

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DES SCIENCES

UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE



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

**Effets pharmacologiques des extraits aqueux et  
méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima*  
Schweinf. (Anacardiaceae) et de leurs fractions sur  
l'infestation par *Schistosoma mansoni* chez la souris  
blanche BALB/c**

THESE

Présentée Soutenue le 7 décembre 2022 en vue de l'obtention du Doctorat/PhD en Biologie des  
Organismes Animaux

Option : Physiologie Animale

Par

**FEUSSOM GIPWE Nestor**

Matricule : 08Q1255

*Maître -ès sciences*

Devant le Jury :



**Président :** KAMTCHOUING Pierre, Professeur, Université de Yaoundé I ;

**Rapporteurs :** TCHUEM TCHUENTE Louis Albert, Professeur, Université de Yaoundé I ;

DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré, Professeur, Université de Yaoundé I ;

**Membres :** NNANGA NGA Emmanuel, Professeur, Université de Yaoundé I ;

DONGMO Alain Bertrand, Professeur, Université de Douala ;

JATSA BOUKENG Hermine, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I.  
Epse MEGAPTCHE

Année académique 2022 - 2023

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix-Travail-Patrie

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

\*\*\*\*\*

BP : 812 – Yaoundé

Tél : (237) 242 23 95 84

Fax : (237) 242 23 44 96



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace-Work-Fatherland

\*\*\*\*\*

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

\*\*\*\*\*

P.O.Box : 812 –Yaounde

Phone number: (237) 242 23 95 84

Fax : (237) 242 23 44 96

CAMEROUN

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

## ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, membres du jury de la soutenance de thèse de Doctorat/PhD en **Biologie des Organismes Animaux**, Option : **Physiologie Animale**, de Monsieur **FEUSSOM GIPWE Nestor**, matricule 08Q1255, soutenance autorisée par la correspondance N° 223167/UY1/VREPDTIC/DAAC/SSPE/CB-nsr du Recteur de l'Université de Yaoundé I en date du 07 Novembre 2022 sur le sujet intitulé : « Effets pharmacologiques des extraits aqueux et méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* Schweinf. (Anacardiaceae) et leurs fractions sur l'infection à *Schistosoma mansoni* chez la souris blanche BALB/c», attestons que les corrections exigées au candidat lors de cette évaluation, qui a eu lieu le Mercredi 07 Décembre 2022 dans la salle multimédia de la Faculté des Sciences, ont réellement été effectuées.

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

Fait à Yaoundé, le **02 MAR 2023**.....

L'Examineur

Pr. JATSA B. Hermine  
épse MEGAPTCHÉ

Le Président du jury

Pierre Kamtchouing  
Professeur des Universités - Hors Echelle

Le Chef de Département



Charles Félicie  
Bilong Bilong  
Professeur

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DES SCIENCES

UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE



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

**Effets pharmacologiques des extraits aqueux et  
méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima*  
Schweinf. (Anacardiaceae) et de leurs fractions sur  
l'infestation par *Schistosoma mansoni* chez la souris  
blanche BALB/c**

THESE

Présentée Soutenue le 7 décembre 2022 en vue de l'obtention du Doctorat/PhD en Biologie des  
Organismes Animaux

Option : Physiologie Animale

Par

**FEUSSOM GIPWE Nestor**

Matricule : 08Q1255

*Maître -ès sciences*

Devant le Jury :

**Président :** KAMTCHOUING Pierre, Professeur, Université de Yaoundé I ;

**Rapporteurs :** TCHUEM TCHUENTE Louis Albert, Professeur, Université de Yaoundé I ;

DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré, Professeur, Université de Yaoundé I ;

**Membres :** NNANGA NGA Emmanuel, Professeur, Université de Yaoundé I ;

DONGMO Alain Bertrand, Professeur, Université de Douala ;

JATSA BOUKENG Hermine, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I.  
Epse MEGAPTCHÉ

*Année académique 2022 - 2023*

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

**LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS**  
**ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION 22 septembre 2021**

**ADMINISTRATION**

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

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

**VICE-DOYEN / DSSE** : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

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

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

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR** : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

|  |
|--|
| <b>1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)</b> |
|--|

| N° | NOMS ET PRÉNOMS                | GRADE      | OBSERVATIONS        |
|----|--------------------------------|------------|---------------------|
| 1  | BIGOGA DAIGA Jude              | Professeur | En poste            |
| 2  | FEKAM BOYOM Fabrice            | Professeur | En poste            |
| 3  | FOKOU Elie                     | Professeur | En poste            |
| 4  | KANSCI Germain                 | Professeur | En poste            |
| 5  | MBACHAM FON Wilfried           | Professeur | En poste            |
| 6  | MOUNDIPA FEWOU Paul            | Professeur | Chef de Département |
| 7  | NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG | Professeur | En poste            |
| 8  | OBEN Julius ENYONG             | Professeur | En poste            |

|    |                                |                       |                               |
|----|--------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| 9  | ACHU Merci BIH                 | Maître de Conférences | En poste                      |
| 10 | ATOUGHO Barbara Mma            | Maître de Conférences | En poste                      |
| 11 | AZANTSA KINGUE GABIN BORIS     | Maître de Conférences | En poste                      |
| 12 | BELINGA née NDOYE FOE M. C. F. | 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 | EWANE Cécile Anne              | Maître de Conférences | En poste                      |
| 17 | MOFOR née TEUGWA Clotilde      | Maître de Conférences | Inspecteur de Service MINESUP |
| 18 | NANA Louise épouse WAKAM       | Maître de Conférences | En poste                      |
| 19 | NGONDI Judith Laure            | Maître de Conférences | En poste                      |

|    |                          |                       |          |
|----|--------------------------|-----------------------|----------|
| 20 | NGUEFACK Julienne        | Maître de Conférences | En poste |
| 21 | NJAYOU Frédéric Nico     | Maître de Conférences | En poste |
| 22 | TCHANA KOUATCHOUA Angèle | Maître de Conférences | En poste |

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

|    |                                 |            |          |
|----|---------------------------------|------------|----------|
| 35 | MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle | Assistante | En poste |
| 36 | OWONA AYISSI Vincent Brice      | Assistant  | En poste |
| 37 | WILFRIED ANGIE Abia             | Assistante | En poste |

## 2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (46)

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

|    |   |                       |          |
|----|---|-----------------------|----------|
| 16 | BILANDA Danielle Claude                 | Maître de Conférences | En poste |
| 17 | DJIOGUE Séfirin                         | Maître de Conférences | En poste |
| 18 | JATSA BOUKENG Hermine épse<br>MEGAPTCHE | Maître de Conférences | En Poste |
| 19 | LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.               | Maître de Conférences | En poste |
| 20 | MEGNEKOU Rosette                        | Maître de Conférences | En poste |

|    |                          |                       |          |
|----|--------------------------|-----------------------|----------|
| 21 | MONY Ruth épouse NTONE   | Maître de Conférences | En Poste |
| 22 | NGUEGUIM TSOFAK Florence | Maître de Conférences | En poste |
| 23 | TOMBI Jeannette          | Maître de Conférences | En poste |

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

|    |                               |            |          |
|----|-------------------------------|------------|----------|
| 42 | BASSOCK BAYIHA Etienne Didier | Assistant  | En poste |
| 43 | ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine | Assistante | En poste |
| 44 | KOGA MANG DOBARA              | Assistant  | En poste |
| 45 | LEME BANOCK Lucie             | Assistante | En poste |
| 46 | YOUNOUSSA LAME                | Assistant  | En poste |

### 3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)

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

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

|    |              |                       |          |
|----|--------------|-----------------------|----------|
| 17 | TSOATA Esaïe | Maître de Conférences | En poste |
|----|--------------|-----------------------|----------|

|    |                             |                  |          |
|----|-----------------------------|------------------|----------|
| 18 | DJEUANI Astride Carole      | Chargé de Cours  | En poste |
| 19 | GOMANDJE Christelle         | Chargée de Cours | En poste |
| 20 | MAFFO MAFFO Nicole Liliane  | Chargé de Cours  | En poste |
| 21 | MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel | Chargé de Cours  | En poste |
| 22 | NGALLE Hermine BILLE        | Chargée de Cours | En poste |
| 23 | NGOUO Lucas Vincent         | Chargé de Cours  | En poste |
| 24 | NNANGA MEBENGA Ruth Laure   | Chargé de Cours  | En poste |
| 25 | NOUKEU KOUAKAM Armelle      | Chargé de Cours  | En poste |
| 26 | ONANA JEAN MICHEL           | Chargé de Cours  | En poste |

|    |                                   |           |          |
|----|-----------------------------------|-----------|----------|
| 27 | GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG        | Assistant | En poste |
| 28 | KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger | Assistant | En poste |
| 29 | KONO Léon Dieudonné               | Assistant | En poste |
| 30 | LIBALAH Moses BAKONCK             | Assistant | En poste |
| 31 | LIKENG-LI-NGUE Benoit C           | Assistant | En poste |
| 32 | TAEDOUNG Evariste Hermann         | Assistant | En poste |
| 33 | TEMEGNE NONO Carine               | Assistant | En poste |

#### 4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (33)

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

|    |                            |                       |                             |
|----|----------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| 11 | ACAYANKA Elie              | Maître de Conférences | En poste                    |
| 12 | BABALE née DJAM DOUDOU     | Maître de Conférences | <i>Chargée Mission P.R.</i> |
| 13 | EMADACK Alphonse           | Maître de Conférences | En poste                    |
| 14 | KAMGANG YOUNI Georges      | Maître de Conférences | En poste                    |
| 15 | KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.  | Maître de Conférences | En poste                    |
| 16 | KONG SAKEO                 | Maître de Conférences | En poste                    |
| 17 | NDI NSAMI Julius           | Maître de Conférences | En poste                    |
| 18 | NJIOMOU C. épouse DJANGANG | Maître de Conférences | En poste                    |
| 19 | NJOYA Dayirou              | Maître de Conférences | En poste                    |
| 20 | TCHAKOUTE KOUAMO Hervé     | Maître de Conférences | En poste                    |

|    |                                |                  |                 |
|----|--------------------------------|------------------|-----------------|
| 21 | BELIBI BELIBI Placide Désiré   | Chargé de Cours  | CS/ ENS Bertoua |
| 22 | CHEUMANI YONA Arnaud M.        | Chargé de Cours  | En poste        |
| 23 | KENNE DEDZO GUSTAVE            | Chargé de Cours  | En poste        |
| 24 | KOUOTOU DAOUDA                 | Chargé de Cours  | En poste        |
| 25 | MAKON Thomas Beauregard        | Chargé de Cours  | En poste        |
| 26 | MBEY Jean Aime                 | Chargé de Cours  | En poste        |
| 27 | NCHIMI NONO KATIA              | Chargé de Cours  | En poste        |
| 28 | NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE | Chargée de Cours | CT/ MINFEM      |
| 29 | NYAMEN Linda Dyorisse          | Chargée de Cours | En poste        |
| 30 | PABOUDAM GBAMBIE A.            | Chargée de Cours | En poste        |

|    |                         |           |          |
|----|-------------------------|-----------|----------|
| 31 | NJANKWA NJABONG N. Eric | Assistant | En poste |
| 32 | PATOUOSSA ISSOFA        | Assistant | En poste |
| 33 | SIEWE Jean Mermoz       | Assistant | En Poste |

| <b>5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (34)</b> |                             |            |  |
|---|-----------------------------|------------|--|
| 1   | DONGO Etienne               | Professeur | Vice-Doyen/FSE/UWI                         |
| 2   | GHOLOMU TIH Robert Ralph    | Professeur | Dir. IBAF/UDA                              |
| 3   | NGOUELA Silvère Augustin    | Professeur | Chef de Département<br>UDS                 |
| 4   | NYASSE Barthélemy           | Professeur | En poste                                   |
| 5   | PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel | Professeur | Directeur/ MINESUP/<br>Chef de Département |
| 6   | WANDJI Jean                 | Professeur | En poste                                   |

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

|    |                        |                 |          |
|----|------------------------|-----------------|----------|
| 28 | KAMTO Eutrophe Le Doux | Chargé de Cours | En poste |
|----|------------------------|-----------------|----------|

|    |                           |                  |          |
|----|---------------------------|------------------|----------|
| 29 | NGNINTEDO Dominique       | Chargé de Cours  | En poste |
| 30 | NGOMO Orléans             | Chargée de Cours | En poste |
| 31 | OUAHOUE WACHE Blandine M. | Chargée de Cours | En poste |
| 32 | SIELINOU TEDJON Valérie   | Chargé de Cours  | En poste |

|    |                         |           |          |
|----|-------------------------|-----------|----------|
| 33 | MESSI Angélique Nicolas | Assistant | En poste |
| 34 | TSEMEUGNE Joseph        | Assistant | En poste |

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

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

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

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

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

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

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

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

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

|    |                              |            |          |
|----|------------------------------|------------|----------|
| 26 | BITYE MVONDO Esther Claudine | Assistante | En poste |
| 27 | MBATAKOU Salomon Joseph      | Assistant  | En poste |
| 28 | MBIAKOP Hilaire George       | Assistant  | En poste |
| 29 | MEFENZA NOUNTU Thiery        | Assistant  | En poste |
| 30 | TCHEUTIA Daniel Duviol       | Assistant  | En poste |

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

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

|   |                           |                       |          |
|---|---------------------------|-----------------------|----------|
| 4 | ASSAM ASSAM Jean Paul     | Maître de Conférences | En poste |
| 5 | BOYOMO ONANA              | Maître de Conférences | En poste |
| 6 | RIWOM Sara Honorine       | Maître de Conférences | En poste |
| 7 | SADO KAMDEM Sylvain Leroy | Maître de Conférences | En poste |

|   |              |                 |          |
|---|--------------|-----------------|----------|
| 8 | BODA Maurice | Chargé de Cours | En poste |
|---|--------------|-----------------|----------|

|    |                             |                  |          |
|----|-----------------------------|------------------|----------|
| 9  | 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         | Assistant        | 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 PHYSIQUE(PHY) (40)

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

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

|    |                               |                  |                                  |
|----|-------------------------------|------------------|----------------------------------|
| 30 | ABDOURAHIMI                   | Chargé de Cours  | En poste                         |
| 31 | CHAMANI Roméo                 | Chargé de Cours  | En poste                         |
| 32 | EDONGUE HERVAIS               | Chargé de Cours  | En poste                         |
| 33 | FOUEDJIO David                | Chargé de Cours  | Chef Cell. MINADER               |
| 34 | MBONO SAMBA Yves Christian U. | Chargé de Cours  | En poste                         |
| 35 | MELI'I Joelle Larissa         | Chargée de Cours | En poste                         |
| 36 | MVOGO ALAIN                   | Chargé de Cours  | En poste                         |
| 37 | OBOUNOU Marcel                | Chargé de Cours  | DA/Univ Inter<br>Etat/Sangmalima |
| 38 | WOULACHE Rosalie Laure        | Chargée de Cours | En poste                         |

|    |                                   |           |          |
|----|-----------------------------------|-----------|----------|
| 39 | AYISSI EYEBE Guy François Valérie | Assistant | En poste |
| 40 | 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 épse YONGUE  | Professeur | En poste                  |
| 3 | NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy | Professeur | En poste                  |
| 4 | NDJIGUI Paul Désiré       | Professeur | Chef de Département       |
| 5 | NGOS III Simon            | Professeur | En poste                  |
| 6 | NKOUMBOU Charles          | Professeur | En poste                  |
| 7 | NZENTI Jean-Paul          | Professeur | En poste                  |

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

|    |                            |                 |                            |
|----|----------------------------|-----------------|----------------------------|
| 23 | ANABA ONANA Achille Basile | Chargé de Cours | En poste                   |
| 24 | BEKOA Etienne              | Chargé de Cours | En poste                   |
| 25 | ELISE SABABA               | Chargé de Cours | En poste                   |
| 26 | ESSONO Jean                | Chargé de Cours | En poste                   |
| 27 | EYONG JOHN TAKEM           | Chargé de Cours | En poste                   |
| 28 | FUH Calistus Gentry        | Chargé de Cours | <i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i> |

|    |                            |                  |               |
|----|----------------------------|------------------|---------------|
| 29 | 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 | TCHAPTCHET TCHATO De P.    | Chargé de Cours  | En poste      |
| 39 | TEHNA Nathanaël            | Chargé de Cours  | En poste      |
| 40 | TEMGA Jean Pierre          | Chargé de Cours  | En poste      |

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

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

| NOMBRE D'ENSEIGNANTS  |                        |                        |                  |                |                 |
|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------|----------------|-----------------|
| DÉPARTEMENT           | Professeurs            | Maîtres de Conférences | Chargés de Cours | Assistants     | Total           |
| BCH                   | 8 (01)                 | 14 (10)                | 13 (05)          | 3 (02)         | <b>38 (18)</b>  |
| BPA                   | 15 (01)                | 8 (06)                 | 18 (05)          | 05 (02)        | <b>46 (14)</b>  |
| BPV                   | 07 (01)                | 10 (01)                | 9 (06)           | 07 (01)        | <b>33 (9)</b>   |
| CI                    | 10 (01)                | 10 (02)                | 10 (02)          | 03 (0)         | <b>33 (5)</b>   |
| CO                    | 6 (0)                  | 21 (05)                | 05 (02)          | 02 (0)         | <b>34(7)</b>    |
| IN                    | 2 (0)                  | 1 (0)                  | 14 (01)          | 08 (01)        | <b>25 (2)</b>   |
| MAT                   | 2 (0)                  | 8 (0)                  | 15 (01)          | 05 (02)        | <b>30 (3)</b>   |
| MIB                   | 3 (0)                  | 4 (02)                 | 05 (01)          | 06 (02)        | <b>18 (5)</b>   |
| PHY                   | 15 (0)                 | 14 (02)                | 09 (03)          | 02 (0)         | <b>40 (5)</b>   |
| ST                    | 7 (1)                  | 15 (01)                | 18 (05)          | 02 (0)         | <b>42(7)</b>    |
| <b>Total</b>          | <b>75 (5)</b>          | <b>105 (29)</b>        | <b>116 (31)</b>  | <b>43 (10)</b> | <b>339 (75)</b> |
| Soit un total de      |                        | <b>339 (75)</b> dont : |                  |                |                 |
| -                     | Professeurs            | <b>75 (5)</b>          |                  |                |                 |
| -                     | Maîtres de Conférences | <b>105 (29)</b>        |                  |                |                 |
| -                     | Chargés de Cours       | <b>116 (31)</b>        |                  |                |                 |
| -                     | Assistants             | <b>43 (10)</b>         |                  |                |                 |
| () = Nombre de Femmes |                        | <b>75</b>              |                  |                |                 |

## **DEDICACE**

Je dédie ce travail à DIEU.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé conjointement au Laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I et au Centre Schistosomiase et Parasitologie de Yaoundé. Au terme de cette recherche, je suis heureux de pouvoir remercier tous ceux et celles qui m'ont accompagné et soutenu tout au long de cette aventure ou qui ont croisé ma route et grâce à qui j'ai pu avancer.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur TCHUEM TCHUENTE Louis-Albert, Directeur du « Centre Schistosomiasés et Parasitologie » de Yaoundé, qui a dirigé ce travail de thèse. Au cours de ces années, votre grande disponibilité, votre rigueur, votre enthousiasme et vos précieux conseils m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions. Merci également pour vos encouragements et pour la bienveillance dont vous avez fait preuve à mon égard pendant la préparation de cette thèse. Soyez assuré, Professeur de mon profond respect et de ma gratitude.

Au Professeur DZEUFLET DJOMENI Paul Désire, merci d'avoir dirigé mon travail avec beaucoup d'attention. Votre disponibilité, votre rigueur scientifique dans le travail et votre positivisme sont des valeurs mobilisantes que j'ai développé à vos côtés.

Au Professeur JATSA BOUKENG Hermine, merci de m'avoir accueilli dans votre équipe de recherche, guidé mes premiers pas dans la recherche. Vous avez toujours veillé au bon déroulement et au suivi de mon travail. Vos conseils ont été d'une importance capitale de mon intégration et du bon déroulement de ce travail au sein de votre équipe. Trouvez ici Professeur, l'expression de ma profonde gratitude.

Au Professeur SOKENG DONGMO Sélestin, pour votre aide inestimable dans la récolte de la plante lors de mes séjours à Ngaoundéré.

A tous les enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales pour vos enseignements, vos conseils et encouragements.

A TSAGUE DONGMO Christelle, Doctorante en Chimie Organique, pour m'avoir aidé dans la réalisation de la phytochimie de ce travail.

Aux personnels du « Centre Schistosomiase et Parasitologie », notamment M. TCHUENKOM Samuel et Mme LIEHEU Germaine, pour leurs disponibilités et leur assistance permanente.

A tous les membres de l'équipe de recherche du Centre Schistosomiasés et Parasitologie de Yaoundé. Je commencerai par KENFACK Christian Mérimé avec qui nous avons parcouru ce

long périple, merci pour le sens de l'amitié durable. Merci à DONGMO NOUMEDEM Calvin, FASSI KADJI Bertin Joseph, NKONDO TIENGA Emilienne, FEMOE MEMBE Ulrich, MOABOULOU Cyriaque, ELOUNDOU OMBEDE Roland Dieudonné, NAOUSSI SOH Roméo et NGATOU TCHAKOUNTE Blandine, travailler à vos côtés a été une belle expérience.

A ma famille, je remercie chacun de vous qui, de près ou de loin a contribué tant moralement que financièrement à l'aboutissement de ce travail.

A l'association PCD (Pathologie Cytologie et Développement), pour l'apport logistique nécessaire à la réalisation de l'histomorphométrie dans cette étude.

A la IFS « International Fondation for Science », pour votre contribution à la réalisation d'une partie de cette étude par l'entremise du financement N° F/3622-2F.

## SOMMAIRE

|   |              |
|---|--------------|
| <b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b> .....   | <b>i</b>     |
| <b>DEDICACE</b> .....   | <b>xii</b>   |
| <b>REMERCIEMENTS</b> .....  | <b>xiii</b>  |
| <b>SOMMAIRE</b> .....   | <b>xv</b>    |
| <b>LISTE DES FIGURES</b> .....  | <b>xvii</b>  |
| <b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....   | <b>xx</b>    |
| <b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....   | <b>xxii</b>  |
| <b>RESUME</b> .....   | <b>xxiii</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>xxv</b>   |
| <b>INTRODUCTION</b> .....   | <b>1</b>     |
| <b>CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE</b> .....   | <b>5</b>     |
| <b>I-1. Généralités sur les schistosomiasés</b> .....   | <b>6</b>     |
| I-1-1. Définition, classification et répartition.....   | 6            |
| I-1-2. Biologie du parasite ( <i>Schistosoma mansoni</i> ) .....  | 7            |
| I-1-3. Caractéristiques des différents stades de schistosomes.....  | 9            |
| I-1-4. Manifestations cliniques de la schistosomiase à <i>Schistosoma mansoni</i> .....   | 10           |
| I-1-5. Diagnostic .....   | 11           |
| I-1-6. Lutte contre la schistosomiase à <i>Schistosoma mansoni</i> .....  | 12           |
| <b>I-2. Schistosomiase à <i>Schistosoma mansoni</i> et atteintes hépatiques</b> .....   | <b>13</b>    |
| I-2-1. Généralités sur le foie .....  | 13           |
| I-2-2. Réactions inflammatoires hépatiques associées à l'infection à <i>Schistosoma mansoni</i> : le granulome bilharzien.....                                    | 14           |
| I-2-3. Schistosomiase à <i>Schistosoma mansoni</i> et stress oxydant .....  | 16           |
| <b>I-3. Etude toxicologique</b> .....   | <b>29</b>    |
| I-3-1. Toxicité <i>in vivo</i> .....  | 30           |
| I-3-2. Evaluation de la cytotoxicité de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique et des fractions de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> ..... | 31           |
| <b>I-4. Généralités sur <i>Ozoroa pulcherrima</i></b> .....   | <b>31</b>    |
| I-4-1. Systématique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> .....  | 31           |
| I-4-2. Description et biogéographie de <i>Ozoroa pulcherrima</i> .....  | 32           |
| I-4-3. Ethnopharmacologie de <i>Ozoroa pulcherrima</i> .....  | 32           |
| I-4-4. Etude phytochimique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> .....   | 33           |
| <b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES</b> .....   | <b>34</b>    |

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
| <b>II-1. Matériel .....</b>  | <b>35</b>                          |
| II-1-1. Matériel végétal .....   | 35                                 |
| II-1-2. Matériel animal .....  | <b>Erreur ! Signet non défini.</b> |
| <b>II-2. Méthodes .....</b>  | <b>35</b>                          |
| II-2-1. Récolte et préparation de l'extrait méthanolique et ses différentes fractions .....  | 35                                 |
| II-2-2. Analyse phytochimique de l'extrait aqueux, méthanolique et des fractions des racines de <i>Ozoroa pulcherrima</i> .....  | 38                                 |
| II-2-3. Réalisation du cycle de <i>Schistosoma mansoni</i> au laboratoire .....  | 44                                 |
| II-2-4. Etude <i>in vitro</i> des effets de l'extrait aqueux, méthanolique et fractions des racines de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur les cercaires et schistosomes .....   | 47                                 |
| II-2-5. Etude <i>in vivo</i> des effets des extraits aqueux et méthanolique et de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur les schistosomes .....   | 50                                 |
| II-2-6. Etude histomorphométrique.....   | 54                                 |
| II-2-7. Etude de la toxicité des extraits et fractions des racines de <i>Ozoroa pulcherrima</i> .....  | 57                                 |
| II-2-8. Protocole de dosage des différents biomarqueurs de la fonction hépatique et de la toxicité.....  | 65                                 |
| II-2-9. Analyses statistiques .....  | 78                                 |
| <b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>  | <b>79</b>                          |
| <b>III-1. Résultats.....</b>   | <b>80</b>                          |
| III-1-1. Activité <i>in vitro</i> des extraits aqueux et méthanolique et fractions à l'hexane et l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de <i>Ozoroa pulcherrima</i> contre les stades de <i>Schistosoma mansoni</i> . ..... | 80                                 |
| III-1-2. Effets des extraits aqueux et méthanolique et de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur l'infection à <i>Schistosoma mansoni</i> chez la souris .....                | 87                                 |
| III-1-3. Evaluation de la toxicité de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> .....  | 117                                |
| III-1-4. Composition phytochimique des extraits aqueux et méthanolique et des différentes fractions de l'extrait méthanolique des racines de <i>Ozoroa pulcherrima</i> .....   | 130                                |
| <b>III-2. Discussion .....</b>   | <b>140</b>                         |
| <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>  | <b>154</b>                         |
| <b>REFERENCES .....</b>  | <b>157</b>                         |
| <b>PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE .....</b>   | <b>175</b>                         |

## LISTE DES FIGURES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> : Cycle biologique de <i>Schistosoma mansoni</i> .....   | 8  |
| <b>Figure 2</b> : Granulomes bilharziens hépatiques associés à l'infection à <i>Schistosoma mansoni</i> . ...  | 15 |
| <b>Figure 3</b> : Principales sources cellulaires des espèces réactives d'oxygène.....   | 18 |
| <b>Figure 4</b> : Les trois étapes de la peroxydation lipidique. ....  | 26 |
| <b>Figure 5</b> : Représentation schématique de la balance pro-oxydant/antioxydant cellulaire, en situation basale et après l'action d'un stress. ....   | 27 |
| <b>Figure 6</b> : Photos de <i>Ozoroa pulcherrima</i> . ....   | 32 |
| <b>Figure 7</b> : Protocole de préparation de l'extrait aqueux des racines de <i>Ozoroa pulcherrima</i> . ....   | 36 |
| <b>Figure 8</b> : Protocole de préparation de l'extrait méthanolique des racines de <i>Ozoroa pulcherrima</i> et ses différentes fractions. ....   | 37 |
| <b>Figure 9</b> : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux. ....   | 41 |
| <b>Figure 10</b> : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes totaux. ....  | 42 |
| <b>Figure 11</b> : Courbe d'étalonnage des protéines totales contenues dans l'extrait méthanolique et ses fractions. ....  | 44 |
| <b>Figure 12</b> : Principe de détection des cellules viables avec le Cell Counting kit 8. ....  | 60 |
| <b>Figure 13</b> : Protocole expérimental d'évaluation de la toxicité aigue orale de <i>Ozoroa pulcherrima</i> . ....  | 62 |
| <b>Figure 14</b> : Protocole expérimental d'évaluation de la toxicité subaigue orale de <i>Ozoroa pulcherrima</i> . ....   | 64 |
| <b>Figure 15</b> : Courbes d'étalonnage du dosage de l'ASAT et de l'ALAT. ....   | 66 |
| <b>Figure 16</b> : Courbe d'étalonnage ASAT et ALAT. ....  | 68 |
| <b>Figure 17</b> : Courbe d'étalonnage des protéines totales plasmatiques.....   | 69 |
| <b>Figure 18</b> : Courbe d'étalonnage de la catalase.....   | 73 |
| <b>Figure 19</b> : Courbe d'étalonnage des nitrites. ....  | 76 |
| <b>Figure 20</b> : Effets <i>in vitro</i> des extraits aqueux et méthanolique et des fractions de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur la viabilité des cercaires de <i>Schistosoma mansoni</i> après 2 heures d'incubation. ....               | 81 |
| <b>Figure 21</b> : Effets <i>in vitro</i> des extraits aqueux et méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> et les différentes fractions sur la viabilité de <i>Schistosoma mansoni</i> après 24 heures d'incubation.....   | 83 |
| <b>Figure 22</b> : Effets <i>in vitro</i> des extraits aqueux et méthanolique et des fractions de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur la viabilité de <i>Schistosoma mansoni</i> après 48 heures d'incubation. ....                            | 84 |
| <b>Figure 23</b> : Effets <i>in vitro</i> des extraits aqueux et méthanolique et des fractions de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur la motricité de <i>Schistosoma mansoni</i> après vingt-quatre et quarante huit heures d'incubation. .... | 86 |
| <b>Figure 24</b> : Effets des extraits aqueux et méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur l'évolution pondérale. ....   | 88 |
| <b>Figure 25</b> : Effets du traitement avec l'extrait aqueux ou avec l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur le poids relatif du foie et de la rate. ....   | 89 |
| <b>Figure 26</b> : Effets du traitement avec l'extrait aqueux et avec l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur la charge parasitaire chez les souris infestées par <i>Schistosoma mansoni</i> . ....  | 90 |
| <b>Figure 27</b> : Effets du traitement avec l'extrait aqueux ou avec l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur la charge ovulaire fécale chez les souris infestées par <i>Schistosoma mansoni</i> . ..  | 91 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 28</b> : Effets du traitement avec l'extrait aqueux ou avec l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur la charge ovulaire hépatique chez les souris infestées par <i>Schistosoma mansoni</i> .<br>.....  | 92  |
| <b>Figure 29</b> : Effets du traitement avec l'extrait aqueux ou avec l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur la charge ovulaire intestinale chez les souris infestées par <i>Schistosoma mansoni</i> .<br>.....  | 93  |
| <b>Figure 30</b> : Effets du traitement avec l'extrait aqueux ou avec l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur les concentrations du malondialdéhyde et de glutathion réduit et sur l'activité enzymatique de la catalase chez les souris infestées par <i>Schistosoma mansoni</i> . ....                    | 98  |
| <b>Figure 31</b> : Microphotographies montrant les coupes de foie de souris infestées par <i>Schistosoma mansoni</i> après traitement avec l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> .....  | 100 |
| <b>Figure 32</b> : Effets du traitement avec l'extrait méthanolique sur le nombre de granulomes hépatiques chez les souris infestées par <i>Schistosoma mansoni</i> . ....  | 101 |
| <b>Figure 33</b> : Effets du traitement avec l'extrait méthanolique sur le volume des granulomes hépatiques chez les souris infestées par <i>Schistosoma mansoni</i> . ....   | 102 |
| <b>Figure 34</b> : Effets de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur l'évolution pondérale. ....  | 103 |
| <b>Figure 35</b> : Effets du traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur le poids relatif du foie, de la rate et de l'intestin . ....   | 104 |
| <b>Figure 36</b> : Effets du traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur la charge parasitaire , la charge ovulaire hépatique , la charge ovulaire intestinale et la charge ovulaire fécale chez les souris infestées par <i>Schistosoma mansoni</i> . .... | 106 |
| <b>Figure 37</b> : Effets du traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur les concentrations de malondialdéhyde, de nitrites, de glutathion réduit et sur les activités de la superoxyde dismutase et de la catalase. ....   | 110 |
| <b>Figure 38</b> : Microphotographies montrant les coupes histologiques de foie de souris colorées à l'Hématoxyline Eosine. ....  | 112 |
| <b>Figure 39</b> : Microphotographies montrant les coupes histologiques de foie de souris infestées colorées au Picrosirius. ....   | 114 |
| <b>Figure 40</b> : Microphotographies montrant les coupes histologiques de foie de souris infestées par <i>Schistosoma mansoni</i> colorées au Giemsa. ....   | 115 |
| <b>Figure 41</b> : Effets du traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique sur le nombre de granulomes hépatique des souris infestées par <i>Schistosoma mansoni</i> . ....  | 116 |
| <b>Figure 42</b> : Effets du traitement à la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique sur le volume des granulomes hépatiques des souris infestées par <i>Schistosoma mansoni</i> . ....   | 117 |
| <b>Figure 43</b> : Effets de l'extrait méthanolique des racines de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur l'évolution pondérale après 28 jours d'administration. ....  | 119 |
| <b>Figure 44</b> : Microphotographies des coupes du foie chez les souris ayant reçues l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> pendant vingt-huit jours. ....  | 126 |
| <b>Figure 45</b> : Microphotographies des coupes des reins chez les souris ayant reçues l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> pendant vingt-huit jours. ....  | 127 |
| <b>Figure 46</b> : Microphotographies des coupes de poumons des souris ayant reçues l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> pendant vingt-huit jours. ....  | 128 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 47</b> : Concentrations inhibitrices 50 des extraits aqueux et méthanolique et des fractions au <i>n</i> -hexane et à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur la lignée cellulaire hepa 1-6. ....                      | 130 |
| <b>Figure 48</b> ; Chromatogramme de HPLC-MS correspondant aux ions moléculaires [M-H] <sup>-</sup> (A) et [M+H] <sup>+</sup> de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> . ....  | 133 |
| Figure 49 : Chromatogrammes de HPLC-MS correspondant aux structures putatives des composés identifiés dans l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> .....   | 135 |
| <b>Figure 50</b> : Chromatogramme de la HPLC-MS correspondant aux ions moléculaires [M-H] <sup>-</sup> de la fraction au <i>n</i> -hexane de l'extrait méthanolique des racines de <i>Ozoroa pulcherrima</i> et les structures putatives des composés identifiés. .... | 137 |
| <b>Figure 51</b> : Chromatogramme de la HPLC-MS correspondant aux ions moléculaires [M+H] <sup>+</sup> de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> et les structures putatives des composés identifiés .....            | 139 |

## LISTE DES TABLEAUX

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau I</b> : Principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques ...   | 17  |
| <b>Tableau II</b> : Préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique .....  | 40  |
| <b>Tableau III</b> : Préparation de la gamme d'étalonnage de la rutine .....  | 42  |
| <b>Tableau IV</b> : Protocole de dosage des protéines totales.....  | 44  |
| <b>Tableau V</b> : Répartition des animaux pour l'évaluation des effets des extraits aqueux et méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> .....  | 51  |
| <b>Tableau VI</b> : Répartition des animaux pour l'évaluation de l'effet de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> .....   | 51  |
| <b>Tableau VII</b> : Protocole de réalisation des courbes d'étalonnage de l'ASAT et de l'ALAT .....   | 66  |
| <b>Tableau VIII</b> : Protocole de dosage des transaminases plasmatiques .....  | 67  |
| <b>Tableau IX</b> : Protocole de réalisation de la courbe d'étalonnage des transaminases hépatiques (ALAT et ASAT) .....  | 67  |
| <b>Tableau X</b> : Protocole de dosage des transaminases.....   | 68  |
| <b>Tableau XI</b> : Protocole de dosage de la bilirubine totale .....   | 70  |
| <b>Tableau XII</b> : Protocole de réalisation de la courbe d'étalonnage de la catalase .....  | 73  |
| <b>Tableau XIII</b> : Protocole de dosage des nitrites .....  | 76  |
| <b>Tableau XIV</b> : Protocole de dosage de triglycéride.....   | 77  |
| <b>Tableau XV</b> : Protocole de dosage de cholestérol total .....  | 78  |
| <b>Tableau XVI</b> : Concentrations létales 50 (CL <sub>50</sub> ) des extraits aqueux et méthanolique et fractions de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> après 48 heures d'incubation .....                                 | 85  |
| <b>Tableau XVII</b> : Effets du traitement avec l'extrait aqueux et avec l'extrait méthanoliques de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur quelques paramètres de la fonction hépatique chez les souris infestées par <i>Schistosoma mansoni</i> ..... | 95  |
| <b>Tableau XVIII</b> : Effets de la fraction avec l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> sur quelques paramètres de la fonction hépatique chez les souris infestées par <i>Schistosoma mansoni</i> .....   | 108 |
| <b>Tableau XIX</b> : Poids corporel et poids relatifs de quelques organes après administration de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> aux doses de 2000 et 5000 mg/kg chez la souris .....                                    | 118 |
| <b>Tableau XX</b> : Poids relatifs de quelques organes après administration de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> aux souris pendant 28 jours .....  | 120 |
| <b>Tableau XXI</b> : Paramètres hématologiques des souris après administration de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> pendant 28 jours.....   | 121 |
| <b>Tableau XXII</b> : Paramètres biochimigiques chez les souris après administration de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> pendant vingt-huit jours .....  | 123 |
| <b>Tableau XXIII</b> : Marqueurs hépatiques du stress oxydant après administration de l'extrait méthanolique de <i>Ozoroa pulcherrima</i> chez les souris pendant vingt-huit jours.....   | 124 |
| <b>Tableau XXIV</b> : Phytochimie qualitative des extraits et fractions des racines de <i>Ozoroa pulcherrima</i> .....  | 131 |
| <b>Tableau XXV</b> : Analyse quantitative des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des protéines totales de l'extrait méthanolique et ses fractions au <i>n</i> -hexane et a l'acétate d'éthyle de <i>Ozoroa pulcherrima</i> .....          | 132 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau XXVI</b> : Protocole d'identification des composés présents dans l'extrait méthanolique des racines de <i>Ozoroa pulcherrima</i> ..... | 136 |
|---|-----|

## LISTE DES ABREVIATIONS

|                            |  |
|----------------------------|--|
| <b>ALAT :</b>              | Alanine Amino Transférase  |
| <b>ASAT :</b>              | Aspartate Amino Transférase  |
| <b>CAA:</b>                | Circulating Anodic Antigen   |
| <b>CAT:</b>                | Catalase   |
| <b>CCA:</b>                | Circulating Cationic Antigen                                       |
| <b>CL<sub>50</sub> :</b>   | Concentration létale 50  |
| <b>CSP :</b>               | Centre Schistosomiase et Parasitologie de Yaoundé                  |
| <b>DL<sub>50</sub> :</b>   | Dose létale 50   |
| <b>DMEM:</b>               | Dulbecco's Modified Earles Medium                                  |
| <b>DMSO :</b>              | Diméthylsulfoxyde  |
| <b>EDTA :</b>              | Ethylène Diamine Tétracétique Acide                                |
| <b>ELISA:</b>              | Enzyme-Linked ImmunoSorbant Essay                                  |
| <b>EROs :</b>              | Espèces réactives de l'Oxygène                                     |
| <b>ERN :</b>               | Espèces Réactives d'azote  |
| <b>GMEM :</b>              | “Glasgow minimum essential medium”                                 |
| <b>GPx :</b>               | Glutathion peroxydase  |
| <b>GSH :</b>               | Glutathion réduit  |
| <b>HPLC-MS:</b>            | Chromatographie Liquide à Haute Performance-Spectrométrie de Masse |
| <b>CI<sub>50</sub> :</b>   | Concentration inhibitrice 50                                       |
| <b>MDA :</b>               | Malondialdéhyde  |
| <b>NFS :</b>               | Numération Formule Sanguine  |
| <b>OECD:</b>               | Organization for Economic Co-operation and Development             |
| <b>OMS :</b>               | Organisation Mondiale de la Santé                                  |
| <b>PZQ:</b>                | Praziquantel   |
| <b>SCGH :</b>              | Système de Classification Globalement Harmonisé                    |
| <b><i>S. mansoni</i> :</b> | <i>Schistosoma mansoni</i>   |
| <b>SOD :</b>               | Superoxyde dismutase   |
| <b>WHO:</b>                | “World Health Organization”  |

## RESUME

La schistosomiase est une infection chronique provoquée par les schistosomes. Actuellement le praziquantel demeure le médicament de choix pour le traitement de toutes les formes de schistosomiases. Cependant, la dépendance à un médicament unique est problématique car certaines souches de schistosomes peuvent développer des résistances. Dans un tel contexte, les plantes médicinales deviennent des candidats potentiels comme source de nouveaux prototypes de médicaments. L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets pharmacologiques des extraits et fractions de *Ozoroa pulcherrima* sur les dysfonctionnements induits par l'infection à *Schistosoma mansoni* chez la souris blanche BALB/c.

Premièrement, une évaluation de l'activité antischistosomale *in vitro* des extraits aqueux et méthanolique et des fractions sur deux stades de développement de *Schistosoma mansoni* a été réalisée. L'extrait aqueux, l'extrait méthanolique et le résidu méthanolique aux concentrations 62,5; 125; 250; 500; 1000 et 2000 µg/mL, aussi bien que les fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique aux concentrations 31,25; 62,5; 125; 250; 500 et 1000 µg /mL ont été testés sur les cercaires et les vers adultes de *Schistosoma mansoni*. Le Niclosamide olamine 5 % (1 µg/mL) et le praziquantel (10 µg/mL) ont été utilisés comme médicament de référence contre les cercaires et les schistosomes adultes respectivement. La mortalité des cercaires a été évaluée après 2 heures d'incubation, tandis que la mortalité des vers et la motricité des vers survivants ont été évaluées après 24 heures et 48 heures d'incubation. Les souris infestées à *Schistosoma mansoni* ont quotidiennement reçues l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique ou la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg pendant 4 semaines à partir de la 5<sup>ème</sup> semaine post-infestation. Après la neuvième semaine post infestation, les paramètres parasitologiques et les biomarqueurs du stress ont été déterminés. L'effet des extraits ou de la fraction sur le stress oxydant a été évalué. Par ailleurs, le potentiel anti-inflammatoire de *Ozoroa pulcherrima* a été mesuré par les analyses biochimiques et l'histomorphométrie du foie. Le profil toxicologique de *Ozoroa pulcherrima* a été évalué par l'étude de la cytotoxicité des extraits et des fractions de *Ozoroa pulcherrima* contre les hépatocytes de souris, la lignée Hepa 1-6 associé à la méthode colorimétrique CCK-8. D'autre part, la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* a été réalisée. En plus, les analyses phytochimiques qualitative et quantitative ; de même que la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse a été réalisée pour identifier les classes de composés présents dans les extraits et fractions de *Ozoroa pulcherrima*.

Les résultats de la première partie montrent que les extraits et fractions de *Ozoroa pulcherrima* ont significativement augmenté la mortalité des cercaires et des vers adultes de

manière concentration-dépendante. L'extrait méthanolique était la substance la plus active sur les cercaires avec une concentration létale 50 (CL<sub>50</sub>) de 20,65 µg/mL après 30 minutes d'incubation; tandis que la fraction au *n*-hexane était la substance la plus active sur les vers avec une concentration létale 50 de 79,54 µg/mL (65,58 à 96,47 µg/mL) après 48 heures d'incubation. Une réduction significative de l'activité motrice des vers survivants de 18,47 à 100 % a été observée après incubation aux différentes concentrations d'extraits et fractions de *Ozorioa pulcherrima*. Outre les résultats phytochimiques qualitatifs et quantitatifs, l'analyse phytochimique par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) a révélé la présence de nombreux terpènes, alcaloïdes, flavonoïdes, phénols, sucre, alcool et acides gras insaturés déjà identifiés et plusieurs autres nouvelles molécules jusqu'ici non identifiées. Les résultats de la seconde partie de ce travail ont montré que l'extrait méthanolique tout comme la fraction à l'acétate d'éthyle a entraîné une baisse ( $p < 0,05$  à  $p < 0,001$ ) de la charge parasitaire, des charges ovulaires hépatique, intestinale et fécale. L'administration de l'extrait méthanolique ou de la fraction à l'acétate d'éthyle aux doses de 200 et de 400 mg/kg a entraîné une réduction ( $p < 0,001$ ) de l'activité enzymatique des transaminases plasmatique, de la bilirubine totale et une augmentation ( $p < 0,001$ ) des protéines totales. L'extrait aqueux n'a provoqué que la diminution significative de la bilirubine aux doses de 200 et de 400 mg/kg. Le traitement avec l'extrait méthanolique ou avec la fraction à l'acétate d'éthyle a entraîné une amélioration des paramètres du stress chez les souris infestées à travers la baisse du malondialdéhyde, de l'augmentation des concentrations des nitrites et du glutathion réduit, et de l'activité enzymatique de la catalase. En outre, le nombre tout comme le volume du granulome du foie ont été significativement réduits après traitement avec l'extrait méthanolique ou avec la fraction à l'acétate d'éthyle. Les effets cytotoxiques contre les hépatocytes de souris, la lignée Hepa 1-6 indiquent que les extraits et des fractions de l'extrait méthanolique de *Ozorioa pulcherrima* ont inhibé la prolifération cellulaire avec une IC<sub>50</sub> > 20 µg/mL et semblent être sans risque. L'administration aigüe de l'extrait méthanolique est révélée faiblement toxique avec une DL<sub>50</sub> supérieure à 5000 mg/kg. En dehors des diminutions ( $p < 0,05$ ) du nombre de globules blancs et de lymphocytes observés dans les groupes satellites et témoin satellite après 28 jours de traitement à l'extrait méthanolique de *Ozorioa pulcherrima*, aucun signe véritable de toxicité n'a été enregistré. La dose de 200 mg/kg est ainsi la dose sans effet toxique observable.

Les résultats de ce travail ont montré que l'extrait méthanolique et la fraction à l'acétate d'éthyle de *O. pulcherrima* ont été plus efficace que l'extrait aqueux tant *in vitro* qu'*in vivo* et seraient des sources potentielles des molécules antischistosomales.

**Mots clés :** *Ozorioa pulcherrima*, inflammation, stress oxydant, toxicité, *Schistosoma mansoni*, foie, HPLC-MS.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a chronic infection caused by trematode flatworms of the genus *Schistosoma*. Chemotherapy remains the only immediate recourse to minimize the prevalence and incidence of this worldwide disease. At present, praziquantel remains the drug of choice for the treatment of all forms of schistosomiasis. However, dependence on a single drug is concern; because some strains can develop resistance. In this context, medicinal plants become potential candidates as sources of new drug prototypes. The objective of this study was to evaluate the pharmacological effects of extracts and fractions of *Ozoroa pulcherrima* on some dysfunctions triggered by an infection with *Schistosoma mansoni* in BALB/c mice.

Firstly, an evaluation of the *in vitro* antischistosomal activity of the aqueous and methanolic extracts and its fractions on two stages of development of *Schistosoma mansoni* was carried out. The aqueous extract, the methanolic extract and the methanolic residue at concentrations 62.5, 125, 250, 500, 1000 and 2000 µg/mL, as well as *n*-hexane and ethyl acetate fractions of the methanolic extract with concentrations 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL were tested on cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni*. Niclosamide olamine 5% (1 µg/mL) and praziquantel (10 µg/mL) have been used as reference drugs against cercariae and adult schistosomes respectively. The mortality of cercariae was determined after 2 hours of incubation, while the mortality of the worms and the motricity of surviving worms were assessed after 24 hours and 48 hours of incubation. Mice infested with *Schistosoma mansoni* daily received the aqueous extract, the methanolic extract and the ethyl acetate fraction of the methanolic extract at doses of 100, 200 and 400 mg/kg for 4 weeks after the 5<sup>th</sup> week post-infestation. After the ninth week post-infestation, worm burden and ova count in the feces, in the liver and intestine were performed. The effect of the extracts or fraction on oxidative stress was determined. Furthermore, the anti-inflammatory potential of *Ozoroa pulcherrima* was evaluated by measuring of total protein concentrations, enzymatic activities of transaminases and liver histomorphometry. The toxicological profile of *Ozoroa pulcherrima* was conducted by studying the cytotoxicity of extracts and fractions of *Ozoroa pulcherrima* against mouse hepatocytes, the Hepa 1-6 line associated with the CCK-8 colorimetric method. Furthermore, the acute and subacute toxicity of the methanolic extract of *Ozoroa pulcherrima* was realized. In addition, qualitative and quantitative phytochemical analyzes; as well as high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry were carried out to identify the groups of compounds present in the extracts and fractions of *Ozoroa pulcherrima*.

The results of the first part show that the extracts and fractions of *Ozoroa pulcherrima* significantly increased the mortality of cercariae and adult worms in a concentration-dependent

manner. The methanolic extract was the most active substance on the cercariae with a lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of 20.65 µg/mL after 30 minutes of incubation; while the *n*-hexane fraction was the most active substance on the worms with a lethal concentration of 79.54 µg/mL (65.58 to 96.47 µg/mL) after 24 and 48 hours of incubation. A significant reduction in the motor activity of the surviving worms (18.47 to 100 %) was observed after incubation at different concentrations of extracts and fractions of *Ozorioa pulcherrima*. In addition to the qualitative and quantitative phytochemical results, the phytochemical analysis by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS) revealed the presence of numerous terpenes, alkaloids, flavonoids and unsaturated fatty acids already identified and several other new molecules not yet identified. The results of the second part of this work showed that the methanolic extract or the ethyl acetate fraction led to a decrease ( $p < 0.05$  to  $p < 0.001$ ) of worm burden, hepatic, intestinal and fecal ova count. Administration of the methanolic extract or ethyl acetate fraction at doses of 200 and 400 mg/kg resulted in a reduction ( $p < 0.001$ ) in plasma transaminases (ALAT and ASAT) enzymatic activity, total bilirubin and an increase ( $p < 0.001$ ) in total protein. The aqueous extract only caused a significant decrease in bilirubin at 200 and 400 mg/kg. Treatment with methanolic extract or ethyl acetate fraction led to an improvement in the stress parameters in infested mice through a decrease of malondialdehyde (MDA), an increase nitrite and reduced glutathione concentrations, as well the enzymatic activity of catalase. In addition, both the number and the volume of the liver granuloma were significantly reduced after treatment with methanolic extract or ethyl acetate fraction. The cytotoxic effects against hepatocytes of C57/l mice, the Hepa 1-6 line indicate that the aqueous extract, the methanolic extract and the fractions of the methanolic extract of *Ozorioa pulcherrima* having inhibited cell proliferation with an IC<sub>50</sub> > 20 µg/mL seem to be safe. Apart from the significant decreases ( $p < 0.05$ ) in the number of white blood cells and lymphocytes observed in the satellite and satellite control groups, no real signs of toxicity were recorded. The results of this work showed that the methanolic extract and the ethyl acetate fraction of *Ozorioa pulcherrima* were more effective than the aqueous extract both, *in vitro* and *in vivo*, for all parameters. The methanolic extract and its fractions are therefore potential sources of the antischistosomal molecules.

**Key words :** *Ozorioa pulcherrima*, inflammation, oxidative stress, toxicity, *Schistosoma mansoni*, liver, HPLC-MS.

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Les schistosomiasis ou schistosomoses sont des affections parasitaires dues à un ver plat, le schistosome, trématode, hématophage, vivant dans la circulation sanguine chez l'homme et les animaux. La schistosomiasis constitue la deuxième endémie parasitaire mondiale derrière le paludisme. Au moins 236,6 millions de personnes ont eu besoin du traitement en 2019 et la transmission est avérée dans 78 pays dans le monde. La zone de prévalence de la schistosomiasis se situe dans les régions tropicales et subtropicales. On estime qu'au moins 90 % de personnes qui ont besoin d'un traitement contre la schistosomiasis vivent en Afrique (OMS, 2022). Au Cameroun, on estime qu'environ cinq millions de personnes sont infectées (Tchuem Tchuente *et al.*, 2013).

Dans la physiopathologie de la schistosomiasis, les œufs restés coincés dans les tissus sont à l'origine d'une réaction inflammatoire à l'origine de la formation du granulome bilharzien. Les granulomes vont conduire aux lésions des organes dans lesquels les œufs sont piégés. Ces granulomes enserrant électivement les veinules portes qui sont souvent thrombosées donnant la classique image de sclérose en « tuyau de pipe ». Cette fibrose entraîne une hypertension portale responsable pour l'essentiel de la mortalité de cette affection (Kamdem *et al.*, 2018)).

L'infection se produit lorsque les cercaires, libérées par les gastéropodes d'eau douce pénètrent dans la peau d'une personne qui est en contact avec une eau infectée. Les lésions causées par la maladie, dues à l'inflammation et à la fibrose liées aux œufs du parasite, sont généralement chroniques et peuvent être douloureuses et débilitantes, entravant à la fois la production personnelle et le développement public (McManus *et al.*, 2018). Il n'existe actuellement aucun vaccin efficace pour prévenir l'infection à *Schistosoma*. La lutte contre la schistosomiasis repose sur l'utilisation d'un seul médicament, le praziquantel (Caffrey, 2007). Cependant, un traitement à long terme et répété au praziquantel peut entraîner une résistance aux médicaments ou une sensibilité réduite (Pinto-Almeida *et al.*, 2016). En effet, des études de laboratoire et des essais cliniques ont soulevé un possible développement de tolérance et /ou de résistance au praziquantel (Doenhoff *et al.*, 2008). De plus, le praziquantel n'empêche pas les réinfections et est moins actif contre les formes immatures de schistosome, ce qui entraîne de faibles taux de guérison dans les zones où la schistosomiasis est hyperendémique (El-Beshbishy *et al.*, 2011; Ouedraogo *et al.*, 2016). Ainsi, il est urgent de développer de nouvelles molécules complémentaires et/ou alternatives au praziquantel (Ramez *et al.*, 2021). De plus, les produits naturels ont toujours été

considérés comme source potentielle dans la découverte et le développement de médicaments (de Oliveira *et al.*, 2017).

La tendance à utiliser des extraits de plantes naturelles comme source de nouveaux médicaments sûrs et efficaces est prometteuse et constitue la base du développement de produits chimiques à titre thérapeutique (Magalhães *et al.*, 2009; Parreira *et al.*, 2010). Récemment, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été menées pour rechercher de nouveaux composés actifs à partir des plantes médicinales contre *Schistosoma mansoni* et des résultats prometteurs ont été rapportés (de Melo *et al.*, 2011). C'est le cas par exemple des espèces végétales *Zingiber officinale* (Mostafa *et al.*, 2011), *Piper cubeba* (Magalhães *et al.*, 2012), *Clerodendrum umbellatum* (Jatsa *et al.*, 2015a), *Sida pilosa* (Pereira, *et al.*, 2015; Jatsa *et al.*, 2016), *Rauwolfia vomiforia* (Tekwu *et al.*, 2017) et *Centella erecta* ( de Carvalho *et al.*, 2022) qui ont montré une activité *in vitro* et / ou *in vivo* contre l'un des stades de développement des schistosomes. C'est dans cet optique que notre équipe de recherche s'est intéressée à la pharmacopée traditionnelle camerounaise pour la recherche des plantes ayant des effets schistosomicides, parmi lesquelles *Ozoroa pulcherrima* a été sélectionnée et a fait l'objet d'un projet, dont le financement a permis la réalisation de cette étude. Il est traditionnellement recommandé pour le traitement des helminthiases intestinales, de porter à ébullition les racines de jeunes plants de *Ozoroa pulcherrima* pendant trente minutes, puis de boire un verre chaque jour jusqu'à guérison (Adjanooun *et al.*, 1996).

Dans la présente étude, les travaux visaient à évaluer les effets de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique ainsi que des fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur les dysfonctionnements liés à l'infestation par *Schistosoma mansoni* chez la souris.

