cytotoxicité utilisant des colorants et les méthodes mesurant le relargage des molécules dans le milieu extracellulaire

##### **❖ Méthodes de cytotoxicité utilisant des colorants**

Elles sont basées sur l'utilisation d'un colorant qui, en fonction de ses caractéristiques, pénètre dans les cellules vivantes ou mortes. La proportion relative des cellules colorées ou non est un reflet exact du nombre de cellules vivantes ou mortes et donc de la viabilité de l'ensemble de la population cellulaire, en relation directe avec la concentration du toxique étudié.

Les trois types de colorants utilisés sont:

- Les colorants vitaux ou d'exclusion (cellules mortes);
- Les colorants supra-vitaux ou d'inclusion (rouge neutre pour les cellules vivantes);
- Les colorants nécessitant une étape de métabolisation (sel de tétrazolium).

##### **❖ Méthodes mesurant le relargage des molécules dans le milieu extracellulaire**

Ces méthodes comprennent une méthode enzymatique (mesure de l'activité de la LDH) et une méthode radioactive (mesure de la libération du chrome radioactif ( $^{51}\text{Cr}$ ) lié de manière non covalente aux acides aminés basiques des protéines intracellulaires libérés par les cellules mortes dans le milieu et quantifié par un compteur gamma).

#### **b) Méthodes fondées sur les altérations de la prolifération cellulaire**

Elles reposent sur le principe que tout effet toxique, en tuant des cellules ou en bloquant le cycle cellulaire, diminue la prolifération de la population. On distingue 2 groupes de méthodes: les méthodes de numération et les méthodes biochimiques qui quantifient l'ADN et les protéines totales, reflet du nombre de cellules.

### **c) Autres méthodes**

Il existe d'autres méthodes à principes différents, à l'instar des méthodes morphologiques fondées sur l'étude des altérations cellulaires jusqu'à la lyse (Ader *et al.*, 2006).

## **I.4.2- GENERALITES SUR LA TOXICITE *IN VIVO***

### **I.4.2.1 - Principaux types de toxicité**

On distingue trois types de toxicité en fonction de la dose administrée et de la durée d'exposition de l'organisme à la substance administrée (Bruckner *et al.*, 2001):

- la toxicité à court terme ou aiguë;
- la toxicité à moyen terme (subaiguë ou subchronique);
- la toxicité à long terme ou chronique.

#### **a) Toxicité à court terme ou aiguë**

Dans ce type de toxicité, la substance d'essai est administrée en une seule dose et lorsqu'il n'est pas possible d'administrer la dose en une seule fois, celle-ci peut être fractionnée sur une période n'excédant pas 24 heures (OCDE, 2001). Une façon pratique de caractériser la toxicité d'une substance consiste à déterminer la dose létale 50 (DL<sub>50</sub>). La DL<sub>50</sub> correspond à la dose d'une substance pouvant causer la mort de 50 % d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises (Bourra, 2008). Le moment d'apparition et les circonstances de décès de tous les morts doivent être notés, tous les signes de toxicité doivent être décrits séparément pour chaque animal. Ces études peuvent donner une indication sur les conséquences d'un surdosage chez l'homme. Généralement, on utilise les petits rongeurs (rats, souris, cobayes) qui ont une durée de vie assez courte et chez lesquels on peut observer assez rapidement des troubles de comportement (WHO, 1998). L'attention portera en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma (OCDE, 2001). L'intérêt de l'évaluation de la toxicité aiguë est d'abord de permettre d'écarter les substances trop toxiques et ensuite de servir de guide pour les expériences ultérieures en fournissant des indications sur les principaux signes d'intoxication (Cheftel *et al.*, 1989).

#### **b) Toxicité à moyen terme**

Elle définit la toxicité provoquée chez des animaux expérimentaux par une exposition répétée à un agent toxique durant une période pouvant atteindre au maximum un dixième de la

durée de vie moyenne de l'espèce en question (Emerson *et al.*, 1993). Elle permet de reconnaître une dose sans effets observable, les principaux sites ainsi que les mécanismes d'actions des substances toxiques (Schorderet, 1992). L'étude est faite sur les groupes d'animaux des deux sexes, exposés à différentes doses de la substance durant la période choisie. Au terme de l'expérience et au moment du sacrifice des animaux, différentes mesures sont effectuées notamment de chimie clinique (analyse du plasma, de l'urine...), d'hématologie, ainsi qu'une autopsie et un examen histopathologique de plusieurs organes (Bürger *et al.*, 2005). La dose d'exposition immédiatement inférieure à celle produisant le premier effet toxique décelé est dite dose sans effet observé. Celle-ci est divisée par un facteur de sécurité généralement compris entre 100 et 500 et permet de proposer une limite supérieure d'exposition pour l'Homme (Diezi, 1992).

### c) Toxicité à long terme

Elle consiste en l'administration répétée du produit pendant une période allant de 3 mois à plusieurs années. L'étude de la toxicité chronique est pleine d'intérêt dans la mesure où elle permet de détecter les substances responsables des maladies et qui sont fonctions de l'âge telles que les affections cardiaques et les déficiences rénales chroniques. L'expérimentation porte sur deux ou trois espèces différentes d'animaux adultes (souris, rats et/ou lapins) recevant chacune généralement trois doses différentes (faible, moyenne, forte) du produit. Elle met en jeu la recherche du pouvoir tératogène et/ou toxicomanogène, cancérigène et mutagène. Ainsi une administration plus prolongée pourrait provoquer des nouvelles lésions et de ce fait, renseigner suffisamment sur le degré de toxicité des médicaments qui sont habituellement employés de façon répétée par les patients (Lechat *et al.*, 1990). La relation entre doses et effets toxiques dans ces essais chroniques permet de fixer, comme dans une étude subchronique mais avec un degré de sûreté en principe supérieur, une valeur maximale d'exposition quotidienne chez l'homme compte tenu des facteurs de sécurité appropriés (Bruckner *et al.*, 2001). La mesure des marqueurs de la filtration glomérulaire (urée et créatinine) et de l'activité de certaines enzymes (transaminases et phosphatases alcalines) est effectuée généralement au cours de cette étude (Aniagu *et al.*, 2004).

#### I.4.2.2- Effet toxique : principes généraux

Dès lors que l'organisme humain est exposé à un produit toxique, différentes phases se succèdent. Elles vont varier selon les types de toxiques mais d'une manière générale les éléments suivants sont à retenir:

- les toxiques produisent des effets au niveau de l'organisme à partir du moment où ils ont été absorbés;
- les effets des produits toxiques sur l'organisme sont liés à la durée d'exposition, à l'âge d'exposition et à la concentration dans les organes cibles, qui dépend de la dose administrée lors de l'exposition, mais aussi des paramètres pharmacocinétiques (absorption, distribution, biotransformation, excrétion) (Tron *et al.*, 2002).

#### **a) Absorption des toxiques**

Trois voies principales permettent l'absorption des toxiques (Lu, 1992). Il s'agit de la voie digestive, la voie pulmonaire et la voie cutanée.

- **Voie digestive**

En général les toxiques pénètrent dans le tube digestif avec l'eau, les aliments ou isolément. En dehors de produits particulièrement caustiques, les effets ne se produisent qu'après absorption. Au niveau du tube digestif ce sont l'estomac et l'intestin grêle qui sont les principaux sites d'absorption.

- **Voie pulmonaire**

Les toxiques absorbés à ce niveau peuvent se trouver sous différentes formes (vapeurs de liquides volatils, aérosols liquides et particules atmosphériques). Les alvéoles respiratoires constituent le principal site d'absorption des voies respiratoires, en particulier pour les gaz et les vapeurs de liquides volatils. L'absorption est d'autant plus rapide que le gaz est soluble dans le sang.

- **Voie cutanée**

La peau constitue une barrière efficace entre l'organisme et les agressions extérieures. Cependant, quelques substances chimiques peuvent être absorbées par la peau et produire des effets néfastes. L'absorption percutanée se fait essentiellement au niveau de l'épiderme et du derme.

#### **b) Distribution des toxiques**

Après absorption, le produit toxique se fixe dans un tissu, la distribution va varier en fonction de la liaison entre la molécule toxique et le site de fixation selon qu'elle soit covalente, donc irréversible, ou non-covalente c'est-à-dire réversible. Dans ce dernier cas, la distribution du toxique peut se faire dans différents organes. Le foie et le rein ont de fortes capacités de fixation (Lauwerys, 1999).

### c) Biotransformation des toxiques

Les réactions de biotransformation se produisent au niveau du foie, des poumons, de l'estomac, de l'intestin, de la peau et des reins. Deux types de réactions sont observés:

- réactions de phase 1 - oxydation, réduction et hydrolyse;
- réactions de phase 2 - production d'un conjugué ou d'un métabolite à partir du toxique d'origine.

Cette étape peut être positive lorsqu'elle permet la détoxification de l'organisme ou négative lorsque les métabolites sont plus toxiques que la molécule mère, dans ce cas on parle de bioactivation (Tron *et al.*, 2002).

### d) Excrétion des toxiques

Les toxiques sont excrétés soit sous leur forme initiale soit sous la forme de métabolites et/ou de dérivés conjugués. La voie urinaire constitue la principale voie d'élimination, cependant certaines molécules sont éliminées par le système biliaire et les poumons. Certains toxiques peuvent être éliminés par des voies sous utilisées dites mineures. Il s'agit du tube digestif (estomac, intestin), du lait maternel, de la salive et de la sueur (Tron *et al.*, 2002).

## I.4.2.3- Principaux systèmes, organes et tissus cibles des toxiques

### a) Le foie

#### i) Physiopathologie

Le foie épure l'organisme des substances nocives issues de la dégradation des métabolites notamment la détoxification du  $\text{NH}_4^+$ , le métabolisme des xénobiotiques (médicaments, toxiques, polluants...), par des réactions de fonctionnalisation et de conjugaison aux Cytochromes P450, et les excrète dans l'urine ou la bile (Johnson, 1987). On regroupe sous le terme hépatites les affections du foie atteignant l'ensemble du parenchyme et s'accompagnant d'une réaction inflammatoire. Les hépatites désignent aussi des altérations réversibles ou irréversibles de la structure des hépatocytes associées à une réaction mésenchymateuse d'intensité et de type variés. Ces atteintes diffèrent par leurs étiologies, leurs évolutions et leurs morphologies (Guyton et Hall, 1996).

On distingue généralement 3 types de lésions anatomiques en fonction du degré d'atteinte de l'organe (Guyton et Hall, 1996):

- une atteinte mésenchymateuse constituée par une réaction inflammatoire;
- une atteinte hépatocystique isolée ou associée à une réaction inflammatoire;

- une cholestase entraînant parfois des troubles thrombo-biliaires (hépatite cholestatique).

## **ii) Marqueurs biochimiques de la fonction hépatique**

L'exploration biochimique du foie permet de distinguer deux types de marqueurs hépatiques: les marqueurs enzymatiques et les marqueurs non enzymatiques, dont les concentrations renseignent sur la physiologie hépatique (Bourel, 1991).

Parmi les marqueurs non enzymatiques nous pouvons citer la bilirubine qui est un pigment responsable de la coloration de la bile. A l'état physiologique normal, seule la bilirubine libre est retrouvée dans le sang (< 10 mg/L), en absence d'obstacle post-hépatique, il n'existe pas de bilirubine conjuguée dans le plasma. Son augmentation pathologique (hyperbilirubinémie) conduit à une coloration de la peau et des muqueuses (ictère). En cas de lésion hépatocytaire ou d'obstacle à l'écoulement biliaire, la bilirubine conjuguée reflue dans le plasma (Bourel, 1991). Les protéines sont les principaux constituants structuraux des cellules et des tissus. Elles constituent avec l'eau la majeure partie des muscles et des organes. Les protéines sont fabriquées en grande partie par le foie. Ce qui explique le fait que certaines lésions hépatiques affectent leur taux sanguin (Til *et al.*, 1998). Les protéines interviennent dans le transport de différentes substances dans le sang dont les lipides (acides gras), le fer ou de nombreux médicaments. Elles participent également à la coagulation du sang, aux défenses immunitaires ou au maintien de la pression sanguine. Les valeurs normales sont de 65 à 80 g/L chez l'Homme et d'environ 5,84 à 6,2 g/dL chez la souris (Estepa, 2006).

Comme marqueurs enzymatiques nous avons les transaminases : Alanine aminotransférase (ALAT) et Aspartate aminotransférase (ASAT) qui sont des enzymes contenues en abondance dans le foie et également dans le cœur et les reins. En cas de cytolysse hépatique, les hépatocytes libèrent leurs enzymes dans le sang ce qui augmente la concentration des transaminases sériques (Bourel, 1991).

## **b) Les reins**

### **i) Physiopathologie**

Le rein participe à l'excrétion de nombreux métabolites toxiques qu'il véhicule dans le produit final qui est l'urine, assure la régulation du pH et l'élimination des déchets du métabolisme azoté (Reece, 2006). Le rein participe à des mécanismes d'homéostasie à médiation hormonale: le système rénine-angiotensine-aldostérone pour le maintien de la pression artérielle, la sécrétion de l'érythropoïétine qui stimule la synthèse des globules rouges dans la moelle osseuse, la transformation de la vitamine D en calciférol (Ahmed, 2010).

Les néphropathies désignent l'ensemble des affections réversibles ou non du parenchyme rénal et qui s'accompagnent d'une réaction inflammatoire d'intensité et de type variés. On distingue trois grands types d'insuffisance rénale (Peraldi et Kanfer, 1994):

- l'insuffisance rénale fonctionnelle (IRF), qui est la conséquence d'une déshydratation extracellulaire et/ou d'une hypovolémie, caractérisée par une oligoanurie avec une natriurèse basse;
- l'insuffisance rénale aiguë (IRA), qui est une cessation brutale de la fonction excrétrice du rein avec anurie, causée par une nécrose tubulaire aiguë, les obturations intratubulaires aiguës et même les néphrites;
- l'insuffisance rénale chronique (IRC), qui est la dégradation progressive de la fonction rénale.

Outre ces trois types d'insuffisances, on a les néphrites interstitielles aiguës qui sont caractérisées par une altération de la fonction rénale secondaire à une inflammation du tissu interstitiel et des tubules rénaux. La plupart des cas sont d'origine médicamenteuse, mais il existe également des formes secondaires dues aux désordres immunitaires ou aux infections (Gauthier et Wauters, 2006).

## **ii) Marqueurs biochimiques de la fonction rénale**

La créatinine est le marqueur circulant utilisé en pratique quotidienne pour évaluer la fonction rénale, en particulier la fonction glomérulaire. Elle peut être mesurée dans le sang et les urines. La créatinine est synthétisée à partir de la créatine suite à une réaction irréversible et non enzymatique. Par jour, 1 à 2 % de la créatine musculaire est convertie en créatinine, elle est librement filtrée au niveau glomérulaire et n'est pas liée aux protéines. En situation d'équilibre, la concentration de créatinine est stable chez un même individu. En l'absence d'excrétion extrarénale, l'élimination rénale de créatinine reflète sa production (Perrone *et al.*, 1992). Cet équilibre de production peut néanmoins être rompu dans certaines situations physiologiques et physiopathologiques notamment un mauvais fonctionnement du rein qui entraînerait une élévation de la concentration de la créatinine sérique. Ce marqueur est donc indispensable pour le diagnostic et le suivi d'une insuffisance rénale (Delanaye *et al.*, 2010).

L'urée est un produit de la dégradation des protéines, son élimination est rénale, l'augmentation de la concentration d'urée dans le sang traduit un mauvais fonctionnement ou une inflammation des reins pouvant entraîner une hyperurémie, maladie souvent mortelle (Orieux et Everaere, 1977).

### **c) Les poumons**

Les lobules pulmonaires sont les sites d'échange de l'oxygène et du dioxyde de carbone entre le sang et l'air, ce sont les sites principaux d'absorption des toxiques sous forme de gaz et de vapeurs. L'appareil respiratoire permet également l'excrétion de toxiques absorbés par les poumons ou d'autres voies et il intervient dans la biotransformation. Beaucoup de toxiques sous forme de particules solides, vapeurs ou gaz affectent l'appareil respiratoire et induisent des effets systémiques ou locaux (Tron *et al.*, 2002).

- **Effets systémiques**

De nombreux produits chimiques présents dans l'air inspiré peuvent être absorbés et transportés par le sang dans différentes régions du corps où ils exerceront leurs effets. L'absorption des gaz toxiques peut se faire aux différents niveaux de l'appareil respiratoire, les alvéoles étant le principal site d'absorption.

- **Effets locaux**

Ils peuvent être de plusieurs ordres. On peut citer : les irritations, les lésions cellulaires et œdèmes, les fibroses et emphysèmes, les allergies et même le cancer du poumon (Tron *et al.*, 2002).

### **d) La peau**

La peau est particulièrement exposée aux produits toxiques, ceci peut entraîner des lésions cutanées mais également des effets systémiques. La majorité des toxiques agissant sur la peau peuvent entraîner les manifestations suivantes: l'irritation, la sensibilisation, la phototoxicité, la photoallergie, l'urticaire et les cancers cutanés (Lu, 1992).

### **e) L'œil**

Du fait de sa complexité tant anatomique que fonctionnelle, l'œil présente des réactions très variées aux toxiques. Les effets toxiques varient selon la zone atteinte, les différentes lésions selon les sites étant: les rétinopathies, les altérations du nerf optique, les affections de la cornée et les effets cataractogènes dont les mécanismes complexes diffèrent selon les produits (Lu, 1992).

### **f) Le système cardio-vasculaire**

Il est constitué de deux parties: le cœur et les vaisseaux sanguins. Le myocarde, tissu cardiaque contractile, est la zone la plus sensible aux toxiques. Le système vasculaire (artères, artérioles, capillaires, veinules et veines) peut être atteint, les effets variant avec l'importance



vitale de la zone irriguée. Au niveau cardiaque, les effets se traduisent principalement par des myocardopathies et des troubles du rythme cardiaque. Au niveau des vaisseaux sanguins, les effets varient selon les organes, il peut s'agir d'œdème cérébral, de gangrène par vasoconstriction, d'athérosclérose, de fibrose rénale, d'inflammation capillaire, de tumeurs hépatiques (Tron *et al.*, 2002).

Le cholestérol est un constituant structural essentiel des membranes et de la couche externe de lipoprotéines plasmatiques. Son dosage dans les études toxicologiques permet d'évaluer les risques cardiovasculaires après consommation de la substance à tester. Sa synthèse peut se faire dans le foie à partir de l'acétylcoenzyme A. Les taux normaux moyens de cholestérol chez l'Homme sont généralement de 1,5 à 2,0 g/L avant 30 ans et 2,0 à 2,5 g/L après 30 ans. Le cholestérol à taux élevé agit comme intermédiaire dans la genèse de l'athérosclérose, ce qui entraîne les accidents cardiovasculaires, la maladie coronaire et les maladies vasculaires périphériques (Rachid et Hassan, 2007).

#### **g) Le système nerveux**

Le système nerveux présente la particularité d'être protégé des toxiques présents dans le sang par la barrière hémato-encéphalique et la barrière nerveuse périphérique. Cependant, les cellules nerveuses (neurones), subissent des attaques membranaires par les toxiques. Les effets neurotoxiques diffèrent selon les sites d'action : neurones (corps cellulaires et axones), cellules gliales ou système vasculaire (Lu, 1992).

#### **h) Le système reproducteur**

Les toxiques peuvent intervenir en agissant au niveau du cycle reproducteur ou de l'embryon. Contrairement à l'ovaire, le testicule est protégé par une barrière hémato-testiculaire. D'autre part il contient des systèmes enzymatiques qui peuvent augmenter ou diminuer la toxicité des molécules.

Le système reproducteur mâle peut être affecté par des toxiques à différents niveaux (spermatogenèse, qualité des spermatozoïdes, régulation hormonale des testicules). Au niveau du système reproducteur femelle, les ovocytes peuvent être altérés par les toxiques. D'autres fonctions reproductrices peuvent être modifiées : l'implantation et/ou la croissance de l'embryon (Lauwerys, 1999).

## **i) Le sang**

Le sang est un tissu vivant complexe, extrêmement différencié. C'est un liquide rouge, opaque, constitué d'éléments figurés (globules rouges, globules blancs et plaquettes) en suspension dans un liquide complexe: le plasma. Chez l'adulte, le volume sanguin représente environ 6 à 8 % du poids corporel. Le sang apporte de l'oxygène et des substances alimentaires vers les cellules et débarrasse celles-ci du dioxyde de carbone. Il transporte aussi les hormones vers les organes cibles. De plus, le sang et ses constituants aident à maintenir l'homéostasie en protégeant les tissus contre les variations extrêmes de pH, en luttant contre les substances étrangères et contre les micro-organismes toxiques. Il participe également à la thermorégulation du corps (Rodney et Tanner, 2004).

Les globules rouges encore appelés hématies ou érythrocytes sont des cellules anucléées en forme de disque biconcave aplaties en leur centre. Chez le rat, en microscopie photonique, l'érythrocyte apparaît comme un disque gris rosé, plus petit qu'un globule rouge humain, avec un diamètre de 5,5 à 7µm, valeurs à moduler en fonction de l'âge, les jeunes rats de 2 à 4 semaines ayant des érythrocytes plus gros que ceux des adultes de plus de 8 semaines. La durée de vie des globules rouges de rat est de 45 à 68 jours ce qui est beaucoup plus faible que chez le chien (100 à 120 jours) et que chez l'homme (127 jours). Certaines circonstances peuvent induire une diminution du nombre de globules rouges, comme une infection ou une inflammation (Descat, 2002).

Les leucocytes ou globules blancs sont les seuls éléments du sang à posséder un noyau et les organites habituels. Ils sont beaucoup moins nombreux que les globules rouges. Selon leurs caractéristiques structurales et chimiques, les leucocytes se divisent en deux grandes catégories : les granulocytes qui contiennent des granulations spécialisées délimitées par une membrane (neutrophiles, éosinophiles, basophiles) et les agranulocytes dépourvus de granulations (lymphocytes, monocytes) (Marieb et Hoehn, 2007). Les taux des différentes variantes des globules blancs reflètent également l'état de santé d'un individu. La diminution du taux de globules blancs peut être due à la prise de médicaments immunosuppresseurs ou de corticoïdes tandis que l'augmentation du taux de globules blancs peut être due à une inflammation ou une réaction allergique (Descat, 2002).

Les thrombocytes ou plaquettes sont des petits fragments anucléés de cytoplasme, issus des mégacaryocytes. Ils sont de taille très variable dans le sang circulant, mais toujours variant entre 1 et 4 µm. Leur rôle étant principalement la fonction d'agrégation plaquettaire dans la coagulation, il est fréquent de les trouver agrégés ou en amas sur un frottis sanguin parce qu'ils

ont été activés lors de la ponction ou du stockage du prélèvement. La variation du taux de plaquettes peut être due à la prise de certains médicaments (Descat, 2002).

## **I.5- GENERALITES SUR *Eremomastax speciosa***

### **I.5.1- DESCRIPTION ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE LA PLANTE**

*Eremomastax speciosa* (Acanthaceae) est un arbuste polymorphe et robuste dont la taille peut atteindre 2 mètres. La tige est quadrangulaire et les feuilles, rouges violacées d'un côté et vertes de l'autre, présentent 5 à 7 paires de nervures latérales (Figure 10). C'est une plante présente en Afrique centrale et de l'ouest, au Soudan, en Ethiopie et même à Madagascar. Une caractéristique de distinction importante de cette plante est la coloration violette des feuilles sur leur face postérieure (Heine, 1966).



**Figure 10: Tiges et feuilles de *Eremomastax speciosa* (Photo prise par SIWE Gaël, 2013)**

### **I.5.2- NOMS LOCAUX ET CLASSIFICATION SYSTEMATIQUE**

*Eremomastax speciosa* est connu au Cameroun sous plusieurs noms locaux à l'instar de *Pa'a fè shu* (Bafang), *Banguimo* (Bafut), *Mejama njombe* (Bakweri), *Alio* (Maka), *Pèkidjum* (*Badjoun*) (Burkill, 1965 ; Adjanohoun *et al.*, 1996).

La classification systématique de *E. speciosa* (Burkill, 1965) est la suivante:

<b>Règne;</b>	Plantae
<b>Sous-règne;</b>	Viridaeplantae
<b>Embranchement;</b>	Tracheophyta
<b>Sous-embranchement;</b>	Euphyllophytina
<b>Classe;</b>	Magnoliopsida
<b>Sous-classe;</b>	Asteridae
<b>Super ordre;</b>	Lamianae
<b>Ordre;</b>	Lamiales
<b>Famille;</b>	Acanthaceae
<b>Genre;</b>	<i>Eremomastax</i>
<b>Espèce;</b>	<i>Eremomastax speciosa</i> .

### **I.5.3- DONNEES ETHNOPHARMACOLOGIQUES ET PHYTOCHIMIE QUALITATIVE**

Les enquêtes ethnobotaniques ont rapporté l'usage thérapeutique de cette plante contre diverses maladies notamment l'anémie, la diarrhée, la dysenterie, les hémorroïdes, les infections du tractus urinaire et même les fractures (Adjanooun *et al.*, 1996). Les feuilles de *E. speciosa* sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de l'infertilité masculine (Erhabor *et al.*, 2013). Au Cameroun, *E. speciosa* est utilisé pour le traitement des menstruations douloureuses, de la gonorrhée, des brûlures et aussi comme antipoison dans la région du Sud-ouest (Ndenecho, 2009). Dans la région du Littoral au Cameroun, *E. speciosa* est également utilisé pour le traitement du paludisme, des douleurs lombaires, des démangeaisons et des douleurs nerveuses périphériques (Dibong *et al.*, 2011).

Oben *et al.* (2006) ont démontré que l'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* possède une action antidiarrhéique. L'effet analgésique de cet extrait a également été démontré par Mezui *et al.* (2017). Cette plante est utilisée pour le traitement de l'anémie et a aussi montré une action antimicrobienne contre les souches de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* et *Aspergillus niger* (Okokon *et al.*, 2007).

Le criblage phytochimique de l'extrait aqueux des parties aériennes de *E. speciosa* a révélé la présence de flavonoïdes, d'alcaloïdes, de phénols, de tannins, de terpènes, de stérols, de quinones, de glycosides, de protéines, d'acides aminés, d'huiles, d'anthocyanines et de résine (Amang *et al.*, 2014a).

## I.6- QUELQUES METHODES D'ANALYSE PHYTOCHIMIQUE

### I.6.1- ANALYSE PAR INFRA-ROUGE (IR)

Le spectre Infra-Rouge permet de repérer les fonctions chimiques présentes comme les groupements (cétone, alcool, acide carboxylique, acétate, etc) qui caractérisent la plupart des triterpènes (Ahmed *et al.*, 2004).

### I.6.2- ANALYSE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)

- **Le spectre RMN du proton (RMN  $^1\text{H}$ )** : il est peu spécifique chez les triterpènes mais présente néanmoins une série de pics caractéristiques dans l'intervalle 0,5 ppm à 2 ppm, correspondant aux groupements méthyles. Le profil (nombre, multiplicité, déplacement) permet une orientation concernant le type et la série du noyau triterpénique. L'examen de la région 2 à 6 ppm indique l'environnement auquel est soumis les protons fonctionnels (hydroxyle, double liaison, etc) (Andras *et al.*, 2008).
- **Le spectre RMN du carbone (RMN  $^{13}\text{C}$ )** : il est plus précieux dans la détermination structurale des noyaux triterpéniques. Ce spectre permet de bien mettre en évidence les 30 atomes de carbone qui constituent le squelette des triterpènes et en particulier les groupements carbonyle, acide carboxylique et alcool, par leurs déplacements chimiques spécifiques (environ 210 ppm pour un carbonyle, 170 ppm pour un acide carboxylique et 70 ppm pour un alcool) (Marcia *et al.*, 1999).

### I.6.3- ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (SM)

La spectrométrie de masse est une méthode physico-chimique appliquée à la détermination structurale des composés organiques. Elle permet d'accéder à la masse moléculaire d'une substance et apporte des informations structurales par le biais de l'étude des fragments moléculaires engendrés (De Hoffmann *et al.*, 1999). Parmi les méthodes analytiques, la spectrométrie de masse occupe une place privilégiée grâce à ses caractéristiques : méthode hautement sensible (détection de composés à l'état de traces en quantité inférieure au milligramme), spécifique, applicable à des mélanges complexes, possédant une grande variété d'applications (analyses chimiques qualitatives et quantitatives, interaction entre molécules, biomédecine, entre autres) et combinable à de nombreuses techniques chromatographiques (Prasain *et al.*, 2004).

- **La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)**

La chromatographie en phase gazeuse permet de séparer les composés volatiles d'un mélange en les soumettant à un gradient de température et les éluant par un gaz vecteur. En utilisant un spectromètre de masse comme détecteur, les composés séparés par la colonne sont ionisés, fragmentés puis accélérés et les fragments sont séparés selon leur rapport masse/charge dans l'analyseur, produisant un spectre d'ions. Cette technique permet une séparation avec une haute résolution et des temps de rétention de composés reproductibles d'une analyse à l'autre. L'identification des composés par leur spectre ionique est facilitée par l'existence de bibliothèques spectrales et la comparaison à la bibliographie existante; de plus, l'analyse spectrale permet d'obtenir des informations sur les composés non identifiés (Koek *et al.*, 2006).

- **La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)**

Couplée à la spectrométrie de masse, la chromatographie en phase liquide devient précieuse car les composants du mélange peuvent être caractérisés directement et quantifiés sélectivement et spécifiquement. Ceci avec une préparation simplifiée de l'échantillon, quelle que soit la famille chimique de la molécule (Cléon et Sevrain, 2002).

## **CHAPITRE II**

### **MATERIEL ET METHODES**

## **II.1- MATERIEL**

### **II.1.1- MATERIEL VEGETAL**

Les feuilles fraîches de *Eremomastax speciosa* ont été récoltées en Juillet 2015 au sein du campus de l'Université de Yaoundé I au quartier Ngoa- Ekelle dans la ville de Yaoundé (région du Centre, Cameroun) et identifiées à l'Herbier National du Cameroun, par comparaison à l'échantillon existant enregistré sous le code HNC/136984. Ces feuilles ont été découpées, séchées à l'ombre puis écrasées à l'aide d'un mixeur.

### **II.1.2- MATERIEL ANIMAL**

#### **II.1.2.1- Animaux pour les tests antibactérien et antiulcéreux**

Les animaux utilisés étaient des souris mâles de souche NMRI âgées de 10 à 12 semaines et pesant entre 26 et 30 grammes, et des rats mâles de souche Wistar, âgés de 12 à 14 semaines et pesant entre 180 et 200 grammes. Ces animaux ont été élevés au sein de l'Animalerie de l'*International Center for Chemical and Biological Sciences (ICCBS)* de l'Université de Karachi, Karachi, Pakistan. La température au sein de l'animalerie était maintenue constante (26 °C) et les animaux soumis à un rythme circadien de 12 heures d'obscurité suivies de 12 heures d'éclairage. Aucun de ces animaux n'avait été sujet à des expériences antérieures. Ils recevaient chaque jour une alimentation standard dont la composition était la suivante: farine de blé (25 %), farine d'avoine (25 %), farine de maïs (20 %), farine de poisson (20 %), lait de vache entier en poudre (5 %), huile de tournesol (4 %), complexe vitaminique (1 %). L'eau de robinet était accessible à volonté.

#### **II.1.2.2- Animaux pour les tests de toxicité *in vivo***

Les animaux utilisés étaient des rats de souche Wistar des deux sexes âgés de 8 à 9 semaines (essai subaigu), 10 à 11 semaines (essai aigu) et pesant entre 85 et 150 grammes. Ces animaux ont été élevés au sein de l'Animalerie du Laboratoire de Physiologie Animale de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I. Les animaux étaient élevés à température ambiante et soumis au rythme naturel des journées et des nuits, les mâles et les femelles étant logés séparément. Les femelles sélectionnées étaient nullipares et non gravides et aucun de ces animaux n'avait été sujet à des expériences antérieures. Ils recevaient chaque jour une alimentation standard dont la composition était la suivante: farine de maïs (60 %), farine de soja (20 %), farine de poisson (10 %), farine d'os (4 %), complexe vitaminique (0,1 %), tourteau de palmiste (5 %), huile de palme (0,1 %), sel de cuisine (0,8 %). L'eau de robinet était accessible à volonté.



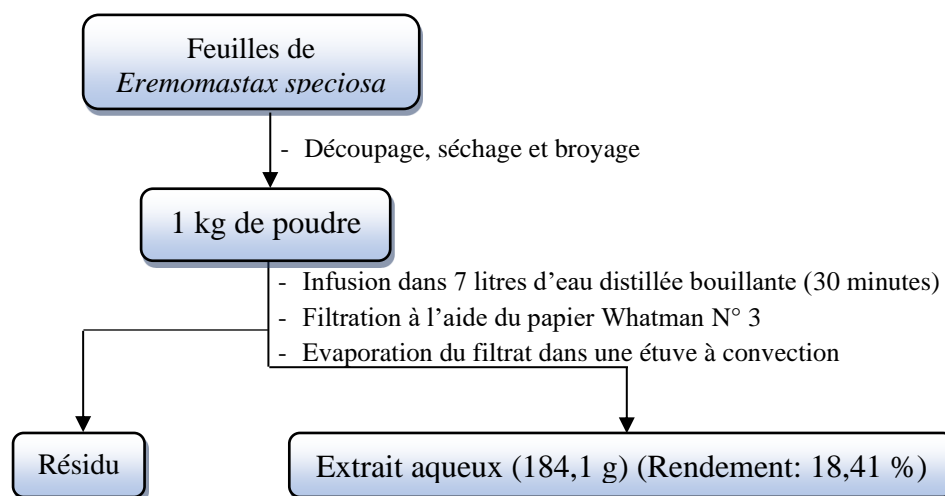
### II.1.3- MATERIEL MICROBIOLOGIQUE

Les cellules saines de souris (NIH-3T3) (ATCC CRL-1658), ainsi que les cellules humaines cancéreuses du côlon (Caco2) (ATCC HTB-37), utilisées dans le cadre de ce travail ont été fournies par la « Cell Bank » de l'ICCBS. Les œufs de *Artemia salina* étaient de source commerciale (Red Jungle Brand, USA).

## II.2- METHODES

### II.2.1- PREPARATION DE L'EXTRAIT

Pour la préparation de l'extrait aqueux (Figure 11), un kilogramme de poudre de *E. speciosa* a été mis dans un récipient contenant sept litres d'eau distillée bouillante. Le mélange a été manuellement agité à l'aide d'une spatule en bois pendant 30 minutes. Ce mélange a ensuite été filtré à l'aide du papier filtre Whatman N° 3 et le filtrat obtenu a été évaporé dans une étuve à convection (Jencons-PLS, UK) réglée à 50 °C. L'extrait obtenu (184,1 g) a été conservé à 4 °C pour utilisation ultérieure.



**Figure 11: Préparation de l'extrait aqueux des feuilles de *Eremomastax speciosa***

### II.2.2- EVALUATION DES EFFETS ANTI-*Helicobacter pylori* DE *Eremomastax speciosa*

Les isolats de *Helicobacter pylori* utilisés dans le cadre de ce travail ont été obtenus à partir de biopsies gastriques prélevées sur plusieurs patients, à l'Hôpital Civil de Karachi, Pakistan, par le Dr Shakeel Akhter (Gastroentérologue, Endoscopiste). Les patients étaient minutieusement entretenus à propos de l'étude et la signature du formulaire de consentement (voir Annexes) était un préalable avant tout prélèvement. La clairance éthique (voir Annexes)

a été délivrée par le comité d'éthique de l'ICCBS. Tous les tests *in vitro* et *in vivo* ont par la suite été menés au sein de différents laboratoires de l'ICCBS.

### **II.2.2.1- Etudes *in vitro***

#### **a) Collecte des biopsies et mise en culture**

Les biopsies prélevées ont été immédiatement introduites dans des tubes Eppendorf de 15 mL, contenant une solution de NaCl 9‰ stérilisée, puis transportées rapidement en laboratoire dans une glacière contenant des blocs de glace. Une fois sous hotte stérile, les biopsies ont été découpées en très fines pièces et déposées sur le milieu de culture approprié comprenant : gélose de cœur et cerveau (Thermo Fisher Scientific Inc., UK) + sang de cheval (Thermo Fisher Scientific Inc., UK) (représentant 10 % du volume total du milieu) + supplément de Dent (Thermo Fisher Scientific Inc., UK) (Vancomycine, triméthoprim, cefsulodine, amphotéricine B). Les boîtes de pétri contenant le milieu ainsi que les biopsies ont été placées dans un incubateur à 37 °C et à 10 % de CO<sub>2</sub> pendant 48 heures. Les colonies bactériennes formées ont été identifiées sur la base de leur apparence, la coloration de Gram et les réactions positives aux tests biochimiques (catalase, oxydase et uréase), *Helicobacter pylori* étant la seule bactérie Gram- positive à ces trois réactions biochimiques.

- ***Coloration de Gram***

Les bactéries Gram positif (Gram+) sont colorées en violet, les bactéries Gram négatif (Gram-) sont colorées en rose, ceci étant dû à une différence de composition de la paroi.

Les colonies ont été prélevées et étalées sur des lames porte-objet de façon à obtenir un frottis. Les lames ont ensuite été passées à la flamme pour fixer les préparations, puis laissées pour refroidissement pendant 5 minutes. La solution de Cristal Violet a été instillée sur les lames grâce à une pipette Pasteur. Après une minute, les lames ont été rincées à l'eau de robinet puis colorées avec du Lugol. Une minute plus tard, les lames ont de nouveau été rincées à l'eau puis décolorées, jusqu'à disparition complète de la coloration violette, grâce à l'instillation de l'éthanol sur les lames inclinées. Après rinçage à l'eau de nouveau, les lames ont été contre-colorées par la solution de Safranine. Trente secondes plus tard, les lames ont été rincées à l'eau une dernière fois et séchées à l'air. Une heure plus tard, les lames ont été observées au microscope à l'objectif 100, en immersion dans de l'huile. La coloration rose des bactéries observées indiquait la présence des bactéries Gram-.

- ***Test de Catalase***

Le test consiste à mettre une colonie bactérienne en contact avec du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.

Une goutte de peroxyde d'hydrogène a été déposée sur une lame à l'aide d'une pipette Pasteur, puis une colonie bactérienne prélevée grâce à une anse a été déposée sur la goutte et homogénéisée. La production de bulles a confirmé la présence de *H. pylori*.

- ***Test d'Oxydase***

Les bactéries possédant l'enzyme cytochrome oxydase peuvent oxyder plusieurs réactifs. Le réactif utilisé dans ce test donne une coloration pourpre foncé lors de son oxydation.

Un morceau de papier filtre absorbant a été posé sur une lame et imbibé avec une goutte de N,N,N,N tétra méthyl-paraphénylènediamine (Hach, France). Une colonie bactérienne prélevée par une anse a ensuite été répartie sur la zone imbibée. L'apparition d'une coloration violacée a été observée après quelques secondes, confirmant la production d'oxydase.

- ***Test d'Uréase***

*Helicobacter pylori* produit l'uréase, une enzyme hydrolytique, qui dégrade l'urée en ammoniac et dioxyde de carbone. L'ammoniac produit augmente le pH du milieu et ce changement est visible grâce à la présence du rouge phénol qui passe d'une coloration jaune orangé à une coloration rose foncé.

Le bouillon d'urée a été réparti dans une microplaque à 96 puits (200 µL/puits), puis 20 µL d'une solution fraîchement préparée d'urée y ont été ajoutés de façon à obtenir une solution finale à 20 mg/mL d'urée et 0,0025 mg/mL de rouge phénol. Une colonie prélevée à l'aide d'une anse a ensuite été introduite dans chaque puits puis laissée pour incubation pendant 24 heures à 37 °C et 10 % de CO<sub>2</sub>. La coloration rose foncé indiquait la présence de *Helicobacter pylori*.

Après identification, des stocks de solutions bactériennes ont été constitués et conservés à -80 °C, conformément à la méthode de Drumm et Sherman (1989), pour utilisations ultérieures.

## **b) Standards Mc Farland**

Les standards Mc Farland, mis sur pied par Joseph Mc Farland (1907), sont des solutions de référence utilisées pour standardiser les suspensions bactériennes par comparaison de la turbidité de ces suspensions bactériennes avec celle des standards Mc Farland. Les

standards Mc Farland utilisés tout au long de ce travail ont été préparés en mélangeant des quantités spécifiques de chlorure de baryum et d'acide sulfurique. Ces deux composantes réagissent ensemble et forment du sulfate de baryum sous forme de précipité, ce qui crée de la turbidité dans le tube. Le tableau complet de préparation des standards Mc Farland en fonction de l'indice de turbidité recherché est présenté en annexe II.

### c) Test d'inhibition cellulaire (AlamarBlue®)

Ce test est largement utilisé pour les études de viabilité ou de cytotoxicité des lignées cellulaires humaines/animales, des bactéries et champignons (Rampersad, 2012). Le principe actif du colorant AlamarBlue® est la résazurine (7-hydroxy-10-oxidophenoxazine-10-ium-3-one) qui est soluble dans l'eau, non toxique et facile à préparer.

#### - Principe

Les cellules viables maintiennent un environnement réducteur dans leur cytoplasme grâce à leur activité métabolique. Dès incubation du colorant avec les cellules viables, la résazurine (forme oxydée, bleue, non fluorescente) est transformée en résorufine (forme réduite, rose, très fluorescente). Ce changement de coloration visible à l'œil nu peut être quantifié par mesure de l'absorbance aux longueurs d'ondes 570 et 600 nm.

Le pourcentage d'inhibition de l'extrait a été calculé grâce à une série d'équations décrites par William *et al.* (1965).

- ❖ Le pourcentage de réduction de l'AlamarBlue® est calculé par la formule :

$$\% \text{ réduction AlamarBlue} = \frac{(\epsilon_{\text{OX}})\lambda_2 A\lambda_1 - (\epsilon_{\text{OX}})\lambda_1 A\lambda_2}{(\epsilon_{\text{RED}})\lambda_1 A'\lambda_2 - (\epsilon_{\text{RED}})\lambda_2 A'\lambda_1} \times 100$$

- ❖ Le pourcentage de différence de réduction entre les bactéries traitées à l'extrait et le témoin positif est calculé par la formule :

$$\% \text{ différence de réduction} = \frac{(\epsilon_{\text{OX}})\lambda_2 A\lambda_1 - (\epsilon_{\text{OX}})\lambda_1 A\lambda_2 (\text{traitement})}{(\epsilon_{\text{OX}})\lambda_2 A^0\lambda_1 - (\epsilon_{\text{OX}})\lambda_1 A^0\lambda_2 (\text{témoin})} \times 100$$

- ❖ Le pourcentage d'inhibition du traitement administré par comparaison au témoin positif est calculé par la formule :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - (\% \text{ différence de réduction})$$

Avec:

$\epsilon_{\text{OX}}$  = Coefficient d'extinction molaire de AlamarBlue forme oxydée

$\epsilon_{\text{RED}}$  = Coefficient d'extinction molaire de AlamarBlue forme réduite

A = Absorbance des puits tests (extrait ou médicament de référence)

A' = Absorbance des puits témoin négatif. Les puits témoin négatif contenant uniquement le milieu de culture + AlamarBlue mais sans bactéries.

A° = Absorbance des puits témoin positif (milieu de culture + AlamarBlue + bactéries)

$\lambda_1$  = Longueur d'onde à 570 nm (540 nm pouvant aussi être utilisée)

$\lambda_2$  = Longueur d'onde à 600 nm (630 nm pouvant aussi être utilisée)

Les valeurs des coefficients d'extinction molaire de l'AlamarBlue en fonction des longueurs d'ondes ont été présentées sous forme de tableau (voir annexe III).

#### - Procédure

Une colonie de chaque isolat de *H. pylori* obtenu a été inoculée dans du bouillon d'urée (Oxoid, UK) et incubée pendant 48 heures dans un incubateur réglé à 37 °C et 10 % de CO<sub>2</sub>. Une fois à confluence, les solutions bactériennes ont été diluées, à l'aide du bouillon d'urée stérile, pour les faire correspondre à un indice de turbidité Mc Farland égal à 0,5 (équivalent à  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Une solution stock de *E. speciosa* (160 mg/mL) a été préparée grâce à de l'eau distillée et 10 µL de cette solution ont été introduits dans les puits d'une microplaque, en polystyrène stérile à 96 puits et à fond plat, à l'exception des puits témoins positif, négatif et standard. Après ajout de 185 µL de bouillon d'urée dans tous les puits, 5 µL de suspension bactérienne y ont été introduits (à l'exception des puits témoin négatif). La concentration de *E. speciosa* dans chaque puits test était de 8 mg/mL (cette concentration ayant été choisie après des tests préliminaires de dilution à partir de 32 mg/mL) et 50 µg/mL pour l'azithromycine et la tétracycline. Le mélange amoxicilline + métronidazole (25 µg/mL, chacun) a été utilisé comme témoin standard et toutes les expérimentations ont été réalisées en triplicat. Les microplaques ont été mises à incuber à 37 °C et 10 % de CO<sub>2</sub> pendant 48 heures. Après 48 heures, 20 µL de solution de sel de résazurine à 0,02 % ont été introduits dans chaque puits et les microplaques ont été placées dans un incubateur rotatif (80 tours/min) à 37 °C pendant 3 heures. Le changement de couleur du bleu au rose indiquait la croissance bactérienne. L'analyse quantitative a été réalisée par lecture des microplaques au spectrophotomètre (Multiskan™ GO, ThermoScientific, USA) à 570 et 600 nm. Le pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne a été calculé comme décrit précédemment.

#### **d) Détermination des concentrations minimales inhibitrice et bactéricide**

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) s'est faite par la méthode de microdilution standard conformément aux directives du « Clinical and Laboratory Standards Institute » (CLSI, 2012). L'extrait aqueux de *E. speciosa* (10 µL) contenu dans un volume approprié de bouillon d'urée a été dilué en série, en raison d'un facteur de 2, de 32 à 0,250 mg/mL. Le mélange amoxicilline/métronidazole a été dilué de 50 à 3,125 µg/mL. Ensuite, 5 µL de suspension bactérienne préparée comme décrit précédemment ont été introduits dans tous les puits. Après 48 heures d'incubation à 37 °C et 10 % de CO<sub>2</sub>, 20 µL de solution de sel de résazurine à 0,02 % ont été introduits dans chaque puits comme décrit précédemment. La plus petite concentration capable d'inhiber la croissance bactérienne de façon visible a été considérée comme étant la CMI.

Pour la détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB), la procédure a été la même que pour la CMI excepté que 10 µL de chaque concentration d'extrait ont été introduits dans des boîtes de pétri stériles. Ensuite 15 mL de milieu de culture (gélose de cœur et cerveau + sang de cheval (représentant 10 % du volume total du milieu) + antibiotiques) suffisamment refroidis ont été versés dans les boîtes de pétri et les contenus ont été homogénéisés. Les boîtes ont été observées après 48 heures d'incubation à 37 °C et 10 % de CO<sub>2</sub>. La plus petite concentration d'extrait capable d'empêcher l'apparition de colonies bactériennes a été considérée comme étant la CMB.

Une fois les CMI et CMB déterminées, le rapport CMB/CMI a été calculé et interprété comme décrit par Marmonier (1990):

- Si le rapport  $CMB/CMI \leq 4$ , la substance testée est bactéricide;
- Si le rapport  $CMB/CMI > 4$ , la substance testée est bactériostatique.

#### **e) Etude de la morphologie bactérienne par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)**

Pour déterminer les effets de *E. speciosa* sur la morphologie bactérienne par MEB, le protocole de Fischer *et al.* (2012) avec de légères modifications a été utilisé. Brièvement, les cellules bactériennes traitées (extrait, standard et témoin positif) ont été mises à incuber pendant 48 heures à 37 °C et 10 % de CO<sub>2</sub>. Après incubation, les tubes contenant les solutions bactériennes ont été centrifugés à 5000 tours/min pendant 5 minutes. Le milieu de culture surnageant a été recueilli et les culots ont été rincés avec du tampon phosphate, suivi d'une fixation des cellules par du glutaraldéhyde à 2 % pendant 1 heure. Après fixation, les cellules ont été rincées à nouveau avec du tampon phosphate et déshydratées par passages successifs

dans des bains d'éthanol de degrés croissant (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % et 100 %). Après séchage sous hotte toute la nuit, les bactéries ont été montées sur une souche et recouvertes d'une très fine couche d'or (jusqu'à 300 Å), dans un dispositif de pulvérisation d'ions (Auto-Coater, Jeol JFC-1500, Japan), pour éviter des charges électriques dans le microscope. Les bactéries ont été visualisées au microscope électronique (Jeol JSM 6380A, Japan), puis les photographies prises et enregistrées.

#### **f) Etude de la morphologie bactérienne par Microscopie à Force Atomique (MFA)**

*H. pylori* a été cultivé pendant 48 heures dans un bouillon d'urée à 37 °C et 10 % de CO<sub>2</sub>. Après incubation, la suspension bactérienne a été centrifugée à 3000 tours/min pendant 5 minutes. Le culot, composé de bactéries, a été rincé avec du tampon phosphate et centrifugé de nouveau. Les bactéries récupérées ont été traitées (extrait, standard et témoin positif) et ensuite incubées pendant 24 heures à 37 °C et 10 % de CO<sub>2</sub>. Après incubation, les suspensions bactériennes ont été successivement rincées avec du tampon phosphate et centrifugées trois fois de suite. Après la dernière centrifugation, les bactéries ont été récupérées dans 10 µL d'eau double distillée stérile et délicatement déposées sur des microplaques de silice (Ted Pella Inc., USA) propres. Ces microplaques ont au préalable été prétraitées avec de la Poly-L-lysine (Sigma Aldrich, UK) (0,01 %) un jour auparavant et laissées pour séchage sous hotte à température ambiante. L'aspect morphologique des bactéries a été observé au microscope à force atomique (Agilent Technologies 5500, USA). Les images 3D et 2D ont été obtenues après chaque passage et un logiciel d'analyse d'image (PicoView 1.2), relié au microscope, a été utilisé pour mesurer les longueur, largeur et hauteur des bactéries.

#### **II.2.2.2- Etudes *in vivo***

Cette partie a été réalisée conformément au protocole de Boda *et al.* (2006).

##### **a) Antibiothérapie préventive**

Afin de s'assurer qu'aucun animal n'était porteur d'une infection préalable à *Helicobacter pylori*, 50 souris mâles ont reçu, par voie orale, un mélange d'amoxicilline et de métronidazole (25 mg/kg chacun) une fois quotidiennement pendant 7 jours. Le 8<sup>e</sup> jour, 5 souris ont été sacrifiées et les estomacs ouverts et nettoyés. Le mucus de chaque souris a été raclé au niveau de la partie glandulaire, grâce à une lame porte-objet, puis introduit dans un tube Eppendorf contenant 500 µL de NaCl 9 %. Après agitation des tubes au vortex, les homogénats ont été dilués 100 fois dans du NaCl 9 %. Cinquante microlitres de chaque dilution ont été instillés, à différents points, dans des boîtes de pétri contenant du milieu de culture (gélose de

cœur et cerveau + sang de cheval (représentant 10 % du volume total du milieu) + antibiotiques). Les boîtes ont été mises à incuber pendant 48 heures à 37 °C et 10 % de CO<sub>2</sub>. Après observation, aucune croissance bactérienne n'a été observée, confirmant ainsi qu'aucun animal n'était infecté avant le début de l'expérimentation. Les souris restantes ont été laissées au repos pendant 7 jours afin d'éliminer complètement de la circulation les antibiotiques administrés. Pour éviter toute réinfection pendant cette période de repos, les animaux ont été placés dans des cages ventilées à air filtré.

#### **b) Infection des animaux à *Helicobacter pylori* et traitement**

Quarante (40) souris mâles ont été infectées avec *H. pylori* en suspension dans du NaCl 9 ‰ stérile ajusté à un indice de turbidité Mc Farland № 3 (approximativement  $9 \times 10^8$  UFC/mL). L'infection s'est faite par gavage (0,2 mL de suspension bactérienne par animal) une fois quotidiennement pendant 7 jours chez des animaux préalablement mis à jeun pendant 4 heures. Un jour après la dernière inoculation, les animaux ont été répartis en cinq groupes expérimentaux de 8 souris chacun comme suit:

- Un groupe témoin positif qui recevait l'eau distillée (0,2 mL par souris);
- Trois groupes qui recevaient *E. speciosa* à différentes doses (100; 200; 400 mg/kg, respectivement);
- Un groupe témoin standard qui recevait le mélange Amoxicilline + Métronidazole à 25 mg/kg chacun.

Les traitements respectifs ont été administrés une fois quotidiennement pendant 7 jours. Le jour suivant la dernière administration, les souris ont été sacrifiées et leurs estomacs prélevés et nettoyés, puis immédiatement introduits dans une glacière contenant des blocs de glace.