Plus spécifiquement, ils s'agissaient de :

- déterminer l'effet antischistosomal *in vitro* de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* et de leurs fractions sur les cercaires et *in vitro et in vivo* sur les vers adultes de *Schistosoma mansoni*;
- définir l'impact du traitement avec l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique et la fraction à l'acétate d'éthyle de *Ozoroa pulcherrima* sur le stress oxydant hépatique chez les souris infestées par *Schistosoma mansoni*;
- mesurer les effets du traitement de la schistosomiase à *Schistosoma mansoni* par l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* et de sa fraction à l'acétate d'éthyle sur le statut inflammatoire du foie;

- délimiter le profil toxicologique *in vitro* des extraits et fractions de *Ozoroa pulcherrima* et *in vivo* de l'extrait méthanolique.

# **CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE**

## I-1. Généralités sur les schistosomiasés

### I-1-1. Définition, classification et répartition

#### a- Définition

Les bilharzioses ou schistosomiasés ou encore schistosomoses sont des affections parasitaires dues à des vers plats, les bilharzies ou schistosomes, trématodes à sexes séparés, hémato-phages, vivants dans le système circulatoire (Getilini *et al.*, 1993).

#### b- Classification de *Schistosoma mansoni* (Southgate *et al.*, 1998)

|                 |  |
|-----------------|--|
| Règne :         | Animal                                     |
| Sous-règne :    | Métazoaires                                |
| Embranchement : | Plathelminthes                             |
| Classe :        | Trématodes                                 |
| Sous-classe :   | Digéniens                                  |
| Ordre :         | Strigeatida (La rue, 1926)                 |
| Sous-ordre :    | Strigeata (La rue, 1926)                   |
| Famille:        | Schistosomatidae (Stiles and Hassal, 1898) |
| Sous-famille :  | Schistosomatinae (Stiles and Hassal, 1926) |
| Genre :         | <i>Schistosoma</i> (Weinland, 1858)        |
| Espèce :        | <i>Schistosoma mansoni</i> (Sambon, 1907)  |

#### c- Répartition des schistosomiasés

Les schistosomoses ou bilharzioses constituent la deuxième endémie parasitaire mondiale après le paludisme. Elles sont endémiques dans 78 pays où 236,6 millions de personnes ont eu besoin d'un traitement antibilharzien en 2019 et 90 % de ces personnes vivent en Afrique (OMS, 2022). Près de 800 millions de personnes sont exposées au risque d'infection. Au Cameroun, on estime à 5 millions le nombre de personnes à risque d'infection dont plus de 2 millions sont parasitées (Tchuem tchuénté *et al.*, 2013). La maladie est causée par six espèces de schistosomes, dont trois sont présentes au Cameroun : *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni* et *Schistosoma guineensis*. En Afrique sub-sahélien, les deux espèces prédominantes sont *Schistosoma haematobium* et *Schistosoma mansoni*.

- *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852): agent de la schistosomiase urinaire ou vésicale. Elle est présente en Afrique noire, notamment à Madagascar, dans la Vallée du Nil et au Moyen-Orient (Aubry & Gaüzère, 2021). Au Cameroun, *S. haematobium* est fréquente dans les régions de l'Extrême nord, du Nord, de l'Adamaoua, de l'Ouest, Centre, Est, du Littoral et du Sud-ouest (Tchuem Tchuénté *et al.*, 2012; Tchuem Tchuénté *et al.*, 2013);

- *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907): C'est l'agent de la schistosomiase intestinale. Il est présent dans la plupart des pays africains, à Madagascar, au Proche-Orient, en Amérique latine et aux Antilles (Aubry & Gaüzère, 2021). Au Cameroun, *S. mansoni* est principalement endémique dans les régions du Nord, de l'Adamaoua et de l'Extrême nord avec des extensions dans le Centre, le Nord-ouest et le Littoral (Tchuem Tchuente *et al.*, 2012; Tchuem Tchuente *et al.*, 2013);

- *Schistosoma guineensis*: Il a longtemps été considéré comme *Schistosoma intercalatum* mais Pagès *et al.* (2003) ont montré que *S. guineensis* est une espèce jumelle de *S. intercalatum*. *S. guineensis* est responsable de la bilharziose strictement africaine et ne sévirait que dans le pourtour du Golfe de Guinée (Hotez *et al.*, 2006; Pagès *et al.*, 2003). Au Cameroun, *S. guineensis* n'est présent que dans 3 foyers : Ekondo titi, Edéa et Eséka (Tchuem Tchuente *et al.*, 2012; Tchuem Tchuente *et al.*, 2013).

### **I-1-2. Biologie du parasite (*Schistosoma mansoni*)**

Les trématodes sont des vers plats dixènes. Dans le cas des schistosomes, le cycle évolutif est hétéroxène et ne varie guère d'une espèce à l'autre et l'hôte intermédiaire est un mollusque pulmoné aquatique (Figure 1). Dans le cas de *S. mansoni*, l'hôte intermédiaire est une planorbe et au Cameroun la planorbe responsable de la transmission par excellence de la maladie est *Biomphalaria pfeifferi*.

#### ✓ **Cycle dans l'eau douce et chez le mollusque:**

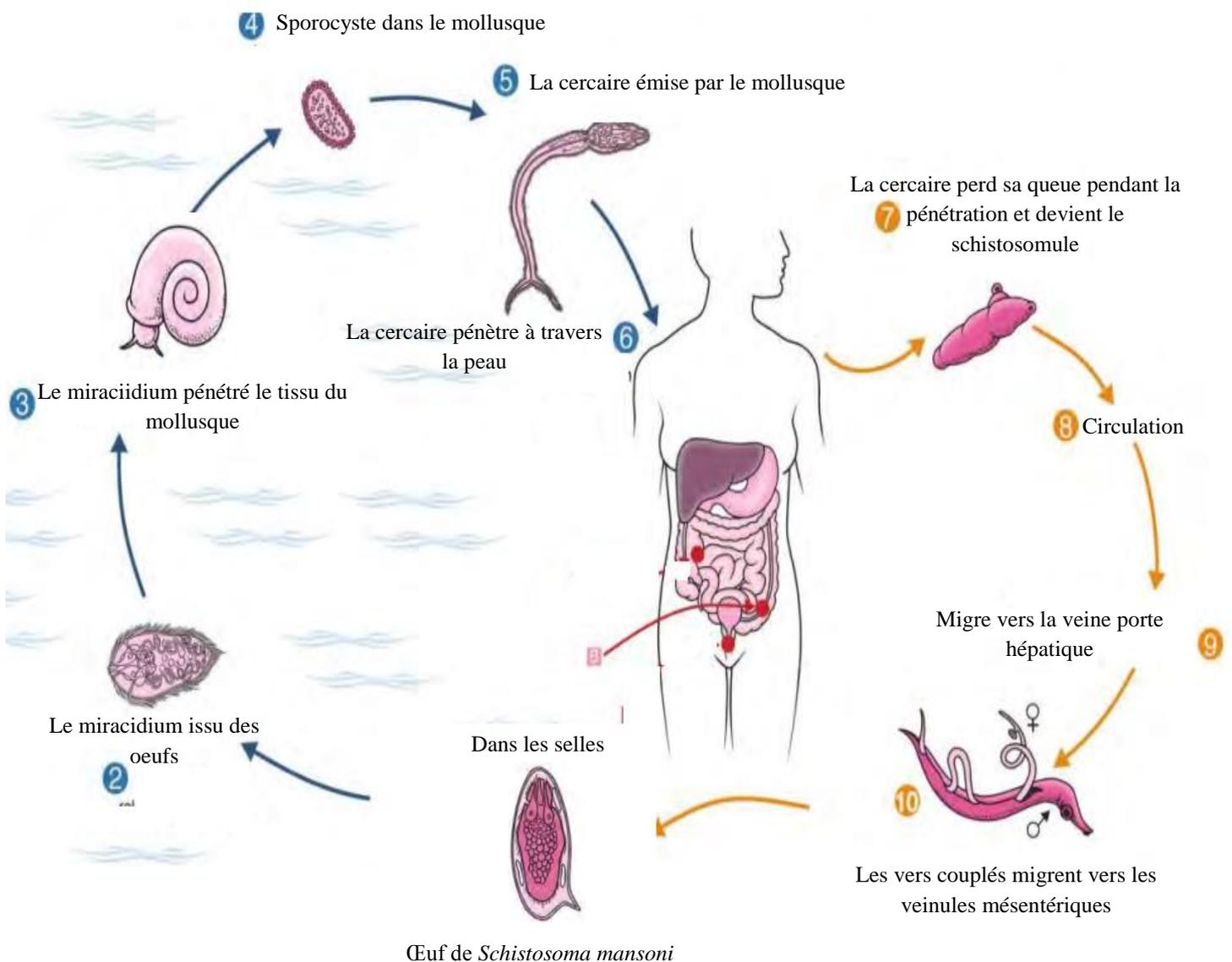
Éliminé avec les matières fécales, l'œuf de *S. mansoni* tombe dans l'eau douce, milieu favorable pour le déroulement de son cycle évolutif. De cet œuf s'échappe le miracidium qui nage librement dans l'eau à la recherche du mollusque hôte intermédiaire spécifique dans lequel il poursuivra son développement. Après avoir pénétré dans le mollusque, le miracidium bourgeonne donnant des sporocystes (le miracidium ne survit pas dans l'eau au-delà de 48 heures). Ces derniers poursuivront leur développement dans hépatopancréas (phénomène de polyembryonie), ce qui aboutit à la formation, à partir d'un seul miracidium, de milliers de cercaires qui émigrent du mollusque aux heures chaudes de la journée (Aubry & Gaüzère, 2021). Ces cercaires peuvent vivre en eau libre pendant 48 h maximum. Chez le mollusque, la durée du cycle du parasite est d'un mois.

#### ✓ **Cycle chez l'hôte définitif:**

L'infestation de l'homme s'effectue lors des baignades dans des eaux douces contaminées par des mollusques. Les cercaires se fixent sur l'épiderme grâce à leur ventouse antérieure munie d'épines. La pénétration à travers la couche cornée fait intervenir une action mécanique et une action chimique (sécrétion d'enzymes lytiques). Cette pénétration est complète en 10 minutes environ. Le jeune schistosomule traverse la couche de Malpighi suivant un trajet oblique, en lysant

les cellules épidermiques, atteint le derme conjonctif et pénètre dans un petit vaisseau lymphatique ou dans une vésicule.

Le trajet du derme aux poumons se fait de façon passive, par transport lymphatique ou veineux et l'arrivée dans les poumons est effective 4 jours après la pénétration. De là, les schistosomules gagnent les veinules portes intra-hépatiques par voie circulatoire, mais il est possible que certains atteignent le foie par un trajet trans-tissulaire. La phase migratoire dure au total 10 à 21 jours. Seuls les schistosomules qui atteignent les veinules porte intra-hépatiques vont pouvoir poursuivre leur développement jusqu'à la différenciation et la maturation sexuelle (en 3 semaines environ). Par contre, ceux qui se perdent dans d'autres organes resteront à l'état immature.



**Figure 1 :** Cycle biologique de *Schistosoma mansoni* (Shaker *et al.*, 2014).

Des veinules portes intra-hépatiques, le couple de schistosomes se déplace à contre-courant vers les lieux de ponte. Le trajet s'effectue d'abord par la veine porte, puis par la veine mésentérique inférieure, et enfin par la veine hémorroïdale supérieure vers le plexus hémorroïdal. Arrivée dans les veinules des plexus, la femelle quitte le mâle pour s'engager dans les fines ramifications veineuses des parois viscérales ou intestinales et remonte jusqu'à la sous muqueuse où elle commence sa ponte. La durée de vie des schistosomes chez l'homme a été estimée de 2 à 18 années. Les œufs pondus peuvent migrer pour traverser la muqueuse et tomber dans la lumière de l'intestin. Ils seront éliminés avec les selles et pourront ainsi alimenter un nouveau cycle en réinfestant un mollusque. Certains œufs seront bloqués dans les tissus où ils vont rester vivants et détermineront la formation d'un granulome bilharzien.

### **I-1-3. Caractéristiques des différents stades de schistosomes**

#### **✓ Vers adultes**

Les adultes sont gonochoriques (sexes séparés) et pourvus de deux ventouses, l'une orale et l'autre ventrale (Colley *et al.*, 2014).

Les mâles mesurent 6 à 20 mm de long suivant les espèces et sont cylindriques au niveau de son tiers antérieur. Le reste du corps est aplati et les cordes latérales se remplissent ventralement pour délimiter le canal gynécophore où se loge la femelle. Les téguments sont couverts d'épines ou de tubercules. On observe 4 à 5 testicules situés directement sous la ventouse ventrale chez *S. haematobium* (Gryseels, 2012). Chez le mâle de *S. intercalatum*, le système génital comporte 3 à 4 testicules et le cæcum est situé au milieu du corps (Bourée, 2008).

D'aspect cylindrique, la femelle mesure 7 à 20 mm selon l'espèce. Elle est filiforme, plus longue que le ver mâle de la même espèce et sa surface est lisse. L'ovaire est plutôt antérieur chez la femelle de *S. haematobium* et 20 à 30 œufs sont visibles dans l'utérus (Gryseels, 2012). Chez la femelle de *S. intercalatum*, l'ovaire est situé dans la moitié postérieure du corps et l'utérus qui se trouve aux tiers du corps renferme 5 à 60 œufs (Bourée, 2008).

#### **✓ Oeufs (Walker, 2011)**

Les œufs de *S. mansoni* sont ovalaires et mesurent 115-170 µm de long sur 40-70 µm de large. Les œufs de *S. mansoni* présentent sur l'une des faces latérales un éperon proéminent. Ils sont pondus un par un dans la sous-muqueuse intestinale, et sont éliminés avec les matières fécales. Chaque femelle pond environ 150 à 300 œufs par jour.

### ✓ **Miracidium**

C'est un embryon cilié et mobile qui présente dans sa région postérieure de nombreuses cellules germinales. Ils constituent une forme larvaire du schistosome et se déplace assez vite en ligne droite (Walker, 2011).

### ✓ **Cercaire**

C'est la forme larvaire infestante du parasite. Elle est formée d'un corps cercarien pourvu de deux ventouses, d'une ébauche du tube digestif, et d'une queue terminée par deux palettes natatoires étroites et pointus. L'ensemble mesure environ 500 micromètres de long. Le tégument porte une série de sensilles dont la structure et la position sont caractéristiques de chaque espèce (Walker, 2011).

## **I-1-4. Manifestations cliniques de la schistosomiase à *Schistosoma mansoni***

Chronologiquement, les manifestations cliniques des bilharzioses peuvent être regroupées en trois phases d'importances inégales: la phase immédiate de réactions cutanées à la pénétration des furcocercaires; la phase d'invasion survenant après une période d'incubation; la phase d'état marquée par les symptômes de la bilharziose concernée et évoluant vers les complications (Aubry & Gaüzère, 2021).

### ❖ **Réactions cutanées d'infestation**

Elle correspond à la pénétration transcutanée des furcocercaires, c'est la dermatite cercarienne généralement modérée, marquée par une légère irritation avec papules éruptives sur le lieu de pénétration. Elle se traduit par un prurit et une réaction urticarienne disparaissant en quelques heures, parfois en 1 à 2 jours (Aubry & Gaüzère, 2021).

### ❖ **Phase d'invasion**

Elle est contemporaine de la migration et des transformations de la schistosomule. Elle correspond aux réactions de l'organisme mis en contact avec les substances antigéniques et toxiques des vers et se traduit par des phénomènes allergiques avec de la fièvre, des sueurs et des céphalées. Il s'y associe des phénomènes urticariens, des arthralgies et myalgies, des œdèmes fugaces, de la toux et de la dyspnée, de la diarrhée. Il peut exister une hépatosplénomégalie légère. La numération formule sanguine montre une hyperleucocytose avec hyperéosinophilie. Cette phase n'est cliniquement marquée que lors des primo-infections; elle est discrète, voire inapparente au cours des réinfestations successives (Aubry & Gaüzère, 2021).

### ❖ **Phase d'état**

Les manifestations intestinales et hépatospléniques sont dominantes dans la bilharziose à *S. mansoni*. La diarrhée est au premier plan; les selles sont fréquentes, molles ou franchement liquide, parfois glaireuses et sanguinolentes, voire dysentérioriformes. Les douleurs localisées au

rectum ou à type de crises coliques s'y associent. Le ténesme est habituel, les épreintes sont rares. Un prolapsus rectal peut s'observer (Aubry & Gaüzère, 2021).

#### ❖ **Complications**

Il s'agit des complications rares cardio-pulmonaires (hypertension artérielle et pulmonaire, insuffisance du ventricule droit), neurologiques (syndrome d'hypertension intracrânienne ou de compression médullaire, des crises convulsives ou une myélite transverse) et cutanées, mais il faut savoir que dans les bilharzioses chroniques des œufs peuvent être trouvés dans pratiquement tous les organes (y compris le placenta) sans que s'exprime chroniquement leur présence (Aubry & Gaüzère, 2021).

#### **I-1-5. Diagnostic**

La confirmation du diagnostic repose sur des examens paracliniques. Il existe des examens non spécifiques qui vont orienter vers une étiologie parasitaire, et des examens spécifiques qui vont identifier le parasite en cause.

##### ➤ **Examens non spécifiques**

Il repose sur des éléments d'orientation épidémiologiques (chez un patient revenant d'une zone d'endémie bilharzienne et l'interrogatoire devra rechercher la notion d'une possible contamination : bain dans un marigot par exemple), cliniques (dans le cas d'une « fièvre des safaris », des selles sanguinolentes) et biologiques (l'hyperéosinophilie peut être évocatrice avec les données cliniques et épidémiologiques).

##### ➤ **Examens spécifiques**

L'examen parasitologique des selles par la méthode de Kato-Katz est utilisé pour l'identification des œufs de *S. mansoni*. Cette méthode a une sensibilité de 60 % et a l'avantage d'être qualitative et quantitative. Le sérodiagnostic, qui utilise des antigènes purifiés est une méthode sensible et spécifique. La technique ELISA restant la méthode de choix avec une sensibilité de 98 % et une spécificité de 95 % (Weerakoon *et al.*, 2015). Les anticorps apparaissent 15 à 30 jours après la contamination, ce qui donne tout son intérêt à la sérologie en phase d'invasion. Al-Sherbiny *et al.* (1999) ont développé une technique destinée à identifier des antigènes circulants grâce à des anticorps monoclonaux préalablement synthétisés. Il s'agit de deux techniques appelées CCA (*Circulating Cationic Antigen*) et CAA (*Circulating Anodic Antigen*). La technique CCA est surtout utilisée pour identifier les antigènes sériques et la technique CAA pour les antigènes urinaires. La CCA a une sensibilité comprise entre 76,9 et 100 % et peut être utilisé dans les zones où l'infestation est moyenne (Tchuem Tchuente *et al.*, 2012b). D'autres

techniques à l'instar de l'échographie et l'endoscopie sont également spécifiques du diagnostic de la schistosomiase.

### **I-1-6. Lutte contre la schistosomiase à *Schistosoma mansoni***

La lutte contre la schistosomiase impose une stratégie globale comprenant la lutte contre les mollusques, l'amélioration de l'élimination des excréments humains, l'éducation sanitaire et le traitement des sujets parasités,

#### **I-1-6-1. Prophylaxie**

Les schistosomiasés sont donc des pathologies transmises lors de séjours en eau douce contaminée. Le traitement primaire consistant à prévenir la contamination débute par la prise en charge du péril fécal. L'installation de latrines et l'éducation des populations exposées sont des mesures simples qui doivent être accompagnées d'une lutte contre les baignades en eaux souillées. Dans le milieu naturel, les méthodes écologiques telles que l'assainissement des points d'eau stagnantes ou à courant qui sont des gîtes à mollusques; la variation régulière du niveau d'eau par assèchement périodique des canaux d'irrigation gêne la multiplication des mollusques et aussi la destruction des végétaux dont se nourrissent ces mollusques est employée. L'utilisation des mollusques compétiteurs, des prédateurs et des molluscicides contre les hôtes intermédiaires est également un autre moyen de lutte (Pointier, 1993). Cependant l'utilisation des molluscicides n'est pas très appréciée, car ils détruisent aussi des espèces non ciblées telles que les poissons et les crustacés, ce qui peut perturber l'équilibre du milieu.

#### **I-1-6-2. Traitements**

Le praziquantel (Biltricide®) reste actuellement le médicament de choix utilisé pour le traitement des schistosomiasés, ceci à cause de son efficacité sur toutes les formes de schistosomes humains et schistosomules de deux jours, il ne présente pas d'effets secondaires majeurs et est facilement accessible pour les populations (Aubry & Gaüzère, 2021). Il est administré en dose unique de 40 à 60 mg par kg de poids corporel en une ou deux prises sur une journée. Dans le cas de deux prises, la seconde prise doit être effectuée 4 à 6 heures après la première. L'oxamniquine (Vansil®) est la seconde molécule utilisée pour le traitement de la bilharziose ; elle est de moins en moins utilisée, du fait qu'elle ne soit efficace que sur les schistosomules de *Schistosoma mansoni* (Aubry & Gaüzère, 2021) d'une part et qu'elle soit plus onéreuse que le praziquantel qui est distribué gratuitement dans les zones de forte endémie parasitaires (Miranda *et al.*, 2020).

Le traitement chirurgical est envisagé en cas de complications hémorragiques de l'hypertension portale, en cas de fibrose péri-portale, d'hépatosplénomégalie ou de rupture des varices œsophagiennes. L'intervention chirurgicale consiste en fonction des cas, à une

splénectomie, à une suture des varices œsophagiennes ou à une ligature au niveau de la veine gastrique gauche (Facundo *et al.*, 2004).

### **I-1-6-3. Phytothérapie dans le traitement de la schistosomiase à *Schistosoma mansoni***

Le traitement de la bilharziose peut également se faire par les plantes médicinales dont certaines ont montré leur efficacité. C'est le cas de *Ozoroa insignis* (Mølgaard *et al.*, 2001), *Clerodendrum umbellatum* et *Sida pilosa* (Jatsa *et al.*, 2016; 2015a; 2015b), *Phyllanthus amarus* (de Oliveira *et al.*, 2017), *Rauwolfia vomitoria* (Tekwu *et al.*, 2017), *Erythrophleum ivorense* (Kyere-Davies *et al.*, 2018), et *Commiphora molmol* (Mahmoud *et al.*, 2018). Par ailleurs, plusieurs molécules issues des extraits de plantes ont montré des activités schistosomicides, c'est le cas du Mirazid extrait de *Commiphora molmol* (Badria *et al.*, 2001), la « piplartine » une amide isolée de *Piper tuberculatum* jacq (Moraes *et al.*, 2011), le « curcumin » extrait de *Curcuma longa* (Kadry, 2012; Magalhães *et al.*, 2009), la berbérine provenant de *Berberis ludaes* (Dkhil, 2014), Hederacolchiside isolé de *Pulsatilla chinensis* (Kang *et al.*, 2018) et Asiaticoside provenant de *Centella erecta* (de Carvalho *et al.*, 2022).

## **I-2. Schistosomiase à *Schistosoma mansoni* et atteintes hépatiques**

### **I-2-1. Généralités sur le foie**

#### **I-2-1-1. Anatomie et histologie**

Situé dans le cadran supérieur droit de l'abdomen sous la coupole diaphragmatique, le foie est un organe plein de teinte brunâtre, à surface lisse et homogène entouré d'une capsule conjonctive: la capsule de Glisson. Cette capsule s'invagine en formant plusieurs sillons délimitant quatre lobes parmi lesquels deux lobes principaux séparés en surface par le ligament falciforme: le lobe droit, le plus volumineux et le lobe gauche, auxquels sont annexés le lobe caudé et le lobe carré; la vésicule biliaire est située dans une petite fossette sur la face intérieure du foie, au niveau du lobe droit (Bourel, 1991). Annexé au tube digestif, le foie est le viscère le plus volumineux et le plus dense de l'organisme. Chez l'homme, il pèse environ 2 kg, dont 800 à 900 g de sang (Krishna, 2013). Le foie présente une double vascularisation afférente (artérielle et portale) et efférente. La vascularisation afférente artérielle apporte l'oxygène et les métabolites aux cellules (circulation nutritionnelle) ; la vascularisation portale draine la totalité du sang veineux du tube digestif (circulation fonctionnelle). La vascularisation efférente est assurée par les veines sus-hépatiques qui drainent du sang hépatique jusqu'à la veine cave inférieure.

Le parenchyme hépatique est constitué de lobules centrés chacun par une veinule terminale sus-hépatique ou veine centro-lobulaire. Chaque angle du lobule est constitué par un espace porte comprenant une branche de l'artère hépatique, la veine porte, les canaux biliaires et les capillaires

lymphatiques. Le lobule est l'unité structurale du parenchyme alors que l'acinus simple correspond à la plus petite unité fonctionnelle du foie. L'acinus est une partie du parenchyme irriguée par le même ensemble de branche de l'artère hépatique et de la veine provenant de deux espaces portes voisins (Krishna, 2013). Entre les angles et le centre du lobule, les travées hépatocytaires (travées de Remak) se disposent de façon radiaire, séparées par les sinusoides qui confluent vers la veine centrale (Difiore & Schmidt, 1981).

### **I-2-1-2. Fonctions hépatiques et biomarqueurs**

Le foie assure diverses fonctions:

- **défense de l'organisme** : cette défense est assurée par les cellules de Kúpffer qui sont les cellules appartenant à une variété de globules blancs de volume important, ayant pour but de débarrasser le sang des débris tels que les bactéries et les globules rouges usés (Bourel, 1991);

- **production de la bile** : sécrétée par les hépatocytes, la bile est nécessaire pour digérer les lipides dans l'intestin (Guyton & Hall, 2006);

- **métabolisme des glucides** : les glucides transformés en molécules de sucre dans l'intestin grêle, deviennent sous l'influence de l'hormone insuline, du glycogène entreposé dans le foie. Lorsque le taux de glucose dans le sang chute, le glycogène qui se trouve dans le foie est transformé en glucose sous l'influence des hormones adrénalines et glucagon (Guyton & Hall, 2006);

- **détoxification du sang** : le foie rend inactif les substances qui sont toxiques pour l'organisme. Les substances actives comme de nombreux médicaments se combinent à l'oxygène, ce qui les rend inoffensives. Il débarrasse le sang de l'ammoniac qui se transforme en urée et est éliminée par les urines (Guyton & Hall, 2006);

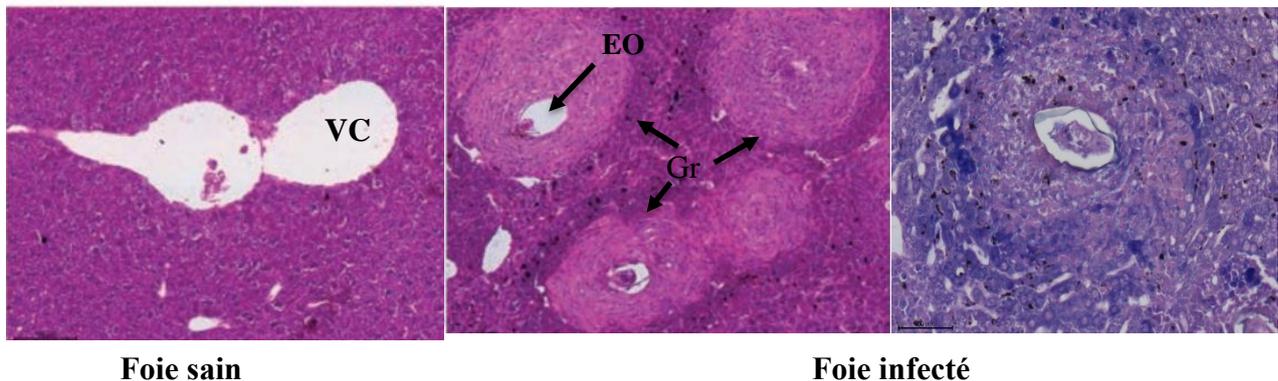
- **métabolisme des lipides** : au niveau du foie, les graisses sont captées dans l'espace de Disse et métabolisées soit vers la production d'énergie (cycle de Krebs), soit vers la synthèse des acides gras, des triglycérides, des phospholipides, du cholestérol et des lipoprotéines (Guyton & Hall, 2006);

- **métabolisme des protéines** : le foie joue un rôle dans la dégradation des peptides et leurs acides aminés d'origine intestinale. Ces peptides perdent leurs acides aminés et sont transformés en urée. Il synthétise de nombreuses protéines de structure et de fonctionnement tels que : l'albumine, le fibrinogène, la globuline, la transferrine et les coagulants (Guyton & Hall, 2006).

### **I-2-2. Réactions inflammatoires hépatiques associées à l'infection à *Schistosoma mansoni* : le granulome bilharzien**

Le pronostic de la bilharziose est lié à l'atteinte hépatique. Cette dernière dépend du parasite en cause : *S. mansoni* a un tropisme hépatique électif et déclenche une atteinte souvent sévère.

Plus que le ver adulte, c'est l'œuf, par son pouvoir antigénique plus important, qui est pathogène. Les œufs embolisés dans les veinules portes intra-hépatiques vont déclencher une réaction inflammatoire. Cette dernière, relayée par des lymphocytes T, provoque un afflux de macrophages, d'éosinophiles et d'histiocytes, qui vont, à terme, former le granulome bilharzien (Figure 2), centré par l'œuf de schistosome. Parmi les lymphokines sécrétées par ces lymphocytes T activés, on a retrouvé chez la souris des substances chimio-attractantes et mitogènes pour les fibroblastes, ainsi que des peptides susceptibles d'accroître la synthèse de fibronectine et de collagène par les fibroblastes (Kamdem *et al.*, 2018). C'est principalement la réponse de l'hôte à ce granulome qui conditionne la gravité de l'atteinte bilharzienne. Ce granulome évolue vers une fibrose concentrique périvasculaire, à l'origine de la fibrose « en tuyau de pipe » décrite par Symmers, (1904). Cette fibrose entraîne une hypertension portale responsable pour l'essentiel de la mortalité de cette affection. Cette hypertension portale a la particularité de créer un bloc pré-sinusoidal avec un gradient de pression hépatique normal (Miranda *et al.*, 2020). Au stade d'hypertension portale, on retrouve une fibrose des cloisons interlobulaires avec phénomène de nécrose ou de stéatose des hépatocytes.



**Figure 2 :** Granulomes bilharziens hépatiques associés à l'infection à *Schistosoma mansoni* (Jatsa *et al.*, 2018a).

EO : Espace occupé par l'œuf ; Gr : Granulome ; VC : Veine centrolobulaire

Pour faire face à ces perturbations l'organisme libère des molécules dites espèces réactives de l'oxygène (EROs) pour limiter les actions du ver. Cependant, la persistance du parasite entraîne la surproduction des EROs capables d'oxyder les molécules biochimiques de l'organisme et entraîner un état de stress oxydant.

### **I-2-3. Schistosomiase à *Schistosoma mansoni* et stress oxydant**

#### **I-2-3-1. Définitions et origine**

Pour définir le stress oxydant, il faut avant tout définir ce que sont les radicaux libres. Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire qui lui confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. Celle-ci est valable selon la nature du radical libre. Parmi ceux formés chez les êtres vivants, l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et le NO sont moins réactifs mais peuvent déclencher des réactions en chaînes qui formeront des radicaux libres beaucoup plus réactifs (Tableau I). Issus respectivement de l'oxydation des lipides (peroxydation) et du clivage du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par la réaction de Fenton ( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$ ) les radicaux peroxy ( $RCOO^{\bullet}$ ) et hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) sont très réactifs. Il existe aussi d'autres dérivés de l'oxygène comme l' $H_2O_2$ , l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) et l'acide peroxyntreux ( $ONOOH$ ), qui, si ils ne sont pas les radicaux libres au sens propre, sont très réactifs et peuvent conduire à l'oxydation de molécules. Les espèces réactives d'oxygène sont des produits essentiels au fonctionnement cellulaire. Ainsi les ERO seraient impliquées dans la prolifération cellulaire, la mort cellulaire programmée (apoptose) et agiraient comme second messenger (Valko et al., 2007a).

Pour un bon équilibre, avoir des ERO en quantité nécessaire pour un bon fonctionnement cellulaire et non pas en excès pour oxyder est maintenu au sein de la cellule par des systèmes d'élimination des espèces réactives d'oxygène. Il existe donc un équilibre entre la production des ERO et leur élimination. Le stress oxydant est classiquement défini comme un déséquilibre en faveur de la production des ERO qui conduit à une oxydation accrue des composants cellulaires essentiels. Ce déséquilibre pro/antioxydant peut avoir une origine exogène : toxine, molécules oxydantes, ou une origine endogène telle que des dysfonctionnements de certaines sources ou de systèmes d'élimination de ERO.

**Tableau I : Principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques**

| Nom                      | Symbole          |
|--------------------------|------------------|
| Espèces radicalaires     |                  |
| Anion superoxyde         | $O_2^{\bullet-}$ |
| Radical hydroxyle        | $OH^{\bullet}$   |
| Monoxyde d'azote         | $NO^{\bullet}$   |
| Espèces non radicalaires |                  |
| Peroxyde d'hydrogène     | $H_2O_2$         |
| Acide hypochlorique      | $HOCl$           |
| Oxygène singulier        | $^1O_2$          |
| Peroxynitrite            | $ONOO^-$         |

### **I-2-3-2. Radicaux libres et espèces réactives d'oxygènes/nitrogènes**

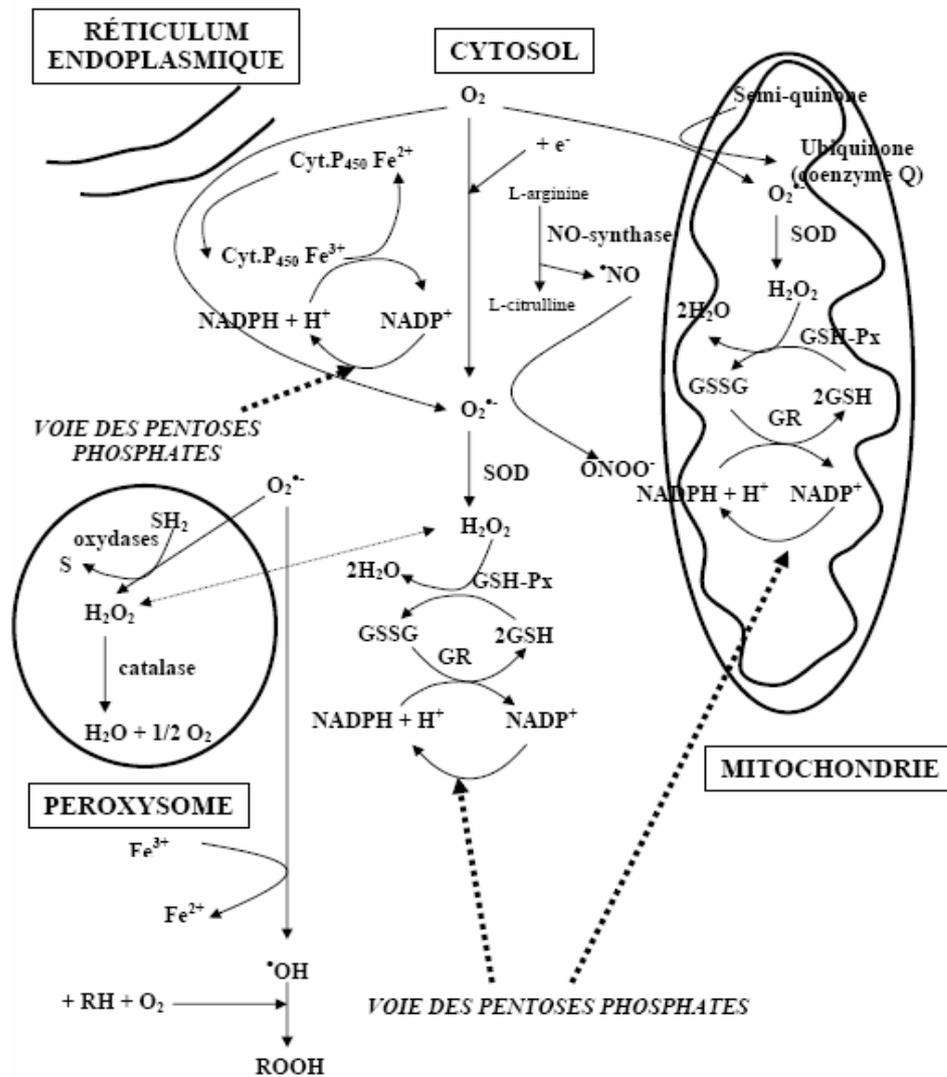
Les ERO se forment de façon parasitaire dans toutes les réactions biochimiques comportant le transfert d'électrons ou la participation de l'oxygène. Divers types cellulaires et tissus donnent naissance aux ERO par des réactions enzymatiques ou par auto-oxydation au cours de leur métabolisme normale et parfois en réponse à un stimulus spécifique. Dans ce contexte, plusieurs exemples peuvent être cités. (Figure 3).

#### **I-2-3-2-1. Anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$**

Espèce la plus couramment générée par la cellule, par réduction d'une molécule de dioxygène. Cette réaction semble surtout être catalysée par des NADPH oxydases membranaires. L'anion superoxyde peut également être formé dans certains organites cellulaires tels que les peroxysomes, via la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, puis en acide urique, catalysée par la xanthine oxydase, et les mitochondries où 2 % à 5 % d'oxygène consommé est transformé en radicaux superoxydes (Favier, 2003).



L'anion superoxyde est relativement stable, peu toxique pour l'organisme. Cette faible réactivité permet d'ailleurs son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques (Favier, 2003). Mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives. Il est régulé par des enzymes, les superoxydes dismutases qui catalysent sa dismutation (Halliwell & Whiteman, 2004).



**Figure 3 :** Principales sources cellulaires des espèces réactives d'oxygène (D'après Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003)..

### I-2-3-2-2. Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est une molécule stable, mais diffusible et avec une durée de vie compatible avec une action à distance de son lieu de production. Il est généré dans le peroxyosome, les microsomes et les mitochondries par une réaction de dismutation (SOD) (Figuroa *et al.*, 2019).

#### Réaction de dismutation



La dismutation de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) spontanée ou catalysée par les superoxydes dismutases est la source majeure de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas un radical libre mais a la capacité de générer des radicaux hautement réactifs. En présence de métaux de transition (fer et cuivre), l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

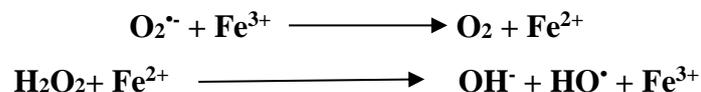
donne naissance via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle ((HO•) hautement réactif. À côté de la SOD, il existe d'autres enzymes produisant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comme les oxydases présentes particulièrement dans les peroxysomes. Cependant, certaines de ces oxydases comme la glycoxylate oxydase, la D-aminoacide oxydase peuvent catalyser directement la réduction divalente de l'oxygène moléculaire produisant ainsi le peroxyde d'hydrogène sans formation du radical superoxyde, le foie est l'organe central de cette production. Les microsomes sont responsables dans 80 % de la concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> générée *in vivo* dans les sites hyperoxiques (Djordjević *et al.*, 2008).

### I-2-3-2-3. Radical hydroxyle (HO•)

Le radical hydroxyle peut être produit par la réduction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon la réaction d'Haber-Weiss qui engendre alors un ion OH<sup>-</sup> inoffensif et un radical hydroxyle HO• (Bargagli *et al.*, 2009).



Cette réaction est lente et probablement inopérante dans les tissus vivants. Mais en revanche, en présence de métaux de transition (fer, cuivre), l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> donne naissance *in vivo* via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle HO• hautement réactif.



Le radical hydroxyle a une demi-vie extrêmement courte et une capacité à diffuser restreinte. Il est capable de réagir très rapidement avec la plupart des molécules biologiques comme l'ADN, les protéines, les sucres et les lipides membranaires. Le radical hydroxyle intervient soit par l'arrachement d'un hydrogène soit par une réaction d'addition. Parmi les ERO le radical hydroxyle est de loin le plus réactif. Le radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a une demi vie plus longue et bien qu'il soit moins réactif il est aussi délétère que le radical HO• (Valko *et al.*, 2007).

### I-2-3-2-4. Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO•) est produit chez les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes N terminaux de la L-arginine. Cette réaction est catalysée par la nitrique oxyde synthase (NOS) selon la réaction suivante :

*Nitrique oxyde synthase*

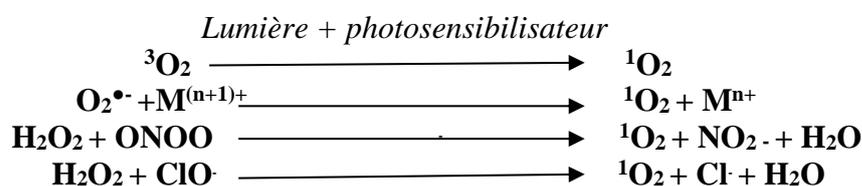


Cette production est physiologique et joue un rôle majeur dans la neurotransmission, régulation de la pression sanguine, mécanisme de défense, relaxation des muscles lisses, régulation

immune (Valko *et al.*, 2007). Mais à forte concentration, le NO devient délétère pour les cellules notamment en réagissant avec le  $O_2^{\bullet-}$  pour former un puissant oxydant le peroxyde d'azote ( $ONOO^{\bullet}$ ) qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le  $NO_2$  et le  $OH^{\bullet}$  (Denisov & Afanas'ev, 2005).

#### I-2-3-2-5. Oxygène singulier

Forme excitée de l'oxygène moléculaire, il est souvent assimilée à un radical libre en raison de sa forte réactivité (Valko *et al.*, 2007). Il peut être produit par plusieurs réactions biochimiques d'oxydation incluant la peroxydase et la lipooxygénase, par la réaction entre divers ERO ou en présence de la lumière, d'oxygène et de photosensibilisateur comme la porphyrine, tel est le cas de la porphyrine érythroprotective-congénitale.



Le radical superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et le radical hydroxyle  $HO^{\bullet}$  sont encore appelés espèce réactive de l'oxygène (ERO) car ces espèces sont beaucoup plus réactives que l'oxygène qui leur a donné naissance. Toutefois, il existe d'autres ERO, notamment les radicaux peroxydes  $ROO^{\bullet}$ , hydroperoxydes  $RO_2H$  ou les radicaux alkoxydes  $RO^{\bullet}$ ; et des espèces réactives d'azote (ERN) tels que le  $NO^{\bullet}$  produit par le NO synthétase, qui est un vasodilatateur physiologique et le peroxyde d'azote  $ONOO^{\bullet}$  issu de la réaction entre  $O_2^{\bullet-}$  et le  $NO^{\bullet}$ , et qui est très néfaste pour les protéines et les gènes (Valko *et al.*, 2007).

#### I-2-3-2-6. Rôle physiologique des radicaux libres

Un paradoxe : les radicaux libres sont-ils indispensables à la vie ? En effet, Ils remplissent de nombreuses fonctions utiles qui, en dehors de la phagocytose, ont été découvertes récemment. Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule et à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes (Favier, 2003). Par exemple, le radical monoxyde d'azote  $NO^{\bullet}$  possède une fonction régulatrice, alors que le radical superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  module la signalisation cellulaire et intervient dans les régulations métaboliques. En plus, lorsqu'il est produit par le réticulum endoplasmique lisse avec

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ils interviennent dans la régulation redox de certaines fonctions essentielles de ce compartiment cellulaire telles que l'adressage et la sécrétion des protéines (Valko *et al.*, 2007).

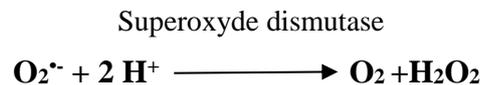
### **I-2-3-3. Système antioxydant**

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des ERO est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les antioxydants cellulaires sont enzymatiques et non-enzymatiques.

#### **I-2-3-3-1. Systèmes antioxydants enzymatiques**

##### **I-2-3-3-1-1. Superoxydes dismutases (SOD)**

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions peroxydes en oxygènes moléculaires et peroxydes d'hydrogène composés stables et moins toxiques (Figuerola *et al.*, 2019) selon la réaction suivante :

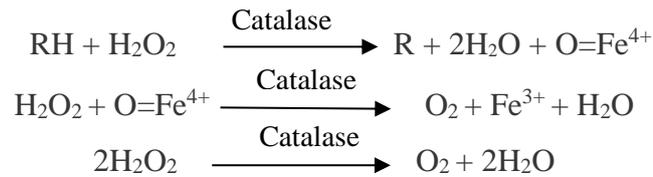


Ces enzymes accélèrent la vitesse de cette réaction spontanée rendant très rapide la disparition du superoxyde mais en générant le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est un composé oxydant mais peut être ultérieurement catabolisé par la catalase et les glutathion peroxydases. Il existe trois isoformes de SOD chez les mammifères : une forme cytosolique et nucléaire et associée aux cuivre et zinc (SOD Cu/Zn), une forme mitochondriale associée au manganèse (SOD Mn) et une forme extracellulaire (SOD-Ex). La forme mitochondriale permet la dismutation quasi instantanée de l'anion superoxyde produit au niveau de l'ETC.

##### **I-2-3-3-1-2. Catalase**

La catalase (CAT) est parmi les antioxydants puissants les plus connus dans la nature (Younas *et al.*, 2018). Cette enzyme est localisée principalement dans les peroxysomes et les mitochondries. Elle se produit en abondance dans le corps, avec la plus grande activité dans le foie, suivie par les érythrocytes, puis les poumons (Younas *et al.*, 2018). La catalase est composée de quatre sous unités protéiques, chacune contenant un groupement hémique avec le Fe<sup>3+</sup> lié au site actif. Chaque molécule comporte habituellement une molécule de NADPH+H<sup>+</sup> qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène.

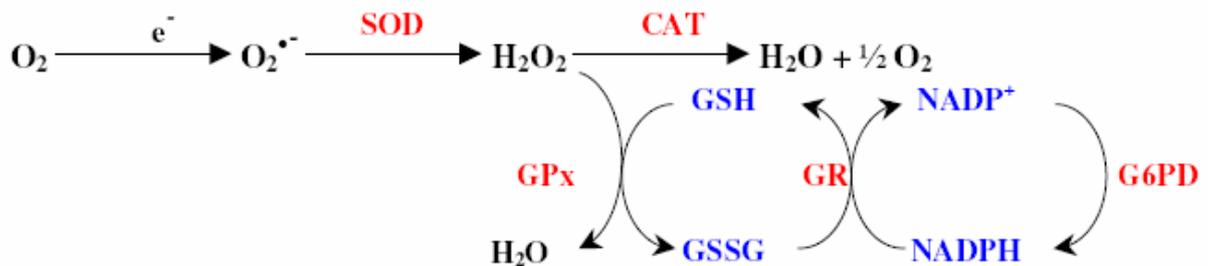
La CAT réagit très efficacement avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pour former de l'eau et de l'oxygène moléculaire, et avec les donneurs d'hydrogène (méthanol, éthanol, acide formique ou phénol):



La catalase et la glutathion peroxydase ont des rôles protecteurs similaires et leur contribution relative est assez variable. La catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydatif est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée et elle joue un rôle significatif en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier.

### I-2-3-3-1-3. Glutathions peroxydase et réductase

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Younas *et al.*, 2018). Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant :



### I-2-3-3-2. Systèmes non enzymatiques

Ce groupe de systèmes anti-oxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) (Favier, 2003). La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulier, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires.

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  ou  $Cu^{2+}/Cu^+$  permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton (Valko *et al.*, 2007).

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables (Lobo *et al.*, 2010). La vitamine piégeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénéré par un autre système. A titre d'exemple, la vitamine E est régénérée par la vitamine C, elle-même régénérée par les ascorbates réductases (Lobo *et al.*, 2010). Des composés comme les alcaloïdes, les polyphénols, les phytates et les flavonoïdes apportés également par l'alimentation, jouent un rôle similaire de piègeurs de radicaux libres (Bruneton & Poupon, 2016).

### **Vitamine C**

L'acide L-ascorbique ou vitamine C est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et peroxydes, et de l'oxygène singulet. Le rôle antioxydant de la vitamine C est basé sur sa réaction avec les radicaux peroxydes aqueux, le produit formé étant le radical ascorbyle. En piégeant les radicaux peroxydes dans la phase aqueuse avant qu'ils initient la peroxydation lipidique, la vitamine C protège les biomembranes et les lipoprotéines (Valko *et al.*, 2007).

### **vitamine E**

Le terme générique de vitamine E désigne en fait une famille constituée des tocophérols et tocotriénols, la forme la plus active étant l' $\alpha$ -tocophérol. Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme. Situé dans les lipoprotéines et dans les membranes, l' $\alpha$ -tocophérol est capable, d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) en s'oxydant en quinone, d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ). Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydes ( $ROO\cdot$ ) pour former un radical tocophéryle. L' $\alpha$ -tocophérol est régénéré essentiellement selon deux voies ; d'une part, la vitamine C, ou l'acide ascorbique est capable de réduire le radical tocophéryle ; d'autre part, une enzyme spécifique glutathion dépendante, la tocophéryl réductase, est capable de réduire le radical tocophéryle en  $\alpha$ -tocophérol. Parallèlement, le glutathion à l'état réduit (GSH) est oxydé en glutathion oxydé (GSSG). Ce métabolisme implique la participation de la vitamine B<sub>2</sub>, cofacteur de la glutathion réductase, nécessaire à la régénération du GSH après son oxydation par le radical tocophéryle (Valko *et al.*, 2007).

## **β-carotène**

Le β-carotène est apporté par l'alimentation. Il est doué de plusieurs capacités: il est précurseur de la vitamine A, il capte l'oxygène singulet sous faible pression d'oxygène et avec les autres caroténoïdes, il a le pouvoir de terminer les réactions en chaîne de lipoperoxydation. Il protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante (Favier, 2003).

## **Sélénium**

Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases sélénodépendantes, et à l'activité biologique antiradicalaire des sélénoprotéines (Orian & Flohé, 2021).

## **Zinc**

Le zinc (Zn) joue un rôle antioxydant indirect en assurant la stabilisation de la Cu-Zn SOD. Cependant, au-delà de cette fonction, le zinc possède d'autres propriétés antioxydantes pour lesquelles le mécanisme précis reste encore incomplètement connu (Gąsecka *et al.*, 2016):

- Le zinc inhibe la production des espèces radicalaires de l'oxygène ERO par les métaux de transitions, en entrant en compétition avec le fer et le cuivre dans la réaction de Fenton.
- Le zinc protège les groupements thiols (SH) des protéines contre l'oxydation induite par le fer, en empêchant la formation de ponts disulfure intramoléculaires.
- L'activité antioxydante du zinc pourrait également passer par l'induction de metallothionéines pouvant piéger les ERO (Valko *et al.*, 2007).

## **Polyphénols**

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes peroxyles. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Gąsecka *et al.*, 2016).

### **I-2-3-3-3. Stress oxydant et ses conséquences biologiques**

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la production d'oxydants accable le système de défenses antioxydantes, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes. L'accumulation des ERO a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et

tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Valko *et al.*, 2007).

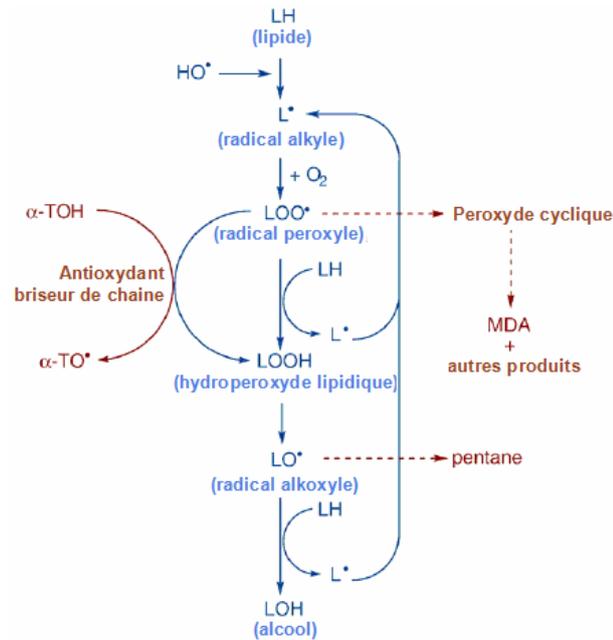
### **I-2-3-3-3-1. Oxydation des lipides**

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée des ERO en raison de leurs hydrogènes bis allyliques facilement oxydables. Comme ces derniers sont les lipides majeurs des membranes cellulaires et des lipoprotéines, on comprend leurs vulnérabilités particulières. Les produits d'oxydation formés peuvent participer en tant que second messager à la régulation de fonctions métaboliques, de l'expression des gènes et de la prolifération cellulaire. Ils peuvent aussi, et surtout, se comporter comme des substances toxiques responsables des dysfonctionnements et d'altérations cellulaires (perte d'acides gras polyinsaturés, diminution de la fluidité membranaire, modification de l'activité des enzymes et des récepteurs membranaires, libération du matériel à partir du compartiment subcellulaire). La peroxydation lipidique se déroule en trois phases suivantes (Figure 4).

**a) Initiation:** l'attaque par un radical  $\text{OH}^\bullet$  du groupement méthylène présent entre deux doubles liaisons d'acide gras polyinsaturés produit un radical carboné  $\text{R}^\bullet$  ( $\text{OH}^\bullet$  enlève un atome d'hydrogène du  $\text{CH}_2$  puis les doubles liaisons subissent un réarrangement moléculaire conduisant à la formation de diènes conjugués). En présence d' $\text{O}_2$  le radical carboné est transformé en radical peroxy  $\text{RO}^\bullet$ .

**b) Propagation:** le radical  $\text{RO}^\bullet$  enlève un hydrogène à un nouvel AGPI voisin qui à son tour produira un radical  $\text{R}^\bullet$  puis un radical  $\text{RO}^\bullet$ ; une réaction en chaîne s'installe. En présence de métaux de transitions, les hydroperoxydes formés peuvent subir un clivage au niveau des liaisons C-C pour donner naissance à divers produits de décompositions; le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal représentant les produits les plus toxiques de la peroxydation lipidique.

**c) Terminaison :** cette phase consiste à former des composés stables issus de la rencontre entre deux espèces radicalaires ou le plus souvent par la réaction d'un radical avec une molécule antioxydante dite 'briseur de chaîne' (Sachdev & Davies, 2008a).