Pour quantifier la charge bactérienne, 100 mg de tissu stomacal glandulaire ont été prélevés chez chaque animal, puis broyés et homogénéisés dans 500 µL de tampon phosphate stérile à l'aide d'un homogénéisateur électrique (Sigma Aldrich, USA). L'homogénat obtenu a été dilué 100 fois dans du NaCl 9 ‰ stérile. Sous hotte, 50 µL de chaque dilution ont été introduits dans des boîtes de pétri, ensuite 15 mL de milieu de culture (gélose de cœur et cerveau + sang de cheval (représentant 10 % du volume total du milieu) + antibiotiques) suffisamment refroidis ont été versés dans les boîtes de pétri et les contenus ont été homogénéisés. Les boîtes ont été mises à incuber pendant 48 heures à 37 °C et 10 % de CO<sub>2</sub>. Après incubation, les colonies bactériennes ont été comptées et la charge bactérienne calculée grâce à la formule suivante:



$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Nombre de colonies} \times \text{Facteur de dilution}}{\text{Volume ensemencé}}$$

La conversion en **UFC/g** de tissu s'est faite par la suite.

### **II.2.3- EVALUATION DES EFFETS DE *Eremomastax speciosa* SUR LES ULCERES GASTRIQUES CHRONIQUES COUPLES A UNE INFECTION A *H. pylori***

Dans cette partie du travail, les effets de *E. speciosa* sur des modèles expérimentaux d'ulcères gastriques chroniques couplés à une infection préalable à *H. pylori* ont été évalués. Pour ce faire, les rats mâles, préalablement prétraités aux antibiotiques standards comme décrit précédemment (voir **II.2.2.2**), ont été infectés avec *H. pylori* en suspension dans du NaCl 9 ‰ stérile ajusté à un indice de turbidité Mc Farland N° 3 ( $9 \times 10^8$  UFC/mL). L'infection s'est faite par voie orale (1 mL de suspension bactérienne) deux fois quotidiennement pendant 14 jours. Le jour suivant la dernière inoculation, les animaux ont été répartis en différents groupes expérimentaux pour induction des ulcères chroniques.

#### **II.2.3.1- Induction des ulcères gastriques chroniques avec l'acide acétique**

##### **a) Répartition des animaux**

Après 24 heures de jeun non hydrique, 70 rats ont été répartis en 7 groupes expérimentaux de 10 animaux chacun comme suit:

- Un groupe témoin infecté qui a reçu de l'eau distillée (1 mL/200 g);
- Un groupe témoin transversal;
- Un groupe témoin longitudinal qui a reçu de l'eau distillée (1 mL/200 g);
- Trois groupes tests qui ont reçu *E. speciosa* à différentes doses (100; 200 et 400 mg/kg, respectivement);
- Un groupe témoin standard qui a reçu la trithérapie standard constituée du mélange Ranitidine (50 mg/kg) + Amoxicilline (25 mg/kg) + Métronidazole (25 mg/kg).

##### **b) Procédure et traitement**

L'induction des ulcères gastriques chroniques a été réalisée chez les rats, infectés à *H. pylori*, selon la méthode décrite par Pillai et Santhakumari (1984). Après anesthésie au mélange kétamine/xylazine (70 et 7 mg/kg, respectivement), les poils du flanc gauche des animaux ont été rasés et une incision abdominale y a été faite. Après avoir exposé l'estomac de la cavité péritonéale, un volume de 50 µL d'acide acétique (30 %) a été injecté dans la paroi stomacale

au niveau de la petite courbure. L'estomac a ensuite été nettoyé avec du coton imbibé d'une solution de NaCl 9 %, puis une suture a été réalisée pour fermer l'incision. La Bétadine® a été quotidiennement appliquée sur l'incision pour éviter l'infection de la blessure jusqu'à cicatrisation complète. L'aliment et l'eau de boisson ont été mis à la disposition des rats dès la fin de l'opération. Au quatrième jour après induction des ulcères, les 10 rats du groupe témoin transversal ont été sacrifiés sous anesthésie au mélange précédemment cité. Après laparotomie et ligature des sphincters œsophagien et pylorique, l'estomac a été prélevé et 10 mL de formaldéhyde (2 %) ont été injectés dans la lumière stomacale de la moitié des rats (l'autre moitié devant servir à calculer la charge bactérienne) dans le but de fixer le cratère ulcéreux. Dix minutes plus tard, les estomacs ont été ouverts le long de la grande courbure et lavés délicatement à l'eau de robinet. Le mucus de chaque rat a été raclé délicatement avec une lame porte-objet (Tan *et al.*, 2000), puis pesé à l'aide d'une balance électronique (Thermo Scientific, UK). Le cratère ulcéreux de chaque estomac a été photographié et mesuré dans le sens de la longueur et de la largeur à l'aide d'une règle graduée et les scores d'ulcères ont été déterminés (Tan *et al.*, 2000). La portion ulcérée de chaque estomac a été conservée dans du formol (10 %) pour les coupes histologiques. Une portion d'estomac a également été prélevée pour le dosage des marqueurs du stress oxydant. Chez la seconde moitié des animaux, une portion d'estomac a été prélevée et utilisée comme décrit précédemment (voir **II.2.2.2**) pour quantifier la charge bactérienne dans les estomacs.

L'extrait de même que l'eau distillée et la trithérapie standard ont été administrés par voie orale une fois quotidiennement pendant 14 jours à partir du 5<sup>e</sup> jour après induction des ulcères. Après quatorze jours de traitement, tous les animaux des groupes restants ont été sacrifiés et ont subi les étapes décrites ci-dessus pour le groupe témoin transversal.

### **II.2.3.2- Induction des ulcères gastriques chroniques « difficilement guérissables »**

La répartition des animaux ainsi que le mode opératoire ont été les mêmes que ceux décrits ci-dessus à quelques exceptions près. A partir du 5<sup>e</sup> jour après induction des ulcères par l'acide acétique, ces ulcères ont été rendus « difficilement guérissables » par administration sous cutanée et quotidienne d'indométacine (1 mg/kg) aux groupes restants (après sacrifice du témoin transversal) pendant 14 jours. Ainsi, l'extrait de même que l'eau distillée, l'indométacine et la trithérapie standard ont été administrés, aux groupes respectifs, une fois quotidiennement pendant 14 jours à partir du 5<sup>ème</sup> jour après induction des ulcères. Le 15<sup>e</sup> jour, tous les animaux ont été sacrifiés et ont subi les mêmes étapes que celles décrites précédemment (voir **II.2.3.1**).

### II.2.3.3- Evaluation des paramètres du stress oxydant

#### a) Préparation des homogénats d'estomac

Dans un bac de glace, 1 g d'estomac de chaque animal a été broyé et homogénéisé à 20 % après ajout de 4 mL de tampon Tris-HCl (50 mM). Après centrifugation des homogénats à 5000 tours/min pendant 10 minutes, les surnageants ont été récupérés et conservés à -20 °C pour le dosage de quelques paramètres du stress oxydant.

#### b) Dosage des protéines totales tissulaires

La méthode du Biuret décrite par Henry *et al.* (1974) a été utilisée pour le dosage des protéines totales.

##### - *Principe*

En milieu basique, 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 des protéines dans la solution.

##### - *Procédure*

Les principaux réactifs utilisés pour ce test ont été le sérum albumine bovin (SAB) (3 mg/mL) et le réactif de Biuret. Les tubes utilisés pour le dosage des protéines ont été préparés et complétés avec les différents réactifs suivant l'ordre présenté dans le Tableau III.

**Tableau III: Protocole de dosage des protéines totales tissulaires**

N° tube	0	1	2	3	4	5	T <sub>1</sub>	...	T <sub>n</sub>
Solution de SAB (mL)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	0	...	0
Eau distillée (mL)	3	2,9	2,8	2,6	2,4	2,2	2,95	...	2,95
Réactif de Biuret (mL)	2	2	2	2	2	2	2	...	2
Homogénat (µL)	0	0	0	0	0	0	50	...	50
Quantité de protéines obtenues (mg)	0	0,3	0,6	1,2	1,8	2,4	?	...	?

(Tube 0 = tube blanc ; Tubes 1 à 6 = tubes étalons ; Tubes T<sub>1</sub> à T<sub>n</sub> = tubes échantillons)

Les tubes ont été laissés pour incubation pendant 20 minutes à température ambiante. Les densités optiques ont été lues au spectrophotomètre à 550 nm contre le tube blanc. La concentration des protéines dans les différents tubes échantillons a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage (voir Annexe IV).

### c) Dosage de la superoxyde dismutase (SOD)

Le dosage de la SOD a été effectué suivant la méthode décrite par Misra et Fridovich (1972).

#### - *Principe*

La présence de SOD dans un échantillon inhibe l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome. L'augmentation de l'absorbance qui est proportionnelle à l'activité du superoxyde dismutase est notée entre 20 et 80 secondes à 480 nm.

#### - *Procédure*

Dans une cuve à spectrophotométrie ont été introduits 134  $\mu$ L d'homogénat et 1666  $\mu$ L de tampon carbonate. Après avoir calibré le spectrophotomètre, on a déclenché la réaction en ajoutant 0,2 mL d'adrénaline (0,3 mM) au mélange réactionnel. Ce mélange a été homogénéisé par inversion rapide de la cuve. L'augmentation de l'absorbance a été notée entre 20 et 80 secondes à 480 nm. Dans la cuve du témoin ont été introduits 1666  $\mu$ L de tampon carbonate, 0,2 mL de solution d'adrénaline et 134  $\mu$ L d'eau distillée.

#### - *Calcul de la concentration de SOD*

L'activité spécifique de la SOD a été évaluée en unité de SOD/mg de protéines. Une unité de la SOD a été définie comme la quantité de SOD nécessaire pour causer une inhibition de 50 % de l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome pendant 1 min.

La variation de la densité optique est :  $\Delta A (\text{min}) = A_{20s} - A_{80s}$

**% inhibition** =  $(100 - \Delta A \text{ Echantillon} \times 100) / \Delta A \text{ Blanc}$

50 % d'inhibition correspond à 1 unité et X % d'inhibition correspond à N unités ;

**Activité spécifique de la SOD** (unité SOD/mg de protéines) = (Nombre d'unités SOD/mL) /  
mg de protéines x facteur de dilution.

### d) Dosage de la catalase

Le dosage de la catalase a été effectué suivant la méthode décrite par Sinha (1972).

#### - *Principe*

Le peroxyde d'hydrogène est rompu en présence de la catalase. Ce peroxyde détruit se lie au dichromate de potassium pour former un précipité vert d'acide perchlorique instable, qui est ensuite détruit par la chaleur pour former un complexe vert absorbant à 570 nm. L'activité

de la catalase qui est proportionnelle à la densité optique de ce complexe est déterminée grâce à la courbe d'étalonnage.

**- Procédure**

Les principaux réactifs utilisés ont été les solutions de dichromate de potassium/acide acétique glacial, de tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,5) et de peroxyde d'hydrogène (50 mM). Les tubes utilisés pour le dosage des protéines ont été préparés et complétés avec les différents réactifs suivant l'ordre présenté dans le Tableau IV.

**Tableau IV: Preparation de la courbe d'étalonnage du dosage de la catalase**

<b>Tubes</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>
<b>Volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µL) (50 mM)</b>	0	20	40	80	160	320
<b>Solution de dichromate/acide acétique (mL)</b>	2	2	2	2	2	2
Après formation d'un précipité bleu, les tubes sont chauffés jusqu'à ébullition pendant 10 min (apparition de la couleur verte de l'acétate chronique) et refroidis à température ambiante.						
<b>Eau distillée (µL)</b>	1000	980	960	920	840	680
L'absorbance est lue à 570 nm						
<b>Quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µmol)</b>	0	1	2	4	8	16

(Tubes 1 à 6 = tubes étalons)

Les données obtenues ont été utilisées pour tracer la courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µmol) (voir Annexe V).

Dans chaque tube à essai test, ont été introduits 50 µL d'homogénat et 750 µL de tampon phosphate. Le chronomètre était déclenché lorsqu'on ajoutait 200 µL de substrat peroxyde d'hydrogène. Après une minute, la réaction était arrêtée par ajout de 2 mL de la solution de dichromate de potassium/acide acétique (acide perchromique). Dans le tube témoin ont été introduits 800 µL de tampon phosphate. L'ensemble des tubes a été chauffé à 100 °C pendant 10 minutes et après refroidissement, les densités optiques ont été lues à 570 nm.

La quantité de peroxyde d'hydrogène restante dans chaque solution après ajout de l'acide perchromique a été évaluée en utilisant la courbe d'étalonnage. L'activité spécifique de la catalase a été exprimée en µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéine.

**e) Dosage du glutathion réduit (GSH)**

Le dosage du GSH a été effectué suivant la méthode décrite par Ellman (1959).

- **Principe**

L'acide 2,2-dithio-5,5'-dibenzoïque (DTNB) réagit avec les groupements SH du glutathion formant un complexe coloré jaune qui absorbe à 412 nm.

- **Procédure**

Les principaux réactifs utilisés ont été le tampon Tris (50 mM) et le réactif d'Ellman. Dans les tubes à essai tests ont été introduits 20 µL d'homogénat d'estomac et 3 mL de réactif d'Ellman. Après agitation au vortex, le mélange a été laissé à température ambiante pendant 60 minutes pour le développement de la coloration. Dans le tube contrôle ont été introduits 20 µL de tampon Tris et 3 mL de réactif d'Ellman. L'absorbance de chaque tube était ensuite lue à 412 nm contre le blanc.

La concentration en glutathion a été exprimée en mol/g d'organe. Le calcul a été effectué suivant la formule ci-après :

$$C_{\text{GSH}} = \frac{DO \times V_t}{\epsilon \times L \times V_i \times m_{\text{org}}}$$

Avec :

DO = densité optique

$\epsilon$  = coefficient d'extinction molaire = 13600 mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

C<sub>GSH</sub> = concentration du glutathion dans le tissu

L = longueur de la cuve (1 cm)

V<sub>t</sub> = volume total de l'homogénat

m<sub>org</sub> = masse d'organe utilisée pour préparer l'homogénat

V<sub>i</sub> = volume d'homogénat utilisé pour le dosage

**f) Dosage du malondialdéhyde (MDA)**

Le dosage du MDA a été effectué suivant la méthode décrite par Wilbur *et al.* (1949).

- **Principe**

Les aldéhydes réagissent avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide et à chaud pour donner un produit de couleur rouge qui absorbe la lumière à 500 nm.

- **Procédure**

Les principaux réactifs utilisés ont été la solution d'acide trichloroacétique (TCA) 20 % et la solution d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 %. Dans chaque tube à essai test ont été

introduits 2 mL d'homogénat, 1 mL de TCA et 2 mL de TBA. Dans le tube témoin, l'homogénat a été remplacé par 2 mL de tampon Tris HCl 50 mM. Les tubes ont été bouchés et incubés dans un bain marie pendant 10 min à 90 °C. Après refroidissement, ils ont été centrifugés à 5700 tr/min pendant 10 min. Le surnageant a été prélevé et l'absorbance a été lue à 500 nm contre le blanc. Après lecture des densités optiques, la concentration en malondialdéhyde (exprimée en mmol/g d'organe) a été calculée comme suit :

$$C_{\text{MDA}} = \frac{\text{DO} \times V_t}{\epsilon \times L \times V_i \times m_{\text{org}}}$$

Tous les symboles ayant la même signification que pour le dosage précédent exceptée la valeur du coefficient d'extinction molaire qui ici était de  $1,53 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### g) Dosage des nitrites

Le dosage des nitrites a été réalisé suivant la méthode de Griess décrite par Grisham *et al.* (1996).

#### - *Principe*

Il s'agit d'une réaction de diazotation en deux étapes en milieu acide, permettant le dosage des ions nitrites. L'espèce  $\text{NO}^+$ , générée par l'acidification de  $\text{NO}_2^-$ , réagit avec la sulfanilamide pour produire un ion diazonium. Après couplage avec la N-(1-naphtyl) éthylène diamine, un chromophore azoïque stable est formé et absorbe fortement à 540 nm (couleur rose)

#### - *Procédure*

Cent microlitres d'homogénat et 100  $\mu\text{L}$  de réactif de Griess ont été mélangés puis homogénéisés et laissés au repos pendant 15 minutes à température ambiante. L'absorbance a été lue au spectrophotomètre à 540 nm. La quantité de nitrites présente dans chaque puits a été calculée grâce à la courbe d'étalonnage (voir Annexe VI) de l'absorbance en fonction de la concentration de  $\text{NaNO}_2$  ( $\mu\text{mol}$ ).

## II.2.3.4- Evaluation des paramètres d'ulcération

### a) Indice d'ulcère

L'indice d'ulcère (IU) est le score moyen d'ulcère pour chaque traitement plus ou moins l'erreur standard sur la moyenne (ESM). Dans le cas des ulcères gastriques chroniques, cet indice correspond directement à la valeur de la surface ulcérée (Tan *et al.*, 2000).

## b) Pourcentage de guérison

Il a été déterminé pour un traitement donné en fonction du groupe témoin longitudinal selon la formule ci-après (Tan *et al.*, 2000):

$$\% \text{ G} = \frac{\text{Indice d'ulcère du témoin longitudinal} - \text{indice d'ulcère du test}}{\text{Indice d'ulcère du témoin longitudinal}} \times 100$$

## c) Pourcentage de la surface ulcérée

Le pourcentage de la surface ulcérée (% SU) de l'estomac d'un rat a été calculé selon la formule suivante (Tan *et al.*, 1996):

$$\% \text{ SU} = \frac{\text{Surface ulcérée (mm}^2\text{)}}{675 \text{ mm}^2} \times 100$$

### II.2.3.5- Réalisation des coupes histologiques

La réalisation des coupes histologiques des estomacs fixés dans le formol à 10 % s'est faite suivant le processus décrit ci-après.

#### Etape 1: Découpe

Des coupes de chaque organe, réalisées à l'aide d'un bistouri, ont été rangées dans des cassettes en matière plastique.

#### Etape 2: Déshydratation

La déshydratation s'est faite en trois étapes: la déshydratation proprement dite, l'éclaircissement et l'imprégnation.

- **Déshydratation proprement dite**

Les cassettes ont séjourné successivement dans des bains d'éthanol de degrés croissants:

Ethanol 50° (1 h) → éthanol 70° (1 h) → éthanol 95° N° 1 (1 h) → éthanol 95° N° 2 (1 h 30 min) → éthanol 100° N° 1 (1 h) → éthanol 100° N° 2 (1 h 30 min) → éthanol 100° N° 3 (2 h).

- **Eclaircissement**

Les cassettes ont séjourné successivement dans deux bains de xylène respectivement pendant 1 h et 1 h 30 min.



- **Imprégnation**

Les organes ont été infiltrés de paraffine par passage dans trois bains de paraffine à 60 °C pendant 1 h, 1 h 30 min et 2 h, respectivement.

**Etape 3: Inclusion**

Les tissus ont été placés dans des moules remplis de paraffine en fusion, puis placés sur des plaques réfrigérantes pour solidification après orientation appropriée des tissus dans le bloc.

**Etape 4: Les coupes**

Les coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées au microtome. Les sections obtenues ont été dépliées dans un bain marie à 40 °C, puis les meilleures coupes (deux coupes par bloc monté) ont été récupérées sur des lames porte-objet et placées à l'étuve (45 °C) pour séchage pendant 24 h.

**Etape 5: Coloration**

Deux types de coloration ont été utilisés lors de cette étape. L'une des coupes était colorée à l'hématoxyline-éosine (H&E) tandis que l'autre était colorée au Giemsa, étant donné que le Giemsa colore *H. pylori* en noir et permet d'illustrer la présence de cette bactérie dans le tissu gastrique.

- **Déparaffinage et réhydratation**

Les coupes ont été déparaffinées et réhydratées par passage successif dans une série de bains selon la séquence suivante :

Xylène N° 1 (5 min) → Xylène N° 2 (5 min) → Xylène N° 3 (5 min) → éthanol 100° N° 1 (10 min) → éthanol 100° N° 2 (10 min) → éthanol 100° N° 83 (10 min) → éthanol 95° (5 min) → éthanol 70° (5 min). Les lames ont été ensuite rincées à l'eau distillée.

- **Coloration proprement dite**

- ✓ **Coloration à l'hématoxyline-éosine**

Les coupes ont été immergées pendant 10 min dans un bac contenant de l'hématoxyline de Mayer, puis rincées à l'eau courante du robinet. Elles ont ensuite été passées dans un bain d'éthanol à 95° pendant 5 min, puis elles ont été immergées pendant 5 min dans une solution d'éosine alcoolique 0,5 % + 40 µL d'acide acétique par 100 mL de solution. Les coupes ont ensuite été déshydratées dans 3 bains successifs d'éthanol 100° (5 min), puis éclaircies dans 3 bains successifs de xylène (5 min).

### ✓ Coloration au Giemsa

Les coupes ont été immergées pendant 15 min dans un bac contenant la solution de Giemsa (4 %) puis rincées à l'eau distillée. Les coupes ont par la suite été déshydratées et éclaircies comme décrit dans le cas de la coloration à l'hématoxyline-éosine.

### **Etape 6: Montage, microscopie et photographie**

Une fois sorties du xylène, quelques gouttes de résine ont été déposées sur les coupes, puis ces dernières ont été recouvertes d'une lamelle couvre-objet pour l'observation au microscope. L'observation des coupes colorées s'est faite au microscope photonique. Les microphotographies ont été réalisées en reliant un ordinateur au microscope.

## **II.2.4- CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE**

Cette technique a été réalisée grâce à un dispositif constitué d'un chromatographe en phase gazeuse relié à un spectromètre de masse, modèle GC-7890A/MS-5975C (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), équipé d'une colonne HP-5MS (30 m de longueur × 0,32 mm de diamètre × 0,25 µm d'épaisseur de film). Le gaz porteur utilisé était l'hélium à un débit de 1mL/min. La température initiale a été réglée à 50 °C avec une vitesse d'augmentation de 5 °C/min pendant dix minutes, puis la température a été augmentée à un rythme de 10 °C/min jusqu'à 300 °C. L'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* préalablement solubilisé dans du chloroforme a été filtré à travers un microfiltre de 0,45 µm de maillage. La solution ainsi filtrée a été injectée en tête de colonne par une microséringue. La colonne, balayée en continu par le gaz porteur (hélium), a entraîné les différents composés de l'échantillon et les a amenés à se détacher les uns des autres en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire (chloroforme). Une fois séparés, ces différents composés ont été détectés en sortie de colonne par le spectromètre de masse. Ce dernier a brisé chaque molécule en fragments ionisés et classé ces fragments en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). L'identification des différents composés s'est faite par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux des standards disponibles dans la bibliothèque de la « National Institute of Standards and Technology » (NIST). Le programme NIST 08 (version 2.0f) a été utilisé à cet effet.

## II.2.5- PROFIL DE TOXICITE DE *Eremomastax speciosa*

### II.2.5.1- Cytotoxicité de *Eremomastax speciosa*

Dans cette partie, il s'est agi d'évaluer la toxicité cellulaire de *E. speciosa* en menant trois principales expériences à savoir: un test de cytotoxicité sur des fibroblastes normaux de souris, un test sur les cellules humaines cancéreuses du côlon et un test sur les larves d'artémies.

#### a) Effet de *Eremomastax speciosa* sur les fibroblastes normaux de souris

##### - *Principe*

Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényl tétrazolium). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. Ceci forme un précipité de couleur violette dans la mitochondrie. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes.

##### - *Procédure*

Les fibroblastes de souris (NIH-3T3) ont été cultivés dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) enrichi avec du sérum fœtal de bovin (5 % du volume total du milieu de culture), de la pénicilline (100 UI/mL) et de la streptomycine (100 µg/mL). Les flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup> contenant les cellules et le milieu de culture ont été incubés à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules en phase exponentielle de croissance ont été récoltées et comptées grâce à un hémacytomètre (pour atteindre 5x10<sup>4</sup> cellules/mL) puis 100 µL de cette suspension ont été introduits dans chaque puits expérimental d'une microplaque à 96 puits. Le jour suivant, le milieu a été remplacé par 200 µL de milieu frais contenant les différentes concentrations d'extrait testées (10; 100; 500 et 1000 µg/mL). Après 48 heures, le milieu a été remplacé par 200 µL de milieu frais contenant le colorant MTT (0,5 mg/mL). Après 4 heures d'incubation, le milieu présent dans tous les puits a été remplacé par 100 µL de DMSO afin de solubiliser les cristaux de Formazan formés à cause de la réduction du MTT. Quinze minutes plus tard, les absorbances ont été lues grâce à un lecteur de microplaque (Spectra Max plus, Molecular Devices, USA) à 540 nm. Le taux de réduction du MTT en formazan dans les cellules représentant le pourcentage d'inhibition a été calculé suivant la formule:

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - \frac{\text{D.O. de l'extrait}}{\text{D.O. témoin positif}} \times 100$$

Le pourcentage de viabilité a été calculé selon la formule:

$$\% \text{ de viabilité} = 100 - \% \text{ d'inhibition}$$

La Concentration Inhibitrice 50 (CI<sub>50</sub>) a par la suite été déterminée.

#### **b) Effet de *Eremomastax speciosa* sur les cellules humaines cancéreuses du côlon**

Pour le test sur les cellules humaines cancéreuses du côlon (Caco2) (ATCC HTB-37), le principe ainsi que le mode opératoire étaient similaires à ceux du test précédent. De même, les pourcentages d'inhibition et de viabilité ont été calculés comme décrit lors du test précédent.

#### **c) Effet de *Eremomastax speciosa* sur les larves d'artémies**

La toxicité de *E. speciosa* a été testée sur les larves de *Artemia salina* à trois concentrations différentes: 10; 100; 1000 µg/mL.

Un litre d'eau de mer artificiel (34,7 g de NaCl dans un litre d'eau distillée) a été préparé et versé dans un bac en plastique divisé en deux compartiments, communiquant entre eux par des trous à 2,54 cm de hauteur. Les œufs de *Artemia salina* ont été déposés dans un compartiment et ce dernier a été recouvert de papier aluminium afin de créer de l'obscurité. Deux jours plus tard, les œufs ont éclos et les larves se sont déplacées vers le compartiment exposé à la lumière.

L'extrait aqueux de *E. speciosa* a été solubilisé dans de l'eau distillée et transféré dans des flacons de sorte à obtenir trois concentrations finales (10; 100 et 1000 µg/mL) d'extrait dans les différents flacons. Pour chaque concentration trois flacons ont été utilisés. Après évaporation de l'eau distillée à l'étuve à convection, 10 larves ont été introduites dans chaque flacon, grâce à une pipette Pasteur et le volume a été complété à 5 mL par de l'eau de mer. Après 24 heures, le décompte des larves survivantes a été réalisé, les taux de mortalité ont été calculés et la Concentration Létale 50 (CL<sub>50</sub>) déterminée.

### **II.2.5.2- Toxicité *in vivo* de *Eremomastax speciosa***

#### **a) Evaluation de la toxicité aiguë**

La toxicité aiguë a été évaluée conformément à la ligne directrice N° 423 de l'OCDE (méthode par classe de toxicité) concernant les essais de substances chimiques (OCDE, 2001).

##### **- Principe**

Une dose déterminée de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux. La substance est testée dans un processus par classe dans lequel trois animaux de

même sexe sont utilisés à chaque étape. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est-à-dire:

- ✓ Arrêt de l'essai (lorsque la dose de 5 mg/kg provoque le décès de 2 à 3 animaux ou la dose de 5000 mg/kg ne cause aucun décès);
- ✓ Administration de la même dose à trois animaux supplémentaires (lorsque la dose administrée provoque le décès d'au plus un animal);
- ✓ Administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à trois animaux supplémentaires (lorsque la dose administrée provoque le décès d'au plus 1 animal ou d'au moins 2 animaux).

- ***Répartition et traitement des animaux***

Neuf (09) femelles ont été réparties en 3 lots de 3 rates dont 1 lot témoin, 1 lot test et 1 lot de confirmation. Les animaux ont été mis à jeun pendant 12 heures avant le début de l'expérimentation. Les animaux du groupe témoin ont reçu de l'eau distillée et ceux du groupe essai ont reçu l'extrait, par voie orale, à la dose unique de 2000 mg/kg. Les animaux du lot de confirmation ont également reçu l'extrait, 48 heures plus tard, à la dose de 2000 mg/kg à l'aide d'une sonde œsophagienne dans un volume maximal de 2 mL/100 g de poids corporel. Les animaux ont été privés d'eau et de nourriture pendant les quatre premières heures qui ont suivi le gavage. Après gavage, les animaux ont été observés régulièrement durant 24 heures avec une attention particulière pendant les 4 premières heures afin de détecter des éventuels troubles du comportement (réactivité au bruit, tremblement, automutilation, convulsion, salivation) et des modifications potentielles des aspects des selles et du pelage. Le nombre d'animaux morts par lot a été noté après 48 heures et les survivants ont été observés pendant 14 jours. La dose létale 50 (DL<sub>50</sub>) a été déterminée suivant le Système de classification Globalement Harmonisé (SGH) des substances entraînant la toxicité aiguë.

A la fin de la période d'observation, tous les animaux ont été pesés puis sacrifiés. Des organes (cœur, foie, reins, poumons, rate, ovaires et estomac) ont été prélevés pour observation macroscopique et détermination de leurs poids relatifs. Les poids relatifs des organes ont été calculés à partir de la formule suivante:

$$\text{Poids relatif} = \frac{\text{Poids de l'organe (g)}}{\text{Poids de l'animal (g)}} \times 100$$

## **b) Evaluation de la toxicité subaiguë**

La toxicité subaiguë a été évaluée conformément à la ligne directrice N° 407 de l'OCDE (méthode d'étude de la toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs) concernant les essais de substances chimiques (OCDE, 2008).

### *i) Répartition et traitement des animaux*

Pour l'évaluation de la toxicité subaiguë, 60 rats ont été répartis en 6 groupes de 10 animaux chacun (5 mâles et 5 femelles) comme suit:

- un groupe témoin négatif qui recevait l'eau distillée;
- trois groupes tests qui recevaient l'extrait aux doses de 400; 800 et 1600 mg/kg, respectivement;
- un groupe témoin satellite qui recevait l'eau distillée;
- un groupe essai satellite qui recevait l'extrait à la dose de 1600 mg/kg.

Tous les animaux ont été gavés une fois quotidiennement pendant 28 jours. Les lots satellites ont été observés pendant 14 jours, après arrêt des gavages, pour évaluer la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive de possibles effets toxiques induits par l'extrait. Les animaux ont été sacrifiés soit à la fin de l'administration de l'extrait (témoin négatif et groupes tests), soit 14 jours après l'arrêt des gavages (témoin et test satellites).

Les animaux étaient pesés tous les deux jours et à la fin de l'expérimentation ils ont été mis à jeun (12 heures avant le sacrifice), puis sacrifiés par décapitation. Le sang a été collecté et conservé dans des tubes à EDTA et des tubes secs. Le foie, les reins, les poumons, la rate, les ovaires, les testicules, le cœur et l'estomac ont été prélevés pour observation macroscopique, détermination de leurs poids relatifs et réalisation des coupes histologiques (foie, reins et poumons).

### *ii) Numération formule sanguine (NFS)*

Les échantillons de sang collectés dans des tubes à EDTA ont servi pour la Numération Formule Sanguine. Les paramètres évalués ont été: l'hématocrite, le taux d'hémoglobine, la numération des érythrocytes, des réticulocytes, des plaquettes et la formule leucocytaire.

Ces analyses ont été réalisées grâce à un automate (Hospitex Diagnostics HemaScreen 18, Italy) qui est un compteur automatique des cellules sanguines. Cet automate fonctionne selon le principe dit de variation de l'impédance ou principe de Coulter. Les cellules en passant à travers une ouverture déplacent un volume égal de fluide conducteur. De plus un courant électrique est appliqué au niveau de cette ouverture. Chaque passage d'une cellule à travers

l'ouverture provoque alors une augmentation de la résistance électrique. Cette augmentation est traduite en impulsions électriques dont la hauteur est directement proportionnelle au volume cellulaire. La détermination du volume cellulaire est donc basée sur le déplacement du liquide.

### *iii) Evaluation des paramètres biochimiques*

Le sang collecté dans les tubes secs a été centrifugé (3000 tr/min) pendant 10 minutes et le sérum prélevé, puis conservé à -20 °C pour les différents dosages biochimiques. Ces dosages, à l'exception des protéines totales, ont été effectués à l'aide de kits (Fortress diagnostics Ltd, Belfast road, UK) commerciaux.

#### **- Evaluation des paramètres biochimiques de la fonction hépatique**

##### **• Dosage des protéines totales**

Le dosage des protéines totales a été réalisé comme décrit précédemment (voir **II.2.3.3**).

##### **• Dosage de la bilirubine totale**

###### *Principe*

La bilirubine est convertie en azobilirubine révélée en présence du diméthylsulphoxyde par réaction avec l'acide sulphonilique diazotisé. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de bilirubine présente dans le milieu.

###### *Procédure*

Les préparations ainsi que les lectures d'absorbances ont été réalisées telles qu'indiqué par le fabricant du kit. La concentration de bilirubine totale dans les échantillons a été calculée selon la formule suivante:

$$[\text{Bilirubine}]_e = \frac{\text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance standard}} \times 17,5$$

Avec:  $[\text{Bilirubine}]_e$  = concentration de bilirubine dans l'échantillon (mg/dL)

##### **• Dosage de l'Alanine Aminotransférase (ALAT)**

L'alanine aminotransférase a été dosée par la méthode de Reitman et Frankel (1957).

###### *Principe*

L'ALAT catalyse le transfert du groupement amine de L- aspartate sur l' $\alpha$ -oxoglutarate pour former le pyruvate et le L-glutamate. Le pyruvate formé réagit avec le

dinitrophénylhydrazine pour donner l'hydrazone. L'intensité de la coloration de l'hydrazone est directement proportionnelle à la quantité de pyruvate.

#### ***Procédure***

Les préparations ainsi que les lectures d'absorbances ont été réalisées telles qu'indiqué par le fabricant du kit. La quantité d'ALAT dans les échantillons a été déterminée grâce à sa courbe d'étalonnage (Voir Annexe VII).

- **Dosage de l'Aspartate Aminotransférase (ASAT)**

L'aspartate aminotransférase a été dosée par la méthode de Reitman et Frankel (1957).

#### ***Principe***

L'ASAT catalyse le transfert du groupement amine de L-aspartate sur l' $\alpha$ -oxoglutarate pour former l'oxaloacétate et le L-glutamate. L'oxaloacétate formé réagit avec le dinitrophénylhydrazine pour donner l'hydrazone. L'intensité de la coloration de l'hydrazone est directement proportionnelle à la quantité d'oxaloacétate.

#### ***Procédure***

Les préparations ainsi que les lectures d'absorbances ont été réalisées telles qu'indiqué par le fabricant du kit. La quantité d'ASAT dans les échantillons a été déterminée grâce à sa courbe d'étalonnage (Voir Annexe VIII).

- **Evaluation des paramètres biochimiques de la fonction rénale**

- **Dosage de la créatinine**

Le dosage de la créatinine a été réalisé par la méthode de Bartels *et al.* (1972).

#### ***Principe***

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

#### ***Procédure***

Les préparations ainsi que les lectures d'absorbances ont été réalisées telles qu'indiqué par le fabricant du kit. La concentration de créatinine dans les échantillons a été calculée selon la formule suivante:

$$[\text{Créatinine}]_e = \frac{\Delta \text{ Absorbance échantillon}}{\Delta \text{ Absorbance standard}} \times 2$$



Avec:  $\left\{ \begin{array}{l} - [\text{Créatinine}]_e: \text{Concentration de la créatinine dans l'échantillon en mg/dL} \\ - \Delta \text{ Abs standard: variation de l'absorbance du standard entre 30 et 120 secondes} \\ - \Delta \text{ Abs échantillon: variation de l'absorbance de l'échantillon entre 30 et 120 secondes} \end{array} \right.$

- **Dosage de l'urée**

***Principe***

L'urée est hydrolysée en présence de l'uréase et produit du CO<sub>2</sub> et de l'ammonium. L'ammonium produit combiné au 2-oxoglutarate et au NADH en présence du glutamate déshydrogénase se transforme en glutamate et en NAD<sup>+</sup>. La diminution de l'absorbance due à la baisse de la concentration de NADH par unité de temps est proportionnelle à la concentration d'urée dans le milieu.

***Procédure***

Les préparations ainsi que les lectures d'absorbances ont été réalisées telles qu'indiqué par le fabricant du kit. La concentration d'urée dans les échantillons a été calculée selon la formule suivante:

$$[\text{Urée}]_e = \frac{\text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance standard}} \times 50$$

Avec:  $[\text{Urée}]_e$  = concentration d'urée dans l'échantillon (mg/dL)

- **Evaluation des paramètres biochimiques de la fonction cardiovasculaire**

- **Dosage du cholestérol total**

***Principe***

Sous l'action de la cholestérol-estérase, les esters de cholestérol présents dans le sérum sont hydrolysés en cholestérol et en acide gras. L'oxydation du cholestérol en présence du cholestérol oxydase produit le 4-cholesténone et du peroxyde d'hydrogène. L'indicateur quinonimine se forme à partir du peroxyde d'hydrogène, de la 4-aminoantipyrine et du phénol sous l'action catalytique de la peroxydase. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol dans l'échantillon.

***Procédure***

Les préparations ainsi que les lectures d'absorbances ont été réalisées telles qu'indiqué par le fabricant du kit. La concentration de cholestérol total dans les échantillons a été calculée selon la formule suivante:

$$[\text{Cholestérol}]_e = \frac{\text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance standard}} \times 200$$

Avec:  $[\text{cholestérol}]_e$  = concentration de cholestérol total dans l'échantillon (mg/dL)

- **Dosage du HDL cholestérol**

***Principe***

Les lipoprotéines de faible densité (LDL et VLDL) sont précipitées spécifiquement par l'acide phosphotungstique en présence des ions magnésium et peuvent ainsi être séparées par centrifugation. Les lipoprotéines à haute densité (HDL) restent en suspension et peuvent être dosées en utilisant le surnageant clair.

***Procédure***

Les préparations ainsi que les lectures d'absorbances ont été réalisées telles qu'indiqué par le fabricant du kit. La concentration de HDL cholestérol dans les échantillons a été calculée selon la formule suivante:

$$[\text{HDL Cholestérol}]_e = \frac{\text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance standard}} \times 200$$

Avec:  $[\text{HDL cholestérol}]_e$  = concentration de HDL cholestérol dans l'échantillon (mg/dL)

- **Dosage des triglycérides**

***Principe***

Sous l'action des lipases, les triglycérides sont hydrolysés en glycérol. Le glycérol est ensuite transformé en peroxyde d'hydrogène sous l'action successive de la glycérol-kinase et de la glycérol-3-phosphate oxydase. Le peroxyde d'hydrogène sous l'action du 4-aminoantipyrine et du p-chlorophénol produit le 4-(p-benzoquinone-monoimino)-phenazone qui sert d'indicateur pour le dosage des triglycérides.

***Procédure***

Les préparations ainsi que les lectures d'absorbances ont été réalisées telles qu'indiqué par le fabricant du kit. La concentration de triglycérides dans les échantillons a été calculée selon la formule suivante:

$$[\text{Triglycérides}]_e = \frac{\text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance standard}} \times 200$$

Avec:  $[\text{Triglycérides}]_e$  = concentration de triglycérides dans l'échantillon (mg/dL)

- **Détermination de la concentration de LDL cholestérol**

La concentration de LDL cholestérol dans les échantillons a été déterminée grâce à l'équation de Friedewald *et al.* (1972):

$$[\text{LDL Cholestérol}]_e = [\text{Cholestérol total}]_e - [\text{HDL Cholestérol}]_e - ([\text{Triglycérides}]_e \div 5)$$

Avec:  $\left\{ \begin{array}{l} - [\text{LDL Cholestérol}]_e = \text{concentration du cholestérol LDL dans l'échantillon (mg/dL)} \\ - [\text{Cholestérol total}]_e = \text{concentration du cholestérol total dans l'échantillon (mg/dL)} \\ - [\text{HDL Cholestérol}]_e = \text{concentration du cholestérol HDL dans l'échantillon (mg/dL)} \\ - [\text{Triglycérides}]_e = \text{concentration de triglycérides dans l'échantillon (mg/dL)} \end{array} \right.$

*iv) Analyses histologiques*

Les organes (foie, rein et poumons) prélevés après sacrifice des animaux ont été fixés dans du formol à 10 %. La réalisation des coupes histologiques s'est faite comme décrit précédemment (voir **II.2.3.5**), excepté le fait que seule la coloration à l'hématoxyline-éosine a été effectuée.

## **II.2.6- ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS**

L'analyse des résultats s'est faite à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 7.00. Les données ont été analysées à l'aide du test d'ANOVA (analyse des variances) suivi du test de comparaison multiple de Tukey. Les différences ont été considérées comme significatives pour des valeurs de  $p < 0,05$ . Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard sur la moyenne (ESM).

## **CHAPITRE III**

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

### III.1- RESULTATS

#### III.1.1- EFFETS DE *Eremomastax speciosa* SUR *Helicobacter pylori*

##### III.1.1.1- EFFETS DE *Eremomastax speciosa* SUR *Helicobacter pylori* *in vitro*

###### a) Effets de *Eremomastax speciosa* sur l'inhibition de *Helicobacter pylori*

Le tableau V représente les pourcentages d'inhibition de *Helicobacter pylori* suite au traitement avec l'extrait et quelques antibiotiques de référence. Le traitement de *Helicobacter pylori* avec l'extrait de *E. speciosa* a provoqué une inhibition de la croissance bactérienne supérieure à 50 % chez tous les isolats, à la concentration de 8 mg/mL. Parmi les antibiotiques standard testés à 50 µg/mL, l'amoxicilline et le métronidazole ont inhibé individuellement plus de 60 % de la croissance bactérienne et plus de 70 % lorsqu'ils étaient en combinaison (25 µg/mL, chacun). La tétracycline et l'azithromycine n'ont inhibé, de manière importante, la croissance bactérienne chez aucun des isolats.

**Tableau V:** Pourcentages d'inhibition de différents isolats de *Helicobacter pylori* induits par *Eremomastax speciosa* et quelques antibiotiques de référence

Traitement	Pourcentages d'inhibition			
	HP 2	HP 4	HP 7	HP 10
<i>E. speciosa</i> (8 mg/mL)	61,15 ± 2,48	58,04 ± 1,88	64,48 ± 2,51	60,71 ± 1,47
Amoxicilline (50 µg/mL)	64,57 ± 2,31	62,42 ± 0,76	79,02 ± 2,54	68,46 ± 4,22
Métronidazole (50 µg/mL)	64,56 ± 1,88	66,53 ± 2,54	65,02 ± 2,84	64,09 ± 3,66
Amoxicilline + Métronidazole	79,08 ± 2,18	80,12 ± 3,54	78,61 ± 3,12	79,30 ± 2,45
Tétracycline (50 µg/mL)	25,98 ± 3,05	8,04 ± 1,20	14,93 ± 0,44	11,97 ± 0,87
Azithromycine (50 µg/mL)	24,57 ± 1,99	17,25 ± 2,05	23,13 ± 5,41	14,65 ± 1,00

HP 2, HP 4, HP 7, HP 10 = Différents isolats de *H. pylori*. Les pourcentages d'inhibition sont exprimés sous forme de moyennes ± ESM ; L'amoxicilline et le métronidazole en combinaison étaient à 25 µg/mL, chacun.

Les CMI et CMB de *E. speciosa* sont représentés dans le tableau VI. *E. speciosa* a inhibé la croissance bactérienne de façon visible chez tous les isolats étudiés à la concentration de 8 mg/mL. L'amoxicilline et le métronidazole ont individuellement présenté une CMI de 50 µg/mL et leur combinaison (25 µg/mL, chacun) a inhibé de façon visible la croissance bactérienne. La CMB de *E. speciosa* s'est révélée supérieure à 32 mg/mL chez tous les isolats, le rapport CMB/CMI étant donc supérieur à 4.

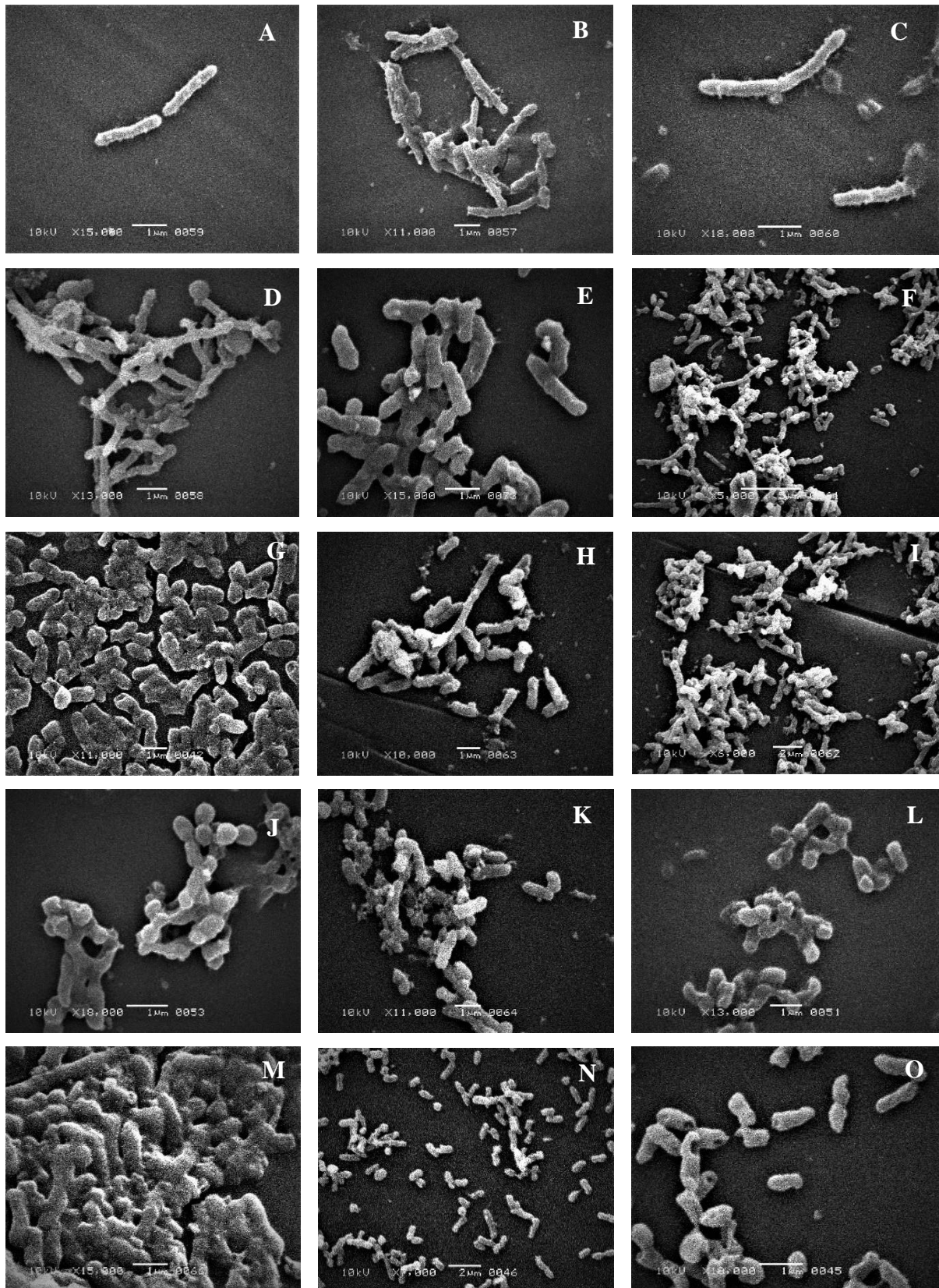
**Tableau VI : Concentrations minimales inhibitrice et bactéricide de *Eremomastax speciosa* et quelques antibiotiques de référence sur différents isolats de *Helicobacter pylori***

Traitement	HP 2		HP 4		HP 7		HP 10	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>E. speciosa</i>	8000	>32 000	8000	>32 000	8000	>32 000	8000	>32 000
Amoxicilline	50	-	50	-	50	-	50	-
Métronidazole	50	-	50	-	50	-	50	-
Amox + Métro	25	-	25	-	25	-	25	-

HP 2, HP 4, HP 7, HP 10 = Différents isolats de *H. pylori*. Les valeurs représentent les concentrations et sont exprimées en µg/mL. (-) = Non testé ; Amox = Amoxicilline ; Métro = Métronidazole

#### **b) Effets de *Eremomastax speciosa* sur la morphologie bactérienne**

La figure 12 représente les microphotographies de *Helicobacter pylori*, prises par microscopie électronique à balayage, après différents traitements. Les bactéries n'ayant subi aucun traitement (figures 12A-12C) ont montré une morphologie normale en bâtonnets avec une paroi lisse et régulière. Les bactéries exposées à la demie CMI (4 mg/mL) de l'extrait aqueux de *E. speciosa* (figures 12D-12F) ont présenté un aspect cellulaire rugueux avec un début de rupture des parois cellulaires. Les traitements par la CMI (figures 12G-12I) et la double CMI (figures 12J-12L) ont induit de graves altérations de la paroi cellulaire avec formation de trous et d'invaginations ainsi qu'un état avancé de désorganisation morphologique accompagné d'une fuite du contenu cytoplasmique bactérien. Après exposition à des médicaments standard (amoxicilline + métronidazole), une lyse complète des cellules a été observée (figures 12M-12O). A ce stade, la plupart des cellules avaient perdu leur morphologie normale. La fuite du contenu cytoplasmique bactérien était plus accentuée et une dispersion de débris cellulaires a également été notée.