**Figure 4** : Trois étapes de la peroxydation lipidique (D’après Sachdev & Davies, 2008).

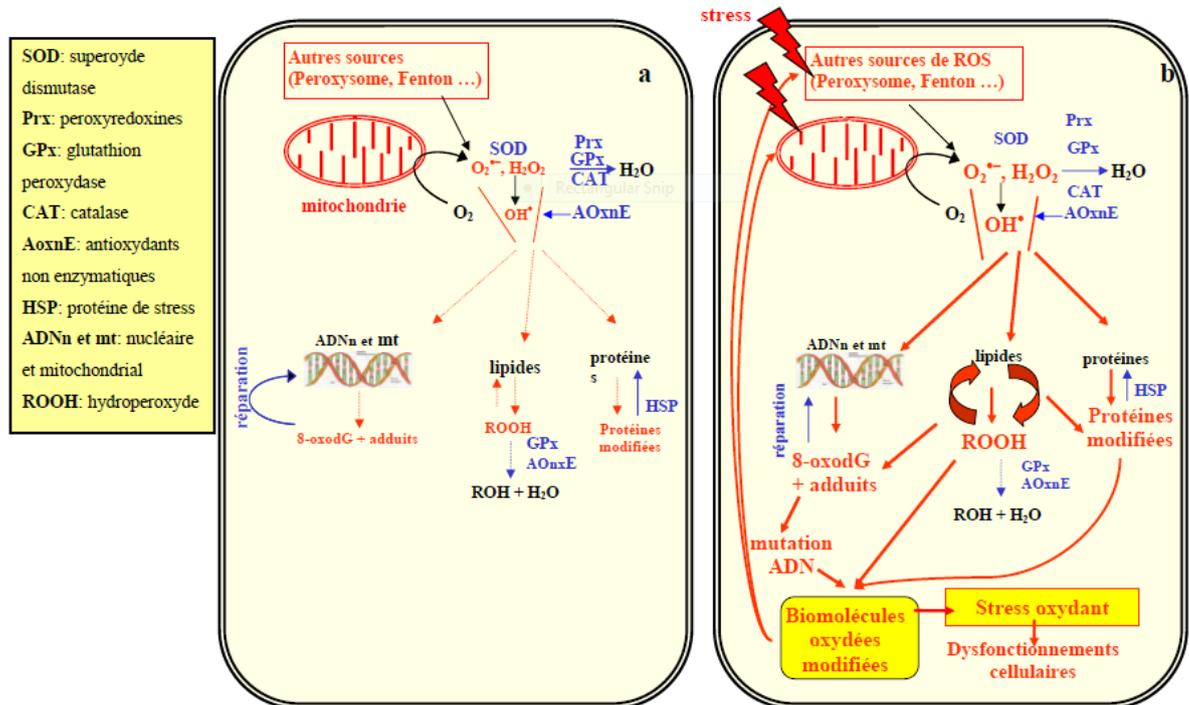
### I-2-3-3-2. Oxydation des protéines

Les modifications oxydatives des protéines par les ERO provoquent l’introduction d’un groupement carbonyle dans la protéine (Hawkins & Davies, 2019). Ces réactions d’oxydation sont fréquemment influencées par les cations métalliques comme le  $Fe^{2+}$  ou le  $Cu^{2+}$ . Les réactions d’oxydation de protéines peuvent être classées en deux catégories : d’une part, celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne peptidique, et d’autre part, les modifications des peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE. De telles modifications conduisent généralement à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées (Hawkins & Davies, 2019) et deviennent généralement plus sensibles à l’action des protéases et sont donc éliminées. L’oxydation de la cystéine est réversible mais peut également perturber les fonctions biologiques du GSH ou de certaines protéines. Le rôle des protéines dans la cellule est tel que leur dysfonctionnement peut bouleverser le fonctionnement cellulaire (enzymes, protéines structurales) (Valko *et al.*, 2007).

### I-2-3-3-3. Oxydation de l’ADN

Les bases puriques, pyrimidiques et le désoxyribose sont la cible privilégiée des ERO ; ils sont alors transformés en produits de fragmentations et en bases oxydées (Liu, 2019). Les ERO ont une grande affinité de réaction avec certaines bases constitutives de l’ADN. La guanine est ainsi facilement transformée en 8-hydroxy-2’-déoxyguanosine (8-OHdG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l’ADN qui peuvent elles aussi être victimes de l’action des radicaux libres. Si ces systèmes de protection sont débordés ou défectueux, les altérations du

matériel génétique s'accumuleront au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Valko *et al.*, 2007) (Figure 5).



**Figure 5 :** Représentation schématique de la balance prooxydant/antioxydant cellulaire, en situation basale (a) et après l'action d'un stress (b).

en bleu, sont représentés les systèmes qui permettent de limiter les dégâts oxydatifs et en rouge, les molécules oxydées et/ ou oxydantes : l'initiation de dégâts oxydatifs peut conduire à un cercle vicieux qui augmente la production des molécules oxydantes.

#### I-2-3-4. Stress oxydant induit par la schistosomiase à *Schistosoma mansoni*

L'implication des radicaux libres a été démontrée dans les pathologies cardiovasculaires et neurodégénératives, le cancer, le vieillissement, les infections virales (SIDA) et parasitaires à l'instar de la bilharziose (Gharib *et al.*, 1999). Dans les maladies parasitaires, il existe une relation physiologique complexe et dynamique entre le parasite et l'hôte définitif (Rizk *et al.*, 2012). Il a été démontré dans le modèle murin que la bilharziose à *S. mansoni* est à l'origine d'un stress oxydant hépatique caractérisé par une surproduction des radicaux libres et une déplétion du potentiel antioxydant (Abdallahi *et al.*, 1999; La Flamme *et al.*, 2001).

En effet, *S. mansoni* entraîne une hépatopathie par induction d'une réaction inflammatoire granulomateuse en réponse aux antigènes sécrétés par le miracidium de l'œuf déposé dans le foie. Les cellules inflammatoires, majoritairement les éosinophiles et d'autres phagocytes se regroupent autour de l'œuf, entraînant une production d'EROs. Ceci est confirmé par des expérimentations *in*

*vitro* dans lesquelles les éosinophiles humains en culture entraînent la mort des schistosomules par dégranulation de la surface larvaire, processus qui dépend de la production et la libération de l'anion superoxyde et d'autres radicaux libres dérivés. Le premier évènement suite à l'infection à *S. mansoni* est la production d'anion superoxyde catalysée par la NADPH oxydase membranaire des phagocytes activés (Abdallahi *et al.*, 1999). L'anion superoxyde subit ensuite une dismutation (réaction catalysée par la superoxyde dismutase) avec formation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui joue un rôle central dans les réactions oxydatives. Il est utilisé par la peroxydase des éosinophiles pour oxyder les halides (I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>) et produire des acides hypohaliques (HOX). Cette réaction conduit à la production d'espèces oxydantes à longue durée de vie, généralement utilisées comme médiateurs des réponses immunes mais qui pourraient entraîner des dommages tissulaires intenses au niveau des foyers inflammatoires (Facundo *et al.*, 2004). De plus, il a été rapporté que dans l'infection à *S. mansoni*, le parasite tente d'interférer le cycle de Krebs en entraînant une baisse de production de lactate par l'hôte, avec pour conséquence directe un surplus d'approvisionnement en oxygène, précurseur de radicaux libres (Rizk *et al.*, 2012).

De nombreuses études ont révélé un état de stress oxydant associé à *S. mansoni* caractérisé par une élévation du taux de malondialdéhyde chez les sujets infestés (Bin Dajem *et al.*, 2011; Dkhil, 2014), démontrant ainsi une augmentation de la peroxydation lipidique due à la surproduction des EROs. En effet, les cellules de Küpffer activées à la suite de la libération d'antigènes par l'œuf de *S. mansoni*, sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles le Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), des enzymes telles la xanthine oxydase (XO) et l'anion superoxyde qui favorisent la genèse des EROs capables de réagir avec les lipides et entrainer leur peroxydation (Ramez *et al.*, 2021). La peroxydation, considérée comme la manifestation la plus importante de l'action délétère des radicaux libres, est à l'origine de la formation des produits tels le malondialdéhyde, le 4-hydroxynonanal et le F<sub>2</sub>-isoprostane qui participent à la perturbation de l'équilibre physicochimique, de la fluidité et de l'intégrité de la membrane des hépatocytes (Bin Dajem *et al.*, 2011). De plus, les éosinophiles associés au granulome bilharzien produisent de grandes quantités d'anions superoxydes et de radicaux hydroxyles qui oxydent les acides gras polyinsaturés avec production de malondialdéhyde et d'hydroperoxydes lipidiques (Facundo *et al.*, 2004). En plus de la peroxydation lipidique, des études ont révélé une relation inverse entre la production de nitrite et la formation de granulomes dans la bilharziose (Souza *et al.*, 2021). En effet, deux semaines après l'implantation des œufs, la réaction inflammatoire déclenchée par les antigènes ovulaires active les phagocytes (macrophages et éosinophiles) qui synthétisent à leur tour les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-12) qui activent les NO synthases

inductibles (iNOS). Par contre, à mesure que la sévérité de la pathologie augmente, l'activité des iNOS décline car les phagocytes producteurs de cytokines pro-inflammatoires sont détruits (Hirata *et al.*, 2001). De plus, la dégradation de l'hème par les vers adultes entraîne un trouble de l'intégrité structural des dimères des iNOS, réduisant ainsi leur activité, concourant à une diminution de la production du NO (Hirata *et al.*, 2001).

De nombreux travaux ont révélé une diminution des taux hépatiques de glutathion réduit (GSH), des activités des enzymes glutathion peroxydase, superoxyde dismutase (SOD) et catalase dans l'infection à *S. mansoni* (Dkhil, 2014). Le glutathion réduit joue un rôle important dans la défense antioxydante dans la mesure où il piège les radicaux libres et favorise leur élimination. La réduction de son taux hépatique est la conséquence d'une hyperproduction d'EROs (Dkhil, 2014). Les EROs sont également responsables de l'inhibition de l'activité de la glutathion peroxydase, ce qui entraîne une accumulation cytotoxique de peroxyde d'hydrogène associée à une baisse du taux de GSH (Rizk *et al.*, 2006). L'ensemble des mécanismes permettant l'augmentation des EROs, aurait pour conséquences une baisse de l'activité de toutes les enzymes antioxydantes. La SOD, considérée comme première barrière antioxydante, par sa nature protéique est dégradée en présence de grandes quantités d'espèces oxygénées activées (Ramez *et al.*, 2021). La catalase quant à elle est inactivée par la surproduction d'anion superoxyde lors des processus inflammatoires déclenchés par *S. mansoni* (Abu Almaaty *et al.*, 2021).

### **I-3. Etude toxicologique**

Le recours à la médecine traditionnelle, et en particulier aux plantes, revient au goût du jour dans le monde. Cet intérêt grandissant fait que les autorités sanitaires accordent de plus en plus d'importance à l'efficacité et à l'innocuité des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle. C'est pourquoi l'OMS a rédigé en 2000 (WHO, 2000) un rapport sur les principes méthodologiques généraux sur la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle, dans lequel une partie est dédiée aux plantes issues de la médecine traditionnelle, intégrant un rappel des lignes directrices sur lesquelles s'appuyer pour l'évaluation de l'efficacité et l'innocuité ou toxicité potentielles de ces plantes (WHO, 1992).

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études qualitatives et quantitatives. Il existe plusieurs types d'études permettant d'évaluer les effets toxiques.

- Les études épidémiologiques qui déterminent les récurrences d'apparition des effets toxiques observés à la suite de la prise des substances thérapeutiques au sein des populations.
- Les études expérimentales *in vivo*, qui utilisent les animaux.

- Les études expérimentales *in vitro*, biochimiques ou cellulaires
- Et les études théoriques par modélisation.

La toxicité des plantes peut être directe ou indirecte via la genèse d'interaction avec les médicaments allopathiques ou de phytothérapie (composé de plante-métabolisme, d'autres médicaments/xénobiotiques).

### **I-3-1. Toxicité *in vivo***

#### **I-3-1-1. Toxicité directe**

Concernant les différentes formes de toxicité, la terminologie fréquemment utilisée selon la fréquence et la durée de l'exposition à une substance est la suivante :

**La toxicité aiguë**, qui permet de connaître la plus petite dose qui, administrée en une seule prise entraîne la mort de 50 % des animaux dans les 24 à 48 heures après le traitement. La durée maximale d'observation étant de 15 jours. Elle permet de déterminer la dose létale 50 (DL<sub>50</sub>). La DL<sub>50</sub> et des méthodes alternatives pour l'évaluation de la toxicité aiguë ont été considérablement discutées dans différents forums internationaux au cours des années 80 et 90. Le résultat de ces discussions intensives est la mise sur pied de protocoles d'étude de la toxicité aiguë impliquant un nombre minimal d'animaux et conduisant à une estimation de la DL<sub>50</sub> et non à son évaluation absolue. Tel est le cas des lignes directrices 420, 423 et 425 de l'OCDE pour l'étude de la toxicité orale aiguë par les méthodes respectives de la dose prédéterminée (OECD, 2002a), de classe de toxicité aiguë (OECD, 2002b) et de l'ajustement des doses (OECD, 2008b).

**La toxicité subaiguë ou subchronique**, qui permet de déceler les troubles de croissance, d'alimentation, les troubles biochimiques et histologiques secondaires et administration continue d'une substance. On définit ainsi la toxicité provoquée chez des animaux expérimentaux par une exposition répétée à l'agent toxique durant une période de 28 jours comme la toxicité subaiguë, et lorsque la période peut atteindre environ un dixième de la durée de vie moyenne de l'espèce en question (soit 90 jours chez le rat et la souris), on parle de toxicité subchronique. La ligne directrice 407 pour l'étude de la toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs (OECD, 2008a) est utilisée pour l'étude de la toxicité subaiguë des produits.

**La toxicité chronique**, qui permet d'avoir des renseignements sur le degré de toxicité des médicaments qui habituellement sont utilisés et répétés par des patients. Dans cette étude, la substance d'essai est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, en général pendant une période de 12 mois, bien que des durées plus longues ou plus courtes puissent aussi être choisies, en fonction des exigences réglementaires. Cette durée est assez longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester, tout en évitant les effets perturbateurs des changements liés au vieillissement. Il convient d'utiliser

au moins trois doses et un groupe témoin. En dehors des contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance ; tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés.

### **I-3-1-2. Toxicité indirecte et interactions médicamenteuses**

Les interactions médicamenteuses peuvent résulter soit d'une inhibition, soit d'une induction, soit d'une compétition entre deux substrats d'une isoenzyme particulièrement impliquée dans le métabolisme. Il en est de même pour certaines plantes médicinales. Cette interaction a pour conséquence une diminution des concentrations thérapeutiques et donc de l'effet thérapeutique de ces médicaments (Komoroski *et al.*, 2004). Les conséquences cliniques de l'inhibition du métabolisme des médicaments sont une augmentation de la concentration du produit actif et une augmentation de la durée de l'effet thérapeutique avec un risque de la toxicité si la formation de métabolites inactifs est ralentie par l'inhibition enzymatique.

### **I-3-2. Evaluation de la cytotoxicité de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique et des fractions de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima***

Le test de cytotoxicité permet la recherche d'un effet toxique sur un type cellulaire par une méthode évaluant un paramètre donné (croissance cellulaire, intégrité cellulaire, activité fonctionnelle cellulaire...). Son but est de déterminer la concentration inhibitrice 50 (CI<sub>50</sub>) qui est la concentration qui inhibe de moitié la prolifération cellulaire globale. Plusieurs méthodes d'étude de la cytotoxicité existent à ce jour; entre autres les méthodes fondées sur des perturbations de la perméabilité membranaire et les méthodes fondées sur des altérations de la prolifération cellulaire.

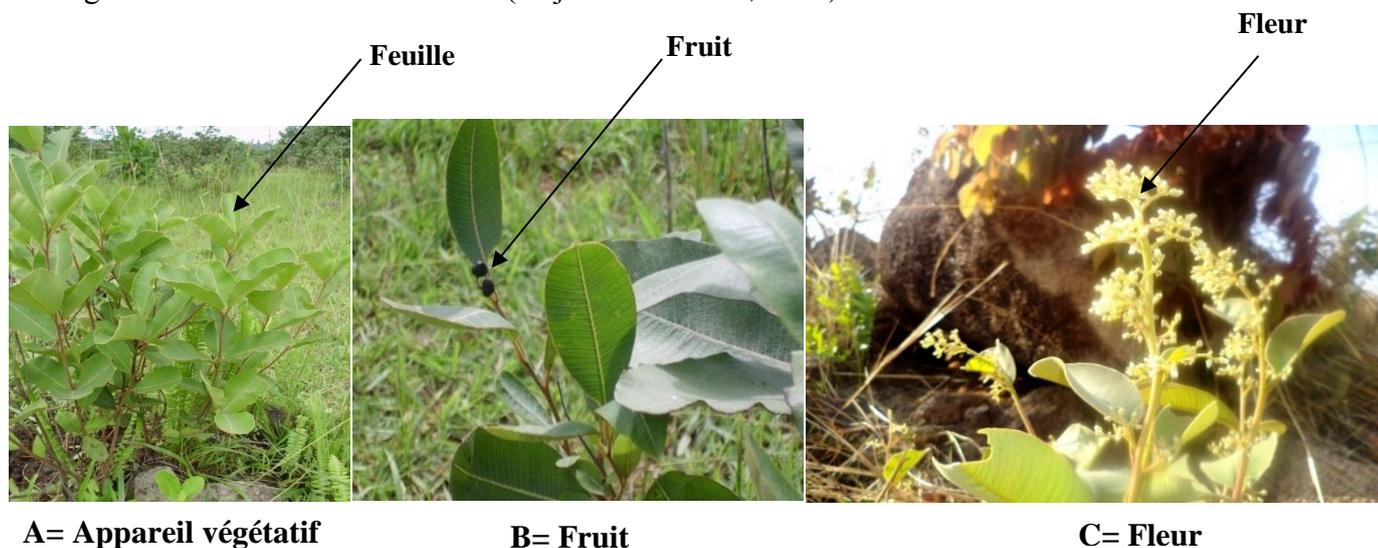
## **I-4. Généralités sur *Ozoroa pulcherrima***

### **I-4-1. Systématique de *Ozoroa pulcherrima***

|                |   |
|----------------|---|
| Règne:         | Plantae (Haeckel, 1866)   |
| Embranchement: | Tracheophyta (Sinnott, 1935 ex Cavalier-Smith, 1998)              |
| Classe:        | Magnoliopsida (Brongniart, 1843 – Dicotyledons)                   |
| Ordre:         | Sapindales (Dumortier, 1829)                                      |
| Famille:       | Anacardiaceae (R. Br., in Tuckey, 1818, nom. Cons)                |
| Genre:         | <i>Ozoroa</i> (Delile, 1843)                                      |
| Espèce:        | <i>Ozoroa pulcherrima</i> (Schweinf.) O. Kuntze R.Fern. & A.Fern. |

#### I-4-2. Description et biogéographie de *Ozoroa pulcherrima*

Encore appelé *Heeria pulcherrima*, Korewinabae en fufuldé, toubouboula en toupouri, libérébem en baya, *Ozoroa pulcherrima* (Schweinf.) est un arbuste atteignant 1 m de haut. Les feuilles sont verticillées par trois. Le limbe, obovale, presque elliptique de 9 à 15 cm de longueur, et 5 à 9 cm de largeur, a un sommet largement arrondi avec une très courte pointe large au centre (Figure 6.A). Chaque feuille est parcourue par 30 à 35 nervures. Le fruit est une drupe noire à maturité, de 9 à 10 mm de longueur et de 7 à 8 mm de hauteur (Figure 6.B). L'inflorescence est en panicule terminale ou axillaire de 5 à 12 cm de longueur. Fleur blanche crème à 5 sépales triangulaires, 5 pétales (Figure 6.C). C'est une espèce répandue du Sénégal au Cameroun dans les régions de l'Adamaoua et de l'Est (Adjanooun *et al.*, 1989).



**Figure 6 :** Photos de *Ozoroa pulcherrima* (photo prise à Ngaoundéré en 2012 par Feussom).

#### I-4-3. Ethnopharmacologie de *Ozoroa pulcherrima*

La plupart des anacardiées et celles du genre *Ozoroa* sont reconnues comme plantes médicinales. C'est le cas de *Ozoroa pulcherrima* dont l'utilisation empirique est multiple :

- ✓ la décoction de la tige feuillée de *O. pulcherrima* est utilisée par voie orale dans le traitement des dystocies et des hyperthermies et en collyre dans le traitement des conjonctivites purulentes (Adjanooun *et al.*, 1989);
- ✓ la décoction des racines de *O. pulcherrima* est utilisée par voie orale dans le traitement des dysménorrhées et des helminthiases intestinales (Adjanooun *et al.*, 1996) ;
- ✓ la décoction des racines de *O. pulcherrima* est également utilisée par voie orale dans le traitement des douleurs abdominales ;
- ✓ le macérat des feuilles de *O. pulcherrima* est utilisé par voie orale pour stimuler la lactation chez les femmes allaitantes.

Par ailleurs, L'effet anti-prolifératif des huiles essentielles issues des feuilles et écorce de *Ozoroa pulcherrima* a été prouvé (Bogninou-Agbidinoukoun *et al.*, 2016). En plus, les propriétés analgésiques et anti-inflammatoires de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* ont été démontrées (Jatsa *et al.*, 2018b).

#### **I-4-4. Etude phytochimique de *Ozoroa pulcherrima***

La phytochimie qualitative de l'extrait aqueux des racines de *O. pulcherrima* a révélé la présence de plusieurs familles de composés bioactifs notamment les saponines, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les phénols, les glycosides et les lipides. L'étude phytochimique de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* a révélé la présence de trois acides anacardiques : ozocardic A, ozorcardic A et B (Tsague *et al.*, 2011a, 2011b) tout récemment une nouvelle céramide, ozoromide a été isolée des tiges de *Ozoroa pulcherrima* (Tsague *et al.*, 2017).

# **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

## **II-1. Matériel**

### **II-1-1. Matériel végétal**

Le matériel végétal était constitué de poudre des racines de *Ozoroa pulcherrima*. Les racines de *Ozoroa pulcherrima* ont été récoltées dans la station fourragère de Wakwa, localité située à environ 10 km de Ngaoundéré dans la région de l'Adamaoua au Cameroun. La plante a été authentifiée à l'Herbier National du Cameroun par comparaison à l'échantillon N° 13667/SRF/CAM.

### **II-1-2. Matériel animal**

Le cycle de développement de *Schistosoma mansoni* a été réalisé au laboratoire du Centre Schistosomiasis et Parasitologie de Yaoundé (CSP). La réalisation du cycle de schistosome au laboratoire a nécessité les mollusques hôtes intermédiaires *Biomphalaria pfeifferi* récoltés dans la rivière "Afémé" (Nkolbisson) (Yaoundé-Cameroun) et les souris blanches de souche BALB/c de sexe mâle et femelle âgées d'environ 2 mois et pesant entre 20 et 30 g qui ont chacune été infestées aux furcocercaires pour les tests *in vitro* et *in vivo*. Par ailleurs, le profil toxicologique a été marqué par la toxicité *in vitro* des extraits et fractions de *Ozoroa pulcherrima* et le toxicité *in vivo* de l'extrait méthanolique où les cellules épithéliales du foie (Hepa 1-6, ATCC CRL- 1830) et les souris de sexe mâle et femelle âgées de 8 semaines et pesant entre 20 et 30 g ont respectivement été utilisées

## **II-2. Méthodes**

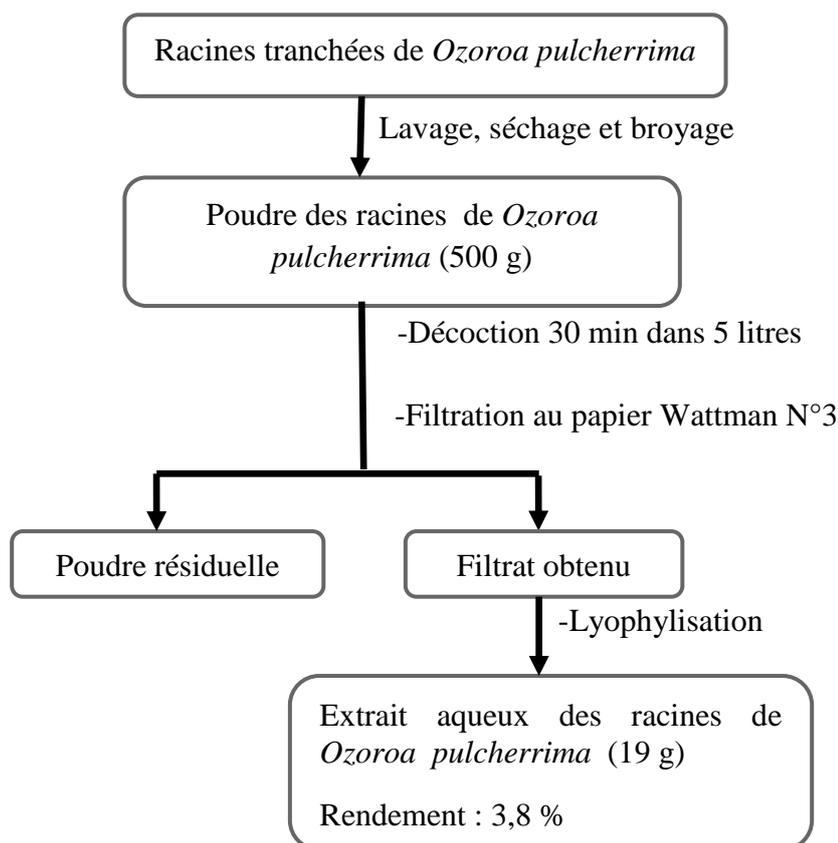
### **II-2-1. Récolte et préparation de l'extrait méthanolique et ses différentes fractions**

#### **II-2-1-1. Récolte de la plante**

Les racines de *Ozoroa pulcherrima* ont été récoltées dans la station fourragère de Wakwa, localité située à environ 10 km de Ngaoundéré dans la région de l'Adamaoua au Cameroun. La plante a été authentifiée à l'Herbier National du Cameroun par comparaison à l'échantillon N° 13667/SRF/CAM.

#### **II-2-1-2. Préparation de l'extrait aqueux des racines de *Ozoroa pulcherrima***

Les racines fraîches de la plante ont été soigneusement lavées, découpées, séchées à l'air libre, à l'abri du soleil et de la poussière puis broyées à l'aide d'une moulinette de façon à obtenir une poudre. L'extrait aqueux des racines de *Ozoroa pulcherrima* a été décocté à partir de 500 grammes de poudre des racines de *Ozoroa pulcherrima* portés à ébullition pendant 30 min dans 5 Litres d'eau distillée. Le mélange a ensuite été filtré à l'aide du papier filtre Whattman N°3 et le filtrat obtenu a été lyophilisé. (Figure 7).



**Figure 7** : Protocole de préparation de l'extrait aqueux des racines de *Ozoroa pulcherrima*.

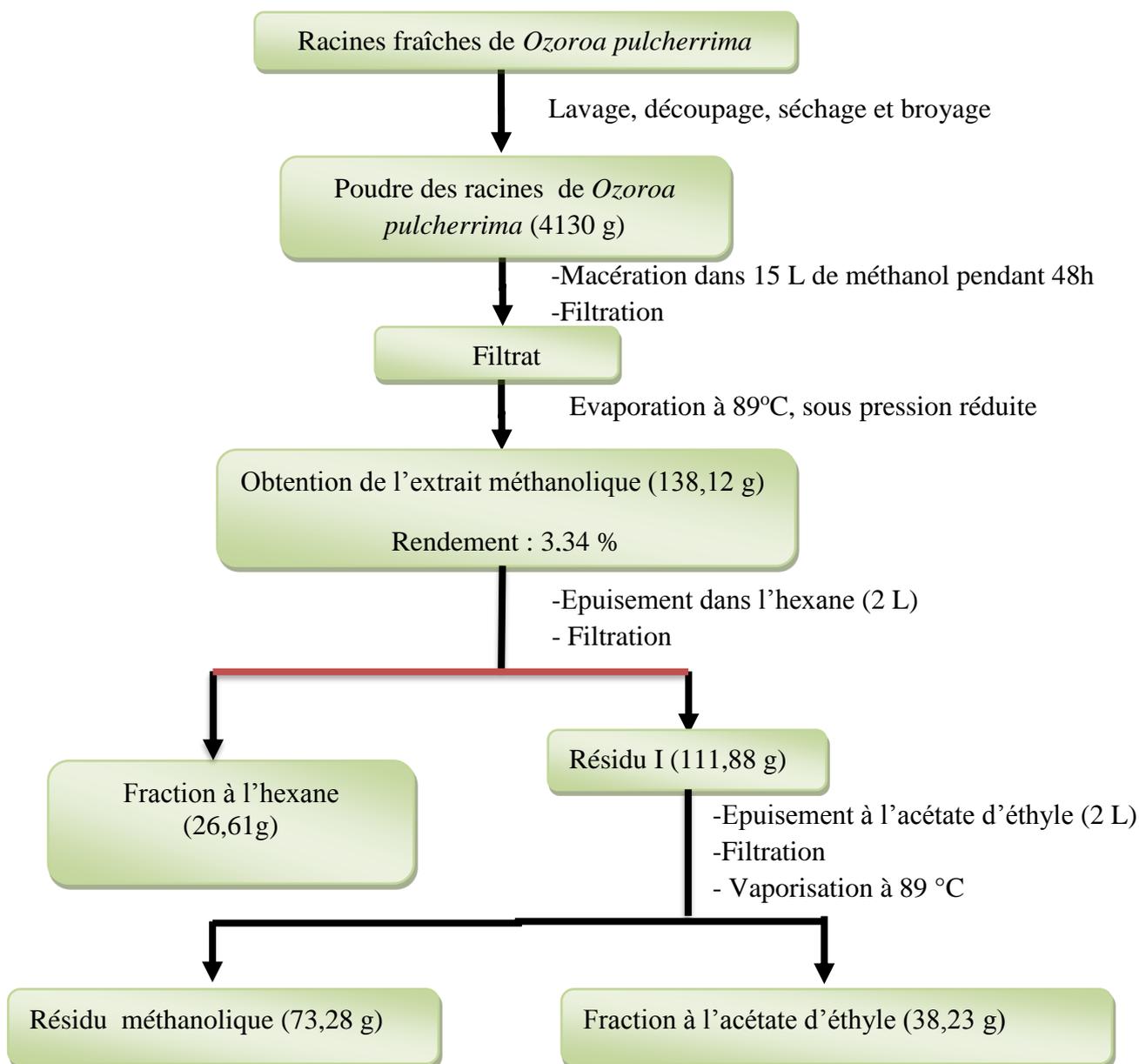
### II-2-1-3. Préparation de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* et ses différentes fractions

Les racines fraîches de la plante ont été soigneusement lavées, découpées, séchées à l'air libre à l'abri du soleil et de la poussière puis pulvérisées à l'aide d'une moulinette de façon à obtenir une poudre. L'extrait méthanolique des racines de *O. pulcherrima* a été préparé à partir de 4130 grammes de poudre des racines de *O. pulcherrima* macérés dans 15 litres de méthanol (MeOH) à température ambiante pendant 48 heures. Le mélange a ensuite été filtré à l'aide du papier filtre whattman N°3 et le filtrat obtenu a été transféré à l'évaporateur rotatif sur un bain-marie de 89°C et de marque *BÜCHI WATER BATH B-480* pour évaporation du solvant. L'extrait concentré a ensuite été séché à l'étuve ventilée à 40°C. Ce procédé a permis d'obtenir 138,12 g d'extrait soit un rendement de 3,34 % (Figure 8). L'extrait méthanolique a ensuite subi une solubilisation différentielle dans des solvants de polarité croissante afin d'obtenir ses différentes fractions.

- ❖ L'extrait méthanolique obtenu a été épuisé dans de l'hexane, et le mélange ainsi obtenu a été filtré à l'aide du papier Whattman n°3. Le filtrat obtenu a ensuite été concentré à 89°C

à l'évaporateur rotatif pour évaporation de l'hexane, puis séché à l'étuve ventilée à 40°C. Ce procédé a permis d'obtenir 26,61 g de la fraction à l'hexane (Figure 8).

- ❖ le résidu de l'extrait méthanolique obtenu après épuisement à l'hexane a ensuite été épuisé dans l'acétate d'éthyle. Le mélange obtenu a été filtré à l'aide du papier whattman n°3 et le filtrat ainsi obtenu a été concentré à 89°C à l'évaporateur rotatif, puis séché à l'étuve ventilée à 40°C. Ce procédé a permis d'obtenir 38,23 g de la fraction à l'acétate d'éthyle (Figure 8).



**Figure 8 :** Protocole de préparation de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* et ses différentes fractions.

## II-2-2. Analyse phytochimique de l'extrait aqueux, méthanolique et des fractions des racines de *ozoroa pulcherrima*

### II-2-2-1. Screening phytochimique qualitatif

Les protocoles décrits par Ayoola *et al.* (2008) ont permis de mettre en évidence la présence ou l'absence de quelques groupes de composés d'intérêt.

➤ **Test des alcaloïdes:** l'extrait (0,1 g) a été dissout dans 2 mL d'acide chlorhydrique. Le mélange a été porté à ébullition puis filtré. A 1mL de filtrat ont été ajoutés 0,4 mL d'ammoniac dilué et 1 mL de chloroforme. La solution a été agitée doucement afin d'extraire la base alcaloïdale. La couche de chloroforme a été extraite et mélangée à 2 mL d'acide acétique. Ce mélange a été divisé en deux portions; le réactif de Mayer a été ajouté à l'une et le réactif de Dragendorff à l'autre. La formation d'une crème (avec le réactif de Mayer) et d'un précipité marron rougeâtre (avec réactif de Dragendorff) a été considérée comme réaction positive de la présence des alcaloïdes dans l'extrait.

➤ **Test des anthraquinones:** l'extrait (0,1 g) a été dissous dans 2 mL d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Le mélange a été porté à ébullition puis filtré à chaud et le filtrat a été agité après ajout de 1 mL de chloroforme. La couche de chloroforme a été pipeté dans un autre tube puis 0,2 mL d'ammoniac dilué a été ajouté. Les anthraquinones ont été mis en évidence par l'apparition d'une coloration rouge.

➤ **Test des flavonoïdes:** à 1 mL de solution d'extrait (0,1g extrait dilué dans 1mL de DMSO 1%) ont été ajoutés 5 mL d'ammoniac dilué. Après filtration, 1 mL d'acide sulfurique concentré a été ajouté. Une coloration jaune qui disparaissait progressivement a indiqué la présence des flavonoïdes.

➤ **Test des glycosides cardiaques (test de Keller-Killiani):** à 1 mL de solution d'extrait (0,1g d'extrait dilué dans 1 mL de DMSO 1%), ont été ajoutés 0,4 mL d'acide acétique glacial, une goutte de chlorure ferrique et 0,2 mL d'acide sulfurique qui a formé une sous-couche. La formation d'une bague de couleur marron dans l'interface a été caractéristique de la présence de cardénolides.

➤ **Test des phénols:** à 0,2 mL de solution d'extrait (0,1g extrait dissous dans 1mL de DMSO 1%), ont été ajoutées 3 gouttes de chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>). La présence des phénols s'est manifestée par l'apparition d'une coloration vert bleuâtre.

➤ **Test des saponines:** dans un tube test, 0,1g d'extrait a été dissous dans 1 mL de DMSO 1% puis la solution a été vigoureusement agitée. La formation d'une mousse persistante au-delà de 5 minutes a été le signe de la présence des saponines dans l'extrait.

➤ **Test des sucres réducteurs (test à la Liqueur de Fehling):** à 1 mL de solution d'extrait (0,1g d'extrait dissous dans 1 mL de DMSO 1%), ont été ajoutées quelques gouttes de liqueur de Fehling A et B puis le mélange a été porté à ébullition. L'apparition d'un précipité rouge brique a été indicatrice de la présence des sucres.

➤ **Test des tanins:** dans un tube test, 0,1 g d'extrait ont été dissous dans 2 mL de DMSO 1%. Après filtration, quelques gouttes de chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>) ont été ajoutées. L'observation d'une coloration vert-marron ou bleue-noir a été indicatrice de la présence des tanins.

**Test des terpénoides (test de Salkowski):** l'extrait (0,1 g) a été dissous dans 0,4 mL de chloroforme. Ensuite, 0,6 mL d'acide acétique concentré ont été minutieusement ajouté de façon à obtenir une couche superficielle. La coloration marron rougeâtre de cette couche a témoigné de la présence de terpénoides.

➤ **Test des triterpènes et des stéroïdes:** à 0,4 mL de solution d'extrait (0,1 g d'extrait dissout dans 2 mL de DMSO 1%), ont été ajoutées successivement 0,6 mL d'acide sulfurique concentré, 0,6 mL d'anhydride acétique et 0,6 mL de chloroforme. La formation de deux phases dont une rouge-violacée et l'autre verte ou bleuâtre a indiqué respectivement la présence des triterpènes et des stéroïdes.

## **II-2-2-2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse**

Une solution de l'extrait méthanolique et fractions de *Ozoroa pulcherrima* a été préparée par dissolution de 1 mg d'extrait ou fraction dans 1 mL d'eau milli-Q.

Le spectromètre de masse «LC Agilent 1200 Analyseur quadrupole-time-of-flight (Q-ToF) (Agilent Accurate Mass QToF 6520)» (GenTech Scientific, USA) a été utilisé pour l'analyse de l'extrait. Le nitrogène a été utilisé comme gaz de nébulisation. La pression de nébulisation était fixée à 30 psi, la température de nébulisation à 340°C et le potentiel du capillaire à 4000 V. la séparation a été effectuée à la température ambiante sur une colonne Colonne Zorbax SB-C18 50 mm x 2,1 mm i.d.-taille de particules = 1,8 µm. Température = 40°C. (Agilent Technologies, USA). La phase mobile constituée d'acétonitrile (ACN+ 0,05 % d'acide formique) (A) et d'eau (H<sub>2</sub>O + 0,05 % d'acide formique) (B) a été utilisée pour élution selon le gradient d'ACN ci-après : 98 % pendant 0,1 min, 0 % pendant 8 min, puis 0 % pendant 12,5 minutes puis 98 % pendant 25 min. Le débit d'élution était de 0,5 mL/min et la détection UV a été faite à 210 nm. Les réactifs utilisés étaient des réactifs pour HPLC et l'eau utilisée (milli-Q) est de l'eau distillée purifiée au moyen d'un système de purification de l'eau (BIOSAN MILLIPORE SAS, Molsheim, France).

Un débit de 90 µL/min a été utilisé pour les analyses MS et les spectres de masse des ions produits ont été enregistrés dans l'intervalle 50 – 2000 m/z. Les données spectrales ont été

interprétées et leur analyse faite par comparaison à la littérature relative à la composition chimique des espèces du genre *Ozoroa pulcherrima*.

Cette étude a été réalisée au laboratoire de chimie organique de l'Ecole normale Supérieure de l'Université de Yaoundé I et au laboratoire d'innovation thérapeutique, UMR 7200 CNRS/ Université de Strasbourg, Labex Medalis, Faculté de Pharmacie, 74 Route du Rhin, 67412, Illkirch, France.

### II-2-2-3. Détermination de la teneur en quelques composés bioactifs dans l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* et de ses fractions

#### II-2-2-3-1. Dosage des polyphénols totaux

L'estimation de la teneur en composés phénoliques extractibles totaux a été réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Mansouri *et al.* (2005).

##### ❖ Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acidephosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760 nm.

##### ❖ Mode opératoire

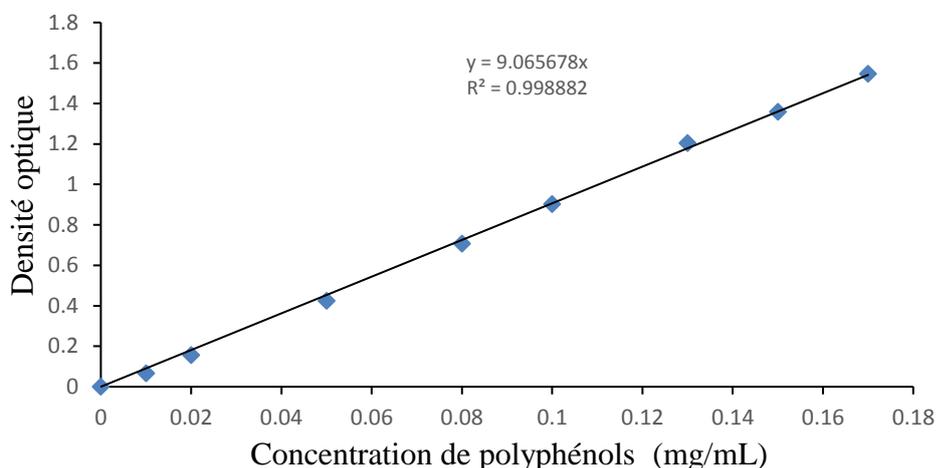
Une gamme de 9 concentrations d'acide gallique (polyphénol témoin) allant de 0 à 0,17 mg/mL a été préparée à partir d'une solution mère à 0,2 mg/mL de concentration (1 mg d'acide gallique dissout dans 5 mL d'eau distillée) suivant le protocole décrit dans le tableau II.

**Tableau II :** Préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique

| N° tube                                | 1 | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    |
|--|---|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Solution mère d'acide gallique (mL)    | 0 | 0,05 | 0,1  | 0,25 | 0,4  | 0,5  | 0,65 | 0,75 | 0,85 |
| Eau distillée (mL)                     | 1 | 0,95 | 0,90 | 0,75 | 0,6  | 0,5  | 0,35 | 0,25 | 0,15 |
| Concentration d'acide gallique (mg/mL) | 0 | 0,01 | 0,02 | 0,05 | 0,08 | 0,10 | 0,13 | 0,15 | 0,17 |

Un volume de 300  $\mu$ L de la solution d'acide gallique (à différentes concentrations) a été prélevé et introduit dans une série de tubes pour la réalisation de la courbe d'étalonnage et 300  $\mu$ L des solutions de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et ses fractions (10 mg de la fraction dissous dans 1mL de méthanol pur) à analyser introduits dans un tube. Le tube blanc contenait 300  $\mu$ L de méthanol. A tous ces tubes ont été ajoutés 1500  $\mu$ L de réactif Folin-Ciocalteu (90 mL d'eau

distillée ajoutés à 10 mL du réactif Folin-ciocalteu); puis 1200  $\mu$ L de la solution de bicarbonate de sodium à 7,5 % (7,5 g de bicarbonate de sodium dissous dans un volume d'eau distillée complété à 100 mL). Le mélange a ensuite été homogénéisé à l'aide d'un agitateur, puis incubé à l'obscurité pendant 1 heure. Les absorbances ont été lues contre le blanc à 760 nm au spectrophotomètre de marque *HACH DR 3900*. La concentration en composés phénoliques extractibles totaux a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 9).



**Figure 9 :** Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.

#### II-2-2-3-2. Dosage des flavonoïdes

La méthode décrite par (Makkar *et al.*(1997) a été utilisée pour l'estimation du taux de flavonoïdes.

##### ❖ Principe

La formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes donne une coloration jaunâtre dont l'intensité est proportionnelle au taux de flavonoïdes présents dans le milieu à 415 nm.

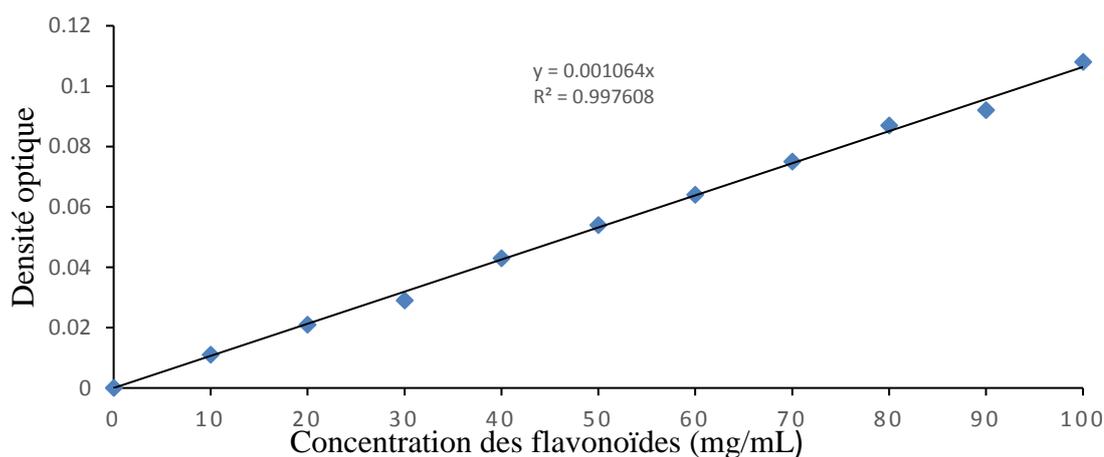
##### ❖ Mode opératoire

Une gamme de 11 concentrations de rutine (flavonoïde témoin) allant de 0 à 100 mg/mL a été préparée à partir d'une solution mère de 100 mg/mL de concentration (400 mg de rutine dissous dans 4 mL d'éthanol 95 %) suivant le protocole décrit dans le tableau III.

**Tableau III :** Préparation de la gamme d'étalonnage de la rutine

| N° tube                         | 1 | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  |
|---------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Solution mère de rutine(mL)     | 0 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,8 | 0,9 | 1   |
| Ethanol 95 % (mL)               | 1 | 0,9 | 0,8 | 0,7 | 0,6 | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0   |
| Concentration de rutine (mg/mL) | 0 | 10  | 20  | 30  | 40  | 50  | 60  | 0   | 30  | 90  | 100 |

Un volume de 500  $\mu$ L de la solution de rutine à différentes concentrations a été prélevé, puis introduit dans une série de 11 tubes pour la réalisation de la courbe d'étalonnage et 500  $\mu$ L de la solution de l'extrait méthanolique, de la fraction à l'hexane et de la fraction à l'acétate d'éthyle de *O. pulcherrima* (10 mg de l'extrait et de la fraction à l'acétate dissous dans 1 mL de méthanol pur) à analyser ont été introduits dans deux tubes (un tube test et un autre qui servira de blanc). A tous ces tubes ont été ajoutés successivement 1,5 mL d'éthanol à 95 %; 0,1 mL d'une solution de chlorure d'aluminium à 10 % (1 g de  $\text{AlCl}_3$  dissout dans 10 mL d'eau distillée); 0,1 mL d'une solution d'acétate de sodium 1 mol/L (0,41 g d'acétate de sodium ( $M= 82,03$  g/mol) dissout dans 5 mL d'eau distillée) et 2,8 mL d'eau distillée. Dans le tube blanc, la solution de chlorure d'aluminium à 10 % a été remplacée par un même volume d'eau distillée. Les tubes ont été homogénéisés à l'aide d'un agitateur puis incubés pendant 30 minutes à température ambiante et les absorbances ont été lues contre le blanc à 415 nm au spectrophotomètre de marque *HACH DR 3900*. La concentration en flavonoïdes totaux a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de la rutine (Figure 10).



**Figure 10 :** Courbe d'étalonnage des flavonoïdes totaux.

### II-2-2-3-3. Dosage des protéines extractibles totales

➤ **Extraction des protéines:** l'extraction des protéines a été faite suivant le protocole décrit par Barbarino & Lourenço (2005). Pour ce faire, une masse de 50 mg de la fraction a été dissoute dans 4 mL de DMSO 3 %. Le mélange a été incubé pendant 12 h à température ambiante. Après cette incubation, la suspension a été centrifugée à 4°C, à 3000 trs/min pendant 20 minutes et le surnageant a été récupéré. Au culot, a été ajouté 0,1 mL de NaOH (0,1 N); le mélange a ensuite été homogénéisé puis incubé à température ambiante pendant 1 heure. Par la suite, le mélange a été centrifugé à 3000 trs/min pendant 20 minutes à 21°C et le second surnageant a été récupéré et combiné au premier, pour un volume total de 3 mL.

#### ➤ **Dosage des protéines proprement dit**

Le dosage des protéines totales dans la fraction a été effectué par la méthode décrite par Gornall *et al.* (1949).

#### ❖ **Principe**

Dans un milieu basique, les tartrates de sodium et de potassium forment avec les ions cuivriques un complexe soluble. L'addition d'une protéine déplace le cuivre complexé avec le tartrate pour former un complexe cuivro-protéique de couleur violette. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans la solution à doser.

#### ❖ **Réactifs**

➤ **Réactif de Biuret:** Le réactif de Biuret a été préparé à partir des solutions A et B. La solution A a été obtenue en faisant dissoudre 0,75 g de sulfate de cuivre hydraté ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) et 3 g de tartrate de sodium potassium dans 100 mL d'eau distillée. La solution B a été obtenue en faisant dissoudre 15 g de soude dans 100 mL d'eau distillée. Les deux solutions ont été mélangées et le volume final a été ajusté à 500 mL avec de l'eau distillée ;

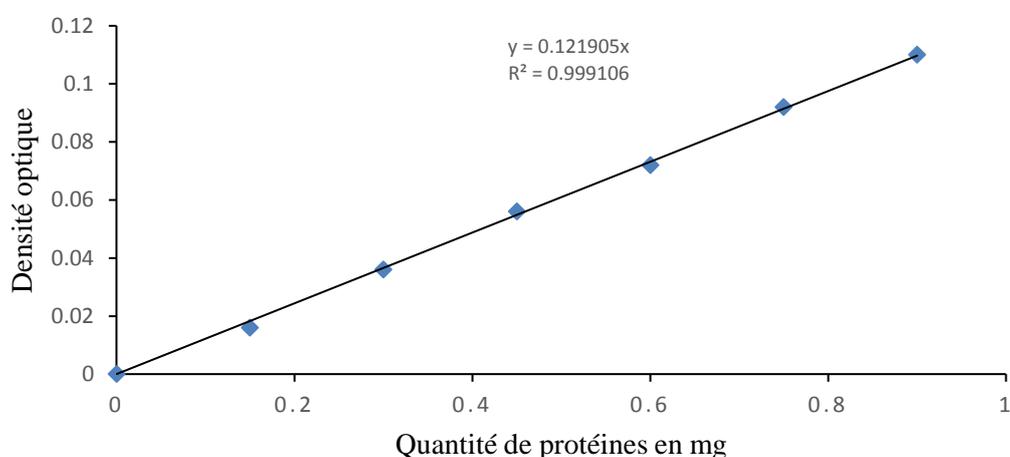
➤ **Solution BSA « (Bovine serum albumin) »:** la solution de BSA (3 mg/mL) a été obtenue en dissolvant 0,03 g de BSA dans 10 mL d'eau distillée.

#### ❖ **Mode opératoire**

La procédure est décrite dans le tableau IV. Les tubes ont été homogénéisés à l'aide d'un agitateur puis incubés pendant 10 minutes à température ambiante. L'absorbance a été lue au spectrophotomètre *HACH DR 3900* à 540 nm contre le blanc. Le modèle d'une courbe de régression linéaire du logiciel *EXCEL* a été utilisé pour l'obtention de la courbe d'étalonnage (Figure 11).

**Tableau IV : Protocole de dosage des protéines totales**

| N° tube                    | 0      | 1    | 2       | 3    | 4    | 5    | 6            | X <sub>1</sub> .....X <sub>n</sub> |     |
|----------------------------|--------|------|---------|------|------|------|--------------|------------------------------------|-----|
|                            | Témoin |      | Etalons |      |      |      | Echantillons |                                    |     |
| BSA (µL)                   | 0      | 50   | 100     | 150  | 200  | 250  | 300          | 0                                  | 0   |
| Eau distillée (µL)         | 600    | 550  | 500     | 450  | 400  | 350  | 300          | 590                                | 590 |
| Réactif de Biuret (µL)     | 400    | 400  | 400     | 400  | 400  | 400  | 400          | 400                                | 400 |
| Echantillon (µL)           | 0      | 0    | 0       | 0    | 0    | 0    | 0            | 10                                 | 10  |
| Quantité de protéines (mg) | 0      | 0,15 | 0,30    | 0,45 | 0,60 | 0,75 | 0,90         | ?                                  | ?   |



**Figure 11 :** Courbe d'étalonnage des protéines totales contenues dans l'extrait méthanolique et ses fractions.

### II-2-3. Réalisation du cycle de *Schistosoma mansoni* au laboratoire

Le cycle de développement de *Schistosoma mansoni* a été réalisé au laboratoire du Centre Schistosomiasis et Parasitologie de Yaoundé (CSP).

#### II-2-3-1. Mollusques

Les mollusques hôtes intermédiaires *Biomphalaria pfeifferi* ont été récoltés dans la rivière "Afémé" (Nkolbisson) (Yaoundé-Cameroun) par peignage systématique des plantes de bordure à l'aide d'une épuisette à mailles fines et à manche longue. Les mollusques transportés au Centre Schistosomiasis et Parasitologie de Yaoundé (CSP) ont été soigneusement nettoyés puis transférés dans des bacs en plastiques contenant de l'eau de source remplie au 2/3 pour élevage dans un molluscarium thermorégulé (25 - 26°C) et aérée.

### **II-2-3-2. Collecte des selles**

La collecte des selles a été faite au sein de la population vivant dans le foyer de schistosomiase dans la région du Centre Cameroun (Makénéne et Nkolbisson). Les selles fraîchement émises ont été recueillies dans des pots de prélèvement en plastique. Ces prélèvements ont été ramenés au laboratoire pour l'identification des selles positives. L'identification des selles contenant les œufs de *Schistosoma mansoni* a été réalisée par la technique standard de Kato-Katz et al. (1972). La préparation ainsi obtenue a été observée au microscope optique *LEICA* (x 100). Les selles contenant les œufs de *S. mansoni* ont été utilisées pour l'extraction des œufs de schistosomes puis pour l'obtention des miracidiums pour l'infestation des mollusques hôtes intermédiaires.

### **II-2-3-3. Infestation des mollusques hôtes intermédiaires**

Les selles contenant les œufs de *S. mansoni* ont été introduites dans un bécher et y a ensuite été ajouté du liquide physiologique (solution de NaCl à 0,9 %). Le mélange a ensuite été homogénéisé, puis la solution obtenue a été filtrée à travers une colonne de 4 tamis à mailles décroissantes (425 µm, 180 µm, 106 µm et 45 µm) et le contenu des 2 derniers tamis (culot) a été récupéré. Ce culot a été introduit dans des tubes coniques qui ont été incubés à l'obscurité pendant 30 minutes. Le surnageant a ensuite été versé et les tubes remplis à nouveau du liquide physiologique et incubés à l'obscurité pendant 30 minutes. Cette étape a été répétée (3 fois). Ensuite le surnageant a été versé et les tubes remplis avec de l'eau de source, puis incubés de nouveau à l'obscurité pendant 30 minutes. Le culot final a été réparti dans des boîtes de pétri en verre qui ont été exposées à la lumière pendant 30 à 60 minutes pour faciliter l'éclosion des œufs. La vérification de l'éclosion des œufs et la présence des miracidiums a été faite à la loupe binoculaire de marque *ZEISS* (Christensen *et al.*, 1984).

Les mollusques âgés de 4 à 6 semaines; mesurant 4 à 6 mm de diamètre de la coquille et les miracidiums âgés de moins de deux heures ont été utilisés pour une infestation. Les mollusques ont été individuellement répartis chacun dans un puits d'une plaque de 24 puits contenant 2 mL d'eau de source et ensuite, quatre miracidiums prélevés à l'aide d'une micropipette ont été ajoutés dans chaque puits. Après 12 heures d'exposition, les mollusques ont été remis en élevage. Le 28<sup>e</sup> jour post-infestation, un test d'émission cercarienne a été effectué afin d'identifier les mollusques émetteurs (Tchuem Tchuenté, 1993).

### **II-2-3-4. Test d'émission cercarienne**

Les mollusques infestés ont individuellement été placés dans des cupules contenant de l'eau de source et ont été exposés à une source lumineuse (lampe de 40 Watt dont la proximité au bac constitue une source de chaleur) pendant 3 heures (entre 10h et 13h) pour stimuler la libération des larves infestantes (furcocercaires). Après l'exposition, l'eau contenue dans chaque cupule a été examinée sous une loupe binoculaire de marque ZEISS et les mollusques émetteurs de cercaires ont été identifiés et séparés des non-émetteurs. Les cercaires ainsi obtenues ont été utilisées pour l'infestation des hôtes définitifs.

### **II-2-3-5. Infestation des souris hôtes définitifs**

Les études pharmacologiques des effets de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* et ses fractions ont été réalisées sur des souris blanches de souche BALB/c, mâles et femelles. Ces animaux ont été élevés à l'animalerie du Centre Schistosomiase et Parasitologie (C.S.P) dans des conditions ambiantes de température d'aération et d'éclairage. Ils ont été nourris d'un mélange composé de farine de maïs (47 %), de farine de blé (15 %), de farine de poisson (15 %), de farine de soja (20 %), de tourteaux de palmiste (1,1%), de farine d'os (1%), de sel de cuisine (0,8 %), et d'un complexe vitaminique (0,1 %). L'eau de boisson était l'eau de robinet ; et tous les animaux étaient nourris *ad libitum*

- ❖ Les souris blanches de sexe mâle et femelle âgées d'environ 2 mois et pesant entre 20 et 30 g ont été infestées chacune à 150 cercaires pour les tests *in vitro*. L'infestation a été faite en utilisant la technique d'immersion de la queue et des pattes (Smithers & Terry, 1965). Chaque souris a été exposée pendant 2 heures à 150 cercaires fraîchement émises par 25 mollusques expérimentalement infestés. Toutes les souris ont ensuite été mises en observation pendant 45 jours. Au bout des 45 jours, elles ont été perfusées avec une solution de NaCl 0,85 % et les schistosomes récupérés pour les tests *in vitro* avec l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* et ses fractions.
- ❖ Les souris blanches âgées entre 20 et 29 g de sexe femelle et mâle ont été utilisées respectivement pour l'évaluation des effets de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* et de ses fractions. Ainsi, chaque souris a été exposée pendant 2 heures à 50 cercaires fraîchement émises par 25 mollusques expérimentalement infestés. Toutes les souris ont été mises en observation pendant 35 jours.

Pour l'étude de la toxicité, les souris blanches mâle et femelle âgées de 7 à 8 semaines ont été utilisées pour l'étude des toxicités aigue et subaiguë de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima*.

## **II-2-4. Etude *in vitro* des effets de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique et de ses fractions sur les cercaires et les schistosomes adultes**

### **II-2-4-1. Etude sur les cercaires**

L'activité anticercarienne des extraits et des fractions de *O. pulcherrima* a été réalisée sur les cercaires fraîchement émises par les mollusques hôtes intermédiaires du genre *Biomphalaria pfeifferi* infestés.

#### **II-2-4-1-1. Préparation de la suspension de cercaires**

Les mollusques *Biomphalaria pfeifferi* expérimentalement infestés ont été utilisés pour les tests d'émission cercarienne. Les mollusques (25 mollusques) émetteurs ont été regroupés dans un bécher contenant 20 mL d'eau distillée, puis exposés à la lumière blanche pendant 1 heure. Environ 20 cercaires fraîchement émises ont été prélevées à l'aide d'une micropipette calibrée à 200 µL sous un microscope inverse de marque Olympus CK 2 (x 40) et ont ensuite été introduites dans les plaques à 24 puits pour les tests de l'activité anticercarienne de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique et les fractions à l'acétate d'éthyle et au *n*-hexane de l'extrait méthanoïque de *Ozoroa pulcherrima*.

#### **II-2-4-1-2. Evaluation de la motricité des cercaires**

Des séries de concentrations (31,25; 62,5; 125; 250; 500 et 1000 µg/mL) de l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique et les fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle de *Ozoroa pulcherrima* ont été fraîchement préparées dans des plaques de 24 puits et analysées avec le contrôle positif Niclosamide olamiine 5 % (1µg/mL) (Jiangsu Aijin Agrochemical Co.). Environ 20 cercaires fraîchement émises ont été transférées dans chaque puits de la plaque grâce à une micropipette. Le même nombre de cercaire était placé dans des puits contenant le DMSO 1% et de l'eau distillée considérés comme témoin négatif. Toutes ces concentrations étaient quadruplées et les expériences dupliquées. La mortalité et la survie des larves infestantes (cercaire) de schistosome ont été observées pendant 2 heures et après chaque 30 minutes à l'aide du microscope inverse de marque (Olympus CK 2) x 40. Les cercaires étaient présumées mortes lorsqu'elles étaient immobiles et déposées au fond du puit, de même que celles avec des queues détachées de la tête. La concentration létale 50 (CL<sub>50</sub>) des différentes substances après 30 minutes d'incubation a été déterminée.

#### **II-2-4-2. Etude sur les schistosomes adultes**

Les tests *in vitro* ont été menés sur des schistosomes obtenus des souris infestées à 150 cercaires de *Schistosoma mansoni*. L'extrait aqueux, l'extrait méthanolique et les fractions à

l'acétate d'éthyle et au *n*-hexane des racines de *Ozoroa pulcherrima* ont été testés afin d'évaluer leur effet sur la motricité et la mortalité après 24 heures et 48 heures incubation.

#### **II-2-4-2-1. Préparation du milieu de culture**

Le milieu de culture utilisé pour le test *in vitro* a été le GLASGOW MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM (GMEM G-6148). Il a été préparé et réparti comme suit:

- A 1000 mL d'eau distillée ont été ajoutés un flacon de GMEM G-6148 (soit 2,50 g de poudre), 2,75 g de bicarbonate de soude, une ampoule de gentamicine (60 mg/1,5 mL) et 10 mL d'HEPES 1M. La solution finale avec un pH compris entre 7,1 et 7,3 a été nommée **GMEM incomplet**. Ce dernier a été filtré sous une hotte à flux laminaire à l'aide d'une membrane filtrante de porosité 0,22 µm et conservé à 4°C dans un flacon stérilisé au préalable.
- **Le GMEM complet** constitué de GMEM incomplet auquel a été ajouté 5 % de sérum bovin fœtal (SBF) inactivité, a également été filtré et conservé à 4°C dans un flacon stérilisé.
- **Le GMEM complet supplémenté** avec 1 % de L-glutamine 2 mM et 1 % d'un mélange d'antibiotiques (5 mg/mL de pénicilline, 5 mg/mL de streptomycine et 10 mg/mL de néomycine) a été le milieu de culture proprement dit. Cette solution de pH compris entre 7,4 et 7,5 a été conservée à 4°C dans un flacon préalablement stérilisé.
- **GMEM de lavage** : constitué de GMEM incomplet et le mélange d'antibiotique-antimycotique

#### **II-2-4-2-2. Récupération des schistosomes**

Les souris âgées de 8 semaines et pesant au minimum 20 g ont été infestées avec 150 cercaires fraîchement émises et ont été mises en observation pendant 7 semaines. Au bout des 7 semaines post infestation, les schistosomes ont été récupérés suivant la technique de perfusion modifiée de (Duvall & DeWitt, 1967). De ce faire, l'abdomen et le thorax ont été incisés pour dégager les viscères. Une ligature a été faite au niveau de la portion finale du rectum. La veine porte a été sectionnée après la confluence des veines mésentériques. L'aorte thoracique a été dégagée ; une aiguille hypodermique a été introduite dans cette dernière et le liquide de perfusion (8,5 g de chlorure de sodium complété à 1000 mL d'eau distillée) a été injecté. Les schistosomes entraînés par le courant du liquide de perfusion vers la veine porte sectionnée ont été récupérés dans un bac placé sous le rongeur (Pellegrino & Siqueira, 1956). La décoloration complète du foie et des veines mésentériques a été indicatif de l'arrêt de la perfusion. Les schistosomes ainsi récupérés ont été utilisés pour la réalisation des tests *in vitro*.

### **II-2-4-2-3. Réalisation des essais *in vitro***

#### **II-2-4-2-3-1. Répartition des schistosomes**

Une fois les vers adultes de *S. mansoni* récupérés, ils ont été lavés dans une solution de NaCl 0,85 % et dans le GMEM de lavage puis répartis dans les plaques de culture sous une hotte à flux laminaire suivant le protocole ci-après :

- trois à quatre fois dans du NaCl 0,85 % toutes les 20 minutes,
- trois fois dans une solution de GMEM incomplet supplémentée avec 3 % de la mixture d'antibiotique-antimycotique toutes les 20 minutes.

Après cette opération de lavage, les vers ont été transférés dans les boîtes de pétri renfermant le milieu de culture proprement dit. Ces vers ont ensuite été répartis dans des plaques de culture en polystyrène de 24 puits stériles à raison de 4 à 5 couples de schistosomes par puits. Les plaques de culture contenant les vers baignant dans 1900 µL de milieu de culture par puits ont été incubées pendant 2 heures dans une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub> et à 37°C pour adaptation.

#### **II-2-4-2-3-2. Administration des extraits aqueux et méthanolique et des fractions des racines de *Ozoroa pulcherrima***

Les solutions stocks de l'extrait méthanolique et de ses fractions ont été dissoutes dans du Diméthylsulfoxyde 10 % (DMSO 10 %). Sous une atmosphère stérile, les différentes solutions stocks ont été filtrées à l'aide des filtres-seringues de porosité 0,2 µm. Les dilutions appropriées ont été effectuées avec le solvant de dilution pour obtenir les différentes solutions-tests aux concentrations souhaitées. Un volume de 100 µL de chaque solution-test (extrait et fractions) a été additionné à chaque puits, amenant ainsi le volume final par puits à 2000 µL et pour une concentration finale maximale à 0,5 % de DMSO. Les concentrations finales de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* et de ses fractions dans chaque puits ont été les suivantes :

- **les extraits aqueux et méthanolique et le résidu méthanolique** : 62,5; 125; 250; 500; 1000 et 2000 µg/mL ;
- **les fractions (hexane et acétate d'éthyle)** : 31,25; 62,5; 125; 250; 500 et 1000 µg/mL.

Les schistosomes incubés uniquement dans le milieu de culture et le milieu de culture avec 0,5 % de DMSO ont servi de témoin négatif et ceux incubés avec le praziquantel à 10 µg/mL constituaient le témoin positif. Quatre réplicats pour chaque concentration (solutions tests et solutions témoins) ont été réalisés et le test pour chaque extrait et fraction effectué deux fois. A la fin de l'administration des produits tests, les plaques de culture ont été incubées dans une

atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub> et à 37°C pendant 48 heures et examinés après chaque 24 heures pour évaluer la motricité des vers vivants et la mortalité.

#### **II-2-4-2-3-3. Evaluation de l'activité *in vitro* des extraits aqueux et méthanolique et des fractions des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur la motricité et la viabilité des schistosomes**

Après chaque 24 heures d'incubation et ce pendant 48 heures, la motricité des schistosomes et le nombre de vers mort ont été évalués à l'aide d'un microscope inverse de marque Olympus CK 2 (X 40), permettant ainsi de déterminer le taux de mortalité des schistosomes pour chaque produit test. Les schistosomes sans mouvement pendant au moins 2 minutes ont été déclarés morts (Caffrey, 2007; Ramirez *et al.*, 2007). La concentration létale 50 (CL<sub>50</sub>) pour chaque extrait et fractions a été alors déterminée par la méthode de Speaman-Karber à l'aide du logiciel « Timmed Speaman-Karber, version 1.5 ». Par ailleurs, la motricité était considérée réduite pour les schistosomes où uniquement les ventouses et/ou le tube digestif étaient en mouvement.

#### **II-2-5. Etude *in vivo* des effets des extraits aqueux et méthanolique et de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *ozoroa pulcherrima* sur les schistosomes**

##### **II-2-5-1. Infestation des hôtes définitifs (souris de souche BALB/c)**

Au total 131 souris blanches de sexe femelle et mâle ont été utilisées. Pour ce faire 84 souris de sexe femelle âgées entre 20 et 23 g ont été réparties en 11 groupes (Tableau V) pour l'évaluation des effets de l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur la bilharziose à *Schistosoma mansoni*. Par ailleurs les 47 autres souris de sexe mâle âgées entre 23 et 29 g ont été utilisées pour l'évaluation des effets de la fraction à l'acétate d'éthyle et réparties en 7 groupes (Tableau VI). L'infestation a été faite par la technique d'immersion de la queue et des pattes (Smithers & Terry, 1965). Chaque souris a été exposée pendant 2 heures à 50 ± 5 cercaires fraîchement émises par 25 mollusques infestés expérimentalement. Toutes les souris ont ensuite été mises en observation pendant 35 jours. Les prises de poids ont hebdomadairement été effectuées jusqu'à la fin de l'expérimentation.

**Tableau V :** Répartition des animaux pour l'évaluation des effets des extraits aqueux et méthanolique de *Ozoroa pulcherrima*

|                               | Groupes                      | Effectifs | Nombre de cercaires | Dose de substance à administrer                        |
|-------------------------------|------------------------------|-----------|---------------------|--|
| Témoins sains                 | TS                           | 7         | /                   | Eau distillée  |
|                               | TS <sub>DMSO</sub>           | 7         | /                   | DMSO 1%  |
| Témoins négatifs              | TN <sub>H<sub>2</sub>O</sub> | 7         | 50 ± 5              | Eau distillée  |
|                               | TN <sub>DMSO</sub>           | 7         | 50 ± 5              | DMSO 1%  |
| Témoin positif (praziquantel) | PZQ                          | 7         | 50 ± 5              | PZQ à 100 mg/kg/jr ×5jrs puis eau distillée/jr×23jours |
| Essais : extrait aqueux       | EAOp100                      | 7         | 50 ± 5              | Extrait à 100 mg/kg                                    |
|                               | EAOp200                      | 7         | 50 ± 5              | Extrait à 200 mg/kg                                    |
|                               | EAOp400                      | 7         | 50 ± 5              | Extrait à 400 mg/kg                                    |
| Essais : extrait méthanolique | EMOp100                      | 7         | 50 ± 5              | Extrait à 100 mg/kg                                    |
|                               | EMOp200                      | 7         | 50 ± 5              | Extrait à 200 mg/kg                                    |
|                               | EMOp400                      | 7         | 50 ± 5              | Extrait à 400 mg/kg                                    |

TS (témoin sain) : souris saines; TN (témoin négatif) : souris infestées et recevant le DMSO 1% (TN<sub>DMSO</sub>) ou l'eau distillée (TN<sub>H<sub>2</sub>O</sub>) ; PZQ (témoin positif) : souris infestées et traités au praziquantel; EAOp100, EAOp200 et EAOp400 souris infestées et traitées avec l'extrait aqueux et EMOp100 EMOp200 et EMOp400 (groupes essais) : souris infestées et traitées avec l'extrait au MeOH des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg et de 400 mg/kg respectivement.

**Tableau VI :** Répartition des animaux pour l'évaluation de l'effet de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima*

|                                      | Groupes            | Effectifs | Nombre de cercaires | Solutions à administrer et doses             |
|--------------------------------------|--------------------|-----------|---------------------|--|
| Témoins sains                        | TS                 | 6         | /                   | DMSO 3% à 10 mL/kg                           |
|                                      | TSOp400            | 6         | /                   | Fraction à la dose de 400 mg /kg             |
| Témoin négatif                       | TN <sub>DMSO</sub> | 7         | 50 ± 5              | DMSO 3% à 10 mL/kg                           |
| Témoin positif                       | PZQ                | 7         | 50 ± 5              | Praziquantel à 100 mg/kg pendant cinq jours, |
| Essais ; fraction à acétate d'éthyle | FAEOp100           | 7         | 50 ± 5              | Fraction à la dose de 100 mg/kg              |
|                                      | FAEOp200           | 7         | 50 ± 5              | Fraction à la dose de 200 mg/kg              |
|                                      | FAEOp400           | 7         | 50 ± 5              | Fraction à la dose de 400 mg/kg              |

TS (témoin sain): souris saines; TN (témoin négatif): souris infestées et non traitées; PZQ (témoins positifs): souris infestées et traitées au praziquantel à la dose globale de 500 mg/kg ; FAEOp 100, FAEOp 200 et FAEOp400 (groupes essais): souris infestées et traitées avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait au MeOH des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses respectives de 100, 200 et 400 mg/kg. TSFAEOp 400: souris saines recevant la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait MeOH des racines de *Ozoroa pulcherrima* à la dose de 400 mg/kg.

## **II-2-5-2. Evaluation des effets de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique et de sa fraction à l'acétate d'éthyle sur les paramètres parasitologiques, biochimiques et sur les marqueurs du stress oxydant après infection à *Schistosoma mansoni***

La mesure des paramètres parasitologiques (charges ovulaires fécale, hépatique et intestinale), biochimiques (les transaminases, bilirubine et protéines totales) et du stress oxydant (malondialdéhyde, glutathion réduit et catalase...) ont permis d'évaluer des effets de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique et de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* sur l'infection à *S. mansoni*.

### **II-2-5-2-1. Prélèvement du sang et des organes**

Au terme de l'expérimentation (63<sup>ème</sup> jour), le sang de chaque souris a été prélevé par ponction intra-orbitaire. Le sang ainsi prélevé a été recueilli dans des tubes à EDTA puis centrifugé à 3500 trs/min pendant 15 min. Le plasma obtenu a été réparti dans des tubes eppendorf et conservés à -70°C pour les dosages biochimiques. Les animaux ont ensuite été sacrifiés par dislocation cervicale puis perfusés. Après la perfusion, le foie, la rate et l'intestin des animaux ont été prélevés et pesés. Le lobe gauche du foie et tout l'intestin ont été digérés dans du KOH 4 % pour le comptage des œufs de schistosomes. Le lobe droit du foie a été conservé à -70°C pour la réalisation des homogénats qui ont ensuite été utilisés pour le dosage des marqueurs du stress oxydatif. Les lobes carré et codé ont été fixés dans le formol tamponné 10 % pour les études histomorphométriques. Le poids relatif du foie, de l'intestin et de la rate a été déterminé par la formule :

$$\mathbf{PR} = \frac{\mathbf{poids\ de\ l'organe}}{\mathbf{poids\ corporel}} \times 100 \quad \text{avec } \mathbf{PR} = \text{poids relatif de l'organe en \% de poids corporel}$$

### **II-2-5-2-2. Evaluation des effets des extraits et fraction de *Ozoroa pulcherrima* sur des paramètres parasitologiques**

La charge parasitaire (nombre de schistosomes), les charges ovulaires fécale, hépatique et intestinale des différents groupes de souris infestées à *Schistosoma mansoni* ont été évaluées.

#### **II-2-5-2-2-1. Collecte des fécès et évaluation de la charge ovulaire fécale**

La veille du sacrifice, les selles des souris ont été récupérées en individualisant les souris dans des bocal pendant 5 à 6 heures. Les selles récupérées ont été conservées dans le formol 10 %. Ces selles ont ensuite été homogénéisées puis filtré sur une colonne de tamis à mailles décroissantes 405 µm, 180 µm, 106 µm et 45 µm. Le culot recueilli dans les deux derniers tamis a été suspendu dans le liquide physiologique (NaCl 9 ‰), les solutions obtenues ont été centrifugées à 1500 trs/min pendant 5 minutes et le surnageant a été éliminé. Après une série de 3

lavages (centrifugation, élimination du surnageant, suspension du culot dans le liquide physiologique), le culot a ensuite été conservé dans le formol tamponné à 10 % pour évaluer le nombre d'œufs de schistosomes dans les fécès (Cheever, 1968). Pour ce faire, le culot contenu dans le formol tamponné a été homogénéisé à l'aide d'une pipette Pasteur, 2 aliquotes de 100 µL ont été montés sur des lames puis recouvert de papier cellophane préalablement imbibés de solution de Kato-Katz (mélange composé de : 1 mL de vert de malachite 3 %, 100 mL de Glycérine et 100 mL d'eau distillée); le comptage des œufs de *S. mansoni* a été réalisé au microscope optique de marque *LEICA* au grossissement 10×100 puis estimé par gramme de selles.

#### **II-2-5-2-2.2. Récupération des schistosomes**

Après le sacrifice, les souris ont été disséquées puis perfusées d'après la technique modifiée de Duvall & DeWitt, (1967). A la fin de cet exercice, les viscères ont été rincés par le jet d'eau physiologique (NaCl 9 ‰) pour récupérer les vers éventuellement bloqués et ont ensuite été prélevés et examinés à la loupe afin de récupérer les schistosomes restés coincés. Les schistosomes recueillis ont été comptés sous une loupe binoculaire de marque *ZEISS*. Le pourcentage de réduction des schistosomes après traitement a été calculé selon la méthode de Tendler *et al.* (1986) comme suit :

$$P = \frac{C-V}{C} \times 100$$

Où **P** est le pourcentage de réduction des vers ou de protection de l'extrait  
**C** est le nombre moyen de vers récupérés chez les animaux parasités non traités  
**V** est le nombre de vers récupérés chez les animaux parasités traités

#### **II-2-5-2-2-3. Evaluation des charges ovulaires hépatique et intestinale**

Le lobe gauche du foie et l'intestin entier de chaque souris ont été pesés, dilacérés et déposés respectivement dans des béchers contenant 15 mL et 20 mL d'une solution de KOH 4 %. Les béchers ont ensuite été placés dans un bain-marie à 37°C pendant 5 à 7 heures. Les tissus des organes ont été dissous et les œufs intacts libérés dans la solution. Les solutions obtenues ont été centrifugées à 1500 trs/min pendant 5 minutes, le surnageant a été éliminé et le culot suspendu dans le liquide physiologique (NaCl 9 ‰). Après une série de 3 lavages (centrifugation, élimination du surnageant, suspension du culot dans le liquide physiologique), le culot a ensuite été conservé dans le formol tamponné à 10 % pour évaluer le nombre d'œufs de schistosomes dans le foie et intestin (Cheever, 1968). Pour ce faire, le culot contenu dans le formol tamponné a été homogénéisé à l'aide d'une pipette Pasteur, 2 aliquotes de 100 µL ont été montés sur des lames puis recouvert de papier cellophane préalablement imbibés de solution de Kato-Katz (mélange composé de : 1 mL de vert de malchite 3 %, 100 mL de Glycérine et 100 mL d'eau distillée); le

comptage des œufs de *S. mansoni* a été réalisé au microscope optique de marque *LEICA* au grossissement 10×100 puis estimé par gramme d'organes.

### **II-2-5-2-3. Analyses biochimiques**

Les analyses biochimiques de quelques marqueurs de la fonction hépatique et du stress oxydant ont été réalisées. Concernant les biomarqueurs de la fonction hépatique, les concentrations des transaminases, de protéines totales et de bilirubine totales ont été évaluées. Par ailleurs, l'évaluation des concentrations hépatiques de malondialdéhyde, de glutathion réduit, de nitrite de même que les activités enzymatiques de la superoxyde dismutase et de la catalase ont été réalisées pour ce qui est des marqueurs du stress oxydant.

### **II-2-6. Etude histomorphométrique**

L'histomorphométrie du foie des souris infestées à *S. mansoni* et traitées avec l'extrait méthanolique ou avec la fraction à l'acétate d'éthyle a été réalisée afin de mesurer l'impact du traitement sur l'évolution des granulomes bilharziens. Concernant l'étude toxicologique de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima*, l'étude histopathologique du foie, du rein et du poumon a également été réalisée.

Cette étude a été réalisée conjointement au laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I, Cameroun et au laboratoire d'histomorphométrie, Institut Médico-légale, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, France.

#### **II-2-6-1. Réalisation des coupes histologiques**

Les organes, une fois prélevés, ont été fixés dans le formol tamponné à 10 %. Le but de la fixation a été de préserver les cellules et les constituants tissulaires dans un état aussi proche que possible de celui du vivant et de permettre au tissu de passer par les étapes de la technique histologique sans changement ni déformation.

##### **II-2-6-1-1. Recoupe ou (Trimming)**

Après fixation des organes dans le formol tamponné à 10 %, une partie du foie, le poumon et les reins ont été coupés suivant un plan transversal à l'aide d'un bistouri sous une hotte ventilée, puis disposés dans des cassettes étiquetées.

##### **II-2-6-1-2. Déshydratation**

La déshydratation, parfois aussi appelée circulation, comporte 3 étapes : la déshydratation elle-même, l'éclaircissement et l'imprégnation.

###### **❖ Déshydratation**

La paraffine n'étant pas miscible avec l'eau, les tissus fixés ont été débarrassés de toute trace d'eau avant de pouvoir être inclus dans ce milieu. La déshydratation a été faite en introduisant

les cassettes dans des bacs contenant de l'alcool éthylique de gradient de concentration croissante et à une durée déterminée : 50° (1 heure), 70° (1 heure), deux bacs de 95° (respectivement 1 heure pour le 1<sup>er</sup> et 1 h 30 min pour le 2<sup>ème</sup>) et 3 bacs de 100° (pendant respectivement 1 heure, 1 h 30 min et 2 heures).

#### ❖ **L'éclaircissement**

Elle consiste à remplacer la solution de déshydratation par un solvant miscible dans le milieu d'inclusion. C'est une étape de transition réalisée par des hydrocarbures benzéniques, à l'instar du xylène. Ainsi, après déshydratation, les cassettes ont été introduites dans deux bacs successifs de xylène pendant 1 heure et 2 heures respectivement.

#### ❖ **Imprégnation**

Une fois déshydratés et éclaircis, les tissus sont prêts à être infiltrés par la paraffine. Ainsi, les cassettes ont été introduites dans 3 séries de bac de paraffine en fusion (60°C) sous vide pendant 1 heure, 1 h 30 min et 2 heures respectivement.

### **II-2-6-1-3. Inclusion**

L'inclusion fournit un support externe aux tissus, ce qui permet la réalisation de coupes au microtome. Les tissus ont ainsi été placés dans des moules en inox remplis de paraffine en fusion (60°C) qui a été mise à solidifier sur une surface froide (4°C) après orientation appropriée du tissu dans le bloc.

### **II-2-6-1-4. Coupe**

Les blocs refroidis ont été fixés sur un microtome de marque LEITZ WETZLAR et coupés en épaisseur de 5 µm. Une fois coupées, les sections ont été mises à déplier dans un bain d'eau chaude (40°C), puis les meilleures coupes de chacune des tranches d'organe ont été récupérées sur une lame porte objet. Les lames ont ensuite été laissées dans une étuve à 40°C pour séchage pendant 24 heures avant coloration.

### **II-2-6-1-5. Coloration**

Après séchage, les coupes ont été déparaffinées dans trois bains de xylène par séjour de 5 min/bain. Elles ont ensuite été réhydratées par passages successifs dans une série de trois bains d'éthanol 100° (10 min/bain), puis un bain d'éthanol 95° (5 min) et enfin un bain d'éthanol 70° (5 min). Les lames ont ensuite été rincées à l'eau distillée puis les colorations à l'hématoxyline-éosine (H&E), au Picrosirius (PS) et au Giemsa ont été réalisées telles que décrites par Jatsa *et al.* (2018a).

#### **a-Coloration à l'hématoxyline-éosine**

Cette coloration a été effectuée afin d'évaluer les infiltrations leucocytaires et la réaction granulomateuse liée à la schistosomiase chez la souris et pour l'étude histopathologique de la

toxicité. Pour ce faire, après rinçage à l'eau distillée, les lames ont été immergées pendant 10 min dans un bac contenant de l'hématoxyline (Color Index (CI) 75290, Sigma-Aldrich), préparée selon Mayer, 1896 pendant 10 min, puis rincées à l'eau courante du robinet pendant 10 min. Elles ont ensuite été plongées tour à tour dans un bain d'éthanol à 70° puis d'éthanol à 95° pendant 5 min et enfin contre-colorées dans une solution d'éosine Y (Color Index (CI) 45380, Sigma-Aldrich) à 0,5 % dans l'éthanol à 95° pendant 5 min. Les coupes ont ensuite été déshydratées par immersion des lames dans trois bains d'éthanol à 100° (5 min/bain), puis éclaircies après trois séjours de 5 min chacun dans du xylène. Le montage des lames a ensuite été effectué à l'aide d'une lamelle après ajout de quelques gouttes de résine Pertex® (Histolab).

### **b- Coloration au picrosirius**

Cette coloration a été entreprise pour mettre en évidence la fibrose et typer le collagène au niveau des foyers granulomateux hépatiques. Le Sirius F3BA, entrant dans la composition du picrosirius est un colorant spécifique du collagène qui permet de différencier les collagènes I et III lorsqu'il est observé en lumière polarisée (Junqueira *et al.*, 1979; Puchtler *et al.*, 1973). La préparation des colorants est décrite ci-après.

- ✓ L'hématoxyline de Weigert a été préparée à partir d'un mélange volume/volume (v/v) d'hématoxyline alcoolique (préparée par dissolution de 1 g d'hématoxyline (Color Index (CI) 75290, Sigma-Aldrich) dans 100 mL d'éthanol à 95°) et d'une solution de chlorure ferrique acide (mélange de 11,6 g de chlorure de fer anhydre (Sigma-Aldrich) et 10 mL d'acide chlorhydrique à 25 % dans 990 mL d'eau distillée).
- ✓ L'eau acétifiée à 0,5 % a été obtenue à partir d'un mélange de 0,5 mL d'acide acétique glacial (Sigma-Aldrich) avec 99,5 mL d'eau distillée.
- ✓ La solution de Picrosirius a été préparée par dissolution de 0,1 g de rouge Sirius (Sirius F3B (Color Index (CI) 35782, Sigma-Aldrich) dans 100 mL d'une solution d'acide saturée picrique (référence 197378, Sigma-Aldrich).

Les lames déparaffinées et réhydratées ont été plongées dans la solution d'hématoxyline de Weigert pendant 12 min, puis rincées à l'eau courante du robinet pendant 10 min et à l'eau distillée pendant 3 min. Après ce lavage, les lames ont été introduites dans la solution de Picrosirius pendant 1 heure et différenciées dans deux bains d'eau acétifiée à 0,5 % (20 à 30 secondes/bain). À l'issue de cette étape de différenciation, les lames ont été égouttées pendant deux minutes, puis déshydratées dans deux bains d'éthanol 100° (5 min/bain), éclaircies dans du xylène (3x5 min) et enfin montées sous résine Pertex® (Histolab).

### **c-Coloration au Giemsa**

Cette coloration a été réalisée afin de mettre clairement en évidence les œufs du parasite ainsi que la larve (miracidium) qu'ils renferment. Les lames déparaffinées et réhydratées ont été plongées dans une solution de tampon phosphate pH 6,8 (Référence 95411, Sigma-Aldrich) pendant 5 min puis mises une nuit à 37°C, dans une solution de travail de Giemsa préparée à partir d'une solution mère (Référence 320300, RAL) diluée à 4 % dans du tampon phosphate pH 6,8. Après refroidissement de la solution les coupes ont été différenciées sous microscope dans de l'acide acétique à 0,5 % jusqu'à obtention d'un fond de coupe rose. Les lames ont ensuite été égouttées pendant deux minutes, puis déshydratées dans deux bains d'éthanol à 100° (2 min/bain), éclaircies dans du xylène (3x3 min) et montées sous résine Pertex® (Histolab).

### **d-Analyses microscopiques**

Après quelques heures de séchage à l'air, toutes les lames ont été observées au microscope optique (Axioscope A1, Zeiss®) connecté à une caméra digitale 3CCD 2 millions de pixels (Jai200Ge, JAI). Les images ont été capturées et analysées à l'aide des logiciels Archimed© et Histolab©, (Microvision Instruments). L'analyse des images a été réalisée grâce au logiciel Image J version 1.32. Le calibrage a été fait à l'aide de la lame de calibration du logiciel Amscope, avec une division correspondant à 0,01 mm.

## **II-2-6-2. Quantification des granulomes et mesure du volume des granulomes**

Le nombre de granulomes présents dans le foie de chaque souris a été évalué en dénombrant les granulomes par champ microscopique. Sur chaque coupe au grossissement x 100, le nombre total de champs et de granulomes a ainsi été évalué pour chaque souris. De même, le volume de chaque granulome a été mesuré à l'aide des logiciels Amscope 3.7 for digital camera et Image G (Jatsa *et al.*, 2018a).

## **II-2-7. Etude de la toxicité des extraits et fractions des racines de *Ozoroa pulcherrima***

### **II-2-7-1. Evaluation de la cytotoxicité des extraits aqueux et méthanolique et des fractions de *ozoroa pulcherrima***

La cytotoxicité de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique et des fractions de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* a été réalisée au laboratoire de l'Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale, UR 7292 Dynamique des interactions Hôtes-Pathogènes, Faculté de Médecine, 3 rue Koberti 67000, Strasbourg, France.

## II-2-7-1-1. Test de cytotoxicité *in vitro*

### II-2-7-1-1-1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire était conservée dans de l'azote liquide. Elle a été décongelée à 37°C dans un bain-marie pendant une semaine, puis centrifugée à 5000 trs/ min pendant 5 minutes. Les cellules ont été cultivées dans du DMEM. Ce milieu a été enrichi en glutamine en sérum fœtal bovin (10 % v/v). Un mélange d'antibiotique a été ajouté au milieu : pénicilline/streptomycine (1 % v/v). Les cellules ont été cultivées en monocouche dans des flasques de culture cellulaire. Les milieux de culture étaient renouvelés le lendemain des mises en culture et ensuite toutes les 48 heures. Les boîtes de culture étaient maintenues dans un incubateur humide à 37°C, avec 5 % de CO<sub>2</sub> jusqu'à confluence des cellules (quand les cellules occupent plus de 80 % de la surface du flasques). Le milieu de culture était alors éliminé et une solution de trypsine 0,25 % (trypsin – 0,53 mM de EDTA) était introduite dans les flasques de culture pour les rincer (deux fois) et permettre de détacher les cellules de leur support. L'effet de la trypsine était stoppé en rajoutant du milieu de culture dans les flasques. Selon la densité cellulaire obtenue, une fraction de la suspension cellulaire (1 à 4 mL selon la taille des flasques) était remise dans d'autres flasques et incubée dans les conditions précédentes.

### II-2-7-1-2. Comptage et répartition des cellules dans les plaques de culture

Avant le début du test les cellules ont été comptées en utilisant le bleu Trypan qui est un colorant vital qui colore seulement les cellules mortes. Nous avons ainsi utilisé une cellule de Fast-Read 102 pour le comptage des cellules vivantes sous un microscope à phase inversée. A cet effet, 10 µL de solution cellulaire ont été introduits dans un puit d'une plaque de 96 puits, puis 10 µL de bleu trypan ont été ajoutés et le mélange homogénéisé. Le comptage des cellules vivantes a ensuite été effectué dans 5 carrées de la cellule Fast-Read 102. A l'issue du comptage, un calcul estimatif du nombre de cellules vivantes a été fait à l'aide de la formule suivante.

$$\text{Nombre de cellule/mL} = \frac{\text{Somme de cellules comptées dans 5 carrées}}{5} \times \text{facteur de dilution}$$

Pour un puit il est recommandé d'utiliser 10<sup>4</sup> cellules/puit dans un volume total de 100 µL. Ainsi, pour une plaque de 96 puits, nous avons préparé une solution cellulaire stock de 100 x 10<sup>4</sup> cellules/puit = 10<sup>6</sup> cellules. La solution cellulaire obtenue a ensuite été homogénéisée et 100 µL de solution ont été introduits dans chaque puits d'une plaque ; excepté la dernière ligne de la plaque qui était réservée au blanc. Les plaques étaient ensuite incubées pendant 24 heures à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub> pour assurer une adhésion adéquate des cellules.

### II-2-7-1-3. Préparation et administration des substances à tester

Les solutions des tests de l'activité antischistosomale *in vitro* de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique et des fractions de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* ont permis de choisir les concentrations suivantes pour l'étude 15,625; 31,25; 62,5; 125,250; 500 et 1000 µg/mL. Les solutions stocks (10 mg/mL) ont été préparées avec de l'eau distillée pour l'extrait aqueux et le DMSO pour l'extrait méthanolique et ses fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle. Les solutions mères ainsi obtenues ont été filtrées à l'aide des seringues-filtres sous une hotte à flux laminaire. Les dilutions appropriées des solutions mères ont permis d'obtenir les concentrations souhaitées dans les puits suivant la formule :

$$C_i V_i = C_f V_f$$

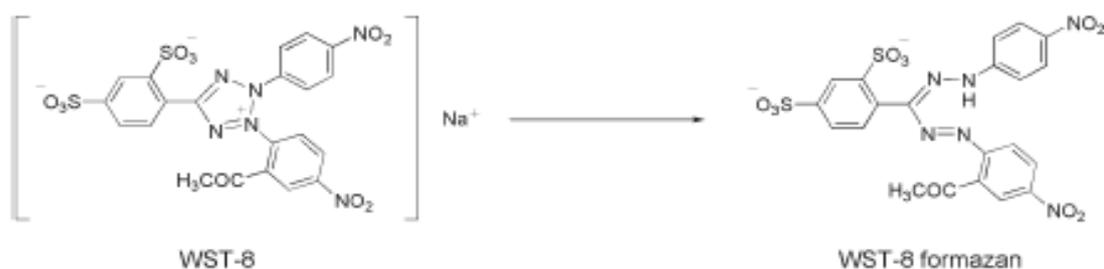
$C_i$  = concentration initiale;  $V_i$  = volume initial;  $C_f$  = concentration finale;  $V_f$  = volume final

Après 24 heures d'incubation, le milieu de culture a été retiré, puis renouvelé à l'aide d'une micropipette; suivi de l'addition des substances à administrer aux concentrations différentes (15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 et 1000 µg/mL). Par ailleurs, la dernière ligne de chaque plaque dépourvue de cellules recevait la plus faible concentration de la substance et constituait le blanc. Cependant, les premières lignes de chaque plaque ont servi de témoin et ne contenaient donc que de cellules vivantes.

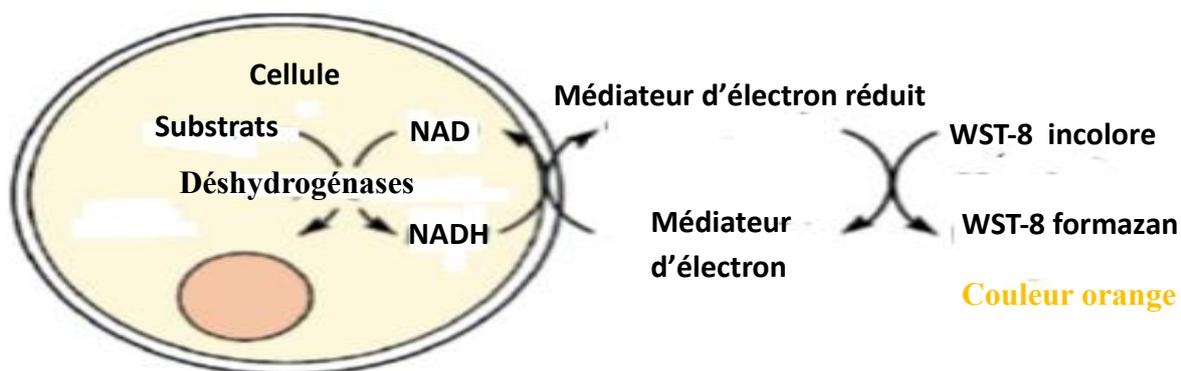
### II-2-7-1-4. Test de viabilité

Le kit de révélation utilisé pour l'expérimentation a été le Cell Counting Kit 8 (CCK-8) (WST-8, abcam, ab 228554, UK) qui est utilisé pour la détermination du nombre de cellules viables pour les tests de prolifération cellulaire et de cytotoxicité. Le test est basé sur la réduction d'un sel de tétrazolium hautement soluble dans l'eau de Dojindo WST-8 [2- (2-méthoxy-4-nitrophényl) -3- (4-nitrophényl) -5- (2,4-disulfophényl) -2H-tétrazolium, sel monosodique] par les déshydrogénases présentes dans les cellules pour donner un produit coloré en orange (formazan), qui est soluble dans le milieu de culture en présence d'un médiateur d'électron. L'intensité de la coloration générée par l'activité des déshydrogénases dans les cellules est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes (Figure 12). Le pourcentage d'inhibition de chaque substance a été calculé suivant la formule :

$$\% \text{ inhibition} = ((D.O \text{ témoin} - D.O \text{ substance}) / D.O \text{ témoin}) \times 100$$



Structures de WST-8 et WST-8 formazan



**Figure 12 :** Principe de détection des cellules viables avec le Cell Counting kit 8.

Après 24 heures d'incubation, 10 µL de WST-8 ont été ajoutés dans chaque puit, puis les plaques ont été recouvertes de papier aluminium et incubées à nouveau pendant 4 heures à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub>. Après ces 4 heures d'incubation, les plaques ont été lues à 450 nm à l'aide du lecteur de plaque Dynex MRXTC II (Dynex Technologies, USA).

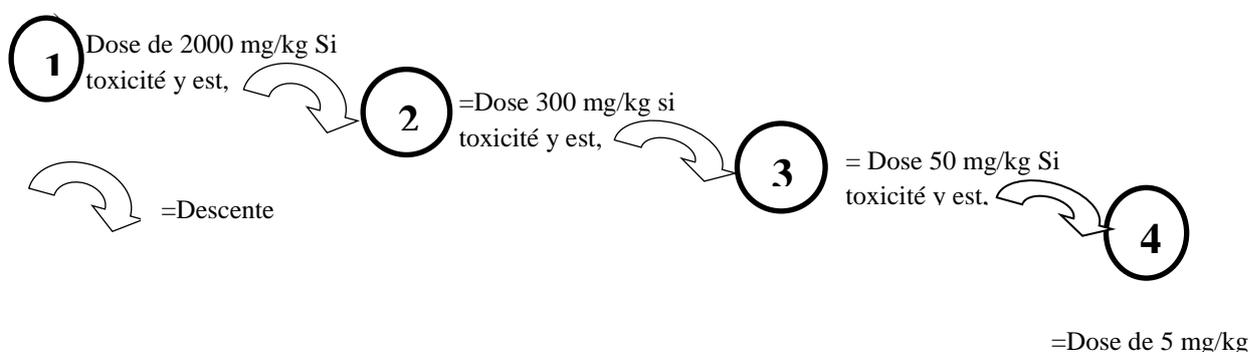
### II-2-7-2. Etude de la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima*

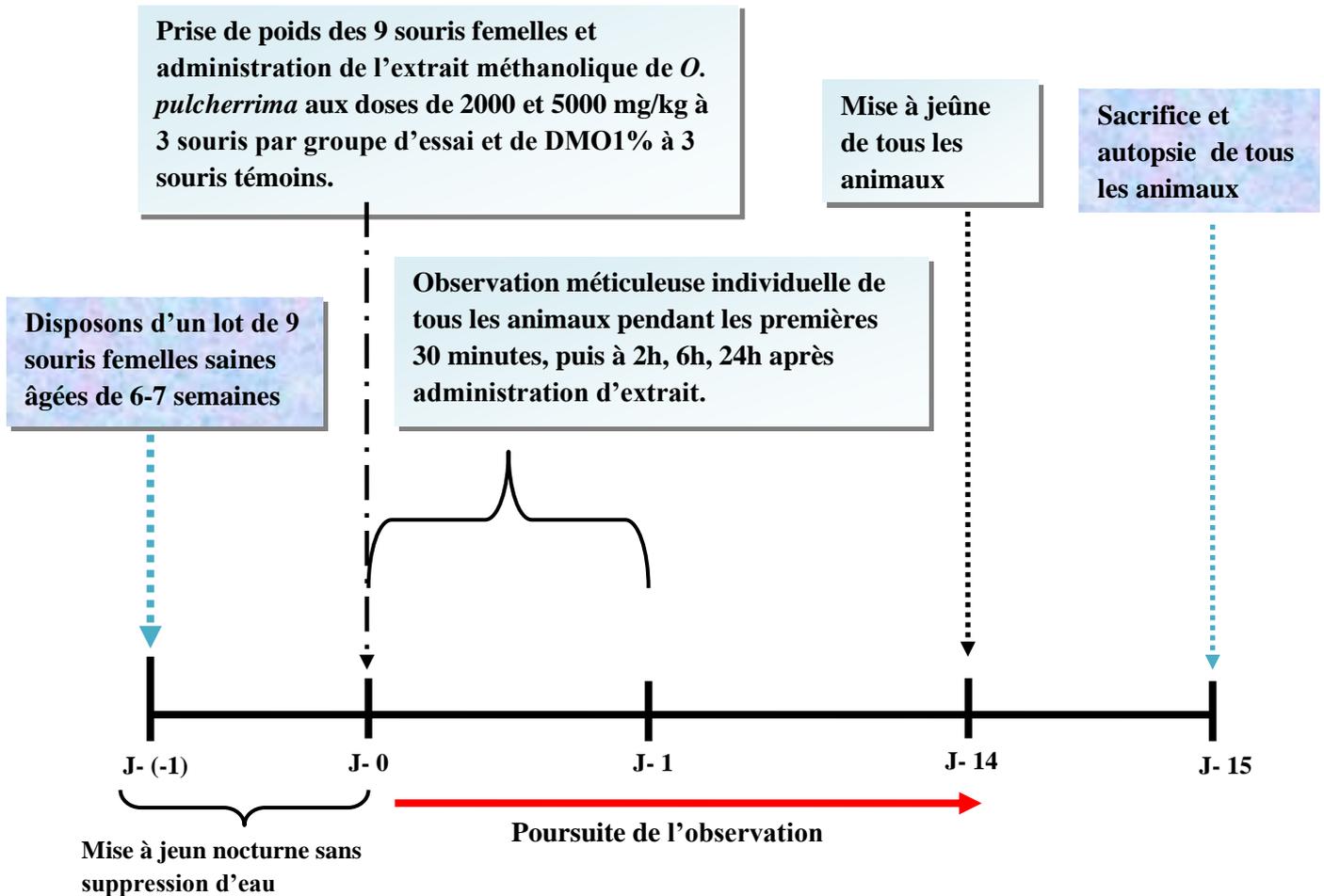
#### II-2-7-2-1. Etude de la toxicité aiguë de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* (ligne directrice n° 425 de l'OCDE : toxicité orale aiguë - Méthode de l'ajustement des doses)

Les souris femelle âgées de 8 semaines ont été soumises à un jeûne non hydrique de 4 heures (OECD, 2008a) et réparties en trois groupes de trois souris chacune. L'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* a été administré par gavage à l'aide d'une sonde œsophagienne. Le groupe témoin a été traité avec le DMSO 1 %. Pour l'évaluation de la toxicité de l'extrait, les animaux du groupe test ont reçu l'extrait aux doses de 2000 et de 5000 mg/kg. Après l'administration de l'extrait, les animaux ont été observés pendant 24 heures avec une attention particulière les 4 premières heures pour l'évaluation des signes externes de toxicité, puis ont été laissés en observation pendant 14 jours. Au terme de la période expérimentale, les souris survivantes ont été pesées, euthanasiées et autopsiées en vue de l'observation macroscopique (Figure 13).

La DL<sub>50</sub> (dose létale 50 %) est la dose unique d'une substance d'essai susceptible d'entraîner la mort de 50 pour cent des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La DL<sub>50</sub> a été estimée être dans une catégorie d'après le système de classement globalement harmonisé suivant plusieurs critères. Les critères pour la catégorie de danger 5 sont destinés à l'identification de substances dont la toxicité aiguë est relativement faible mais qui peuvent, sous certaines conditions, être dangereuses pour des populations vulnérables. La DL<sub>50</sub> orale ou dermale de ces substances est escomptée se situer dans la gamme 2000-5000 mg/kg. Ainsi, des substances d'essai peuvent être classées dans la catégorie SCGH de danger 5, définie par 2000 mg/kg < DL<sub>50</sub> < 5000 mg/kg, dans le cas suivant :

si, sur la base de l'incidence de mortalité, l'un quelconque des schémas de l'Annexe 3 dirige la substance vers cette catégorie.





**Figure 13 :** Protocole expérimental d'évaluation de la toxicité aiguë orale de *Ozoroa pulcherrima* (OECD, 2008a).

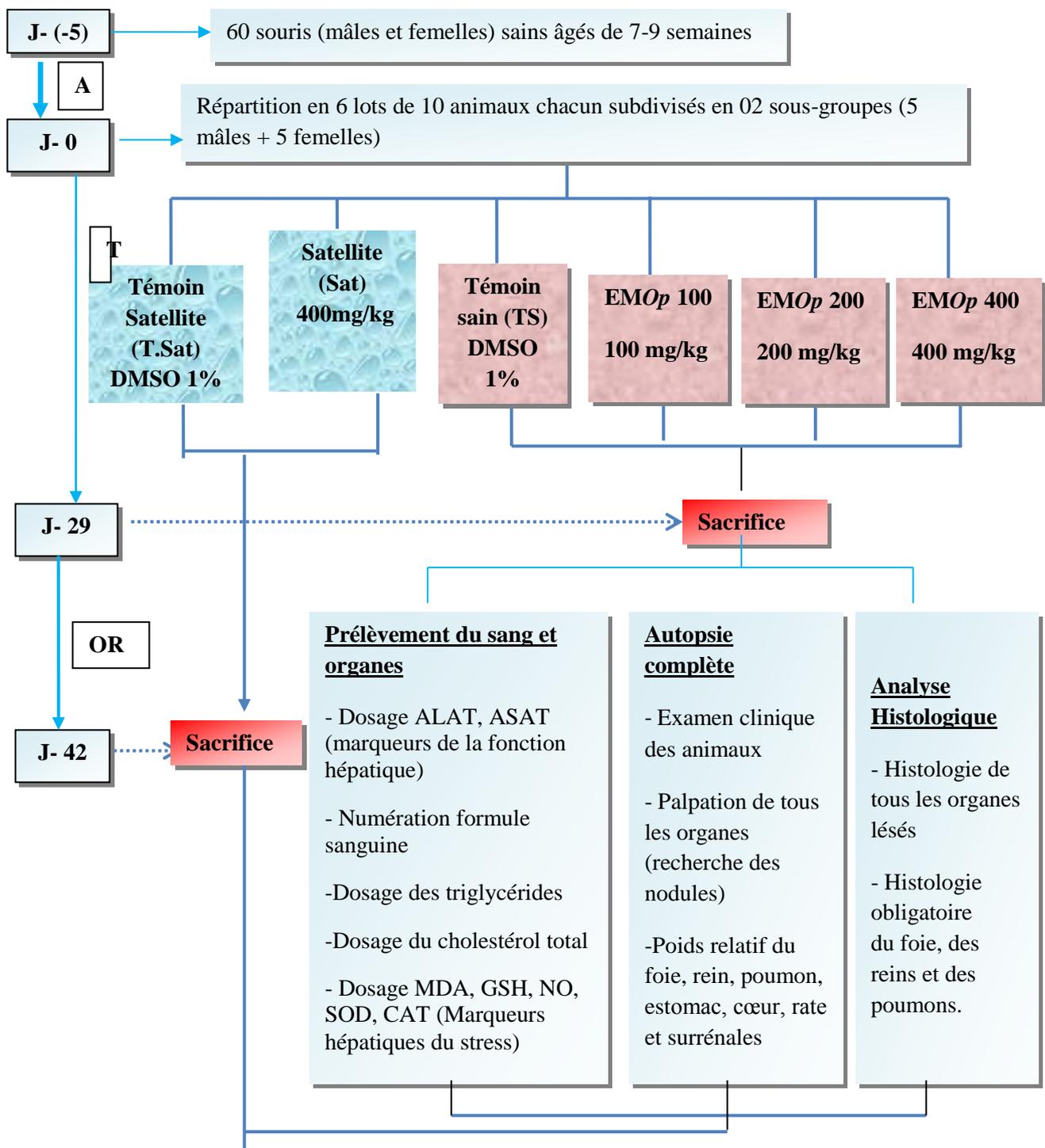
#### II-2-7-2-2. Etude de la toxicité orale subaigüe de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* (ligne directrice n° 407 de l'OCDE : toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs)

Les souris mâles et femelles ont été réparties en six groupes de 10 souris chacun (5 mâles et 5 femelles). Les animaux ont quotidiennement reçu par gavage œsophagique le solvant de dilution de l'extrait ou l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* pendant 28 jours. Le groupe sain (groupe témoin) a reçu le DMSO 1 % (0,2 mL). Les groupes tests (EMOp 100, EMOp 200 et EMOp 400) ont reçu l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* aux doses respectives de 100, 200 et de 400 mg/kg; les groupes satellites (Tsat et EMOp 400) ont respectivement reçu le DMSO 1 % (témoin satellite) et l'extrait à la dose maximale de 400 mg/kg. Les groupes satellites ont été observés pendant 14 jours supplémentaires post-administration des différentes doses de l'extrait

méthanolique pour évaluer une réversibilité à la plausible toxicité. Pendant la période de traitement, le poids corporel hebdomadaire des souris a été évalué.

A la fin du traitement, les animaux ont été sacrifiés, le sang a été recueilli par ponction intra orbitaire dans les tubes secs et les tubes à EDTA (anticoagulant). Le sang recueilli dans les tubes EDTA a été utilisé pour les analyses hématologiques. Les examens hématologiques de Numération Formule Sanguine (NFS) ont été effectués : hémocrite, concentration d'hémoglobine, numération des érythrocytes et des réticulocytes, numération et formule leucocytaire, numération des plaquettes.

Par ailleurs, le sang recueilli dans les tubes secs a été centrifugé à 3500 trs/min pendant 15 minutes à 4 °C et le sérum conservé à -70 °C pour les dosages biochimiques. Une analyse macroscopique de tous les organes à la recherche des nodules et/ou lésions a été faite. Le rein gauche, les poumons et une partie du foie ont été mis dans le formol 10 % pour les analyses histopathologiques. La seconde partie du foie a été pesée et conservée à -70 °C pour les dosages tissulaires. Les différents paramètres ainsi énumérés sont consignés dans la figure 14.



**Figure 14 :** Protocole expérimental d'évaluation de la toxicité subaiguë orale de *Ozoroa pulcherrima* (OECD, 2008a).

**A** = Période d'acclimatation (5 jours). **T** = Période de traitement.

**OR** = Période d'observation post traitement pour une éventuelle réversibilité des symptômes toxiques s'il y a toxicité.

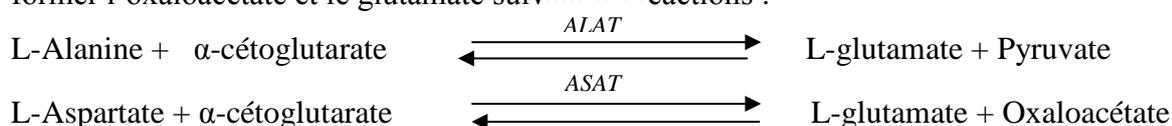
## II-2-8. Protocole de dosage des différents biomarqueurs de la fonction hépatique et de toxicité

### II-2-8-1. Dosage des transaminases

L'augmentation des taux plasmatiques de l'alanine aminotransférase (ALAT) et aspartate aminotransférase (ASAT) reflète une lésion cellulaire, en particulier au niveau hépatique ou musculaire.

#### ❖ Principe

Les transaminases alanine aminotransférase (ALAT) et aspartate aminotransférase (ASAT) catalysent le transfert du groupement aminé respectivement de l'alanine sur l' $\alpha$ -cétoglutarate pour former le pyruvate et le glutamate et de l'aspartate sur l' $\alpha$ -cétoglutarate pour former l'oxaloacétate et le glutamate suivant les réactions :



Le pyruvate ou l'oxaloacétate formé réagit avec le 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) pour donner le complexe oxaloacétate hydrazone ou pyruvate hydrazone marron. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de pyruvate ou d'oxaloacétate dans le milieu c'est-à-dire lié à l'activité de l'ALAT ou de l'ASAT.

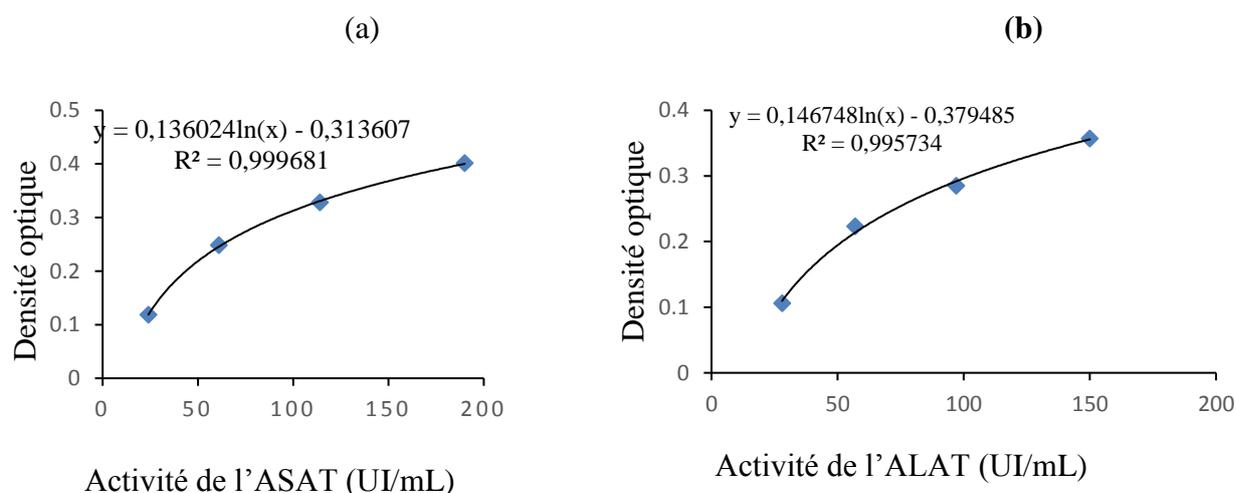
#### ❖ Mode opératoire

Le dosage de ces enzymes a été réalisé à l'aide du kit *BIOCLIN (Quibasa Quimica Basica Ltda, Belo Horizonte, Brasil)*. La réalisation des courbes d'étalonnage (Figure 15) et le dosage des activités de l'ALAT et de l'ASAT dans les échantillons ont été effectués suivant le protocole décrit dans le tableau VII.