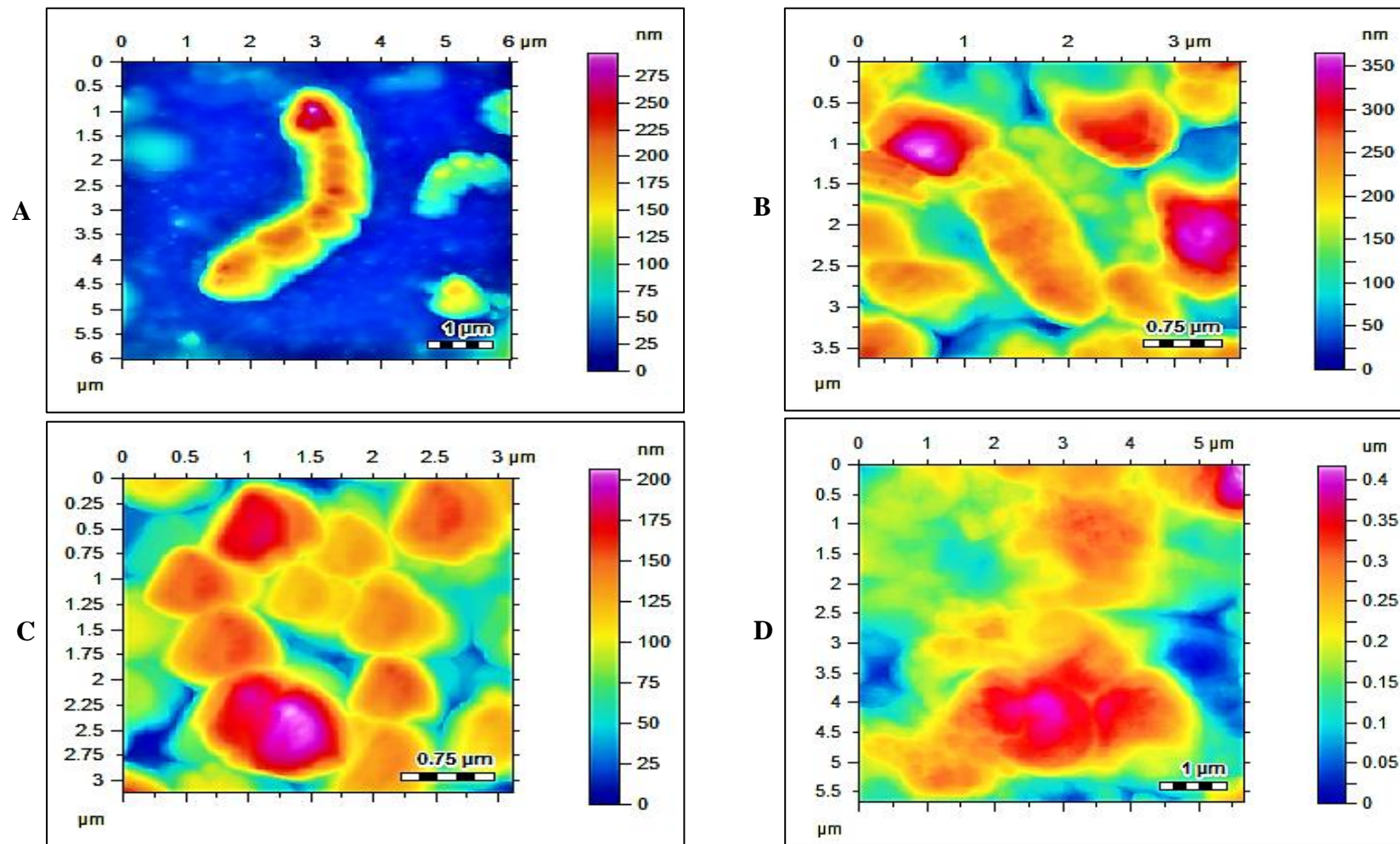


**Figure 12: Microphotographies de *Helicobacter pylori* par microscopie électronique à balayage (Grossissement :  $\times 7\ 000$  -  $\times 18\ 000$ )**

(A-C) = Bactéries non traitées ; (D-F) = Bactéries traitées avec *E. speciosa* à 4 mg/mL ; (G-I) = Bactéries traitées avec *E. speciosa* à 8 mg/mL ; (J-L) = Bactéries traitées avec *E. speciosa* à 16 mg/mL ; (M-O) = Bactéries traitées avec le mélange amoxicilline + métronidazole (25 µg/mL chacun)

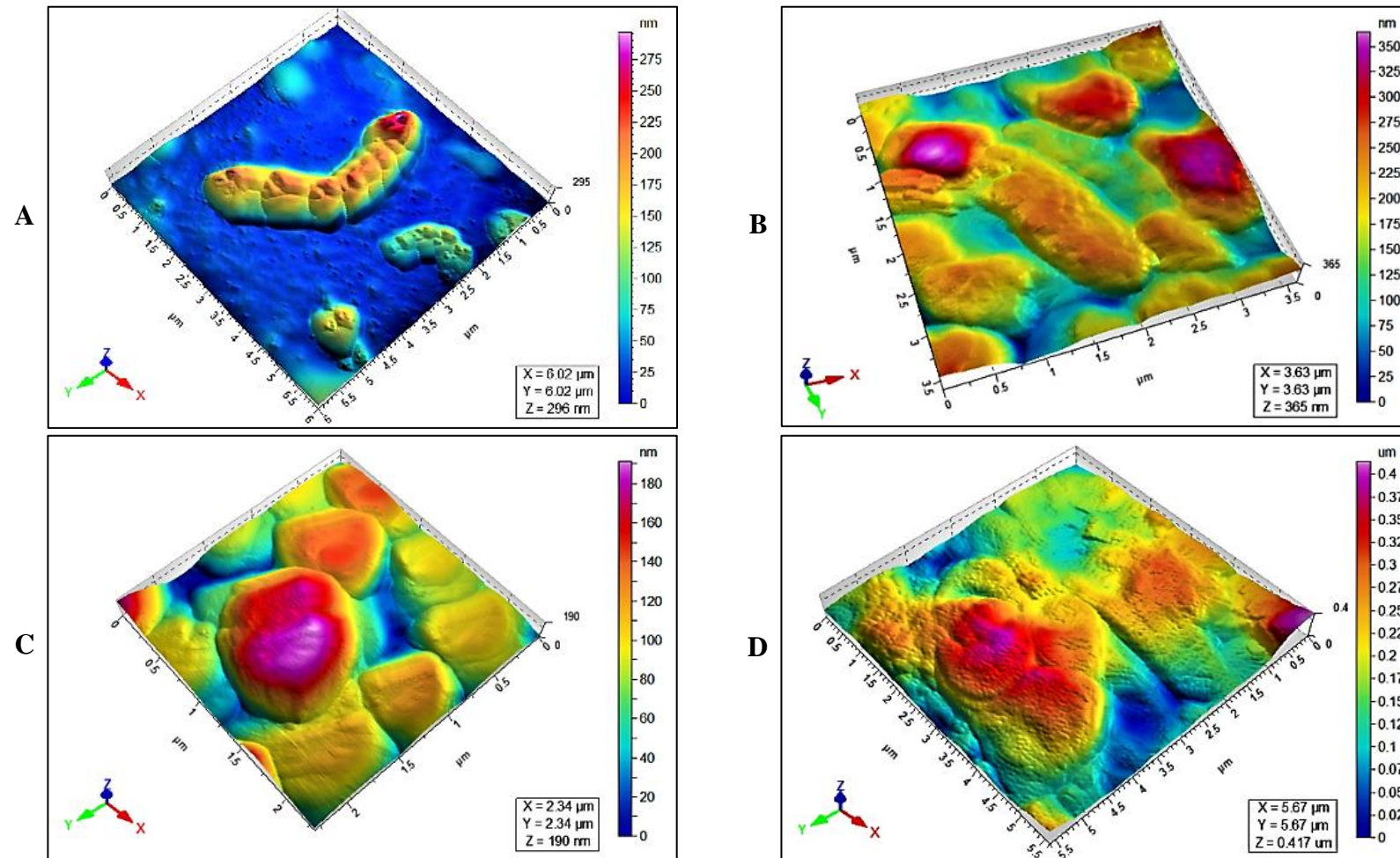
Les figures 13 et 14 illustrent les effets des différents traitements sur *Helicobacter pylori* observés par microscopie à force atomique. Les parois des bactéries n'ayant subi aucun traitement (figures 13A et 14A) ont présenté un aspect typique lisse et régulier, avec une intégrité structurelle bien maintenue. Les cellules traitées à la CMI et à la double CMI (figures 13B et C ; 14B et C) ont présenté plusieurs dommages. La plupart des cellules ont présenté des renflements avec des formes irrégulières et un degré élevé de rupture accompagné d'une fuite de contenu cytoplasmique, ce qui a provoqué une variation importante des mensurations (longueur, largeur et hauteur) bactériennes. Un éparpillement des débris cellulaires a également été observé. Le traitement avec des médicaments standards (Figures 13D et 14D) a induit la désorganisation complète de la plupart des cellules bactériennes, entraînant une fuite massive du contenu cytoplasmique et une perte totale de l'intégrité morphologique.





**Figure 13: Microphotographies 2D de *Helicobacter pylori* par microscopie à force atomique**

*A* = Bactéries non traitées ; *B* = Bactéries traitées avec *E. speciosa* à 8 mg/mL ; *C* = Bactéries traitées avec *E. speciosa* à 16 mg/mL ; *D* = Bactéries traitées avec le mélange amoxicilline + métronidazole (25 μg/mL chacun).

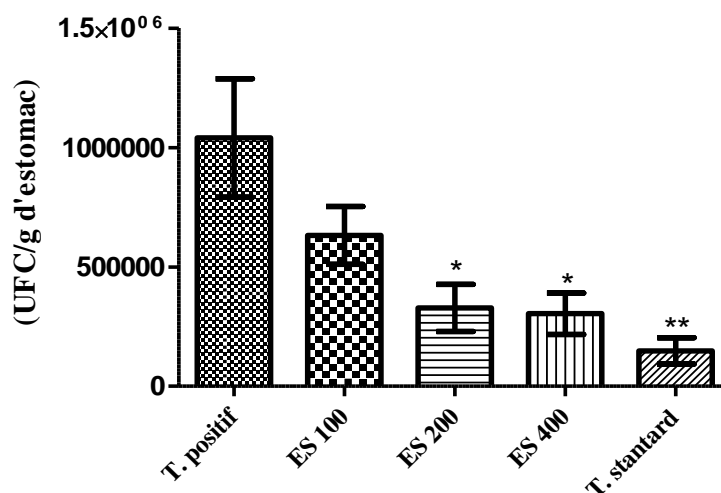


**Figure 14: Microphotographies 3D de *Helicobacter pylori* par microscopie à force atomique**

*A* = Bactéries non traitées ; *B* = Bactéries traitées avec *E. speciosa* à 8 mg/mL ; *C* = Bactéries traitées avec *E. speciosa* à 16 mg/mL ; *D* = Bactéries traitées avec le mélange amoxicilline + métronidazole (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  chacun).

### III.1.1.2- EFFETS DE *Eremomastax speciosa* SUR *Helicobacter pylori* *in vivo*

La figure 15 illustre l'effet de *E. speciosa* sur la charge bactérienne dans les estomacs des souris. L'administration de *E. speciosa* a provoqué une baisse significative ( $p < 0,05$ ) de la charge bactérienne aux doses de 200 et 400 mg/kg. Le traitement avec le mélange amoxicilline et métronidazole a quant à lui occasionné une baisse significative ( $p < 0,01$ ) de la charge bactérienne chez les souris.



**Figure 15: Effet de *E. speciosa* sur la charge bactérienne *in vivo***

*T. positif* = témoin positif (animaux ayant reçu l'eau distillée) ; *T. standard* = témoin standard (animaux ayant reçu le mélange amoxicilline + métronidazole) ; *ES 100* = animaux traités avec *E. speciosa* à la dose de 100 mg/kg ; *ES 200* = animaux traités avec *E. speciosa* à la dose de 200 mg/kg ; *ES 400* = animaux traités avec *E. speciosa* à la dose de 400 mg/kg ; \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  = différence statistique significative par rapport au témoin positif ; les colonnes représentent les moyennes  $\pm$  ESM

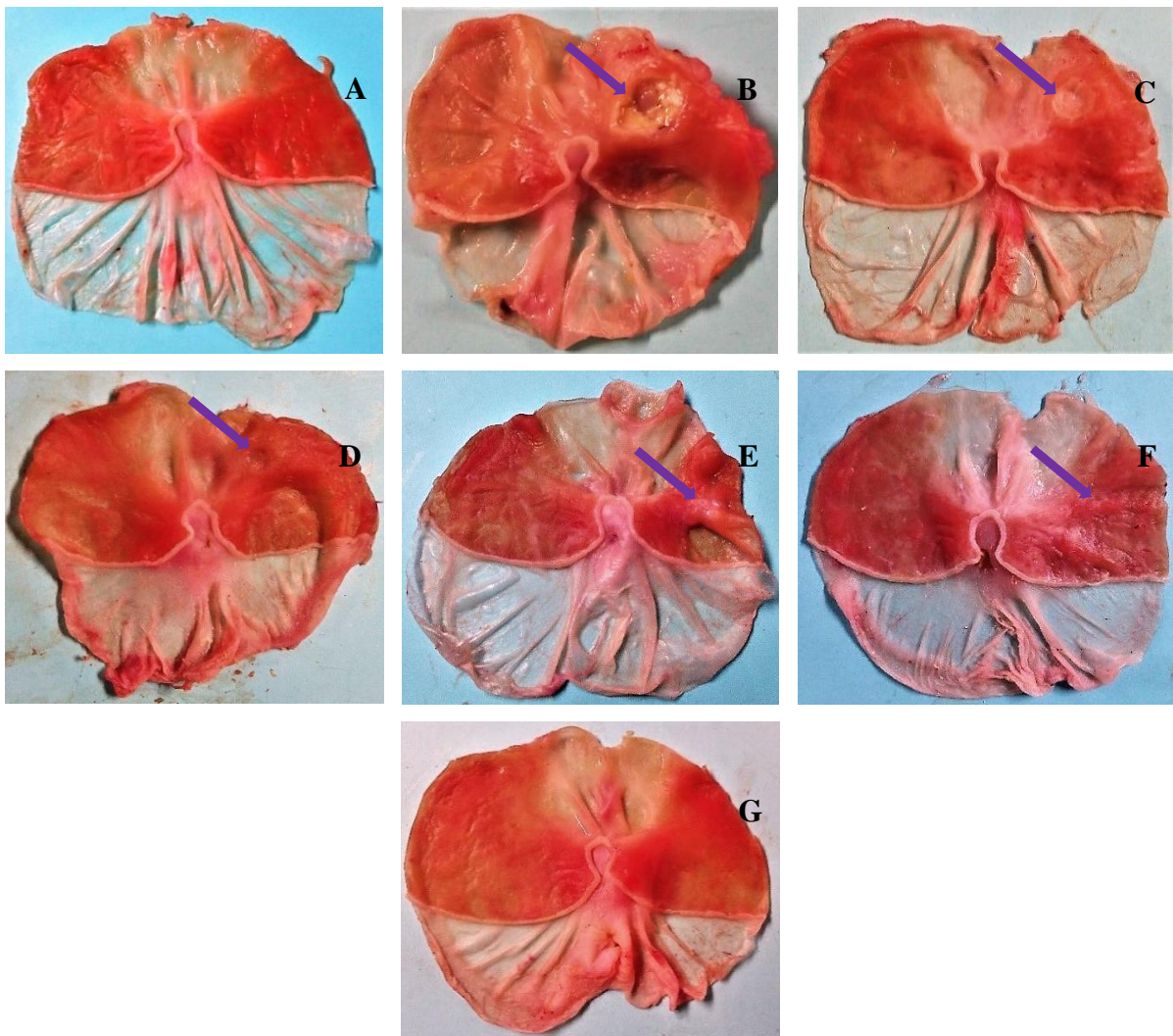
### III.1.2- EFFETS DE *Eremomastax speciosa* SUR LES ULCERES GASTRIQUES CHRONIQUES COUPLES A UNE INFECTION A *Helicobacter pylori*

#### III.1.2.1- EFFETS DE *Eremomastax speciosa* SUR LES ULCERES GASTRIQUES CHRONIQUES INDUITS AVEC L'ACIDE ACETIQUE

##### a) Effet de *Eremomastax speciosa* sur l'aspect macroscopique des ulcères

L'aspect macroscopique des estomacs, après induction de l'ulcère chronique avec l'acide acétique suivie du traitement par *E. speciosa*, est représenté par la figure 16. Les ulcères apparaissent sous la forme de cratères situés sur la partie glandulaire et leur gravité dépend

autant de la surface que de la profondeur des cratères. La photographie A représente l'estomac d'un rat n'ayant pas subi d'induction d'ulcère. La photographie B est l'illustration d'un estomac du lot transversal sacrifié 4 jours après induction de l'ulcère. Une couche de mucus en formation peut être observée au fond d'un cratère ulcéreux béant. Sur la photographie C représentant l'estomac d'un animal du lot longitudinal, la couche de mucus est apparemment totalement formée et les abords du cratère ulcéreux sont moins renflés, comparativement à la photographie B. Les photographies D, E et F illustrent les estomacs des animaux traités avec l'extrait aqueux de *E. speciosa* aux doses respectives de 100; 200 et 400 mg/kg. Les photographies D, E et F illustrent les estomacs des animaux traités avec l'extrait aqueux de *E. speciosa* aux doses respectives de 100; 200 et 400 mg/kg.



**Figure 16: Aspect macroscopique des estomacs des rats sujets à l'ulcère chronique induit avec l'acide acétique**

*A = Témoin infecté ; B = témoin transversal ; C = témoin longitudinal ; D = E. speciosa à 100 mg/kg ; E = E. speciosa à 200 mg/kg ; F = E. speciosa à 400 mg/kg ; G = témoin standard ; —> = indication des ulcères gastriques*

La diminution progressive des cratères ulcéreux accompagnée d'une normalisation du tissu glandulaire, jusqu'à la quasi disparition du cratère à la dose de 400 mg/kg, est nettement visible. Sur la photographie G, l'estomac d'un animal ayant reçu les médicaments de référence présente un tissu glandulaire régulier et une coloration uniforme ce qui atteste d'une guérison apparemment complète du tissu.

#### b) Effet de *Eremomastax speciosa* sur quelques paramètres d'ulcération

Le tableau VII résume les effets de l'extrait aqueux de *Eremomastax speciosa* sur quelques paramètres d'ulcération chez les animaux sujets à l'ulcère chronique induit avec l'acide acétique. L'indice d'ulcère chez le lot témoin longitudinal a significativement baissé ( $p < 0,001$ ), par comparaison au groupe témoin transversal, révélant ainsi une auto-guérison de 37,76 %. Tous les groupes traités aux différentes doses d'extrait (100; 200 et 400 mg/kg) ont connu une baisse significative de l'indice d'ulcère ( $p < 0,001$ ), comparativement au groupe témoin longitudinal, ce qui correspond à des baisses de 62,72 % ; 84,57 % et 96,19 %, respectivement. Cette baisse progressive des indices d'ulcère, chez les animaux traités à l'extrait, s'est accompagnée d'une augmentation de la sécrétion de mucus qui a été significative aux doses de 200 et 400 mg/kg. Chez les animaux du groupe traité aux médicaments de référence, l'indice d'ulcère a baissé de façon significative, inversement à la sécrétion de mucus qui a connu une augmentation significative ( $p < 0,001$ ).

**Tableau VII: Effets de *Eremomastax speciosa* sur quelques paramètres d'ulcération chez les animaux sujets à l'ulcère chronique induit avec l'acide acétique**

Traitement	Dose (mg/kg)	N	Indice d'ulcère (IU)	% S.U.	% G	Masse du mucus (mg)
Témoin infecté	-	5	-	-	-	61,11 ± 4,89
Témoin transversal	-	5	46,85 ± 2,50	6,94	-	50,22 ± 5,01
Témoin longitudinal	-	5	29,16 ± 1,08###	4,32	37,68 (% A.G)	42,22 ± 3,57
<i>E. speciosa</i>	100	5	10,87 ± 0,44***	1,61	76,80 [62,72]	48,96 ± 5,12
<i>E. speciosa</i>	200	5	4,50 ± 0,22***	0,67	90,39 [84,57]	59,69 ± 3,42*
<i>E. speciosa</i>	400	5	1,11 ± 0,00***	0,16	97,63 [96,19]	66,60 ± 4,30**
Témoin standard	-	5	0,86 ± 0,00***	0,13	98,16 [97,05]	71,68 ± 3,48***

*Témoin transversal* = rats sacrifiés au 4<sup>ème</sup> jour après induction de l'ulcère ; *Témoin longitudinal* = rats sujets à l'ulcère et traités avec l'eau distillée pendant 14 jours ; *Témoin standard* = rats sujets à l'ulcère et traités avec le mélange (ranitidine + amoxicilline + métronidazole) pendant 14 jours ; N = nombre de rats ; % S.U. = Pourcentage de la surface ulcérée ; % G = Pourcentage de guérison par comparaison au lot témoin transversal ; [ ] = Pourcentage de guérison par comparaison au lot témoin longitudinal ; % A.G. = Pourcentage d'auto-

guérison ; ### $p < 0,001$  : différence statistique significative par rapport au témoin transversal ; \* $p < 0,05$  : \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$  = différence statistique significative par rapport au témoin longitudinal ; les valeurs du tableau représentent les moyennes  $\pm$  ESM

### c) Effet de *Eremomastax speciosa* sur quelques paramètres du stress oxydant

Les effets de *E. speciosa* sur quelques paramètres du stress oxydant chez les animaux sujets à l'ulcère chronique induit avec l'acide acétique ont été récapitulés dans le tableau VIII. L'extrait a provoqué une augmentation significative de nitrites à toutes les doses testées par comparaison au témoin longitudinal. Le taux de MDA n'a pas connu de variation significative. *E. speciosa* a entraîné des augmentations significatives des taux de SOD (aux doses de 100 et 400 mg/kg), de catalase (à la dose de 400 mg/kg) et de GSH (aux doses de 100 et 200 mg/kg) par comparaison au témoin longitudinal.

**Tableau VIII: Effets de *Eremomastax speciosa* sur quelques paramètres du stress oxydant chez les animaux sujets à l'ulcère chronique induit avec l'acide acétique**

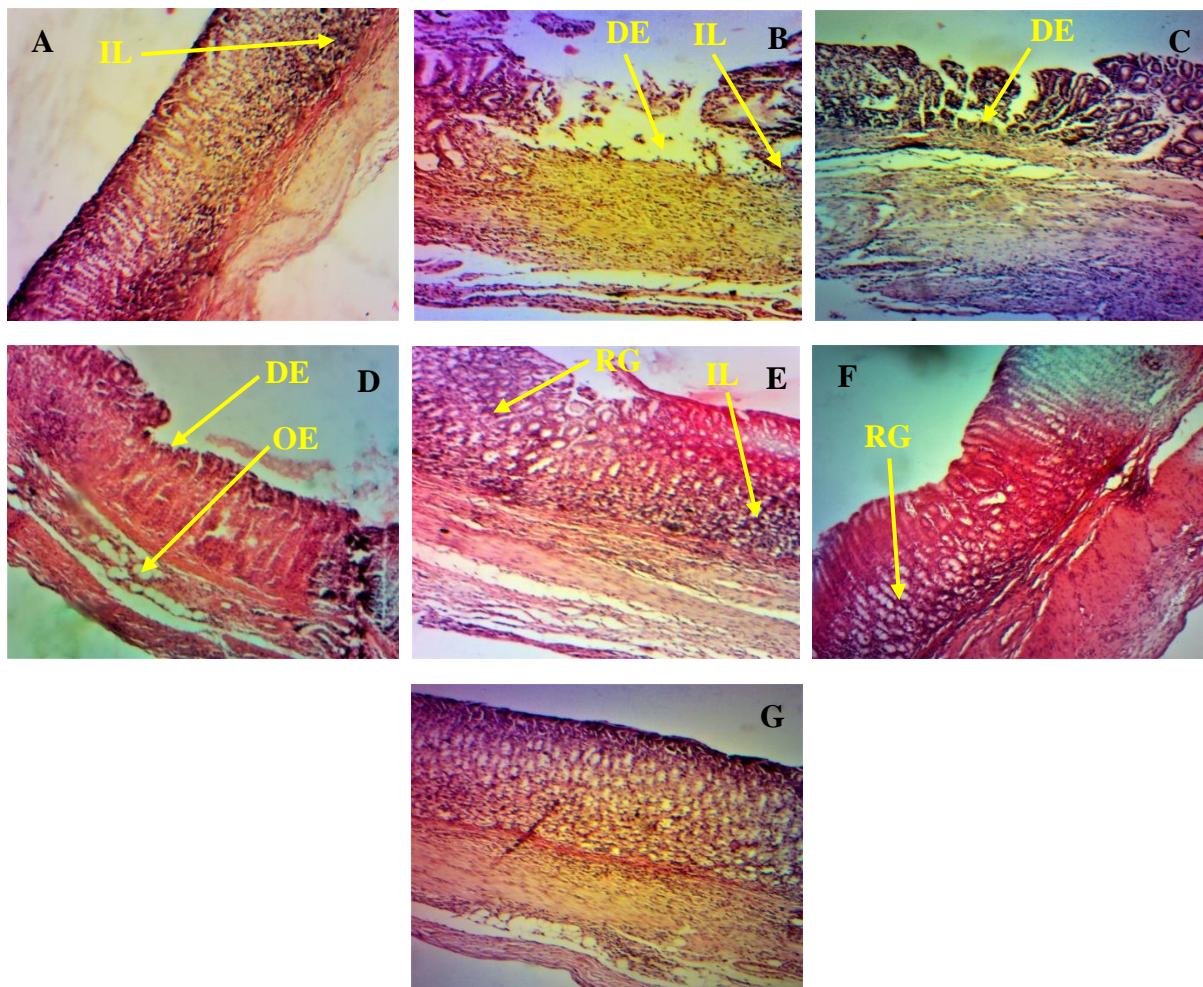
Traitement	Dose (mg/kg)	N	SOD (U/mg de protéines)	Catalase ( $\mu$ M de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min /mg de protéine)	GSH (mol/g de tissu x 10 <sup>-3</sup> )	MDA (mmol/g de tissu x 10 <sup>-4</sup> )	Nitrites ( $\mu$ mol)
<b>T. infecté</b>	-		1,94 $\pm$ 0,19	1,12 $\pm$ 0,08	0,81 $\pm$ 0,08	1,24 $\pm$ 0,18	21,46 $\pm$ 3,86
<b>T. trans.</b>	-	5	1,02 $\pm$ 0,07	0,75 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,07	1,84 $\pm$ 0,27	15,17 $\pm$ 2,15
<b>T. long.</b>	-	5	1,51 $\pm$ 0,27	0,83 $\pm$ 0,11	0,37 $\pm$ 0,05	1,53 $\pm$ 0,16	14,10 $\pm$ 2,74
<i>E. speciosa</i>	100	5	3,00 $\pm$ 0,22*	1,13 $\pm$ 0,09	1,21 $\pm$ 0,09*	0,94 $\pm$ 0,04	30,00 $\pm$ 3,75*
<i>E. speciosa</i>	200	5	2,70 $\pm$ 0,19	1,23 $\pm$ 0,14	1,75 $\pm$ 0,15*	0,93 $\pm$ 0,13	45,50 $\pm$ 5,63*
<i>E. speciosa</i>	400	5	3,01 $\pm$ 0,29*	3,08 $\pm$ 0,23**	0,49 $\pm$ 0,08	1,25 $\pm$ 0,15	63,70 $\pm$ 8,05**
<b>T. stand.</b>	-	5	4,41 $\pm$ 0,44	1,21 $\pm$ 0,13	2,21 $\pm$ 0,18**	1,15 $\pm$ 0,10	91,00 $\pm$ 9,49***

*T. infecté* = Témoin infecté ; *T. trans.* = Témoin transversal ; *T. long.* = Témoin longitudinal ; *T. stand.* = Témoin standard ; N = Nombre de rats ; \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$  = différence statistique significative par rapport au témoin longitudinal ; les valeurs du tableau représentent les moyennes  $\pm$  ESM

### d) Effet de *Eremomastax speciosa* sur le tissu gastrique

La figure 17 représente les microphotographies des coupes histologiques des estomacs chez les animaux sujets à l'ulcère chronique induit avec l'acide acétique. Sur la figure 17 A, correspondant à un sujet du lot normal, il est observé un tissu sain avec des couches régulières et parfaitement disposées les unes en continuité des autres avec toutefois la présence d'une infiltration leucocytaire. La figure 17 B, représentant un animal du lot témoin transversal, laisse voir une destruction épithéliale avancée avec perte de substance, une désorganisation du tissu

gastrique ainsi qu'une infiltration leucocytaire. Sur la figure 17 C, représentant un animal du lot témoin longitudinal, la destruction épithéliale est toujours perceptible avec cependant un début de régénération de l'épithélium ainsi que des couches sous-jacentes. Sur les figures 17 D et E, représentant les lots traités aux doses respectives de 100 et 200 mg/kg, la régénération glandulaire est nettement visible de même qu'une normalisation progressive des couches sous-muqueuse et musculuse. Il est aussi à noter la persistance des infiltrations leucocytaires et la présence d'œdèmes. La figure 17 F, illustrant l'estomac d'un rat traité à la dose de 400 mg/kg, montre un tissu stomachal quasi normal avec cependant des poches visibles de régénération glandulaire. Les animaux ayant reçu les médicaments standards (figure 17 G) ont quant à eux montré des épithélia totalement reconstitués avec toutefois la persistance des œdèmes au niveau de la musculuse chez certains animaux.

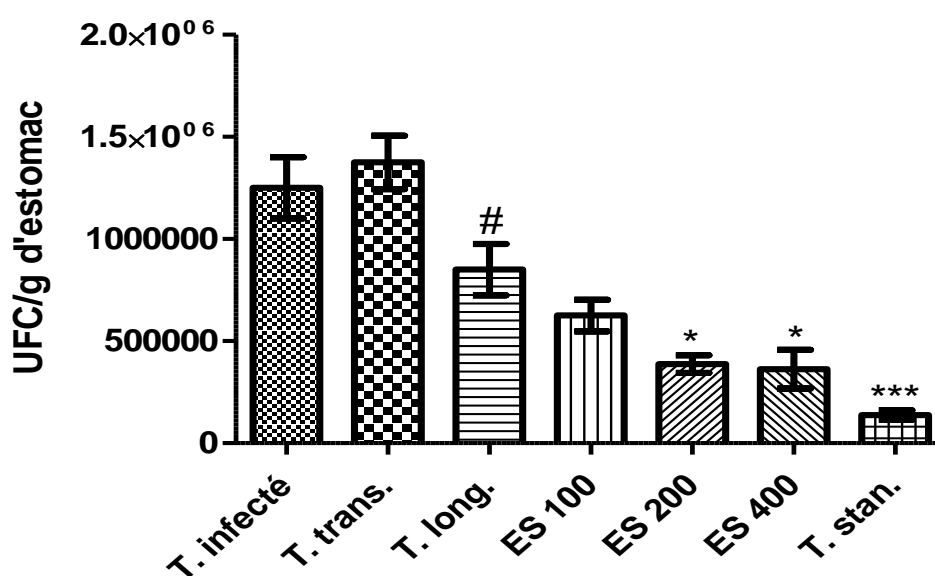


**Figure 17: Microphotographies des estomacs de rats sujets à l'ulcère chronique induit avec l'acide acétique (H&E ; ×400)**

*A = Témoin infecté ; B = témoin transversal ; C = témoin longitudinal ; D = E. speciosa à 100 mg/kg ; E = E. speciosa à 200 mg/kg ; F = E. speciosa à 400 mg/kg ; G = témoin standard ; DE = Destruction épithéliale ; IL = Infiltration leucocytaire ; RG = régénération glandulaire ; OE = Œdème*

### e) Effet de *Eremomastax speciosa* sur la colonisation bactérienne

La figure 18 représente l'effet de *E. speciosa* sur la charge bactérienne dans les estomacs des rats sujets à l'ulcère gastrique chronique induit avec l'acide acétique. Une baisse significative ( $p < 0,05$ ) de la charge bactérienne a été observée chez le témoin longitudinal par comparaison au témoin transversal. Le traitement par l'extrait a provoqué une baisse significative ( $p < 0,05$ ) de la charge bactérienne aux doses de 200 et 400 mg/kg, par comparaison au témoin longitudinal. De même chez le lot traité aux médicaments de référence (ranitidine + amoxicilline + métronidazole) une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de la charge bactérienne, par comparaison au témoin longitudinal, a été notée.



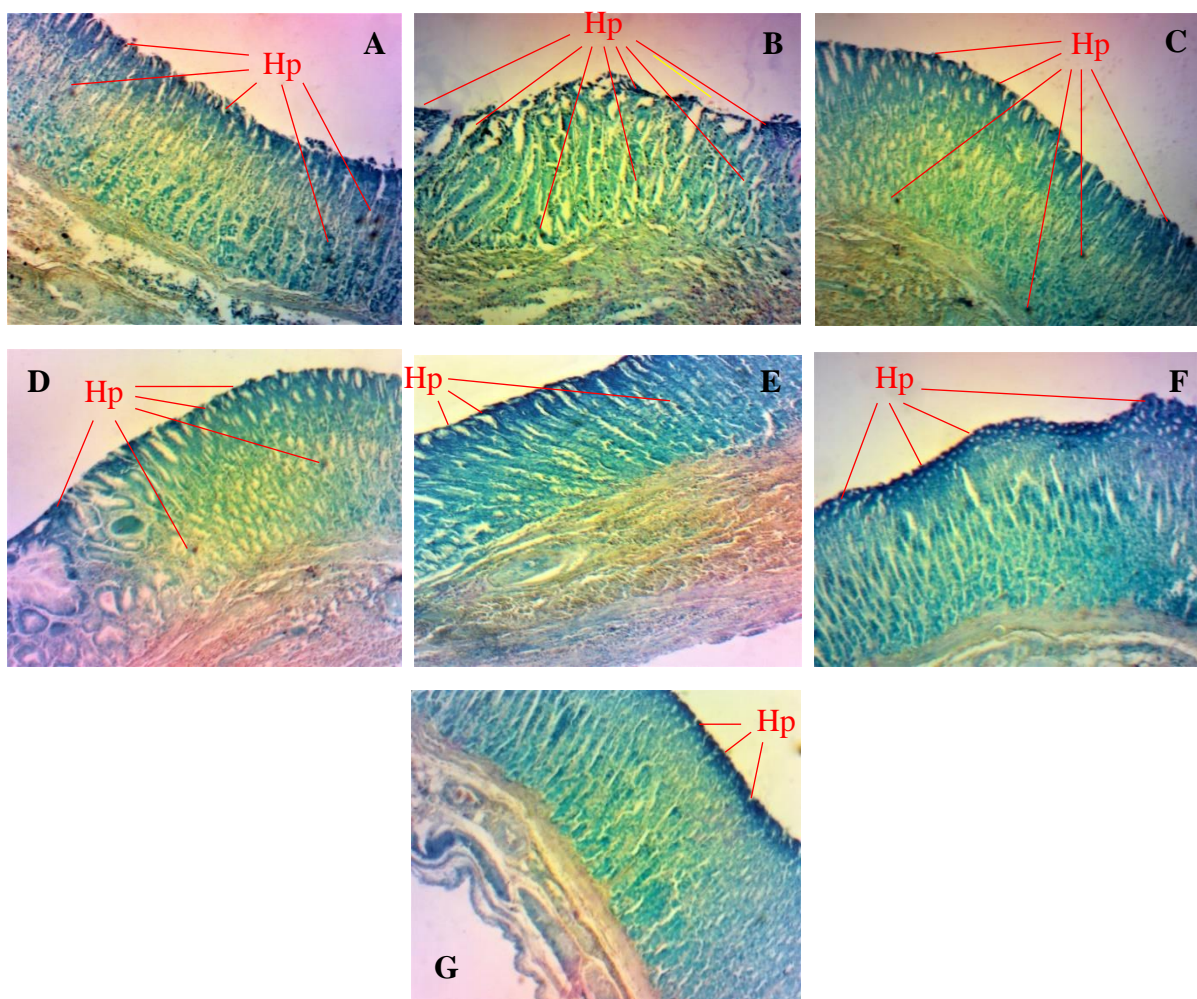
**Figure 18: Effet de *Eremomastax speciosa* sur la charge bactérienne**

**T. infecté** = témoin infecté ; **T. trans.** = témoin transversal (animaux sacrifiés au 4<sup>e</sup> jour après induction de l'ulcère) ; **T. long.** = témoin longitudinal (animaux ayant reçu l'eau distillée tout au long du traitement) ; **ES 100** = animaux traités avec *E. speciosa* à la dose de 100 mg/kg ; **ES 200** = animaux traités avec *E. speciosa* à la dose de 200 mg/kg ; **ES 400** = animaux traités avec *E. speciosa* à la dose de 400 mg/kg ; **T. stan.** = témoin standard (animaux ayant reçu le mélange (ranitidine + amoxicilline + métronidazole) ; \* $p < 0,05$  ; \*\*\* $p < 0,001$  = différence statistique significative par rapport au témoin longitudinal ; # $p < 0,05$  = différence statistique significative par rapport au témoin transversal ; les colonnes représentent les moyennes  $\pm$  ESM

La figure 19 représente les microphotographies des estomacs chez les animaux sujets à l'ulcère chronique induit avec l'acide acétique et préalablement infectés par *Helicobacter pylori*. La présence de *Helicobacter pylori* a été révélée par les petits points noirs caractéristiques de la coloration au Giemsa. Les figures 19 A, B et C, représentant



respectivement des animaux du lot normal, du lot témoin transversal et du lot témoin longitudinal, montrent une importante colonisation bactérienne de la muqueuse gastrique. Les bactéries se retrouvant principalement au niveau de la crête épithéliale ainsi qu'en profondeur entre les cellules glandulaires de l'épithélium et ce jusqu'à la limite de la sous muqueuse. Les estomacs des rats traités aux différentes doses d'extrait (figures 19 D, E et F) ont révélé une diminution progressive de la présence bactérienne avec les colonies se localisant presque exclusivement au niveau de la crête épithéliale. Chez les animaux ayant reçu les médicaments de référence, il a été observé une éradication quasi complète de la colonisation bactérienne avec cependant la présence très rare de bactéries au niveau de la crête épithéliale.



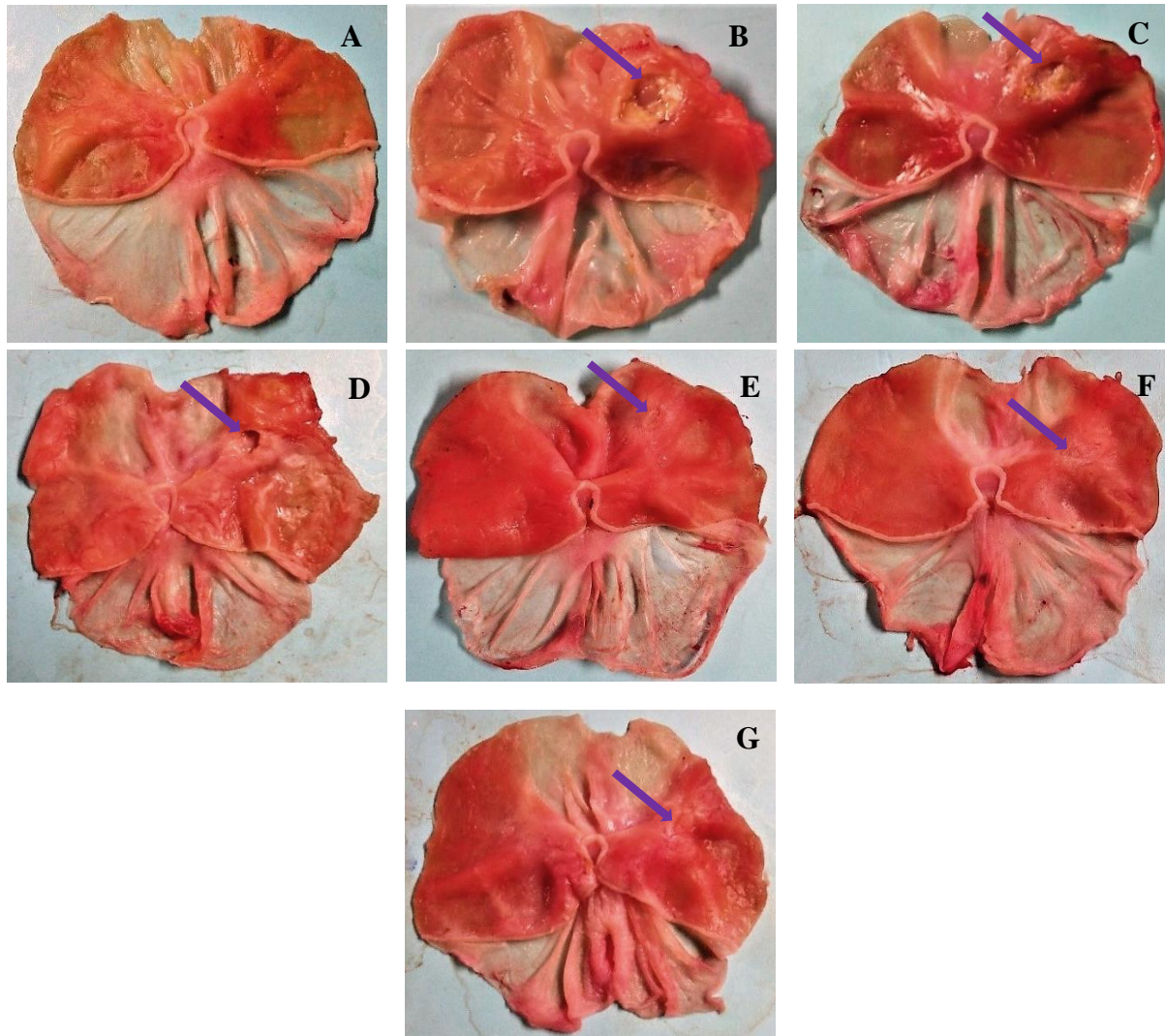
**Figure 19: Microphotographies des estomacs de rats sujets à l'ulcère chronique induit avec l'acide acétique (Giemsa; ×400)**

*A = Témoin infecté ; B = témoin transversal ; C = témoin longitudinal ; D = E. speciosa à 100 mg/kg ; E = E. speciosa à 200 mg/kg ; F = E. speciosa à 400 mg/kg ; G = témoin standard ; Hp = Helicobacter pylori ; — = indication de la présence de Helicobacter pylori*


### III.1.2.2- EFFETS DE *Eremomastax speciosa* SUR LES ULCERES GASTRIQUES CHRONIQUES « DIFFICILEMENT GUERISSABLES »

#### a) Effet de *Eremomastax speciosa* sur l'aspect macroscopique des ulcères

L'aspect macroscopique des estomacs, après induction de l'ulcère chronique « difficilement guérissable » suivie du traitement par *E. speciosa*, est représenté par la figure 20. La photographie A représente l'estomac d'un rat n'ayant pas subi d'induction d'ulcère. Sur la photographie B, illustrant un estomac du groupe témoin transversal sacrifié 4 jours après induction de l'ulcère, une couche de mucus en formation peut être observée au fond d'un cratère ulcéreux béant. La photographie C, illustrant un estomac du groupe témoin longitudinal, présente un cratère assez profond mais moins large que chez le témoin transversal ainsi qu'un dépôt de mucus. Les photographies D, E et F représentant les estomacs des animaux traités avec l'extrait aqueux de *E. speciosa* aux doses respectives de 100; 200 et 400 mg/kg laissent entrevoir une normalisation progressive du tissu glandulaire de manière dose dépendante avec une guérison presque complète à la dose de 400 mg/kg. Sur la photographie G, représentant un animal du groupe témoin standard, l'ulcère est à peine perceptible et la coloration du tissu glandulaire est uniforme.



**Figure 20: Aspect macroscopique des estomacs de rats sujets à l'ulcère « difficilement guérissable »**

*A = Témoin infecté ; B = témoin transversal ; C = témoin longitudinal ; D = E. speciosa à 100 mg/kg ; E = E. speciosa à 200 mg/kg ; F = E. speciosa à 400 mg/kg ; G = témoin standard ;  = indication des ulcères gastriques*

#### **b) Effet de *Eremomastax speciosa* sur quelques paramètres d'ulcération**

Le tableau IX représente les effets de l'extrait aqueux de *E. speciosa* sur quelques paramètres d'ulcération chez les animaux sujets à l'ulcère « difficilement guérissable ». Le groupe témoin longitudinal a connu une baisse significative de l'indice d'ulcère, comparativement au lot témoin transversal, correspondant à une auto-guérison de 26,92 %. Tous les groupes traités à l'extrait ont connu une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de l'indice d'ulcère qui s'est accompagnée d'une augmentation significative (aux doses de 200 et 400 mg/kg) de la sécrétion de mucus. Les animaux traités aux médicaments de référence ont

également connu une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de l'indice d'ulcère couplée à une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la sécrétion de mucus.

**Tableau IX: Effets de *Eremomastax speciosa* sur quelques paramètres chez les animaux sujets à l'ulcère « difficilement guérissable »**

Traitement	Dose (mg/kg)	N	Indice d'ulcère (IU)	% S.U.	% G	Masse du mucus (mg)
Témoin infecté	-	5	-	-	-	61,11 ± 4,89
Témoin transversal	-	5	46,85 ± 2,50	6,94	-	50,22 ± 5,01
Témoin longitudinal	-	5	34,24 ± 3,78#	5,07	26,92 (% AG)	32,12 ± 4,54#
<i>E. speciosa</i>	100	5	19,42 ± 2,04**	2,88	58,55 [43,28]	44,31 ± 3,84
<i>E. speciosa</i>	200	5	11,78 ± 1,87***	1,75	74,86 [65,60]	55,88 ± 5,10**
<i>E. speciosa</i>	400	5	6,67 ± 0,77***	0,99	85,76 [80,52]	58,41 ± 4,22**
Témoin standard	-	5	2,00 ± 0,13***	0,30	95,73 [94,16]	73,97 ± 6,57***

**Témoin transversal** = rats sacrifiés au 4<sup>ème</sup> jour après induction de l'ulcère ; **Témoin longitudinal** = rats sujets à l'ulcère « difficilement guérissable » et traités avec l'eau distillée pendant 14 jours ; **Témoin standard** = rats sujets à l'ulcère « difficilement guérissable » et traités avec le mélange (ranitidine + amoxicilline + métronidazole) pendant 14 jours ; **N** = nombre de rats ; **% S.U.** = Pourcentage de la Surface Ulcérée ; **% G** = Pourcentage de guérison par comparaison au lot témoin transversal ; **[ ]** = Pourcentage de guérison par comparaison au lot témoin longitudinal ; **% A.G.** = Pourcentage d'auto-guérison ; **#p < 0,05** = différence statistique significative par rapport au témoin transversal ; **\*\*p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001** = différence statistique significative par rapport au témoin longitudinal; les valeurs du tableau représentent les moyennes ± ESM

### c) Effet de *Eremomastax speciosa* sur quelques paramètres du stress oxydant

Le tableau X illustre les effets de *E. speciosa* sur quelques paramètres du stress oxydant chez les animaux sujets à l'ulcère « difficilement guérissable ». L'extrait a provoqué une augmentation significative de nitrites, de SOD et de GSH, à toutes les doses testées, par comparaison au témoin longitudinal. Le taux de catalase a également connu une augmentation significative à la dose de 400 mg/kg. Le taux de MDA n'a, quant à lui, pas connu de variation significative.

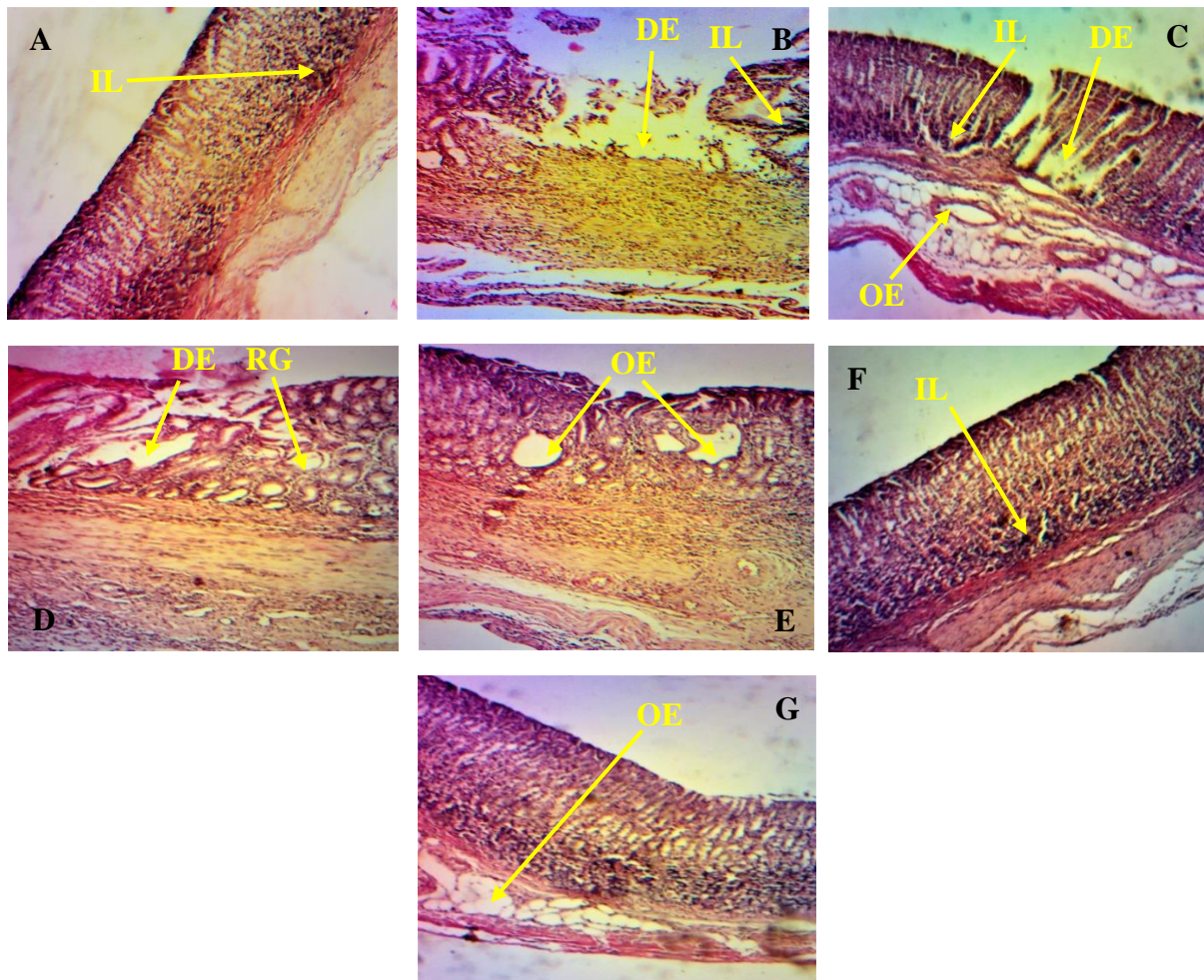
**Tableau X: Effets de *Eremomastax speciosa* sur quelques paramètres du stress oxydant chez les animaux sujets à l'ulcère « difficilement guérissable »**

Traitement	Dose (mg/kg)	N	SOD (U/mg de protéines)	Catalase ( $\mu\text{M}$ de $\text{H}_2\text{O}_2$ /min /mg de protéine)	GSH (mol/g de tissu x $10^{-3}$ )	MDA (mmol/g de tissu x $10^{-4}$ )	Nitrites ( $\mu\text{mol}$ )
<b>T. infecté</b>	-	5	1,94 $\pm$ 0,19	1,12 $\pm$ 0,08	0,81 $\pm$ 0,08	1,24 $\pm$ 0,18	21,46 $\pm$ 3,86
<b>T. trans.</b>	-	5	1,02 $\pm$ 0,07	0,75 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,07	1,84 $\pm$ 0,27	15,17 $\pm$ 2,15
<b>T. long.</b>	-	5	1,46 $\pm$ 0,20	1,39 $\pm$ 0,11	0,21 $\pm$ 0,05	1,59 $\pm$ 0,21	17,30 $\pm$ 1,75
<b><i>E. speciosa</i></b>	100	5	3,13 $\pm$ 0,26*	3,62 $\pm$ 0,32**	1,05 $\pm$ 0,07*	1,56 $\pm$ 0,14	61,03 $\pm$ 7,05**
<b><i>E. speciosa</i></b>	200	5	4,43 $\pm$ 0,26**	1,86 $\pm$ 0,16	1,19 $\pm$ 0,06**	1,15 $\pm$ 0,10	52,80 $\pm$ 6,28*
<b><i>E. speciosa</i></b>	400	5	4,83 $\pm$ 0,31**	1,84 $\pm$ 0,16	1,25 $\pm$ 0,08**	1,17 $\pm$ 0,19	65,50 $\pm$ 5,97**
<b>T. stand.</b>	-	5	4,78 $\pm$ 0,45**	1,19 $\pm$ 0,18	1,88 $\pm$ 0,20 **	1,21 $\pm$ 0,19	64,12 $\pm$ 5,24**

*T. infecté* = Témoin infecté ; *T. trans.* = Témoin transversal ; *T. long.* = Témoin longitudinal ; *T. stand.* = Témoin standard ; N = Nombre de rats ; \**p* < 0,05 et \*\**p* < 0,01 = différence statistique significative par rapport au témoin longitudinal ; les valeurs du tableau représentent les moyennes  $\pm$  ESM

#### d) Effet de *Eremomastax speciosa* sur le tissu gastrique

Les microphotographies des coupes histologiques des estomacs chez les animaux sujets à l'ulcère « difficilement guérissable » sont illustrées par la figure 21. Sur la figure 21 A, correspondant à un sujet du lot témoin infecté, il est observé un tissu sain avec des couches régulières et parfaitement disposées les unes en continuité des autres avec toutefois la présence d'une infiltration leucocytaire. La figure 21 B, représentant un animal du lot témoin transversal, laisse voir une destruction épithéliale avancée avec perte de substance, une désorganisation du tissu gastrique ainsi qu'une infiltration leucocytaire. Sur la figure 21 C, correspondant à un sujet du lot témoin longitudinal, la désorganisation du tissu gastrique et infiltration leucocytaire persistent avec toutefois un début de régénération glandulaire. Chez les animaux traités à la dose de 100 mg/kg d'extrait (figure 21 D), la désorganisation de l'épithélium était toujours visible avec cependant un début de régénération. Les animaux traités aux doses de 200 et 400 mg/kg (figures 21 E et F, respectivement) ont montré un état de réparation avancée du tissu gastrique avec toutefois la présence d'œdèmes et d'infiltration leucocytaire. Chez les animaux ayant reçu les médicaments standards, la réparation de l'épithélium est apparue presque complète et la présence d'œdèmes au niveau de la musculuse a également été observée.