**Tableau VII :** Protocole de réalisation des courbes d'étalonnage de l'ASAT et de l'ALAT pour le dosage des transaminases plasmatiques

| Réactifs\N° Tubes   | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    |
|---|------|------|------|------|------|
| Standard ASAT/ALAT (µL)   | -    | 10   | 20   | 30   | 40   |
| Substrat ASAT/ALAT (µL)   | 100  | 90   | 80   | 70   | 60   |
| Eau distillée (µL)  | 20   | 20   | 20   | 20   | 20   |
| Réactif de cor : 2,4-dinitrophénylhydrazine (µL)  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  |
| <b>Le mélange a ensuite été homogénéisé et incubé pendant 20 minutes à température ambiante</b> |      |      |      |      |      |
| Hydroxyde de sodium 0,4 N (µL)  | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| <b>Ensuite homogénéisé et incubé pendant 5 minutes à température ambiante</b>                   |      |      |      |      |      |
| Activité ASAT (UI/mL)   | 0    | 24   | 61   | 114  | 190  |
| Activité ALAT (UI/mL)   | 0    | 28   | 57   | 97   | 150  |

Les densités optiques ont été lues à 505 nm au spectrophotomètre de marque *HACH DR 3900* et le modèle logarithmique de la courbe de tendance dans le logiciel *EXCEL* a été utilisé pour le tracé des courbes d'étalonnage (Figure 15).



**Figure 15 :** Courbes d'étalonnage du dosage de l'ASAT (a) et de l'ALAT (b).

Dans les tubes tests, les réactifs ont été ajoutés comme l'indique le tableau VIII suivant.

**Tableau VIII** : Protocole de dosage des transaminases plasmatiques

|  |                            |
|--|----------------------------|
| Substrat ASAT/ ALAT (réactif N°1)  | 50 µL                      |
| <b>Incubé pendant 3 minutes à 37°C</b>   |                            |
| Ajout de l'échantillon (plasma)  | 20 µL(ASAT) ou 10 µL(ALAT) |
| <b>Le mélange a été homogénéisé et incubé pendant 30 minutes à 37°C</b>        |                            |
| Ajout de 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) réactif N°2                         | 50 µL                      |
| <b>Ensuite homogénéisé et incubé pendant 20 minutes à température ambiante</b> |                            |
| Ajout de l'hydroxyde de sodium 0,4 N (réactif N°3)                             | 500 µL                     |

Les mélanges ainsi obtenus ont été homogénéisés puis laissés au repos pendant 5 minutes à température ambiante. Les densités optiques ont été lues à 505 nm au spectrophotomètre de marque *HACH DR 3900* et les activités de l'ASAT et de l'ALAT déterminées à partir des courbes d'étalonnage (Figure 16).

Le taux de transaminases hépatiques pour l'étude de la toxicité a été déterminé à l'aide du kit BIOLABO. Le principe de la réaction est le même que précédemment décrit.

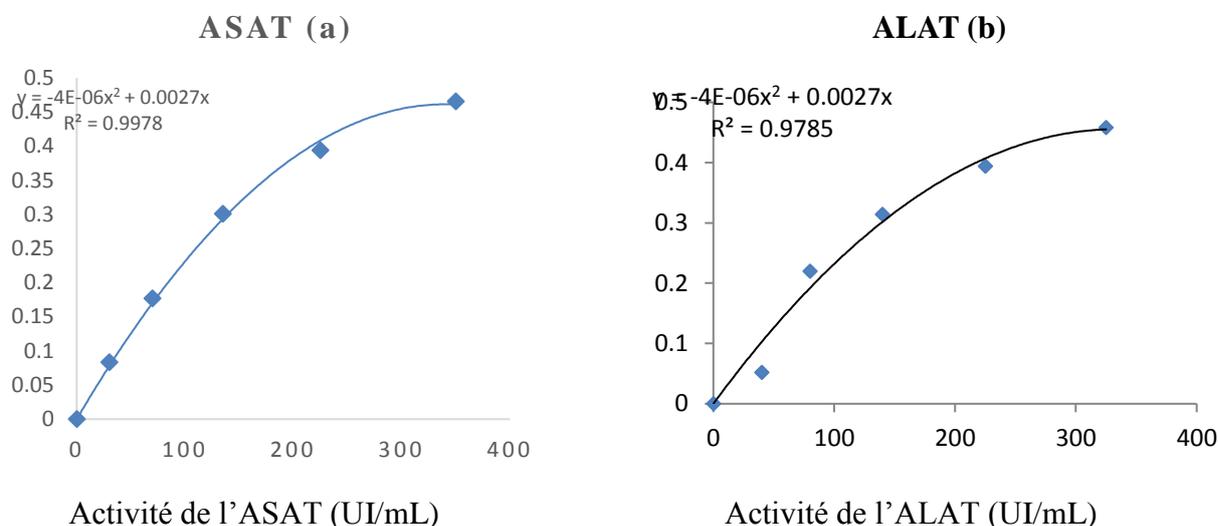
#### ❖ Mode opératoire

Le dosage de ces enzymes a été réalisé à l'aide du kit BIOLABO. La réalisation des courbes d'étalonnage (Figure 16) et le dosage des activités de l'ALAT et de l'ASAT dans nos échantillons ont été effectués suivant le protocole décrit dans le tableau IX.

**Tableau IX** : Protocole de réalisation de la courbe d'étalonnage des transaminases hépatiques (ALAT et ASAT)

| Tubes   | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |
|---|------|------|------|------|------|------|
| Eau distillée   | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 |
| R1 ou R2  | 1    | 0,90 | 0,80 | 0,70 | 0,60 | 0,50 |
| R4  | -    | 0,10 | 0,20 | 0,30 | 0,40 | 0,50 |
| (standard)  |      |      |      |      |      |      |
| R3  | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    |
| (Colorant)  |      |      |      |      |      |      |
| <b>Le mélange a été homogénéisé, laissé 20 minutes à température ambiante</b> |      |      |      |      |      |      |
| NAOH 0,4 N  | 10   | 10   | 10   | 10   | 10   | 10   |
| <b>Ensuite Homogénéisé, incubé pendant 5 minutes</b>                          |      |      |      |      |      |      |
| Unités TGO (UI/L)   | 0    | 30   | 70   | 135  | 225  | 350  |
| Unités TGP (UI/L)   | 0    | 40   | 80   | 140  | 225  | 325  |

Les densités optiques ont été lues à 505 nm au spectrophotomètre de marque *URIT-810 biochemistry analyzer* et le modèle logarithmique de la courbe de tendance dans le logiciel *EXCEL* a été utilisé pour le tracé des courbes d'étalonnage (Figure 16).



**Figure 16 :** Courbe d'étalonnage des transaminases hépatiques ASAT (a) et ALAT (b).

Dans les tubes tests, les réactifs ont été ajoutés comme l'indique le **tableau X** suivant.

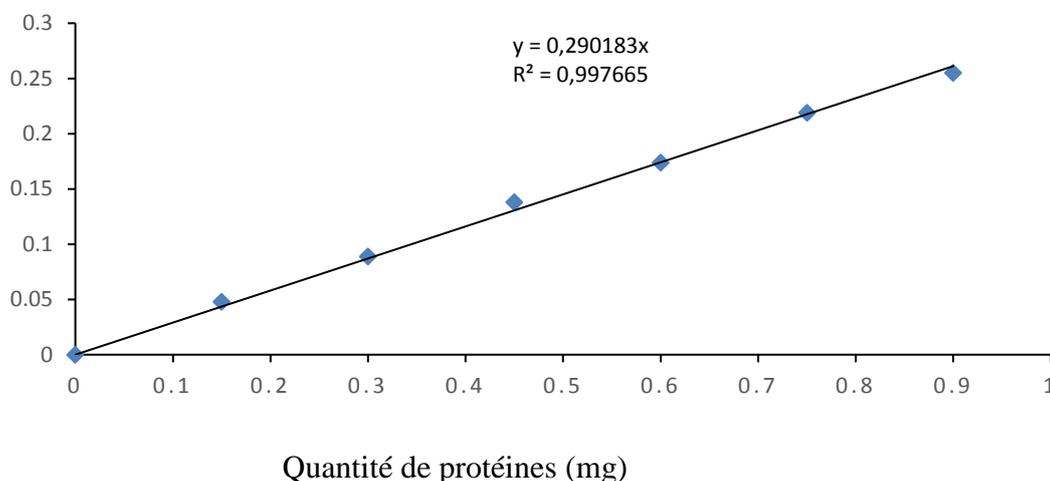
**Tableau X :** Protocole de dosage des transaminases (ASAT et ALAT) hépatiques

| Tubes   | TGO (ASAT)             | TGP (ALAT)                |
|---|------------------------|---------------------------|
| Réactif R1  | 1 mL                   | -                         |
| Réactif R2  | -                      | 1 mL                      |
| <b>Incubé pendant 5 minutes à 37°C</b>                                      |                        |                           |
| Homogénat   | 200 µL                 | 200 µL                    |
| <b>Le mélange a été homogénéisé et incubation à 37°C</b>                    | <b>Pendant 1 heure</b> | <b>Pendant 30 minutes</b> |
| Réactif R3  | 1 mL                   | 1 mL                      |
| <b>Puis homogénéisé et incubé pendant 20 minutes à température ambiante</b> |                        |                           |
| NAOH 0,4 N  | 10 mL                  | 10 mL                     |

Les mélanges ainsi obtenus ont été homogénéisés puis laissés au repos pendant 5 minutes à température ambiante. Les densités optiques ont été lues à 505 nm au spectrophotomètre de marque *URIT-810 bioanalyzer* et les activités de l'ASAT et de l'ALAT déterminées à partir des courbes d'étalonnage (Figure 16).

### II-2-8-2. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales plasmatiques a été effectué par la méthode décrite par Gornall *et al.* (1949). Le principe du dosage et le protocole de réalisation de la courbe d'étalonnage (Figure 17) sont décrits dans la section **II-2-2-3-3**.



**Figure 17** : Courbe d'étalonnage des protéines totales plasmatiques.

### II-2-8-3. Dosage de la bilirubine totale

#### ❖ Principe

La réaction entre la bilirubine et l'acide sulfanilique diazoté conduit à un composé de coloration rouge : l'azobilirubine. En solution aqueuse, seule la bilirubine directe réagit. Pour doser la bilirubine totale, il est donc nécessaire de rompre la liaison entre la bilirubine indirecte et l'albumine. Cette liaison est rompue par ajout de coféine dans le milieu réactionnel. L'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à la concentration en bilirubine.

#### ❖ Mode opératoire

Le dosage de la bilirubine totale a été réalisé suivant le protocole décrit dans le kit *INMESCO* (Allemagne). Les réactifs ont été ajoutés dans les différents tubes (Blanc et tubes tests) suivant le tableau XI ci-dessous.

**Tableau XI : Protocole de dosage de la bilirubine totale**

| Réactifs  | Tube test | Blanc  |
|---|-----------|--------|
| <b>Réactif 1</b> : Acide sulfanilique (25 mmol/L)<br>HCl (100 mmol/L)       | 100 µL    | 100 µL |
| <b>Réactif 2</b> : Nitrite de sodium (3,5 mmol/L)                           | 20 µL     | 20 µL  |
| <b>Réactif 3</b> : Coffeine (460 mmol/L)<br>Benzoate de sodium (400 mmol/L) | 400 µL    | 400 µL |
| <b>Echantillon (plasma)</b>   | 100 µL    | -      |
| <b>Eau distillée</b>  | -         | 100 µL |

Le mélange a été homogénéisé et incubé pendant 5 minutes à température ambiante puis la variation de l'absorbance a été lue au spectrophotomètre *GENESYS 20* à 546 nm contre le blanc. La concentration en bilirubine a été déterminée selon la formule suivante :

$$[\text{Bilirubine totale}] (\mu\text{mol/L}) = \Delta\text{DO échantillon} \times \text{Facteur}$$

$\Delta\text{DO échantillon}$ : variation de l'absorbance de l'échantillon = DO échantillon - DO blanc; Facteur = 154 ( $\mu\text{mol/L}$ ).

#### II-2-8-4. Evaluation de quelques paramètres du stress oxydatif

❖ **Préparation du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,4)** : il a été obtenu en faisant dissoudre 1,21 g de Tris base et 2,79 g de KCl dans 250 mL d'eau distillée, suivi d'un ajustement du pH à l'aide d'un pH-mètre par ajout de HCl 11,8 N. Le volume final a été complété à 500 mL avec de l'eau distillée.

❖ **Préparation des homogénats de foie** : Une masse de foie a été pesée, broyée et homogénéisée à 20 % (masse/volume) avec du tampon Tris-HCl 50 mM à l'aide d'un mortier sur un bac de glace. L'homogénat obtenu a été centrifugé à 3000 tours par minute pendant 25 minutes à 4°C et le surnageant recueilli a été reparti en aliquots et conservé à -70°C pour les différents dosages.

##### II-2-8-4-1. Dosage du malondialdéhyde

###### ❖ Principe

La présence de malondialdéhyde (MDA) dans un échantillon se traduit par la formation en milieu acide et chaud (100°C) d'aldéhyde malonique qui réagit avec l'acide thiobarbiturique pour former un complexe rose. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 530 nm contre un tube blanc. Le dosage de malondialdéhyde a été réalisé suivant le protocole décrit par Wilbur *et al.* (1949).

### ➤ Réactifs

- **Solution d'acide trichloroacétique (TCA) 20 %** : Cette solution a été obtenue en faisant dissoudre 2 g de TCA dans 10 mL d'eau distillée (QSP).

- **Solution d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 %** : Cette solution a été obtenue en faisant dissoudre 0,335 g de TBA dans 50 mL d'eau distillée (QSP).

### ➤ Mode opératoire

Dans les tubes tests ont été introduit 500 µL de l'homogénat et dans le tube blanc 250 µL du tampon Tris-HCl (50 mM, KCl 150 mM, pH 7,4). Dans chaque tube, ont été ensuite ajoutés 250 µL d'acide trichloroacétique 20 % (TCA) et 500 µL d'acide thiobarbiturique 0,67 % (TBA). Les tubes ont été bouchés à l'aide des billes de verre et incubés pendant 10 minutes à 90°C, puis refroidis à l'eau du robinet. Ils ont été centrifugés à 3000 tours/minute pendant 15 minutes à température ambiante. Le surnageant a été pipeté et l'absorbance lue à 530 nm au spectrophotomètre *GENESYS 20* contre le blanc. La quantité de malondialdéhyde a été déterminée à l'aide de la formule suivante :  $DO = \epsilon \cdot C \cdot L$

$$[\text{MDA}](\text{mmol/g de foie}) = \frac{DO \times Vt}{\epsilon \times L \times Vi \times m}$$

**DO** est la densité optique (nm); **Vt** est le volume total de surnageant (mL); **Vi** est le volume utilisé pour le dosage (mL); **m** est la masse de l'organe utilisée (g); **L** est la longueur de la cuve = 1 cm; **ε** est le coefficient d'extinction molaire =  $1,56 \times 10^5 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

### II-2-8-4-2. Dosage de la superoxyde dismutase

Le protocole utilisé est celui décrit par (Gaeta *et al.*, 2002).

#### ❖ Principe

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

#### ❖ Réactifs

- **Solution de tampon carbonate (0,05 M, pH 10,2)**: dans un bécher de 1000 mL, 4,5 g de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3, 10\text{H}_2\text{O}$ ) et 4,2 g de  $\text{NaHCO}_3$  ont été dissous dans 900 mL d'eau distillée. Le pH de la solution obtenue a été ajusté à 10,2 par ajout d'une solution de soude, puis le volume a été complété à 1000 mL avec de l'eau distillée ;

- **Solution d'adrénaline (0,3 mM)**: 6 mg d'adrénaline ont été dissous dans 100 mL d'eau distillée. La solution a été conservée à l'abri de la lumière.

#### ❖ Mode opératoire

Dans une cuve à spectrophotomètre ont été introduits 134 µL d'homogénat d'organe pour l'essai et 1666 µL de tampon carbonate pour la cuve témoin. Après avoir calibré le spectrophotomètre, la réaction a été déclenchée en ajoutant 200 µL d'adrénaline (0,3 mM) dans chaque tube. Le mélange a été homogénéisé par inversion rapide de la cuve. La densité optique à 480 nm a été notée après 20 et 80 secondes. L'activité spécifique de la SOD est définie en unité de SOD nécessaire pour causer une inhibition de 50 % de l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome pendant une minute.

#### ❖ Détermination de l'activité de la SOD

- La variation de la DO :  $\Delta DO (\text{min}) = DO_{20s} - DO_{80s}$

- Pourcentage d'inhibition =  $(\Delta DO_{\text{blanc}} - \Delta DO_{\text{essai}}) / \Delta DO_{\text{blanc}} \times 100 = 100 - (1 - \Delta DO_{\text{essai}} / \Delta DO_{\text{blanc}})$

50 % d'inhibition de SOD correspond à 1 unité de SOD

X % d'inhibition correspond à N unités

L'activité spécifique de la SOD (unité de SOD/g de foie) est égale au nombre d'unité de SOD/g de foie.

#### II-2-8-4-3. Dosage de la catalase

Le dosage de la catalase a été réalisé suivant le protocole décrit par (Sinha, 1972).

#### ❖ Principe

Le peroxyde d'hydrogène est rompu en présence de la catalase. Le résidu (peroxyde) se lie au dichromate de potassium pour former un précipité bleu vert d'acide perchlorique instable qui va être décomposé par la chaleur et former un complexe vert.

#### ➤ Réactifs

- **Solution de peroxyde d'hydrogène 50 mm** : pour obtenir cette solution, 243 µL de peroxyde d'hydrogène 35 % ont été dilués dans 50 mL d'eau distillée ;
- **Solution de dichromate de potassium 5 %/acide acétique glacial** : La solution de dichromate de potassium 5 % a été obtenue en dissolvant 2,5 g de dichromate de potassium dans 50 mL d'eau distillée. La solution de dichromate/acide acétique glacial a été obtenue en mélangeant 50 mL de solution de dichromate de potassium 5 % et 150 mL d'acide acétique glacial pur ;
- **Tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,5)**: deux solutions ont été initialement préparées. Pour cela, 8,9 g de phosphate disodique hydraté ont été dissous dans 500 mL d'eau distillée et 6,5 g de phosphate monosodique hydraté ont été dissous dans 500 mL d'eau distillée.

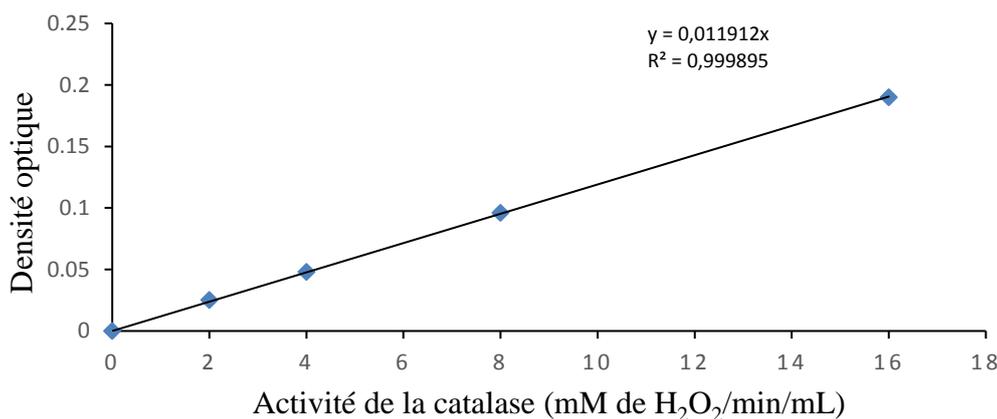
A 500 mL de la solution de phosphate disodique hydraté ont été ajoutés 70 mL de la solution de phosphate monosodique hydraté, puis goutte à goutte 30 mL de la même solution, ce qui a donné un volume final d'environ 600 mL de tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,5).

➤ **Mode opératoire**

Les différents réactifs ont été mélangés selon la procédure indiquée dans le tableau XII et les densités ont été lues au spectrophotomètre *HACH DR 3900* à 570 nm. Le modèle d'une courbe de régression linéaire du logiciel *EXCEL* a été utilisé pour l'obtention de la courbe d'étalonnage (Figure 18).

**Tableau XII** : Protocole de réalisation de la courbe d'étalonnage de la catalase

| N° tubes  | 1    | 2   | 3   | 4   | 5   |
|---|------|-----|-----|-----|-----|
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50mM) (µL)</b>   | 0    | 20  | 40  | 80  | 160 |
| <b>Solution de dichromate de potassium/acide acétique glacial (mL)</b>  | 2    | 2   | 2   | 2   | 2   |
| <b>Après formation du précipité bleu, les solutions ont été chauffées jusqu'à ébullition pendant 10 minutes (apparition de la couleur verte) et refroidis à température ambiante.</b> |      |     |     |     |     |
| <b>Eau distillée (µL)</b>   | 1000 | 980 | 960 | 920 | 840 |
| <b>Activité catalase (mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mL)</b>  | 0    | 2   | 4   | 8   | 16  |



**Figure 18** : Courbe d'étalonnage de la catalase.

Dans les tubes tests ont été introduits 12,5 µL de l'homogénat et 187,5 µL de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,5). Le chronomètre a été ensuite déclenché après ajout de 50 µL de

peroxyde d'hydrogène (50 mM). Après une minute, la réaction a été arrêtée par ajout de 500 µL de solution de dichromate de potassium/acide acétique. Les solutions ont été chauffées à 100° C pendant 10 minutes et après refroidissement, la densité optique a été lue au spectrophotomètre *HACH DR 3900* à 570 nm contre le blanc. La quantité de peroxyde d'hydrogène restant dans la solution après ajout de la solution de dichromate de potassium/acide acétique glacial a été évaluée en utilisant la courbe d'étalonnage. L'activité spécifique de la catalase a été déterminée puis exprimée en mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/g de foie d'après la formule suivante :

$$\text{Activité catalase} = \frac{(\text{DO Blanc} - \text{DO Ech}) \times f}{a \times t \times \text{mi}}$$

**DO Ech** : densité optique de l'échantillon ; **f**: facteur de dilution; **a**: coefficient de la droite d'équation de la courbe d'étalonnage (a = 0,011912); **t**: temps de réaction (t = 1 minute); **mi** (g): masse de foie correspondant au volume de dosage.

#### II-2-8-4-4. Dosage du glutathion réduit

Le dosage du glutathion réduit a été réalisé suivant le protocole de (Ellman, 1959).

##### ➤ Principe

L'acide 2,2-dithio-5,5'-dinitrobenzoïque (DTNB) réagit avec les groupements -SH du glutathion présent dans l'homogénat pour donner un complexe de couleur jaune.

##### ❖ Réactifs

➤ **Tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5)**: une masse de 8,9 g de phosphate disodique hydraté (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O) a été dissoute dans 500 mL d'eau distillée et 6,5 g de phosphate monosodique hydraté (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O) ont aussi été dissous dans 500 mL d'eau distillée. A 500 mL de la solution de phosphate monosodique hydraté obtenue ont été ajoutés 200 mL de la solution de phosphate disodique, puis goutte à goutte 80 mL de la même solution jusqu'à obtention d'un volume final d'environ 780 mL de tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5);

➤ **Réactif d'Ellman** : il a été obtenu en dissolvant 5 mg de DTNB (L'acide 2,2-dithio-5,5'-dinitrobenzoïque) dans 250 mL du tampon phosphate (0,1 M; pH 6,5).

##### ❖ Mode opératoire

Un volume de 1500 µL du réactif d'Ellman a été introduit dans des tubes contenant préalablement 100 µL d'homogénat (tube test) ou 100 µL de tampon tris-HCl (tube témoin) puis les mélanges ont été incubés pendant 1 heure à température ambiante et l'absorbance a été lue au spectrophotomètre *HACH DR 3900* à 412 nm contre le blanc. La quantité de glutathion cellulaire a été déterminée à l'aide de la formule suivante.

$$[\text{GSH}](\text{mol/g de foie}) = \frac{\text{DO} \times \text{Vt}}{\epsilon \times \text{L} \times \text{Vi} \times \text{m}}$$

**DO** est la densité optique (nm); **Vt** est le volume total de surnageant (mL); **Vi** est le volume utilisé pour le dosage (mL); **m** est la masse de l'organe utilisée (g); **L** est la longueur de la cuve = 1 cm;  $\epsilon$  est le coefficient d'extinction molaire =  $13600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### II-2-8-4-5. Dosages des Nitrites

Le dosage des nitrites s'est fait suivant le protocole décrit par Hibbs *et al.* (1988).

##### ➤ Principe

En présence de l' amino-4-benzène sulfonamide (sulfanilamide) et de dichlorure de N-(naphthyl-1)-diamino-1,2-éthane ou N-1-naphtyléthylène diamine (NED) en milieu acide, les nitrites subissent la réaction de diazotation. La coloration du produit obtenu est proportionnelle à la quantité de nitrites présents dans l'échantillon.

##### ❖ Réactifs

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

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

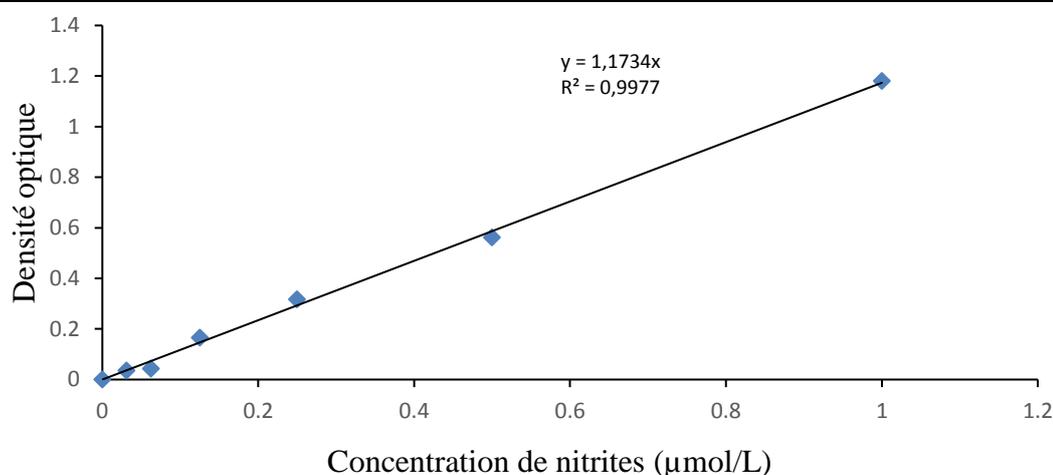
➤ **Solution standard de nitrite de sodium (1 mM)**: une masse de 0,69 g de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) a été dissoute dans 10 mL d'eau distillée.

##### ❖ Mode opératoire

Les réactifs ont été ajoutés dans les différents tubes suivant la procédure décrite dans le tableau XIII. Ces tubes ont ensuite été incubés à l'abri de la lumière pendant 10 minutes et les densités optiques ont été lues contre le blanc au spectrophotomètre *HACH DR 3900* à 560 nm. Le modèle d'une courbe de régression linéaire du logiciel *EXCEL* a été utilisé pour l'obtention de la courbe d'étalonnage (Figure 19). La concentration de nitrites a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de  $\text{NaNO}_2$ .

**Tableau XIII : Protocole de dosage des nitrites**

| N° tube   | 0            | 1      | 2   | 3              | 4   | 5   | 6                   | X1.....Xn |     |
|---|--------------|--------|-----|----------------|-----|-----|---------------------|-----------|-----|
|   | <b>Blanc</b> |        |     | <b>Étalons</b> |     |     | <b>Echantillons</b> |           |     |
| <b>Concentration de NaNO<sub>2</sub> (µmol)</b> | 0            | 0,0312 | 0,0 | 0,             | 0,  | 0,5 | 1                   | -         | -   |
|   |              |        | 625 | 125            | 250 |     |                     |           |     |
| <b>Volume de NaNO<sub>2</sub> (µL)</b>          | 100          | 100    | 100 | 100            | 100 | 100 | 100                 | -         | -   |
| <b>Echantillon (µL)</b>                         | -            | -      | -   | -              | -   | -   | -                   | 100       | 100 |
| <b>Eau distillée (µL)</b>                       | 400          | 400    | 400 | 400            | 400 | 400 | 400                 | 400       | 400 |
| <b>Réactif de Griess (µL)</b>                   | 500          | 500    | 500 | 500            | 500 | 500 | 500                 | 500       | 500 |



**Figure 19 : Courbe d'étalonnage des nitrites.**

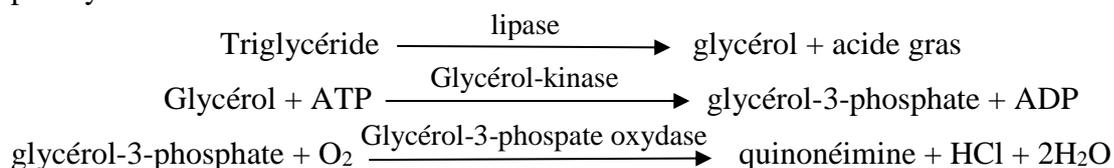
### II-2-8-5. Evaluation du profil lipidique

Le profil lipidique (triglycérides, cholestérol total) a été évalué par colorimétrie grâce aux kits Fortress.

#### II-2-8-5-1. Dosage des triglycérides

##### ❖ Principe

Sous l'action des lipases, les triglycérides sont hydrolysés en glycérol. Le glycérol sera ensuite transformé en peroxyde d'hydrogène sous l'action successive de la glycérol kinase et de la glycérol-3-phosphate oxydase. La quinonéimine sert d'indicateur qui se forme par action de peroxyde d'hydrogène-4-aminoantipyrine et 4-chlorophénol sous l'action catalytique de la peroxydase.



### ❖ Mode opératoire

Les différents tubes ont été constitués comme l'indique le tableau XIV. Le taux de triglycéride a été déterminé à l'aide du kit Fortress.

**Tableau XIV : Protocole de dosage de triglycéride**

|                     | <b>Blanc de réactif</b> | <b>Standard</b> | <b>Echantillon</b> |
|---------------------|-------------------------|-----------------|--------------------|
| <b>Etalon (µL)</b>  | 0                       | 10              | 0                  |
| <b>Sérum (µL)</b>   | 0                       | 0               | 10                 |
| <b>Réactif (µL)</b> | 1000                    | 1000            | 1000               |

Les différents tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 10 minutes à 25°C et l'absorbance a été lue à 500 nm contre le blanc au bout de 60 minutes. La concentration de triglycéride a été déterminée dans les tubes échantillons suivant la formule ci-après :

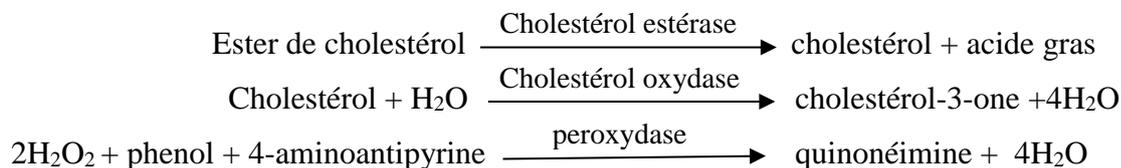
**Concentration triglycéride (mg/dL) =  $\Delta$ Abs échantillon/ $\Delta$ Abs standard x concentration standard**

Avec concentration standard = 200 mg/dL

### II-2-8-5-2. Dosage cholestérol total

#### ❖ Principe

Sous l'action de la cholestérol-estérase, le cholestérol estérifié est transformé en cholestérol ou en acide gras. L'oxydation du cholestérol en présence du cholestérol-oxydase produit le cholestérol-3-one et du peroxyde d'hydrogène. La quinonéimine sert d'indicateur qui se forme sous l'action de peroxyde d'hydrogène, de 4-aminoantipyrine et de phénol sous l'action catalytique de la peroxydase.



#### ❖ Mode opératoire

Les tubes (blanc, standard et échantillon) ont été préparés comme indiqué dans le tableau XV suivant la procédure du kit (Fortress).

**Tableau XV : Protocole de dosage de cholestérol total**

|                           | <b>Blanc de réactif</b> | <b>Standard</b> | <b>Echantillon</b> |
|---------------------------|-------------------------|-----------------|--------------------|
| <b>Eau distillée (µL)</b> | 10                      | 0               | 0                  |
| <b>Etalon (µL)</b>        | 0                       | 10              | 0                  |
| <b>Sérum (µL)</b>         | 0                       | 0               | 10                 |
| <b>Réactif (µL)</b>       | 1000                    | 1000            | 1000               |

Les tubes ont été agités à l'aide d'un vortex, puis incubés à 25°C pendant 10 minutes. Les densités optiques ont été lues au spectrophotomètre à 500 nm après 60 minutes. La concentration du cholestérol total a été déterminé par la relation suivante;

**Concentration cholestérol total (mg/dL) =  $\Delta$ Abs échantillon /  $\Delta$ Abs standard x concentration standard**

Avec concentration standard = 2 g/L

#### **II-2-9. Analyses statistiques**

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  ESM.

Pour les analyses *in vitro*, la concentration qui induit 50 % de mortalité (CI<sub>50</sub>) a été déterminée à partir des courbes concentration-réponse réalisée à partir des logiciels Trimmed Spearman-Karber (TSK) version 1.5 (US Environmental Protection agency) et GraphPad Prism 8.02 (San Diego, CA, USA). Les analyses d'interaction entre les différents groupes aux différentes concentrations ont été effectuées par l'analyse des variances « two way » pour l'activité anticercarienne et « One way » pour l'activité schistosomicide.

Les résultats des tests *in vivo* sur la schistosomiase à *Schistosoma mansoni* et la toxicité ont été traités par l'analyse des variances ANOVA « One way » suivit du post test de Turkey, utilisé pour comparer les différents groupes grâce au logiciel GraphPad Prism 8.02 (San Diego, CA, USA).

Pour toutes les analyses, la différence était considérée significative pour un  $p < 0,05$ .

# **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

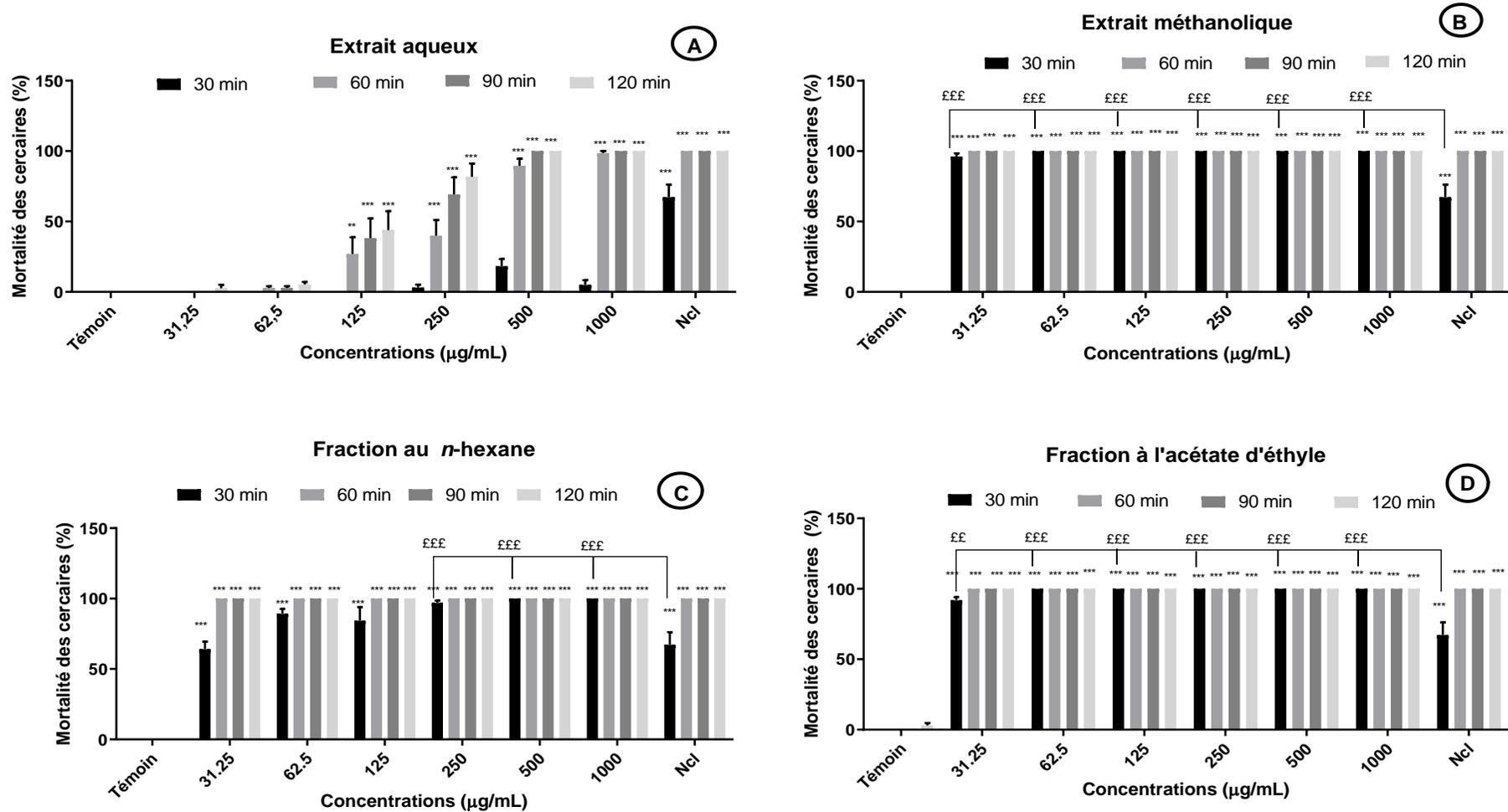
### III-1. Résultats

#### III-1-1. Activité *in vitro* des extraits aqueux et méthanolique et des fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* contre les stades de schistosomes

Cette étude a porté sur l'évaluation de l'effet antischistosomal de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique et des fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur les cercaires et vers adultes de *Schistosoma mansoni*. La mortalité et l'activité motrice des cercaires et des vers adultes ont été observées lors de l'incubation *in vitro* avec diverses concentrations des extraits et des fractions des racines de *Ozoroa pulcherrima*.

##### III-1-1-1. Effets du traitement aux extraits aqueux et méthanolique ou aux fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur la viabilité des cercaires

L'effet de l'incubation avec les différentes concentrations des extraits et fractions de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur la viabilité des cercaires pendant 2 heures est présenté dans la figure 20. L'activité anti-cercarienne de *O. pulcherrima* est à la fois concentration et temps dépendants. L'incubation de l'extrait méthanolique et ses fractions aux différentes concentrations (31,25; 62,5; 125; 250; 500 et 1000 µg/mL) a entraîné une mortalité significative durant les 30 premières minutes. De même, durant ces 30 minutes, 100 % de mortalité a été enregistrée aux fortes concentrations (500 et 1000 µg/mL). Par ailleurs, après une heure d'incubation avec l'extrait méthanolique et ses fractions, 100 % de mortalité a été enregistrée. Par contre, l'extrait aqueux était moins efficace. L'incubation avec l'extrait aqueux à la concentration de 31,25 µg/mL après 90 minutes n'a entraîné aucune mortalité des cercaires qui présentaient encore des mouvements normaux. Cependant, durant ces 90 minutes et aux fortes concentrations (500 et 1000 µg/mL), 100 % de mortalité a été enregistrée. Les valeurs de la concentration létale 50 (CL<sub>50</sub>) ont été déterminées après 30 min d'exposition des cercaires aux extraits et fractions des racines de *Ozoroa pulcherrima*. L'extrait méthanolique est l'extrait le plus actif avec une CL<sub>50</sub> de 20,65 µg/mL, suivi de la fraction à l'acétate d'éthyle (CL<sub>50</sub>= 23,46 µg/mL), la fraction au *n*-hexane (CL<sub>50</sub>= 28,40 µg/mL) et de l'extrait aqueux.



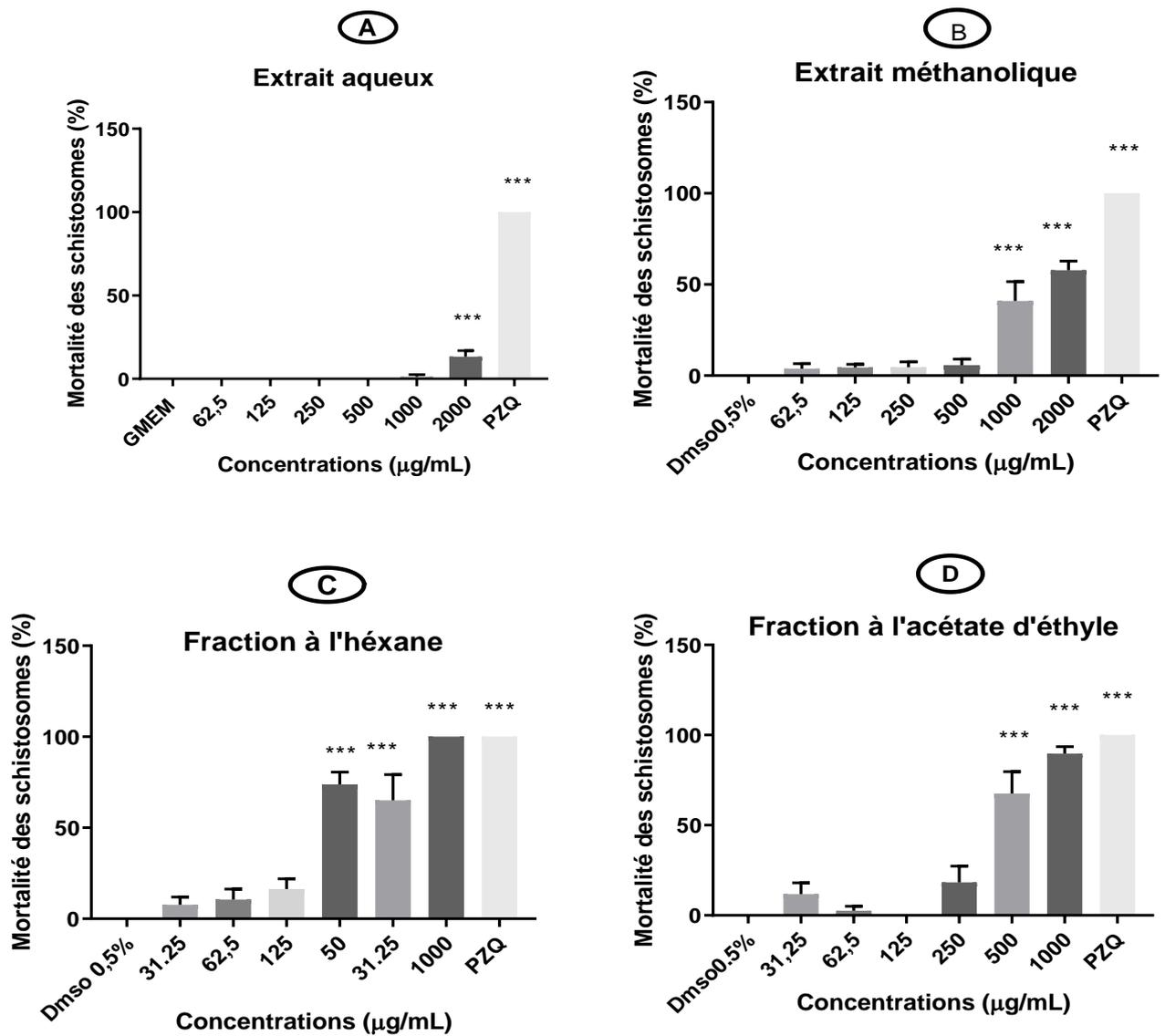
**Figure 20 :** Effets *in vitro* des extraits aqueux et méthanolique et des fractions de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur la viabilité des cercaires de *Schistosoma mansoni* après 2 heures d'incubation.

Les valeurs sont significativement différentes par rapport aux contrôles (eau distillée ou DMSO 0,5%) \*\*\* $p < 0,001$  et au Niclosamide olamine 5% à \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$  respectivement Ncl : Niclosamide Olamine 5 %

### III-1-1-2. Effets du traitement aux extraits aqueux et méthanolique ou des fractions de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur la viabilité des schistosomes adultes après 24 et 48 heures d'incubation

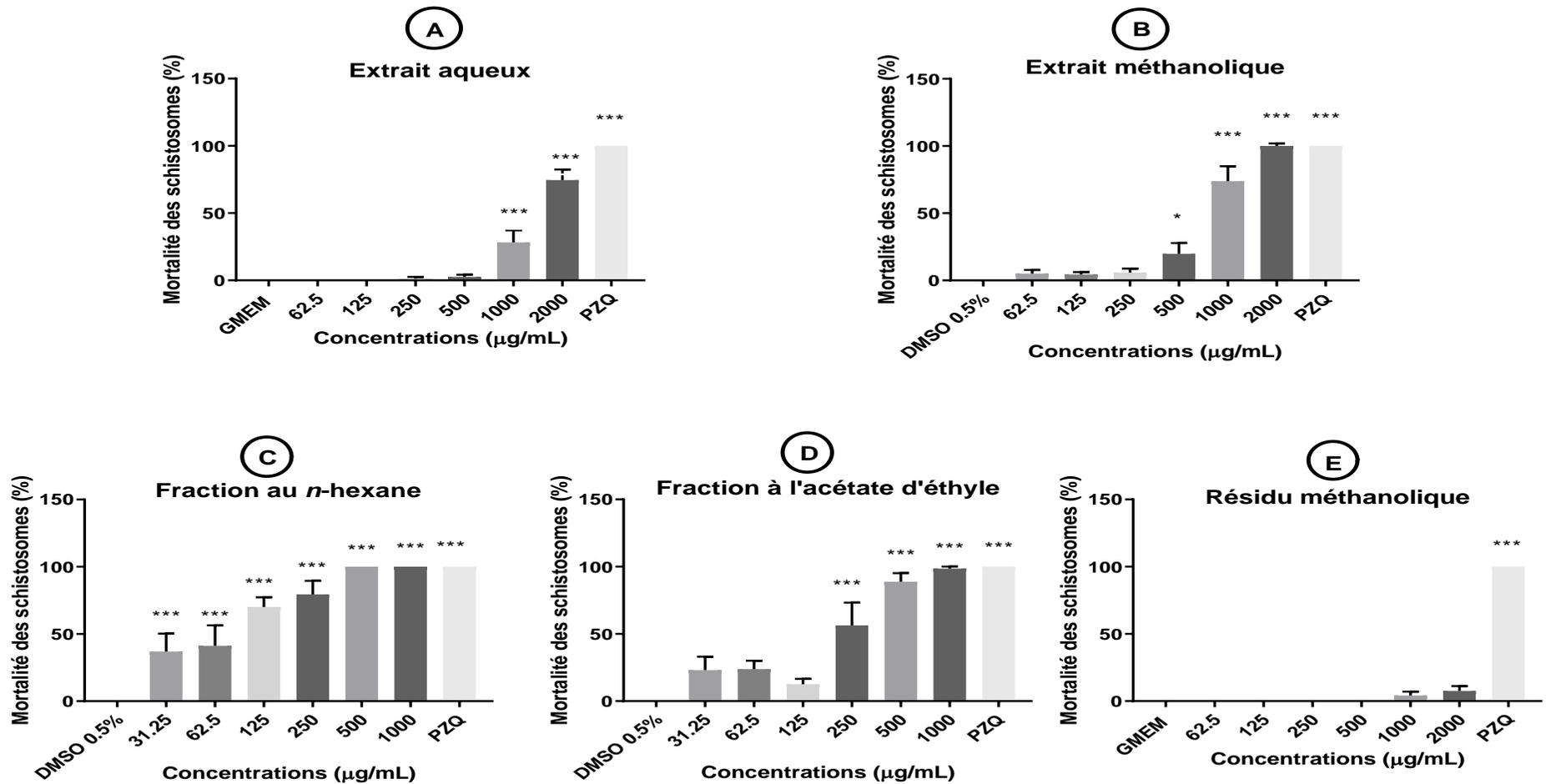
L'effet antischistosomal des extraits aqueux et méthanolique ou des fractions de l'extrait méthanolique sur la viabilité des vers adultes en fonction de la concentration suivant le temps d'incubation (24 et 48 heures) est représenté sur les figures 21 et 22. Après incubation avec les extraits aqueux et méthanolique ou des fractions de l'extrait méthanolique, une augmentation concentration-dépendante du taux de mortalité des vers adultes de schistosome a été enregistrée. Après 24 heures d'incubation, 100 % de mortalité a été obtenue à la concentration 1000 µg/mL de la fraction au *n*-hexane. Toutefois, à la concentration 2000 µg/mL, le taux de mortalité était de 13,3 % et 57,81 % pour les extraits aqueux et méthanolique respectivement et de 89,72 % pour les vers incubés dans la fraction à l'acétate d'éthyle à la concentration de 1000 µg/mL. Cependant aucune mortalité n'a été enregistrée après incubation dans le résidu méthanolique à la concentration 2000 µg/mL. Par ailleurs, après 48 heures d'incubation, la létalité maximale (100 % mortalité) a été observée aux concentrations de 2000 µg/mL de l'extrait méthanolique, de 1000 µg/mL de la fraction à l'acétate d'éthyle et à 500 µg/mL de la fraction au *n*-hexane. A la concentration 2000 µg/mL, le taux de mortalité était de 74,54 % et 7,5 % pour l'extrait aqueux et le résidu méthanolique respectivement. En outre, à la concentration de 1000 µg/mL, 98,61 % de mortalité a été observée après incubation dans la fraction à l'acétate d'éthyle. Par contre, les essais réalisés avec les groupes témoins où les puits ne renfermaient que soit le milieu de culture GMEM uniquement, soit du GMEM + DMSO 0,5 %, tous les vers sont restés en vie pendant 48 heures. Par contre le traitement des vers adultes au praziquantel à 10 µg/mL a entraîné une mortalité de 100 % après 24 heures d'incubation.

L'évaluation de la concentration létale 50 (CL<sub>50</sub>) de chaque substance (l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique et ses différentes fractions) a été réalisée à l'aide de la méthode non paramétrique de Spearman-Kärber et il ressort que la fraction au *n*-hexane de l'extrait méthanolique possède la plus grande activité avec une CL<sub>50</sub> de 79,54 µg/mL (65,58 – 96,47 µg/mL) tandis que la plus faible activité antischistosomale revenait au résidu méthanolique avec une CL<sub>50</sub> très élevée que le logiciel n'a pas pu estimer après 48 h d'incubation. Les résultats obtenus ont permis d'établir un classement des différentes substances par ordre décroissant d'activité schistosomicide. Ledit classement est le suivant : fraction au *n*-hexane > fraction à l'acétate d'éthyle > extrait méthanolique > extrait aqueux > résidu méthanolique (Tableau XVI).



**Figure 21 :** Effets *in vitro* des extraits aqueux et méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* et des différentes fractions de l'extrait méthanolique sur la viabilité des schistosomes de *Schistosoma mansoni* après 24 heures d'incubation.

Les valeurs sont significativement différentes par rapport aux témoins (milieu de culture ou milieu de culture + DMSO 0,5%) à  $***p < 0,001$  ; PZQ = Praziquantel ; GMEME= Glasgow minimum Essential Medium



**Figure 22 :** Effets *in vitro* des extraits aqueux et méthanolique et des fractions de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur la viabilité des schistosomes de *Schistosoma mansoni* après 48 heures d'incubation.

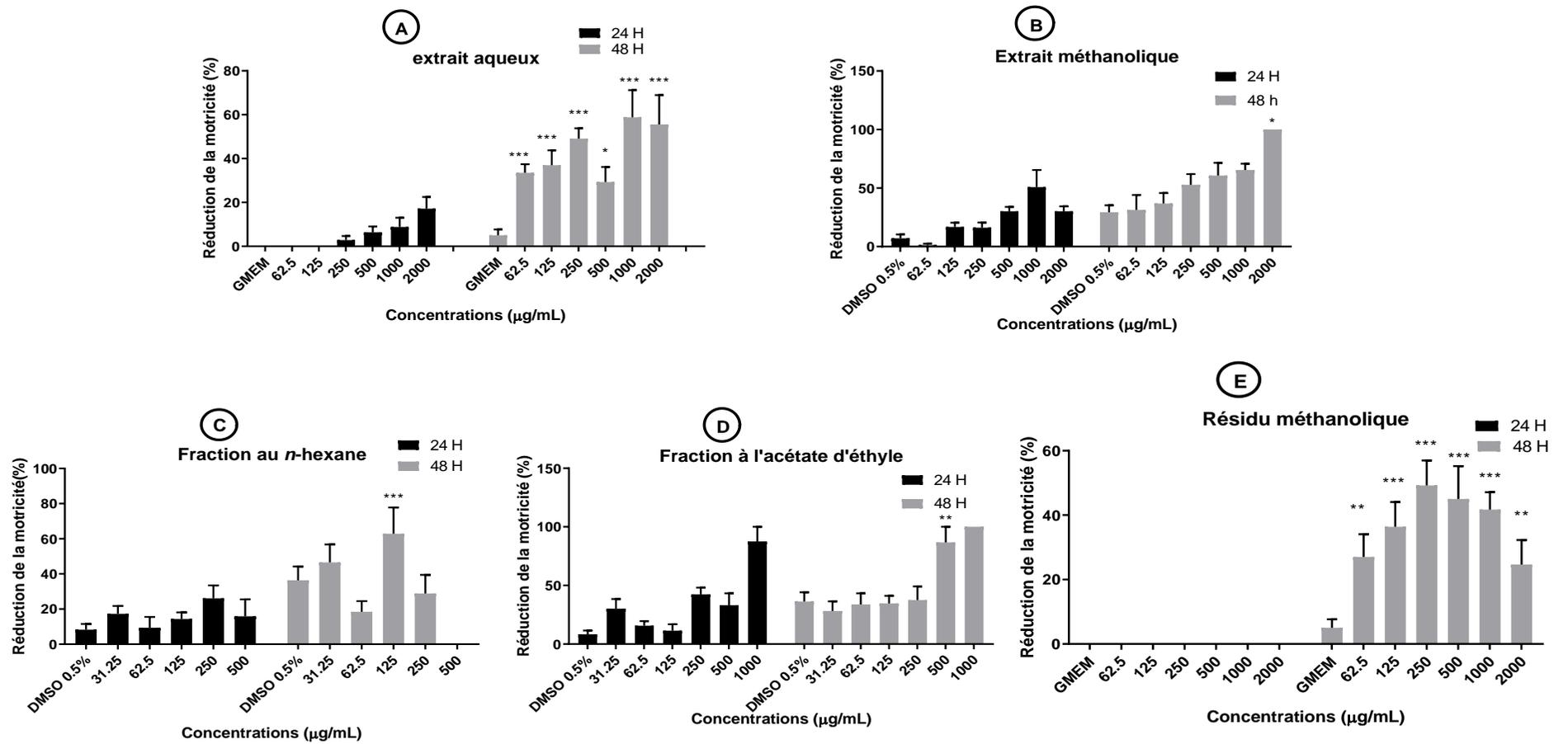
Les valeurs sont significativement différentes par rapport aux témoins (milieu de culture ou milieu de culture + DMSO 0,5%) à \* $p < 0,05$  et \*\*\* $p < 0,001$  respectivement ; PZQ = Praziquantel ; GMEM = Glasgow minimum essential Medium

**Tableau XVI:** Concentrations létales 50 (CL<sub>50</sub>) des extraits aqueux et méthanolique et fractions de l'extrait méthanolique de *Ozorioa pulcherrima* après 48 heures d'incubation

| <i>Ozorioa pulcherrima</i>    | CL <sub>50</sub><br>(µg/mL) | 95% limite inférieure<br>(µg/mL) | 95 % limite supérieure<br>(µg/mL) |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Extrait aqueux                | 1363,26                     | 1120,39                          | 1658,77                           |
| Extrait méthanolique          | 773,25                      | 697,51                           | 897,27                            |
| Fraction à l'acétate d'éthyle | 235,16                      | 205,39                           | 268,85                            |
| Fraction à l'hexane           | 79,54                       | 65,58                            | 94,47                             |

### III-1-1-3. Effets des extraits aqueux et méthanolique et des fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *Ozorioa pulcherrima* sur l'activité motrice des schistosomes adultes

L'absence de l'activité motrice des vers adultes de schistosomes est marquée par des faibles mouvements des ventouses et des mouvements sporadiques du corps. Après 24 heures d'incubation, les schistosomes présentaient une faible réduction de l'activité motrice et une motilité réduite après 48 heures d'exposition aux différentes substances. Aux concentrations 2000 µg/mL de l'extrait méthanolique et 1000 µg/mL de la fraction à l'acétate d'éthyle, une réduction de l'activité motrice de 100 % a été enregistrée chez les vers survivants après 48 heures d'incubation. Toutefois, l'incubation des vers dans l'extrait aqueux aux concentrations de 62,5 ; 125; 250; 500; 1000 et 2000 µg/mL après 48 heures a entraîné chez les survivants une baisse de l'activité motrice de 33,47; 36,98; 49,13; 29,31; 58,56 et de 55,56 % respectivement. Le pourcentage de diminution de l'activité motrice chez les vers survivants incubés dans l'extrait méthanolique aux concentrations 62,5; 125; 250; 500; 1000 et 2000 µg/mL était de 31,31; 36,76; 52,87; 60,74; 65,42 et de 100 % respectivement. Par ailleurs l'incubation des vers dans la fraction à l'acétate d'éthyle aux concentrations 31,25 ; 62,5 ; 125 ; 250 ; 500 et 1000 µg/mL a entraîné une réduction de l'activité motrice de 28,23 ; 33,79 ; 34,66 ; 37,5 et de 66,67 % respectivement. Lorsqu'ils étaient incubés dans la fraction au *n*-hexane aux concentrations de 31,25 ; 62,5 ; 125 et de 250 µg/mL, le pourcentage de réduction de l'activité chez les vers survivants variat de 18,47 à 88,9 % respectivement. Par contre les vers adultes de *Schistosoma mansoni* incubés dans le milieu de culture GMEM uniquement et GMEM + 0,5 % DMSO demeuraient mobiles. Cependant de très faibles réductions de l'activité motrice ont été observées chez certains vers durant les 48 heures d'incubation (**Figure 23**).