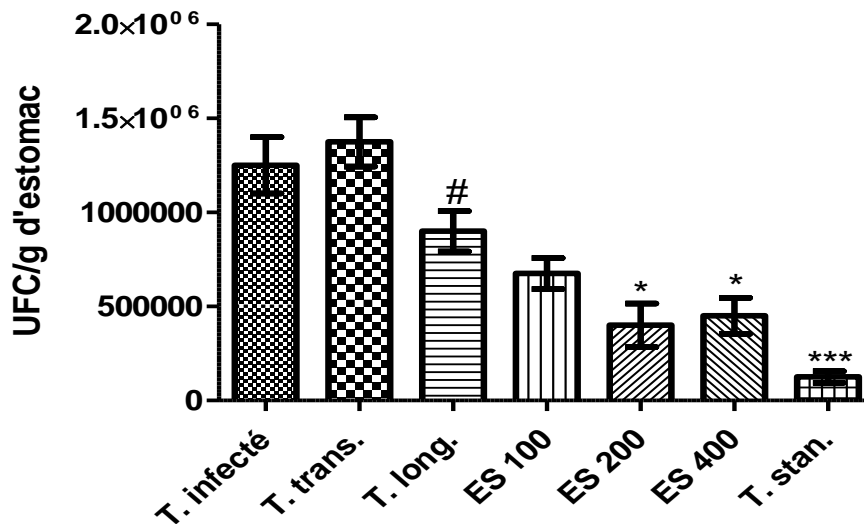


**Figure 21: Microphotographies des estomacs de rats sujets à l'ulcère « difficilement guérissable » (H&E ; ×400)**

*A* = Témoin infecté ; *B* = témoin transversal ; *C* = témoin longitudinal ; *D* = *E. speciosa* à 100 mg/kg ; *E* = *E. speciosa* à 200 mg/kg ; *F* = *E. speciosa* à 400 mg/kg ; *G* = témoin standard ; *DE* = Destruction épithéliale ; *IL* = Infiltration leucocytaire ; *RG* = régénération glandulaire ; *OE* = Œdème

#### e) Effet de *Eremomastax speciosa* sur la colonisation bactérienne

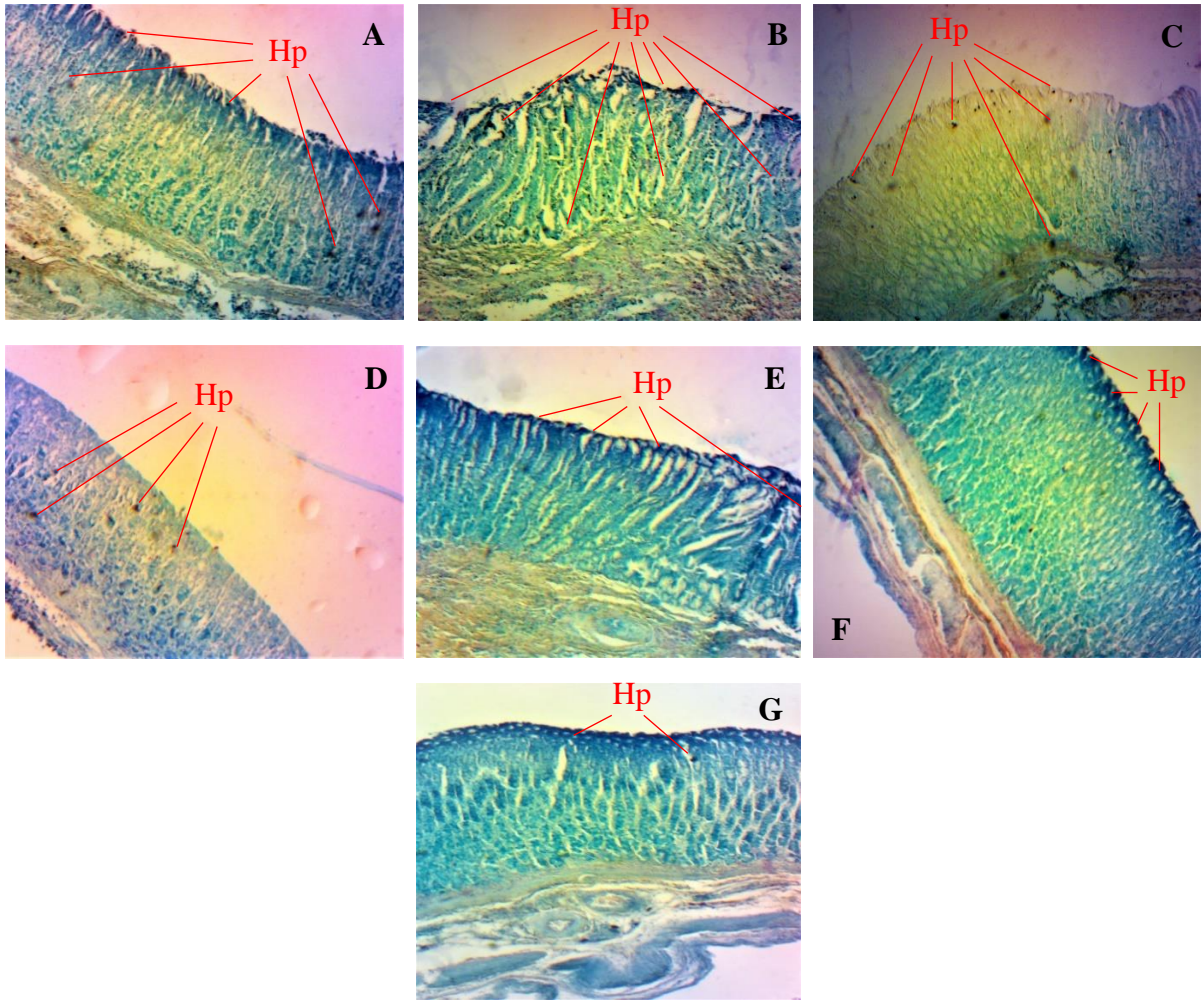
L'effet de *E. speciosa* sur la charge bactérienne des rats sujets à l'ulcère « difficilement guérissable » est illustré par la figure 22. La charge bactérienne a significativement ( $p < 0,05$ ) baissé chez le lot longitudinal par comparaison au lot transversal. Le traitement par *E. speciosa* a provoqué une baisse significative de la charge bactérienne aux doses de 200 et 400 mg/kg comparativement au témoin longitudinal. Une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de cette charge a également été notée chez le lot témoin standard.



**Figure 22: Effet de *Eremomastax speciosa* sur la charge bactérienne**

*T. infecté* = témoin infecté ; *T. trans.* = témoin transversal (animaux sacrifiés au 4<sup>e</sup> jour après induction de l'ulcère) ; *T. long.* = témoin longitudinal (animaux ayant reçu l'eau distillée tout au long du traitement) ; *ES 100* = animaux traités avec *E. speciosa* à la dose de 100 mg/kg ; *ES 200* = animaux traités avec *E. speciosa* à la dose de 200 mg/kg ; *ES 400* = animaux traités avec *E. speciosa* à la dose de 400 mg/kg ; *T. stan.* = témoin standard (animaux ayant reçu le mélange (ranitidine + amoxicilline + métronidazole) ; \*\**p* < 0,01 ; \*\*\**p* < 0,001 = différence statistique significative par rapport au témoin longitudinal ; #*p* < 0,05 = différence statistique significative par rapport au témoin transversal ; les colonnes représentent les moyennes ± ESM

La figure 23 représente les microphotographies des estomacs chez les animaux sujets à l'ulcère « difficilement guérissable » et préalablement infectés par *Helicobacter pylori*. Les petits points noirs, caractéristiques de la coloration au Giemsa, indiquaient la présence de *Helicobacter pylori*. Les figures 23 A, B et C, représentant respectivement des animaux du lot témoin infecté, du lot témoin transversal et du lot témoin longitudinal, montrent une importante colonisation bactérienne de la muqueuse gastrique. Les bactéries se trouvant principalement au niveau de la crête épithéliale ainsi qu'en profondeur entre les cellules glandulaires de l'épithélium et ce jusqu'à la limite de la sous muqueuse. Les animaux traités à la dose de 100 mg/kg d'extrait (figure 23 D) ont révélé une présence bactérienne encore importante dans l'épithélium gastrique. Chez les rats traités aux doses d'extrait de 200 et 400 mg/kg (figures 23 E et F, respectivement), il a été observé une diminution importante de la présence bactérienne dans l'épithélium, avec les colonies se localisant presque exclusivement au niveau de la crête épithéliale. Les rats traités par les médicaments de référence (figure 23 G) ont révélé une absence de colonisation bactérienne dans les épithélia avec toutefois la présence de quelques bactéries au niveau de la crête.



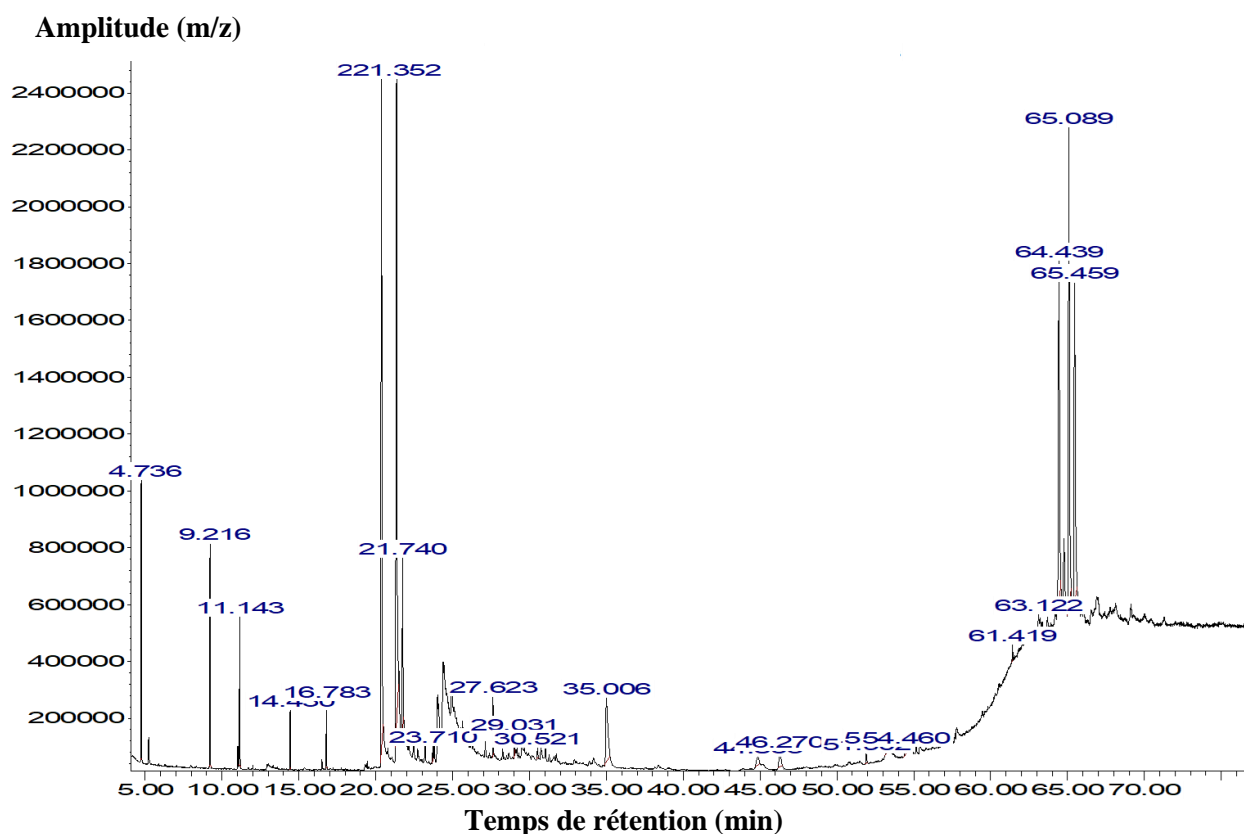
**Figure 23: Microphotographies des estomacs de rats sujets à l'ulcère « difficilement guérissable » (Giemsa ; ×400)**

*A = Témoin infecté ; B = témoin transversal ; C = témoin longitudinal ; D = E. speciosa à 100 mg/kg ; E = E. speciosa à 200 mg/kg ; F = E. speciosa à 400 mg/kg ; G = témoin standard ; Hp = Helicobacter pylori ; — = indication de la présence de Helicobacter pylori*



### III.1.3- CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE DE *Eremomastax speciosa*

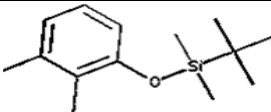
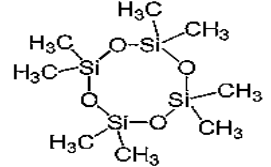
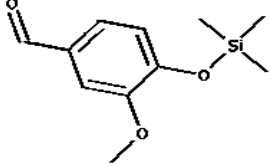
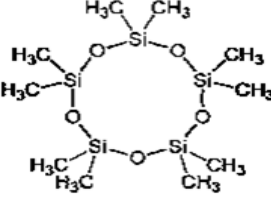
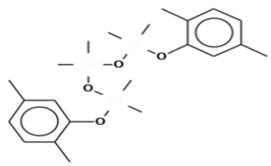
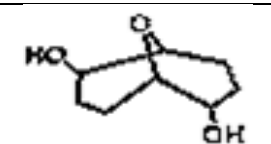
Le chromatogramme de l'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* a révélé la présence de 22 composés, détectés à différents temps de rétention (Figure 24).

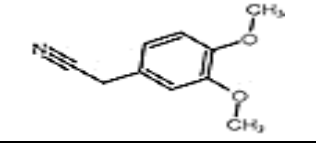

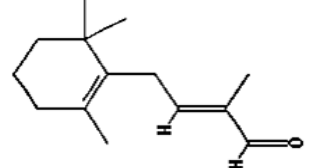

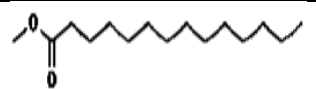
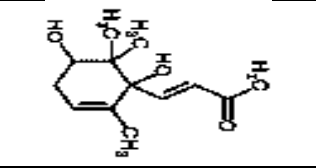
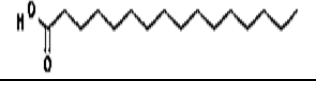
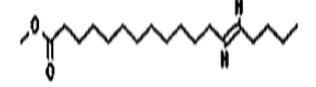
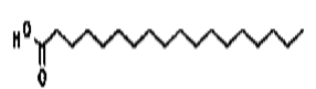


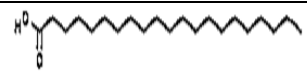
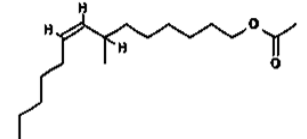
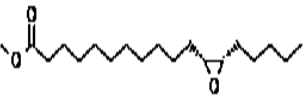
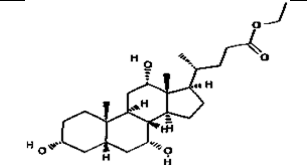
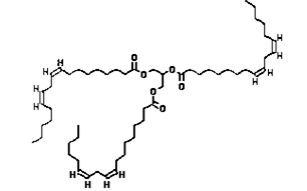
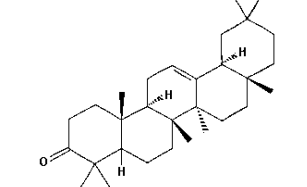
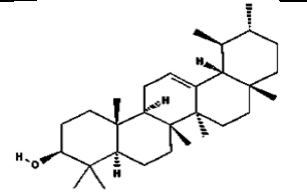
**Figure 24:** Chromatogramme de l'extrait aqueux des feuilles de *Eremomastax speciosa*

Les composés identifiés dans l'extrait sont présentés dans le tableau XI. Les composés majoritaires étaient: la  $\beta$ -amyronne (28,37 %), le 2,7-Dioxaisotwistane (19,77 %), le 9-oxabicyclo [3.3.1]-nonane-2,6-diol (15,80 %) et la  $\alpha$ -amyrine (12,09 %).

**Tableau XI: Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse de l'extrait aqueux de *Eremomastax speciosa***

No	Noms	Formules	Poids moléculaire	Temps de rétention (min)	Abondance (%)	Structures
1	2,3-Diméthylphénol, tert-butyl-diméthylsilyl éther	$C_{14}H_{24}OS$	236	4,73	3,96	
2	Octaméthyl-Cyclotétrasiloxane	$C_8H_{24}O_4Si_4$	296	9,21	3,49	
3	3-méthoxy-4-[(triméthylsilyl)oxy] - benzaldéhyde	$C_{12}H_{19}NO_3S$	253	11,14	2,16	
4	Décaméthyl-cyclopentasiloxane	$C_{10}H_{30}O_5Si_5$	370	14,40	0,85	
5	1,7-Di(2,5-diméthylphényl)-2,2,4,4,6,6-hexaméthyl-1,3,5,7-tétraoxa-2,4,6-trisilaheptane	$C_{22}H_{36}O_4Si_3$	448	16,78	0,92	
6	9-Oxabicyclo [3.3.1] nonane-2,6-diol	$C_8H_{14}O_3$	158	20,37	15,80	

7	2,7-Dioxaisotwistane	$C_8H_{12}O_2$	140	21,35	19,77	
8	5-hydroxy-9-oxabicyclo [3,3,1] nonan-2-one	$C_8H_{12}O_3$	156	21,74	3,62	
9	Boronal	$C_{14}H_{22}O$	206	23,71	0,18	
10	11-Isopropylidenetricyclo [4,3,1,1(2,5)] undéc-3-en-10-one	$C_{14}H_{18}O$	202	27,62	1,04	
11	Tétradécanoate de méthyle	$C_{15}H_{30}O_2$	242	29,03	0,34	
12	4-(1,5-Dihydroxy-2,6,6-triméthylcyclohex-2-enyl) but-3-en-2-one	$C_{13}H_{20}O_3$	224	30,52	0,19	
13	Acide hexadécanoïque, méthyle ester	$C_{17}H_{34}O_2$	270	35,00	3,82	
14	13-octadécénoate de méthyle	$C_{19}H_{36}O_2$	296	44,84	0,59	
15	Acide octadécanoïque, méthyle ester	$C_{19}H_{38}O_2$	298	46,26	0,86	

16	Acide hénicosanoïque	$C_{21}H_{42}O_2$	326	51,90	0,25	
17	7-Méthyl-Z-tétradécen-1-ol acétate	$C_{17}H_{32}O_2$	268	53,28	0,24	
18	Méthyle 11-(3-pentyl-2-oxiranyl) undécanoate	$C_{19}H_{36}O_3$	312	54,46	0,29	
19	Iso-allocholate d'éthyle	$C_{26}H_{44}O_5$	436	61,42	0,22	
20	Trilinoléine	$C_{57}H_{98}O_6$	878	63,11	0,93	
21	$\beta$ -amyrone	$C_{30}H_{48}O$	424	65,09	28,37	
22	$\alpha$ -amyrine	$C_{30}H_{50}O$	426	65,45	12,09	

### III.1.4- TOXICITE DE *Eremomastax speciosa*

#### III.1.4.1- CYTOTOXICITE DE *Eremomastax speciosa*

##### a) Effet de *Eremomastax speciosa* sur les fibroblastes sains de souris

La figure 25 représente l'effet de *E. speciosa* sur les fibroblastes sains de souris. L'exposition de ces cellules à l'extrait, aux concentrations de 10; 100, 500 et 1000  $\mu\text{g/mL}$ , a occasionné des inhibitions de l'ordre de 6 ; 15 ; 21,33 et 31,33 %, respectivement. La Concentration Inhibitrice 50 ( $\text{CI}_{50}$ ) de l'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* vis-à-vis des cellules NIH-3T3, après 48 heures d'exposition, est donc supérieure à 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

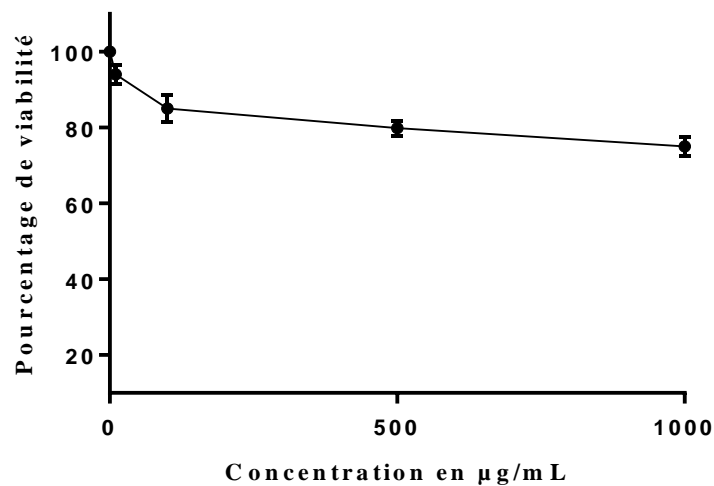
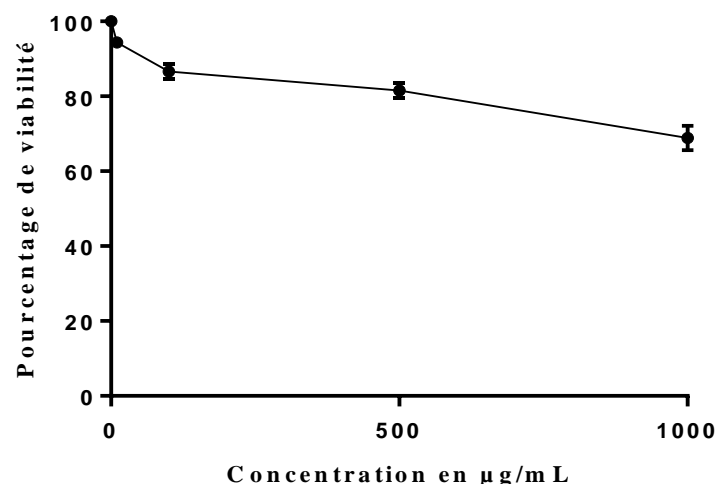


Figure 25: Effet de *Eremomastax speciosa* sur les cellules NIH-3T3

##### b) Effet de *Eremomastax speciosa* sur les fibroblastes sains de souris

Les effets de *E. speciosa* sur les cellules cancéreuses Caco2, sont illustrés par la figure 26. Le traitement des cellules par l'extrait, aux doses de 10; 100; 500 et 1000  $\mu\text{g/mL}$ , a provoqué des inhibitions respectives de 5,66 ; 13,40 ; 18,45 et 32,22 %. La Concentration Inhibitrice 50 ( $\text{CI}_{50}$ ) de l'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* vis-à-vis des cellules cancéreuses Caco2, après 48 heures d'exposition, est donc supérieure à 1000  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figure 26:** Effet de *Eremomastax speciosa* sur les cellules cancéreuses Caco2

**c) Effet de *Eremomastax speciosa* sur les larves de *Artemia salina***

Le tableau XII illustre l'effet de *E. speciosa* sur les larves de *Artemia salina*. L'extrait a provoqué la mort de 6,66 % des larves après 24 heures d'exposition à la concentration de 10 µg/mL, 13,33 % des larves à la concentration de 100 µg/mL et 20 % des larves à la concentration de 1000 µg/mL. La concentration létale 50 (CL<sub>50</sub>) de l'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* vis-à-vis des larves de *Artemia salina*, après 24 heures d'exposition, est donc supérieure à 1000 µg/mL.

**Tableau XII:** Effet de *Eremomastax speciosa* sur les larves de *Artemia salina*

	Concentration (µg/mL)	Nombre de larves survivantes après 24 heures			Nombre total de larves survivantes	Pourcentage de mortalité
		Test 1	Test 2	Test 3		
<i>E. speciosa</i>	10	9/10	10/10	9/10	28/30	6,66
	100	9/10	8/10	9/10	26/30	13,33
	1000	8/10	8/10	8/10	24/30	20

### III.1.4.2- TOXICITE *in vivo* DE *Eremomastax speciosa*

#### a) Toxicité aiguë de *Eremomastax speciosa*

##### 1) Effets de *Eremomastax speciosa* sur le comportement et la survie des rates

L'administration de l'extrait n'a entraîné aucun trouble visible du comportement, comparativement aux animaux du lot témoin. Aucune manifestation de tremblement, de convulsion, de diarrhée, de salivation, d'automutilation ou de marche à reculons n'a été observée. Par ailleurs, aucun décès n'est survenu chez les animaux durant la période de 14 jours d'observation suivant l'administration orale d'une dose unique d'extrait à la dose de 2000 mg/kg. La dose létale 50 a donc été estimée supérieure à 2000 mg/kg.

##### 2) Effet de *Eremomastax speciosa* sur l'évolution du poids corporel

L'évolution du poids corporel des animaux après l'administration d'une dose unique d'extrait est représentée par la figure 27. L'extrait n'a entraîné aucune variation significative du poids corporel des animaux, par comparaison au lot témoin.

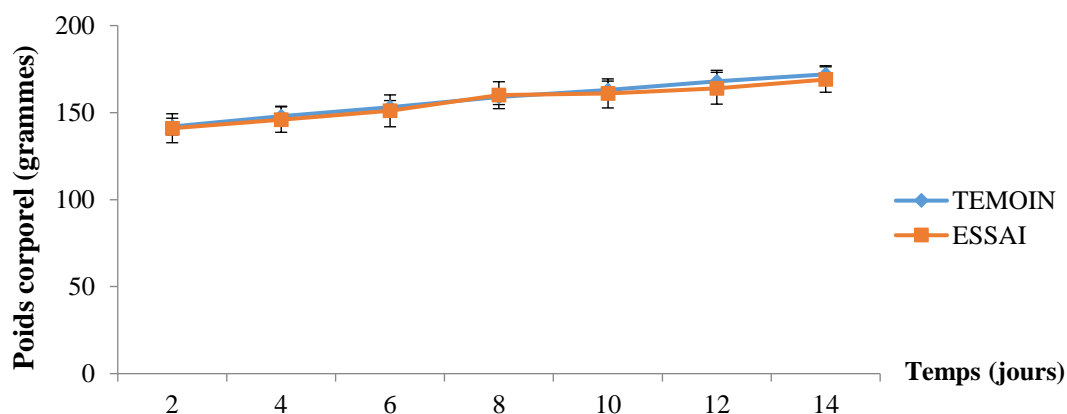
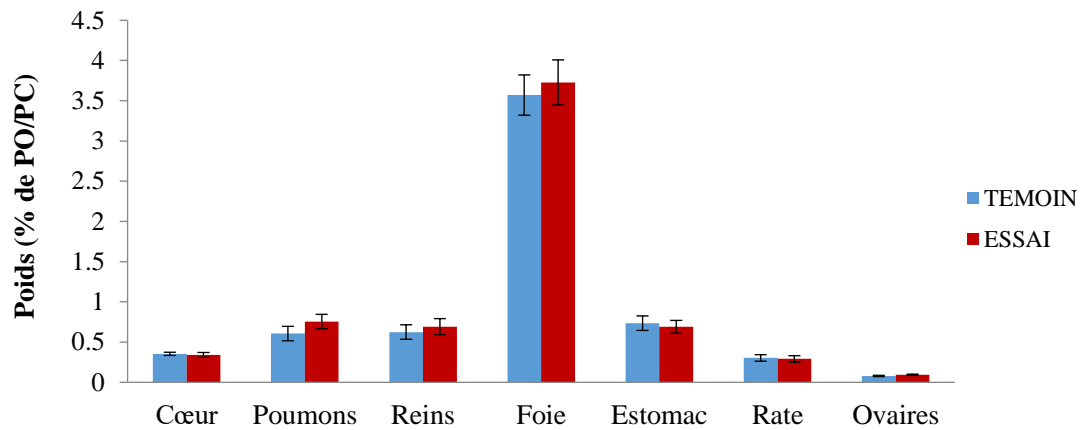


Figure 27: Effet de *Eremomastax speciosa* sur l'évolution du poids corporel en essai aigu

Les points représentent les poids moyens  $\pm$  ESM

##### 3) Effet de *Eremomastax speciosa* sur le poids relatif de quelques organes

La figure 28 illustre les effets de l'extrait sur le poids relatif du cœur, des poumons, des reins, du foie, de l'estomac, de la rate et des ovaires. L'extrait n'a entraîné aucune variation significative des poids relatifs de ces organes par comparaison au lot témoin.



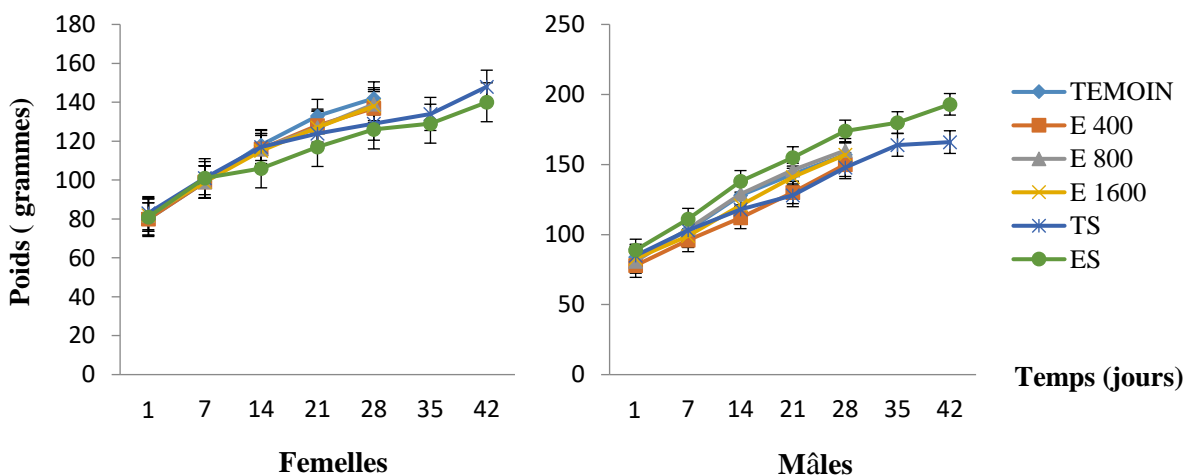
**Figure 28: Effets de *Eremomastax speciosa* sur le poids relatif des organes en essai aigu**

Les colonnes représentent les poids moyens  $\pm$  ESM ; PC = poids corporel ; PO= poids de l'organe

### b) Toxicité subaiguë de *Eremomastax speciosa*

#### 1) Effet de *Eremomastax speciosa* sur l'évolution du poids corporel

La figure 29 représente l'évolution du poids corporel des animaux tout au long de l'expérimentation. Aussi bien chez les femelles que chez les mâles, l'extrait n'a provoqué aucune variation significative du poids corporel par comparaison aux témoins respectifs.



**Figure 29: Effets de *Eremomastax speciosa* sur l'évolution du poids corporel**

E 400 = lot traité à la dose de 400 mg/kg ; E 800 = lot traité à la dose de 800 mg/kg ; E 1600 = lot traité à la dose de 1600 mg/kg ; TS = lot témoin satellite ; ES = lot essai satellite traité à la dose de 1600 mg/kg. Les points représentent les poids moyens  $\pm$  ESM



## 2) Effet de *Eremomastax speciosa* sur le poids relatif de quelques organes

La figure 30 illustre les effets de l'extrait sur le poids relatif de quelques organes. Aussi bien chez les mâles que chez les femelles, l'extrait n'a provoqué aucune variation significative des poids relatifs des organes par comparaison aux témoins respectifs.

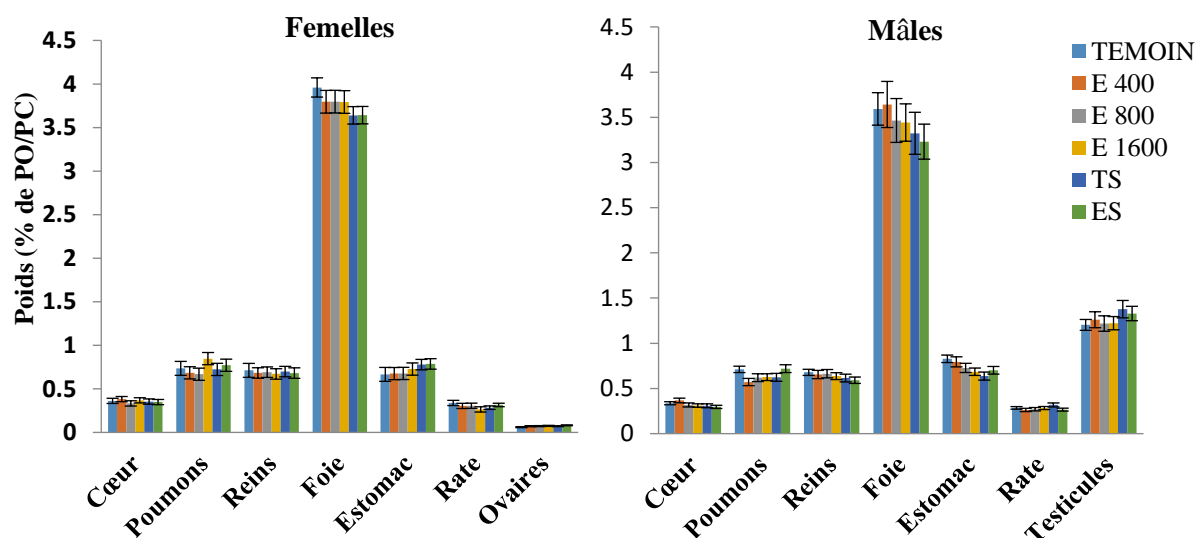


Figure 30: Effets de *Eremomastax speciosa* sur le poids relatif de quelques organes

*E 400* = lot traité à la dose de 400 mg/kg ; *E 800* = lot traité à la dose de 800 mg/kg ; *E 1600* = lot traité à la dose de 1600 mg/kg ; *TS* = lot témoin satellite ; *ES* = lot essai satellite traité à la dose de 1600 mg/kg ; *PC* = poids corporel ; *PO* = poids de l'organe ; Les colonnes représentent les poids moyens  $\pm$  ESM

## 3) Effets de *Eremomastax speciosa* sur quelques paramètres hématologiques

Le tableau XIII représente les effets de l'extrait sur quelques paramètres hématologiques. Une baisse significative ( $p < 0,05$ ) du taux de globules blancs a été observée chez les mâles traités à la dose de 1600 mg/kg, de même qu'une baisse significative ( $p < 0,01$ ) du taux de granulocytes aux doses de 400; 800 et 1600 mg/kg comparativement aux témoins. Le taux de plaquettes a lui aussi connu une baisse significative à la dose de 800 mg/kg par rapport aux témoins. Chez les femelles, le taux de globules blancs a subi une augmentation significative chez les animaux traités aux doses de 400 et 1600 mg/kg ainsi que chez le groupe satellite traité à la dose de 1600 mg/kg, comparativement à leurs témoins respectifs.

**Tableau XIII: Effets de *Eremomastax speciosa* sur quelques paramètres hématologiques**

	Témoin	ES 400	ES 800	ES 1600	Témoin satellite	Essai satellite
<b>FEMELLES</b>						
Globules rouges (10 <sup>6</sup> /μL)	6,57 ± 0,43	6,65 ± 0,34	7,27 ± 0,39	6,72 ± 0,15	7,18 ± 0,26	6,09 ± 0,27
Globules blancs (10 <sup>3</sup> /μL)	9,57 ± 2,45	24,02 ± 6,78**	14,35 ± 2,49	23,80 ± 5,72**	8,92 ± 0,62	18,50 ± 2,33#
Lymphocytes (%)	67,97 ± 3,03	67,12 ± 2,42	64,32 ± 0,89	60,55 ± 6,86	75,70 ± 2,43	69,52 ± 8,69
Monocytes (%)	17,25 ± 0,98	15,40 ± 0,34	16,90 ± 1,17	15,32 ± 1,17	13,47 ± 0,89	12,20 ± 1,36
Granulocytes (%)	14,77 ± 2,18	17,42 ± 2,22	18,75 ± 2,05	24,07 ± 1,18*	10,80 ± 1,74	18,25 ± 5,14#
Plaquettes (10 <sup>3</sup> /μL)	661,00 ± 36,10	498,25 ± 81,65	599,15 ± 103,00	641,45 ± 42,50	656,00 ± 30,00	590,50 ± 50,25
Hémoglobine (g/dL)	10,75 ± 0,73	11,00 ± 0,68	11,42 ± 0,39	11,10 ± 0,31	12,10 ± 0,51	11,72 ± 0,21
Hématocrite (%)	34,20 ± 2,71	33,82 ± 1,65	38,32 ± 2,66	35,07 ± 0,54	35,15 ± 1,48	31,15 ± 0,75
CHCM (g/dL)	31,55 ± 1,11	32,35 ± 0,57	30,10 ± 1,53	31,65 ± 0,49	34,42 ± 0,37	37,65 ± 1,14
HCM (pg)	16,37 ± 0,71	16,25 ± 0,54	15,77 ± 0,65	16,50 ± 0,23	16,85 ± 0,38	19,32 ± 0,70
VCM (fL)	51,75 ± 1,03	51,00 ± 1,00	52,25 ± 1,10	52,00 ± 0,91	48,75 ± 0,75	51,25 ± 1,43
<b>MALES</b>						
Globules rouges (10 <sup>6</sup> /μL)	6,40 ± 0,33	7,30 ± 0,12	6,15 ± 0,84	7,12 ± 0,24	6,60 ± 1,37	6,56 ± 0,32
Globules blancs (10 <sup>3</sup> /μL)	14,50 ± 1,84	10,47 ± 1,98	9,82 ± 2,17	7,90 ± 2,06*	14,27 ± 6,62	15,52 ± 6,93
Lymphocytes (%)	53,55 ± 4,54	69,20 ± 4,04*	65,60 ± 2,10	68,73 ± 2,57	64,12 ± 6,13	72,10 ± 1,02
Monocytes (%)	15,20 ± 0,52	18,40 ± 2,27	19,77 ± 1,08	19,02 ± 1,19	18,97 ± 2,60	13,52 ± 1,73
Granulocytes (%)	31,25 ± 5,07	12,40 ± 1,78**	14,60 ± 1,91**	11,32 ± 0,90**	16,90 ± 3,70	14,37 ± 2,51
Plaquettes (10 <sup>3</sup> /μL)	810,50 ± 143,76	632,05 ± 45,10	561,25 ± 120,65*	739,00 ± 119,45	611,15 ± 86,28	521,00 ± 162,50
Hémoglobine (g/dL)	10,92 ± 0,69	11,82 ± 0,43	10,85 ± 0,67	11,47 ± 0,47	15,92 ± 3,59	11,60 ± 1,44
Hématocrite (%)	34,30 ± 1,79	38,47 ± 0,40	34,32 ± 2,34	37,92 ± 1,29	36,85 ± 7,26	33,25 ± 1,79
CHCM (g/dL)	31,77 ± 0,56	30,72 ± 0,80	31,82 ± 2,06	30,30 ± 0,75	35,70 ± 5,96	33,10 ± 4,36
HCM (pg)	17,05 ± 0,69	16,20 ± 0,43	18,70 ± 2,79	16,12 ± 0,47	21,82 ± 1,89	21,55 ± 2,15
VCM (fL)	53,50 ± 1,25	52,75 ± 0,47	58,00 ± 5,74	53,00 ± 0,40	55,50 ± 5,90	50,75 ± 1,65

*ES 400* = lot traité à la dose de 400 mg/kg d'extrait; *ES 800* = lot traité à la dose de 800 mg/kg d'extrait; *ES 1600* = lot traité à la dose de 1600 mg/kg d'extrait; *CHCM* = concentration en hémoglobine corpusculaire moyen; *HCM* = hémoglobine corpusculaire moyen; *VCM* = volume corpusculaire moyen; \**p* < 0,05 et \*\**p* < 0,01 = différence statistique significative par rapport au témoin; #*p* < 0,05 = différence statistique significative par rapport au témoin satellite; les valeurs du tableau représentent les moyennes ± *ESM*

#### **4) Effets de *Eremomastax speciosa* sur quelques paramètres biochimiques**

Les effets de l'extrait aqueux de *E. speciosa* sur quelques paramètres biochimiques sont représentés dans le tableau XIV. Chez les mâles, aucune différence significative n'a été notée entre les animaux traités à l'extrait et leurs témoins respectifs. Chez les femelles, les taux d'ASAT ont connu une augmentation significative aux doses de 800 et 1600 mg/kg, de même que le taux de bilirubine totale à toutes les doses testées. Cette augmentation du taux de bilirubine n'a toutefois pas persisté chez les femelles du lot satellite traité à l'extrait.

**Tableau XIV: Effets de *Eremomastax speciosa* sur quelques paramètres biochimiques**

	Témoïn	ES 400	ES 800	ES 1600	Témoïn satellite	Essai satellite
<b>FEMELLES</b>						
ALAT (U/L)	69,95 ± 7,71	69,12 ± 8,02	58,52 ± 8,68	61,00 ± 10,66	63,67 ± 7,21	50,50 ± 6,18
ASAT (U/L)	112,70 ± 17,32	134,49 ± 14,64	209,50 ± 19,11*	211,84 ± 18,48*	137,00 ± 13,62	193,25 ± 11,07
Cholestérol total (mg/dL)	111,00 ± 10,28	122,56 ± 10,82	138,56 ± 6,73	126,00 ± 4,94	119,31 ± 10,89	131,60 ± 5,43
Triglycérides (mg/dL)	102,90 ± 9,64	113,80 ± 10,68	95,52 ± 8,71	127,18 ± 11,37	71,34 ± 9,37	100,96 ± 6,06
HDL-Cholestérol (mg/dL)	66,96 ± 5,65	79,08 ± 6,08	85,15 ± 6,08	81,26 ± 9,21	84,84 ± 8,02	76,96 ± 7,64
LDL-Cholestérol (mg/dL)	23,46 ± 4,22	20,72 ± 3,87	34,31 ± 6,35	19,30 ± 3,45	20,20 ± 3,98	34,45 ± 5,18
Créatinine sérique (mg/dL)	0,48 ± 0,07	0,59 ± 0,06	0,44 ± 0,06	0,34 ± 0,05	0,58 ± 0,08	0,39 ± 0,07
Urée (mg/dL)	47,00 ± 7,52	61,50 ± 8,38	60,00 ± 10,67	62,50 ± 9,67	55,25 ± 7,33	44,00 ± 4,60
Bilirubine totale (mg/dL)	2,08 ± 0,49	4,27 ± 0,96*	5,21 ± 1,10*	4,84 ± 1,79*	2,76 ± 0,07	3,49 ± 1,03
Protéïnes totales (g/dL)	8,12 ± 1,78	8,15 ± 1,55	8,40 ± 2,07	8,45 ± 1,98	7,43 ± 1,32	8,51 ± 1,77
<b>MALES</b>						
ALAT (U/L)	63,60 ± 9,54	58,65 ± 12,15	47,65 ± 7,66	52,25 ± 14,29	53,72 ± 12,24	67,45 ± 9,71
ASAT (U/L)	117,33 ± 14,84	143,54 ± 13,43	129,21 ± 13,89	133,70 ± 10,90	116,52 ± 9,76	155,23 ± 11,02
Cholestérol total (mg/dL)	117,76 ± 10,42	129,00 ± 11,21	118,40 ± 6,59	135,52 ± 8,83	115,25 ± 4,99	132,68 ± 15,02
Triglycérides (mg/dL)	92,81 ± 6,78	116,01 ± 8,13	114,55 ± 10,82	84,07 ± 5,74	83,99 ± 9,02	123,00 ± 13,04
HDL-Cholestérol (mg/dL)	66,36 ± 2,78	76,96 ± 8,31	52,11 ± 6,85	72,41 ± 5,41	73,03 ± 4,05	85,45 ± 3,91
LDL-Cholestérol (mg/dL)	32,83 ± 6,43	28,83 ± 5,85	43,38 ± 7,99	46,30 ± 7,32	25,42 ± 4,23	22,63 ± 4,05
Créatinine sérique (mg/dL)	0,71 ± 0,13	0,62 ± 0,10	0,52 ± 0,07	0,57 ± 0,08	0,52 ± 0,05	0,47 ± 0,08
Urée (mg/dL)	51,60 ± 6,40	47,25 ± 7,09	67,40 ± 7,01	38,50 ± 2,50	49,00 ± 6,97	38,00 ± 6,68
Bilirubine totale (mg/dL)	2,57 ± 0,41	2,85 ± 0,89	3,08 ± 0,36	3,18 ± 0,26	2,66 ± 0,50	3,84 ± 0,50
Protéïnes totales (g/dL)	7,08 ± 1,12	9,34 ± 2,05	7,07 ± 1,08	5,85 ± 1,33	6,57 ± 1,12	8,18 ± 2,03

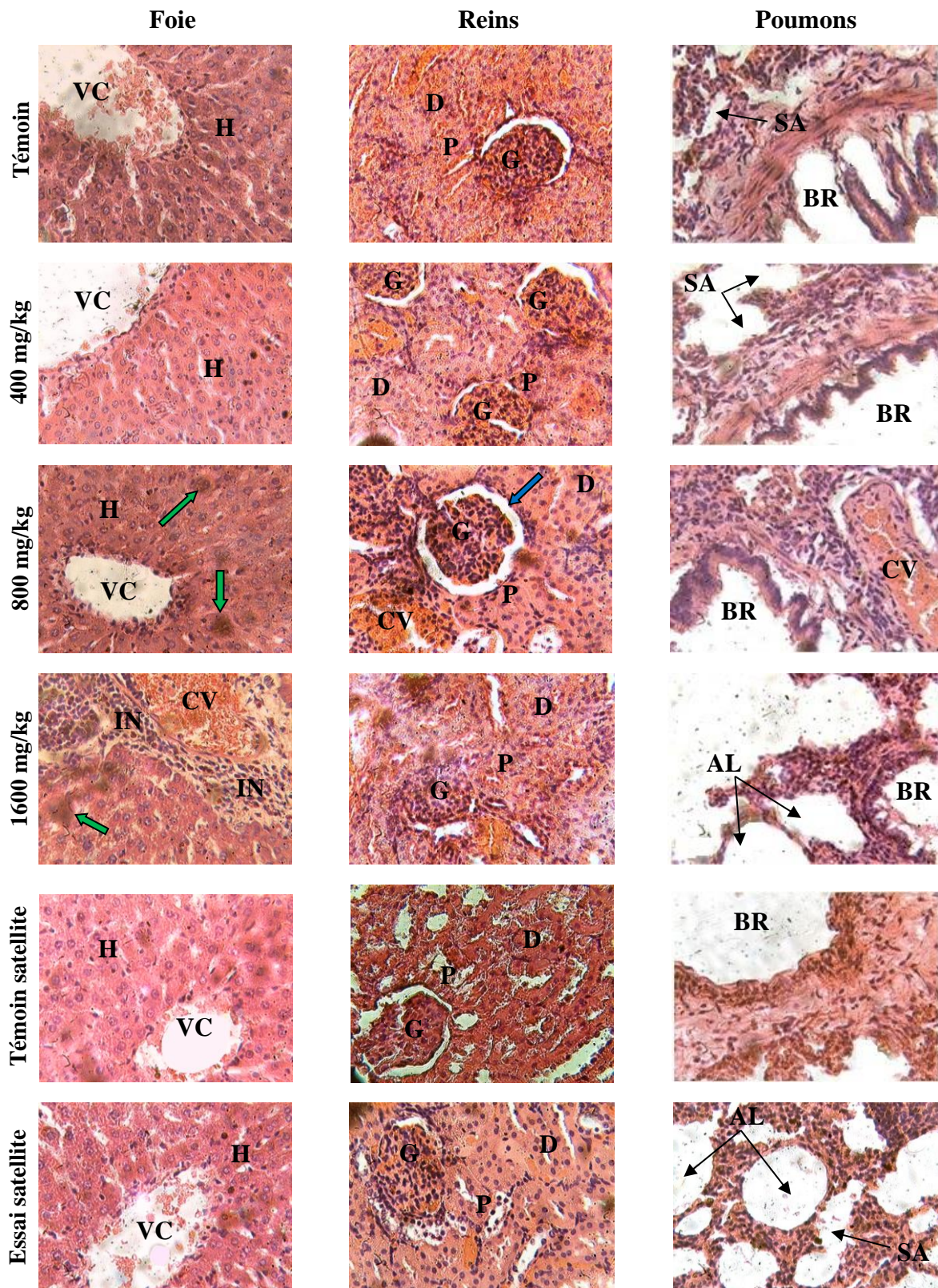
*ES 400* = lot traité à la dose de 400 mg/kg d'extrait; *ES 800* = lot traité à la dose de 800 mg/kg d'extrait; *ES 1600* = lot traité à la dose de 1600 mg/kg d'extrait; \**p* < 0,05 = différence statistique significative par rapport au témoin ; les valeurs du tableau représentent les moyennes ± ESM

## 5) Effets de *Eremomastax speciosa* sur la structure histologique de quelques organes



### • Chez les femelles

La figure 31 représente les microphotographies des coupes histologiques des foies, reins et poumons chez les femelles. Concernant les témoins respectifs, les foies ont révélé une architecture normale avec des hépatocytes et des veines centro-lobulaires intacts. Les reins des lots témoins ont présenté des glomérules distincts et délimités par l'espace de Bowman. Les poumons ont présenté une structure normale avec des alvéoles, des sacs alvéolaires et des bronchioles tapissées d'un épithélium.

Chez les animaux traités à l'extrait, quelques anomalies ont été décelées. Au niveau du foie, la présence de foyers inflammatoires a été notée chez deux femelles traitées à la dose de 800 mg/kg. Deux femelles et un mâle traités à la dose de 1600 mg/kg ont présenté des congestions vasculaires ainsi que des signes d'inflammation avec une présence accrue de leucocytes. Une femelle traitée à la dose de 400 mg/kg, une autre traitée à la dose de 800 mg/kg et deux femelles traitées à la dose de 1600 mg/kg ont présenté des stases biliaires. Les animaux du lot satellite traités à la dose de 1600 mg/kg présentaient une architecture normale. Au niveau des reins, une réduction de l'espace de Bowman a été observée chez deux femelles traitées à la dose de 1600 mg/kg. Deux femelles traitées à la dose de 1600 mg/kg ont présenté des congestions vasculaires. La réduction de l'espace de Bowman a persisté chez deux femelles du lot satellite traité à l'extrait. Concernant les poumons, deux femelles traitées à la dose de 1600 mg/kg ont révélé des alvéoles pulmonaires très développées qui finissaient par fusionner entre elles. Des congestions vasculaires ont été observées chez une femelle traitée à la dose de 800 mg/kg ainsi que chez deux autres traitées à la dose de 1600 mg/kg. La présence d'alvéoles pulmonaires très développées a persisté chez deux animaux du lot satellite traité à l'extrait.



**Figure 31: Effets de *Eremomastax speciosa* sur la structure histologique de quelques organes chez les femelles (H&E ;  $\times 400$ )**

*VC* = Veine centro-lobulaire ; *H* = Hépatocytes ; *IN* = Inflammation ;  = Stase biliaire ; *CV* = Congestion vasculaire ; *G* = Glomérule ; *P* = Tube contourné proximal ; *D* = Tube contourné distal ; *BR* = Bronchiole ; *AL* = Alvéole pulmonaire ; *SA* = Sac alvéolaire ;  = Espace de Bowman

- *Chez les mâles*

La figure 32 représente les microphotographies des coupes histologiques des foies, reins et poumons chez les mâles. Tout comme chez les femelles, les organes des groupes témoins respectifs ont révélé des structures saines et une architecture normale.

Chez les animaux traités à l'extrait, quelques anomalies ont été décelées. Un mâle traité à la dose de 1600 mg/kg a présenté une congestion vasculaire associé à un foyer inflammatoire au niveau du foie. Les animaux du lot satellite traités à l'extrait présentaient une architecture normale. Concernant les reins, une réduction de l'espace de Bowman a été observée chez deux mâles traités à la dose de 1600 mg/kg. Les reins des animaux du groupe satellite traité à l'extrait ne présentaient aucune anomalie. Un mâle traité à la dose de 800 mg/kg ainsi que deux autres traités à la dose de 1600 mg/kg ont révélé des alvéoles pulmonaires très développées fusionnant entre elles. La présence de ces alvéoles très développées a persisté chez deux mâles du groupe satellite traité à l'extrait.

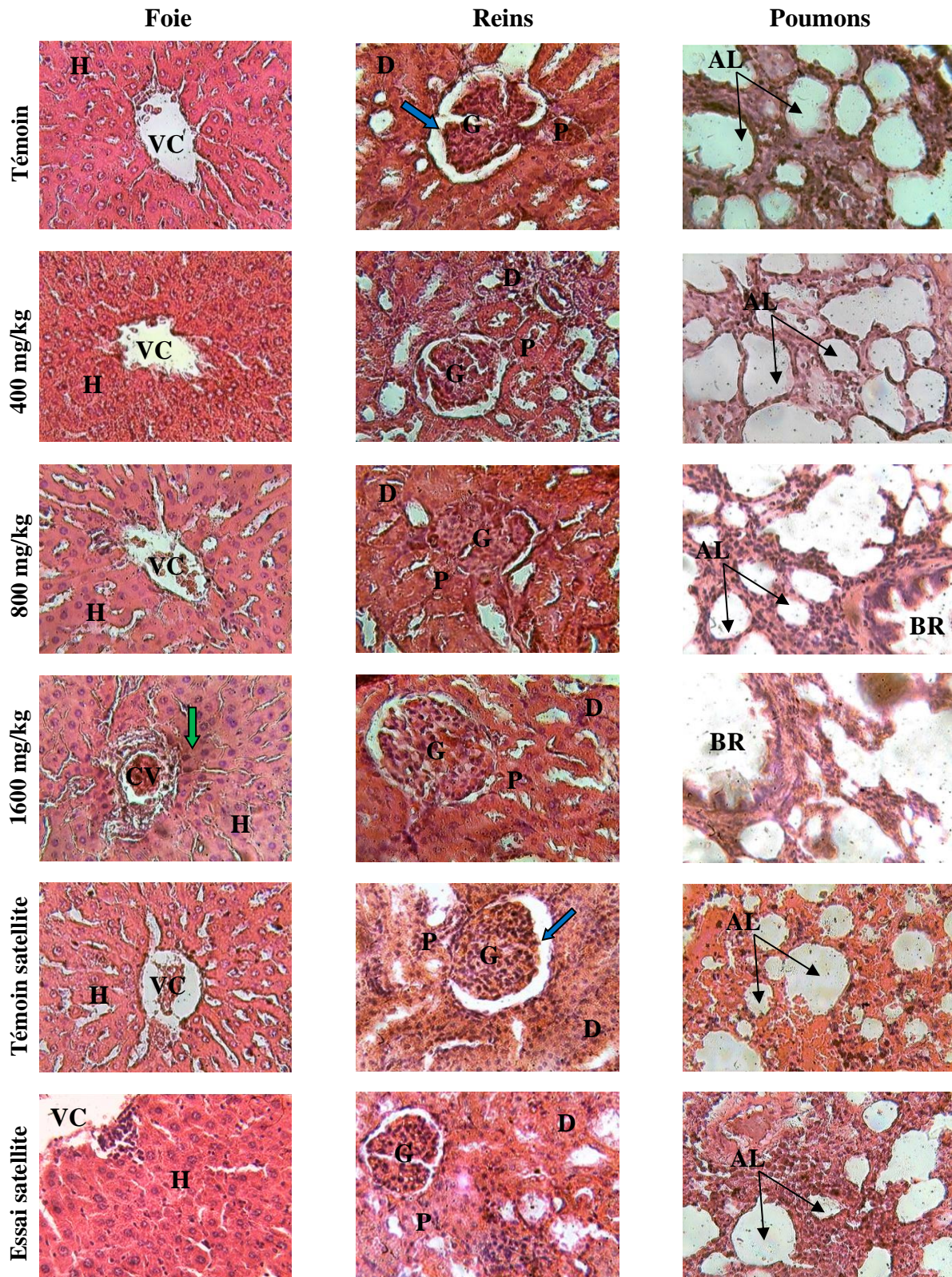




Figure 32: Effets de *Eremomastax speciosa* sur la structure histologique de quelques organes chez les mâles (H&E ;  $\times 400$ )

VC = Veine centro-lobulaire ; H = Hépatocytes ; G = Glomérule ;  = Stase biliaire ; CV = Congestion vasculaire ; P = Tube contourné proximal ; D = Tube contourné distal ; BR = Bronchiole ; AL = Alvéole pulmonaire ; SA = Sac alvéolaire ;  = Espace de Bowman



### III.2- DISCUSSION

L'activité anti-*Helicobacter pylori in vitro* de l'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* a été testée par la méthode de l'AlamarBlue®. La CMI a été évaluée à 8 mg/mL et la CMB était supérieure à 32 mg/mL, classant ainsi l'extrait comme bactériostatique. Les techniques de microscopie électronique à balayage et de microscopie à force atomique ont permis de visualiser cet effet antibactérien. L'extrait, au contact des bactéries *in vitro*, a provoqué des altérations importantes de leur morphologie ce qui suggère que l'extrait agirait par action directe sur la paroi bactérienne. Toutefois, il est connu que des résultats antibactériens concluants *in vitro* contre *H. pylori* n'impliquent pas forcément le même succès *in vivo*. Cette divergence entre des résultats *in vitro* et *in vivo* peut s'expliquer par les différences importantes entre les conditions *in vitro* et l'environnement *in vivo* sujet à des processus physiologiques complexes. L'un des facteurs responsables de cette différence est le faible pH dans l'estomac qui inhibe l'action antibactérienne de plusieurs médicaments (Cellini *et al.*, 1996). Ainsi, les études *in vivo* sont indispensables pour établir fidèlement l'action anti-*Helicobacter pylori* d'un médicament. L'administration quotidienne de *E. speciosa* pendant 7 jours a réduit la charge bactérienne stomacale chez les souris préalablement infectées, avec des baisses significatives aux doses de 200 et 400 mg/kg confirmant ainsi les résultats obtenus *in vitro*, et partant, l'activité anti-*Helicobacter pylori* de l'extrait.

L'effet curatif de l'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* a été testé, sur des rats préalablement infectés à *H. pylori*, grâce au modèle d'ulcère chronique induit par injection d'acide acétique. Ce modèle d'ulcère chronique offre de nombreux avantages parmi lesquels ; la simplicité de la procédure d'induction, la bonne reproductibilité des ulcères obtenus, ainsi que la très grande similarité de ce type d'ulcère avec ceux développés par les humains en termes de caractéristiques pathologiques et de mécanismes de guérison (Okabe et Amagase, 2005). L'administration de *E. speciosa* pendant 14 jours a accéléré la guérison des ulcères. Sur le plan macroscopique, l'extrait a provoqué une baisse significative de l'indice d'ulcère ainsi qu'une augmentation significative de la production de mucus aux doses de 200 et 400 mg/kg. Selon Brzozowski *et al.* (1999), l'administration de *H. pylori* chez les rats retarde la guérison des ulcères chroniques induits avec l'acide acétique, ceci à travers des mécanismes impliquants; la réduction de la microcirculation gastrique, la surexpression des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$ ) et la rupture de la balance sérique gastrine/somatostatine. Nos résultats sont en accord avec ce qui précède étant donné que le pourcentage d'autoguérison du groupe témoin longitudinal de l'étude (37,68 %) a été inférieur à celui du même groupe dans l'étude de Amang

*et al.* (2017b) (44,98 %), qui elle n'impliquait pas une infection à *H pylori*. *E. speciosa* a dans le même temps réduit la charge bactérienne stomachale, avec une baisse significative aux doses de 200 et 400 mg/kg.

Le second modèle d'ulcère chronique utilisé a été celui des ulcères dits « difficilement guérissables ». Les ulcères induits par injection d'acide acétique ont été rendus « difficilement guérissables » par des injections répétées d'indométacine. L'indométacine inhibe l'expression de la cyclo-oxygénase (COX), responsable de la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines (PG), ce qui altère la barrière muqueuse, facilite l'action corrosive de la pepsine et de l'acidité gastrique (Vane et Botting, 1998). En outre, l'inhibition de la COX-1 par l'indométacine conduit à une libération importante de l'endothéline 1, un puissant vasoconstricteur capable de provoquer des lésions de la muqueuse gastrique. D'autre part, en inhibant la synthèse des prostaglandines, l'indométacine provoque l'activation des neutrophiles et la libération locale d'espèces réactives de l'oxygène (Whittle, 2002). L'administration d'indométacine provoque également une réduction marquée du débit sanguin muqueux, une baisse de sécrétion du mucus/bicarbonate, une altération de l'agrégation plaquettaire, une réduction du renouvellement des cellules épithéliales et une adhérence accrue des leucocytes (Allen *et al.*, 1993). Tous ces mécanismes concourent à retarder la guérison des ulcères gastriques. *E. speciosa* a provoqué une baisse significative de l'indice d'ulcère à toutes les doses testées, ainsi qu'une augmentation significative de la production de mucus aux doses de 200 et 400 mg/kg. Plusieurs études impliquant concomitamment une infection à *H. pylori* et l'administration des AINS ont été menées avec à la clé des résultats souvent divergents. Graham *et al.* (1991), puis Goggin *et al.* (1993) ont indiqué que l'administration des AINS n'avait aucun effet aggravant sur l'infection à *Helicobacter pylori*. Par contre, Publig *et al.* (1994) ainsi que Santucci *et al.* (1995) ont suggéré que l'association de ces deux facteurs d'agression potentialisait leurs effets respectifs. La charge bactérienne du groupe témoin longitudinal n'a quasiment pas varié selon qu'on soit dans l'un ou l'autre des modèles utilisés lors de notre travail. Ces résultats suggèrent que les injections répétées d'indométacine n'auraient pas d'effet aggravant sur l'infection à *H. pylori*.

Les radicaux libres dérivés du métabolisme de l'oxygène jouent un rôle important dans la pathogenèse et l'entretien de l'ulcère gastrique (Choi *et al.*, 1999). La nécrose résultante de l'injection d'acide acétique provoque une importante libération de radicaux libres qui à leur tour vont générer des lésions gastriques *via* la peroxydation des membranes cellulaires. La colonisation de la muqueuse gastrique par *H. pylori* provoque une inflammation active avec infiltration de neutrophiles au stade aigu de l'infection, puis des macrophages/monocytes,

lymphocytes et cellules du plasma au stade chronique. Ces neutrophiles et macrophages/monocytes produisent une grande quantité de radicaux libres susceptibles de créer des lésions de la muqueuse (Mooney *et al.*, 1991; Davies *et al.*, 1994). De plus, l'implication des radicaux libres tels que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle dans la pathogenèse des lésions ischémiques de la muqueuse gastroduodénale ainsi que dans les modèles d'ulcères gastriques induits par les AINS a été établie (Joseph *et al.*, 1999). De ce fait, tout agent susceptible d'inhiber la génération des espèces réactives de l'oxygène, d'inhiber la peroxydation lipidique ou de stimuler la production d'antioxydants est capable de réduire la formation des ulcères ou d'accélérer le processus de guérison (Rodriguez *et al.*, 2006). *E. speciosa* a globalement augmenté de façon significative la production des antioxydants endogènes quel que soit le modèle d'ulcère chronique utilisé. L'effet curatif de l'extrait pourrait donc, entre autres, être lié à sa capacité à renforcer les défenses antioxydantes de l'estomac.

Le monoxyde d'azote (NO) dilate les muscles lisses vasculaires de plusieurs organes afin d'augmenter le flux sanguin. De ce fait, il a été avancé que si la production de NO est inhibée, la guérison des ulcères sera retardée (Okabe et Amagase, 2005). Konturek *et al.* (1993) ont étudié les effets des inhibiteurs de la NO synthétase (NOs), ainsi que des donneurs exogènes de NO sur la guérison des ulcères gastriques induits par l'acide acétique chez les rats. Les inhibiteurs de la NO synthétase ont significativement retardé la guérison des ulcères, réduit le flux sanguin de la muqueuse gastrique aux abords du cratère ulcéreux et diminué les nombres de capillaires dans le tissu de granulation au niveau du lit de l'ulcère. Ces données confirment que le NO endogène joue un rôle important: dans le maintien du flux sanguin aux alentours de l'ulcère, dans l'angiogenèse à l'intérieur du tissu de granulation et partant, dans la guérison de l'ulcère. Le NO inhibe le recrutement de neutrophiles au site de l'inflammation, ainsi que leur infiltration dans la muqueuse gastrique (Miller et Sandoval, 1999). Le NO diminue également la sécrétion d'acide gastrique par inhibition de la libération d'histamine à partir des cellules enterochromaffine-like (Freitas *et al.*, 2004). *E. speciosa* a induit une augmentation significative du taux de nitrites, un dérivé stable du métabolisme du NO, à toutes les doses testées indépendamment du modèle d'ulcère utilisé. Ces résultats suggèrent que l'effet curatif de *E. speciosa* pourrait aussi être dû à sa capacité à améliorer le flux sanguin et favoriser l'angiogenèse via l'augmentation de la production de NO. D'autre part, le NO produit exerce dans la cellule émettrice et dans son environnement une action antivirale, antibactérienne et antiparasitaire (Crépel et Lemaire, 1995). Ceci pourrait être l'un des mécanismes d'action par lequel l'extrait exerce son activité anti-*Helicobacter pylori in vivo*.

Les coupes histologiques d'estomacs, après coloration à l'hématoxyline-éosine, nous ont permis d'apprécier les aspects microscopiques liés à l'étendue des ulcères. Après induction de l'ulcère gastrique avec l'acide acétique, les groupes témoins (transversal et longitudinal) ont révélé: une destruction épithéliale avancée, une désorganisation du tissu gastrique, la présence d'œdèmes ainsi que des infiltrations leucocytaires, ces éléments étant caractéristiques d'un ulcère gastrique chronique. L'action réparatrice de *E. speciosa* a été illustrée par une régénération glandulaire, une disparition progressive des œdèmes et infiltrations leucocytaires, et une normalisation dose-dépendante des différentes couches de l'estomac. Selon Amagase *et al.* (2003), sur le plan histologique, des degrés plus importants de fibroses et d'accumulation de neutrophiles, couplés à une baisse de l'angiogenèse sont observés chez l'ulcère gastrique « difficilement guérissable » comparativement aux ulcères gastriques induits par l'acide acétique. Il a donc été conclu que la fibrose sévère, la persistance de l'infiltration de neutrophiles ainsi que la mauvaise angiogenèse dans le lit de l'ulcère sont des facteurs impliqués dans l'installation de l'ulcère « difficilement guérissable ». De plus, il est possible que la réduction du niveau de prostaglandines au niveau de la surface ulcérée et/ou l'interférence avec les facteurs de croissance (bFGF, PDGF, TGF, etc.) qui stimulent l'angiogenèse, soient les mécanismes sous-jacents associés au retardement de la guérison de l'ulcère par l'indométacine (Brzozowski *et al.*, 2001). *E. speciosa* a accéléré la guérison de l'ulcère, de façon dose-dépendante chez les deux modèles utilisés, avec à chaque fois un retour à la quasi normalité du tissu gastrique. L'extrait agirait par stimulation de la production de prostaglandines et donc de mucus, ce qui faciliterait la re-épithélialisation du lit de l'ulcère, mais aussi par stimulation des facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse, favorisant de ce fait l'établissement de nouveaux vaisseaux sanguins ainsi que les apports nutritifs y relatifs. Les sections d'estomacs colorées au Giemsa nous ont fourni une illustration claire de la présence de *H. pylori* dans le tissu gastrique. L'extrait a réduit de façon visible la colonisation bactérienne de l'épithélium dans les deux modèles d'ulcères utilisés. Ces résultats confirment ceux obtenus par quantification de la charge bactérienne stomacale.

L'activité pharmacologique d'une plante médicinale étant liée à sa teneur en composés bioactifs, l'étude phytochimique de ces plantes s'avère donc indispensable pour la compréhension des effets biologiques observés. Le criblage phytochimique de l'extrait aqueux des feuilles de *Eremomastax speciosa* par GC-MS, a révélé la présence de 22 composés, dont plusieurs ayant des propriétés pharmacologiques déjà démontrées. Le tétra-décanoate de méthyle, un composé entrant dans la fabrication des dentifrices et des déodorants, posséderait un effet décongestionnant (Duke, 2000). L'acide octadécanoïque ou acide stéarique est l'un

des acides gras les plus abondants chez les animaux et les plantes. Il est également un constituant majeur des beurres, huiles et laitages. Ce composé possède des effets anti-inflammatoire et hépatoprotecteur (Hashemi *et al.*, 2016). L'activité anti-inflammatoire de l'acide hexadécanoïque a également déjà été démontrée (Aparna *et al.*, 2012). Les effets anticancéreux et vasorelaxant de l'iso-allocholate d'éthyle ont été reportés (Duke, 2000). Cette liste non exhaustive d'effets pharmacologiques, associés aux composés retrouvés dans l'extrait étudié, pourrait expliquer la multitude d'usages de *E. speciosa* en médecine traditionnelle. Par ailleurs, ces résultats sont en accord avec ceux de Amang *et al.* (2014a) qui ont révélés la présence de plusieurs classes de composés dans l'extrait aqueux de *E. speciosa*, parmi lesquels; les phénols, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les terpènes et les huiles dont sont majoritairement issus les composés identifiés dans cette étude.

Parmi les composés recensés dans l'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* par GC-MS, deux ont particulièrement retenu notre attention. Il s'agit de la  $\alpha$ -amyrine (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O) et de la  $\beta$ -amyrone (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O), deux triterpènes pentacycliques possédant de nombreuses propriétés pharmacologiques avérées. La lipophilicité étant un paramètre important à prendre en compte lors du développement des agents antimicrobiens, elle est d'autant plus élevée que la chaîne de carbone est longue. Les molécules possédant une chaîne de carbone supérieure à C-10 sont assez lipophiles et de ce fait sont de bons candidats pour les évaluations pharmacologiques. De plus, le coefficient de partition (log P), qui est un important indice de lipophilicité, est un paramètre physico-chimique essentiel lors de la mise sur pied des molécules antibactériennes étant donné qu'il est étroitement lié à la perméabilité à travers la membrane lipidique des bactéries (Tokuyama *et al.*, 2001). Mallavadhani *et al.* (2004) ont démontré l'action bactéricide de la  $\alpha$ -amyrine contre deux bactéries Gram négatif. Les bactéries testées étaient *Escherichia coli* et *Pseudomonas syringae*, avec des CMI respectives de 95 et 50  $\mu\text{g/mL}$ . La  $\beta$ -amyrine, un isomère de la  $\alpha$ -amyrine, a également révélé de bonnes propriétés antibactériennes contre trois bactéries Gram négatif à savoir: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhi*, avec des CMI respectives de 97; 97 et 95  $\mu\text{g/mL}$  (Hichri *et al.*, 2003). La  $\beta$ -amyrone a démontré une très forte activité antifongique contre *Candida albicans* avec une CMI de 8  $\mu\text{g/mL}$  (Ata *et al.*, 2011). Bourjot *et al.* (2012) ont, pour leur part, rapporté l'effet antiviral de la  $\beta$ -amyrone contre le virus à Chikungunya. L'acide 3 O-acétylaleuritolique, un autre triterpène pentacyclique, a été isolé à partir de l'extrait au méthanol/chlorure de méthylène (2v/v) des feuilles de *E. speciosa* (Ouamba, 2015). L'activité antiplasmodiale de ce composé a été établie contre deux souches de *Plasmodium falciparum* (Hadi *et al.*, 2013). Nyasse *et al.* (2006) ont, par ailleurs, démontré les propriétés antifilariennes de l'acide 3 O-acétyl

aleuritologique contre les vers mâles adultes de *Onchocerca gutturosa*. L'analyse générale des relations entre la structure chimique et l'activité bactéricide des triterpènes indique que les propriétés antibactériennes des triterpènes pourraient être liées à la présence d'un groupement oxygéné à la position C-3, étant donné que 95 % des triterpènes bactéricides possèdent ce groupement (Pacheco *et al.*, 2012). La  $\alpha$ -amyrine et la  $\beta$ -amyrone possédant tous les deux ce groupement, ces données suggèrent que l'activité anti-*Helicobacter pylori* de l'extrait pourrait être liée à la présence de ces deux composés. Le mélange  $\alpha/\beta$ -amyrine a montré des effets protecteurs contre les ulcères gastriques induits par l'éthanol absolu chez les souris (Oliveira *et al.*, 2004). Li *et al.* (2015) ont établi les propriétés cytoprotectrices de la  $\delta$ -amyrone, un isomère de la  $\beta$ -amyrone, contre les ulcères gastriques induits par l'éthanol chez les souris. La  $\delta$ -amyrone a agi à travers des mécanismes impliquant l'augmentation de la sécrétion de mucus et l'inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-6). Sánchez *et al.* (2006) ont démontré les propriétés cytoprotectrices de l'acide oléanolique, un dérivé de la  $\alpha$ -amyrine, contre les ulcères gastriques induits par le mélange HCl/éthanol chez les souris. Dans ladite étude, l'acide oléanolique a prévenu l'endommagement des cellules épithéliales gastriques humaines par le taurocholate de sodium et induit une augmentation significative de la production de prostaglandines *in vitro*. L'acide oléanolique et plusieurs de ses dérivés ont révélé leurs propriétés cytoprotectrices contre les modèles d'ulcères gastriques induits par : ligature du pylore, aspirine et éthanol absolu chez les rongeurs (Astudillo *et al.*, 2002). Rodriguez *et al.* (2003) ont également établi les propriétés curatives de l'acide oléanolique contre les ulcères gastriques induits par l'acide acétique chez les rats. De ces données, il ressort que ce dérivé de la  $\alpha$ -amyrine possède des effets cytoprotecteur, antisécrétoire et curatif, tout comme l'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa*. Au vu de tout ce qui précède, la  $\alpha$ -amyrine et la  $\beta$ -amyrone seraient responsables, au moins partiellement, des propriétés anti-*Helicobacter pylori* et antiulcéreuse de l'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa*, étant donné que ces deux molécules représentent plus de 40 % (en abondance) des composés identifiés dans l'extrait par GC-MS. Ces composés agiraient en synergie, pour conférer les propriétés pharmacologiques susmentionnées à la plante, sous leur forme primaire et/ou sous forme de composés dérivés obtenus après métabolisation de l'extrait.

Après les effets pharmacologiques démontrés tout au long de cette étude, il est apparu opportun de vérifier l'innocuité de l'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa*. Ainsi, des tests de cytotoxicité, puis de toxicité *in vivo* ont été réalisés. La cytotoxicité de l'extrait a été évaluée vis-à-vis des larves de *Artemia salina* et sur des lignées cellulaires saine (fibroblastes de souris) et cancéreuse (cellules cancéreuses humaines du colon). Le test sur larves d'artémies est une

méthode simple, rapide et peu coûteuse d'évaluation de l'innocuité des extraits de plantes. De plus, les résultats obtenus ont une bonne corrélation avec les propriétés cytotoxiques et anticancéreuses (Baravalia *et al.*, 2012). *E. speciosa* a provoqué la mort des larves de façon concentration-dépendante, avec 20 % de décès à la concentration de 1000 µg/mL. La CL<sub>50</sub> a donc été estimée supérieure à 1000 µg/mL, ce qui classe l'extrait comme étant non toxique (Meyer *et al.*, 1982). *E. speciosa* a également inhibé la prolifération des deux lignées cellulaires testées de façon concentration-dépendante. Toutefois, l'extrait n'a pas atteint 50 % d'inhibition après 48 heures, quelle que ce soit la lignée cellulaire testée. D'après Gad (2009), un produit avec une CI<sub>50</sub> supérieure à 1000 µg/mL sera considéré comme potentiellement non toxique. De ces tests de cytotoxicité, il ressort que l'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* n'aurait pas d'effet anticancéreux et serait non toxique pour les cellules saines.

L'administration orale d'une dose unique de 2000 mg/kg d'extrait n'a entraîné aucun trouble du comportement et toutes les rates traitées ont survécu durant les 14 jours d'observation qui ont suivi l'administration de l'extrait. L'évolution des poids corporels des animaux traités à l'extrait n'a pas montré de différence significative comparativement aux témoins. Il en a été de même pour les poids relatifs des organes prélevés. Avec une DL<sub>50</sub> supérieure à 2000 mg/kg et suivant les recommandations de l'OCDE (OCDE, 2001), l'extrait peut donc être classé dans la catégorie 5 du système de classification globalement harmonisé (SGH), catégorie correspondant aux substances faiblement ou pas toxiques.

En essai subaigu, l'administration orale répétée de l'extrait n'a entraîné aucune variation significative des poids corporels des animaux des deux sexes traités comparativement à leurs témoins respectifs. De même, aucune différence significative n'a été notée entre les poids relatifs des organes des animaux traités à l'extrait et ceux de leurs témoins respectifs, ce qui suggère que l'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* présenterait de faibles risques de toxicité.

Le sang est le principal moyen de transport de plusieurs médicaments et xénobiotiques dans l'organisme et pour cette raison les principaux constituants du sang (globules rouges, globules blancs, hémoglobine et plaquettes) sont exposés à des concentrations significatives de substances toxiques. L'analyse des paramètres sanguins fournit des données importantes sur une possible atteinte du système hématopoïétique et a une grande valeur prédictive de la toxicité chez les humains (jusqu'à 91 % de concordance) lorsque les essais sont effectués sur des rongeurs (Olson *et al.*, 2000). Les analyses hématologiques ont révélé chez les rats mâles une baisse significative du taux de globules blancs à la dose de 1600 mg/kg, du taux de granulocytes à toutes les doses et du taux de plaquettes à la dose de 800 mg/kg. Le taux de

globules blancs des femelles a subi une augmentation significative chez les animaux traités aux doses de 400 et 1600 mg/kg ainsi que chez le groupe satellite traité à la dose de 1600 mg/kg comparativement à leurs témoins respectifs. Ces fluctuations concernant certains éléments figurés du sang n'étaient pas dose-dépendantes et différaient en fonction des sexes, ce qui suggère que les hormones sexuelles pourraient être impliquées. En effet, la progestérone stimule les cellules T helpers 2 (responsables du déclenchement de la production d'anticorps) et inhibe les cellules T helpers 1 (qui secrètent les cytokines pro-inflammatoires et promeuvent la réponse immunitaire à médiation cellulaire). D'autre part, la testostérone possède des effets anti-inflammatoires et exerce des effets immunosuppresseurs sur plusieurs modèles animaux de maladies auto-immunes (Whitacre *et al.* 1999). Ces différences pourraient donc être dues à l'action de certains composés présents dans l'extrait et capables d'interagir avec les hormones sexuelles pour maximiser les effets de ces dernières sur le système immunitaire.

L'analyse de l'activité de certaines enzymes hépatiques (ASAT et ALAT) dans le sérum sert d'indicateur pour divers désordres pouvant affecter le tissu hépatique après exposition à certains agents pharmacologiques (Al-Hashem, 2009). L'ASAT est localisée à environ 80 % dans les mitochondries au niveau de plusieurs organes (foie, reins, cœur et pancréas), alors que l'ALAT est principalement localisée dans le cytosol des hépatocytes. L'ALAT est donc considéré comme étant un marqueur quantitatif des dommages hépatiques plus sensible que l'ASAT (Hilaly *et al.* 2004). L'augmentation significative du taux d'ASAT observée chez les femelles traitées aux doses de 800 et 1600 mg/kg pourrait ainsi être le signe de dommages touchant le foie et/ou d'autres organes.

La bilirubine est un produit de la dégradation de l'hémoglobine dans la rate, le foie et la moelle osseuse Sa concentration sérique reflète la capacité du foie à la métaboliser et la sécréter dans la bile. Une augmentation de la concentration sérique ou tissulaire de bilirubine pourrait être le résultat d'une hémolyse accrue ou d'une altération hépatique (hépatite, obstruction du canal biliaire) (Shatoor, 2011). L'augmentation significative du taux de bilirubine totale chez les femelles traitées à toutes les doses suggère que l'extrait pourrait avoir des effets néfastes sur les conduits biliaires. Par ailleurs, les niveaux élevés de bilirubine associés à un taux normal d'ALAT sont les signes cliniques d'une cholestase (Singh *et al.* 2011). En effet, les coupes histologiques de foie ont révélé la présence de foyers inflammatoires, de congestions vasculaires et de stases biliaires. Toutefois, les niveaux sériques d'ASAT et de bilirubine totale sont revenus à la normale chez les femelles du groupe satellite traité à l'extrait, ce qui suggère que les potentiels dommages hépatiques causés par l'extrait seraient transitoires et réversibles après arrêt du traitement. Les marqueurs biochimiques des



fonctions rénale (urée, créatinine) et cardiovasculaire (profil lipidique) n'ont pas connu de variation significative chez tous les groupes traités à l'extrait, par comparaison à leurs témoins respectifs. L'extrait n'aurait donc pas d'effets néfastes sur la fonction rénale ainsi que sur les facteurs de risques cardiovasculaires.

L'examen histopathologique a permis de déceler certaines anomalies au niveau des organes étudiés. Une réduction de l'espace glomérulaire, s'apparentant à une hyperplasie mésangiale avec prolifération extra-capillaire, a été observée chez deux femelles et deux males (à la dose de 1600 mg/kg). En effet, les glomérules jouent une variété de rôles critiques dans le maintien de l'homéostasie parmi lesquels l'ultrafiltration du plasma, la régulation de la pression sanguine et le maintien de la balance électrolytique. Les dommages glomérulaires causés par des toxiques peuvent affecter les autres segments du néphron et potentiellement conduire à une perte de fonction de ce dernier (Robertson, 1998). A l'exception de l'hyperplasie mésangiale qui a persisté chez deux femelles du lot satellite traité à l'extrait, aucun dommage tissulaire irréversible n'a été décelé au niveau du rein. Les coupes histologiques des poumons de certains animaux traités à la dose de 1600 mg/kg ont révélé la présence d'alvéoles pulmonaires très développées, pouvant être le signe d'un emphysème. Les emphysèmes se manifestent de façon histopathologique par une compression des structures alvéolaires aboutissant à la fusion des sacs alvéolaires voisins. Les dommages causés par un emphysème sont irréversibles et aboutissent à des "trous" permanents dans les tissus des lobes inférieurs des poumons (Tan *et al.* 2007). Ceci pourrait expliquer la présence d'alvéoles très développées chez les animaux du lot satellite traité à l'extrait en comparaison des alvéoles observés chez les animaux du lot témoin satellite. Ces résultats suggèrent que l'administration répétée de fortes doses d'extrait (1600 mg/kg) pourraient causer des dommages tissulaires irréversibles au niveau des reins et des poumons.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

A l'issue de cette étude dont l'objectif général était d'évaluer le profil de toxicité et les effets curatifs de l'extrait aqueux des feuilles de *Eremomastax speciosa* sur les ulcères gastriques chroniques impliquant une infection à *Helicobacter pylori* chez des rongeurs, il ressort que:

- ♣ l'extrait a inhibé la prolifération de *Helicobacter pylori in vitro* et l'a éradiqué *in vivo*;
- ♣ l'extrait a accéléré la guérison des ulcères chroniques associés à une infection à *Helicobacter pylori* indépendamment de l'administration d'indométacine et ce par des mécanismes impliquants entre autres l'augmentation de la sécrétion de mucus et le renforcement des défenses antioxydantes de l'estomac;
- ♣ la  $\alpha$ -amyrine et la  $\beta$ -amyrone, deux composés constituant plus de 40 % des composés détectés dans l'extrait seraient responsables, en partie, des effets anti-*Helicobacter pylori* et curatifs de *E. speciosa* démontrés au cours de cette étude;
- ♣ l'extrait ne serait pas cytotoxique et son administration prolongée à la dose thérapeutique (200 mg/kg) ne serait pas nocif pour l'organisme.

## **RECOMMANDATION**

Au vu des résultats du présent travail ainsi que des travaux précédents menés sur les extraits de *Eremomastax speciosa*, la plante possède des propriétés antiulcéreuses intéressantes. Toutefois, la prise de l'extrait aqueux des feuilles de *Eremomastax speciosa* de façon chronique est déconseillée aux personnes hypotendues ceci en raison de l'effet potentialisateur de l'extrait sur la production de monoxyde d'azote.

## PERSPECTIVES

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail apportent une caution scientifique supplémentaire à l'usage thérapeutique de *Eremomastax speciosa* pour le traitement des ulcères gastriques. Des études supplémentaires nécessaires à l'approfondissement de ce travail sont envisagées et pourraient s'orienter vers les points suivants:

- réaliser l'étude phytochimique de l'extrait par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse;
- évaluer les effets de la  $\alpha$ -amyrine et la  $\beta$ -amyrone sur des modèles expérimentaux d'ulcères chroniques, puis sur des modèles expérimentaux d'ulcères chroniques couplés à une infection à *Helicobacter pylori*;
- préparer, puis évaluer les effets anti-*Helicobacter pylori* et antiulcéreux d'une formulation à base d'extrait aqueux des feuilles de *E. speciosa* enrichi à la  $\alpha$ -amyrine et la  $\beta$ -amyrone;
- réaliser un essai clinique en vue de la mise sur pied d'un médicament traditionnel amélioré (MTA).

## **REFERENCES**

- Ader JL, Carré F, Dinh-Xuan AT, Duclos M, Kubis N, Mercier J, Mion F, Préfaut C, Roman S.** (2006). "Physiologie". 2<sup>e</sup> Edition Masson. 464 pages.
- Adjanohoun JE, Aboubakar N, Dramane K, Ebot ME, Ekpere JA, Enow-Orock EG, Focho D, Gbile ZE, Kamanyi A, Kamsu Kom J, Keita A, Mbenkum T, Mbi CN, Mbiele AL, Mbome IL, Miburu NK, Nancy WL, Nkongmeneck B, Satabie B, Sofowora A, Tamze V, Wirmum CK.** (1996). "Traditional Medicine and Pharmacopoeia: Contribution to the ethnobotanical and floristic studies in Cameroon". *CSTR/OUA*. 641p.
- Ahmed M.** (2010). "Application pratique de l'anatomie humaine Tome 1 - Viscères du tronc". *Editions Publibook 14, Paris*. 255p.
- Ahmed SM, Sandra G, Gustavo B.** (2004). "Antinociceptive activity of triterpenes isolated from *Clusia ellipticifolia*". *Rev Col Cienc Quim Farm*. **33**: 156-162.
- Akah PA, Orisakwe OE, Gamaniel KS, Shittu A.** (1998). "Evaluation of Nigerian traditional medicines: Effects of some Nigerian folk remedies on peptic ulcer". *J Ethnopharmacol*. **62**: 123-127.
- Akhtar MS, Akhtar AH, Khan MA.** (1992). "Antiulcerogenic Effects of *Ocimum basilicum* Extracts, Volatile Oils and Flavonoid Glycosides in Albino Rats". *Int J Pharmacog*. **30**: 97-104.
- Al-Hashem F.** (2009). "Camel's milk protects against aluminum chloride-induced toxicity in the liver and kidney of white albino rats". *Am J Biochem Biotechnol*. **5**: 98-108.
- Allain P.** (2000). "Les médicaments". 3<sup>e</sup> Edition CdM, Paris. 500p.
- Allen A, Flemstrom G, Garner A, Kivilaakso E.** (1993). "Gastroduodenal mucosal protection". *Physio Rev*. **73**: 823-857.
- Amagase K, Yokota M, Okabe S.** (2003). "Characterization of "unhealed gastric ulcers" produced with chronic exposure of acetic acid ulcers to indomethacin in rats". *J Physiol Pharmacol*. **54**: 349-360.
- Amagase K, Okabe S.** (1990). "A new ulcer model, "unhealed gastric ulcers", induced by chronic treatment with indomethacin in rats with acetic acid ulcers". *J Physiol Pharmacol*. **50(2)**: 169-181.
- Amandeep K, Robin S, Ramica S, Sunil K.** (2012). "Peptic ulcer: a review on etiology and pathogenesis". *Int Res J Pharm*. **3(6)**: 34-38.
- Amang AP, Mezui C, Siwe TG, Emakoua J, Mbah G, Nkwengoua EZ, Enow-Orock GE, Tan PV.** (2017a). "Healing and Antisecretory Effects of Aqueous Extract of

- Eremomastax speciosa* (Acanthaceae) on Unhealed Gastric Ulcers”. *Biomed Res Int.* (2017), Article ID 1924320, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/1924320>.
- Amang AP, Mezui C, Siwe TG, Zondengoumba EN, Enow-Orock GE, Tan PV.** (2017b). “Prophylactic and Healing Activities of the Leaves Aqueous Extract of *Eremomastax speciosa* on Gastric Ulcers in Rats”. *J Adv Biol Biotechn.* **12(3)**: 1-13.
- Amang AP, Tan PV, Nkwengoua E, Nyasse B.** (2014a). “Antisecretory action of the extract of the aerial parts of *Eremomastax speciosa* (Acanthaceae) occurs through antihistaminic and anticholinergic pathways”. *Adv Pharmacol Sci.* **2014(2014)**; Article ID 323470, 10 pages.
- Amang AP, Tan PV, Patamaken AS, Mefe NM.** (2014b). “Cytoprotective and Antioxidant effects of the methanol extract of *Eremomastax speciosa* in rats”. *Afr J Trad Compl Alter Med.* **11(1)**: 165-171.
- Andras K, Curt LB, William FJ.** (2008). “A molecular perspective on terpene variation in Australian *Myrtaceae*”. *Austral J Bot.* **56**: 197-213.
- Aniagu SO, Nwinvi FC, Olanubi B, Akumka DD, Ajoku GA, Izebe KS, Agala P, Agbani EO, Enwerem NM, Ihegwara C, Gamaniel KS.** (2004). “Is *Berlina grandiflora* (leguminosae) toxic in rats?”. *Phytomedicine.* **11(4)**: 352-360.
- Ankouane F, Ngatcha G, Kowo M, Ndjitoyap NAW, Tagni-Sartre M, Dang I, Njoya O, Biwolé SM, Tzeuton C, Ndjitoyap NEC.** (2016). “Analyse démographique et endoscopique des patients atteints d’ulcère gastroduodéal à Yaoundé au Cameroun: qu’est ce qui a changé depuis les années 1990?” *Med Afr Noir.* **63(7)**: 409-415.
- Aparna V, Dileep KV, Mandal PK, Karthe P, Sadasivan C, Haridas M.** (2012). “Anti-Inflammatory Property of n-Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment”. *Chem Biol Drug Des.* **80**: 434-439.
- Astudillo L, Rodriguez JA, Schmeda-Hirschmann G.** (2002). “Gastroprotective activity of oleanolic acid derivatives on experimentally induced gastric lesions in rats and mice”. *J Pharm Pharmacol.* **54(4)**: 583-588.
- Ata A, Tan DS, Matochko WL, Adesanwo JK.** (2011). “Chemical constituents of *Drypetes gossweileri* and their enzyme inhibitory and anti-fungal activities”. *Phytochem Lett.* **4**: 34-37.
- Azevedo NF, Huntington J, Goodman, KJ.** (2009). “The epidemiology of *Helicobacter pylori* and public health implications”. *Helicobacter.* **14(1)**: 1-7.

- Backert S, Selbach M.** (2008). "Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis". *Cell Microbiol.* 10: 1573-1581.
- Bajer B, Cazejust J.** (2008). "Appareil digestif: gastro-entérologie, hépatologie, chirurgie viscérale" S-Editions, France. p180.
- Bandyopadhyay D, Biswas K, Bhattacharyya M, Reiter RJ, Banerjee RK.** (2002). "Involvement of reactive oxygen species in gastric ulceration, protection by melatonin". *Ind J Exp Biol.* 40: 693-705.
- Baravalia Y, Vaghasiva Y, Chanda S.** (2012). "Brine Shrimp Cytotoxicity, Anti-inflammatory and Analgesic Properties of *Woodfordia fruticosa* Kurz Flowers" *Iran J Pharm Res.* 11(3): 851-861.
- Bartels H, Bohmer M, Heierli C.** (1972). "Serum creatinine determination without protein precipitation". *Clin Chem. Acta* 37: 193-197.
- Beaugerie L, Sokol H.** (2014). "Les fondamentaux de la pathologie digestive". *Editions Elsevier-Masson, Paris.* Chapitre 2. 23 pages.
- Bhattacharjee M, Bhattacharjee S, Gupta A, Banerjee RK.** (2002). "Critical role of an endogenous gastric peroxidase in controlling oxidative damage in *H. pylori* mediated and non-mediated gastric ulcer". *Fr Rad Biol Med.* 32: 731-743.
- Boda M, Tan PV, Nyasse B.** (2006) Rapid *in vivo* screening method for the evaluation of new anti- *helicobacter* medicinal preparations. *Afr J Trad Compl Altern Med.* 3(4): 102-114.
- Bommelaer G, Stef A.** (2009). "Gastroduodenal ulcer before and after *Helicobacter pylori*". *Gastroenterol Clin Biol.* 33(8-9): 626-634.
- Bonfils S.** (1990). "Physiopathologie de la maladie ulcéreuse: pour un reclassement des concepts". *Editions la Maladie ulcéreuse, Paris.* pp 107-116.
- Borelli F, Izzo AA.** (2000). "The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies". *Phytother Res.* 14: 581-591.
- Bouarioua N, Merrouche M, Pospai D, Mignon M.** (2007). "Physiopathologie de la maladie ulcéreuse gastroduodénale à l'ère d'« *Helicobacter pylori* »". *Editions Elsevier Masson SAS Paris.* pp 1-12.
- Bourel M.** (1991). "Hépatologie". *Editions Bordas Ellipses, Paris.* 383p.
- Bourjot M, Leyssen P, Eydoux C, Guillemot JC, Canard B, Rasoanaivo P, Guérrite F, Litaudon M.** (2012). "Chemical constituents of *Anacolosa pervilleana* and their antiviral activities". *Fitoterapia.* 83: 1076-1080.
- Bourra H.** (2008). "Toxicités aiguë et chronique: Notions de base". *Hygiène.* 1-2.



- Boveris A, Oshino N, Chance B.** (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide". *Biochem J.* **128**: 617-630.
- Bruckner VJ, Kyle MG, Luthra R, Aosta D, Mehda MS.** (2001). "Acute, short-term, and subchronic oral toxicity of 1,1,1-trichloroethane in rats". *Toxicol Sci.* **60**: 363-372.
- Brunton LL.** (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11<sup>th</sup> Edition McGraw Hill, New York. pp 673-683.
- Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Kwiecien S, Pajdo R, Karczewska E, Stachura J, Hahn EG.** (1999). "Water extracts of *Helicobacter pylori* delay healing of chronic gastric ulcers in rats: role of cytokines and gastrin-somatostatin link". *Digestion.* **60(1)**: 22-33.
- Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Sliwowski Z, Pajdo R, Drozdowicz D, Ptak A, Hahn EG.** (2001). "Classic NSAID and selective cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibitors in healing of chronic gastric ulcers". *Microsc Res Tech.* **53**: 343-353.
- Bürger C, Fischer RD, Cordenunzi AD, Batschauer BA, Filho CV, Soares ARS.** (2005). "Acute and subacute toxicity of the hydroalcoholic extract from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (asteraceae) in mice". *J Pharm Pharmaceut Sci.* **8(2)**: 370-373.
- Burkill HM.** (1965). "The useful plant of west Tropical Africa". *Royal Botanic Gardens Kew, London.* **1**: 610-611.
- Calop J, Limat S, Fernandez C.** (2008). "Pharmacie clinique et thérapeutique". 3<sup>e</sup> Edition Elsevier-Masson. p 223.
- Cellini L, Di Campli E, Masulli M, Di Bartolomeo S, Allocati N.** (1996). "Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*)". *FEMS Immunol Med Microbiol.* **13**: 273-277.
- Cheftel JC, Cheftel H, Besancon R.** (1989). "Aspect toxicologique: Introduction à la Biochimie et à la Technique des aliments". *Editions Lavoisier, Paris.* pp 137-161.
- Choi MA, Kim BS, Yu R.** (1999). "Serum antioxidative vitamin levels and lipid peroxidation in gastric carcinoma patients". *Cancer Lett.* **136**: 89-93.
- Chuah SK, Tsay FW, Hsu PI, Wu DC.** (2011). "A new look at anti-*Helicobacter pylori* therapy". *World J Gastroenterol.* **17**: 3971-3975.
- Cléon P, Sevrain S.** (2002). "Le point sur le couplage chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse". *Spectra analyse.* **229(31)**: 22-30.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** (2012). "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard". Ninth edition, M07-A9. **32(2)**: 68 pages.

- Cooke MS, Olinski R, Evans MD.** (2006). “Does measurement of oxidative damage to DNA have a clinical significance?”. *Clin Chim Acta.* **365**: 30-49.
- Crépel F, Lemaire G.** (1995). “Le monoxyde d'azote”. *Méd Sci.* **11**: 1639-1642.
- Davies GR, Simmonds NJ, Stevens TRJ, Sheaff MT, Banatvala N, Laurenson IF, Blake DR, Rampton DS.** (1994). “*Helicobacter pylori* stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production *in vivo*”. *Gut.* **35**: 179-185.
- De Hoffmann E, Charette J, Stroobant V.** (1999). “Spectrométrie de masse”. *2<sup>e</sup> Edition Dunod, Paris.* 399 pages.
- De Korwin JD, Lehours P.** (2010). “*Helicobacter pylori*: notions fondamentales, épidémiologie, méthodes diagnostiques”. *Encyclopédie Médicale Chirurgie Gastro-entérologie ; 9-000-B-60.*
- Dedon PC, Tannenbaum SR.** (2004). “Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation”. *Arch Biochem Biophys.* **423**: 12-22.
- Delanaye P, Cavalier E, Maillard N, Krzesinski JM, Mariat C, Cristol JP, Piéroni L.** (2010). “La créatinine: d’hier à aujourd’hui”. *Ann Biol Clin.* **68(5)**: 331-343.
- Delchier JC, De Korwin JD, Mégraud F, Bessède E, Lehours P, Lamarque D.** (2014). “Infection à *H. pylori* et cancers gastriques”. *Rev Prat.* **64(2)**: pp 187-214.
- Delchier JC.** (2012). “*Helicobacter pylori* : actualités thérapeutiques en 2012”. *Post’U*, 1-6.
- Descat F.** (2002). “Hématologie du rat: Hémogramme et Myélogramme”. *Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.* 34-39.
- Dibong SD, Mpondo ME, Ngoye A, Priso RJ.** (2011). “Modalities of exploitation of medicinal plants in Douala’s region”. *Am J Food Nutr.* **1(2)**: 67-73.
- Diezi J.** (1992). “Principe de base et répercussion clinique dans: pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques”. *Editions Frisson-Roche, Paris.* pp 33-35.
- Drumm B, Sherman P.** (1989). “Long-term storage of *Campylobacter pylori*”. *J Clin Microbiol.* **27**: 1655-1656.
- Dudek RW.** (2007). “High-yield physiology”. *1<sup>st</sup> edition Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.* 336 pages.
- Duke JA.** (2000). “Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants”. *2<sup>nd</sup> Edition, Boca Raton, FL. CRC Press, New York.* 676 pages.
- Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S.** (1992). “Motility as a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*”. *J Med Microbiol.* **37**: 123-127.

- Elliott SN, Mcknight W, Cirino G, Wallace JL.** (1995). "A Nitric Oxide-Releasing Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Accelerates Gastric Ulcer Healing in Rats". *Gastroenterology*. **109**: 524-530.
- Ellman GL.** (1959). "Tissue sulfhydryl group". *Arch Biochem Biophys*. **82**: 70-77.
- Eloumou BSAF, Luma NH, Noah ND, Esomba NE, Malongue A, Manga A, Tzeuton C, Biwole SM.** (2016). "Facteurs de risques associés aux lésions gastroduodénales dans un hôpital de référence à Douala (Cameroun)". *Med Sant Trop*. **26**: 104-109.
- Emerson SF, Sharada AC, Uma DP.** (1993). "Toxic effects of crude root extract of *Plumbago rosea* on mice and rats". *J Ethnopharmacol*. **38**: 79-84.
- Erhabor JO, Idu M, Udo FO.** (2013). "Ethnomedicinal survey of medicinal plants used in the treatment of male infertility among the IFA Nkari people of Ini local government area of Akwa Ibom State, Nigeria". *Res J Rec Sc*. **2**: 5-11.
- Ernst PB, Gold BD.** (2000). "The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer". *Annu Rev Microbiol*. **54**: 615-640.
- Estepa L.** (2006) "Protéines totales". *Editions Sciences Médicales et Élémentaires, Paris*. pp 2-3.
- Fennerty MB.** (2002). "Physiopathologie du tractus gastro-intestinal supérieur : justification des avantages thérapeutiques de suppression de l'acide". *Crit Car Med*. 351-355.
- Fischer ER, Hansen BT, Nair V, Hoyt FH, Dorward DW.** (2012). "Scanning Electron Microscopy". *Curr Protoc Microbiol*. **2(2)**: 1-76.
- Freitas CS, Baggio CH, Da Silva-Santos JE, Rieck L, de Moraes Santos CA, Júnior CC, Ming LC, Garcia CDA, Marques MC.** (2004). "Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* Pedersen, Amaranthaceae, in rats". *Life Sci*. **74**: 1167-1179.
- Frenck RWJ, Clemens J.** (2003). "*Helicobacter* in the developing world". *Microb Infect* **5**: 705-713.
- Fridovich I.** (1995). "Superoxide radical and superoxide dismutases". *Annu Rev Biochem*. **64**: 97-112.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS.** (1972) "Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without the use of preparative centrifuge". *Clin Chem*. **18**: 499-502.

- Gad SC.** (2009). "Alternatives to *in vivo* studies in toxicology. In: Ballantyne B, Marrs TC, Syversen TLM, General and Applied Toxicology". *Volume 6, 3<sup>rd</sup> Edition Wiley & Sons, New Jersey.* 3940p.
- Gauthier T, Wauters JD.** (2006). "Les néphrites interstitielles et pathologie rénale". *Clin Pharm. Editions Masson, Paris.* pp 124-127.
- Ghfourifar P, Cadenas E.** (2005). "Mitochondrial nitric oxide synthase". *Trends Pharmacol Sci, 26* : 190-195.
- Gharzouli K, Khennouf S, Amira S, Gharzouli A.** (1999). "Effects of aqueous extracts from *Quercus ilex* L. root bark, *Punica granatum* L. frut peel and *Artemisia herba-alba* Asso leaves on ethanol-induced gastric damage in rats. *Phytother Res.* **13**: 42-45.
- Gisbert JP.** (2005). "The recurrence of *Helicobacter pylori* infection: incidence and variables influencing it. A critical review". *Am J Gastroenterol.* **100**: 2083-2099.
- Goggin PM, Collins DA, Jazrawi RP, Jackson PA, Corbishley CM, Bourke BE, Northfield TC.** (1993). "Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and its effect on symptoms and non-steroidal anti-inflammatory drug induced gastrointestinal damage in patients with rheumatoid arthritis". *Gut.* **34**: 1677-1680.
- Graham DY, Lidsky MD, Cox AM, Evans DJ, Evans DG, Alpert L, Klein PD, Sessoms SL, Michaletz PA, Saeed ZA.** (1991). "Long-term nonsteroidal anti-inflammatory drugs use and *Helicobacter pylori* infection". *Gastroenterology.* **100**: 1653-1657.
- Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR.** (1996). "Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids". *Methods Enzymol.* **268**: 237-246.
- Gumurdulu Y, Serin E, Ozer B, Kayaselcuk F, Ozsahin K, Cosar AM, Gursoy M, Gur G, Yilmaz U, Boyacioglu S.** (2004). "Low eradication rate of *Helicobacter pylori* with triple 7-14 days and quadruple therapy in Turkey". *World J Gastroenterol.* **10**: 668-671.
- Gustafson J, Welling D.** (2010). "No Acid, No Ulcer-100 Years Later: A Review of the History of Peptic Ulcer Disease". *J Am Coll Surg.* **210(1)**: 110-116.
- Guyton AC, Hall JE.** (1996). "Textbooks of Medical physiology". *Editions Saunders, Philadelphia.* pp 315-329.
- Hadi V, Hotard M, Ling T, Salinas YG, Palacios G, Connelly M, Rivas F.** (2013). "Evaluation of *Jatropha isabelli* natural products and their synthetic analogs as potential antimalarial therapeutic agents". *Eur J Med Chem.* **65**: 376-380.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** (1999). "Free Radicals in Biology and Medicine" *Oxford University Press.* 896 p.

- Hashemi GN, Eghbal MA, Darabi M, Roshangar L, Asadi M, Zarghami N, Nouri M.** (2016). "Improvement of Liver Cell Therapy in Rats by Dietary Stearic Acid". *Iran Biomed J.* **20(4)**: 217-222.
- Hawkey CJ, Langman MJ.** (2003). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs: overall risks and management. Complementary roles for COX-2 inhibitors and proton pump inhibitors". *Gut*: **52**: 600-608.
- Hazell SL, Lee D, Brady L, Hennessy W.** (1986). "*Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as Important Factors in colonization of the gastric epithelium". *J Infect Dis.* **153 (4)**: 658-663.
- Heine H.** (1966). "Flore du Gabon: Acanthaceae". *Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.* **3**: 29-32.
- Henry RJ, Canon DC, Winkelman JW.** (1974). "Clinical chemistry, principles and Techniques". *2<sup>nd</sup> Edition Harper & Row, Hagerstown.* pp 412-525.
- Hichri F, Ben Jannet H, Cheriaa J, Jegham S, Mighri Z.** (2003). "Antibacterial activities of a few prepared derivatives of oleanolic acid and of other natural triterpenic compounds". *C R Chimie.* **6**: 473-483.
- Hilaly JE, Israili ZH, Lyoussi B.** (2004). "Acute and chronic toxicological studies of *Ajugaiva* in experimental animals". *J Ethnopharmacol.* **91(1)**: 43-50.
- Hunt RH, Barkun AN, Baron D, Bombardier C, Bursey FR, Marshall JR, Morgan DG, Paré P, Thomson AB, Whittaker JS.** (2002). "Recommendations for the appropriate use of anti-inflammatory drugs in the era of the coxibs: defining the role of gastroprotective agents". *Can J Gastroenterol.* **16**: 231-240.
- Isomoto H, Moss J, Hirayama T.** (2010). "Pleiotropic actions of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA". *Tohoku J Exp Med.* **220**: 3-14.
- Johnson LR.** (1987). "Physiology of the gastrointestinal tract". *2<sup>nd</sup> Edition Raven Press, New York.* 251p.
- Joseph RM, Varela V, Kanji VK, Subramony C, Mihas AA.** (1999). "Protective effects of zinc in indomethacin-induced gastric mucosal injury: evidence for a dual mechanism involving lipid peroxidation and nitric oxide". *Aliment Pharmacol Ther.* **13(2)**: 203-208.
- Ko JK, Cho CH.** (2000). "Alcohol drinking and cigarette smoking: a "partner" for gastric ulceration". *Chin Med J.* **63(12)**: 845-854.