**Figure 23 :** Effets *in vitro* des extraits aqueux et méthanolique et des fractions de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur la motricité des schistosomes de *Schistosoma mansoni* après vingt-quatre et quarante huit heures d'incubation.

Les valeurs sont significativement différentes par rapport aux contrôles (milieu de culture ou milieu de culture + DMSO 0,5%) à \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  respectivement.

### **III-1-2. Effets des extraits aqueux et méthanolique et de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur l'infection à *Schistosoma mansoni* chez la souris**

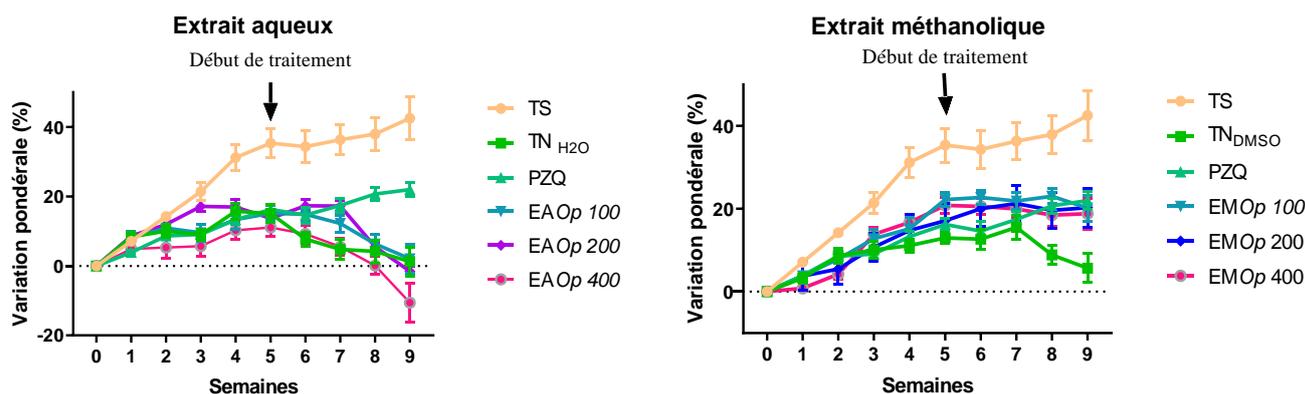
*Ozoroa pulcherrima* est une plante dont les propriétés antihelminthique et anti-inflammatoire justifierait l'usage en médecine traditionnelle. Cependant, l'extrait aqueux utilisé usuellement en médecine traditionnelle s'est révélé moins efficace que l'extrait méthanolique et ses fractions pour les tests *in vitro*. Ceci suggère que les composés peu polaires ou apolaires de *Ozoroa pulcherrima* auraient des meilleures activités antischistosomales, anti-inflammatoires et antioxydantes. Nous nous sommes proposés ainsi de concentrer un peu plus les molécules bioactives en utilisant l'extrait méthanolique et sa fraction à l'acétate d'éthyle pour les tests *in vivo* chez la souris.

#### **III-1-2-1. Effets du traitement à l'extrait aqueux ou à l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur l'infection à *Schistosoma mansoni* chez la souris**

##### **III-1-2-1-1. Effets du traitement à l'extrait aqueux ou à l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur l'évolution pondérale**

Après l'infestation, les souris ont été réparties par groupes et le poids corporel de chaque souris était évalué chaque semaine. Les variations pondérales des animaux des différents groupes sont présentées sur la figure 24. Il en ressort qu'à la 4<sup>ème</sup> semaine post-infestation, une différence significative ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ ) du poids corporel entre les souris des groupes infestés (TN, PZQ et essais) et celui du groupe témoin sain a été enregistrée. A partir de la 8<sup>ème</sup> semaine post-infestation, une perte significative du poids corporel a été observée chez les témoins négatifs comparativement aux témoins sains. Après traitement des souris infestées à l'extrait aqueux de *O. pulcherrima*, aucune différence significative de l'évolution pondérale n'a été notée entre les souris du groupe témoin sain et celles traitées au praziquantel ou à l'extrait aqueux de la 1<sup>ère</sup> à la 4<sup>ème</sup> semaine post-infestation. A partir de la 5<sup>ème</sup> semaine post-infestation, des différences significativement ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ ) du poids corporel ont été observées chez les souris infestées et non traitées, tout comme chez les souris infestées et traitées à l'extrait aqueux aux différentes doses comparativement au témoin sain (Figure 24 A).

Cependant, l'administration de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* ou du praziquantel a significativement empêché cette perte de poids corporel chez ces animaux traités comparés aux témoins négatifs (Figure 24 B).



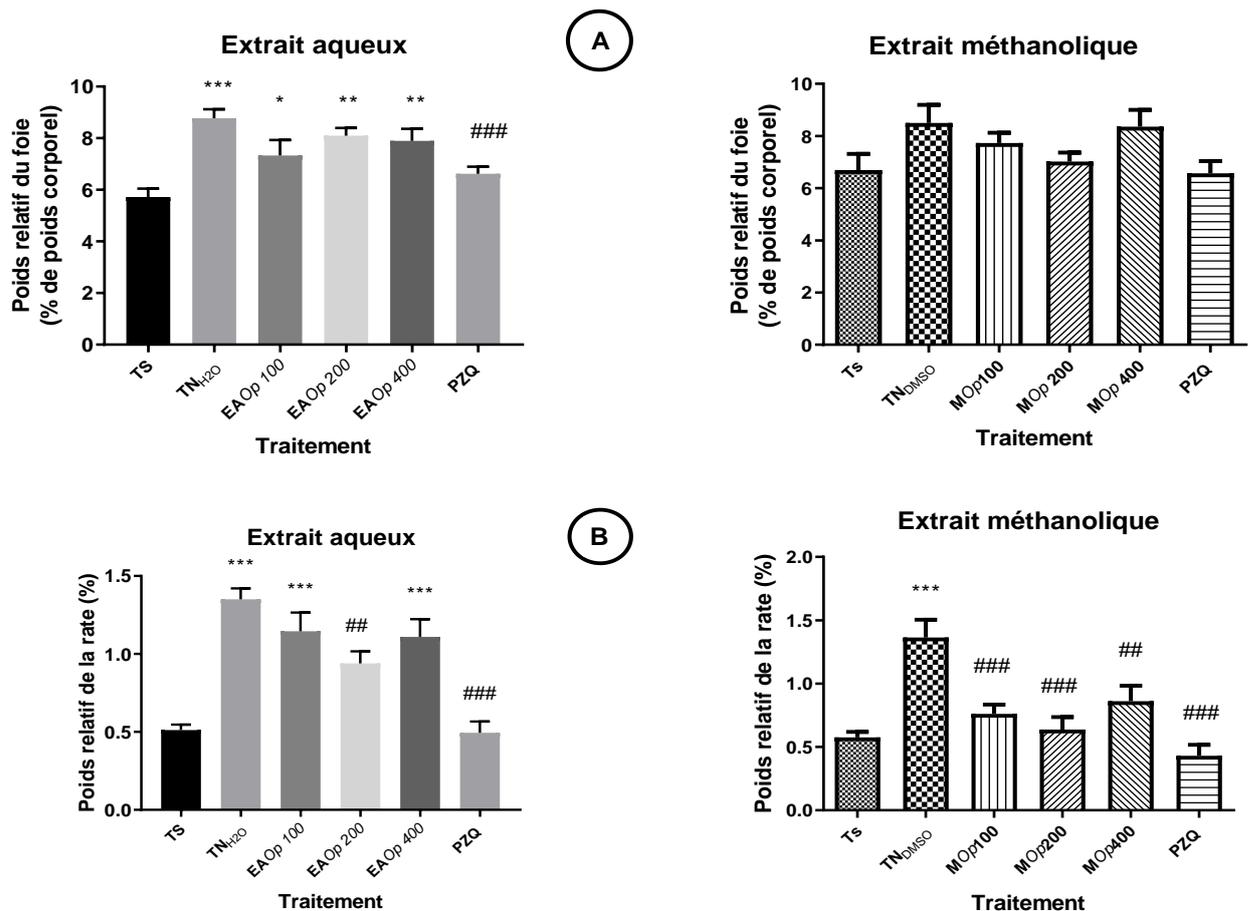
**Figure 24 :** Effets des extraits aqueux (A) et méthanolique (B) de *Ozoroa pulcherrima* sur l'évolution pondérale.

Chaque point représente le pourcentage du poids moyen  $\pm$  ESM ; n=6 à 10 TS (témoin sain) : souris saines; TN (témoin négatif) : souris infestées et recevant le DMSO 1% (TN<sub>DMSO</sub>) ou l'eau distillée (TN<sub>H2O</sub>) ; PZQ (témoin positif) : souris infestées et traitées au praziquantel; EAOp100, EAOp200 et EAOp400 souris infestées et traitées à l'extrait aqueux et EMOp100 EMOp200 et EMOp400 (groupes essais) : souris infestées et traitées à l'extrait au MeOH des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses 100 mg/kg, 200 mg/kg et 400 mg/kg respectivement.

### III-1-2-1-2. Effets du traitement à l'extrait aqueux ou à l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur le poids relatif du foie et de la rate

L'infestation à *S. mansoni* a entraîné une augmentation non significative du poids relatif du foie chez les souris témoins négatifs DMSO et une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) chez les souris témoins négatifs H<sub>2</sub>O comparées aux témoins sains. Comparativement au poids relatif du foie des souris des groupes témoins négatifs, aucune différence significative n'a été enregistrée avec les souris traitées à l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique aux différentes doses. L'administration du praziquantel a entraîné une réduction significative ( $p < 0,01$ ) du poids relatif du foie comparativement au groupe témoin négatif H<sub>2</sub>O de 23,29 % (Figure 25 A).

L'infestation à *S. mansoni* a entraîné une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) du poids relatif de la rate chez les animaux parasités et non traités comparés aux témoins sains. Cependant une normalisation ( $p < 0,001$ ) du poids relatif de la rate de 44,12 %, 52,94 %, 36,76 % et de 68,38 % a été observée chez les animaux ayant reçus l'extrait méthanolique des racines de *O. pulcherrima* aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg ou du praziquantel respectivement comparativement au témoins négatif (TN<sub>DMSO</sub>). Par ailleurs, le traitement à l'extrait aqueux de *O. pulcherrima* à la dose 200 mg/kg a entraîné une réduction significative ( $p < 0,01$ ) du poids relatif de la rate de 34,31% comparativement au témoin négatif H<sub>2</sub>O (TN<sub>H2O</sub>) (Figure 25 B).



**Figure 25 :** Effets du traitement à l'extrait aqueux ou à l'extrait méthanolique de *Ozoroo pulcherrima* sur le poids relatif du foie (A) et de la rate (B).

Les histogrammes sont des moyennes  $\pm$  ESM; n=6 à 10 ; \*\*p<0,01 , \*\*\*p<0,001 : différence significative par rapport au groupe témoin sain et # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 : différences significatives par rapport aux groupes témoins négatifs (TN<sub>H2O</sub>) et (TN<sub>DMSO</sub>). TS (témoin sain) : souris saines ; TN (témoin négatif) : souris infestées et recevant le DMSO 1% (TN<sub>DMSO</sub>) ou l'eau distillée (TN<sub>H2O</sub>) ; PZQ (témoin positif) : souris infestées et traitées au praziquantel; EAOp100; EAOp200 et EAOp400 souris infestées et traitées à l'extrait aqueux et EMOp100; EMOp200 et EMOp400 (groupes essais) : souris infestées et traitées à l'extrait au MeOH des racines de *Ozoroo pulcherrima* aux doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg et de 400 mg/kg respectivement.

### III-1-2-1-3. Effets du traitement avec l'extrait aqueux ou avec l'extrait méthanolique de *Ozoroo pulcherrima* sur la charge parasitaire et sur les charges ovulaires fécale, hépatique et intestinale

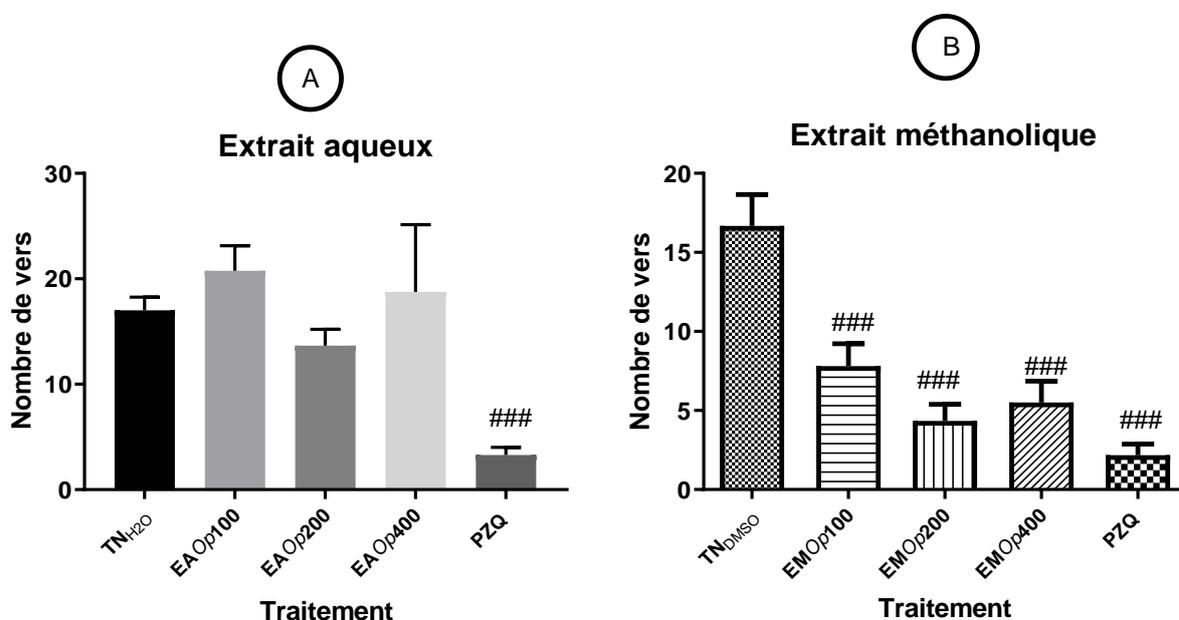
Après le traitement des souris infestées à *S. mansoni* par les extraits aqueux et méthanolique de *O. pulcherrima*, le nombre de vers récupérés, de même que les charges ovulaires fécales, hépatiques et intestinales ont été évaluées.

### III-1-2-1-3-1. Charge parasitaire

Après soixante et trois jours post infestation, en moyenne  $17 \pm 1,25$  vers adultes de *S. mansoni* ont été récupérés dans le groupe  $TN_{H_2O}$  et  $16,67 \pm 1,99$  dans le groupe  $TN_{DMSO}$  soit un rendement de 34 % et 33,34 % respectivement.

L'administration de l'extrait aqueux de *O. pulcherrima* à toutes les doses chez les souris infestées n'a pas entraîné de diminution sur la charge parasitaire (Figure 26 A).

Le traitement des souris infestées par l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* a entraîné une réduction significative de la charge parasitaire de 53,21 %, de 74,02 % et de 67,07 % aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement par comparaison au groupe témoin négatif  $TN_{DMSO}$ . Par ailleurs, chez les animaux traités au praziquantel, une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de la charge parasitaire de 87,24 % et de 86,98 % a été enregistrée comparativement aux témoins négatifs  $TN_{H_2O}$  et  $TN_{DMSO}$  respectivement (Figure 26 B).



**Figure 26 :** Effets du traitement avec l'extrait aqueux (A) et avec l'extrait méthanolique (B) de *Ozoroa pulcherrima* sur la charge parasitaire chez les souris infestées par *Schistosoma mansoni*.

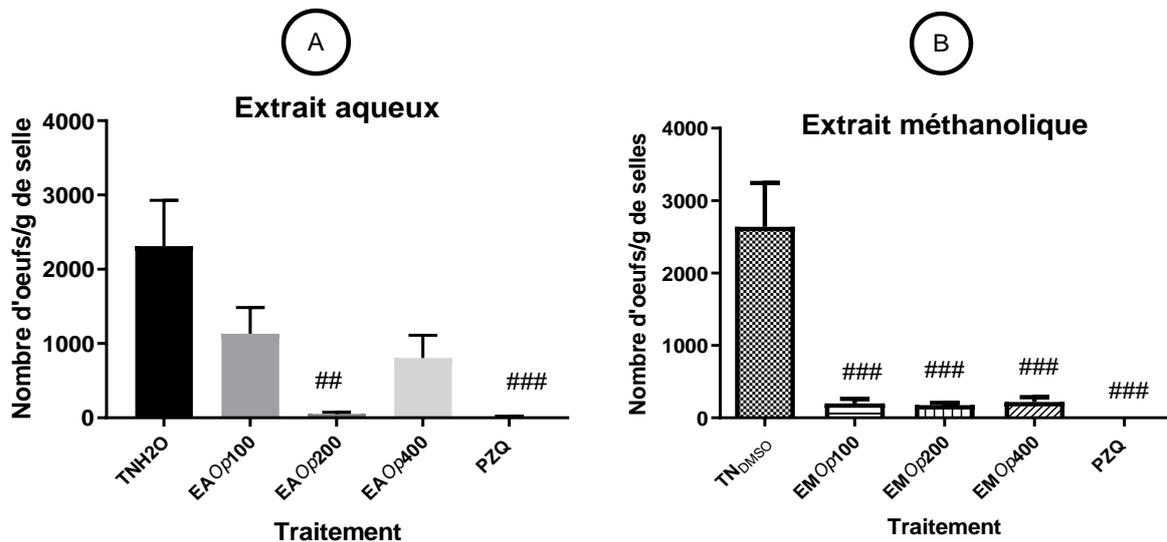
Les histogrammes sont des moyennes  $\pm$  ESM;  $n=6$  à  $10$ ; ###  $p < 0,001$ : différence significative par rapport aux groupes témoin négatif ( $TN_{H_2O}$ ) et ( $TN_{DMSO}$ ). TS (témoin sain) : souris saines; TN (témoin négatif) : souris infestées et recevant le DMSO 1% ( $TN_{DMSO}$ ) ou l'eau distillée ( $TN_{H_2O}$ ); PZQ (témoin positif) : souris infestées et traitées au praziquantel; EAOp100; EAOp200 et EAOp400 souris infestées et traitées à l'extrait aqueux et EMOp100; EMOp200 et EMOp400 (groupes essais) : souris infestées et traitées à l'extrait au MeOH des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses 100 mg/kg, 200 mg/kg et 400 mg/kg respectivement

### III-1-2-1-3-2. Charge ovulaire fécale

L'administration de l'extrait aqueux de *O. pulcherrima* chez les souris infestées par *S. mansoni* a entraîné une diminution significative ( $p < 0,01$ ) de la charge ovulaire fécale de 97,60 % à la dose de 200 mg/kg comparée au groupe témoin négatif  $TN_{H_2O}$  (Figure 27 A).

Par ailleurs, il a également été noté une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de 92,45 %, 93,30 % et 91,70 % de la charge ovulaire fécale chez les animaux infestés puis traités avec l'extrait méthanolique des racines de *O. pulcherrima* aux doses respectives de 100, 200 et de 400 mg/kg comparativement aux témoins négatifs ( $TN_{DMSO}$ ) (Figure 27 B).

Le traitement des souris infestées par *S. mansoni* avec une dose de 500 mg/kg de praziquantel, a entraîné une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de la charge ovulaire fécale de 99,45 % et de 99,52 % par rapport aux souris infestées et non traitées ( $TN_{H_2O}$ ) et ( $TN_{DMSO}$ ) respectivement (Figure 29B).



**Figure 27 :** Effets du traitement avec l'extrait aqueux (A) ou avec l'extrait méthanolique (B) de *Ozoroa pulcherrima* sur la charge ovulaire fécale chez les souris infestées par *Schistosoma mansoni*.

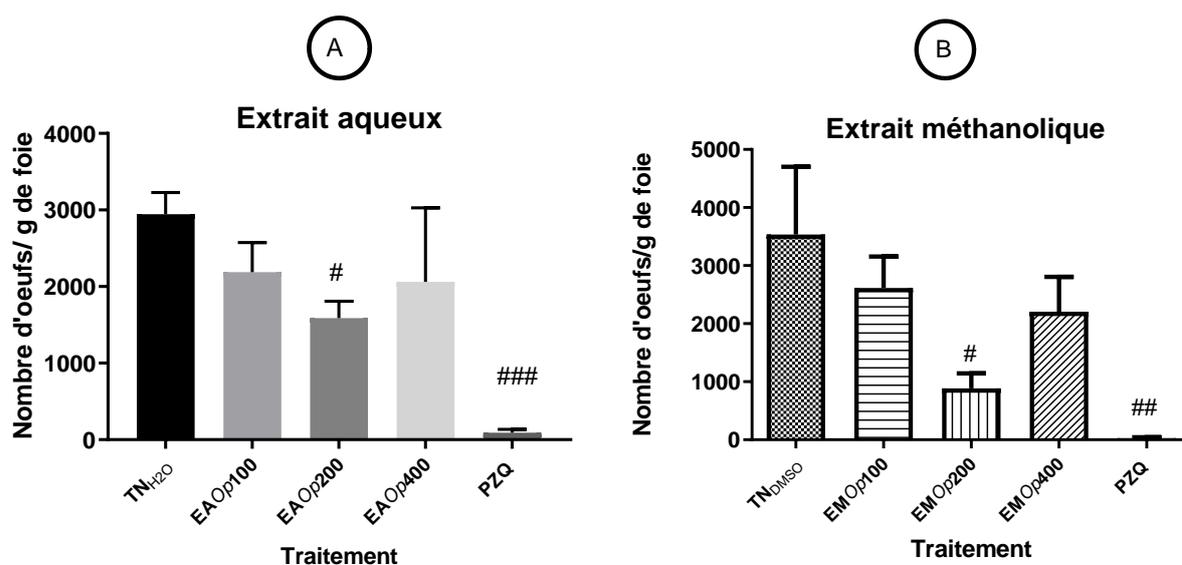
Les histogrammes sont des moyennes  $\pm$  ESM ;  $n=6$  à  $10$ ; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$ : différence significative par rapport aux groupes témoin négatif ( $TN_{H_2O}$ ) et ( $TN_{DMSO}$ ). TS (témoin sain) : souris saines; TN (témoin négatif) : souris infestées et recevant le DMSO 1% ( $TN_{DMSO}$ ) ou l'eau distillée ( $TN_{H_2O}$ ); PZQ (témoin positif) : souris infestées et traitées au praziquantel; EAOp100; EAOp200 et EAOp400 souris infestées et traitées à l'extrait aqueux et EMOp100; EMOp200 et EMOp400 (groupes essais) : souris infestées et traitées à l'extrait au MeOH des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg et de 400 mg/kg respectivement.

### III-1-2-1-3-3. Charge ovulaire hépatique

L'évaluation de la charge ovulaire hépatique des différents groupes a été effectuée. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 28. Il en ressort que l'administration de l'extrait aqueux de *O. pulcherrima* a entraîné une réduction significative ( $p < 0,05$ ) de la charge ovulaire hépatique de 46,03 % uniquement chez les souris infestées par *S. mansoni* et traitées à la dose de 200 mg/kg comparativement aux témoins négatifs (TN<sub>H2O</sub>) (Figure 28 A).

Tout comme l'extrait aqueux, le traitement des souris infestées à *S. mansoni* par l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* a entraîné une diminution significative ( $p < 0,05$ ) de 75 % de la charge ovulaire hépatique à la dose de 200 mg/kg comparativement aux témoins négatifs (TN<sub>DMSO</sub>) (Figure 28 B).

L'administration du praziquantel a entraîné une diminution significative de 99,15 % de la charge ovulaire hépatique par rapport aux souris infestées et non traitées du groupe (TN<sub>H2O</sub>) (Figure 28 A) et de 99,29 % comparativement au groupe TN<sub>DMSO</sub> (Figure 28 B).



**Figure 28 :** Effets du traitement avec l'extrait aqueux (A) ou avec l'extrait méthanolique (B) de *Ozoroa pulcherrima* sur la charge ovulaire hépatique chez les souris infestées par *Schistosoma mansoni*.

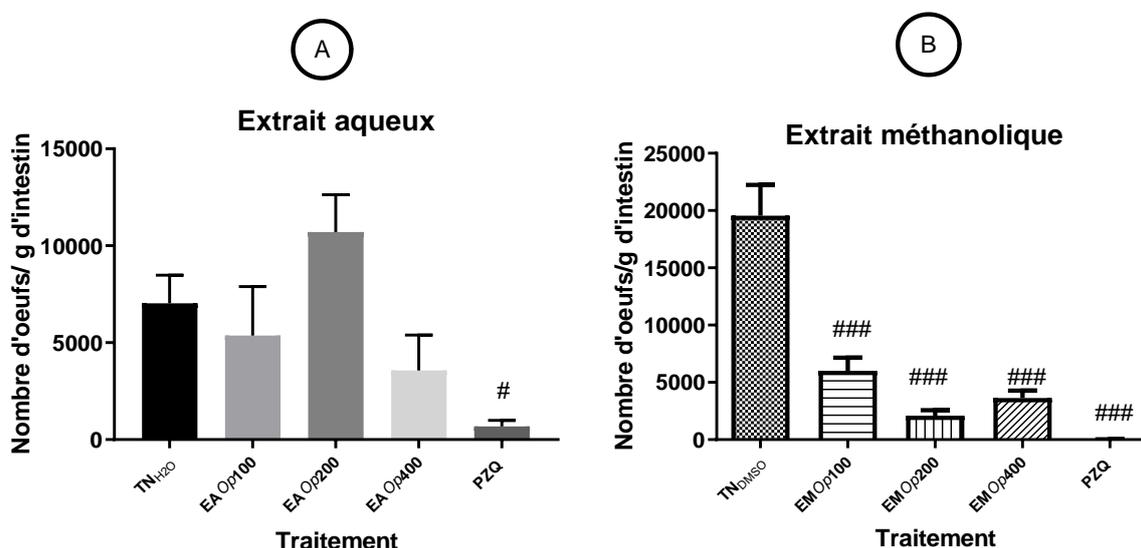
Les histogrammes sont des moyennes  $\pm$  SEM; n=6 à 10; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  : différence significative par rapport aux groupes témoin négatif (TN<sub>H2O</sub>) et (TN<sub>DMSO</sub>). TS (témoin sain) : souris saines; TN (témoin négatif) : souris infestées et recevant le DMSO 1% (TN<sub>DMSO</sub>) ou l'eau distillée (TN<sub>H2O</sub>); PZQ (témoin positif) : souris infestées et traitées au praziquantel; EAOp100; EAOp200 et EAOp400 souris infestées et traitées à l'extrait aqueux et EMOp100; EMOp200 et EMOp400 (groupes essais) : souris infestées et traitées à l'extrait au MeOH des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg et de 400 mg/kg respectivement.

### III-1-2-1-3-4. Charge ovulaire intestinale

Le nombre d'œufs embolisés dans l'intestin a été évalué et représenté sur la figure 29. Il en ressort que le traitement des souris infestées par *S. mansoni* avec l'extrait aqueux de *O. pulcherrima* n'a significativement pas fait varier la charge ovulaire intestinale (Figure 29 A).

Le traitement des souris infestées par l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* a quant à lui entraîné une diminution significative ( $p < 0,001$ ) de 69,30 %, 89,28 % et de 81,43 % de la charge ovulaire intestinale respectivement aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg comparativement aux témoins négatifs ( $TN_{DMSO}$ ) (Figure 29 B).

Après le traitement des souris infestées avec le praziquantel, une baisse significative de la charge ovulaire intestinale de 99,74 % a été enregistrée comparativement aux souris infestées du groupe ( $TN_{H_2O}$ ). De même, cette diminution était de 99,91 % par rapport aux souris infestées et non traitées du groupe ( $TN_{DMSO}$ ) (Figure 29B).



**Figure 29 :** Effets de traitement avec l'extrait aqueux (A) ou avec l'extrait méthanolique (B) *Ozoroa pulcherrima* sur la charge ovulaire intestinale chez les souris infestées par *Schistosoma mansoni*.

Les histogrammes sont des moyennes  $\pm$  ESM;  $n=6$  à  $10$ ; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$ : différence significative par rapport aux groupes témoin négatif ( $TN_{H_2O}$ ) et ( $TN_{DMSO}$ ). TS (témoin sain) : souris saines; TN (témoin négatif) : souris infestées et recevant le DMSO 1% ( $TN_{DMSO}$ ) ou l'eau distillée ( $TN_{H_2O}$ ); PZQ (témoin positif) : souris infestées et traitées au praziquantel; EA Op100; EA Op200 et EA Op400 souris infestées et traitées à l'extrait aqueux et EM Op100; EM Op200 et EM Op400 (groupes essais) : souris infestées et traitées à l'extrait au MeOH des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg et de 400 mg/kg respectivement.

#### **III-1-2-1-4. Effets du traitement avec l'extrait aqueux ou avec l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur quelques paramètres de la fonction hépatique**

Afin d'évaluer les effets de l'extrait aqueux ou de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur la fonction hépatique du foie, les concentrations des protéines totales, de la bilirubine totale et l'activité des transaminases ont été déterminées. Les résultats ainsi obtenus sont présentés par le tableau XVII.

L'infestation des souris par *S. mansoni* a entraîné une diminution significative ( $P < 0,001$ ) de la concentration des protéines de 42,52 % chez les souris infestées et non traitées (TN<sub>H<sub>2</sub>O</sub>) ou de 37,05 % chez celles du groupe (TN<sub>DMSO</sub>) par rapport aux groupes témoins sains. A l'issue du traitement des souris infestées par l'extrait aqueux de *O. pulcherrima*, les concentrations des protéines sont restées inchangées par rapport à celles des souris infestées et non traitées (TN<sub>H<sub>2</sub>O</sub>). Par contre, le traitement des souris infestées par l'extrait méthanolique a entraîné une normalisation ( $p < 0,001$ ) de ces concentrations avec des pourcentages de 57,14 %, 45,71 % et de 65,14 % respectivement aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg comparés aux animaux témoins négatifs (TN<sub>DMSO</sub>). Le traitement des souris par le praziquantel s'est traduit par une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la concentration des protéines de 89,25 % et de 58,28 % par rapport aux souris infestées et non traitées des groupes TN<sub>H<sub>2</sub>O</sub> et TN<sub>DMSO</sub> respectivement.

Le tableau XVII montre que l'infestation des souris par *S. mansoni* a entraîné une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la concentration de bilirubine totale chez les souris infestées et non traitées par rapport aux animaux des groupes témoins sains. Lorsque les souris étaient traitées à l'extrait aqueux de *O. pulcherrima*, il s'en est suivi une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de la concentration de bilirubine totale de 58,05 % et de 54,69 % aux doses de 200 et de 400 mg/kg respectivement par rapport aux souris infestées du groupe TN<sub>H<sub>2</sub>O</sub>. L'administration de l'extrait méthanolique aux souris infestées aux doses de 200 et de 400 mg/kg a entraîné une réduction significative ( $p < 0,001$  et  $p < 0,01$ ) de 52,48 % et de 24,92 % de la concentration de bilirubine respectivement par comparaison au groupe témoin négatif (TN<sub>DMSO</sub>). Le traitement des souris infestées avec le praziquantel a entraîné une diminution significative ( $p < 0,001$ ) de la concentration de bilirubine totale comparativement aux animaux infestés et non traités des groupes TN<sub>H<sub>2</sub>O</sub> et TN<sub>DMSO</sub>.

L'infestation des souris à 50 cercaires de *S. mansoni* a induit chez les animaux infestés et non traités (TN<sub>H<sub>2</sub>O</sub>) une augmentation significative de l'aspartate aminotransférase ( $p < 0,001$ ) et de l'alanine aminotransférase ( $p < 0,05$ ) comparés au groupe témoin sain. Par ailleurs, une augmentation significative de l'aspartate aminotransférase ( $p < 0,05$ ) et l'alanine aminotransférase

( $p < 0,001$ ) chez les animaux témoins négatifs ( $TN_{DMSO}$ ) comparativement au groupe témoin sain a été enregistrée. Le traitement des souris infestées avec l'extrait aqueux de *O. pulcherrima* n'a pas entraîné de variation de l'activité de ces enzymes comparativement aux groupes témoins négatifs ( $TN_{H_2O}$ ). A l'issue du traitement des souris infestées par l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima*, une diminution significative ( $p < 0,001$ ) de l'activité enzymatique de l'ALAT de 36,90 %, 50,77 et de 28,19 % aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement par rapport au groupe témoin négatif ( $TN_{DMSO}$ ) a été enregistrée. Cependant, l'administration de cet extrait n'a présentée aucun impact véritable sur l'activité enzymatique de l'ASAT. Le praziquantel quant à lui a induit la baisse significative ( $p < 0,001$ ) de l'activité enzymatique de l'ASAT et de l'ALAT par rapport aux souris infestées et non traitées ( $TN_{DMSO}$ ) et une diminution significative ( $p < 0,001$ ) de l'ASAT uniquement comparé au groupe  $TN_{H_2O}$ .

**Tableau XVII :** Effets du traitement avec l'extrait aqueux ou avec l'extrait méthanoliques de *Ozoroa pulcherrima* sur quelques paramètres de la fonction hépatique chez les souris infestées par *Schistosoma mansoni*

| Groupes         | Protéines totales (mg/mL)      | ASAT (U/mL)                       | ALAT (U/mL)                       | Bilirubine totale ( $\mu\text{mol/L}$ ) |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---|
| TS              | 4,21 $\pm$ 0,23                | 163,97 $\pm$ 8,30                 | 253,44 $\pm$ 8,22                 | 1,13 $\pm$ 0,1                          |
| $TN_{H_2O}$     | 2,42 $\pm$ 0,17***             | 764,31 $\pm$ 57,81***             | 401,98 $\pm$ 69,65*               | 8,31 $\pm$ 1,06***                      |
| <b>EAOp 100</b> | 1,91 $\pm$ 0,09***             | 686,81 $\pm$ 49,88***             | 325,69 $\pm$ 13,31                | 6,56 $\pm$ 0,59*** <sup>£££</sup>       |
| <b>EAOp 200</b> | 1,84 $\pm$ 0,08***             | 582,31 $\pm$ 73,88**              | 339,77 $\pm$ 11,6                 | 3,49 $\pm$ 0,36 <sup>###</sup>          |
| EAOp 400        | 2,02 $\pm$ 0,07***             | 738,01 $\pm$ 58,32***             | 341,58 $\pm$ 11,21                | 3,77 $\pm$ 0,88 <sup>###</sup>          |
| <b>PZQ</b>      | 4,58 $\pm$ 0,14 <sup>###</sup> | 189,36 $\pm$ 57,81 <sup>###</sup> | 372,51 $\pm$ 26,59                | 0,90 $\pm$ 0,10 <sup>###</sup>          |
| TS              | 2,78 $\pm$ 0,07                | 159,27 $\pm$ 6,48                 | 345,57 $\pm$ 37,48                | 8,11 $\pm$ 0,39                         |
| $TN_{DMSO}$     | 1,75 $\pm$ 0,08***             | 303,09 $\pm$ 64,92*               | 791,29 $\pm$ 32,20***             | 24,20 $\pm$ 1,68***                     |
| <b>EMOp 100</b> | 2,75 $\pm$ 0,19 <sup>###</sup> | 234,23 $\pm$ 6,93                 | 499,32 $\pm$ 54,40 <sup>###</sup> | 22,21 $\pm$ 1,03                        |
| <b>EMOp 200</b> | 2,55 $\pm$ 0,19 <sup>###</sup> | 195,26 $\pm$ 15,37                | 389,51 $\pm$ 42,33 <sup>###</sup> | 11,50 $\pm$ 1,41 <sup>###</sup>         |
| <b>EMOp 400</b> | 2,89 $\pm$ 0,08 <sup>###</sup> | 231,93 $\pm$ 18,03                | 568,18 $\pm$ 37,66 <sup>###</sup> | 18,17 $\pm$ 1,20 <sup>##</sup>          |
| <b>PZQ</b>      | 2,77 $\pm$ 0,09 <sup>###</sup> | 168,13 $\pm$ 13,41 <sup>###</sup> | 391,66 $\pm$ 31,85 <sup>###</sup> | 15,32 $\pm$ 1,76 <sup>###</sup>         |

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  ESM ; n=6 à 10; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ : différence significative par rapport au groupe témoin sain et #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  : différence significative par rapport aux groupes témoin négatif ( $TN_{H_2O}$ ) et ( $TN_{DMSO}$ ) ; TS (témoin sain) : souris saines; TN (témoin négatif) : souris infestées et recevant le DMSO 1% ( $TN_{DMSO}$ ) ou l'eau distillée ( $TN_{H_2O}$ ) ; PZQ (témoin positif) : souris infestées et traitées au praziquantel; **EAOp100; EAOp200 et EAOp400** souris infestées et traitées à l'extrait aqueux et **EMOp100; EMOp200 et EMOp400** (groupes essais) : souris infestées et traitées à l'extrait au MeOH des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg et de 400 mg/kg respectivement.

### **III-1-2-1-5. Effets du traitement avec l'extrait aqueux ou avec l'extrait méthanolique de *Ozorioa pulcherrima* sur le stress oxydant induit par l'infection à *Schistosoma mansoni***

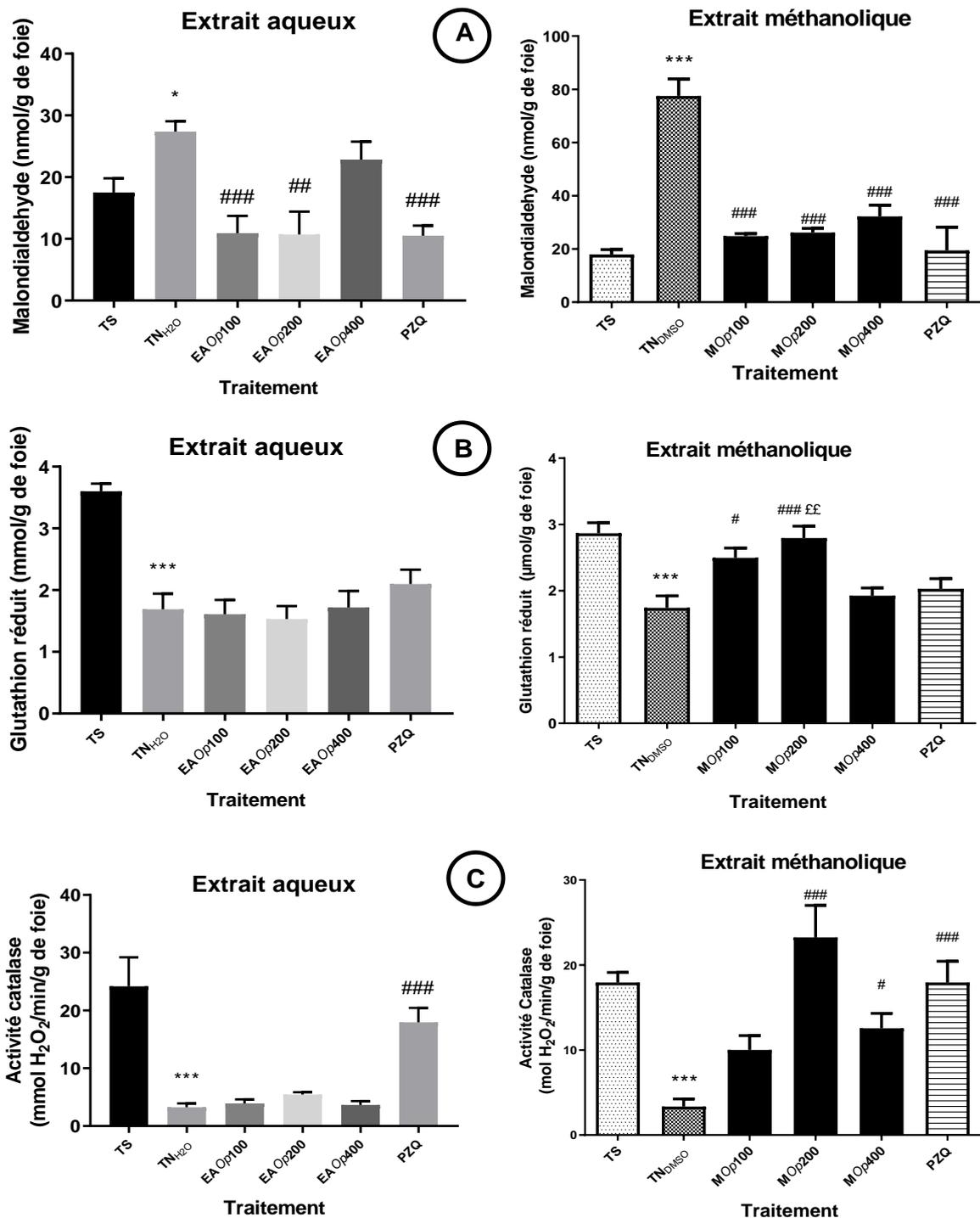
Les effets de l'extrait aqueux ou de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* sur le stress oxydant chez des souris infestées à *S. mansoni* ont été évalués sur les concentrations hépatiques de malondialdéhyde, du glutathion réduit et sur l'activité enzymatique de la catalase.

L'infestation des souris avec 50 cercaires de *S. mansoni* a entraîné une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la concentration de MDA chez les souris du groupe témoin négatif (TN<sub>DMSO</sub>) de 332,64% comparé au groupe témoin sain. Après infestation, les souris traitées par l'extrait aqueux de *O. pulcherrima* ont montré une diminution significative ( $p < 0,001$  et  $p < 0,01$ ) de 60,14 % et de 60,87 % de la concentration de MDA aux doses de 100 et de 200 mg/kg respectivement par rapport aux souris du groupe témoin négatif (TN<sub>H2O</sub>) comme présenté sur la figure 30 A. Le traitement des souris infestées par *S. mansoni* avec l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* a entraîné une diminution significative ( $p < 0,001$ ) de 68,40 %, 66,26 % et de 58,44 % de la concentration de malondialdéhyde respectivement aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg comparativement aux souris infestées et non traitées (TN<sub>DMSO</sub>) (Figure 30 A). L'administration du praziquantel a entraîné une baisse significative de MDA de 61,56 % ( $p < 0,001$ ) comparativement au groupe témoin négatif (TN<sub>H2O</sub>) et de 74,87 % ( $p < 0,001$ ) par rapport au groupe témoin négatif (TN<sub>DMSO</sub>) (figure 30 A).

L'évaluation de la concentration de glutathion réduit (GSH) dans les homogénats de foie de souris infestées par *S. mansoni* a montré une diminution significative ( $p < 0,001$ ) par rapport aux souris non infestées. Cette diminution était de 53,05 % pour le groupe TN<sub>H2O</sub> ou de 39,37 % pour le groupe TN<sub>DMSO</sub> (Figure 30 B). A l'issue du traitement des souris infestées avec l'extrait aqueux de *O. pulcherrima*, la concentration de glutathion réduit est restée inchangée par rapport à celle des souris infestées et non traitées du groupe (TN<sub>H2O</sub>) (Figure 30 B). Cependant, l'administration de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* aux souris infestées a entraîné une augmentation significative ( $p < 0,05$  et  $p < 0,001$ ) de la concentration de GSH de 43,68 % et de 60,34 % aux doses respectives de 100 et de 200 mg/kg comparativement au groupe témoin négatif (TN<sub>DMSO</sub>). Cette augmentation était plus importante que celle obtenue avec le praziquantel (Figure 30 B). Les souris infestées par *S. mansoni* puis traitées avec le praziquantel n'ont pas vu leur taux de glutathion réduit s'améliorer par rapport aux souris infestées non traitées des groupes (TN<sub>H2O</sub>) et (TN<sub>DMSO</sub>) (Figure 30 B).

L'infection à *S. mansoni* a induit une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de l'activité de la catalase dans le foie des souris du groupe témoin négatif (TN<sub>H2O</sub>) de 86,48 % ou de 81,33 % chez

les souris du groupe témoin négatif (TN<sub>DMSO</sub>) comparativement aux souris du groupe témoin sain. A l'issue du traitement des souris infestées avec l'extrait aqueux de *O. pulcherrima*, l'activité enzymatique de la catalase est restée inchangée par rapport à celle des souris du groupe TN<sub>H<sub>2</sub>O</sub> (figure 30 C). Par contre, le traitement des souris infestées avec l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima*, a induit une augmentation significative ( $p < 0,001$  et  $p < 0,05$ ) de 85,59 % et de 73,31 % aux doses respectives de 200 et de 400 mg/kg comparativement aux souris infestées non traitées du groupe TN<sub>DMSO</sub> (Figure 30 C). Par ailleurs, l'administration du praziquantel s'est traduite par une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de l'activité de la catalase de 81,77 % par rapport aux souris infestées non traitées du groupe TN<sub>H<sub>2</sub>O</sub> ou de 81,33 % comparativement aux souris du groupe TN<sub>DMSO</sub>. Cette activité était comparable à celle des souris saines.



**Figure 30 :** Effets du traitement avec l'extrait aqueux ou avec l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur les concentrations du malondialdéhyde (A) et de glutathion réduit (B) et sur l'activité enzymatique de la catalase (C) chez les souris infestées par *Schistosoma mansoni*.

Les bandes sont des moyennes  $\pm$  ESM ; n=6 à 10 ; \* $p$ <0,05 ; \*\* $p$ <0,001 : différences significatives par rapport au groupe témoin sain, #  $p$ <0,05; ##  $p$ <0,01; ###  $p$ <0,001 : différences significatives par rapport aux groupes témoin négatif (TN<sub>H2O</sub>) et (TN<sub>DMSO</sub>) et ££  $p$ <0,01 : différence significative par rapport aux groupes témoin positif (PZQ).

### **III-1-2-1-6. Effets du traitement avec l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur histomorphométrie du foie**

L'extrait méthanolique ayant présenté les meilleurs résultats schistosomicide que l'extrait aqueux tant *in vitro* qu'*in vivo* et à tous dans tous les paramètres, nous avons ainsi décidé de déterminer les effets du traitement sur histomorphométrie du foie uniquement avec l'extrait méthanolique. Dans cette étude, l'évaluation du potentiel anti-fibrotique de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* dans l'infection à *S. mansoni* a été faite tant sur l'histologie qualitative que sur l'histomorphométrie (mesure de la taille et du volume des granulomes bilharziens) du foie.

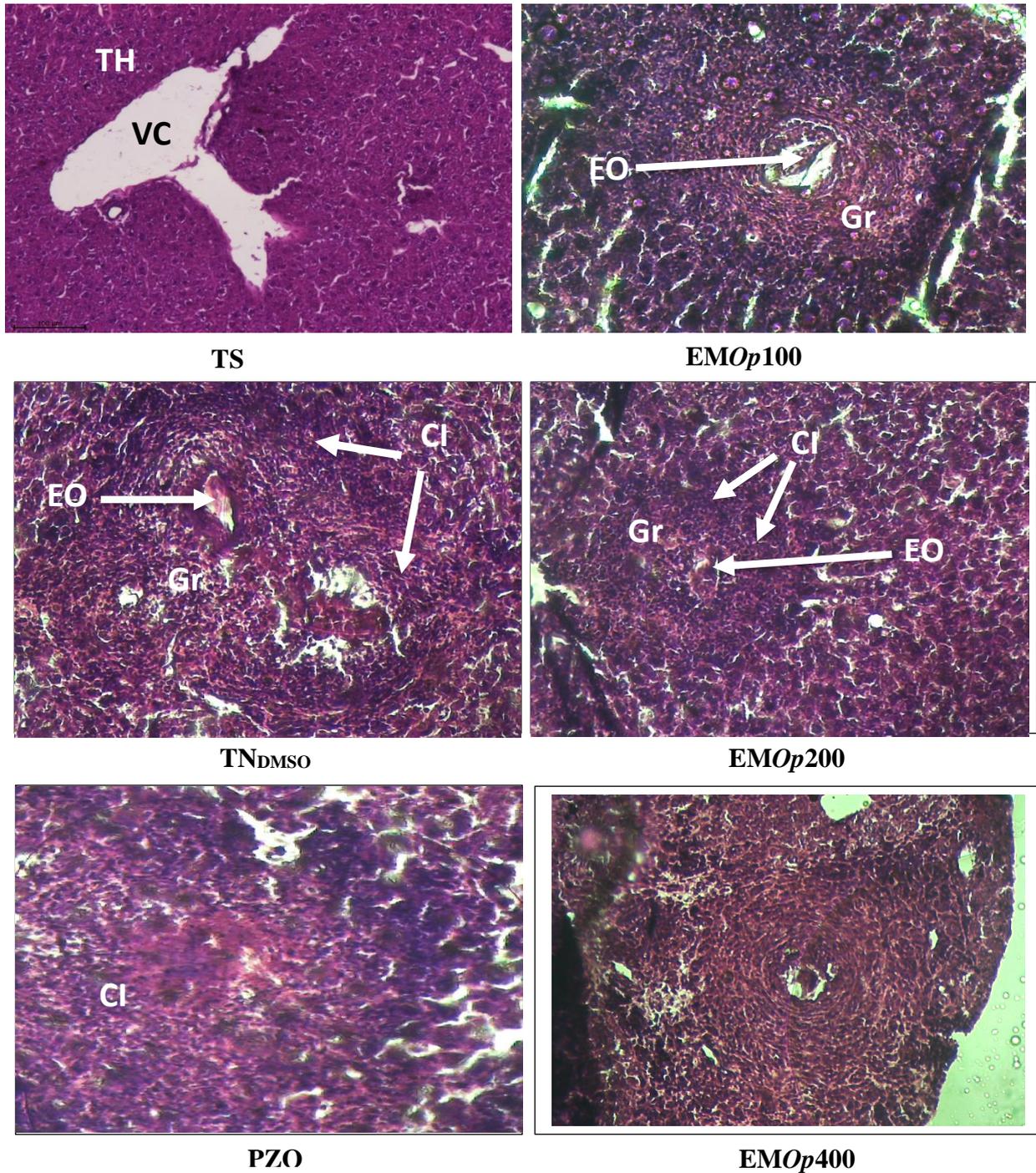
#### **III-1-2-1-6-1. Histologie qualitative du foie**

La coloration H&E des coupes de foie des souris saines (TS) montre une structure hépatique normale avec des lobules hépatiques, unités structurelles et fonctionnelles du foie. Chaque lobule est composé de travées d'hépatocytes irriguées par un réseau de capillaires sinusoides qui confluent dans la veine centrolobulaire. Au carrefour de plusieurs lobules, se trouve l'espace porte de Kiernan formé d'une triade constituée par une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte et le canalicule biliaire (Figure 31).

Chez les souris infestées par *S. mansoni* et non traitées (TN<sub>DMSO</sub>), de nombreux et volumineux granulomes bilharziens associés à une intense infiltration leucocytaire sont visibles sur les coupes de foie colorées à H&E (Figure 31).

Le traitement par l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* a entraîné une réduction du nombre et du volume de granulomes à la dose de 200 mg/kg (dose efficace). Cependant, quelques infiltrations cellulaires dans la structure des granulomes sont observées (Figure 31).

Chez les souris infestées puis traitées au praziquantel (PZQ), les granulomes bilharziens sont pratiquement inexistantes sur les coupes de foie colorées à H&E; seules quelques cellules inflammatoires sont visibles (Figure 31).



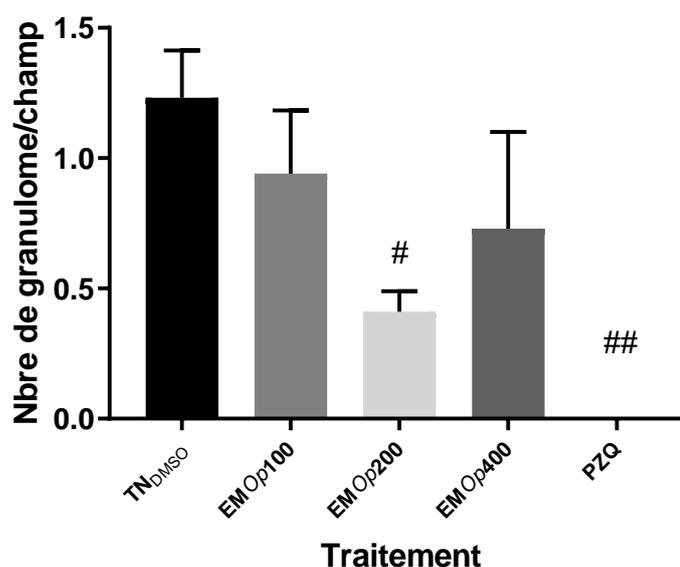
**Figure 31 :** Microphotographies montrant les effets du traitement avec l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur l'histologie du foie de souris infestées à *Schistosoma mansoni* (grossissement x 100).

CI : Cellules inflammatoires ; Eo : Espace occupé par l'œuf ; Gr : Granulomes ; VC : Veine centrolobulaire et TH : Travées d'Hépatocytes

### III-1-2-1-6-2. Nombre de granulomes bilharziens dans le foie

L'évaluation du nombre de granulomes a été faite sur 32 à 77 champs microscopique pour chaque coupe de foie.

Chez les souris infestées à *S. mansoni* puis traitées avec l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima*, une réduction significative ( $p < 0,05$ ) de 66,67% du nombre de granulomes ( $0,41 \pm 0,07$  vs  $1,23 \pm 0,18$ ) à la dose de 200 mg/kg comparativement aux souris infestées non traitées ( $TN_{DMSO}$ ) a été enregistrée. Chez les animaux infestés et traités au praziquantel, aucun granulome n'a été dénombré (Figure 32).



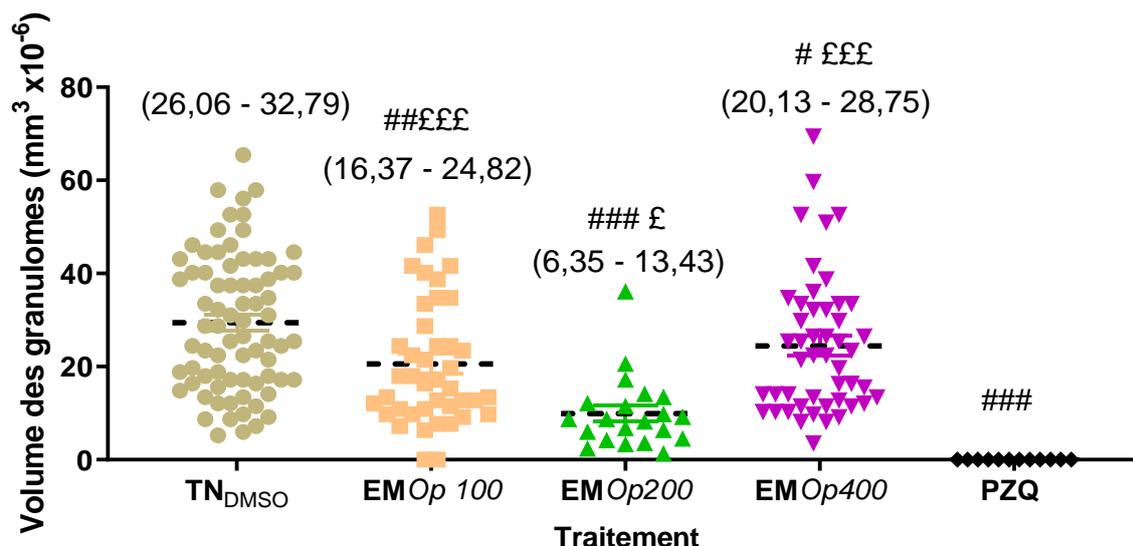
**Figure 32 :** Effets du traitement à l'extrait méthanolique sur le nombre de granulomes hépatiques sur les souris infestées à *Schistosoma mansoni*.

Les histogrammes sont des moyennes  $\pm$  ESM ;  $n=6$  à  $10$  ; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  : différence significative par rapport au groupe témoin négatif ( $TN_{DMSO}$ ). **TN** (témoin négatif) : souris infestées et recevant le DMSO 1% ( $TN_{DMSO}$ ); **PZQ** (témoin positif) : souris infestées et traités au praziquantel; souris infestées et traitées à l'extrait au MeOH des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement.

### III-1-2-1-6-3. Volume des granulomes bilharziens dans le foie

Le volume des granulomes a été déterminé sur un minimum de 20 granulomes renfermant un œuf de *S. mansoni* par souris.

L'administration de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* a entraîné une diminution significative ( $p < 0,01$ ;  $0,001$  et  $0,05$ ) de 30,21 %, 66,39 % et de 16,96 % du volume des granulomes aux doses respectives de 100; 200 et de 400 mg/kg comparativement aux souris infestées non traitées ( $TN_{DMSO}$ ). (Figure 33).



**Figure 33 :** Effets du traitement avec l'extrait méthanolique sur le volume des granulomes hépatiques des souris infestées par *Schistosoma mansoni*.

Chaque point représente la valeur du volume de chaque granulome ; n=6 à 10 ; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  : différences significatives par rapport au groupe témoin négatif (TN<sub>DMSO</sub>) ; £  $p < 0,05$ , ££  $p < 0,01$ , £££  $p < 0,001$  : différences significatives par rapport au groupe témoin positif (PZQ) ; TN (témoin négatif) : souris infestées et recevant le DMSO 1% (TN<sub>DMSO</sub>) ; PZQ (témoin positif) : souris infestées et traitées au praziquantel ; EMOp100 EMOp200 et EMOp400 (groupes essais) : souris infestées et traitées avec l'extrait au MeOH des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement.

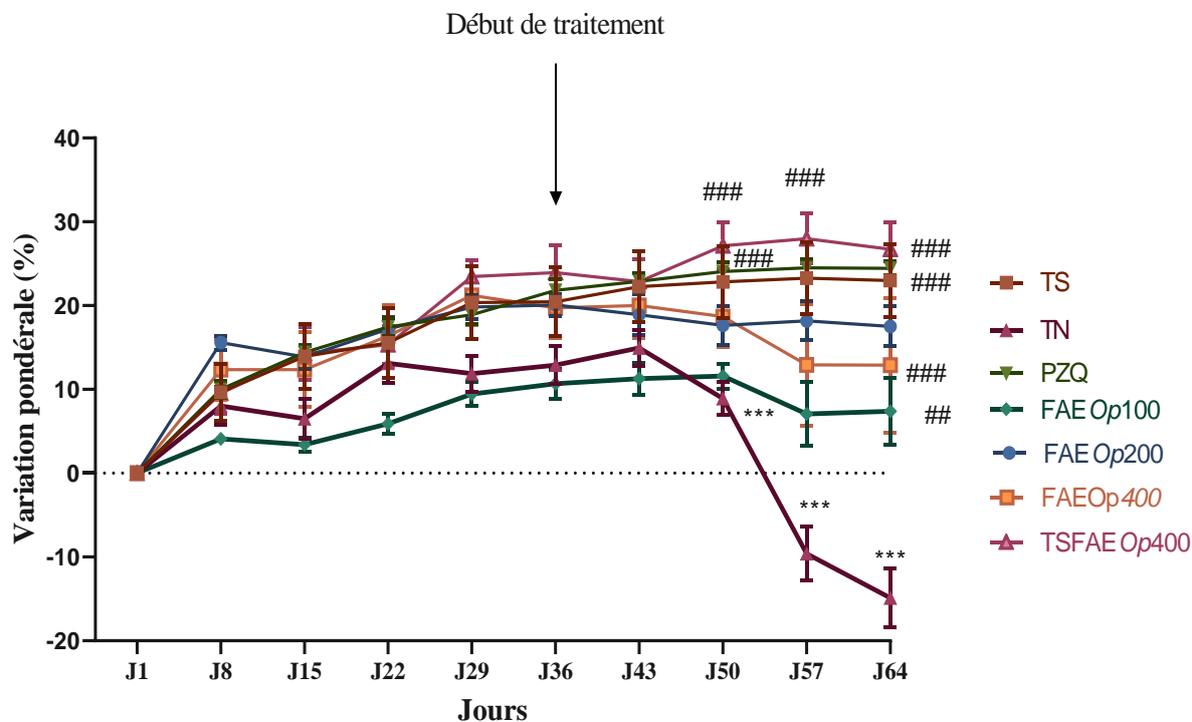
### III-1-2-2. Effets de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur l'infestation par *Schistosoma mansoni* chez la souris

L'extrait méthanolique des racines de *O. pulcherrima* ayant montré la meilleure activité schistosomicide *in vivo*, sa fraction ayant été efficace sur les schistosomes adultes et possédant plus de composés et à des proportions plus importantes pour des molécules connues que la fraction au *n*-hexane, cette fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* a également été utilisée pour évaluer son activité sur la pathologie induite par *S. mansoni*.

#### III-1-2-2-1. Effets de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur l'évolution pondérale

Les courbes d'évolution du poids corporel des animaux dans les différents groupes sont représentées à la figure 34. Il ressort de cette étude qu'aucune différence significative du gain de poids corporel n'a été observée entre les souris des groupes témoins et celles traitées avec le praziquantel et avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *O. pucherrima* après le 35<sup>ème</sup> jour post-infestation. Cependant, à partir du 57<sup>ème</sup> jour post-infestation, une diminution significative ( $p < 0,001$ ) du poids corporel chez les souris infestées et non traitées

(TN<sub>DMSO</sub>) a été enregistrée par rapport aux animaux sains. L'administration de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* ou du praziquantel a significativement empêché cette perte de poids chez les animaux traités comparés aux témoins négatifs.



**Figure 34 :** Effets de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur l'évolution pondérale.

Chaque point représente le pourcentage du poids moyen  $\pm$  ESM, n = 6-7 ; \*\*\* $p < 0,001$ : différences significatives par rapport au témoin sain ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$ : différences significatives par rapport au témoin négatif

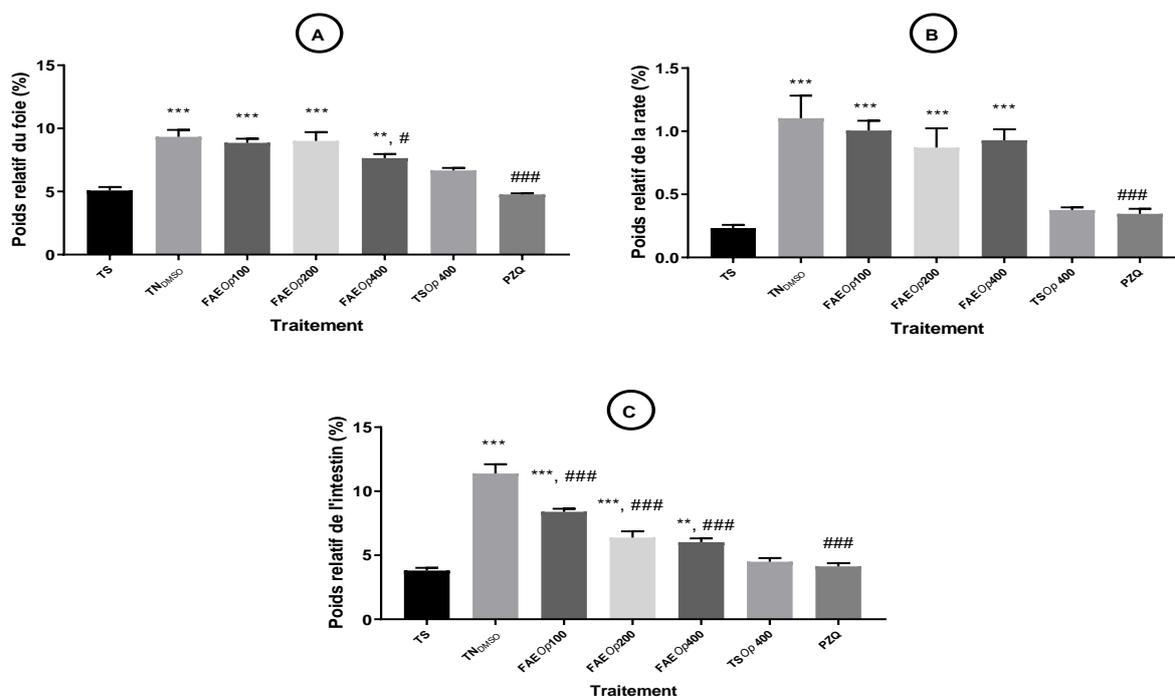
TS (témoin sain): souris saines; TN<sub>DMSO</sub> (témoin négatif): souris infestées et non traitées; PZQ (témoin positif): souris infestées et traitées au praziquantel à 100 mg/kg; FAEOp 100, FAEOp 200 et FAEOp400 (groupes essais): souris infestées et traitées à la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses respectives de 100, 200 et 400 mg/kg. TS FAEOp 400: souris saines recevant la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* à la dose 400 mg/kg.

### III-1-2-2-2 Effets de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur le poids relatif du foie, de la rate et de l'intestin

L'infestation à *S. mansoni* a entraîné une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) des poids relatifs du foie, de la rate et de l'intestin chez les animaux infestés et non traités par rapport à ceux du groupe témoin sain (Figure 35). Le traitement des souris infestées par la fraction à l'acétate d'éthyle de *O. pulcherrima* à la dose de 400 mg/kg a entraîné une baisse significative ( $p < 0,05$ ) de 25,41 % du poids relatif du foie par rapport aux souris du groupe témoin négatif. (Figure 35 A).

Par ailleurs, aucune diminution significative du poids relatif de la rate n'a été observée chez les souris infestées et traitées avec la fraction à l'acétate d'éthyle à ses différentes doses comparé à celui des souris infestées et non traitées (Figure 35 B). L'administration des différentes doses (100, 200 et 400 mg/kg) de la fraction à l'acétate d'éthyle de *O. pulcherrima* a entraîné des baisses significatives ( $p < 0,001$ ) de 27,38 %, 42,43 % et de 50,77 % respectivement du poids relatif de l'intestin des souris infestées (Figure 35 C). Par ailleurs, l'administration du PZQ aux souris infestées à *S. mansoni* a entraîné une diminution significative ( $p < 0,001$ ) du poids relatif du foie, de la rate et de l'intestin de 48,98 %, 68,75 % et de 63,75 % respectivement par rapport au groupe témoin négatif.

Toutefois, l'administration de la fraction à l'acétate d'éthyle de *O. pulcherrima* à la dose de 400 mg/kg chez les souris non infestées n'a entraînée aucune modification du poids relatif du foie, de la rate et de l'intestin.



**Figure 35 :** Effets du traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur le poids relatif du foie (A), de la rate (B) et de l'intestin (C).

Les histogrammes sont des moyennes  $\pm$  ESM,  $n = 6-7$  ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ : différences significatives par rapport au témoin sain ; # $p < 0,05$ ; ### $p < 0,001$ : différences significatives par rapport au témoin négatif. **TS** (témoin sain): souris saines; **TN** (témoin négatif): souris infestées et non traitées; **PZQ** (témoin positif): souris infestées et traitées au praziquantel à 100 mg/kg; **FAEOp100**; **FAEOp 200** et **FAEOp400** (groupes essais): souris infestées et traitées à la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses respectives de 100; 200 et de 400 mg/kg. **TSFAEOp 400**: souris saines recevant la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* à la dose de 400 mg/kg.

### III-1-2-2-3. Effets du traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur la charge parasitaire et les charges ovulaires hépatique, intestinale et fécale

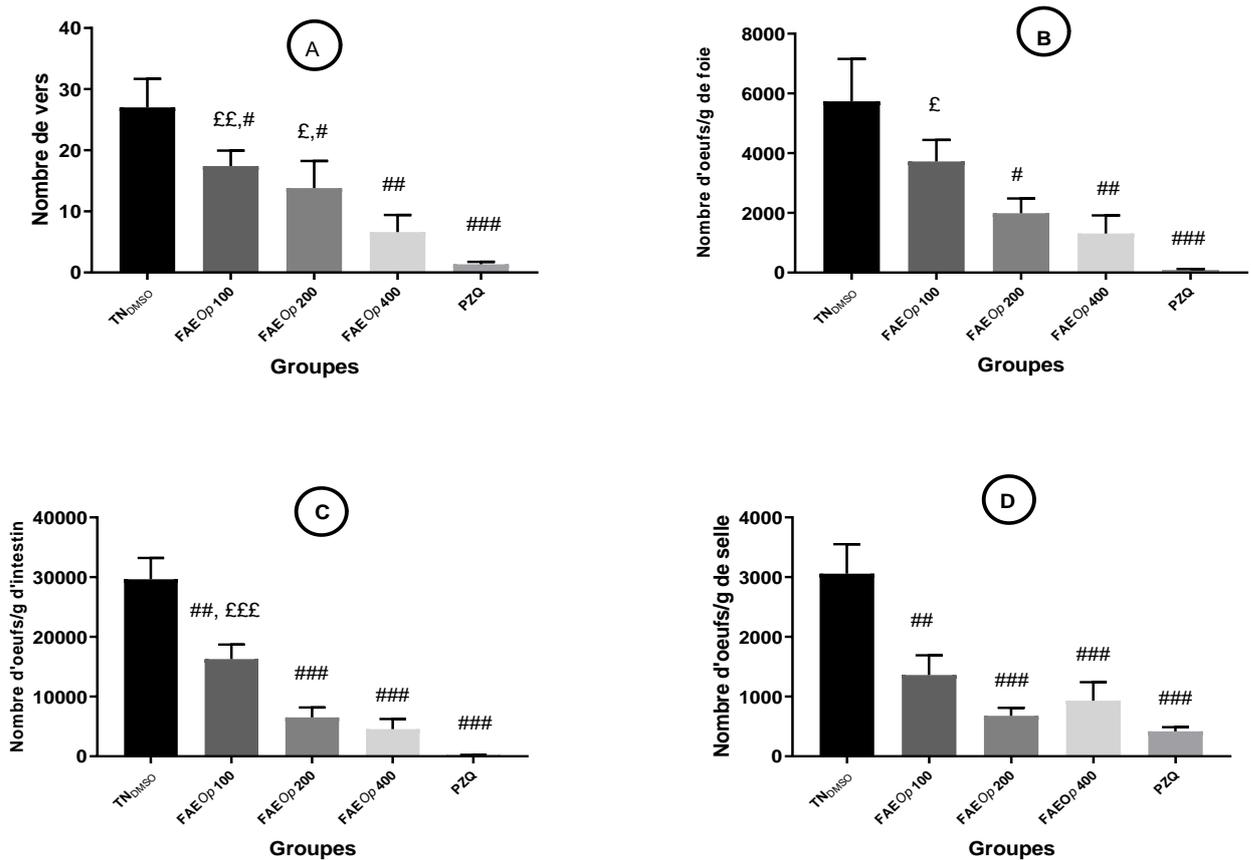
Après traitement des souris infestées par *S. mansoni*, avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima*, le nombre de schistosomes récupérés, le nombre d'œufs par gramme de selles, de foie ou d'intestin a été évalué.

Le traitement des souris infestées par la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de *O. pulcherrima* a entraîné une réduction dose-dépendante et significative ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ) de 35,44 %; 38,39 % et 49,49 % de la charge parasitaire aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement par rapport à celle des animaux infestés et non traités. L'administration du praziquantel aux souris infestées a entraîné une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de la charge parasitaire de 95,07 % comparativement aux souris du groupe témoin négatif. Il est cependant important de noter que les charges parasitaires sont restées plus élevées ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ) chez les animaux des groupes essais aux doses de 100 et de 200 mg/kg de la fraction par rapport à celles des animaux traités au praziquantel (Figure 36 A).

L'évaluation du nombre d'œufs embolisés dans le foie a été effectuée et les résultats ainsi obtenus sont présentés dans la figure 36 B. Il en ressort de cette dernière que le traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle a entraîné une diminution significative ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ ) de la charge ovulaire hépatique de 46,81 % et de 79,92 % aux doses de 200 et de 400 mg/kg respectivement par rapport au groupe témoin négatif (TN). L'administration du praziquantel aux souris infestées à *S. mansoni* s'est traduit par la diminution significative ( $p < 0,001$ ) du nombre d'œufs restés séquestrés dans le foie de 98,28 % par rapport à celui des animaux du groupe témoin négatif TN<sub>DMSO</sub> (Figure 36 B).

Le traitement des souris infestées à *S. mansoni* par la fraction à l'acétate d'éthyle de *O. pulcherrima* a entraîné une réduction significative ( $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ ) de la charge ovulaire intestinale de 38,54 %, 66,26 % et de 85,55 % aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement par rapport à ceux du groupe TN<sub>DMSO</sub>. A l'issue du traitement des souris infestées à *S. mansoni* avec le praziquantel, une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de 99,32 % a été enregistrée en comparaison aux souris infestées et non traitées (TN<sub>DMSO</sub>). Il est cependant important de noter que cette charge ovulaire intestinale est restée élevée ( $p < 0,001$ ) chez les animaux des groupes essais à la dose de 100 mg/kg comparativement à celle des animaux traités avec le praziquantel (Figure 36 C).

Les résultats de la moyenne par groupe du nombre d'œufs excrétés dans les selles sont représentés sur la figure 36 D. Il en ressort qu'à l'issue du traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle de *O. pulcherrima*, une réduction significative ( $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ ) de 55,45 %; 78,34 % et de 69,52 % a été enregistrée aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement comparativement aux animaux infestés et non traités (TN<sub>DMSO</sub>). L'administration du praziquantel chez les souris infestées à *S. mansoni* a entraîné une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de 86,29 % de la charge ovulaire fécale par rapport aux souris du groupe témoin négatif (TN<sub>DMSO</sub>).



**Figure 36 :** Effets du traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur la charge parasitaire (A), la charge ovulaire hépatique (B), la charge ovulaire intestinale (C) et la charge ovulaire fécale (D) chez les souris infestées par *Schistosoma mansoni*.

Les bandes sont représentées les moyennes  $\pm$  ESM, n = 6-7; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ : différences significatives par rapport au témoin négatif et £££  $p < 0,001$ : différence significative par au groupe témoin positif (PZQ)

TN<sub>DMSO</sub> (témoin négatif): souris infestées et non traitées; PZQ (témoin positif): souris infestées et traitées au praziquantel à 100 mg/kg; FAEOp 100; FAEOp 200 et FAEOp 400 (groupes essais): souris infestées et traitées à la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses respectives de 100, 200 et de 400 mg/kg. TSFAEOp 400: souris saines recevant la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* à la dose 400 mg/kg.

#### **III-1-2-2-4. Effets du traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur quelques marqueurs plasmatiques de la fonction hépatique**

Les effets de la fraction à l'acétate d'éthyle de *Ozoroa pulcherrima* sur la fonction hépatique ont été évalués par la détermination de l'activité des transaminases et des concentrations plasmatiques de bilirubine et de protéines totales. Les résultats sont consignés sur le tableau XVIII.

L'infestation par *S. mansoni* a entraîné une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) des activités de l'ASAT et de l'ALAT et de la concentration de la bilirubine totale comparativement aux animaux témoins sains. Par ailleurs, cette infestation a entraîné une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de 37,17 % de la concentration des protéines totales chez les animaux témoins négatifs comparativement aux animaux témoins sains.

Le traitement des souris infestées avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* a induit une baisse significative ( $p < 0,05$  ; et  $p < 0,001$ ) de l'activité de l'ALAT et une réduction significative ( $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ ) de l'activité de l'ASAT aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement comparativement au groupe témoin négatif. Ce traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle de *O. pulcherrima* s'est également traduit par une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de 50,10 % et de 52,82 % de la concentration en bilirubine aux doses respectives de 200 et de 400 mg/kg par rapport au groupe témoin négatif. Cependant, l'administration de la fraction à l'acétate d'éthyle aux souris infestées par *S. mansoni* a entraîné une augmentation significative ( $p < 0,05$  et  $p < 0,001$ ) de 15,31 %, 41,84 % et de 66,33 % de la concentration des protéines totales aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement comparativement aux souris infestées et non traitées. Il est cependant important de noter qu'aucune différence significative n'a été observée entre les animaux du groupe TS et ceux du groupe constitué de souris saines ayant reçues la fraction à la dose de 400 mg/kg.

Par ailleurs, l'administration du praziquantel aux souris infestées a considérablement diminué ( $p < 0,001$ ) les activités de l'ALAT et de l'ASAT et de la concentration en bilirubine totale de 46,06 % comparé à ceux des souris infestées et non traitées. Quant à la concentration des protéines totales, une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de 64,29 % a été observée après traitement avec le praziquantel.

**Tableau XVIII :** Effets de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur quelques paramètres de la fonction hépatique chez les souris infestées par *Schistosoma mansoni*

| Groupes   | Protéines totales (mg/mL) | ASAT (U/mL)                  | ALAT (U/mL)                 | Bilirubine totale (µmol/L) |
|-----------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| TS        | 1,56 ± 0,04               | 278,68 ± 22,97               | 325,82 ± 14,99              | 32,44 ± 1,84               |
| TSOp 400  | 1,55 ± 0,06               | 242,21 ± 12,73               | 330,61 ± 18,40              | 31,01 ± 0,47               |
| TNDMSO    | 0,98 ± 0,05***            | 865,83 ± 78,86***            | 757,98 ± 51,66***           | 69,86 ± 2,43***            |
| PZQ       | 1,61 ± 0,10###            | 267,41 ± 17,77###            | 367,35 ± 2,87###            | 37,68 ± 0,82###            |
| FAEOp 100 | 1,13 ± 0,05 <sup>#</sup>  | 756,85 ± 59,59 <sup>##</sup> | 643,18 ± 38,16 <sup>#</sup> | 63,14 ± 1,84               |
| FAEOp 200 | 1,29 ± 0,08###            | 324,71 ± 20,82###            | 350,40 ± 13,69###           | 34,86 ± 1,66###            |
| FAEOp 400 | 1,63 ± 0,02###            | 280,39 ± 16,40###            | 350,51 ± 18,30###           | 32,96 ± 1,73###            |

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM avec n = 6-7. <sup>#</sup>p<0,05; <sup>\*\*\*</sup>p<0,001: différences significatives par rapport au témoin sain ; <sup>##</sup>p<0,01; <sup>###</sup>p<0,001: différences significatives par rapport au témoin négatif.

TS (témoin sain): souris saines; TNDMSO (témoin négatif): souris infestées et non traitées; PZQ (témoin positif): souris infestées et traitées avec le praziquantel à 100 mg/kg ; FAEOp100, FAEOp200 et FAEOp400 (groupes essais): souris infestées et traitées avec la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses respectives de 100, 200 et de 400 mg/kg. TSAEOp 400: souris saines recevant la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* à la dose 400 mg/kg.

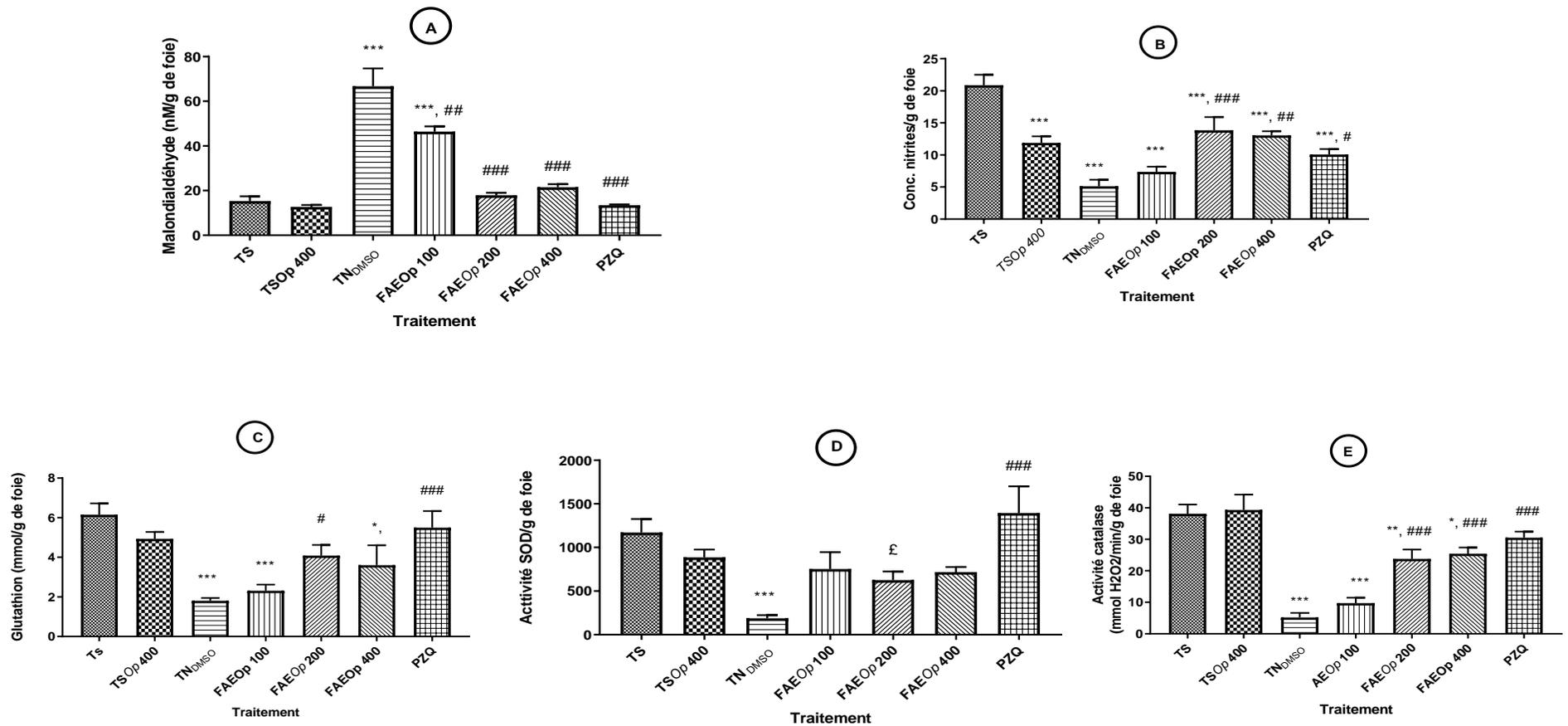
### III-1-2-2-5. Effets du traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur le stress oxydant dans l'infestation par *Schistosoma mansoni*

Les effets du traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle de *O. pulcherrima* sur le stress oxydant des souris infestées par *S. mansoni* ont été déterminés en évaluant au niveau hépatique; les concentrations de malondialdéhyde, de glutathion réduit et des nitrites et les activités enzymatique de la superoxyde dismutase et de la catalase.

L'infestation des souris avec 50 cercaires de *S. mansoni* a entraîné une augmentation significative ( $p<0,001$ ) de 77,07 % de la concentration en malondialdéhyde, tandis qu'une réduction de 70,73 % de la concentration en glutathion réduit, ainsi que de la concentration des nitrites de 75,46 % ( $p<0,001$ ) et des activités enzymatiques de la superoxyde dismutase (SOD) de 83,96 % et de la catalase de 86,35 % chez les animaux du groupe témoin négatif par rapport à ceux des animaux du groupe témoin sain (Figure 37).

Le traitement des souris infestées par *S. mansoni* avec la fraction à l'acétate d'éthyle de *O. pulcherrima* a entraîné une réduction significative ( $p<0,01$  et  $p<0,001$ ) de 26,10 %; 73,20 % et de 67,78 % de la concentration en malondialdéhyde aux doses respectives de 100, 200 et de 400 mg/kg comparativement à celui des animaux du groupe témoin négatif. Par contre, ce traitement a entraîné chez les souris infestées une augmentation significative de 55 % ( $p<0,05$ ) des concentrations en glutathion réduit à la dose de 200 mg/kg, de 63,03 % ( $p<0,001$ ) et de 60,69 % ( $p<0,01$ ) des nitrites hépatiques aux doses respectives de 200 et de 400 mg/kg. De même, une augmentation significative de l'activité enzymatique de la catalase de 78,13 % ( $p<0,001$ ) et de 79,56 % ( $p<0,001$ ) aux doses de 200 et de 400 mg/kg respectivement comparativement au groupe témoin négatif a été observée.

A l'issue du traitement avec le praziquantel, une diminution significative de 79,89 % ( $p<0,001$ ) de la concentration en MDA par rapport aux souris infestées et non traitées a été enregistrée. Cependant, une augmentation significative de 67,24 % ( $p<0,001$ ) des concentrations en glutathion réduit, de 49,31 % ( $p<0,05$ ) et des nitrites et de 86,52 % ( $p<0,001$ ) des activités enzymatiques de SOD et de 82,96 % de la catalase comparé aux souris infestées et non traitées (Figure 37 E).



**Figure 37 :** Effets du traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle de *Ozoroa pulcherrima* sur les concentrations de malondialdéhyde (A), des nitrites (B), de glutathion réduit (C) et sur les activités de la superoxyde dismutase (D) et de la catalase (E).

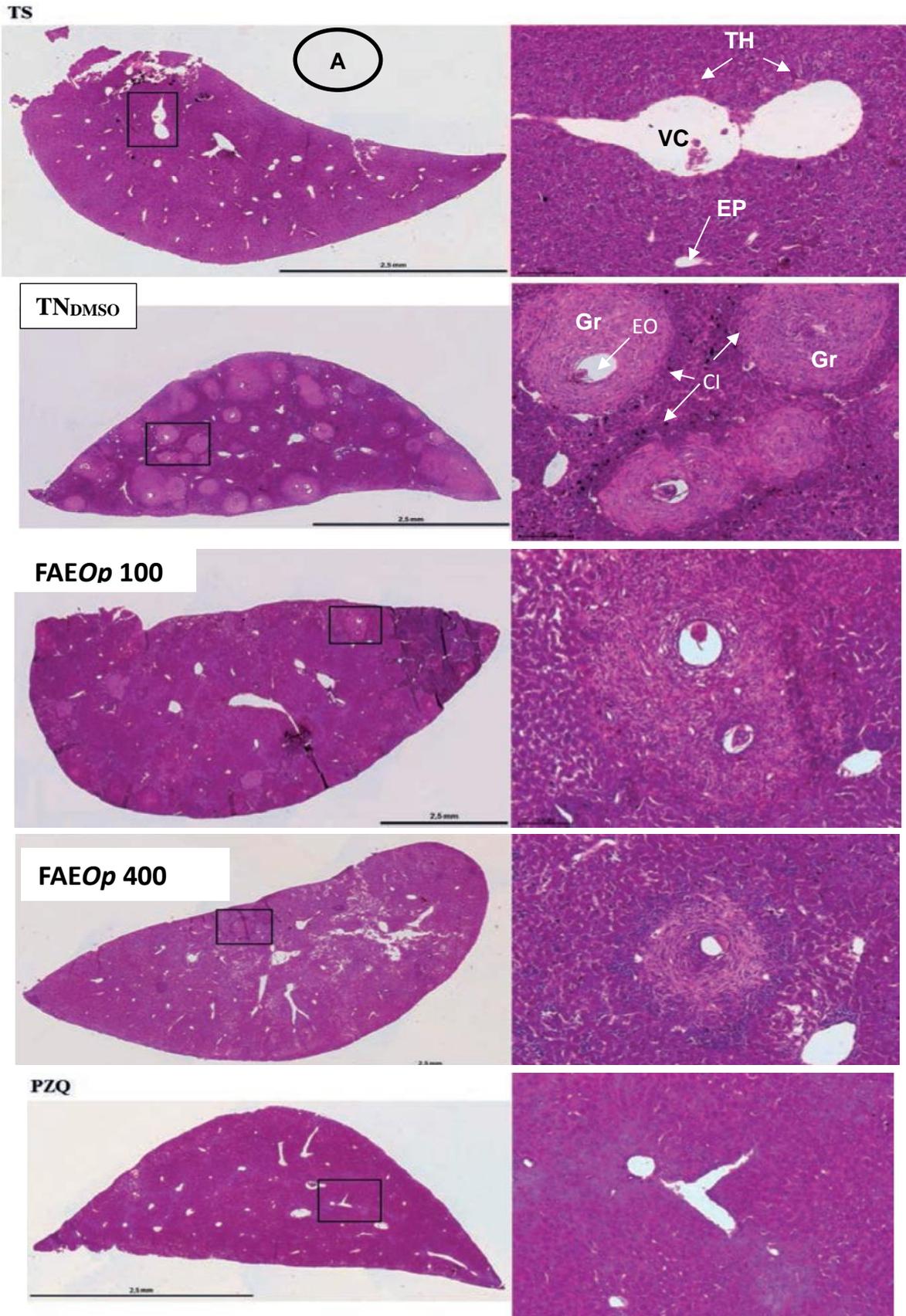
Chaque bande représente la moyenne  $\pm$  ESM avec  $n = 6-7$ . \* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ : différences significatives par rapport au témoin sain; # $p < 0,05$ ; ### $p < 0,01$ ; #### $p < 0,001$ : différences significatives par rapport au témoin négatif, £ $p < 0,05$ : différence significative par rapport au groupe témoin positif (PZQ). **TS** (témoin sain): souris saines; **TN<sub>DMSO</sub>** (témoin négatif): souris infestées et non traitées; **PZQ** (témoin positif): souris infestées et traitées avec le praziquantel à 100 mg/kg; **FAEOp100**, **FAEOp200** et **FAEOp400** (groupes essais): souris infestées et traitées avec la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses respectives de 100, 200 et de 400 mg/kg. **TS FAEOp400**: souris saines recevant la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* à la dose de 400 mg/kg.

### **III-1-2-2-6. Effets du traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur l'histomorphométrie du foie**

Dans cette étude, l'évaluation du potentiel anti-fibrotique de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* dans l'infestation par *S. mansoni* a été faite tant sur l'histologie qualitative (infiltration leucocytaire, réaction granulomateuse, typage de collagène et mise en évidence de miracidium dans les œufs) que sur l'histomorphométrie (numération et volume des granulomes bilharziens) du foie.

#### **III-1-2-2-6-1. Histologie qualitative du foie**

La coloration H&E des coupes de foie des souris saines (TS) montre une structure hépatique normale avec des lobules hépatiques, unités structurelles et fonctionnelles du foie. Chaque lobule est composé de travées d'hépatocytes irriguées par un réseau de capillaires sinusoides qui confluent dans la veine centrolobulaire. Au carrefour de plusieurs lobules, se trouve l'espace porte de Kiernan formé d'une triade constituée par une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte et le canalicule biliaire (Figure 38 A). Chez les souris infestées par *S. mansoni* et non traitées (TN<sub>DMSO</sub>), de nombreux et volumineux granulomes bilharziens associés à une intense infiltration leucocytaire sont visibles sur les coupes de foie colorées à H&E (Figure 38). Par contre, les coupes de foie de souris infestées par *S. mansoni* puis traitées avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* aux doses de 100 et de 400 mg/kg montrent une réduction tant du nombre que du volume des granulomes bilharziens. Il en est de même chez les souris infestées puis traitées avec le praziquantel (PZQ) où les granulomes bilharziens sont pratiquement inexistantes sur les coupes de foie où seules quelques cellules inflammatoires sont visibles (Figure 38).

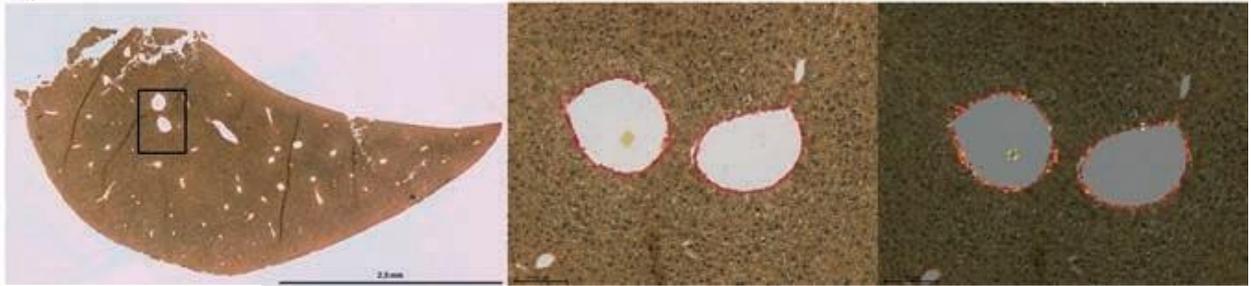


**Figure 38 :** Microphotographies montrant les coupes histologiques du foie de souris colorées à l'Hématoxyline-éosine.

CI : Cellules inflammatoires; Eo : Espace occupé par l'œuf; EP : Espace Porte; FC : Fibre de Collagène; Gr : Granulomes; VC : Veine centrolobulaire et TH : Travées d'Hépatocytes

En outre, la coloration au picrosirius des coupes de foie de souris saines (TS) a permis de visualiser le collagène sous-endothélial coloré en rouge au niveau de la veine centrolobulaire. En polarisation, ce collagène apparaît en rouge-orangé, ce qui atteste que c'est du collagène de type I (Figure 39). La forte densité de collagène de type 1 visibles sur les coupes de foie des souris infestées et non traitées (TN<sub>DMSO</sub>) confirme la présence d'intenses foyers fibrotiques. La polarisation rouge orangé du collagène au niveau des granulomes bilharziens indique que ces nodules parasitaires sont « anciens », c'est-à-dire résultent d'une infection chronique dans le temps (Figure 39). Par contre, une faible densité de collagène et une diminution des nodules parasitaires fibrotiques ont été observés après traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle aux doses de 100 et 400 mg/kg. Les fibres de collagènes sont cependant inexistantes sur le parenchyme hépatique de souris infestées et traitées avec le praziquantel. (Figure 39).

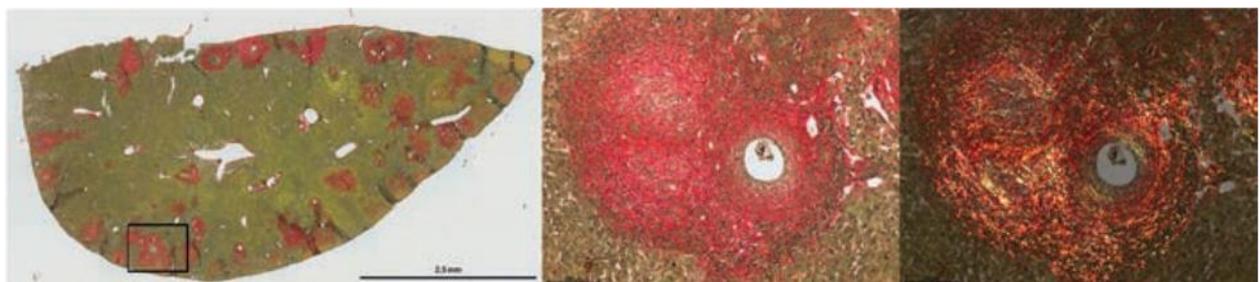
TS



TN<sub>DMSO</sub>



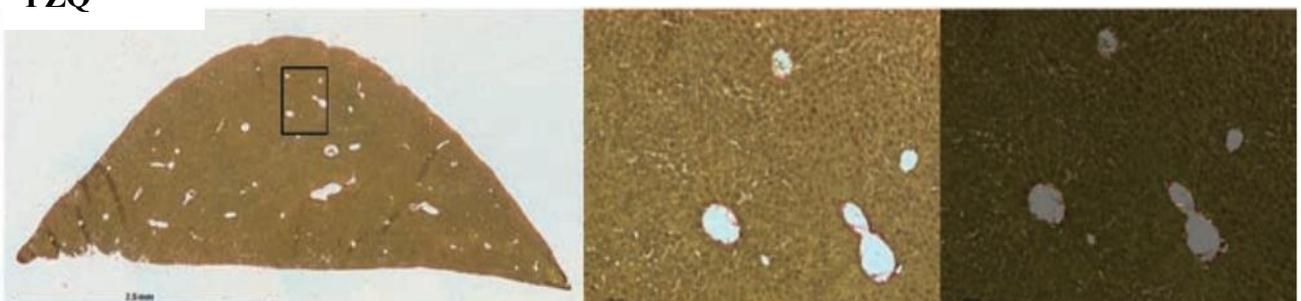
FAE<sub>Op</sub> 100



FAE<sub>Op</sub> 400



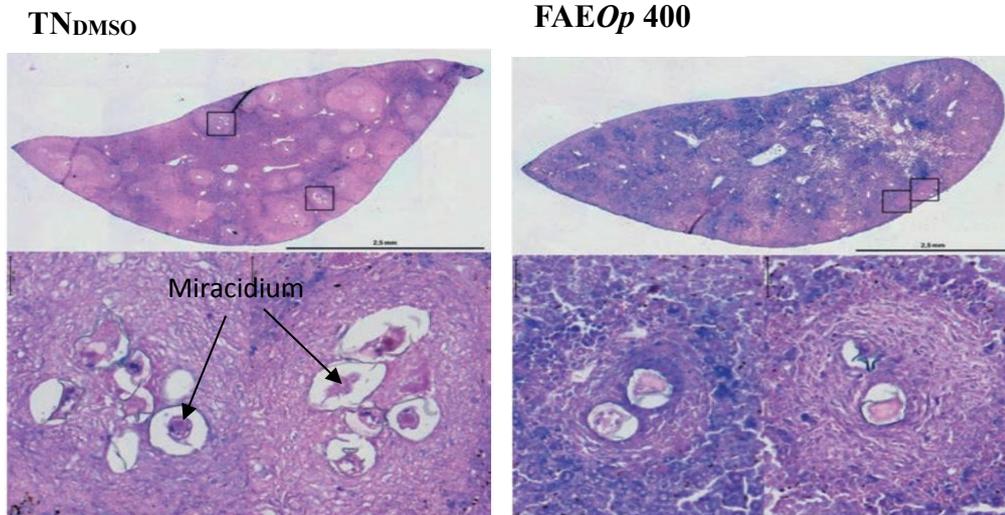
PZQ



**Figure 39** : Microphotographies montrant des coupes histologiques du foie de souris infestées colorées au Picrosirius.

CI : Cellules inflammatoires; Eo : Espace occupé par l'œuf; EP : Espace Porte; FC : Fibre de Collagène;  
Gr : Granulomes; VC : Veine centrolobulaire et TH : Travées d'Hépatocytes

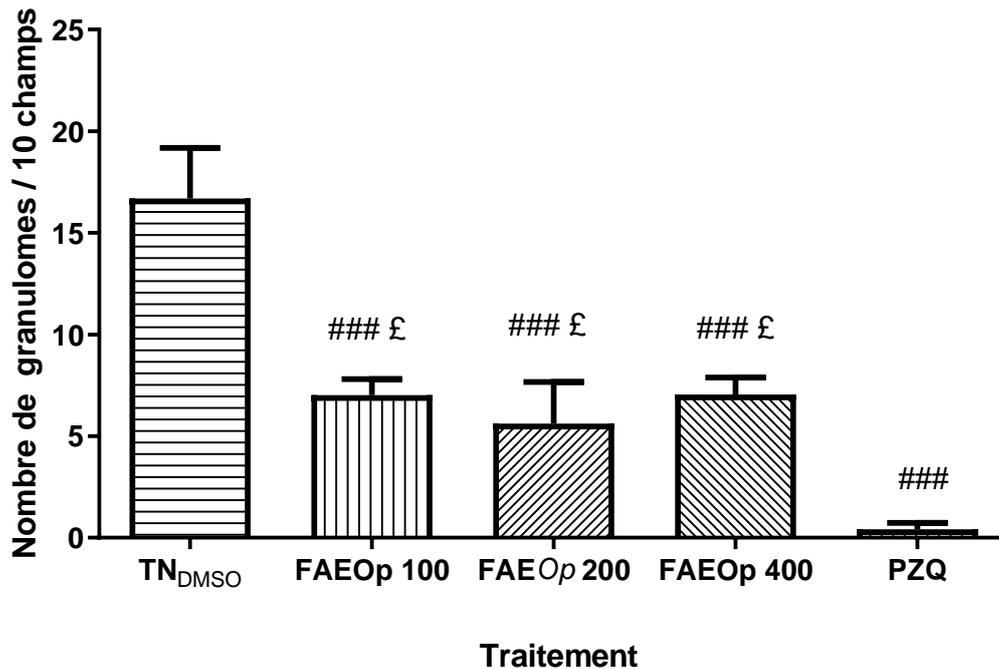
La mise en évidence des œufs encapsulés dans les nodules parasitaires et renfermant la larve miracidium sur les coupes de foie a été faite grâce à la coloration de Giemsa. A l'issue du traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle à la dose de 400 mg/kg, une diminution du nombre d'œufs du parasite a été observée (Figure 40).



**Figure 40** : Microphotographies montrant les coupes histologiques du foie de souris infestées par *Schistosoma mansoni* colorées au Giemsa.

### III-1-2-2-6-2. Nombre de granulome bilharzien dans le foie des souris infestées par *Schistosoma mansoni* puis traitées

L'évaluation du nombre de granulomes a été faite pour chaque coupe de foie. Chez les souris infestées par *S. mansoni* puis traitées avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima*, une réduction significative de 57,94 % ( $p < 0,001$ ), de 66,39 % ( $p < 0,001$ ) et de 57,82 % ( $p < 0,001$ ) du nombre de granulomes aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement comparativement aux souris infestées et non traitées (TN<sub>DMSO</sub>) a été observée. Chez les animaux infestés et traités au praziquantel, une baisse significative de 97,48 % ( $p < 0,001$ ) du nombre de granulome a été obtenue. (Figure 41).

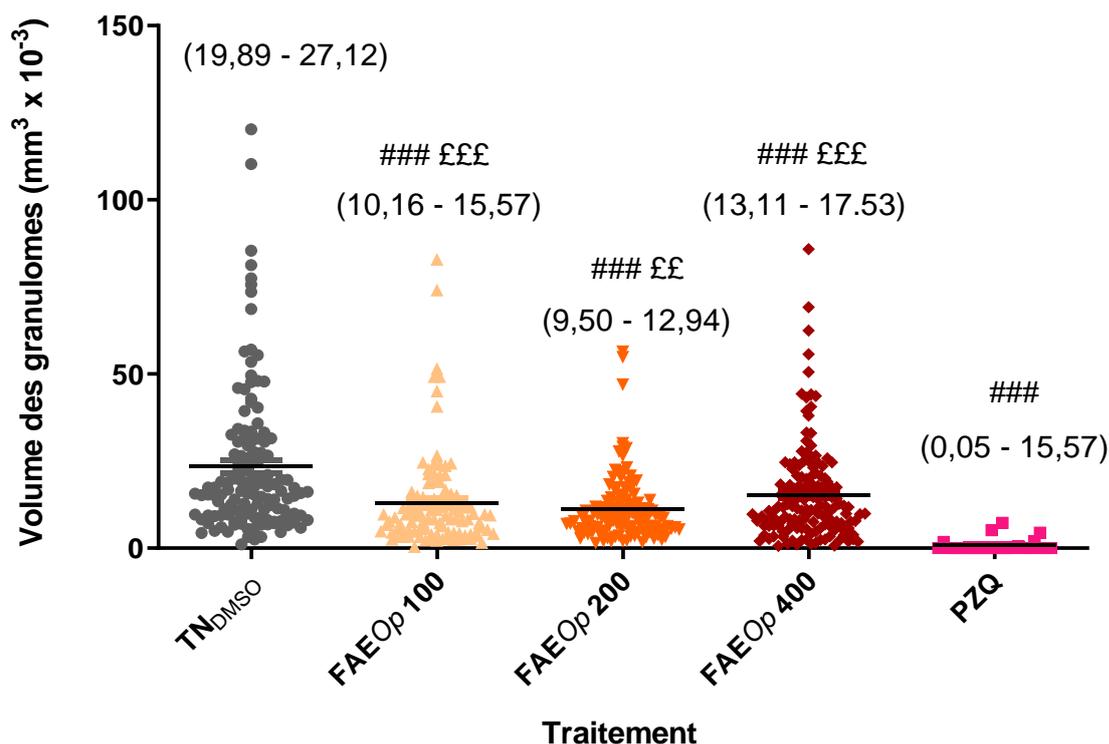


**Figure 41** : Effets du traitement avec la fraction de l'acétate d'éthyle de l'extrait méchanolique sur le nombre de granulomes hépatique des souris infestées par *Schistosoma mansoni*.

Chaque histogramme représente la moyenne  $\pm$  ESM avec  $n = 6-7$ . # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  ; ### $p < 0,001$ : différences significatives par rapport au témoin négatif, £ $p < 0,05$  : différence significative par rapport au groupe témoin positif (PZQ) TN<sub>DMSO</sub> (témoin négatif): souris infestées et non traitées; PZQ (témoin positif): souris infestées et traitées avec le praziquantel à 100 mg/kg ; FAEOp100, FAEOp200 et FAEOp400 (groupes essais): souris infestées et traitées avec la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses respectives de 100, 200 et 400 mg/kg.

### III-1-2-6-3. Volume des granulomes bilharziens dans le foie des souris infestées par *Schistosoma mansoni* puis traitées

Le volume des granulomes a été réalisé sur un minimum de 20 granulomes renfermant un œuf de *S. mansoni* par souris. Comme représenté sur la figure 42, l'administration de la fraction à l'acétate d'éthyle de *O. pulcherrima* chez les souris infestées par *S. mansoni* a entraîné une régression significative ( $p < 0,001$ ) de 45,28 %, de 52,25 % et de 34,81 % du volume des granulomes bilharziens du foie des souris infestées et traitées avec la fraction à l'acétate d'éthyle aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement par rapport à celui des souris du groupe témoin négatif.



**Figure 42 : Effets du traitement avec la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique sur le volume des granulomes hépatiques des souris infestées par *Schistosoma mansoni*.**

Chaque histogramme représente la moyenne  $\pm$  ESM avec  $n = 6-7$ . # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  ; ### $p < 0,001$ : différences significatives par rapport au témoin négatif, ££ $p < 0,01$  et £££ $p < 0,001$ : différences significatives par rapport au groupe témoin positif (PZQ)

TN<sub>DMSO</sub> (témoin négatif): souris infestées et non traitées; PZQ (témoin positif): souris infestées et traitées avec le praziquantel à 100 mg/kg ; FAEOp100, FAEOp200 et FAEOp400 (groupes essais): souris infestées et traitées avec la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses respectives de 100, 200 et 400 mg/kg.

### III-1-3. Résultats de l'étude de toxicité de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima*

#### III-1-3-1. Résultats de l'étude de toxicité orale aigue-méthode d'ajustement des doses de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima*

L'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* aux doses de 2000 et de 5000 mg/kg n'a pas entraîné de mortalité chez les souris traitées. De même, aucun signe de toxicité externe n'a été observé pendant les semaines d'observation, ni même une anomalie macroscopique des organes internes à la fin de la période d'observation. Par ailleurs, aucune modification du poids corporel et du poids relatif des organes n'a été observée chez les souris traitées avec l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* aux doses de 2000 et de 5000 mg/kg comparativement aux animaux du groupe témoin sain (Tableau XIX). La survie de tous les animaux après administration de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* aux doses de 2000 et de 5000 mg/kg permet d'estimer la DL<sub>50</sub> supérieure à la dose de 5000 mg/kg. L'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* serait donc classer dans la catégorie 5 du système global harmonisé (SGH) des substances faiblement toxiques.

**Tableau XIX :** Poids corporel et poids relatifs de quelques organes après administration de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* aux doses de 2000 et de 5000 mg/kg chez la souris

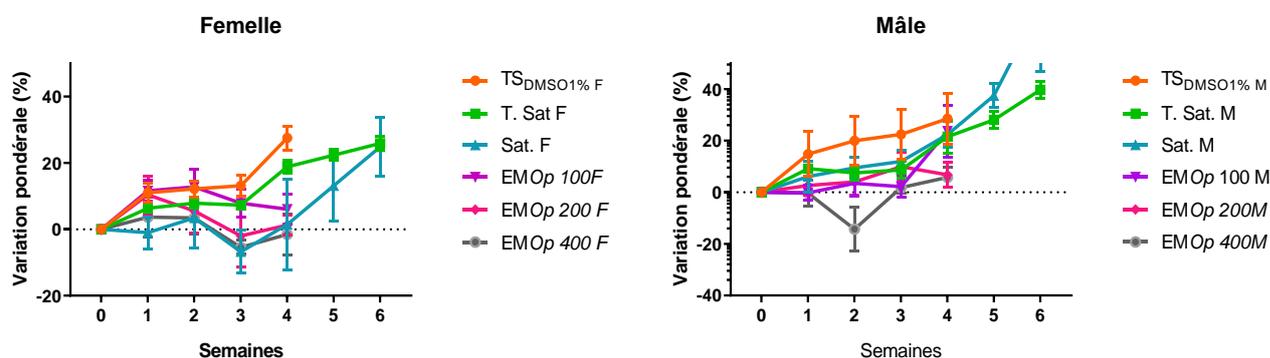
| Groupes            | Poids corporel (g) |             | Poids relatif des organes (g/100g du poids corporel) |            |             |             |            |             |                             |
|--------------------|--------------------|-------------|--|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-----------------------------|
|                    | Poids Initial      | Poids Final | Foie   | Poumons    | Reins       | Coeur       | Estomac    | Rate        | Ovaires (10 <sup>-2</sup> ) |
| <b>Témoin</b>      | 22,93± 0,09        | 25,85± 0,80 | 4,55± 0,13   | 0,69± 0,02 | 0,91 ± 0,03 | 0,44 ±0,02  | 0,71 ±0,06 | 0,32 ±0,02  | 3,88 ±0,10                  |
| <b>2000 mg/kg.</b> | 24,14± 0,17        | 26,53± 0,57 | 5,38± 0,38   | 0,65 ±0,02 | 1,08 ± 0,07 | 0,44 ± 0,03 | 0,63 ±0,06 | 0,40 ± 0,01 | 3,77 ±0,10                  |
| <b>5000 mg/kg</b>  | 24,16± 0,37        | 27,34± 0,91 | 4,44 ±0,53   | 0,62 ±0,08 | 1,04 ± 0,06 | 0,42 ± 0,01 | 0,77 ±0,08 | 0,40 ± 0,04 | 3,66 ±0,10                  |

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM avec n = 3. Témoin : souris saines; 2000 mg/kg (essai): souris recevant l'extrait à la dose de 2000 mg/kg; 5000 mg/kg (essai): souris recevant l'extrait à la dose de 5000 mg/kg.

### III-1-3-2. Résultats de l'étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours chez les souris ayant reçues l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima*

#### III-1-5-2-1. Effets de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur le poids corporel des souris

La variation pondérale des souris femelle et mâle au cours des 6 semaines d'expérimentation (4 semaines d'administration de l'extrait et 2 semaines d'observation pour les groupes satellites) est représentée sur la figure 43. Il en ressort qu'aucune différence significative de gains pondéraux moyens chez les souris mâles et femelles traitées avec l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* n'a été observée comparativement à leurs témoins respectifs.