- Koek MM, Mulwijk B, van der Werf MJ, Hankemeier T.** (2006). “Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry”. *Anal Chem.* **78(4)**: 1272–1281.
- Konturek SJ, Brzozowski T, Majka J, Pytko-Polonczyk J, Stachura J.** (1993). “Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcers”. *Eur. J. Pharmacol.* **239**: 215-217.
- Kusters JG, Van Vliet AHM, Kuipers EJ.** (2006). “Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection”. *Clin Microbiol Rev.* **19(3)**: 449–490.
- Lacave R, Larsen C, Robert J.** (2005). “Cancérologie fondamentale”. *Edition John Libbey Eurotext.* 448 pages.
- Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A.** (2008). “Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside”. *Gastroenterology.* **135(1)**: 41-60.
- Lapointe G.** (2004). “Notions de Toxicologie”. *Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec, Québec.* pp 41-67.
- Lauwerys RR.** (1999). “Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles” *Editions Masson, Paris.* pp 460-467.
- Lechat P, Calvo F, De Crémoux P, Giroud JP, Lagier G, Lechat P, Rouvéix B, Weber S.** (1990). “Pharmacologie Médicale”. *Editions Masson, Paris.* pp 341-346.
- Leeuwenburgh C, Heinecke JW.** (2001). “Oxidative stress and antioxidants in exercise”. *Curr Med Chem.* **8**: 829-838.
- Leslie W.** (1972). “Peptic Ulcer: A Reappraisal of its peptic aetiology”. *Ann Roy Coll Surg Engl.* **50**: 146-163.
- Levi S, Goodtad RA, Lee CY, Stamp G, Walport MJ, Wright NA, Hodgson HJF.** (1990). “Inhibitory effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on mucosal cell proliferation associated with gastric ulcer healing”. *Lancet.* **336**: 840-843.
- Li W, Yao H, Niu X, Wang Y, Zhang H, Li H, Mu Q.** (2015). “Protective effect of  $\delta$ -amyrone against ethanol-induced gastric ulcer in mice”. *Immunobiology.* **220**: 798-806.
- Lu FC.** (1992). “Toxicologie : Données générales, procédures d’évaluation, organes cibles, évaluation du risque”. *Editions Masson, Paris.* pp 160-192.
- Majumdar D, Bebb J, Atherton J.** (2011). “*Helicobacter pylori* infection and peptic ulcers”. *Medicine.* **39**: 154-161.
- Mallavadhani UV, Mahapatra A, Jamil K, Reddy PS.** (2004). “Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains”. *Biol Pharm Bull.* **27(10)**: 1576-1579.

- Marcia LN, Fabiano MC, Maria CYM, Vanderlan SB.** (1999). "Complete Assignments of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectra of the 3, 4-*seco*-Triterpene Canaric Acid isolated from *Rudgea jasminoides*". *J Braz Chem Soc.* **10**: 237-240.
- Marieb EN, Hoehn K.** (2007). "Human Anatomy and Physiology". *Seventh Edition De boeck université, Paris.* pp 806-932.
- Marieb EN.** (1999). "Anatomie et physiologie humaines". *Traduction de la 4<sup>e</sup> édition, De Boeck, Paris.* pp 862-886.
- Marmonier AA.** (1990). "Technique de diffusion en gélose : Méthode des disques. Dans: Bactériologie Médicale, Techniques usuelles". pp 237-244.
- Martindale S, McNeill G, Devereux G, Campbell D, Russell G, Seaton A.** (2005). "Antioxidant intake in pregnancy in relation to wheeze and eczema in the first two years of life". *Am J Resp Crit Car Med.* **171(2)**: 121-128.
- Matsuda H, Li Y, Murakami T, Yamahara J, Yoshikawa M.** (1998). "Protective effects of oleanolic acid oligoglycosides on ethanol or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats". *Life Sci.* **63**: 245-250.
- Mc Farland J.** (1907). "The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines." *J American Med Associat.* **14**: 1176-1178.
- Mégraud F.** (2003). "When and how does *Helicobacter pylori* infection occur"? *Gastroenterol Clin Biol.* **3(2)**: 374-379.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mc Laughlin JL.** (1982). "Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents". *Plant Med.* **45**: 31-34.
- Mezui C, Tchinda FSH, Amang AP, Malepa MGB, Tan PV.** (2017). "Analgesic and non-ulcerogenic activities of the aqueous extract of the aerial parts *Eremomastax speciosa* Hochst (Acanthaceae) in mice". *J Med Plant Stud.* **5(2)**: 6-10.
- Miller MJ, Sandoval M.** (1999). "Nitric oxide: III. A molecular prelude to intestinal inflammation". *Am J Physiol.* **276**: G795-G799.
- Misra HP, Fridovich I.** (1972). "The role of super oxide anion in the auto oxidation epinephrine to adrenochrome and a simple assay for superoxide dismutase". *J Biol Chem.* **247**: 3170-3175.

- Mooney C, Keenan J, Munster D, Wilson I, Allardyce R, Bagshaw P, Chapman B, Chadwick V.** (1991). "Neutrophil activation by *Helicobacter pylori*". *Gut*. **32**: 853-857.
- Murley JS, Kataoka Y, Hallahan DE, Roberts JC, Grdina DJ.** (2001). "Activation of NF kappa B and MnSOD gene expression by free radical scavengers in human microvascular endothelial cells". *Free Radic Biol Med*. **30**: 1426-1439.
- Ndenecho EN.** (2009). "Herbalism and resources for the development of ethnopharmacology in Mount Cameroon region". *Afr J Pharm Pharmacol*. **3(3)**: 78-86.
- Neuzil J, Gebicki JM, Stocker R.** (1993). "Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants". *Biochem J*. **293(3)**: 601-606.
- Nyasse B, Ngantchou I, Nono J-J, Schneider B.** (2006). "Antifilarial activity *in vitro* of polycarpol and 3-*O*-acetyl aleuritolic acid from Cameroonian medicinal plants against *Onchocerca gutturosa*". *Nat Prod Res*. **20(4)**: 391-397.
- O'Connor A, Gisbert JP, McNamara D, O'Morain C.** (2010). "Treatment of *Helicobacter pylori* infection". *Helicobacter*. **15**: 46-52.
- Oben JE, Assi SE, Agbor GA, Musoro DF.** (2006). "Effect of *Eremomastax speciosa* on experimental diarrhoea". *Afr J Tradit Complement Altern Med*. **3(1)**: 95-100.
- OCDE** (2001). "Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë". *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*. **4**: 1-14.
- OCDE** (2008). "Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs". *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*. **4**: 1-14.
- Okabe S, Amagase K.** (2005). "An Overview of Acetic Acid Ulcer Models: The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research". *Biol Pharm Bull*. **28(8)**: 1321-1341.
- Okokon JE, Antia BS, Udoh AE, Akpan MM.** (2007). "Antianaemic and antimicrobial activity of *Eremomastax speciosa*". *J Pharmacol Toxicol*. **2**: 196-199.
- Oliveira FA, Vieira-Júnior GM, Chaves MH, Almeida FR, Santos KA, Martins FS, Silva RM, Santos FA, Rao VS** (2004). "Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neuron". *Planta Med*. **70(8)**: 780-782.
- Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G, Lilly P, Sanders J, Sipes G, Bracken W, Dorato M, Deun KV, Smith P, Berger B, Heller A.** (2000). "Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals". *Regul Toxicol Pharmacol*. **32**: 56-67.



- Orieux M, Everaere M.** (1977). “Anatomie et Physiologie Humaines”. *Editions Classique Hachettes, Paris.* 222p.
- Ouamba WSO.** (2015). “Etude phytochimique de *Eremomastax speciosa* (Acanthaceae) et activités biologiques”. *Mémoire de Master en Chimie Organique, Université de Yaoundé I.* 44p.
- Pacheco AG, Alcântara AFC, Abreu VGC, Corrêa GM.** (2012). “Relationships between chemical structure and activity of triterpenes against Gram-positive and Gram-negative bacteria”. *Search Antibact Ag.* 1-24.
- Peraldi MN, Kanfer A.** (1994). “Insuffisance rénale aiguë”. *Encycl Med Chir.* **18**: 42- 106.
- Perrone RD, Madias NE, Levey AS.** (1992). “Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts”. *Clin Chem.* **38**: 1933-1953.
- Pillai NR, Santhakumari G.** (1984). “Effects of nimbidin on acute and chronic gastroduodenal ulcer models in experimental animals”. *Planta Medica.* **50**: 143-147.
- Pocock G, Richards C.** (2006). “*Human Physiology: The Basis of Medicine*”. *Oxford University Press.* p 230.
- Poncelet C, Sifer C.** (2011). “Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l’humain”. *Editions Springer, Paris.* p 84.
- Pospai D, Vissuzaine C, Vatie J, Mignon M.** (1997). “Physiopathologie de la maladie ulcéreuse gastroduodénale à l’ère de *Helicobacter pylori*”. *Editions Elsevier, Paris.* pp 1-16.
- Powers SK, Lennon SL.** (1999). “Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle”. *Proc Nutr Soc.* **58**: 1025-1033.
- Prasain JK, Wang CC, Barnes S.** (2004). “Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples”. *Free Rad Biol Med.* **37(9)**: 1324-1350.
- Prucksunand C, Indrasukhsri B, Leethochawalit M, Hungspreugs K.** (2001). “Phase II clinical trial on effect of the long turmeric (*Curcuma longa* Linn) on healing of peptic ulcer”. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* **32(1)**: 208-215.
- Publig W, Wustinger C, Zandl C.** (1994). “Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) cause gastrointestinal ulcers mainly in *Helicobacter pylori* carriers”. *Wein Klin Wochenschr.* **106**: 276-279.
- Rachid S, Hassan T.** (2007). “Cholestérol, lipoprotéines et athérosclérose: de la biochimie à la physiopathologie”. *Les technologies de laboratoire.* **2**: 2-3.

- Rambaud JC.** (2005). “Physiologie de la maladie ulcéreuse duodénale et gastrique. Dans : Traité de Gastroentérologie”. *Editions Flammarion, Médecine-Sciences, Paris*. pp 331-334.
- Rampersad SN.** (2012) “Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays”. *Sensors*. **12(9)**: 12347-12360.
- Reece** (2006). “Biologie”. *Editions De Boeck université, Paris*. 1035p.
- Reitman S, Frankel SA.** (1957). “A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase”. *Am J Clin Pathol*. **28**: 56-63.
- Robertson JL.** (1998). “Chemically-induced glomerular injury: A review of basic mechanisms and specific xenobiotics”. *Toxicol Pathol*. **26(1)**: 64-72.
- Rodney A, Tanner GA.** (2004). “Medical physiology”. *2<sup>nd</sup> Edition Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia*. pp 516-521.
- Rodriguez JA, Astudillo L, Schmeda-Hirschmann G.** (2003). “Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rats”. *Pharmacol Res*. **48**: 291-294.
- Rodriguez JA, Theoduloz C, Yanez T, Becerra J, Schmeda-Hirschmann G.** (2006). “Gastroprotective and ulcer healing effects of ferruginol in mice and rats: assessment of its mechanism of action using *in vitro* models”. *Life Sci*. **78(21)**: 2503-2509.
- Salena BJ, Hunt RH.** (2005). “L’estomac et le duodénum, Principes fondamentaux de gastroentérologie: états pathologiques et démarches thérapeutiques”. *5<sup>ème</sup> Edition Janssen-ortho*. 158-198.
- Sánchez M, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann G, Razmilic I, Yáñez T, Rodriguez JA.** (2006). “Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: *In vitro-in vivo* relationships”. *Life Sci*. **79**: 1349-1356.
- Santucci L, Fiorucci S, Tatoia L.** (1995). “Severe gastric mucosal damage induced by NSAIDs in healthy subjects is associated with *Helicobacter pylori* infection and high levels of serum pepsinogens”. *Dig Dis Sci*. **40**: 2074-2080.
- Schorderet M.** (1992). “Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques”. *Editions. Frisson-Roche et Slatkine, Paris-Grenoble*. 932.
- Selgrad M, Malfertheiner P.** (2011). “Treatment of *Helicobacter pylori*”. *Curr Opin Gastroenterol*. **27**:565-570.
- Sen T, Pal S, Nag Chaudhuri AK.** (1992). “Studies on the antiulcer activities of *Pluchea indica* less. In natural Drugs and the digestive tract”. *Editions EMSI, Rome*. pp 69-72.

- Shatoor AS.** (2011). “Acute and sub-acute toxicity of *Crataegus aronia* Syn. *Azarolus* (L.) whole plant aqueous extract in Wistar rats”. *Am J Pharmacol Toxicol.* **6(2)**: 37-45.
- Singh A, Bhat TK, Sharma OP.** (2011). “Clinical biochemistry of hepatotoxicity”. *J Clinic Toxicol.* **S4:001**. DOI:10.4172/2161-0495.S4-001.
- Sinha AK.** (1972). “Colorimetric assay of catalase”. *Anal Clin Biochem.* **47**: 389-394.
- Smoot DT, Mobley HL, Chippendale GR, Lewison JF, Resau JH.** (1990). “*Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells”. *Infect Immun.* **58**: 1992-1994.
- Société Nationale Française de Gastro-Entérologie (SNFGE).** (2009). Enseignement du 2<sup>ème</sup> cycle polycopié national hépato-gastro-entérologie. pp 527-529.
- Srinivas TL, Lakshmi SM, Shama SN, Reddy GK, Prasanna KR.** (2013). “Medicinal Plants as Anti-Ulcer Agents”. *J Pharmacog Phytochem.* **2(4)**: 91-97.
- Srivastava DP, Rajani GP, Gupta N, Sharma RK, Mandal S.** (2011). “Antiulcer and Anti-inflammatory activity of fresh leaves extracts of *Polyalthia Longifolia* in rats”. *Int J Drug Develop Res.* **3(1)**: 351-359.
- Stevens A, Lowe J.** (1997). “Réponses tissulaires aux agressions dans Anatomie Pathologique Générale et Spéciale”. *Editions de Boeck, Washington.* pp 57-75.
- Szabo S, Vincze A, Sandor Z, Jadus M, Gombos Z, Pedram A, Levin E, Hagar J, Iaquinto G** (1998). “Vascular approach to gastroduodenal ulceration. New studies with endothelins and VEGF”. *Dig Dis Sci.* **43**: 40-45.
- Tan PV, Boda M, Enow-Orock GE, Etoa FX, Bitolog P.** (2007). “Acute and subacute toxicity profile of the aqueous stem bark extract of *Enantia Chloranta* Oliver (Annonaceae) in laboratory animals”. *PharmacologyOnline.* **1**: 304-313.
- Tan PV, Nyasse B, Enow-Orock GE, Wafo P, Forcha EA.** (2000). “Prophylactic and healing properties of a new anti-ulcer compound from *Enantia chlorantha* in rats”. *Phytomedicine.* **7(4)**: 291-296.
- Tan PV, Nditafon GN, Yewah MP, Ayafor JF, Dimo T.** (1996). “*Eremomastax speciosa*: Effect on the leaf aqueous extract on ulcer formation and gastric secretion in rats”. *J Ethnopharmacol.* **54**: 139-142.
- Tarpey MM, Fridovich I.** (2001). “Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxyxynitrite”. *Circ Res.* **89**: 224-236.

- Thiébaux I, Demange C.** (2001). “ Les traitements d’éradication de *Helicobacter pylori* ”. *Dossier du CNHIM (Centre National Hospitalier d’Information sur le Médicament). Publication bimestrielle. XXII* : 5-24.
- Til HP, Woutersen RA, Feron VJ, Clary JJ.** (1998). “Evaluation of the oral toxicity of acetaldehyde and formaldehyde in a drinking water study in rats”. *Fed Chem Toxicol.* **26**: 447-452.
- Tokuyama R, Takahashi Y, Tomita Y, Tsubouchi M, Yoshida T, Iwasaki N, Kado N, Okezaki Eiichi, Nagata O.** (2001). “Structure-Activity relationship (SAR) studies on oxazolidinone antibacterial agents. 3.<sup>1</sup> Synthesis and evaluation of 5-Thiocarbamate oxazolidinones”. *Chem Pharm Bull.* **49(4)**: 361-367.
- Toledo H, Valenzuela M, Rivas A, Jeres CA.** (2002). “Acid stress response in *Helicobacter pylori*”. *FEMS Microbiol Lett.* **213(1)**: 67-72.
- Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG.** (1997). “The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*”. *Nature.* **388**: 539-547.
- Tournier H, Schinella G, de Balsa EM, Buschiazzo H, Mordujovich de Buschiazzo PMS.** (1999). “Effect of the chloroform extract of *Tanacetum vulgare* and one of its active principles, parthenolide, on experimental gastric ulcer in rats”. *J Pharm Pharmacol.* **51**: 215-219.
- Tron I, Piquet O, Mouton C.** (2002). “Toxon: Manuel de toxicologie”. *Agence De l’Environnement et de la Maîtrise de l’Energie, France.* pp 220-281.
- Tulassay Z, Herszényi L.** (2010). Gastric mucosa defense and cytoprotection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* **24(2)**: 499-502.
- Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohe L.** (1999). “Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation”. *Science.* **285**: 1393-1396.
- Valle DL.** (2005). “Peptic ulcer diseases and related disorders. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors. Harrison’s principles of internal medicine”. *16<sup>th</sup> Edition McGraw-Hill, New York.* pp 1746-1762.
- Vane JR, Botting RM.** (1998). “Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action”. *Am J Med.* **47(2)**: 78-87.
- W.H.O.** (1998). “Guidelines for the appropriate use of herbal medicines”. *Regional office for the western pacific.* pp 22-27.
- W.H.O.** (1992). “Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal Medicines”. *Manilla, Philippines.* pp 5-6.

- Wang JY, Yamasaki S, Takeuchi K, Okabe S.** (1989). “Delayed healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats by indomethacin”. *Gastroenterology*. **96**: 393-402.
- Warren JR, Marshall B.** (1983). “Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis”. *Lancet*. 1(8336): 1273-1275.
- Watanabe F.** (2007). “Vitamin B<sub>12</sub> sources and bioavailability”. *Experiment Biol Med*. **232(10)**: 1266-1274.
- Weeks DL, Eskandari S, Sciott DR, Sachs G.** (2000). “A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization”. *Science*. **287(5452)**: 482-485.
- Whitacre CC, Reingold SC, O’Looney PA.** (1999). “A gender gap in autoimmunity”. *Science*. **283(5406)**: 1277-1278.
- White JR, Winter JA, Robinson K.** (2015). “Differential inflammatory response to *Helicobacter pylori* infection: etiology and clinical outcomes”. *J Inflamm Res*. **8**: 137-147.
- Whittle BJ.** (2002). “Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs”. *Fundam Clin Pharmacol*. **17**: 301-313.
- Wilbur KM, Bernheim F, Shapiro OW.** (1949). “Determination of lipid peroxydation”. *Arch Biochem Biophys*. **24**: 305-310.
- William HH, Merritt Jr. LL, Dean JA.** (1965). “Ultraviolet and Visible Absorption Methods”. “Instrumental Methods of Analysis”. *D. Van Nostrand Co. Inc., Princeton, New Jersey*. pp 94-95.
- Wu P, Ma G, Li N, Deng Q, Yin, Huang R.** (2015). “Investigation of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk”. *Food Chem*. **173**: 194-202.
- Xiao YL, Nie YQ, Hou XH, Xie PY, Fang JY, et al.** (2013). “The efficacy, safety and cost-effectiveness of hydrotalcite versus esomeprazole in on-demand therapy of NERD: A multicenter, randomized, open-label study in China”. *J Dig Dis*. **14**: 463-468.
- Yamahara J, Kubomura Y, Miki K, Fujimura H.** (1988). “Antiulcer action of *Panax japonicus* rhizome”. *J Ethnopharmacol*. **19**: 95-101.
- Zhang DH, Zhou LY, Lin SR, Ding SG, Huang YH, Gu F, Zhang L, Li Y, Cui RL, Meng LM, Yan XE, Zhang J.** (2009). “Recent changes in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection among children and adults in high or low-incidence regions of gastric cancer in China”. *Chin Med J*. **122**: 1759-1763.

**Zollinger RM, Ellison EH.** (1955). "Primary peptic ulcerations of the jejunum associated with islet cell tumors of the pancreas". *Ann Surg.* **142(4)**: 709-723.

# ANNEXES

## ANNEXE I : (Préparation des solutions)

### **Annexe Ia: Solutions de *E. speciosa***

La solution à administrer était préparée par dilution de l'extrait aqueux de *E. speciosa* dans de l'eau distillée. Le volume (V) de la solution à administrer aux animaux a été déterminé à partir de la formule suivante :

$$V = \frac{\text{Dose} \times \text{Poids}}{\text{Concentration}}$$

**Volume (mL)** = Volume de la solution à administrer  
**Poids (kg)** = Poids de l'animal  
**Dose (mg/kg)** = Dose de l'extrait  
**Concentration (mg/mL)** = Concentration de la solution à administrer

### **Annexe Ib: Solution étalon de sérum albumine bovin (SAB)**

Elle a été préparée en dissolvant 150 mg de SAB dans 40 mL d'eau distillée. Le volume de la solution a été ajusté à 50 mL avec de l'eau distillée pour obtenir une solution de concentration 3 mg/mL.

### **Annexe Ic: Réactif de Biuret**

Une solution A a été préparée par dissolution de 0,75 g de sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O) et de 3 g de tartrate de sodium et de potassium dans 100 mL d'eau distillée. Une solution B a été préparée par dissolution de 15 g de soude dans 100 mL d'eau distillée. Le réactif de Biuret a été obtenu en mélangeant la solution A et la solution B. Le volume final du réactif a été ajusté à 500 mL avec de l'eau distillée.

### **Annexe Id: Solution de NaCl (9 ‰)**

Elle a été préparée en dissolvant 9 g de NaCl anhydre dans 900 mL d'eau distillée. Après homogénéisation, le volume a été ajusté à 1000 mL.

### **Annexe Ie: Solutions de formaldéhyde (10 % et 2 %)**

Les solutions de formaldéhyde ont été préparées à partir d'une solution mère de formaldéhyde de concentration 40 %. Un volume V de formaldéhyde de cette solution mère a été dilué 4 fois ou 20 fois dans de l'eau distillée pour obtenir une solution de formaldéhyde de 10 % ou 2 %, respectivement.



#### **Annexe If: Solution d'acide acétique (30 %)**

Elle a été préparée en ajoutant lentement 5 mL d'acide acétique (99,5 %) dans un erlenmeyer contenant 11,58 mL d'eau distillée, donnant ainsi un volume total de 16,58 mL d'acide acétique (30 %).

#### **Annexe Ig: Solution d'indométacine (1 mg/mL)**

Elle a été préparée en dissolvant 10 mg d'indométacine (Indocid® 25 mg, Merck Sharp et Dohme Chibert, France) dans 8 mL de NaCl (9 %). Le volume de la solution a par la suite été ajusté à 10 mL par ajout de NaCl (9 %).

#### **Annexe Ih: Solution d'Amoxicilline + Métronidazole**

Elle a été préparée en dissolvant 0,75 g d'amoxicilline (Sigma-Aldrich, USA) et 0,75 g de métronidazole (Sigma-Aldrich, USA) dans 50 mL d'eau distillée. Après homogénéisation, le volume de la solution a été ajusté à 60 mL par ajout d'eau distillée. Ceci a permis d'obtenir une solution finale d'amoxicilline et de métronidazole à 12,5 mg/mL chacun.

#### **Annexe Ii: Solution de Ranitidine + Amoxicilline + Métronidazole**

Elle a été préparée en dissolvant 1,5 g de ranitidine (Azantac®, Glaxo Smith Kline, France), 0,75 g d'amoxicilline (Sigma-Aldrich, USA) et 0,75 g de métronidazole (Sigma-Aldrich, USA) dans 25 mL d'eau distillée. Après homogénéisation, le volume de la solution a été ajusté à 30 mL par ajout d'eau distillée. Ceci a permis d'obtenir une solution finale de ranitidine, amoxicilline et métronidazole à des concentrations de 50, 25 et 25 mg/mL, respectivement.

#### **Annexe Ij: Solution d'acide trichloroacétique (20 %)**

Elle a été préparée en dissolvant 2 mg d'acide trichloroacétique dans 8 mL d'eau distillée. Le volume a ensuite été ajusté à 10 mL par ajout d'eau distillée.

#### **Annexe Ik: Solution d'acide thiobarbiturique (0,67 %)**

Elle a été préparée en dissolvant 0,67 mg de TBA dans 95 mL d'eau distillée. Le volume de la solution a ensuite été ajusté à 100 mL par ajout d'eau distillée.

#### **Annexe Il: Solution de tampon carbonate (0,05 M ; pH 10,2)**

Elle a été préparée en dissolvant 4,3 g de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 10  $\text{H}_2\text{O}$ ) et 4,2 g d'hydrogénocarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) dans 900 mL d'eau distillée. Le pH de la solution a été ajusté à 10,2 avec une solution de soude ( $\text{NaOH}$  ; 0,1N) et le volume de la solution ajusté à 1000 mL par ajout d'eau distillée.

### **Annexe Im: Solution de tampon phosphate (0,1M ; pH 7,5)**

Elle a été préparée en dissolvant 11,75 g de phosphate disodique hydraté ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) et 4,08 g de phosphate monosodique hydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) dans 900 mL d'eau distillée. Le pH a été ajusté et le volume complété à 1000 mL par ajout d'eau distillée.

### **Annexe In: Solution de tampon phosphate (0,1M ; pH 6,5)**

Elle a été préparée en dissolvant 1,07 g de phosphate disodique hydraté ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) et 3,48 g de phosphate monosodique hydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) dans 200 mL d'eau distillée. Le pH a été ajusté et le volume complété à 250 mL par ajout d'eau distillée.

### **Annexe Io: Solution de peroxyde d'hydrogène (50 mM)**

Elle a été préparée en ajoutant 243  $\mu\text{L}$  de peroxyde d'hydrogène (35 %) dans un bécher contenant 45 mL d'eau distillée. Le volume de la solution a été ajusté à 50 mL par ajout d'eau distillée.

### **Annexe Ip: Réactif d'Ellman**

Il a été préparé en dissolvant 4,96 mg d'acide 5,5-dithiobisnitrobenzoïque (DTNB) dans 200 mL de tampon phosphate (0,1M ; pH 6,5). Après homogénéisation, le volume de la solution a été ajusté à 250 mL par ajout de solution tampon.

### **Annexe Iq: Solution de tampon tris-(HCl 50 mM, KCl 150 mM, pH 7, 4)**

Elle a été préparée en dissolvant 1,21 g de tris base et 2,79 g de KCl anhydre dans 250 mL d'eau distillée. Une fois le pH ajusté grâce au HCl 12 N, le volume a été ajusté à 500 mL par ajout d'eau distillée.

### **Annexe Ir: Solution de résazurine (0,02 %)**

Elle a été préparée en dissolvant 2 mg de sel de résazurine (Chem-Impex-Int'L Inc, USA) dans 90 mL d'eau distillée. Après homogénéisation, le volume de la solution a été ajusté à 100 mL par ajout d'eau distillée.

### **Annexe Is: Solution de MTT (0,5 mg/mL)**

Elle a été préparée en dissolvant 5 mg de MTT dans 8 mL d'eau distillée. Après homogénéisation, le volume de la solution a été ajusté à 10 mL par ajout d'eau distillée.

### **Annexe It: Réactif de Griess**

Il a été préparé en introduisant 1 g de sulfanilamide, 0,1 g de naphthyléthylènediamine et 2,3 mL d'acide phosphorique (85 %) dans 90 mL d'eau distillée. Après homogénéisation, le volume de la solution a été ajusté à 100 mL par ajout d'eau distillée.

### **ANNEXE II**

**Tableau des standards Mc Farland**

<b>Standards Mc Farland</b>	<b>Charge bactérienne approximative par mL</b>	<b>BaCl<sub>2</sub> (1 %) (mL)</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 %) (mL)</b>
0,5	1,5 x 10 <sup>8</sup>	0,05	9,95
1,0	3,0 x 10 <sup>8</sup>	0,1	9,9
2,0	6,0 x 10 <sup>8</sup>	0,2	9,8
3,0	9,0 x 10 <sup>8</sup>	0,3	9,7
4,0	1,2 x 10 <sup>9</sup>	0,4	9,6
5,0	1,5 x 10 <sup>9</sup>	0,5	9,5
6,0	1,8 x 10 <sup>9</sup>	0,6	9,4
7,0	2,1 x 10 <sup>9</sup>	0,7	9,3
8,0	2,4 x 10 <sup>9</sup>	0,8	9,2
9,0	2,7 x 10 <sup>9</sup>	0,9	9,1
10,0	3,0 x 10 <sup>9</sup>	1,0	9,0

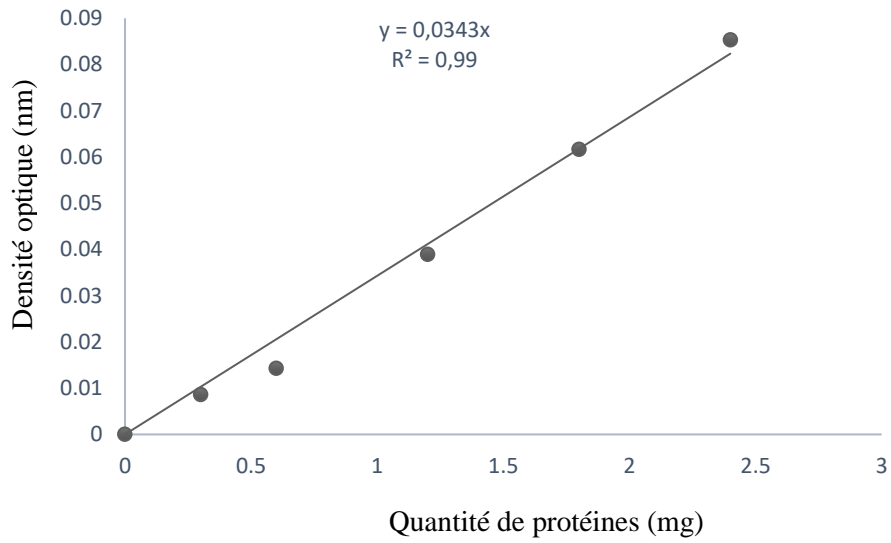
### **ANNEXE III**

**Coefficients d'extinction molaire pour AlamarBlue®**

<b>Longueurs d'onde (λ) (nm)</b>	<b>ε<sub>RED</sub></b>	<b>ε<sub>OX</sub></b>
540	104,395	47,619
570	155,677	80,586
600	14,652	117,216
630	5,494	34,798

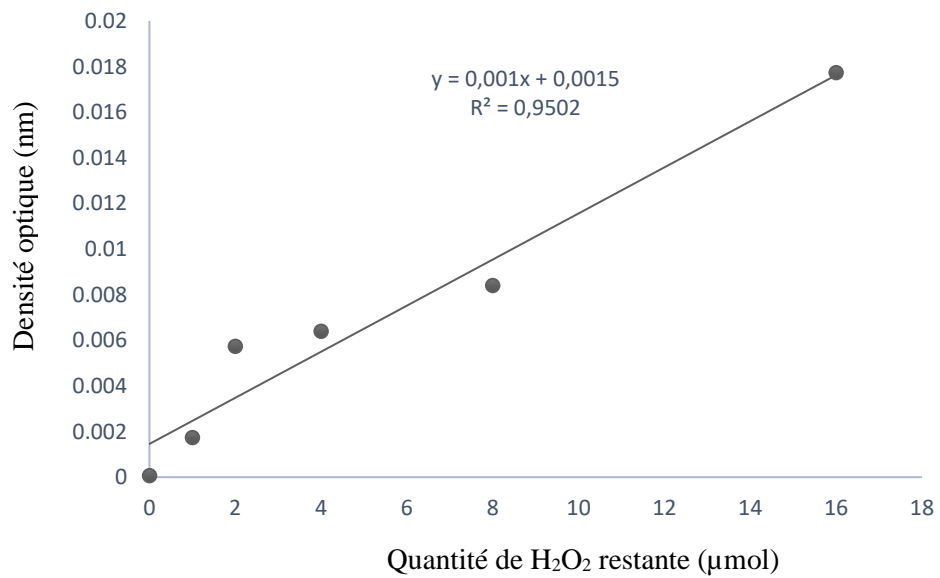
## ANNEXE IV

### Courbe d'étalonnage des protéines totales



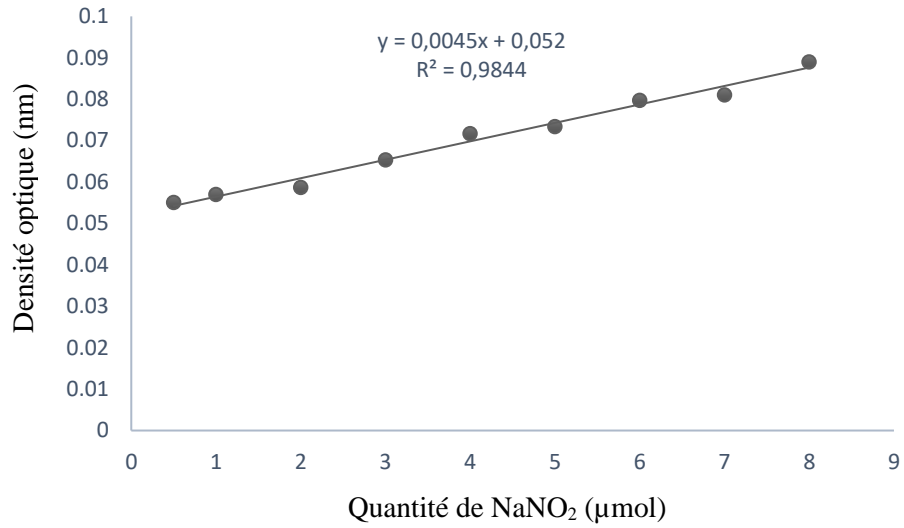
## ANNEXE V

### Courbe d'étalonnage de la catalase



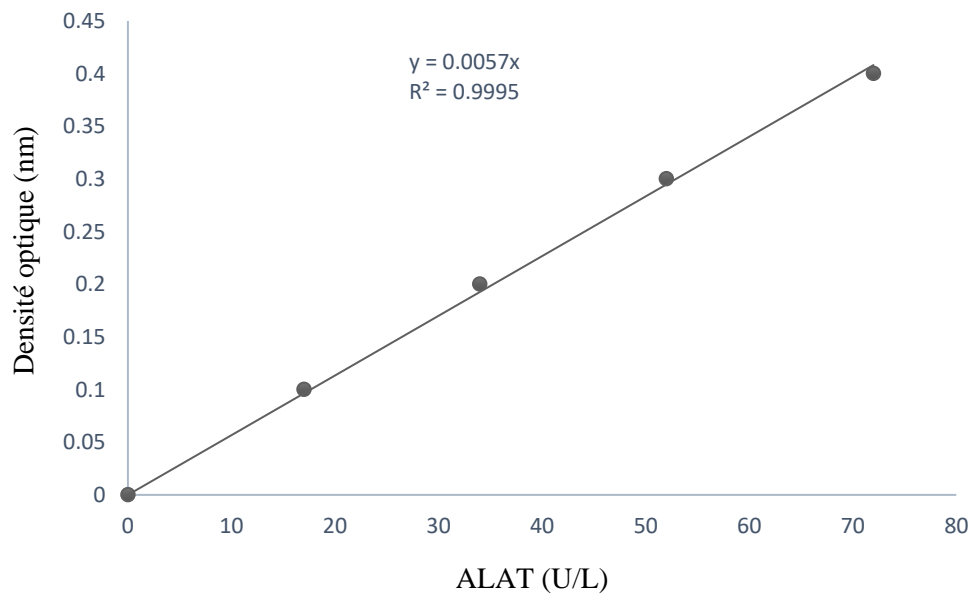
## ANNEXE VI

### Courbe d'étalonnage des nitrites



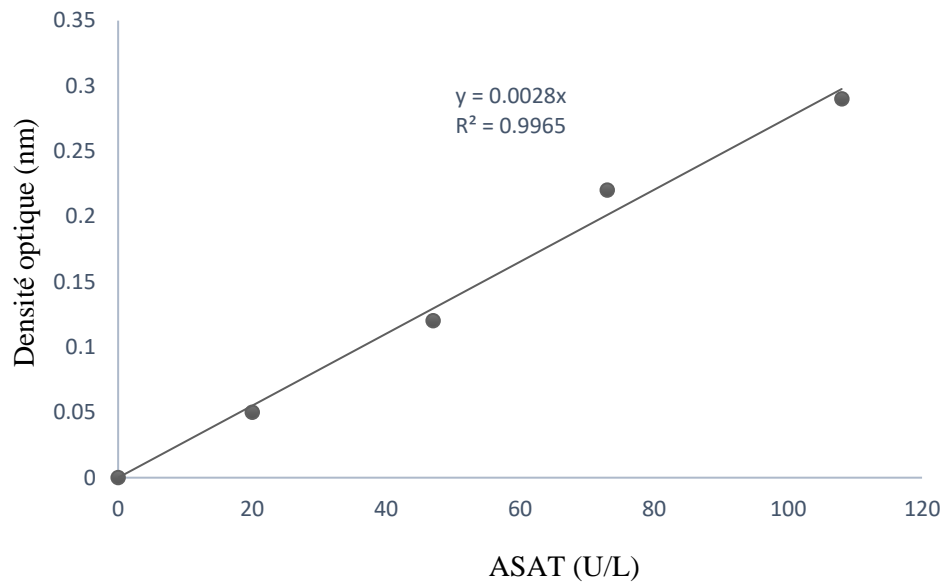
## ANNEXE VII

### Courbe d'etalonnage de l'ALAT



## ANNEXE VIII

### Courbe d'etalonnage de l'ASAT



**ARTICLES ISSUS DE  
LA THESE**



## **Acute and Subacute Toxicological Assessment of the Leaf Aqueous Extract of *Eremomastax speciosa* (Acanthaceae) in Wistar Rats**

**Gaël Tchokomeni Siwe<sup>1</sup>, George Enonchong Enow-Orock<sup>2</sup>,  
André Perfusion Amang<sup>3</sup>, Christophe Mezui<sup>4</sup>, Alain Bertrand Dongmo<sup>5</sup>  
and Paul Vernyuy Tan<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science,  
University of Yaoundé I, Yaoundé, P.O.Box 812, Cameroon.

<sup>2</sup>Department of Biomedical Sciences, Faculty of Health Science, University of Buea, Buea,  
Cameroon.

<sup>3</sup>Department of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Maroua, P.O.Box 46, Maroua,  
Cameroon.

<sup>4</sup>Department of Animal Biology, Higher Teacher Training College, ENS, University of Yaoundé I,  
Yaoundé, Cameroon.

<sup>5</sup>Department of Animal Biology, Faculty of Science, University of Douala, P.O.Box 24157, Douala,  
Cameroon.

### **Authors' contributions**

*This work was carried out in collaboration among all authors. Authors GTS, ABD and PVT designed the study and wrote the protocol. Authors GTS, APA and CM managed the biochemical analysis, author GEEO conducted the analysis of histological sections, authors GTS and PVT did the literature search and statistical analysis, author GTS wrote the first draft, authors GEE, ABD and PVT supervised the study. All authors read and approved the final manuscript.*

### **Article Information**

DOI: 10.9734/JAMPS/2015/18361

Editor(s):

(1) Franciszek Burdan, Experimental Teratology Unit, Human Anatomy Department, Medical University of Lublin, Poland.

Reviewers:

(1) Anonymous, Istanbul Yeni Yuzyil University, Turkey.

(2) Edet O. Akpanyung, Department of Biochemistry, University of Uyo, Uyo, Nigeria.

(3) Davi Oliveira e Silva, Institute of Microbiology and Immunology Paulo de Góes, Brazil.

Complete Peer review History: <http://sciencedomain.org/review-history/9846>

**Original Research Article**

**Received 17<sup>th</sup> April 2015**  
**Accepted 23<sup>rd</sup> May 2015**  
**Published 18<sup>th</sup> June 2015**



## ABSTRACT

**Aim:** The present study was carried out to investigate the possible toxic effects of the leaf aqueous extract from *Eremomastax speciosa* and also to evaluate the acceptable safety level of this extract in Wistar rats.

**Place and Duration of Study:** Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Sciences of the University of Yaounde I, between September and December 2013.

**Methodology:** The acute assay used 9 female rats distributed into 3 groups of 3 rats each. A control group received distilled water and the two test groups received by oral route a unique dose of the extract at 2000 mg/kg with 48 hours interval. In the subacute assay, 60 rats of both sexes were distributed into 6 groups of 10 rats each (5 males and 5 females) and received the extract by oral route for 28 days consecutively. The tests groups received the extract at doses of 400, 800 and 1600 mg/kg. The controls and satellite test groups received, respectively, distilled water and extract at the dose of 1600 mg/kg. Anthropometric, hematological and biochemical parameters were measured and histological sections of liver, kidneys and lungs were realized.

**Results:** The results showed no signs of toxicity such as general behavior change, mortality or change in gross appearance of internal organs even at high dose (2 g/kg). In subacute toxicity assay few modifications were observed in hematological and biochemical parameters. Histopathology showed the presence of disturbances at the dose of 800 and 1600 mg/kg particularly in the females.

**Conclusion:** The aqueous extract of the leaves of *E. speciosa* could be moderately toxic at high doses and adequate caution should be exercised in its use in ethnomedicine.

**Keywords:** *E. speciosa*; acute toxicity; subacute toxicity; Wistar rats.

## 1. INTRODUCTION

The use of traditional and complementary medicine is becoming widely popular both in the developing as well as in the developed nations. The increasing cost, non-availability of modern drugs and limited access to adequate health care have compelled about 80% of the world population to use traditional pharmacopoeia for primary health care [1]. Since the mid-nineteenth century, serious efforts have been made to isolate and purify the active principles of these remedies. Thus a large variety of biologically-active compounds have been obtained and their structures determined e.g. morphine from the opium plant, cocaine from coca leaves, and quinine from the bark of the cinchona tree [2]. Some of the most common practices involve the use of crude plant extracts which may contain a broad diversity of molecules with often unknown biological effects [3]. Besides this, the fact that a drug has a natural origin does not assure its innocuousness. Therefore, a pre-clinical toxicity study is indispensable to validate their safe medicinal use [4].

*Eremomastax speciosa* (Hochst.) Cufod. (Acanthaceae) is a plant widely distributed in tropical Africa and is one of the two species of the genus *Eremomastax* (syn. *Paulo wilhelmia* (Lindau); and *Ruellia* (S. Moore)). It is a robust, polymorphous shrub that grows to 2 m high and

has a characteristic quadrangular stem and violate underside of the leaves which has earned for it the local name *Pang nyemshe*, meaning 'red on one side' in the Bamileke region of Cameroon [5]. This plant is commonly used in Cameroonian ethnomedicine for the treatment of various stomach complaints and information from tradipractitioners suggested that it possesses antiulcer effects. The antidiarrhoeic activity of *E. speciosa* leaf aqueous extract has been reported [6]. The leaf extract is used for the treatment of male infertility among the *Ifa Nkari* people of Akwa Ibom State, Nigeria (where it is known commonly as "golden seal"; "African blood tonic plant"; local name, *Edem Ididout*, *Ndana-edem*) [7]. Its widely-claimed anti-anemic activity has been experimentally demonstrated by authors [8] who also showed anti-microbial actions against pure clinical cultures of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. The Douala people of Cameroon employ *E. speciosa* variously for malaria, kidney pain, scabies, anemia, diabetes, and nerve pain [9]. *E. speciosa* has been cited for its local use in the treatment of female infertility in the west region of Cameroon [10], as well as for its use in the treatment of irregular menstruation by the Aguambu-Bamumbu peoples of the Lebialem highlands in the South West Region of Cameroon [11]. The plant has also been cited [12] for the treatment of

appendicitis, menstrual pains, gonorrhoea, burns, as an anti-poison, and to increase and purify blood in the mount Cameroon region. Phytochemical screening of the water extract of *E. speciosa* revealed the presence of tannins, alkaloids, resins, flavonoids, anthocyanins, phenols, quinones, oils, sterols, triterpenoids, glycosides and proteins [13].

In spite of the wide ethnotherapeutic applications of the plant, there is no literature information related to the safety limits of *Eremomastax speciosa* aqueous extract in traditional medicine. Thus, in the present study, we evaluated the oral acute and subacute toxicity of the aqueous extract of the leaves of *E. speciosa* in rats.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Materials

#### 2.1.1 Plant material

The leaves of *E. speciosa* plant were collected in May 2013 in Yaoundé (Centre Region of Cameroon) and identified botanically by Paul Mezili of the Cameroon National Herbarium (by comparison with existing voucher specimen No. HNC/136984).

#### 2.1.2 Animal

Adult female Wistar rats (140-150 g) were used for acute toxicity and young Wistar rats of both genders (85-90 g) were used for subacute toxicity. The female rats were nulliparous and non-pregnant. The animals were raised in the Animal house of the Animal Physiology Laboratory, Faculty of Science, University of Yaounde I. They were fed with a standard laboratory diet and tap water *ad libitum*. Each cage contained 3 to 5 rats of the same sex with a bedding of wood shavings. Natural day/night cycles were provided. Environmental conditions (a temperature of  $26^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  and a relative humidity of  $60\%\pm 10\%$ ) were maintained. Prior authorization for the use of laboratory animals in this study was obtained from the Cameroon National Ethics Committee (Reg. No. FWA-IRB00001954). The use, handling and care of animals were done in adherence to the European Convention (Strasbourg, 18.III.1986) for the protection of vertebrate animals used for experimental and other purposes (ETS-123), with particular attention to Part III, articles 7, 8 and 9.

### 2.2 Methods

#### 2.2.1 Preparation of plant extract

The leaves were chopped and quickly dried in the shade to avoid them getting moldy and then ground in a mechanical grinder to obtain a fine powder. Eight hundred grams (800 g) of powder were extracted by infusion in 5 liters of boiled distilled water for 15 minutes. After filtration through Whatman filter paper No. 3, the filtrate was evaporated at  $40^{\circ}\text{C}$  using a Raven convection air oven (Jencons-PLS, UK). The brownish solid obtained (150.8 g (18.85% yield)) was stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for subsequent experiments.

#### 2.2.2 Acute toxicity

Acute toxicity assay was carried out according to the Organization of Economic Co-operation and Development (OECD) guideline No. 423 for testing of chemicals [14]. The overnight fasted (water *ad libitum*) female rats were divided into 3 groups of 3 animals each. Animals in the control group received distilled water. The first test group received, by oral route, a unique dose of the extract at 2000 mg/kg and the second test group (the confirmation group), received the same dose of extract 48 hours later. Neither food nor water was given up to 4 h after extract administration and the animals were observed closely during this time for any toxicity manifestations. Body weight change, signs of toxicity, behavior and mortality were observed for the initial 24 hours after extract administration and once daily for 14 days.

#### 2.2.3 Subacute toxicity

The repeated doses (28 days) procedure for oral toxicity study was carried out in rats according to the OECD test guideline No. 407 [15]. Sixty rats of both sexes were distributed into 6 groups of 10 rats each (5 males and 5 females) as follows: Group I (Control; distilled water), Groups II, III and IV (extract: 400, 800 and 1600 mg/kg, respectively). They received vehicle or extract daily for 28 days. The remaining 20 rats were distributed into 2 satellite groups (distilled water, 1600 mg/kg extract) that were equally treated for 28 days, but were allowed an extra 2 week period of observation after treatment withdrawal. Body weight, food and water intake were measured daily. The animals were observed daily for any death and abnormal clinical signs during the entire study period. At the end of the treatment period, 40 animals (Control I and Groups III, IV & V) were fasted overnight (water

*ad libitum*). On day 29, the animals were weighed, and sacrificed (one at a time) using an overdose of ether. Each rat was opened up surgically and blood samples were drawn by cardiac puncture. Blood was collected into tubes with and without ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) for hematological and biochemical analysis, respectively. The internal organs such as liver, kidneys, stomach, spleen, lungs, heart and testis/ovaries were excised, prepared for gross pathology and weighed (paired organs were weighed together) to determine relative organs weights. Liver, kidney and lung tissue samples were rinsed in 0.9% saline and preserved in 10% neutral buffered formaldehyde solution for histopathological examination. Fourteen days later, the 20 remaining animals (Control II & Group VI) were sacrificed and submitted to the same procedures as above in order to observe reversibility, persistence or delayed occurrence of toxic effects.

#### *2.2.3.1 Hematological parameters*

Blood samples were collected into sample tubes containing EDTA. The tubes were shaken gently to mix up the blood with EDTA and prevent clotting. Red blood cell count (RBC), white blood cell count (WBC), differential leukocyte count (lymphocyte, monocyte, granulocyte), platelets, hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular volume (MCV) were determined using an automatic analyzer (Hospitex Diagnostics Hema Screen 18).

#### *2.2.3.2 Biochemical parameters*

Blood samples collected without anticoagulant were immediately centrifuged at 3400 rpm for 10 minutes to obtain serum for analysis of biochemical parameters. The serum was carefully aspirated with a Pasteur pipette into sample bottles for the various biochemical assays. Serum contents of alanine aminotransferase (ALAT), aspartate aminotransferase (ASAT), triglyceride, cholesterol (Chol) (total, HDL and LDL), creatinine, urea, total bilirubin and total protein were evaluated using standard analytical kits obtained from Fortress Diagnostics Ltd, UK. Atherogenic index was calculated as described by authors [16].

#### *2.2.3.3 Histopathological examination*

Tissue samples of liver, kidneys and lungs preserved in 10% neutral buffered formaldehyde

solution were dehydrated using upgraded ethanol series and embedded in paraffin blocks. Ultra-thin sections (5  $\mu$ m) were de-waxed by xylene, rehydrated through a degraded ethanol series and stained with hematoxylin and eosin (H&E). A pathologist (Author GEE) performed the histopathological examination with an optical microscope and microphotographs of the sections were recorded.

### **2.2.4 Statistical analysis**

Statistical analysis was done by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett's test for multiple comparisons and p values less than 0.05 were considered as significant. The results are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM).

## **3. RESULTS**

### **3.1 Acute Toxicity**

The limit dose of 2000 mg/kg did not cause death or any toxic signs in treated female rats. All six rats were normal throughout the study and survived until the end of the 14-day experimental period. No behavioral changes such as tremor, convulsion, self-mutilation, salivation, lethargy or sleep were observed during the first four hours of *E. speciosa* extract administration. No changes in feces and body coat condition and reactivity to noise and touch were observed. The eating habits (26.13-45.63 g/animal/day) and drinking habits (13.00-18.66 ml/animal/day) of all the animals (Tables 1 & 2) remained normal, and there were no significant differences in body and organ weights of rats treated with the extract compared with the controls. Macroscopic examination did not reveal any changes in organ condition.

### **3.2 Subacute Toxicity**

No deaths, unusual changes in behavior or in locomotor activity were recorded and no signs of intoxication were observed during the 28-day treatment period. Significant differences (in males) were found in growth rate between the satellite control group and the animals treated with the highest dose of the extract (Table 3). The relative organ weights showed no significant differences between treated and control groups (Table 4). The macroscopic observation of the target organs (liver, lung, heart, spleen, kidney and sex organs) of the treated animals did not show significant changes in color and texture when compared with the controls.

Hematological parameters; RBC, HGB, MCHC, MCH and MCV in both control and experimental rats, were not significantly different. However, in male rats, platelet counts significantly decreased from  $810 \pm 143 \times 10^3/\mu\text{L}$  in the controls to  $632 \pm 45 \times 10^3/\mu\text{L}$  at the dose of 800 mg/kg. WBC counts of the extract-treated groups increased in the females ( $9.57 \pm 0.25$  vs  $24.02 \pm 6.78 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) and decreased in the males ( $14.50 \pm 0.98$  vs  $7.90 \pm 2.06 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) compared with the controls (Table 5).

The results of biochemical parameters in rats treated with various doses of the aqueous extract of *E. speciosa* for 28 days are shown in Table 6. In the extract-treated male rats, none of the parameters was significantly different compared with the controls. But in female rats, ASAT significantly increased from  $112.70 \pm 37.32$  u/l in the controls to  $211.84 \pm 48.48$  U/L at the doses of 800 and 1600 mg/kg while total bilirubin values increased from  $2.08 \pm 0.49$  mg/dl to  $5.21 \pm 1.10$  mg/dl for the same extract doses compared with the 28 day controls.

Histology of the liver sections of control rats showed normal hepatic architecture and normal liver lobular structure with portal triad, prominent nucleus and well-preserved cytoplasm. Hepatic cell damage was not perceptible for the lower dose (400 mg/kg) but at the higher doses (800 and 1600 mg/kg), the liver sections showed histological disturbances characterized by localized inflammation, cell degeneration, vascular congestion and biliary stasis (Figs. 1 & 2).

Histopathological examination of kidney sections showed generalized tubular epithelial cell necrosis associated with reduction of glomerular space and scattered inflammation at the dose of 1600 mg/kg. At the lower doses, cellular architecture was not different when compared with controls (Figs. 1 & 2).

Histology of the lung sections of control rats and of all the extract-treated groups revealed a normal architecture with bronchioles, thin-walled alveoli and alveolar sacs. However, at the dose of 1600 mg/kg, histopathological examination showed the presence of very developed alveoli in both sexes (Figs. 1 & 2).

#### 4. DISCUSSION

The results of the acute toxicity study indicated that the water extract of *E. speciosa* administered by oral route at the dose of 2000 mg/kg did not produce death or any sign of toxicity in the rats indicating that the LD50 of the extract is greater than 2000 mg/kg of body weight. No signs of writhing and body weakness were observed following acute intake as reported by authors [8] who administered the extract of *E. speciosa* by intraperitoneal route. There were no significant differences in organ and body weights in the extract-treated groups compared with the control. In line with the chemical labeling and classification of acute systemic toxicity, the water extract of *E. speciosa* can be assigned to the lowest toxicity class (class 5; no label; unclassified) [14].

Acute toxicity data are of limited clinical application since cumulative toxic effects do occur even at very low doses. Hence multiple dose studies are almost always essential in evaluating the safety profile of phytomedicines. Thus, subacute toxicity study was carried out for evaluation of long-term effects of the water extract of *E. speciosa*. The study revealed that no adverse clinical sign or toxicity sign or death was observed throughout the treatment duration of 28 days in the rats. This is in line with the acute toxicity studies where experimental animals treated orally with the extract doses up to 2000 mg/kg body weight showed neither toxicity sign nor death in mice. This may be an indication that long-term oral administration of the extract within this dose range may be safe.

**Table 1. Effects of the extract on the food intake (g/animal/day) in acute assay**

	Day 1	Day 2-5	Day 6-9	Day 10-13	Day 14	Day 1-14
Control	36.30	41.29	42.86	42.60	38.26	40.26
Extract	31.30	31.76	39.10	39.35	33.73	35.05

**Table 2. Effects of the extract on the water intake (ml/animal/day) in acute assay**

	Day 1	Day 2-5	Day 6-9	Day 10-13	Day 14	Day 1-14
Control	17.33	14.25	14.67	15.83	13.00	15.01
Extract	16.66	17.25	16.00	17.50	18.00	17.08

**Table 3. Effects of the extract on the body weight (g) in subacute assay**

	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 35	Day 42
<b>Male</b>							
Control (dH <sub>2</sub> O)	84.4±3.6	103.6±4.8	128.4±5.9	143.1±10.2	157.2±6.9	-	-
Extract (400 mg/kg)	78.6±3.3	96.4±4.3	112.6±6.3	130.8±4.6	150.7±6.4	-	-
Extract (800 mg/kg)	81.2±4.2	104.4±4.7	129.5±8.2	146.0±7.3	160.9±7.9	-	-
Extract (1600 mg/kg)	83.9±4.8	99.7±3.9	121.9±7.9	141.4±9.2	157.1±6.4	-	-
Satellite (dH <sub>2</sub> O)	85.1±3.8	103.9±4.2	118.7±6.9	128.3±8.4	148.8±4.7	164.6±10.4	166.8±10.1
Sat (Extract 1600 mg/kg)	89.7±5.9	111.1±4.6	138.3±5.7*	155.2±8.3*	174.5±6.5*	193.4±8.7*	180.2±7.9*
<b>Female</b>							
Control (dH <sub>2</sub> O)	80.3±3.9	99.4±5.4	118.8±8.23	133.2±6.3	142.3±8.4	-	-
Extract (400 mg/kg)	80.7±4.8	99.3±6.4	116.2±8.2	128.0±5.7	137.1±7.9	-	-
Extract (800 mg/kg)	82.2±5.2	99.2±4.6	116.0±7.3	127.4±7.4	139.0±6.8	-	-
Extract (1600 mg/kg)	82.8±4.2	99.7±4.6	115.8±6.6	127.1±3.6	138.1±10.5	-	-
Satellite (dH <sub>2</sub> O)	83.1±4.8	101.8±8.6	117.4±5.8	124.9±7.3	129.8±6.5	134.4±6.5	148.6±9.9
Sat (Extract 1600 mg/kg)	81.0±4.3	101.5±6.9	106.4±7.4	117.9±6.5	126.7±8.1	129.9±6.4	140.3±7.5

Values are expressed as mean ± S.E.M. (n=5), \*p<0.05; statistically significant compared to control II. Sat=Satellite

**Table 4. Effects of the extract on the relative organ weights (g/100 g of b.w.) in subacute assay**

	Heart	Lungs	Kidneys	Liver	Stomach	Spleen	Testis/Ovaries
<b>Male</b>							
Control (dH <sub>2</sub> O)	0.336±0.02	0.811±0.04	0.678±0.05	3.593±0.07	0.728±0.06	0.285±0.02	1.203±0.09
Extract (400 mg/kg)	0.317±0.02	0.619±0.04	0.663±0.06	3.465±0.07	0.727±0.04	0.27±0.03	1.218±0.08
Extract (800 mg/kg)	0.311±0.03	0.625±0.03	0.636±0.05	3.442±0.05	0.685±0.06	0.283±0.03	1.222±0.03
Extract (1600 mg/kg)	0.308±0.02	0.623±0.03	0.615±0.04	3.323±0.06	0.637±0.05	0.317±0.02	1.377±0.06
Satellite (dH <sub>2</sub> O)	0.367±0.04	0.601±0.03	0.654±0.04	3.642±0.08	0.794±0.07	0.262±0.03	1.26±0.08
Sat (Extract 1600 mg/kg)	0.296±0.01	0.719±0.04	0.591±0.04	3.231±0.07	0.701±0.08	0.266±0.03	1.329±0.07
<b>Female</b>							
Control (dH <sub>2</sub> O)	0.362±0.03	0.735±0.08	0.712±0.07	3.96±0.11	0.666±0.08	0.338±0.03	0.06±0.06
Extract (400 mg/kg)	0.333±0.03	0.668±0.06	0.691±0.07	3.797±0.13	0.677±0.06	0.306±0.02	0.072±0.005
Extract (800 mg/kg)	0.368±0.04	0.847±0.09	0.671±0.03	3.493±0.13	0.727±0.8	0.264±0.01	0.075±0.007
Extract (1600 mg/kg)	0.354±0.03	0.723±0.07	0.698±0.04	3.34±0.10	0.778±0.09	0.284±0.03	0.071±0.007
Satellite (dH <sub>2</sub> O)	0.382±0.02	0.684±0.06	0.682±0.05	3.796±0.10	0.675±0.07	0.304±0.02	0.071±0.005
Sat (Extract 1600 mg/kg)	0.348±0.02	0.771±0.08	0.681±0.08	3.042±0.06	0.786±0.06	0.315±0.04	0.081±0.008

Values are expressed as mean ± S.E.M. (n=5) Sat=Satellite

Table 5. Effects of the extract on hematological parameters in subacute toxicity

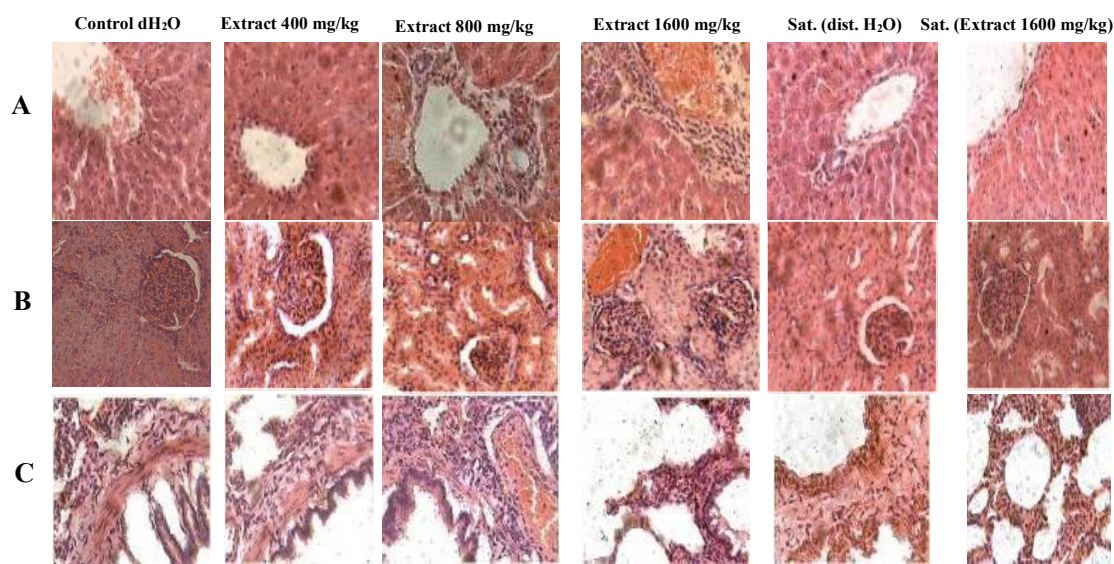
	Control (dH <sub>2</sub> O)	Extract (400 mg/kg)	Extract (800 mg/kg)	Extract (1600 mg/kg)	Satellite (dH <sub>2</sub> O)	Satellite (extract 1600 mg/kg)
<b>Male</b>						
RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	6.40±0.33	7.30±0.12	6.15±0.84	7.12±0.24	6.60±1.37	6.56±0.32
WBC (10 <sup>3</sup> /μl)	14.50±0.98	10.47±1.98	9.82±2.17	7.90±2.06*	14.27±0.66	15.52±0.69
Lymphocyte (%)	53.55±4.54	69.20±4.04*	65.60±2.10	68.73±2.57	64.12±6.13	72.10±1.02
Monocyte (%)	15.20±0.52	18.40±2.27	19.77±1.08	19.02±1.19	18.97±2.60	13.52±1.73
Granulocyte (%)	31.25±5.07	12.40±1.78**	14.60±1.91**	11.32±0.90**	16.90±3.70	14.37±2.51
Platelets (10 <sup>3</sup> /μl)	810±143	632±45	561±120*	739±119	611±86	521±162
HGB (g/dl)	10.92±0.69	11.82±0.43	10.85±0.67	11.47±0.47	15.92±3.59	11.60±1.44
HCT (%)	34.30±1.79	38.47±0.40	34.32±2.34	37.92±1.29	36.85±7.26	33.25±1.79
MCHC (g/dl)	31.77±0.56	30.72±0.80	31.82±2.06	30.30±0.75	35.70±5.96	33.10±4.36
MCH (pg)	17.05±0.69	16.20±0.43	18.70±2.79	16.12±0.47	21.82±1.89	21.55±2.15
MCV (fl)	53.50±1.25	52.75±0.47	58.00±5.74	53.00±0.40	55.50±5.90	50.75±1.65
<b>Female</b>						
RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	6.57±0.43	6.65±0.34	7.27±0.39	6.72±0.15	7.18±0.26	6.09±0.27
WBC (10 <sup>3</sup> /μl)	9.57±0.25	24.02±6.78**	14.35±2.49	23.80±5.72**	8.92±0.62	18.50±2.33#
Lymphocyte (%)	67.97±3.03	67.12±2.42	64.32±0.89	60.55±6.86	77.00±2.43	65.20±8.69
Monocyte (%)	17.25±0.98	15.40±0.34	16.90±1.17	15.32±1.17	13.47±0.89	12.20±1.36
Granulocyte (%)	14.77±2.18	17.42±2.22	18.75±2.05	24.07±1.18*	10.80±1.74	18.25±5.14#
Platelets (10 <sup>3</sup> /μl)	661±36	498±81	599±103	641±42	656±30	590±50
HGB (g/dl)	10.75±0.73	11.00±0.68	11.42±0.39	11.10±0.31	12.10±0.51	11.72±0.21
HCT (%)	34.20±2.71	33.82±1.65	38.32±2.66	35.07±0.54	35.15±1.48	31.15±0.75
MCHC (g/dl)	31.55±1.11	32.35±0.57	30.10±1.53	31.65±0.49	34.42±0.37	37.65±1.14
MCH (pg)	16.37±0.71	16.25±0.54	15.77±0.65	16.50±0.23	16.85±0.38	19.32±0.70
MCV (fl)	51.75±1.03	51.00±1.00	52.25±1.10	52.00±0.91	48.75±0.75	51.25±1.43

Values are expressed as mean ± S.E.M. (n=5), \*p<0.05; \*\*p<0.01: statistically significant compared to control I. #p<0.05: statistically significant compared to control II. dH<sub>2</sub>O=distilled water

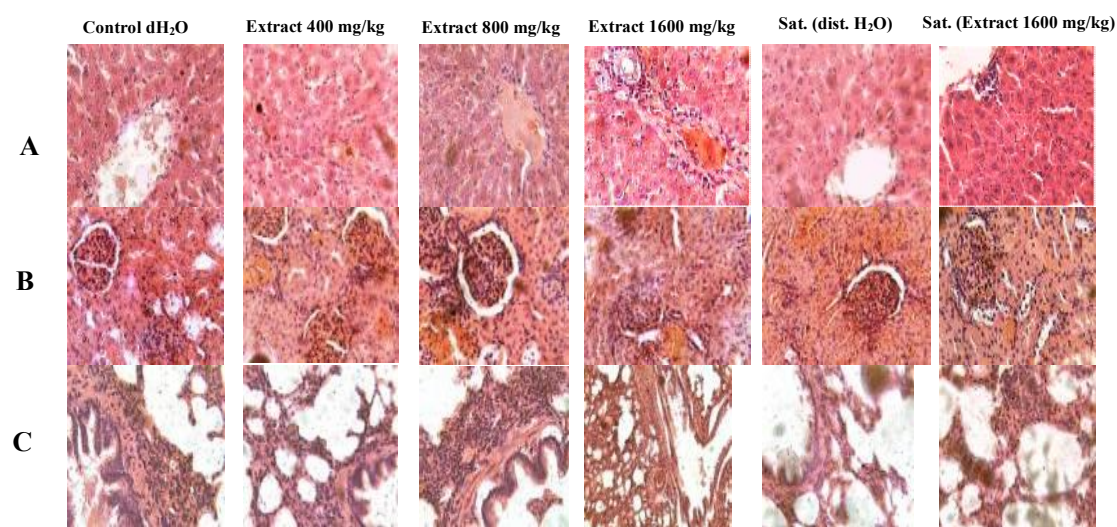
**Table 6. Effects of the extract on biochemical parameters in subacute toxicity**

	Control (dH <sub>2</sub> O)	Extract (400 mg/kg)	Extract (800 mg/kg)	Extract (1600 mg/kg)	Satellite (dH <sub>2</sub> O)	Satellite (extract 1600 mg/kg)
<b>Male</b>						
ALAT (U/l)	63.60±9.54	58.65±12.15	47.65±7.66	52.25±14.29	53.72±12.4	67.45±9.71
ASAT (U/l)	117.33±24.84	143.54±36.43	129.21±23.89	133.70±37.90	116.52±18.76	155.23±21.02
Total Chol (mg/dl)	117.76±10.42	129.00±18.21	118.40±6.59	135.52±8.83	115.25±4.99	132.68±15.02
Triglyceride (mg/dl)	92.81±20.78	116.01±48.13	114.55±25.82	84.07±15.74	83.99±9.02	123.00±33.04
HDL-Chol (mg/dl)	66.36±2.78	76.96±11.31	52.11±6.85	72.41±15.41	73.03±9.05	85.45±13.91
LDL-Chol (mg/dl)	32.83±6.43	28.83±5.85	43.38±7.99	46.30±7.32	25.42±4.23	22.63±4.05
Atherogenic index	1.77±0.21	1.68±0.13	2.27±0.44	1.87±0.35	1.58±0.27	1.55±0.31
Creatinine (mg/dl)	0.71±0.13	0.62±0.10	0.52±0.07	0.57±0.08	0.52±0.05	0.47±0.08
Urea (mg/dl)	51.60±6.40	47.25±17.09	67.40±7.01	38.50±2.50	49.00±12.97	43.00±6.68
Total bilirubin (mg/dl)	2.57±0.41	2.85±0.89	3.08±0.36	3.18±0.26	2.66±0.50	3.84±0.50
Total protein (mg/dl)	7.08±1.12	9.34±2.05	7.07±1.08	5.85±1.33	6.57±1.12	8.18±2.03
<b>Female</b>						
ALAT (U/l)	69.95±12.71	69.12±8.02	58.52±13.68	61.00±10.66	63.67±7.21	50.50±16.18
ASAT (U/l)	112.70±37.32	134.49±24.64	209.50±29.11*	211.84±48.48*	137.00±23.62	193.25±37.07
Total Chol (mg/dl)	111.00±15.28	122.56±10.82	138.56±6.73	126.00±4.94	119.31±10.89	131.60±5.43
Triglyceride (mg/dl)	102.90±76.64	113.80±30.68	95.52±25.71	127.18±61.37	71.34±9.37	100.96±25.00
HDL-Chol (mg/dl)	66.96±10.65	79.8±16.08	85.15±12.08	81.26±18.21	84.84±8.02	76.96±7.64
LDL-Chol (mg/dl)	23.46±4.22	20.72±3.87	34.31±6.35	19.30±3.45	20.20±3.98	34.45±5.18
Atherogenic index	1.66±0.32	1.55±0.27	1.63±0.30	1.55±0.28	1.41±0.22	1.71±0.34
Creatinine (mg/dl)	0.48±0.07	0.59±0.11	0.44±0.06	0.34±0.05	0.58±0.08	0.39±0.07
Urea (mg/dl)	47.00±13.52	61.50±11.38	60.00±10.67	62.50±9.67	55.25±14.33	44.00±14.60
Total bilirubin (mg/dl)	2.08±0.49	4.27±0.96*	5.21±1.10*	4.84±1.79*	2.76±0.07	3.49±1.03
Total protein (mg/dl)	8.12±1.78	8.15±1.55	8.40±2.07	8.45±1.98	7.43±1.32	8.51±1.77

Values are expressed as mean ± S.E.M. (n=5), \*p<0.05: statistically significant compared to control 1. dH<sub>2</sub>O=distilled water



**Fig. 1. Effects of the extract on histology of liver (A), kidneys (B) and lungs (C) in female rats (H&E × 400). Sat=Satellite**



**Fig. 2. Effects of the extract on histology of liver (A), kidneys (B) and lungs (C) in male rats (H&E × 400) Sat=Satellite**

Changes in body weight (especially weight loss) have been used as an indicator of adverse effects of drugs and chemicals [17]. Significant differences in body weight gain were noted only in the male satellite controls (1600 mg/kg extract) which gained more body weight from weeks 2 to 6 compared with the untreated (distilled water) satellite controls. Since a similar result was not obtained for the extract-treated male rats (1600 mg/kg) that were sacrificed on day 28, it cannot be attributed to an effect of the extract. Changes

in organ weights are also indices of toxicity in animals which are readily determined in long-term toxicity tests. There is a possibility that herbal products, when ingested into the body may be toxic to important organs such as the kidneys, liver, spleen, stomach, and lungs because of their diverse roles in the human body. Macroscopic observation of the major organs showed no abnormalities in morphology, consistency and appearance in the rats treated for 28 days with the extract.



The hematopoietic system is one of the most sensitive targets of toxic compounds and provides important indices of physiological and pathological status in man and animals [18]. Blood constitutes the main medium of transport for many drugs and xenobiotics in the body. For this reason blood components such as red blood cells, white blood cells and blood platelets are often exposed to significant concentrations of toxic compounds. Blood parameter analysis in rodents can provide a high predictive index (up to 91% concordance) for risk of toxicity in humans [19]. Our results showed no significant difference in hematological parameters between controls and treated groups except for the sex-related differential variation of white blood cell count which could be attributed to the presence of compounds in the extract which interact with sexual hormones to maximize their effects on immune response [20]. Indeed some flavonoids such as quercetin can induce opposing actions on white blood cell counts depending on their concentrations and/or different conditions [21]. By the way, our results did not show any concordance with those obtained by authors [8] who demonstrated the anti-anemic actions of *E. speciosa*. This could be due to differences in phytochemical composition between the two extracts. The significant decrease of platelet counts in male rats at the dose of 800 mg/kg may lead to clinical implications such as high risk of hemorrhage due to thrombocytopenia. Clinical symptoms of thrombocytopenia can include prolonged bleeding from cuts, mouse or nose bleeds, blood in urine or stools, unusually heavy menstrual flows, and fatigue. Factors that cause thrombocytopenia include low platelet production by the bone marrow, rapid destruction of platelets by the body (due to autoimmune diseases, medicines or infections), and high platelet retention by enlarged spleen (as in severe liver disease such as cirrhosis). Some medicines such as diuretics, ibuprofen, aspirin and chloramphenicol can slow the production of platelets [22]. The significant reductions in blood platelet counts and platelet aggregation reported in rats given, respectively, aqueous extracts of *Ocimum gratissimum* [23] and *Ocimum basilicum* [24] were attributed to the presence of saponins and cardiac glycosides. The presence of glycosides (but not saponins), has been reported in the aqueous extract of *E. speciosa* [13], and this may be responsible for the decrease in blood platelets observed in this study. The decrease of WBC counts and its differentials in the males such as basophils, monocytes, eosinophils, lymphocytes and neutrophils could be linked to

suppression of leucocytosis in the bone marrow which may induce poor defensive mechanisms against infection; consequentially, they might have effects on the immune system and phagocytic activity of the animals [25,26]. On the other hand, increases in WBC counts can boost the immune system and defensive mechanisms against infection.

Serum biochemical analyses were carried out to evaluate the effect of the extract on hepatic and renal functions and also on lipid profile. Many xenobiotics are capable of causing some degree of liver injury [27]. The liver is prone to xenobiotic-induced injury because of its central role in xenobiotic metabolism, its portal location within the circulation and its anatomical and physiological structure. Generally, analysis of the activities of some basic liver enzymes (such as ALAT and ASAT) in the plasma or serum can be used to indirectly assess the integrity of tissues after being exposed to certain pharmacological agents [28]. Necrosis or membrane damage releases the enzymes into circulation; therefore, they can be measured in the serum. Usually, about 80% of ASAT is found in the mitochondria whereas ALAT is a purely cytosolic enzyme. Therefore, ASAT appears in higher concentrations in a number of tissues (liver, kidneys, heart and pancreas) and is released slowly in comparison to ALAT. But since ALAT is localized primarily in the cytosol of hepatocytes, this enzyme is considered a more sensitive marker of liver inflammation or damage than ASAT and within limits can provide a quantitative assessment of the degree of damage sustained by the liver [29]. The significant increase of ASAT levels in the female rats at the doses of 800 and 1600 mg/kg could therefore be an indication of hepatocellular changes and/or histological changes in organs such as kidneys, heart and pancreas induced by the extract. Bilirubin is formed by the breakdown of hemoglobin in the liver, spleen and bone marrow. Levels of serum bilirubin reflect the liver's ability to take up, process, and secrete bilirubin into the bile. An increase in tissue or serum bilirubin concentrations occurs as a result of increased breakdown of RBC (hemolysis) or liver damage e.g., hepatitis or bile duct obstruction [30]. The high levels of serum bilirubin concentration observed in the female rats at all doses of the extract used in this study are indicative of possible adverse effects of the extract on hemoglobin metabolism pathways or bile duct obstruction. Clinically, this could lead to the complications such as the development of

gallstones either in the gall bladder or in bile ducts. The observed increases in bilirubin levels with little or no increase in ALAT levels in this study are clinical indications of cholestasis [31]. In fact, histology of the liver revealed the presence of inflammatory cells, vascular congestion and biliary stasis at the doses of 800 and 1600 mg/kg of extract. However, ASAT and total bilirubin levels in the satellite control animals left in observation for 14 days tended to revert back towards initial control values. This suggests that any hepatocellular damage induced by *E. speciosa* could be temporary and reversible after medium term intake.

Estimation of total protein is one of the most widely used means of measuring hepatocellular injury. Total protein measurements can reflect nutritional status and may be used to screen for and help diagnose kidney disease, liver disease, and many other conditions. Low total protein levels can suggest a liver disorder, a kidney disorder, or a disorder in which protein is not digested or absorbed properly. High total protein levels may be seen with chronic inflammation or liver infections. Total cholesterol test is used to estimate risk of developing a disease (specifically heart disease) and some liver dysfunctions. Increase in the total protein and cholesterol as well would have indicated hepatocyte damage [32]. There were no significant changes in any liver function parameters (such as total cholesterol, total protein) and in serum lipid profile (triglyceride, HDL, LDL cholesterol) as compared to the control groups. All these results suggest the absence of major hepatotoxicity and cardiovascular risk factors induced by *E. speciosa*.

The kidneys are highly susceptible to toxicants for two reasons; a high volume of blood flows through it and its ability to filter large amounts of toxins which can concentrate in the kidney tubules. It can result in systemic toxicity causing decreased ability to excrete body wastes, inability to maintain body fluid and electrolyte balance and decreased synthesis of essential hormones. Blood urea nitrogen is derived in the liver protein/amino acid from dietary or tissue sources and is normally excreted in the urine. In renal disease, serum urea accumulates because the rate of serum urea production exceeds the rate of clearance [33]. Creatinine, on the other hand, is mostly derived from endogenous sources by tissue creatine breakdown. The plasma creatinine concentrations in normal individuals are usually affected by a number of

factors such as the muscle mass, high protein diet and catabolic state, thus serum urea concentration is often considered the more reliable renal function predictor than serum creatinine [29]. There were no significant changes in the levels of serum creatinine and urea in the treated groups compared with the controls. However, histopathological examination of kidney sections showed that high doses of extract (1600 mg/kg) produced generalized tubular epithelial cell necrosis associated with reduction of glomerular space and scattered inflammation. In toxic injury, renal epithelial cell necrosis is accompanied by massive tissue damage leading to rapid collapse of internal homeostasis of the cell characterized by cell swelling, loss of plasma membrane integrity, major changes to organelles, and swelling of the nucleus. The affected cells rupture, spilling cellular contents into the surrounding tissue space evoking an inflammatory response [34]. Glomeruli play a variety of important functions that are critical in maintaining homeostasis. These include plasma ultrafiltration, regulation of blood pressure and tubular metabolism, and removal of macromolecules from circulation. Many drugs can induce glomerular damage by a variety of pathogenic mechanisms which in turn, can lead to a loss of nephron function and significantly affect blood flow to other nephron segments [35]. Rats given high doses of Cimetidine (an H<sub>2</sub> antagonist of histamine), developed glomerular lesions associated with proteinuria within 2 to 4 weeks of iv injection, the magnitude of proteinuria being proportional to the administered dose. *E. speciosa* extract has been shown to possess gastric antisecretory activity that is achieved through a mechanism of action which may involve the histaminergic pathway similar to cimetidine [13]. Clinically, the drug and chemically induced lesions may lead to irreversible nephron loss, and in an attempt to compensate for this, the remaining nephrons may undergo cellular and functional hypertrophy as well as increased glomerular filtration and glomerular hypertension. These events can set up a cycle of sclerosis, progressive nephron loss, and renal fibrosis which may lead to renal dysfunction and failure [35].

Histological sections of lungs of the rats treated at the dose of 1600 mg/kg revealed the presence of very developed pulmonary alveoli which could be an indication of emphysema or diffuse alveolar damage. Diffuse alveolar damage can lead to various complications in the body including hypoxia (low oxygen tension),

hypercapnia (increased carbon dioxide build-up), pulmonary hypertension (increased pulmonary artery pressure due to compression of the lung vasculature by the collapsed parenchyma) and cardio respiratory arrest. Diffuse alveolar damage can be arrested and stabilized but it is irreversible [36].

## 5. CONCLUSION

The water extract of the aerial parts of *E. speciosa* can be considered safe, as it did not cause either lethality or adverse changes in general behavior of rats in acute toxicity study up to the dose of 2000 mg/kg. The high safety margin of the extract through oral route justifies its widespread use by traditional healers. However, since the extract had effects on selected organ histology and on some hematological and biochemical parameters, caution should be exercised in its use especially at high doses. Further investigations (chronic, reproductive, developmental and genetic toxicity studies) need to be done for the complete elucidation of the safety profile of *E. speciosa*.

## CONSENT

It is not applicable.

## COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

## REFERENCES

1. Wickramasinghe BM. Quality control, screening, toxicity and regulation of herbal drugs. *Mod Phytochem*. 2006;2:25-57.
2. Wamburu RW, Kareru PG, Mbaria JM, Njonge FK, Nyaga G, Rechab SO. Acute and sub-acute toxicological evaluation of ethanolic leaves extract of *Prosopis juliflora* (Fabaceae). *J Nat Sci Res*. 2013; 3(1):8-15.
3. Yakob HK, Uyub AM, Sulaiman SF. Toxicological evaluation of 80% methanol extract of *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) P.H. Raven leaves (Onagraceae) in BALB/c mice. *J Ethnopharmacol*. 2012;142:663-668.
4. Dipak P, Swati D, Ranjitsinh D, Ramachandran AV. Acute and sub-chronic toxicological evaluation of hydro-methanolic extract of *Coriandrum sativum* L. seeds. *Excli J*. 2012;11:566-575.
5. Heine H. Flore du Gabon: Acanthaceae. *Museum Nationale d'Histoire Naturelle*. 1966;3:29-32.
6. Oben JE, Sheila EA, Agbor GA, Musoro DF. Effect of *Eremomastax speciosa* on experimental diarrhoea. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2006;3(1):95-100.
7. Erhabor JO, Idu M, Udo FO. Ethnomedicinal survey of medicinal plants used in the treatment of male infertility among the IFA Nkari people of Ini local government area of Akwalbom State, Nigeria. *Res J Rec Sci*. 2013;2:5-11.
8. Okokon JE, Antia BS, Udoh AE, Akpan MM. Antianaemic and antimicrobial activity of *Eremomastax speciosa*. *J Pharmacol Toxicol*. 2007;2:196-199.
9. Dibong SD, Mpondo ME, Ngoye A, Priso RJ. Modalities of exploitation of medicinal plants in Douala's region. *Am J Food Nutr*. 2011;1(2):67-73.
10. Telefo PB, Lemfack MC, Bayala B, Lienou LL, Goka CS, Yemele MD et al. Enquete ethnopharmacologique des plantes utilisées dans le traitement de l'infertilité féminine dans les localités de Fosson-Wentcheng et Foto, Cameroun. *Phytotherap*. 2012;10:25-34.
11. Focho DA, Ndam WT, Fonge BA. Medicinal plants of Aguambu–Bamumbu in the Lebialem highlands, southwest province of Cameroon. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2009;3(1):1-13.
12. Ndenecho EN. Herbalism and resources for the development of ethnopharmacology in Mount Cameroon region. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2009;3(3):78-86.
13. Amang AP, Tan PV, Nkwengoua E, Nyasse B. Antisecretory action of the extract of the aerial parts of *Eremomastax speciosa* (Acanthaceae) occurs through antihistaminic and anticholinergic pathways. *Adv Pharmacol Sci*. 2014(2014):10. Article ID. Available:<http://dx.doi.org/10.1155/2014/323470>
14. OCDE. Toxicité orale aiguë – Méthode par classe de toxicité aiguë. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. 2001;4:1-14.
15. OCDE. Toxicité orale aiguë – Méthode par classe de toxicité aiguë. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. 2001;4:1-14.
16. Youmbissi TJ, Djoumessi S, Nouedoui C, Ndobbo P, Meli J. Profil lipidique d'un

- groupe d'hypertendus camerounais noirs africains. *Med Afr Noir*. 2001;48(7):305-314.
17. Mukinda JT, Syce, JA. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *J Ethnopharmacol*. 2007; 112:138-144.
  18. Adeneye AA, Ajagbonna OP, Adeleke TI, Bello SO. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark of aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. *J Ethnopharmacol*. 2006;105:374-379.
  19. Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G, et al. Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2000;32:56-67.
  20. Whitacre CC, Reingold SC, O'Looney PA. A gender gap in autoimmunity. *Sci*. 1999;283:1277-1278.
  21. Elliott MJR, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000;52:673-751.
  22. National Heart Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. Available:<http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/thcp/>
  23. Okon UA, Ita SO, Ekpenyong CE, Davies KG., Inyang, OI. Reduction of platelet and lymphocyte counts and elevation of neutrophil counts in rats treated with aqueous leaf extract of *Ocimum gratissimum*; *Afr J Biochem Res*. 2011; 5(9):303-306.
  24. Tohti I, Tursun M, Umar A, Imin H, Moore N. Aqueous extracts of *Ocimum basilicum* L. (Sweet basil) decrease platelet aggregation induced by ADP and thrombin in vitro and rats arterio-venous shunt thrombosis in vivo. *Thromb. Res*. 2006; 118(6):733-739.
  25. Oyedemi SO, Yakubu MT, Afolayan AJ. Effect of aqueous extract of *Leonurus leonurus* (L)R. Br leaves in male Wistar rats. *Hum Exp Toxicol*. 2010;29:377-384.
  26. Torell J, Cillard J, Cillard P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochem*. 1986;25(2): 383-385.
  27. Omiecinski CJ, Heuvel PJV, Perdew GH, Peters JM. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: From biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol Sci*. 2011;120:49-75.
  28. Al-Hashem F. Camel's milk protects against aluminum chloride-induced toxicity in the liver and kidney of white albino rats. *Am J Biochem Biotechnol*. 2009;5:98-108.
  29. Hilaly JE, Israilli ZH, Lyoussi B. Acute and chronic toxicological studies of *Ajugaiva* in experimental animals. *J Ethnopharmacol*. 2004;91(1):43-50.
  30. Shatoor AS. Acute and sub-acute toxicity of *Crataegus aronia* Syn. *Azarolus* (L.) whole plant aqueous extract in Wistar rats. *Am J Pharmacol Toxicol*. 2011;6(2):37-45.
  31. Singh A, Bhat TK, Sharma OP. Clinical biochemistry of hepatotoxicity. *J Clin Toxicol*. 2011;4:1. DOI:10.4172/2161-0495.S4-001.
  32. Aniagu SO, Nwinyi FC, Akumka DD, Ajoku GA, Dzarma S, Izebe KS, et al. Toxicity studies in rats fed nature cure bitters. *Afr J Biotechnol*. 2002;4(1):72-78.
  33. Mayne P, Mayne PD. Clinical chemistry in diagnosis and treatment. A Hodder Arnold Publication. 6<sup>th</sup> Ed. London; 1994.
  34. Ueda N, Shah SV. Tubular cell damage in acute renal failure – apoptosis, necrosis, or both. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15: 318-323.
  35. Robertson JL. Chemically-induced glomerular injury: A review of basic mechanisms and specific xenobiotics. *Toxicol Pathol*. 1998;26(1):64-72.
  36. Tan PV, Enow-Orock GE, Dimo T, Nyasse B, Kimbu SF. Evaluation of the anti-ulcer and toxicity profile of *Aloe buettneri* in laboratory animals. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2006;3(2):8-20.

© 2015 Siwe et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:  
The peer review history for this paper can be accessed here:  
<http://sciencedomain.org/review-history/9846>



ISSN (E): 2320-3862  
ISSN (P): 2394-0530  
NAAS Rating: 3.53  
JMPS 2019; 7(2): 25-29  
© 2019 JMPS  
Received: 14-01-2019  
Accepted: 18-02-2019

**Gaël Tchokomeni Siwe**  
Department of Animal Biology & Physiology, Faculty of Science, P.O. Box 812, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

**Nkwengoua Zondegoumba Ernestine**  
Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, P.O. Box 812, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

**Rukesh Maharjan**  
H.E.J. Research Institute of Chemistry, International Centre for Chemical and Biological Sciences, University of Karachi, 75270, Pakistan

**André Perfusion Amang**  
Department of Biological Sciences, Faculty of Science, P.O. Box 46, University of Maroua, Maroua, Cameroon

**Christophe Mezui**  
Department of Animal Biology, Higher Teacher Training College, ENS, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

**Muhammad Iqbal Choudhary**  
H.E.J. Research Institute of Chemistry, International Centre for Chemical and Biological Sciences, University of Karachi, 75270, Pakistan

**Paul Vernyuy Tan**  
Department of Animal Biology & Physiology, Faculty of Science, P.O. Box 812, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

**Correspondence**  
**Paul Vernyuy Tan**  
Department of Animal Biology & Physiology, Faculty of Science, P.O. Box 812, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

## Comparative GC-MS analysis of two crude extracts from *Eremomastax speciosa* (Acanthaceae) leaves

**Gaël Tchokomeni Siwe, Nkwengoua Zondegoumba Ernestine, Rukesh Maharjan, André Perfusion Amang, Christophe Mezui, Muhammad Iqbal Choudhary and Paul Vernyuy Tan**

### Abstract

This study was designed to identify the possible volatile compounds present in two extracts from *Eremomastax speciosa* leaves. The air-dried leaves were powdered and subjected to extraction using respective solvents; distilled water and methanol/methylene chloride. Then, each of the extracts was further subjected to gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). GC-MS analysis revealed the presence of 22 compounds in aqueous extract and 44 compounds in methanol/methylene chloride extract. Five compounds were found commonly in both extracts. The major constituents identified in aqueous extract were olean-12-en-3-one (28.37%), 2, 7-Dioxaisotwistane (19.77%), 9-oxabicyclo [3.3.1] nonane-2, 6-diol (15.80%) and  $\alpha$ -Amyrin (12.09%). In methanol/methylene chloride extract the major compounds identified were n-hexadecenoic acid (17.74%), stigmaterol (12.81%),  $\gamma$ -sitosterol (10.50%) and  $\alpha$ -Linolenic acid (9.01%). Some of these compounds were already reported to be pharmacologically active. From these results and given that *Eremomastax speciosa* is widely used to treat or prevent many diseases, it is obvious that this plant contains many biologically active compounds and might be exploited for the development of plant-based drugs.

**Keywords:** *Eremomastax speciosa*, GC-MS, aqueous extract, methanol/methylene chloride extract

### Introduction

Plants play a significant role in the prevention and treatment of diseases and can even prevent and reduce the adverse effects of conventional treatments [1]. They can be a source of chemical compounds of biological and pharmacological importance. History reveals that plants are sources of successful drugs and will continuously be important for screening of new lead compounds [2]. An essential part in the investigation on medicinal plant is identification of the biologically active compounds present in plant leading to further biological and pharmacological studies [3-5].

*Eremomastax speciosa* (Hochst.) Cufod. (Acanthaceae) is widely distributed in tropical Africa. It is a robust, polymorphous shrub that grows to 2 m high and it has a characteristic quadrangular stem and violate underside of the leaves, which has earned it the local name *Pang nyemshe*, meaning “red on one side” in the west region of Cameroon [6]. This plant is used in Cameroonian ethnomedicine for the treatment of various stomach complaints and information from tradipracticitioners suggests that it possesses antiulcer effects. The antidiarrhoeic activity of *E. speciosa* leaf aqueous extract has been reported [7]. The leaf extract is used for the treatment of male infertility among the *Ifa Nkari* people of Akwa Ibom State, Nigeria (where it is known commonly as “golden seal”; “African blood tonic plant”; local name, *Edem Ididout*, *Ndana-edem*) [8]. Its widely-claimed anti-anemic activity has been experimentally demonstrated by authors [8] who also showed anti-microbial actions against pure clinical strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. The Douala people of Cameroon employ *E. speciosa* variously for malaria, kidney pain, scabies, anemia, diabetes, and nerve pain [9]. *E. speciosa* has been cited for its local use in the treatment of female infertility in the west region of Cameroon [10], as well as for its use in the treatment of irregular menstruation by the Aguambu-Bamumbu peoples of the Lebialem highlands in the South West Region of Cameroon [11]. The plant has also been cited for the treatment of appendicitis, menstrual pains, gonorrhoea, burns, as an anti-poison, and to

increase and purify blood in the mount Cameroon region [12]. Phytochemical screening of the water extract of *E. speciosa* revealed the presence of tannins, alkaloids, resins, flavonoids, anthocyanins, phenols, quinones, oils, sterols, triterpenoids, glycosides and proteins [13].

In spite of the wide ethnotherapeutic applications of *E. speciosa*, a detailed review of the literature on the plant has shown that so far there are no published reports on the chemical compounds present in *E. speciosa*. So, the aim of the present study was to investigate the volatile compounds present in aqueous and methanol/methylene chloride extracts of *E. speciosa* by using GC-MS analysis.

## Material and Methods

### Plant material

The leaves of *E. speciosa* were harvested in May 2017 in Yaoundé (Centre Region of Cameroon) and identified botanically by the Cameroon National Herbarium (by comparison with existing voucher specimen No. HNC/136984).

### Preparation of plant extracts

The leaves were chopped and quickly dried in the shade to avoid them getting moldy and then ground in a mechanical grinder to obtain a fine powder.

For aqueous extract, eight hundred grams (800 g) of powder were extracted by infusion in 5 liters of boiled distilled water for 15 minutes. After filtration through Whatman filter paper No. 3, the filtrate was evaporated at 40 °C using a Raven convection air oven (Jencons-PLS, UK). The brownish solid obtained (150.8 g (18.85% yield)) was stored at 4 °C for subsequent experiments.

For methanol/methylene chloride (2v/v) extract, 500 grams of the fine ground powder was macerated in 3 L of extraction mixture for 48 hours. After filtration, the solution was evaporated in a rotative evaporator to obtain a paste which was further dried at 40 °C, using a Raven convection air oven (Jencons-PLS, UK) (41.5 g (8.3% yield)).

### Gas chromatography-mass spectroscopic analysis

The GC-MS analysis of volatile compounds from the different extracts of *E. speciosa* was done using Agilent Technologies GC systems with GC-7890A/MS-5975C model (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with HP-5MS column (30 m in length × 0.32 mm in diameter × 0.25 µm in thickness of film). Spectroscopic detection by GC-MS involved an electron ionization system which utilized high energy electrons (70 eV). The carrier gas used was Helium with a flow rate of 1.0 ml/min. The initial temperature was set at 50 °C with increasing rate of 5 °C/min and holding time of about 10 min. Finally, the temperature was increased to 300 °C at 10 °C/min. Each prepared extract was solubilized in respective solvents (chloroform for aqueous extract and methanol for methanol/methylene chloride extract), filtered through a 0.45 µm filter, and then injected in a splitless mode. The compounds were identified by comparison of their mass spectra with standards available in NIST mass spectral library attached to the GC-MS instrument and the results obtained have been tabulated.

### Results and Discussion

The GC-MS spectra confirmed the presence of various components with different retention times as illustrated by figures 1 and 2.

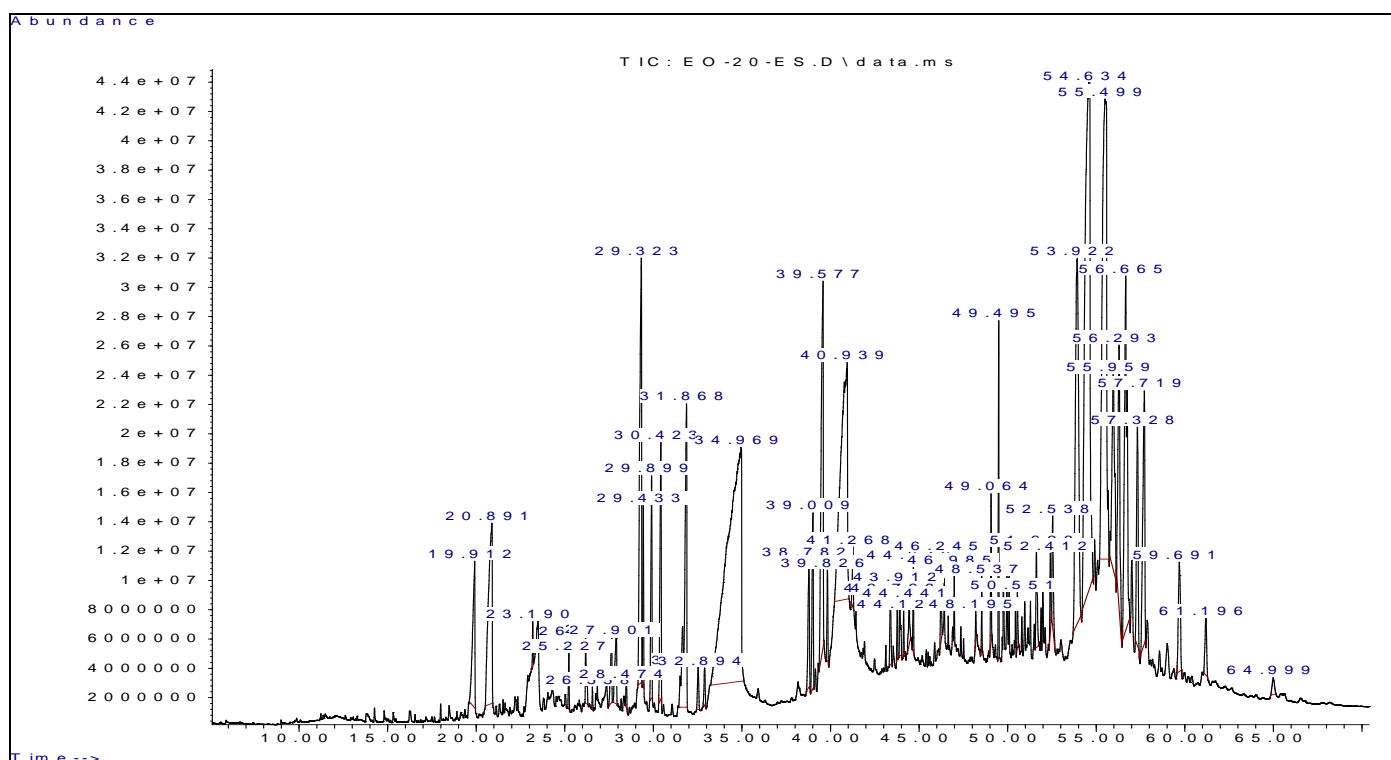


Fig 1: GC-MS chromatogram of methanol/methylene chloride extract of *Eremomastax speciosa*

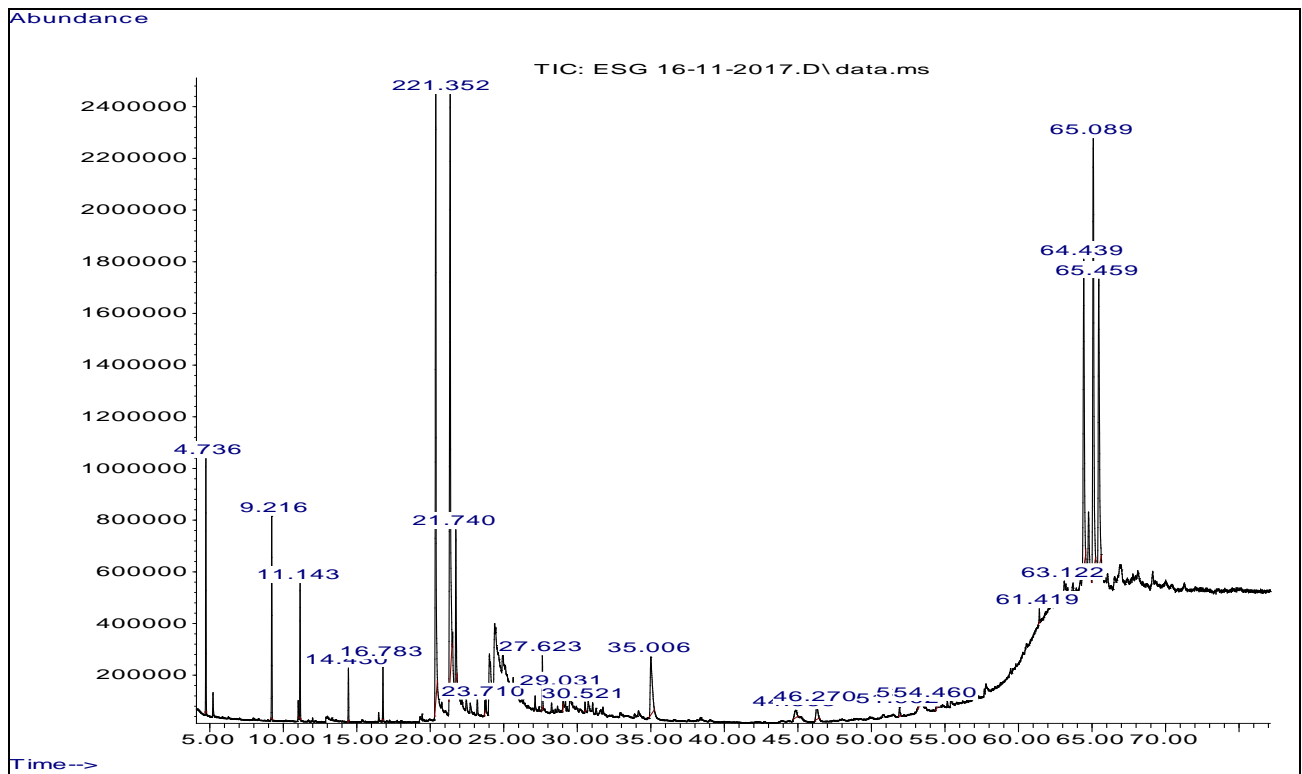


Fig 2: GC-MS chromatogram of aqueous extract of *Eremomastax speciosa*

The compounds identified in both extracts are presented in tables 1 and 2, with their retention time (RT), molecular formula, molecular weight (MW), abundance (peak area%).

Table 1: Phytoconstituents of methanol/methylene chloride extract of *E. speciosa*

No	Names of compounds	Formula	Molecular weight	Retention time (min)	Abundance (%)
1	9-Oxabicyclo[3.3.1]nonane-2,6-diol	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	158	19.91	1.75
2	2,5-Methano-2H-furo[3,2-b]pyran, hexahydro-	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	140	20.89	3.48
3	6,6-Dimethyl-10-methylene-1-oxa-spiro[4.5]decane	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O	180	23.19	0.13
4	4-Hydroxy-β-ionone	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	208	25.22	0.20
5	2-cis-9-Octadecenyloxyethanol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	312	26.26	0.63
6	N-methyl-N-[4-[2-acetoxymethyl-1-pyrrolidyl]-2-butynyl]- Acetamide	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	266	26.56	0.07
7	Tetradecanoic acid	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	228	27.65	0.45
8	9,10-Dimethyltricyclo[4.2.1.1(2,5)]decane-9,10-diol	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	196	27.89	0.57
9	3-Oxo-androsta-1,4-dien-17β-spiro-2'-3'-oxo-oxetane	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	326	28.48	0.09
10	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	268	29.43	0.69
11	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296	30.42	6.99
12	Isophytol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296	32.51	0.25
13	Z-(13,14-Epoxy)tetradec-11-en-1-ol acetate	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	268	32.90	0.23
14	n-Hexadecanoic acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256	34.96	17.74
15	Linoleic acid, methyl ester	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	294	38.78	0.87
16	Linolenic acid, methyl ester	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	292	39.00	1.09
17	Phytol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296	39.57	3.85
18	Octadecanoic acid	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	298	39.82	0.38
19	α-Linolenic acid	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	278	40.94	9.01
20	Stearic acid	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284	41.27	0.38
21	E,E,Z-1,3,12-Nonadecatriene-5,14-	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	294	43.38	0.42
22	Methyl 4-(2-((2-((2-(2-pentylcyclopropyl) methyl) cyclopropyl) methyl) cyclopropyl) methyl) cyclopropyl) butanoate	C <sub>25</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	374	43.76	0.23
23	Oleic Acid	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	282	43.91	0.38
24	7-Methyl-Z-tetradecen-1-ol acetate	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	268	44.13	0.14
25	Eicosanoic acid	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	312	44.44	0.60
26	2-Monopalmitin	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	330	46.24	0.42
27	Ethyl iso-allocholate	C <sub>26</sub> H <sub>44</sub> O <sub>5</sub>	436	48.19	0.29
28	Methyl lignocerate	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	382	48.53	0.20
29	13-Docosenamide	C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO	337	49.06	0.77
30	Squalene	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	410	49.49	1.1
31	Dodecanoic acid	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	200	50.55	0.25
32	γ-Tokoferol	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	416	51.62	0.60
33	cholesterol	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	386	52.40	0.31

34	Campesterol	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	400	53.92	5.72
35	Stigmasterol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	412	54.62	12.81
36	$\gamma$ -Sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	414	55.51	10.5
37	$\alpha$ -Amyrin	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	426	55.98	2.26
38	Lupenone	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O	424	56.29	2.66
39	4,22-Cholestadien-3-one	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O	382	56.67	4.71
40	$\alpha$ -Tocopherol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	430	57.32	2.41
41	Sitostenone	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	412	57.71	2.57
42	3 $\beta$ -methoxy-Stigmasta-5,22-diene,	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	426	59.69	1.19
43	5 $\alpha$ -Stigmastane-3,6-dione	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	428	61.18	0.57
44	3-acetoxy-7,8-Epoxylanostan-11-ol	C <sub>32</sub> H <sub>54</sub> O <sub>4</sub>	502	64.99	0.17

Table 2: Phytoconstituents of aqueous extract of *E. speciosa*

No	Names of compounds	formula	Molecular weight	Retention time (min)	Abundance (%)
1	2,3-Dimethylphenol, tert-butyl dimethylsilyl ether	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> OS	236	4.73	3.96
2	Octamethyl-Cyclotetrasiloxane	C <sub>8</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> Si <sub>4</sub>	296	9.21	3.49
3	3-methoxy-4-[(trimethylsilyloxy)-benzaldehyde	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> S	253	11.14	2.16
4	Decamethyl-cyclopentasiloxane,	C <sub>10</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> Si <sub>5</sub>	370	14.40	0.85
5	1,7-Di(2,5-dimethylphenyl)-2,2,4,4,6,6-hexamethyl-1,3,5,7-tetraoxa-2,4,6-trisilaheptane	C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub> Si <sub>3</sub>	448	16.78	0.92
6	9-Oxabicyclo[3.3.1]nonane-2,6-diol	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	158	20.37	15.80
7	2,7-Dioxaisotwistane	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	140	21.35	19.77
8	5-hydroxy-9-oxabicyclo [3.3.1] nonan-2-one,	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	156	21.74	3.62
9	Boronal	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	206	23.71	0.18
10	11-Isopropylidenetricyclo [4.3.1.1(2,5)]undec-3-en-10-one	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O	202	27.62	1.04
11	Methyl tetradecanoate	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	242	29.03	0.34
12	4-(1,5-Dihydroxy-2,6,6-trimethylcyclohex-2-enyl)but-3-en-2-one	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	224	30.52	0.19
13	Hexadecanoic acid	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270	35.00	3.82
14	Methyl 13-octadecenoate	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	296	44.84	0.59
15	Octadecanoic acid	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	298	46.26	0.86
16	Eicosanoic acid	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	326	51.90	0.25
17	7-Methyl-Z-tetradecen-1-ol acetate	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	268	53.28	0.24
18	Methyl 11-(3-pentyl-2-oxiranyl)undecanoate	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	312	54.46	0.29
19	Ethyl iso-allocholate	C <sub>26</sub> H <sub>44</sub> O <sub>5</sub>	436	61.42	0.22
20	Trilinolein	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	878	63.11	0.93
21	Olean-12-en-3-one	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O	424	65.09	28.37
22	$\alpha$ -Amyrin	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	426	65.45	12.09

The mass spectrometer analyzes the compounds eluted at different times to identify the nature and structure of the compounds. The large compounds fragment into small compounds giving rise to appearance of peaks at different m/z ratios. These mass spectra are fingerprints of those compounds which can be identified from the data library [14].

The GC-MS analysis revealed the presence of 44 compounds in methanol/methylene chloride extract and 22 compounds in the aqueous extract. This significant difference can be easily explained given that recovery of natural compounds depends on the type of solvent used, its polarity index (PI) and the solubility of phenolic compounds in the extraction solvents [15]. Five compounds were found in both extracts.  $\alpha$ -amyrin, 9-oxabicyclo [3.3.1] nonane-2,6-diol and octadecanoic acid were in higher quantities in the aqueous extract while eicosanoic acid and ethyl iso-allocholate were sensibly higher in the methanol/methylene chloride extract. Based on abundance, the major compounds present in the methanol/methylene chloride extract were n-hexadecanoic acid (17.74%), stigmasterol (12.81%),  $\gamma$ -sitosterol (10.50%) and  $\alpha$ -Linolenic acid (9.01%). The aqueous extract contained olean-12-en-3-one (28.37%), 2, 7-Dioxaisotwistane (19.77%), 9-oxabicyclo [3.3.1] nonane-2,6-diol (15.80%) and  $\alpha$ -Amyrin (12.09%) as major compounds.

Some of these major compounds and many others have been found to possess several biological activities. n-Hexadecanoic acid showed anti-inflammatory activity [16]. Stigmasterol has been shown to be anti-hypercholesterolemic, antioxidant, anti-

inflammatory and hypoglycemic [17]. Antidiabetic activity of  $\gamma$ -sitosterol has also been reported [18]. Anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-cancer properties of  $\alpha$ -Amyrin were demonstrated by authors [19].

## Conclusion

The biological activities of compounds present in *E. speciosa* leaves extracts support the medicinal use of the plant. The study revealed major bioactive compounds present in both extracts. Identification of these compounds in the plant serves as the basis for determination of the possible health benefits of the plant leading to further pharmacologic studies. Thus, further studies are needed to isolate active principles of the extracts as well as to elucidate their exact mechanism of action against various disorders.

## Acknowledgement

The authors are thankful to The World Academy of Sciences (TWAS) and International Center for Chemical and Biological Sciences (ICCBS), University of Karachi, Karachi, Pakistan, for supporting and providing facilities for this study.

**Conflicts of interest:** Authors declare that there is no conflict of interests.

## References

1. Bachrach ZY. Contribution of selected medicinal plants for cancer prevention and therapy. Acta Fac Med Naiss.



- 2012; 29(3):117-123.
2. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnol Adv.* 2015; 3(8):1582-1614.
  3. Momin MA, Bellah SF, Rahman SM, Rahman AA, Murshid GM, Emran TB. Phytopharmacological evaluation of ethanol extract of *Sida cordifolia* L. roots. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014; 4(1):18-24.
  4. Farid MM, Hussein SR, Ibrahim LF, Desouky MA, Elsayed AM, Oqlah AA *et al.* Cytotoxic activity and phytochemical analysis of *Arum palaestinum* Boiss. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015; 5(11):944-947.
  5. Guo F, Feng L, Huang C, Ding H, Zhang X, Wang Z, *et al.* Phenylflavone derivatives from *Broussonetia papyrifera* inhibit the growth of breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Phytochem Lett.* 2013; 6(3): 331-336.
  6. Heine H. Flore du Gabon : *Acanthaceae*. Museum Nationale d'Histoire Naturelle. 1966; 3:29-32.
  7. Oben JE, Sheila EA, Agbor GA, Musoro DF. Effect of *Eremomastax speciosa* on experimental diarrhoea. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2006; 3(1):95-100.
  8. Erhabor JO, Idu M, Udo FO. Ethnomedicinal survey of medicinal plants used in the treatment of male infertility among the IFA Nkari people of Ini local government area of Akwa Ibom State, Nigeria. *Res J Rec Sci.* 2013; 2:5-11.
  9. Okokon JE, Antia BS, Udoh AE, Akpan MM. Antianaemic and antimicrobial activity of *Eremomastax speciosa*. *J Pharmacol Toxicol.* 2007; 2:196-199.
  10. Telefo PB, Lemfack MC, Bayala B, LienouLL, Goka CS, Yemele MD *et al.* Enquête ethnopharmacologique des plantes utilisées dans le traitement de l'infertilité féminine dans les localités de Fosson Wentcheng et Foto, Cameroun. *Phytotherap.* 2012; 10:25-34.
  11. Focho DA, Ndam WT, Fonge BA. Medicinal plants of Aguambu–Bamumbu in the Lebiale highlands, south west province of Cameroon. *Afr J Pharm Pharmacol.* 2009; 3(1):1-13.
  12. Ndenecho EN. Herbalism and resources for the development of ethnopharmacology in Mount Cameroon region. *Afr J Pharm Pharmacol.* 2009; 3(3):78-86.
  13. Amang AP, Tan PV, Nkwengoua E, Nyasse B. Antisecretory action of the extract of the aerial parts of *Eremomastax speciosa* (Acanthaceae) occurs through antihistaminic and anticholinergic pathways. *Adv Pharmacol Sci.* 2014(2014):10. Article ID. Available: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/323470> 323470.
  14. Kanthal LK, Dey A, Satyavathi K, Bhojaraju P. GC-MS analysis of bio-active compounds in methanolic extract of *Lactuca runcinate* DC. *Phcog Res.* 2014; 6:58-61.
  15. Simon BI, Lidianys ML, Claudia LL, Armida AG, Daniela F, Jose LR *et al.* Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Res Notes.* 2015; 8:396.
  16. Vasudevan A, Kalarickal V, Dileep, Pradeep KM, Ponnuraj K, Chittalakkottu S *et al.* Anti-Inflammatory Property of n-Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment. *Chem Biol Drug Des.* 2012; 80:434-439.
  17. Navpreet K, Jasmine C, Akash J, Lalit K. stigmasterol: a comprehensive review. *Int J Pharm Sci Res.* 2011; 2(9):2259-2265.
  18. Bala M, Veeramuthu D, Savarimuthu I. Antidiabetic activity of  $\gamma$ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. *Eur J pharm.* 2011; 667(1-3):410-418.
  19. Vázquez LH, Palazon J, Navarro-Ocaña A. The Pentacyclic Triterpenes  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyriins: A Review of Sources and Biological Activities. *Phytochemicals.* 2012; 23:487-502.



## *Eremomastax speciosa* (Hochst.) Cufod. (*Acanthaceae*) leaves aqueous extract eradicates *Helicobacter pylori* infection in mice

[El extracto acuoso de *Eremomastax speciosa* (Hochst.) Cufod. (*Acanthaceae*) erradica la infección por *Helicobacter pylori* en ratones]

Gaël Tchokomeni Siwe<sup>1</sup>, Rukesh Maharjan<sup>2</sup>, André Perfusion Amang<sup>3</sup>, Christophe Mezui<sup>4</sup>, Ernestine Nkwengoua Zondegoumba<sup>5</sup>, Syed Shakeel Akhtar<sup>6</sup>, Muhammad Iqbal Choudhary<sup>2,7</sup>, Paul Vernuy Tan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Biology & Physiology, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon.

<sup>2</sup>H.E.J. Research Institute of Chemistry, International Center for Chemical and Biological Sciences, University of Karachi, Karachi, Pakistan.

<sup>3</sup>Department of Biological Sciences, University of Maroua, Maroua, Cameroon.

<sup>4</sup>Department of Animal Biology, Higher Teacher Training College, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon.

<sup>5</sup>Department of Organic Chemistry, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon.

<sup>6</sup>Department of Surgery, Civil Hospital, Karachi, Pakistan.

<sup>7</sup>Department of Biochemistry, King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia.

\*E-mail: [verdzekovns@yahoo.com](mailto:verdzekovns@yahoo.com)

### Abstract

**Context:** Conventional treatments against *Helicobacter pylori* (the main cause of gastric ulcers) display some limitations because of resistance to antibiotics. Thus, elaboration of alternative treatments that are effective and with lower toxicity, remains a major challenge. Therefore, *Eremomastax speciosa* a plant with well-established antiulcer properties has been evaluated for its potential anti-*H. pylori* action.

**Aims:** To investigate the possible anti-*Helicobacter pylori* properties of the aqueous extract of *Eremomastax speciosa* leaves.

**Methods:** The air-dried leaves were powdered and infused using boiled distilled water. *H. pylori* isolates were obtained from gastric biopsies collected in the Civil hospital, Karachi. *In vitro* susceptibility tests against *H. pylori* were performed using microplate AlamarBlue® assay. MIC and MBC were then determined. A rapid *in vivo* *H. pylori* eradication test was performed on mice.

**Results:** *E. speciosa* was found to be active against all *H. pylori* isolates with MIC at 8 mg/mL, and MBC above 32 mg/mL, indicating this extract as bacteriostatic. Atomic force microscopy and scanning electron microscopy revealed major alterations in *H. pylori* morphology after exposure to *E. speciosa* at active doses. *H. pylori* colonization in mice was eradicated in a dose-dependent manner by *E. speciosa* with significant differences at the doses of 200, and 400 mg/kg.

**Conclusions:** These results suggest that aqueous extract of *E. speciosa* may contain some potent compounds, which could be used alone or in combination with other antibiotics against *H. pylori* infection, and further reinforce the therapeutic use of this medicinal plant for the management of gastric ulcers.

**Keywords:** AlamarBlue® assay; *Eremomastax speciosa*; *Helicobacter pylori*; NMRI mice.

### Resumen

**Contexto:** Los tratamientos convencionales contra *Helicobacter pylori* (la principal causa de úlceras gástricas) presentan algunas limitaciones debido a la resistencia a los antibióticos. Por lo tanto, la elaboración de tratamientos alternativos, que sean efectivos y con menor toxicidad, sigue siendo un desafío importante. Por lo tanto, *Eremomastax speciosa*, una planta con propiedades antiulcerosas bien establecidas, ha sido evaluada por su potencial anti-*H. pylori*.

**Objetivos:** Investigar las posibles propiedades anti-*Helicobacter pylori* del extracto acuoso de hojas de *Eremomastax speciosa*.

**Métodos:** Las cepas de *H. pylori* se aislaron de biopsias gástricas recogidas en el hospital Civil, Karachi. Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* contra *H. pylori* se realizaron utilizando el ensayo AlamarBlue® en microplaca. Entonces se determinaron MIC y MBC. Se realizó una prueba rápida de erradicación de *H. pylori* *in vivo* en ratones.

**Resultados:** *E. speciosa* fue activa en todas las cepas de *H. pylori* con MIC a 8 mg/mL y MBC por encima de 32 mg/mL, lo que indica que este extracto es bacteriostático. La microscopía de fuerza atómica y la microscopía electrónica de barrido revelaron perturbaciones en la morfología de *H. pylori* después de la exposición a *E. speciosa*. La colonización por *H. pylori* en ratones fue erradicado por *E. speciosa* con diferencias significativas en las dosis de 200 y 400 mg/kg.

**Conclusiones:** El extracto acuoso de *E. speciosa* es potente contra la infección por *H. pylori* y refuerza aún más el uso terapéutico de esta planta medicinal para el tratamiento de las úlceras gástricas.

**Palabras Clave:** ensayo AlamarBlue®; *Eremomastax speciosa*; *Helicobacter pylori*; ratones NMRI.

### ARTICLE INFO

Received: June 29, 2019.

Received in revised form: November 14, 2019.

Accepted: November 14, 2019.

Available Online: November 18, 2019.

Declaration of interests: The authors declare no conflict of interest.

Funding: This research was supported by The World Academy of Sciences (TWAS), Trieste, Italy, and International Center for Chemical and Biological Sciences (ICCBS), University of Karachi, Karachi, Pakistan through the Sandwich Postgraduate Fellowship No 3240287193.



---

## INTRODUCTION

---

*Helicobacter pylori* is a gram-negative bacterium responsible of many gastroduodenal disorders, such as chronic gastritis, gastroduodenal ulcer, and gastric cancer (Parsonnet et al., 1991). The current treatment regimens against *H. pylori* infections are based on a triple-therapy (two antibiotics, and a proton pump inhibitor), which are highly effective when preceded by susceptibility tests (Toracchio et al., 2000; Langmead and Rampton, 2001). Despite the good eradication rates by the current therapeutic regimen, treatment failures are still observed and reported worldwide due to *H. pylori* resistance against many drugs, such as tinidazole, clarithromycin, and metronidazole (Graham, 1998; Graham and Qureshi, 2000). Finding alternative treatments that are effective, inexpensive, easily accessible, and have lower toxicity remain a major challenge. Some natural products like *Propolis*, and *Cuminum cyminum* L. have demonstrated anti-*H. pylori* activity (Nostro et al., 2005), and for centuries, a variety of plants present in different geographical areas of the world have been used to treat gastrointestinal disorders (Borelli and Izzo, 2000).

*Eremomastax speciosa* is a resistant shrub, widely spread in tropical Africa. This plant can reach two meters in height and possesses particular characteristics like quadrangular stems and violate underside of the leaves (Heine, 1966). *E. speciosa* is well known to possess a wide range of biological properties (Siwe et al., 2015), and more specifically, its antiulcer activity has already been reported by several authors (Tan et al., 1996; Amang et al., 2014a;b; Amang et al., 2017a;b).

This study was designed to investigate the *in vitro* and *in vivo* anti-*H. pylori* effects of the aqueous extract of *E. speciosa* leaves.

---

## MATERIAL AND METHODS

---

### Identification and collection of plant material

*E. speciosa* leaves were harvested in Yaoundé (Cameroon) (3°51'36.551"N 11°29'52.354"E), and

formally identified by Mr Paul Mezili (botanist) by comparison with the existing voucher deposited at the Cameroon National Herbarium under the number HNC/136984. The leaves were cut, and shade dried, and finally crushed. Extraction was made by infusion of one kilogram of *E. speciosa* powder in seven liters of boiled distilled water for 30 minutes. Whatman® filter paper No. 3 was used for filtration, and the collected filtrate was evaporated at 50°C using a Raven convection air oven (Jencons-PLS, UK). The extract obtained was stored at 4°C.

### Bacterial strains and culture conditions

Twelve gastric biopsies were collected from patients with gastrointestinal diseases at the Civil Hospital (Karachi, Pakistan), with the approval of Independent Ethics Committee (№ ICCBS/IEC-046-HT-2019/Protocol/1.0), ICCBS, University of Karachi. Biopsies were quickly transported in cold normal saline to the laboratory, chopped in very small pieces, plated in appropriate media comprising Brain Heart Infusion (BHI) agar (Oxoid, England), supplemented by 10% Laked Horse Blood (Oxoid, England), and *H. pylori* selective supplement (Dent) (Oxoid, England). The plates were incubated at 37°C in 10% CO<sub>2</sub> incubator for two days. The colonies grown in the plate were identified on the basis of Gram-staining (-ve), urease (+), catalase (+), and oxidase (+). Additionally, scanning electron microscopy (SEM) and Atomic force microscopy (AFM) studies were performed to observe the bacterial morphology. Stock cultures were stored in 10% glycerol (BHI broth + 10% Laked Horse Blood + Dent supplement) until required for use at -80°C, according to the method described by Drumm and Sherman (1989).

### Microplate AlamarBlue® Assay (MABA) Procedure

This assay was used to check the antibacterial activity of *E. speciosa*. One colony of each *H. pylori* isolate, grown in the aforementioned appropriate media, was inoculated in Urea Broth (Oxoid, England), and incubated for 48 hours at 37°C in 10% CO<sub>2</sub> incubator. The bacterial cultures obtained

were diluted using urea broth, and adjusted with 0.5 McFarland Standard ( $\sim 1.5 \times 10^8$  CFU/mL). A stock solution (320 mg/mL) of *E. speciosa* extract was prepared in distilled water, and 10  $\mu$ L of this extract were placed in all the wells of a sterile 96 wells microplate, except the positive, negative and drug control wells. After adding appropriate volume of media (urea broth) in all the wells, bacterial suspension (5  $\mu$ L) was added, except in negative control wells. The final concentration of extract in the final 200  $\mu$ L solution was 16 mg/mL. For susceptibility control and comparative analysis, amoxicillin and metronidazole mixture were used as drug control. Each experiment was run in triplicate. Plates were incubated at 37°C for 48 h in 10% CO<sub>2</sub> incubator. After 48 hours, 20  $\mu$ L of 0.02% AlamarBlue® dye (Chem-Impex-International Inc, USA) solution was added in all the wells, and incubated at 37°C in a shaking incubator at 80 rpm for 2 h. Proliferation of bacteria was indicated by a change in color from blue to pink. For quantitative analysis, absorbance was read at two wavelengths (570 and 600 nm) by a spectrophotometer (Multiskan™ GO, Thermo Scientific). The percentage of inhibition of bacterial growth due to treatment was calculated as described by Al-Nasiry et al. (2006).

#### **Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)**

MIC test was performed using the standard broth micro dilution method in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (CLSI, 2012). Appropriate volume of urea broth was supplemented with serial two-fold dilutions of *E. speciosa* extract, ranged as follows: 0.125, 0.250, 0.500, 1, 2, 4, 8 and 16 mg/mL. Concentrations of amoxicillin/metronidazole were ranged as follows: 3.125; 6.250; 12.5; 25 and 50  $\mu$ g/mL. Finally, 5  $\mu$ L of bacterial suspension prepared as described above, were added in all the wells, and incubated for 48 h in a 10% CO<sub>2</sub> incubator. The lowest concentration of extract, capable of inhibiting visible growth with no turbidity, was then recorded as the MIC.

For MBC determination, a similar procedure was conducted as for MIC, except that 10  $\mu$ L of

each extract concentration was added into sterile petri dishes. Then, 15 mL of properly melted brain heart infusion agar, supplemented with 10% Laked Horse Blood and *H. pylori* selective supplement (Dent), were poured into these dishes. The contents were gently homogenized by rotating plate in both clockwise, and anticlockwise directions. The Petri dishes were observed after two days of incubation, and minimum extract concentration value with absence of any bacterial colony was assigned as MBC. All experiments were carried out in triplicates.

#### **Scanning electron microscopy (SEM) procedure**

The SEM protocol mentioned by Fischer et al. (2012) was used to determine the effect of aqueous extract of *E. speciosa* on *H. pylori* cells. Briefly, untreated cells, extract-treated cells (at half MIC, MIC, and double MIC) and drug (amoxicillin and metronidazole at 25  $\mu$ g/mL each) treated cells were incubated for 48 h. After incubation, these cells were transferred into 2 mL Eppendorf tubes, and centrifuged at 4,500 rpm for 6 minutes. The supernatant media without cells were discarded, and pellets formed at the bottom were washed with phosphate buffer saline (PBS). The washed cells were fixed by incubating with 2% glutaraldehyde for 1 h. Cells were washed again with PBS to remove glutaraldehyde, and subsequently, cells were dehydrated in ethanol solution by incubating in ascending order (30, 50, 70, 80, 90, and 100%) for 1 h each. After drying, cells were mounted in an ion sputtering device (Jeol JFC-1500), and SEM imaging was performed with Jeol (JSM 6380A, Japan) equipment.

#### **Atomic force microscopy (AFM) procedure**

The AFM procedure was realized following recommendations of Torrents et al. (2010). *H. pylori* was grown for 48 hours in urea broth using 1 mL vial. The bacterial suspension was centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The cells were gently washed with PBS and centrifuged again to collect the pellets. The bacteria were incubated for 24 h after treatment with plant extract and standard drug. In the positive growth control, there were no treatment with extract or drug. Following incubation,

the bacterial pellets were successively washed with 500  $\mu$ L of PBS and centrifuged thrice. After final centrifugation, the bacteria were suspended in 10  $\mu$ L of sterile double distilled water, and the samples were applied on clean silicon wafers chips, which were pretreated with (0.01%) poly-L-lysine and allowed to dry at room temperature. AFM images were taken in tapping mode by using Agilent Technologies 5500 equipment, with silicon nitride high resonance frequency cantilever. Topography images with their respective pseudocolor images were obtained, and images were analyzed by using PicoView 1.2 software. An average of three individual bacterial cells were captured for each extract concentration.

### ***In-vivo* experiment**

NMRI male mice of 10-12 weeks old, weighing 18-25 g were used for animal study. Mice were housed in ventilated cages with optimum conditions of temperature, light and ventilation by using Tecniplast (Easy Flow, Italy) equipment. Standard rodent diet (commercial feed pellets), and tap water were freely available. Prior authorization for the use of laboratory animals in this study was obtained from the Cameroon National Ethics Committee (Number: FWAIRB00001954 of 15 July 2017). The use, handling, and care of animals were done in adherence to the European Convention (Strasbourg, 18.III.1986) for the protection of vertebrate animals used for experimental and other purposes (ETS-123), with particular attention to Part III, articles 7, 8, and 9.

### **Eradication of *H. pylori* in experimental animals**

The mice chosen for the study were given a mixture of amoxicillin and metronidazole at the same dose of 25 mg/kg each, orally once per day for seven days (Boda et al., 2006). Five animals were sacrificed on the 8<sup>th</sup> day after 4 hours of fasting. The stomachs were opened, and the mucus scraped and homogenized in 500  $\mu$ L of normal saline. The homogenates were hundred-fold diluted and instilled in plates containing an appropriate selective medium (BHI agar, 10% horse blood, 5  $\mu$ g/mL trimethoprim 10  $\mu$ g/mL vancomycin, 5  $\mu$ g/mL amphotericin B, and 5  $\mu$ g/mL cefsulodin).

The plates were incubated at 37°C in a 10% CO<sub>2</sub> incubator for two days, after which bacterial growth was checked. No growth was observed in any plate confirming thus that the mice were *H. pylori* free. Administration of antibiotics was stopped for the remaining animals, and they were allowed to rest for seven more days in order to clear the system from the circulating antibiotics.

### ***H. pylori* infection and treatment**

The test was performed according to the protocol described by Boda et al. (2006) with slight modifications. Forty male mice were infected by oral gavage with *H. pylori* suspended in normal saline, adjusted to McFarland № 3 turbidity index (approximately 9 $\times$ 10<sup>8</sup> CFU/mL). Infection was induced, preceded by 4 hours fasting, once daily for one week. After the final inoculation, the mice were randomly divided into 5 experimental groups containing 8 mice each, as follows:

- Positive control group received only distilled water;
- Three extract-treated groups, which received *E. speciosa* at different doses (100, 200, and 400 mg/kg, respectively);
- Standard drug-treated group received amoxicillin + metronidazole (25 mg/kg each).

Extracts and standard drugs were orally administered to the respective groups, once daily for one week. The control group received equivalent volumes of distilled water.

The quantitative assessment of *H. pylori* colonization was performed as described by Keto et al. (2002) with slight modifications. One hundred milligrams of gastric tissue were homogenized in 500  $\mu$ L of sterile normal saline using an electric homogenizer, and the homogenate was diluted 100-fold in sterile normal saline. Fifty microliters of each dilution were added in a petri dish, and gently homogenized with appropriately melted medium, as described above. The plates were incubated at 37°C in a 10% CO<sub>2</sub> incubator for 2 days. *H. pylori* colonies were identified as previously described. *H. pylori* colonization was quantified

(CFU/g of stomach) using the following formula [1].

$$\text{CFU/mL} = (\text{number of colonies} \times \text{dilution [1 factor]}) / \text{volume plated}$$

After obtaining the bacterial charge in CFU/mL, we divided the value by two to obtain the charge in 500  $\mu$ L corresponding to 100 mg of gastric tissue. Then, the charge was multiplied by ten, to obtain the value in CFU/g.

### Statistical analysis

Statistical differences between different groups were obtained by using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey's post-test, and ( $p < 0.05$ ) was considered as statistically significant. The results were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (S.E.M.).

## RESULTS

From the twelve gastric biopsies collected from the Civil Hospital, Karachi, four *H. pylori* isolates were obtained, and formally identified as previously described. In order to preserve patients' an-

onymity, the isolates were named HP2, HP4, HP7, and HP10.

The treatment of bacterial cells by *E. speciosa* showed more than 50% growth inhibition of all four *H. pylori* isolates at the concentration of 8 mg/mL, as described in Table 1. Among the standard antibiotics tested at 50  $\mu$ g/mL, amoxicillin, and metronidazole were able to inhibit more than 60% of bacterial growth individually, and more than 70% when combined (25  $\mu$ g/mL, each). Tetracycline and azithromycin as well as *E. speciosa* (only on HP4 isolate) inhibitory activities were significantly weaker than the amoxicillin/metronidazole mixture.

The MIC and MBC values of *E. speciosa*, and antibiotics are shown in Table 2. *E. speciosa* inhibited visible growth in the four isolates at the dose of 8 mg/mL. Amoxicillin and metronidazole exhibited the same MIC value individually (50  $\mu$ g/mL), and combined (25  $\mu$ g/mL) against all the isolates. There was no significant difference between all these treatments. MBC value of *E. speciosa* was found to be above 32 mg/mL on all the isolates.

**Table 1:** Susceptibility testing of *E. speciosa*, and antibiotics against *H. pylori* isolates.

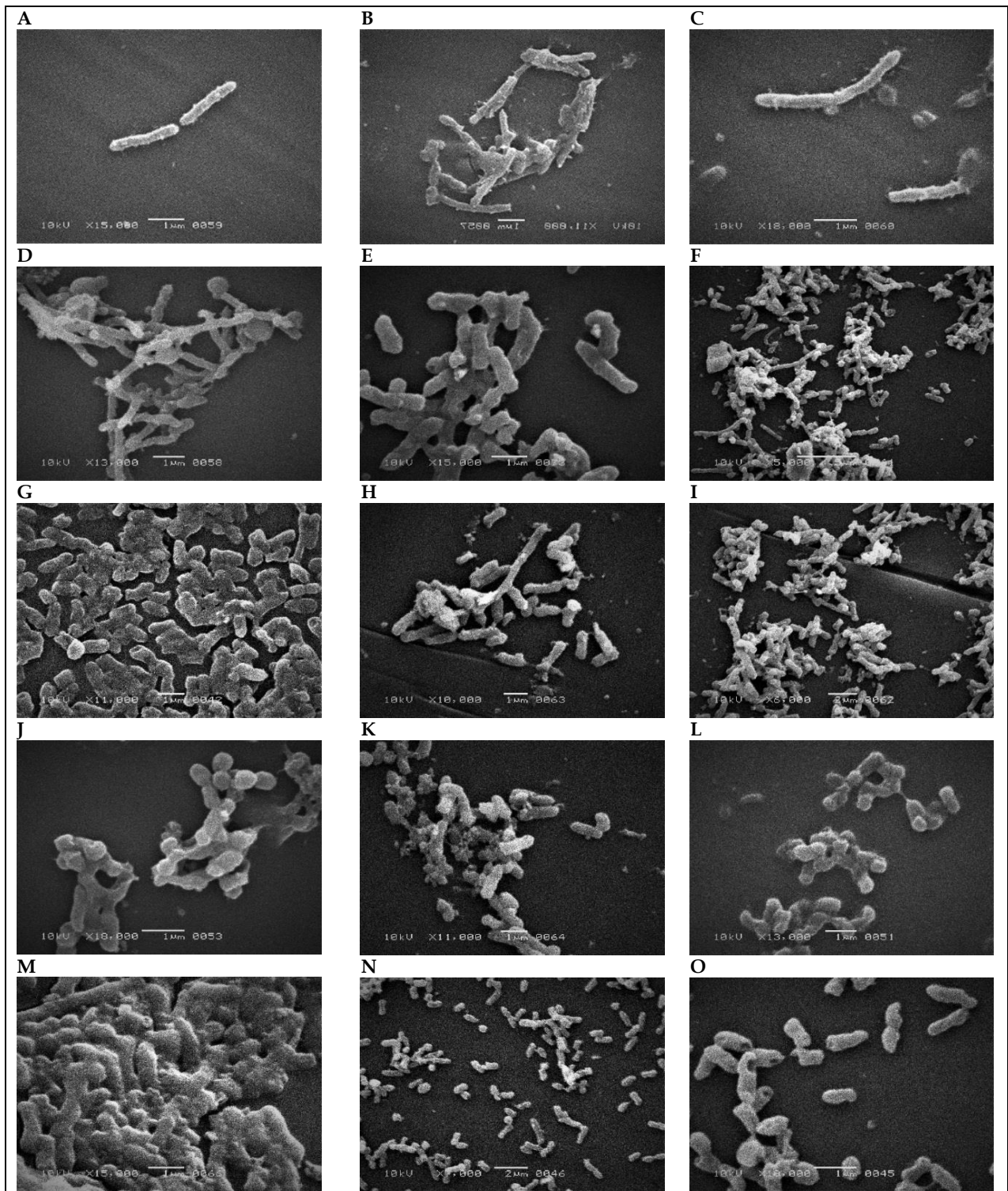
Treatment	Percentages of inhibition (%)			
	HP 2	HP 4	HP 7	HP 10
<i>E. speciosa</i> (8 mg/mL)	61.15 $\pm$ 2.48	58.04 $\pm$ 1.88*	64.48 $\pm$ 2.51	60.71 $\pm$ 1.47
Amoxicillin	64.57 $\pm$ 2.31	62.42 $\pm$ 0.76	79.02 $\pm$ 2.54	68.46 $\pm$ 4.22
Metronidazole	64.56 $\pm$ 1.88	66.53 $\pm$ 2.54	65.02 $\pm$ 2.84	64.09 $\pm$ 3.66
Amoxicillin + Metronidazole	79.08 $\pm$ 2.18	80.12 $\pm$ 3.54	78.61 $\pm$ 3.12	79.30 $\pm$ 2.45
Tetracycline	25.98 $\pm$ 3.05***	8.04 $\pm$ 1.20***	14.93 $\pm$ 0.44***	11.97 $\pm$ 0.87***
Azithromycin	24.57 $\pm$ 1.99***	17.25 $\pm$ 2.05***	23.13 $\pm$ 5.41***	14.65 $\pm$ 1.00***

Percentages of inhibition are expressed as Mean  $\pm$  S.E.M, n=3. All antibiotics were tested at 50  $\mu$ g/mL. Amoxicillin and metronidazole in combination were tested at 25  $\mu$ g/mL each. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  significant statistical difference by comparison with mixture amoxicillin/metronidazole. HP (2, 4, 7 and 10) represent isolate codes.

**Table 2:** MIC and MBC values ( $\mu$ g/mL) of *E. speciosa* and antibiotics against *H. pylori* isolates.

Treatment	HP 2		HP 4		HP 7		HP 10	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>E. speciosa</i>	8000	>32 000	8000	>32 000	8000	>32 000	8000	>32 000
Amoxicillin	50	-	50	-	50	-	50	-
Metronidazole	50	-	50	-	50	-	50	-
Amoxicillin + metronidazole	25	-	25	-	25	-	25	-

(-) = not tested; HP (2, 4, 7, and 10) represent isolate codes, n=3.



**Figure 1:** Scanning electron microscopy of *H. pylori* cells at different magnifications. (A-C) = untreated cells; (D-F) = half MIC-treated cells; (G-I) = MIC-treated cells; (J-L) = double MIC-treated cells; (M-O) = amoxicillin + metronidazole (25 µg/mL each) treated cells.

The physical effects of *E. speciosa* on *H. pylori* cells morphology was investigated using a scan-

ning electron microscope (Fig. 1) and atomic force microscope (Fig. 2). The isolate HP7 was chosen

for these experiments because it appeared to be more susceptible to the extract. SEM micrographs are represented in Fig. 1. Untreated cells (A-C) showed normal rod and smooth morphology. Bacteria exposed to half MIC (D-F) showed a rough cell appearance with the beginning of cells disruption, compared to the untreated cells. Treatment with MIC (G-I), and double MIC (J-L) induced severe alterations of the cells wall with the formation of holes, invaginations, and an advanced state of morphological disorganization with the leakage of bacterial cytoplasmic content. After exposure to standard drugs (M-O), complete lysis of the cells was observed. At this stage, most of the cells had lost their normal morphology. Leakage of bacterial cytoplasmic content was more emphasized and scattering of cellular debris were also noticed.

Fig. 2 shows AFM micrographs of *H. pylori* in 3D and 2D representation. Untreated cells (A-B) demonstrated typical bar, and regular morphology. Cells treated with half MIC (C-D) revealed irregular cell morphology with some membrane segmentation, which were absent in untreated cells. Treatment with MIC (E-F) and twofold MIC (G-H) provoked important changes in bacterial surface with the formation of holes and invaginations, accompanied with cytoplasm leakages. After treatment with standard antibiotics (I-J), cells displayed total disorganization with the majority of them completely destroyed, as shown by scattered cell debris.

*In vivo* study results are described in Fig. 3. *E. speciosa* reduced bacterial load in mice gastric tissues in a dose-dependent manner with significant decrease at the doses of 200, and 400 mg/kg. The mixture of amoxicillin and metronidazole, at 25 mg/kg each, was also found to be significantly active against *H. pylori* colonization of stomach.

---

## DISCUSSION

---

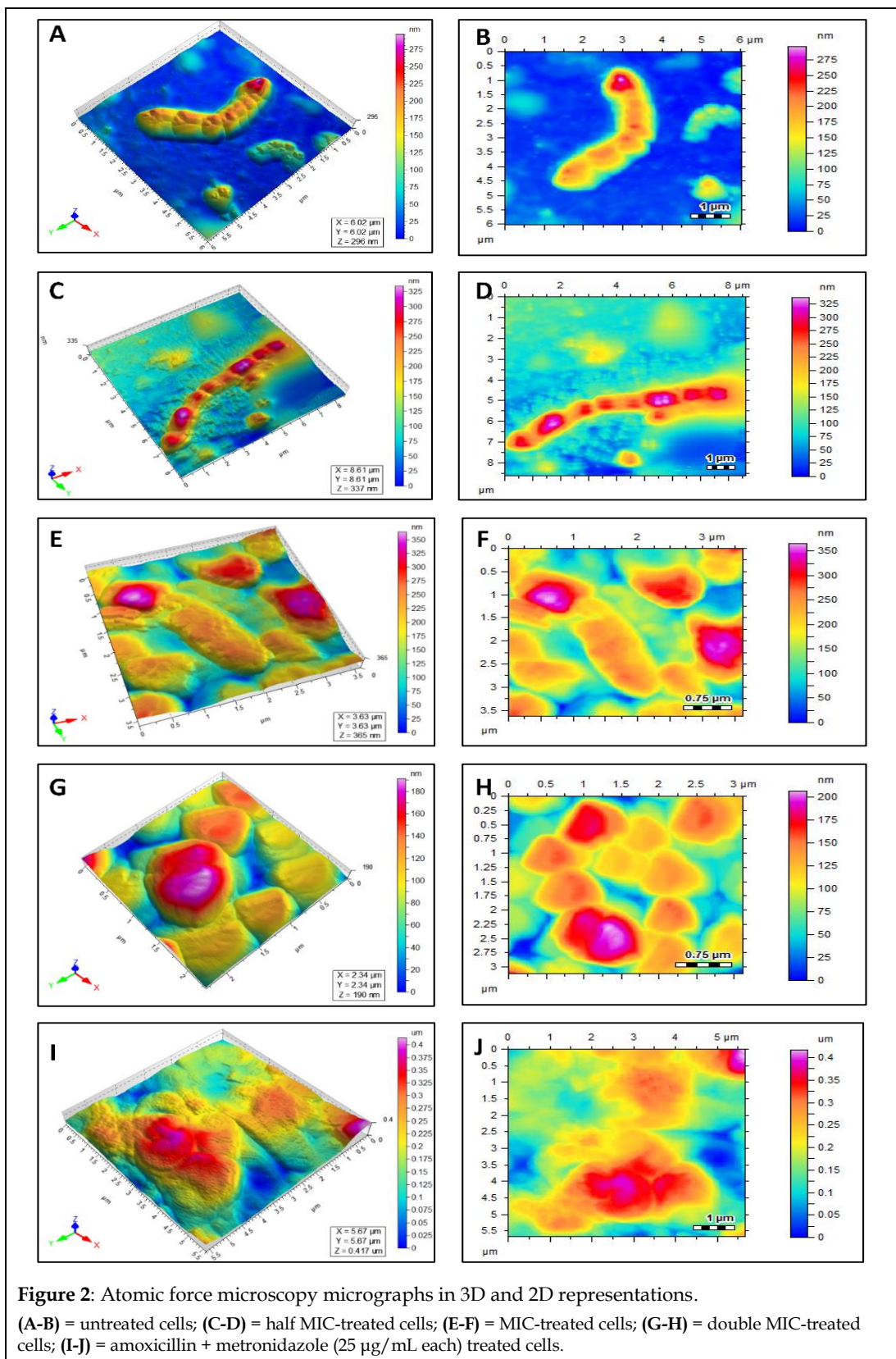
*E. speciosa* has been found to possess anti-ulcer activity against several gastric ulcer models in-

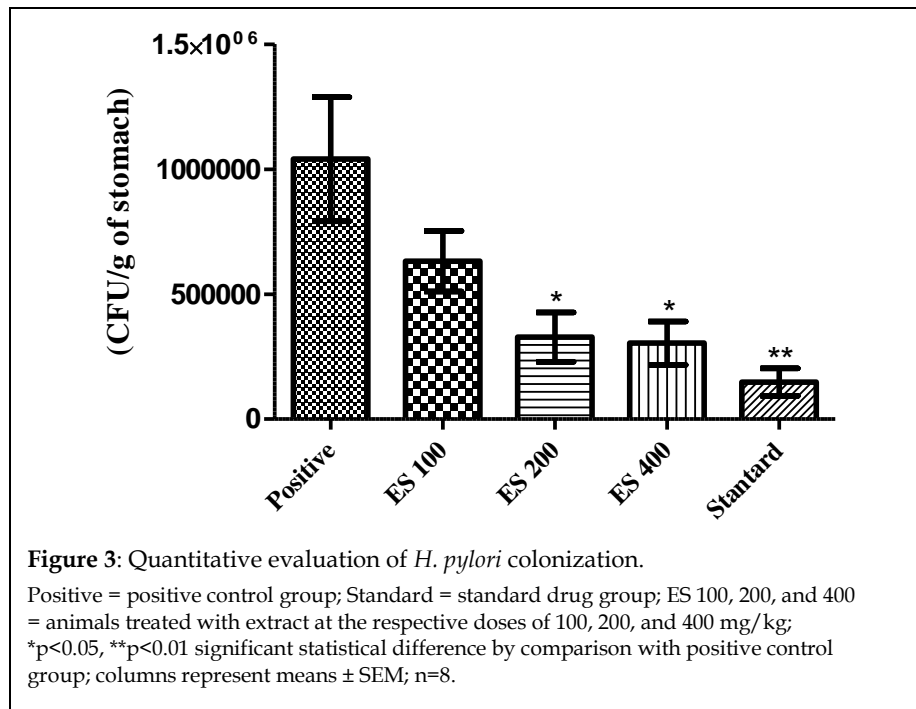
duced in animals and since *H. pylori* is the major cause of gastric ulcer, this study investigated the anti-*H. pylori* potential of *E. speciosa* both *in vitro*, and *in vivo*.

The antibacterial activity of *E. speciosa* against *H. pylori* was assessed by using AlamarBlue® assay. MIC was found to be 8 mg/mL with an MBC value above 32 mg/mL, thus classifying *E. speciosa* as bacteriostatic. SEM and AFM permitted to observe the deleterious effects of *E. speciosa* on *H. pylori* structure. *H. pylori* possesses an outer membrane, which acts as a barrier to numerous environmental substances, notably antibiotics. Therefore, in such circumstances, one compound which could alter the permeability of bacterial cells allows the entry of another potent compound, such that due to their synergistic or additive effects, the cells metabolic processes will be disturbed, leading to the killing of the bacterial cells. This could explain the swelling and leakage of the bacterial cytoplasmic contents, followed by death of the bacteria after exposure to *E. speciosa*.

Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) analysis revealed the presence of two pentacyclic triterpenes as major compounds in the aqueous extract of *E. speciosa* leaves (Siwe et al., 2019).  $\alpha$ -amyirin (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O), and  $\beta$ -amyrone (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O) were identified with, respectively, 12.09% and 28.37%, out of the 22 compounds recorded. Lipophilicity is an important parameter in the development of antimicrobial agents, and it increases with the length of the carbon chain. In drug discovery and design, optimal lipophilicity is of paramount importance, as it has influence in determining different pharmacokinetics parameters (absorption, distribution, metabolism, excretion) and is also related to the permeability through the lipid bilayer of bacteria (Tokuyama et al. 2001). The bactericidal activity of  $\alpha$ -amyirin against two Gram negative bacteria has been reported in a study (Mallavadhani et al., 2004). The tested bacteria were *Escherichia coli*, and *Pseudomonas syringae* with the respective MIC of 95, and 50  $\mu$ g/mL.







$\beta$ -Amyrin, an  $\alpha$ -amyrin isomer, was also found to possess good antibacterial potency against three Gram negative bacteria; namely *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella typhi* with their respective MIC of 97, 97, and 95  $\mu$ g/mL (Hichri et al., 2003).  $\beta$ -Amyrone, a derivative obtained by the oxidation of  $\beta$ -amyrin, is a compound with a wide range of pharmacological properties among which are antifungal, and antiviral properties.  $\beta$ -Amyrone was found to possess a strong antifungal activity against *Candida albicans* with a MIC of 8  $\mu$ g/mL (Ata et al., 2011). Another study reported antiviral activity of  $\beta$ -amyrone against Chikungunya virus cells (Bourjot et al., 2012). The structure-activity relationship study of triterpenes indicates that their antibacterial activity on both Gram positive and Gram negative bacteria may be due to the presence of an oxygenated group at C-3, as most of the reported bactericidal triterpenes present this functionality (Pacheco et al., 2012). In view of the above, the anti-*H. pylori* activity of the aqueous extract of *E. speciosa* could be attributed, at least partially, to the synergistic effect of  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrone, representing together more than 40% (abundance) of compounds found in the studied extract by GC-MS.

However, *in vitro* susceptibility does not necessarily mean success *in vivo*. The divergence of outcomes obtained *in vitro* and *in vivo* could be attributed to the contrast between a laboratory and *in vivo* condition, regulated by complex physiological processes. One of the causes of this situation is the low pH in the stomach, which decreases the antimicrobial action of numerous medicines (Cellini et al., 1996). Thus, *in vivo* studies are necessary to establish anti-*H. pylori* property of any medicine. Daily administration of *E. speciosa* to mice for one week, decreased the stomach colonization by *H. pylori* in a dose-dependent manner with significant reduction at the doses of 200, and 400 mg/kg. This confirms the *in vitro* results and suggests that *E. speciosa* is potent against *H. pylori* infection.

## CONCLUSIONS

In addition to its well-established antiulcer (cytoprotective, antisecretory, ulcer healing) properties, *E. speciosa* extract eradicates *H. pylori* infection. Two pentacyclic triterpenes ( $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrone) found in the leaf aqueous extract of *E. speciosa* could be implicated in the observed bactericidal effect. Further studies need to be carried

out to determine the mechanism(s) by which this extract affects *H. pylori* survival.

---

## CONFLICT OF INTEREST

---

The authors declare no conflict of interest.

---

## ACKNOWLEDGMENTS

---

The authors are very thankful to The World Academy of Sciences (TWAS), Trieste, Italy, and International Center for Chemical and Biological Sciences (ICCBS), University of Karachi, Karachi, Pakistan, for supporting and providing all the facilities for this study, through the Sandwich Postgraduate Fellowship No 3240287193, granted to Mr. Siwe Tchokomeni Gael.

---

## REFERENCES

---

- Al-Nasiry S, Geusens N, Hassens M, Luyten C, Pijnenborg R (2006) The use of AlamarBlue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* 22(5): 1304–1309.
- Amang AP, Mezui C, Siwe GT, Zondengoumba EN, Enow-Orock GE, Tan PV (2017a) Prophylactic and healing activities of the leaves aqueous extract of *Eremomastax speciosa* on gastric ulcers in rats. *J Adv Biol Biotech* 12(3): 1–13.
- Amang AP, Mezui C, Siwe TG, Emakoua J, Mbah G, Nkwengoua EZ, Enow-orock GE, Tan PV (2017b) Healing and antisecretory effects of aqueous extract of *Eremomastax speciosa* (Acanthaceae) on unhealed gastric ulcers. *Biomed Res Int* 2017: Article ID 1924320.
- Amang AP, Tan PV, Nkwengoua E, Nyasse B (2014b) Antisecretory action of the extract of the aerial parts of *Eremomastax speciosa* (Acanthaceae) occurs through antihistaminic and anticholinergic pathways. *Adv Pharmacol Sci* 2014: Article ID 323470.
- Amang PA, Tan PV, Patamaken SA, Mefe MN (2014a) Cytoprotective and antioxidant effects of the methanol extract of *Eremomastax speciosa* in rats. *Afr J Trad Compl Altern Med* 11(1): 165–171.
- Ata A, Tan DS, Matochko WL, Adesanwo JK (2011) Chemical constituents of *Drypetes gossweileri* and their enzyme inhibitory and anti-fungal activities. *Phytochem Lett* 4: 34–37.
- Boda M, Tan PV, Nyasse B (2006) Rapid *in vivo* screening method for the evaluation of new anti-*Helicobacter* medicinal preparations. *Afr J Trad Compl Altern Med* 3(4): 102–114.
- Borrelli F, Izzo AA (2000) The plant kingdom as a source of antiulcer remedies. *Phytother Res* 14: 581–591.
- Bourjot M, Leyssen P, Eydoux C, Guillemot JC, Canard B, Rasoanaivo P, Gueritte F, Litaudon M (2012) Chemical constituents of *Anacolosia pervilleana* and their antiviral activities. *Fitoterapia* 83: 1076–1080.
- Cellini L, Di Campli E, Masulli M, Di Bartolomeo S, Allocati N (1996) Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunol Med Microbiol* 13: 273–277.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-ninth edition. M07-A9, CLSI, Wayne, PA, USA.
- Drumm B, Sherman P (1989) Long-term storage of *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 27: 1655–1656.
- Fischer ER, Hansen BT, Nair V, Hoyt FH, Dorward DW (2012) Scanning Electron Microscopy. *Curr Prot Microbiol* Chapter 2: Unit 2, B.2.
- Graham DY (1998) Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy. *Gastroenterology* 115: 1272–1277.
- Graham DY, Qureshi WA (2000) Antibiotic resistant *H. pylori* infection and its treatment. *Curr Pharm Des* 6: 1537–1544.
- Heine H (1966) Flore du Gabon: *Acanthaceae*. *Mus Nat Hist Nat* 3: 29–32.
- Hichri F, Ben Jannet H, Cheriaa J, Jegham S, Mighri Z (2003) Antibacterial activities of a few prepared derivatives of oleanolic acid and of other natural triterpenic compounds. *CR Chim* 6: 473–483.
- Keto Y, Ebata M, Tomita K, Okabe S (2002) Influence of *Helicobacter pylori* infection on healing and relapse of acetic acid ulcers in Mongolian gerbils. *Dig Dis Sci* 47(4): 837–849.
- Langmead L, Rampton DS (2001) Review article: herbal treatment in gastrointestinal and liver disease-benefit and dangers. *Aliment Pharmacol Ther* 15: 1239–1252.
- Mallavadhani UV, Mahapatra A, Jamil K, Reddy PS (2004) Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. *Biol Pharm Bull* 27(10): 1576–1579.
- Nostro A, Cellini L, Di Bartolomeo S, Di Campli E, Grande R (2005) Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytother Res* 19 (3): 198–202.
- Pacheco AG, Alcântara AFC, Abreu VGC, Corrêa GM (2012) Relationships between chemical structure and activity of triterpenes against Gram positive and Gram negative bacteria. *Search Antibact Ag* 1–24.
- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP (1991) *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *New Engl J Med* 325: 1127–1131.
- Siwe TG, Enow-Orock GE, Amang AP, Mezui C, Dongmo AB, Tan PV (2015) Acute and subacute toxicological assessment of the leaf aqueous extract of *Eremomastax speciosa* (Acanthaceae) in Wistar rats. *J Adv Med Pharm Sci* 4(1): 1–13.
- Siwe TG, Zondengoumba EN, Maharjan R, Amang AP, Mezui C, Choudhary MI, Tan PV (2019) Comparative GC-MS

analysis of two crude extracts from *Eremomastax speciosa* (Acanthaceae) leaves. *J Med Plant Stud* 7(2): 25–29.

Tan PV, Nditafon NG, Yewah MP, Dimo T, Ayafor FJ (1996) *Eremomastax speciosa*: Effects of leaf aqueous extract on ulcer formation and gastric secretion in rats. *J Ethnopharmacol* 54: 139–142.

Tokuyama R, Takahashi Y, Tomita Y, Tsubouchi M, Yoshida T (2001) Structure-activity relationship (SAR) studies on oxazolidinone antibacterial agents. *Synthesis and*

evaluation of 5-thiocarbamate oxazolidinones. *Chem Pharm Bull* 49(4): 361–367.

Toracchio S, Cellini L, Di Campli E (2000) Role of antimicrobial susceptibility testing on efficacy of triple therapy in *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 14: 1639–1643.

Torrent M, Sánchez-Chardi A, Nogués MV, Boix E (2010) Assessment of antimicrobial compounds by microscopy techniques. *Microscopy: Sci Tech Appl Educ* 3(4): 1115–1126.

#### AUTHOR CONTRIBUTION:

Contribution	Siwe GT	Maharjan R	Amang AP	Mezui C	Zondegoumba EN	Akhtar SS	Choudhary MI	Tan PV
Concepts or ideas	x							x
Design	x			x			x	
Definition of intellectual content								
Literature search	x	x	x	x				x
Experimental studies	x	x						
Data acquisition	x	x				x		
Data analysis			x	x	x			x
Statistical analysis			x	x	x			x
Manuscript preparation	x							
Manuscript editing		x						
Manuscript review	x	x	x	x	x	x	x	x

**Citation Format:** Siwe GT, Maharjan R, Amang AP, Mezui C, Zondegoumba EN, Akhtar SS, Choudhary MI, Tan PV (2020) *Eremomastax speciosa* (Hochst.) Cufod. (Acanthaceae) leaves aqueous extract eradicates *Helicobacter pylori* infection in mice. *J Pharm Pharmacogn Res* 8(2): 135–145.