**Figure 43 :** Effets de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur le poids corporel des souris après 28 jours d'administration.

Chaque point représente le pourcentage du poids moyen  $\pm$  ESM ; n = 6 Témoin : animaux recevant de l'eau distillée ; **EMO100**; **EMOp200** et **EMOp400** Animaux traités avec l'extrait au méthanol de *O. pulcherrima* aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement. **TS<sub>DMSO</sub>** (Témoin sain) : animaux sains ; **T.Sat** (Témoin Satellite) : animaux sains non traités et sacrifiés après 2 semaines d'observation et **Sat.** (Satellite) : animaux traités avec l'extrait méthanolique à la dose de 400 mg/kg et sacrifiés après deux semaines d'observation.

#### III-1-3-2-2. Effets de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur le poids relatif de quelques organes

Le tableau XX présente les effets de l'extrait au méthanol des racines de *O. pulcherrima* sur le poids relatif du foie, des poumons, des reins, du cœur, de l'estomac, de la rate, de l'intestin, des testicules et des ovaires. A l'exception de l'augmentation ( $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$ ) du poids relatif des poumons observée chez les souris mâles et femelles traitées respectivement avec les doses de 100 et de 400 mg/kg et du poids relatif de l'ovaire ( $p < 0,05$ ) à la dose de 100 mg/kg, les autres organes n'ont présenté aucune modification statistiquement significative comparés au témoin sain. Les variations ont été restaurées, car aucune différence significative n'a été enregistrée chez les groupes satellites comparés à leurs témoins.

**Tableau XX :** Poids relatifs de quelques organes après administration de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* aux souris pendant 28 jours

| Poids relatif des organes (g/100 g du poids corporel) |                      |                     |                     |                     |                   |                     |
|---|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| Organes   | TS <sub>DMSO1%</sub> | Groupes essai       |                     |                     | Groupes satellite |                     |
|   |                      | EMOp<br>(100 mg/kg) | EMOp<br>(200 mg/kg) | EMOp<br>(400 mg/kg) | Témoin            | EMOp<br>(400 mg/kg) |
| <b>Mâle</b>   |                      |                     |                     |                     |                   |                     |
| <b>Rate</b>   | 0,74 ± 0,06          | 0,62 ± 0,07         | 0,56 ± 0,05         | 0,52 ± 0,09         | 0,7 ± 0,07        | 0,54 ± 0,07         |
| <b>Reins</b>  | 1,48 ± 0,07          | 1,45 ± 0,03         | 1,33 ± 0,07         | 1,27 ± 0,06         | 1,45 ± 0,11       | 1,26 ± 0,04         |
| <b>Poumons</b>  | 0,6 ± 0,03           | 0,76 ± 0,05*        | 0,69 ± 0,04         | 0,62 ± 0,01         | 0,7 ± 0,03        | 0,65 ± 0,04         |
| <b>Coeur</b>  | 0,49 ± 0,05          | 0,51 ± 0,02         | 0,51 ± 0,03         | 0,52 ± 0,02         | 0,44 ± 0,02       | 0,48 ± 0,02         |
| <b>Testicules</b>                                     | 0,53 ± 0,02          | 0,53 ± 0,02         | 0,60 ± 0,02         | 0,56 ± 0,03         | 0,53 ± 0,04       | 0,57 ± 0,04         |
| <b>Foie</b>   | 6,67 ± 0,15          | 6,43 ± 0,24         | 3,01 ± 0,39         | 6,09 ± 0,13         | 5,77 ± 0,35       | 5,69 ± 0,17         |
| <b>Intestin</b>                                       | 4,80 ± 0,22          | 4,11 ± 0,17         | 5,01 ± 0,21         | 5,3 ± 0,38          | 5,10 ± 0,30       | 5,09 ± 0,06         |
| <b>Estomac</b>  | 0,79 ± 0,02          | 0,88 ± 0,03         | 0,80 ± 0,03         | 0,74 ± 0,03         | 0,84 ± 0,04       | 0,88 ± 0,02         |
| <b>Femelle</b>  |                      |                     |                     |                     |                   |                     |
| <b>Rate</b>   | 0,60 ± 0,03          | 0,72 ± 0,13         | 0,72 ± 0,09         | 0,56 ± 0,04         | 0,71 ± 0,05       | 0,60 ± 0,06         |
| <b>Reins</b>  | 1,26 ± 0,02          | 1,28 ± 0,03         | 1,14 ± 0,05         | 1,33 ± 0,04         | 1,42 ± 0,11       | 1,21 ± 0,03         |
| <b>Poumons</b>  | 0,73 ± 0,02          | 0,89 ± 0,09         | 0,94 ± 0,07         | 1,26 ± 0,21**       | 0,75 ± 0,01       | 0,81 ± 0,05         |
| <b>Estomac</b>  | 0,87 ± 0,03          | 0,96 ± 0,04         | 0,98 ± 0,10         | 0,93 ± 0,03         | 0,87 ± 0,03       | 0,96 ± 0,02         |
| <b>Coeur</b>  | 0,51 ± 0,03          | 0,53 ± 0,03         | 0,53 ± 0,03         | 0,60 ± 0,07         | 0,50 ± 0,01       | 0,48 ± 0,03         |
| <b>Foie</b>   | 6,54 ± 0,29          | 6,19 ± 0,17         | 6,96 ± 0,36         | 6,06 ± 0,40         | 5,74 ± 0,17       | 5,86 ± 0,21         |
| <b>Intestin</b>                                       | 6,13 ± 0,45          | 6,27 ± 0,41         | 6,4 ± 0,22          | 5,11 ± 0,57         | 5,09 ± 0,12       | 5,71 ± 0,19         |
| <b>Ovaires</b>  | 0,047 ± 0,01         | 0,024 ± 0,00*       | 0,03 ± 0,00         | 0,04 ± 0,01         | 0,04 ± 0,00       | 0,043 ± 0,00        |

Les valeurs représentent les moyennes ± ESM ; n = 6 ; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , différence significative par rapport au groupe témoin sain (TS<sub>DMSO</sub>)

Témoin : animaux recevant de l'eau distillée ; **EMOp100**; **EMOp200** et **EMOp400** Animaux traités avec l'extrait au méthanol de *O. pulcherrima* aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement. **TS<sub>DMSO1%</sub>** (Témoin sain) : animaux sains recevant le DMSO1% ; **T.Sat** (Témoin Satellite) : animaux sains non traités et sacrifiés après 2 semaines d'observation et **Sat.** (Satellite) : animaux traités avec l'extrait méthanolique à la dose de 400 mg/kg et sacrifiés après deux semaines d'observation.

### III-1-3-2-3. Effets de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur les paramètres hématologiques

Les effets de l'extrait au méthanol des racines de *O. pulcherrima* sur les paramètres hématologiques sont présentés dans le tableau XXI.

A l'exception de la baisse significative ( $p < 0,05$ ) du taux de globules blancs enregistré chez les femelles du groupe satellite ayant reçu la dose de 400 mg/kg, aucune modification véritable

dans d'autres groupes n'a été noté entre les taux moyens des différents paramètres hématologiques évalués chez les animaux des deux sexes traités comparés à ceux des groupes témoins correspondants. Par ailleurs, aucune différence significative de ces paramètres n'a été observée chez les souris du groupe satellite comparativement au groupe témoin satellite.

**Tableau XXI :** Paramètres hématologiques des souris après administration de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* pendant 28 jours

| Parameters                 | TS <sub>DMSO1%</sub> | Groupes essai       |                    |                    | Groupes satellite |                     |
|----------------------------|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
|                            |                      | EMOp<br>(100 mg/kg) | EMOP<br>(200mg/kg) | EMOP<br>(400mg/kg) | Témoin            | EMOP<br>(400 mg/kg) |
| <b>Mâle</b>                |                      |                     |                    |                    |                   |                     |
| GR (10 <sup>6</sup> /μL)   | 7,73 ± 0,19          | 8,07 ± 0,27         | 10,90 ± 1,24       | 8,81 ± 0,50        | 6,51 ± 1,00       | 6,85 ± 0,64         |
| HGB (mg/dL)                | 14,75 ± 0,52         | 14,63 ± 0,54        | 17,53 ± 2,41       | 13,98 ± 0,26       | 9,38 ± 0,92       | 10,53 ± 1,02        |
| HCT (%)                    | 39,38 ± 1,73         | 41,45 ± 1,70        | 52,7 ± 6,51        | 43,33 ± 3,28       | 34,26 ± 3,68      | 38,75 ± 4,10        |
| CCMH (g/dL)                | 36,05 ± 0,88         | 35,36 ± 0,62        | 32,23 ± 1,17       | 32,13 ± 2,30       | 30,56 ± 2,31      | 27 ± 2,25           |
| TGMH (pg)                  | 18,33 ± 0,60         | 18,13 ± 0,45        | 15,88 ± 0,87       | 16 ± 0,94          | 14,64 ± 1,05      | 13,48 ± 0,98        |
| VGM (fl)                   | 51 ± 1,38            | 51,33 ± 1,17        | 49,33 ± 1,33       | 49,50 ± 1,04       | 50 ± 1,00         | 49 ± 12,30          |
| GB (10 <sup>3</sup> /μL)   | 7,68 ± 0,89          | 7,40 ± 0,99         | 7,83 ± 0,81        | 7,98 ± 1,74        | 4,16 ± 0,30       | 4,05 ± 0,38         |
| LYM (10 <sup>3</sup> /μL)  | 4,84 ± 0,88          | 5,46 ± 0,79         | 7,13 ± 0,61        | 6,70 ± 2,25        | 3,54 ± 0,43       | 3,73 ± 0,41         |
| Mono (10 <sup>3</sup> /μL) | 360 ± 74,83          | 625 ± 94,65         | 580 ± 96,95        | 500 ± 115,47       | 250 ± 74,83       | 125 ± 25,00         |
| GRA (10 <sup>3</sup> /μL)  | 0,70 ± 0,15          | 0,90 ± 0,07         | 0,57 ± 0,23        | 0,70 ± 0,12        | 0,36 ± 0,81       | 0,20 ± 0,08         |
| PLA (10 <sup>3</sup> /μL)  | 622,20 ± 74,33       | 658,50±88,07        | 431,33±72,67       | 541,75±104,31      | 481,80±71,68      | 453,60±84,81        |
| <b>Femelle</b>             |                      |                     |                    |                    |                   |                     |
| GR (10 <sup>6</sup> /μL)   | 8,07 ± 0,56          | 8,62 ± 0,38         | 7,43 ± 0,71        | 7,43 ± 1,06        | 7,85 ± 0,49       | 7,41 ± 0,43         |
| HGB (mg/dL)                | 13,52 ± 1,01         | 14,33 ± 0,52        | 11,8 ± 1,9         | 12,95 ± 1,61       | 12,52 ± 0,42      | 11,77 ± 0,66        |
| HCT (%)                    | 40,34 ± 3,52         | 42,43 ± 2,28        | 37,3 ± 4,58        | 30,13 ± 6,94       | 39,48 ± 3,89      | 38,5 ± 2,87         |
| CCMH (g/dL)                | 33,66 ± 0,74         | 33,95 ± 0,59        | 33,63 ± 0,99       | 34,3 ± 0,91        | 31,94 ± 1,4       | 30,93 ± 2,37        |
| TGMH (pg)                  | 16,72 ± 0,30         | 16,75 ± 0,41        | 16,77 ± 0,23       | 16,55 ± 0,42       | 15,46 ± 0,94      | 16,06 ± 0,84        |
| VGM (fl)                   | 49,8 ± 1,88          | 49,33 ± 1,36        | 50 ± 2,08          | 51,25 ± 1,03       | 49,8 ± 0,86       | 51,57 ± 0,97        |
| GB (10 <sup>3</sup> /μL)   | 9,62 ± 0,74          | 8,16 ± 1,03         | 7,53 ± 1,09        | 5,15 ± 1,13        | 5,24 ± 0,58       | 4,43 ± 0,62*        |
| LYM (10 <sup>3</sup> /μL)  | 7,6 ± 0,54           | 8,02 ± 0,86         | 6,43 ± 0,99        | 4,20 ± 1,13        | 4,64 ± 0,63       | 3,96 ± 0,58         |
| Mono (10 <sup>3</sup> /μL) | 0,63 ± 0,06          | 0,70 ± 0,12         | 0,57 ± 0,09        | 0,43 ± 0,075       | 0,22 ± 0,04       | 0,17 ± 0,05         |
| GRA (10 <sup>3</sup> /μL)  | 0,75 ± 0,10          | 0,74 ± 0,20         | 0,53 ± 0,13        | 0,53 ± 0,08        | 0,38 ± 0,06       | 0,33 ± 0,11         |
| PLA (10 <sup>3</sup> /μL)  | 773,83 ± 62,90       | 660,33±98,84        | 932 ± 98,54        | 716,71 ± 22,92     | 458,80 ± 53,20    | 545,20± 70,15       |

% Var.= pourcentage de variation ; les valeurs représentent les moyennes ± ESM ; n = 6 ; \*p<0,05, \*\*p<0,01 : différences significatives par rapport au groupe témoin sain (TS<sub>DMSO</sub>) Témoin : animaux recevant de l'eau distillée ; EMO<sub>p100</sub>, EMO<sub>p200</sub> et EMO<sub>p400</sub> Animaux traités avec l'extrait au méthanol de *O. pulcherrima* aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement GB= Globules blancs, GR= Globules rouges, HGB= Hémoglobine, HCT= Hématocrite, LYM= Lymphocytes, GRA= Granulocytes, MONO= Monocytes, PLA= Plaquettes sanguines, CCMH= Concentration moyenne d'hémoglobine dans les érythrocytes, TGMH= Concentration moyenne d'hémoglobine, VGM= volume moyen de globule rouge

### III-1-3-2-4. Effets de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur quelques paramètres biochimiques

Les effets de l'extrait au méthanol de *O. pulcherrima* sur quelques paramètres biochimiques sont présentés dans le tableau XXII.

Après 28 jours d'administration de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* chez les souris mâles, aucune différence significative de l'activité des transaminases (ALAT et ASAT), des

concentrations des protéines totales, des triglycérides et du cholestérol total n'a été observée chez les souris mâles traitées aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg comparativement au groupe témoin sain. De même, aucune différence significative n'a été notée chez le lot satellite mâle traité à la dose de 400 mg/kg comparé au témoin satellite mâle.

Chez les femelles par contre, on note une augmentation significative de 15,81% ( $p < 0,05$ ) du taux de cholestérol total chez les souris ayant reçues l'extrait à la dose de 100 mg/kg comparé au témoin sain. Cependant, aucune différence significative n'a été observée chez les animaux du groupe satellite femelle traité à la dose de 400 mg/kg comparé au témoin satellite femelle.

**Tableau XXII :** Paramètres biochimiques chez les souris après administration de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* pendant vingt-huit jours

| Paramètres                      | TS <sub>DMSO</sub> 1% | Groupes essai        |                     |                      | Groupes satellite |                                   |
|---------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|-------------------|-----------------------------------|
|                                 |                       | E MOp<br>(100 mg/kg) | EMOp<br>(200 mg/kg) | E Mop<br>(400 mg/kg) | Témoin            | E MOp<br>(40 <sup>20</sup> mg/kg) |
| <b>Mâle</b>                     |                       |                      |                     |                      |                   |                                   |
| ALAT<br>(U/mL)                  | 340,46 ± 15,86        | 324,03 ± 12,99       | 294,09 ± 62,29      | 394,57 ± 28,30       | 323,06 ± 24,59    | 336,73 ± 20,49                    |
| ASAT<br>(U/mL)                  | 2370,80±224,95        | 2178±210,95          | 2291,50±189,47      | 2330,20±233,39       | 2392,80 ±158      | 2419,5 ± 228,78                   |
| Protéines<br>totales<br>(mg/mL) | 8,09 ± 0,70           | 7,82 ± 0,75          | 8,26 ± 0,60         | 9,10 ± 1,33          | 5,78 ± 0,52       | 5,39 ± 0,60                       |
| Triglycerides<br>(mg/dL)        | 4,25 ± 0,35           | 4,03 ± 0,20          | 4,16 ± 0,17         | 3,88 ± 0,26          | 4,09 ± 0,20       | 3,79 ± 0,14                       |
| Cholestérol<br>total<br>(mg/dL) | 18,17 ± 1,04          | 17,15 ± 2,88         | 18,54 ± 2,02        | 16,95 ± 2,53         | 11,35 ± 1,09      | 11,07 ± 1,11                      |
| <b>Femelle</b>                  |                       |                      |                     |                      |                   |                                   |
| ALAT<br>(U/mL)                  | 418,37 ± 31,05        | 306,09 ± 21,60       | 295,29 ± 26,05      | 314,07 ± 21,60       | 324,61 ± 26,08    | 344,54 ± 12,28                    |
| ASAT<br>(U/mL)                  | 2452,20±162,49        | 2312,10±152,19       | 2655,10±218,2       | 2442,40±278,78       | 2140,80±172,14    | 2452,20±162,49                    |
| Protéines<br>totals<br>(mg/mL)  | 8,46 ± 0,96           | 8,90 ± 0,45          | 8,46 ± 0,96         | 8,26 ± 0,75          | 9,24 ± 0,29       | 8,61 ± 0,75                       |
| Triglycerides<br>(mg/dL)        | 4,08 ± 0,30           | 4,66 ± 0,49          | 3,97 ± 0,21         | 4,51 ± 0,18          | 3,75 ± 0,13       | 4,25 ± 0,39                       |
| Cholesterol<br>total<br>(mg/dL) | 8,91 ± 0,84           | 18,28 ± 2,81*        | 14,77 ± 2,20        | 16,67 ± 3,51         | 12,28 ± 1,32      | 12,49 ± 1,70                      |

Les valeurs représentent les moyennes ± ESM ; n = 4 à 6 ; \**p*<0,05, différence significative par rapport au groupe témoin sain (TS<sub>DMSO</sub>).Témoin : animaux recevant du DMSO1% ; **EMOp100**; **EMOp200** et **EMOp400** Animaux traités avec l'extrait au méthanol de *O. pulcherrima* aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement. **T.Sat** (Témoin Satellite) : animaux sains non traités et sacrifiés après 2 semaines d'observation et **Sat.** (Satellite) : animaux traités avec l'extrait méthanolique à la dose de 400 mg/kg et sacrifiés après deux semaines d'observation.

### III-1-3-2-5. Effets de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur quelques marqueurs du stress oxydant

Les effets de l'administration subaigue de l'extrait méthanolique des racines de *O. pulcherrima* sur quelques marqueurs hépatiques du stress oxydant sont représentés dans le tableau XXIII. Il en ressort qu'aucune modification significative de la concentration de malondialdéhyde, du taux de glutathion réduit, de nitrites et des activités enzymatiques de la superoxyde dismutase et de la catalase n'a été enregistrée chez les souris mâles et femelles traitées comparativement au groupe témoin sain. De même aucune différence significative n'a été observée chez les animaux

des groupes satellites mâle et femelle traités avec la dose de 400 mg/kg comparés à leurs groupes témoins satellites correspondants.

**Tableau XXIII :** Marqueurs hépatiques du stress oxydant après administration de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* chez les souris pendant vingt-huit jours

| Paramètres   | Groupes essai        |                     |                     | Groupes satellite   |                |                     |
|--|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------|---------------------|
|  | TS <sub>DMSO1%</sub> | EMOp<br>(100 mg/kg) | EMOp<br>(200 mg/kg) | EMOp<br>(400 mg/kg) | Témoin         | EMOp<br>(400 mg/kg) |
| <b>Mâle</b>  |                      |                     |                     |                     |                |                     |
| MDA (nmol/g de foie)   | 15,68 ± 7,26         | 19,30 ± 5,60        | 23,01 ± 2,48        | 14,32 ± 3,59        | 8,88 ± 0,83    | 15,25 ± 3,65        |
| GSH (µmol/g de foie)   | 1377,8±284,67        | 1313,4±290,06       | 1225,6±530,78       | 2198,80±80,81       | 1493,50±144,24 | 1462,50±195,73      |
| Nitrites (µmol/g de foie)  | 6,19 ± 1,09          | 5,78 ± 1,31         | 9,84 ± 1,58         | 9,45 ± 2,89         | 7,90 ± 0,37    | 5,26 ± 0,48         |
| CAT (Mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x10 <sup>3</sup> / g de foie) | 5,70 ± 0,50          | 4,27 ± 1,02         | 4,54 ± 0,86         | 5,74 ± 0,36         | 5,86 ± 0,09    | 5,75 ± 0,37         |
| SOD (SOD units/g de foie)  | 115,27 ± 14,97       | 103,03 ± 6,77       | 138,18 ± 44,62      | 108,48 ± 11,58      | 89,09 ± 17,58  | 100,61 ± 9,23       |
| <b>Femelle</b>   |                      |                     |                     |                     |                |                     |
| MDA (nmol/g de foie)   | 16,94 ± 2,04         | 24,26 ± 5,45        | 17,74 ± 1,85        | 19,73 ± 0,80        | 19,15 ± 2,85   | 20,16 ± 1,13        |
| GSH (µmol/g de foie)   | 1193,40±306,66       | 1159±547,19         | 1251,1±485,10       | 1662,60±216,02      | 1105±203,56    | 1606,20±253,88      |
| Nitrite (µmol/g de foie)   | 12,87 ± 3,62         | 15,80 ± 2,07        | 12,44 ± 3,21        | 7,84 ± 1,43         | 8,36 ± 2,30    | 7,29 ± 1,44         |
| CAT (Mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 <sup>3</sup> / g de foie)  | 3,08 ± 0,68          | 3,16 ± 0,86         | 5,27 ± 0,29         | 4,76 ± 0,86         | 4,16 ± 0,48    | 5,12 ± 0,66         |
| SOD (SOD units/g de foie)  | 140±14,98            | 117,45 ± 7,96       | 100,45 ± 4,54       | 101,82 ± 14,41      | 138,18 ± 45,58 | 61,82 ± 25,88       |

Les valeurs représentent les moyennes ± ESM ; n = 4 à 6 ; \**p*<0,05, différence significative par rapport au groupe témoin sain TS<sub>DMSO1%</sub> (Témoin) : animaux recevant du DMSO1% ; EMOp100; EMOp200 et EMOp400 Animaux traités avec l'extrait au méthanol de *O. pulcherrima* aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement. T.Sat (Témoin Satellite) : animaux sains non traités et sacrifiés après 2 semaines d'observation et Sat. (Satellite) : animaux traités avec l'extrait méthanolique à la dose de 400 mg/kg et sacrifiés après deux semaines d'observation.

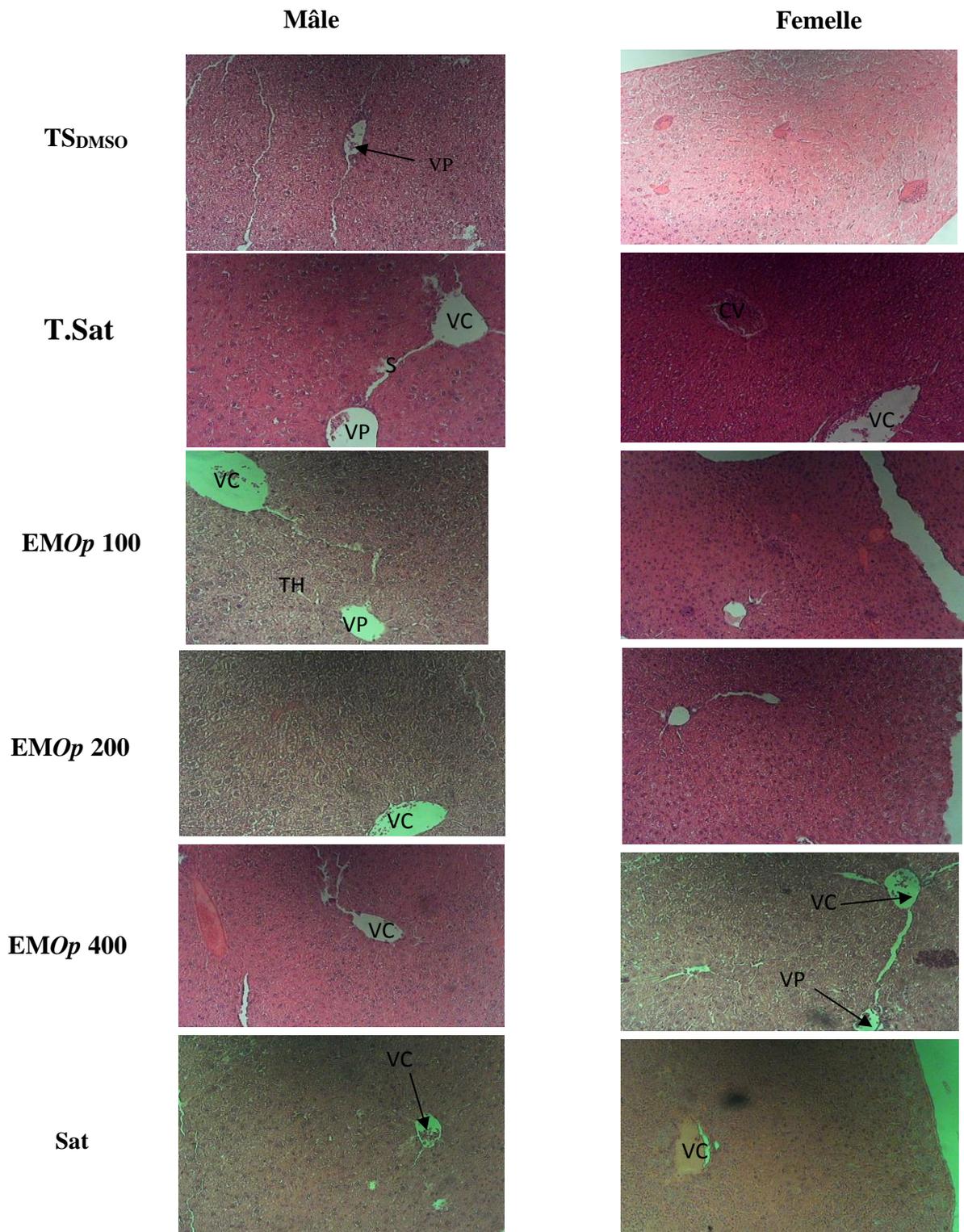
### III-1-3-2-6. Histopathologie de quelques organes (foie, rein, poumon)

L'examen histologique des organes des souris traitées avec l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* pendant 28 jours révèle que le foie des animaux des groupes témoin satellite femelle et essai satellite mâle présente des congestions vasculaires. Cependant, aucune anomalie n'est observable sur le foie des animaux ayant reçus l'extrait à toutes les doses en comparaison aux souris du groupe témoin sain recevant du DMSO 1% (Figure 44).

La figure 45 présente les microphotographies de coupes du rein des animaux ayant survécus jusqu'à la fin de l'essai. Les coupes de reins des souris traitées pendant quatre semaines

à l'extrait méthanolique présentent une architecture comparable à celle des souris témoins sains recevant le DMSO1%.

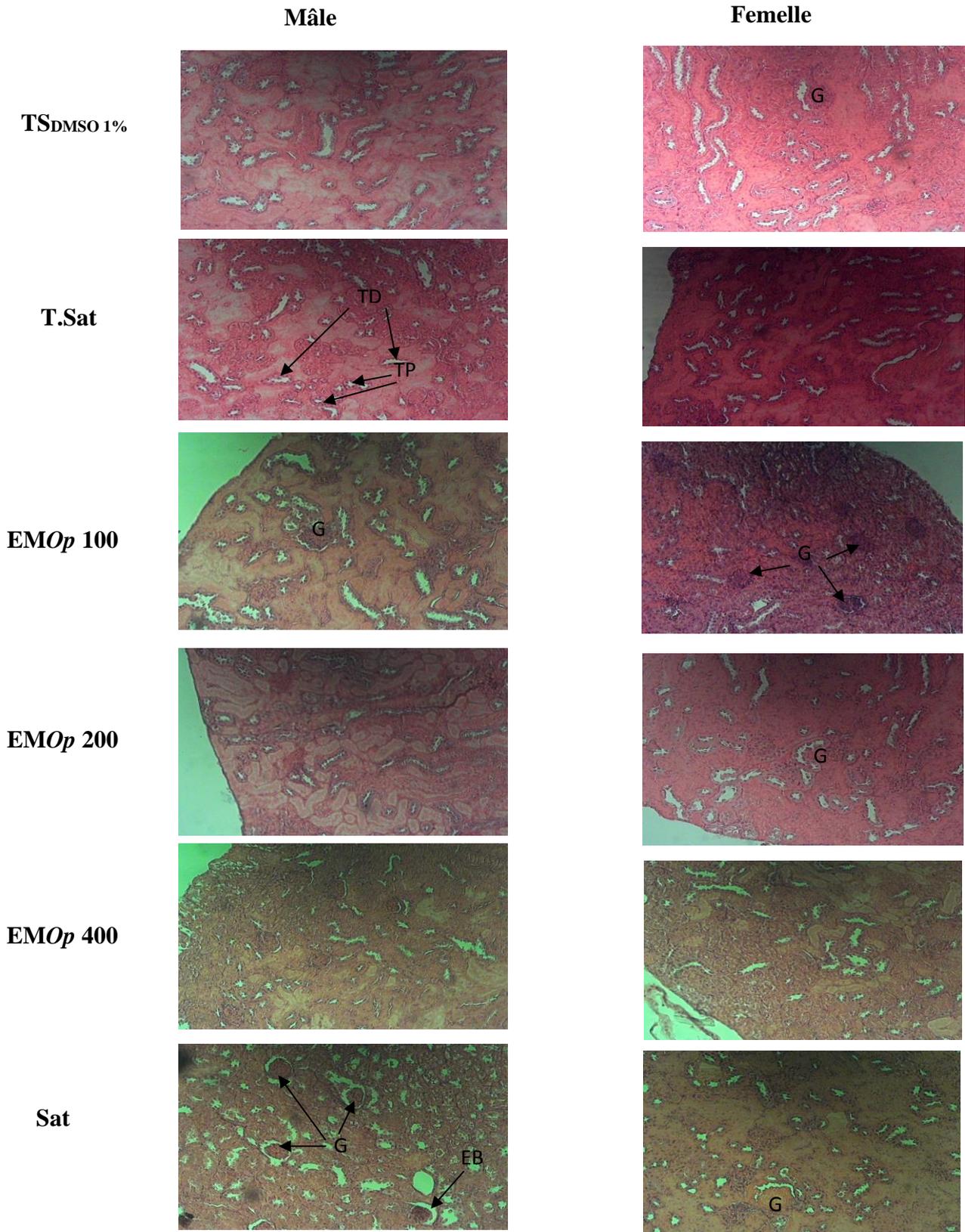
Les coupes de poumon des animaux du groupe témoin et des souris traitées avec l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* sont présentées dans la figure 46. Analyse de ces coupes montre une structure normale et l'absence d'une quelconque lésion pathologique dans les poumons. Toutefois, des infiltrations leucocytaires sont observées dans les poumons des animaux des groupes EMOp 100 et EMOp 400 femelle et du groupe satellite mâle.



**Figure 44 :** Microphotographies des coupes du foie (A) chez les souris ayant reçu l'extrait méthanolique de *Ozorioa pulcherrima* pendant vingt-huit jours (grossissement x 100).

CV=Congestion Vasculaire ; S= Sinusoïdes ; VC= Veine Centro-lobulaire ; VP = Veine porte ; TH= Travée hépatocytaire

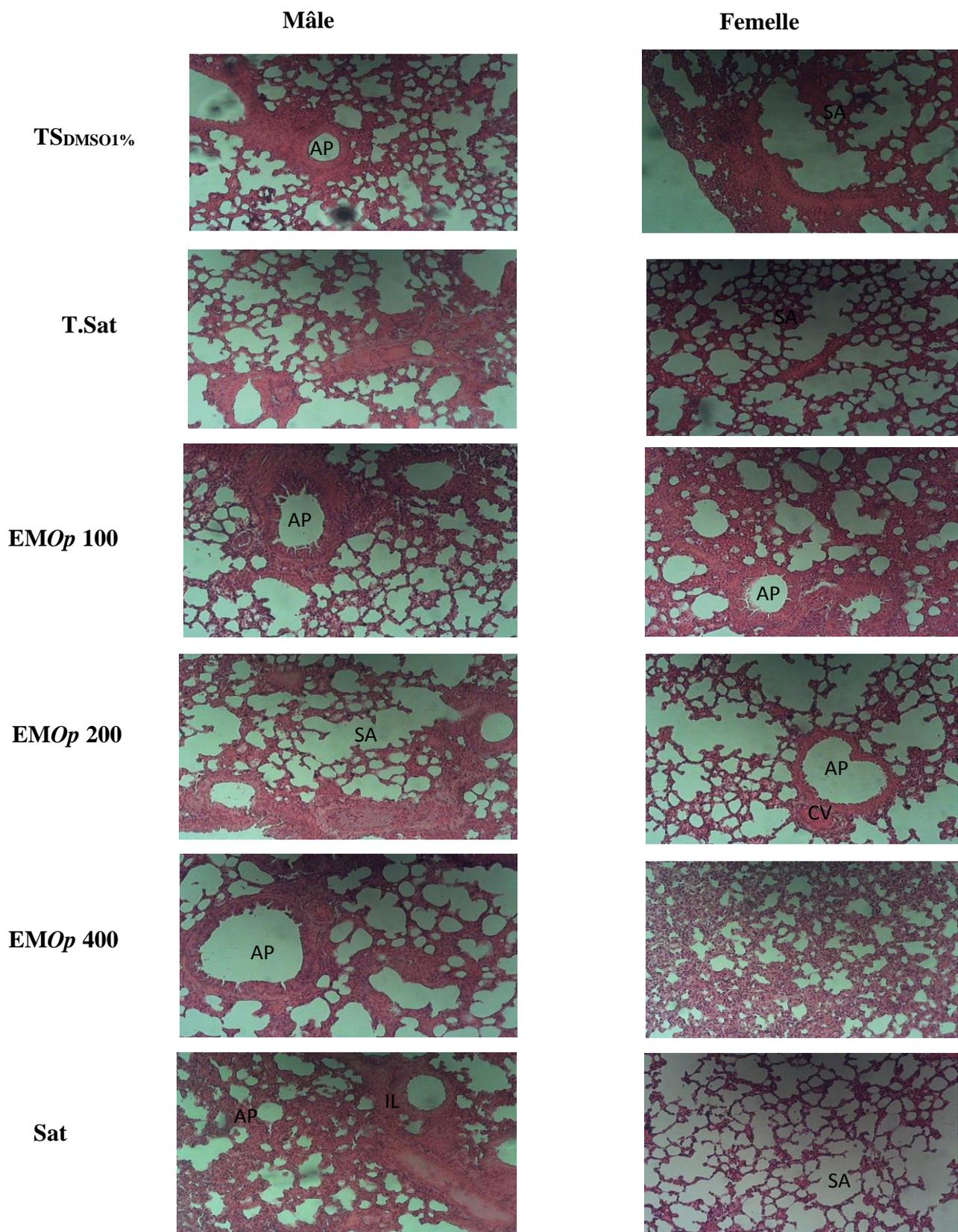
**TS<sub>DMSO</sub>1%** (Témoin) : animaux recevant du DMSO1% ; **EMOp100; EMOp200 et EMOp400** Animaux traités avec l'extrait au méthanol de *O. pulcherrima* aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement. **T.Sat** (Témoin Satellite) : animaux sains non traités et sacrifiés après 2 semaines d'observation et **Sat.** (Satellite) : animaux traités avec l'extrait méthanolique à la dose de 400 mg/kg et



**Figure 45 :** Microphotographies des coupes de reins chez les souris ayant reçu l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* pendant vingt-huit jours (grossissement x100).

G=Glomérule ; EB=Espace de Bowman ; TP=Tube proximal ; TD=Tube distal

**TS<sub>DMSO</sub>1%** (Témoin) : animaux recevant du DMSO1% ; **EMOp100**; **EMOp200** et **EMOp400** Animaux traités avec l'extrait au méthanol de *O. pulcherrima* aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement. **T.Sat** (Témoin Satellite) : animaux sains non traités et sacrifiés après 2 semaines d'observation et **Sat**. (Satellite) : animaux traités avec l'extrait méthanolique à la dose de 400 mg/kg et sacrifiés après deux semaines d'observation.

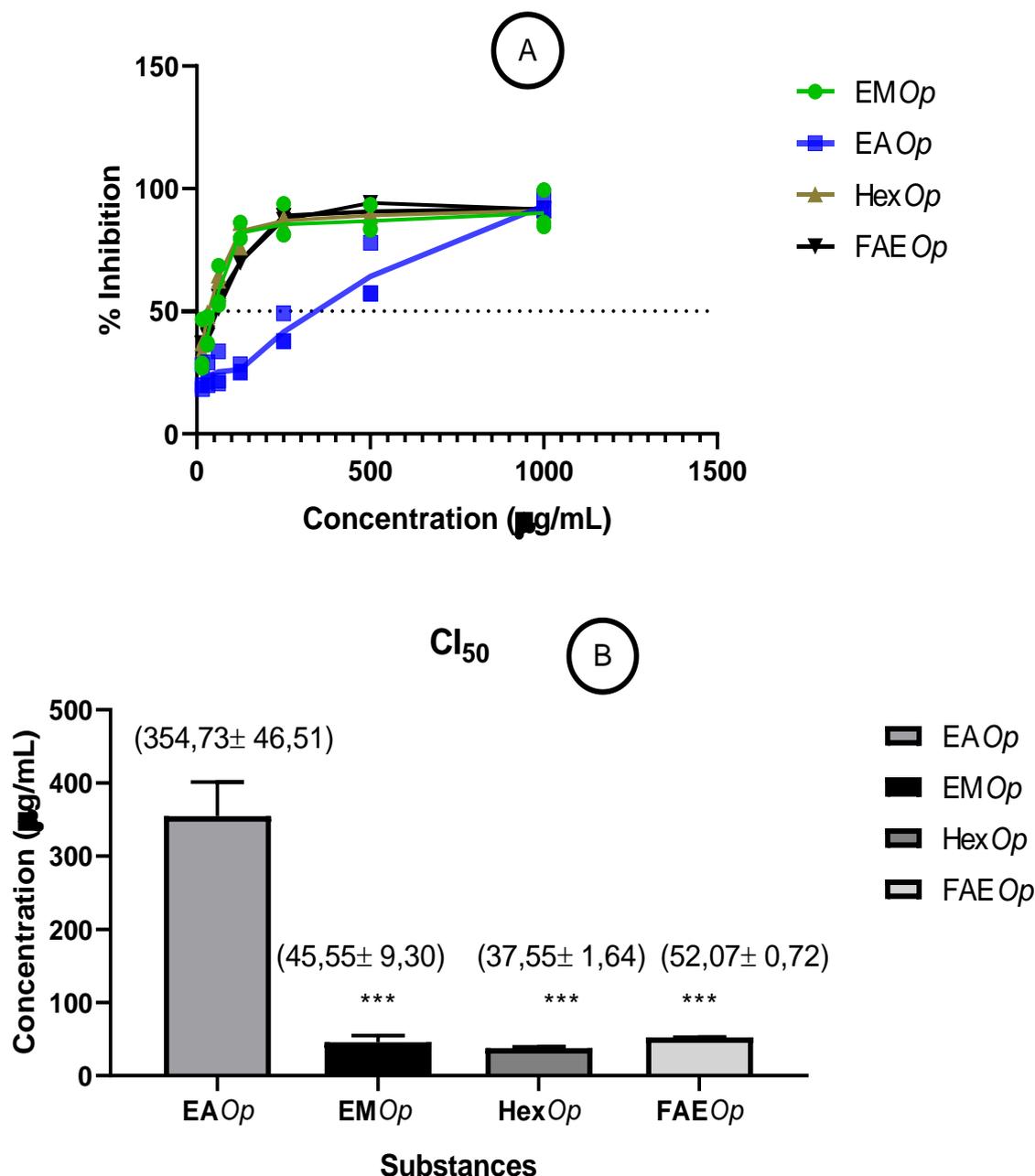


**Figure 46 :** Microphotographies des poumons des souris ayant reçu l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* pendant vingt-huit jours (grossissement x 100).

AP= Artère pulmonaire, CV = Congestion vasculaire ; IL= Infiltration Leucocytaire ; SA= Sac Alvéolaire  
**TS<sub>DMSO</sub>1%** (Témoin) : animaux recevant du DMSO1% ; **EMOp100**; **EMOp200** et **EMOp400** Animaux traités avec l'extrait au méthanol de *O. pulcherrima* aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg respectivement. **T.Sat** (Témoin Satellite) : animaux sains non traités et sacrifiés après 2 semaines d'observation et **Sat**. (Satellite) : animaux traités avec l'extrait méthanolique à la dose de 400 mg/kg et sacrifiés après deux semaines d'observation.

### III-1-3-3. Effets cytotoxiques *in vitro* des extraits aqueux et méthanolique et des fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle de *Ozoroa pulcherrima* sur la lignée cellulaire « Hepa 1-6 »

La cytotoxicité *in vitro* de l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique et les fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* a été évaluée à différentes concentrations (15,625 – 1000 µg/mL) contre les cellules hépatocytaires normales Hepa 1-6 de souris C57/l. Les résultats de la cytotoxicité de ces substances sont présentés sur la figure 47 A. Les pourcentages d'inhibition des extraits et fractions de *O. pulcherrima* ont été concentration-dépendantes. Les courbes dose-réponses des extraits aqueux et méthanolique et des fractions à l'acétate d'éthyle et au *n*-hexane sur les hépatocytes de souris de la lignée Hepa 1-6 ont été utilisées pour déterminer les concentrations inhibitrices 50 (CI<sub>50</sub>) ici présentées dans la figure 47 B. Les concentrations inhibitrices 50 de ces substances étant supérieures à 20 µg/mL, elles ne sont donc pas fortement cytotoxiques contre les hépatocytes Hepa 1-6. Toutefois, ces substances présentent un certain niveau de toxicité, avec la fraction au *n*-hexane étant la plus toxique (CI<sub>50</sub>= 37,55 ± 1,64), suivie de l'extrait méthanolique (CI<sub>50</sub>= 45,55 ± 9,30), de la fraction à l'acétate d'éthyle (CI<sub>50</sub>= 52,07 ± 0,72) et de l'extrait aqueux (CI<sub>50</sub>= 354,73 ± 46,51). Cependant, il est important de noter qu'il existe une différence significative ( $p < 0,001$ ) de l'effet cytotoxique de l'extrait aqueux avec ceux de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et de ses fractions à l'acétate d'éthyle et au *n*-hexane.



**Figure 47 :** Concentrations inhibitrices 50 des extraits aqueux et méthanolique et des fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* sur la lignée cellulaire hepa 1-6.

Les histogrammes représentent les moyennes ± ESM et chaque point de la courbe le pourcentage d'inhibition ; n = 4 à 6 ; \*\*\**p*<0,001, différence significative par rapport à l'extrait aqueux EAOp : extrait aqueux ; EMOp : extrait méthanolique, Hex : fraction à l'hexane de l'extrait méthanolique et FAEOp : fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* ; CI<sub>50</sub> : concentration inhibitrice 50

### III-1-4. Composition phytochimique des extraits aqueux et méthanolique et des différentes fractions de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima*

L'analyse phytochimique qualitative de l'extrait méthanolique et ses différentes fractions a révélé la présence de terpénoïdes, de flavonoïdes, de saponines, de tanins hydrolysables, de

glycosides cardiaques, de lipides et de triterpènes. Par ailleurs, l'analyse phytochimique qualitative de l'extrait aqueux a révélé la présence de flavonoïdes, d'alcaloïdes, de phénols, de saponines de glycosides cardiaques et de lipides. En outre, le résidu méthanolique possède de terpénoïdes, de flavonoïdes, de saponines, de tanins condensés, de phénols de lipides et de triterpènes. (Tableau XXIV).

**Tableau XXIV :** Phytochimie qualitative des extrait et fractions des racines de *Ozoroa pulcherrima*

| Classes de métabolites secondaires | Extrait aqueux | Extrait méthanolique | Fraction au <i>n</i> -hexane | Fraction à l'acétate d'éthyle | Résidu méthanolique |
|------------------------------------|----------------|----------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Sucre réducteur                    | /              | -                    | -                            | +                             | +                   |
| Anthraquinones                     | /              | +                    | +                            | -                             | -                   |
| Terpénoïdes                        | /              | +                    | +                            | +                             | +                   |
| Flavonoïdes                        | +              | +                    | +                            | +                             | +                   |
| Saponines                          | +              | +                    | +                            | +                             | +                   |
| Tanins condensés                   | -              | +                    | -                            | +                             | +                   |
| Alcaloïdes                         | +              | +                    | -                            | -                             | -                   |
| Glucosides cardiaques              | +              | +                    | +                            | +                             | -                   |
| Phénols                            | +              | +                    | -                            | +                             | +                   |
| Lipides                            | +              | +                    | +                            | +                             | +                   |
| Triterpènes                        | -              | +                    | +                            | +                             | +                   |
| Stéroïdes                          | -              | -                    | -                            | -                             | -                   |
| Tanins hydrolysables               | -              | +                    | +                            | +                             | -                   |

(-) Absent ; (+) Présent ; (/) Non évalué.

Par ailleurs, les quantités de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de protéines totales ont été déterminées et les résultats sont présentés dans le tableau XXV ci-dessous. Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols totaux, flavonoïdes et protéines totales que les fractions à l'acétate d'éthyle, au *n*-hexane et le résidu méthanolique. Cependant, la fraction au *n*-hexane est la fraction la plus pauvre en ces différentes classes de composés.

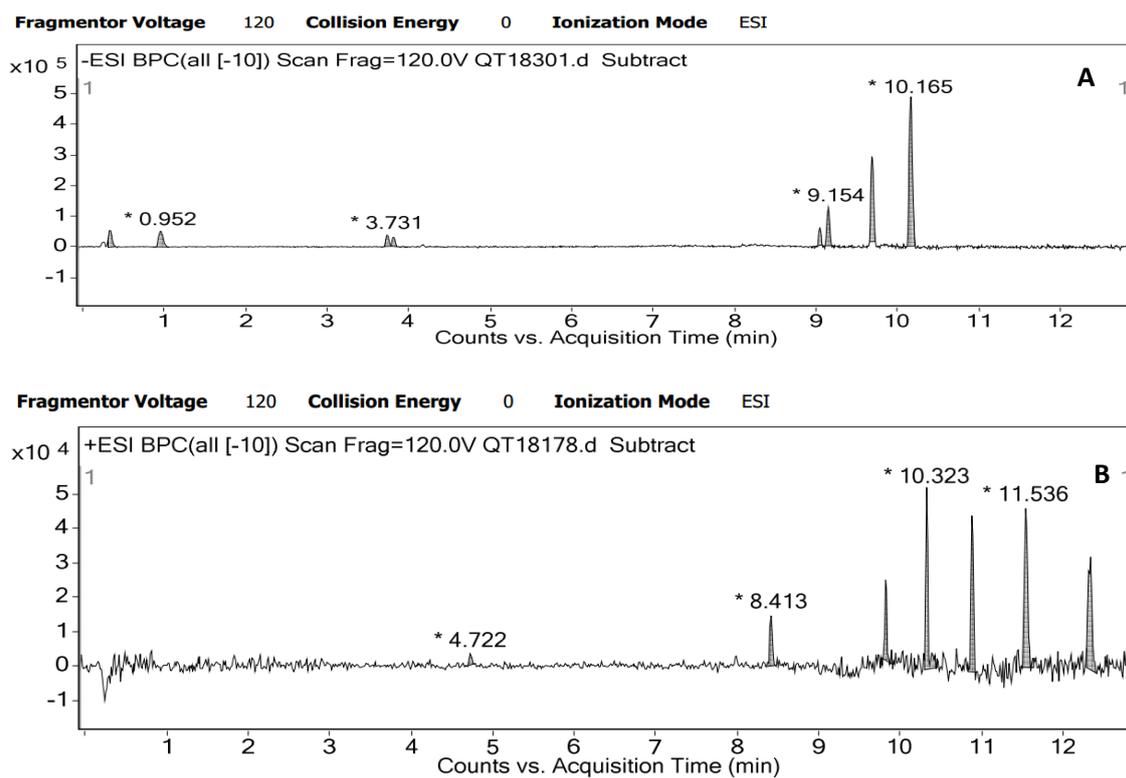
**Tableau XXV** : Analyse quantitative des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des protéines totales de l'extrait méthanolique et ses fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle de *Ozoroa pulcherrima*

| Classes de Métabolites secondaires'             | Extrait méthanolique | Fraction au <i>n</i> -hexane | Fraction à l'acétate | Résidu méthanolique |
|---|----------------------|------------------------------|----------------------|---------------------|
| <b>Polyphénols totaux (mg/100 mg d'extrait)</b> | 80,89 ± 0,26         | 24,58 ± 5,46                 | 77,69 ± 0,01         | 40,55 ± 0,09        |
| <b>Flavonoïdes (mg/100mg d'extrait)</b>         | 82,24 ± 0,47         | 4,70 ± 0,97                  | 64,38 ± 3,29         | 34,30 ± 3,29        |
| <b>Protéines totales (mg/100 mg d'extrait)</b>  | 88,20 ± 0,60         | 2,44 ± 0,17                  | 18,43 ± 0,02         | 45,95 ± 0,07        |

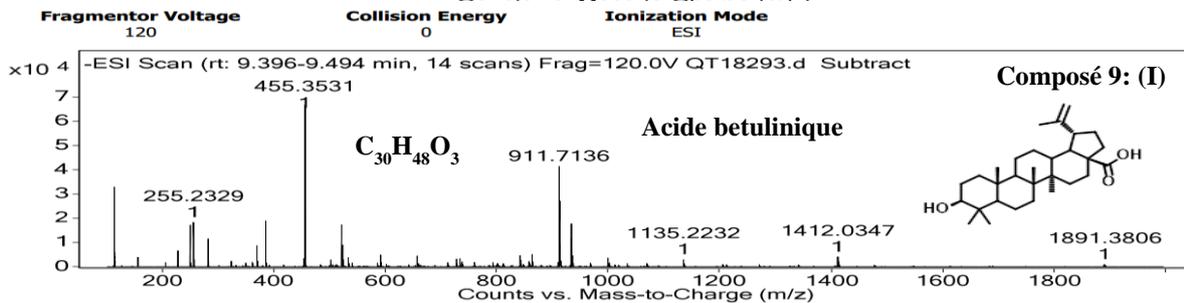
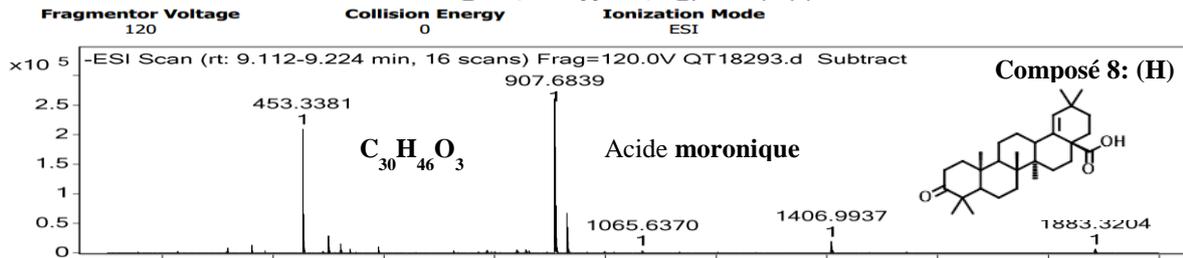
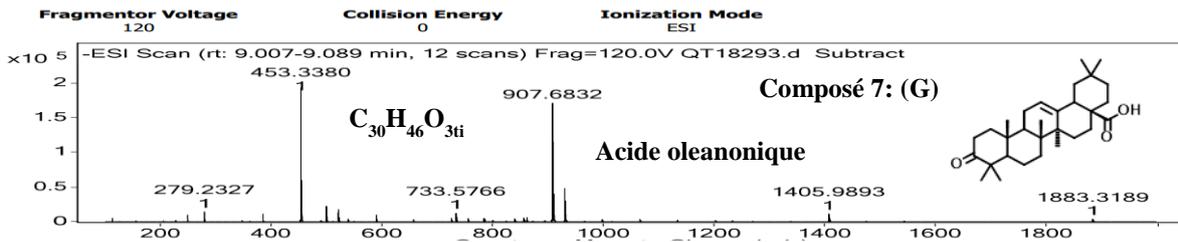
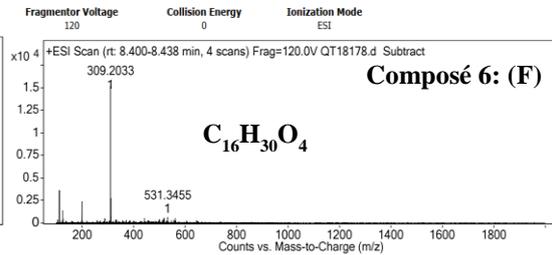
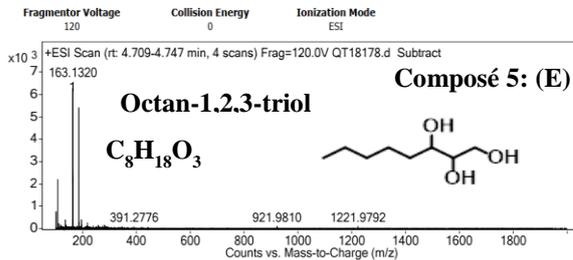
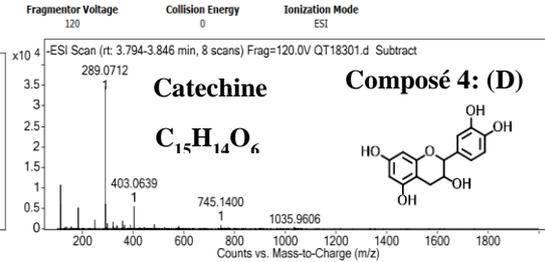
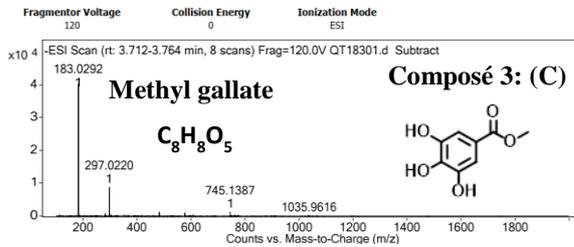
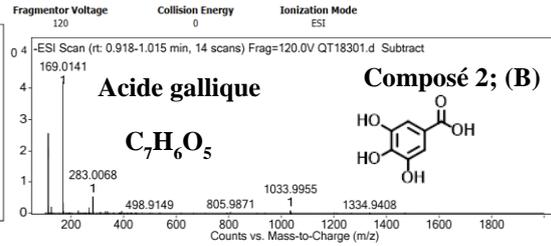
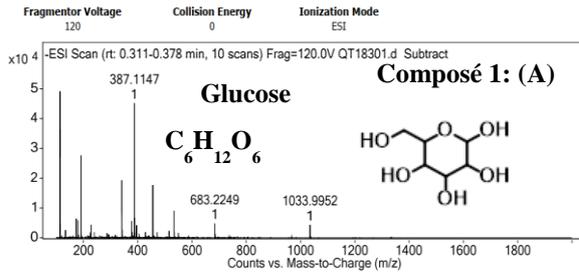
Les composés présents dans l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* ont été identifiés par HPLC-MS. Les spectres de masses des pics correspondants aux ions moléculaires  $[M+H]^+$  et  $[M-H]^-$  sont représentés dans la figure 48 et les spectres de masse et la structure des molécules identifiées dans la figure 49. Les données spectrales ainsi obtenues montrent que 16 molécules ont été identifiées dans cet extrait. La combinaison de ces données et les informations fournies par la littérature a permis l'identification de 11 composés. Les composés ainsi identifiés, leurs temps de rétention, leurs masses moléculaires et le rapport masse-charge ( $m/z$ ) et de même que les noms de ces composés sont représentés dans le tableau XXVI.

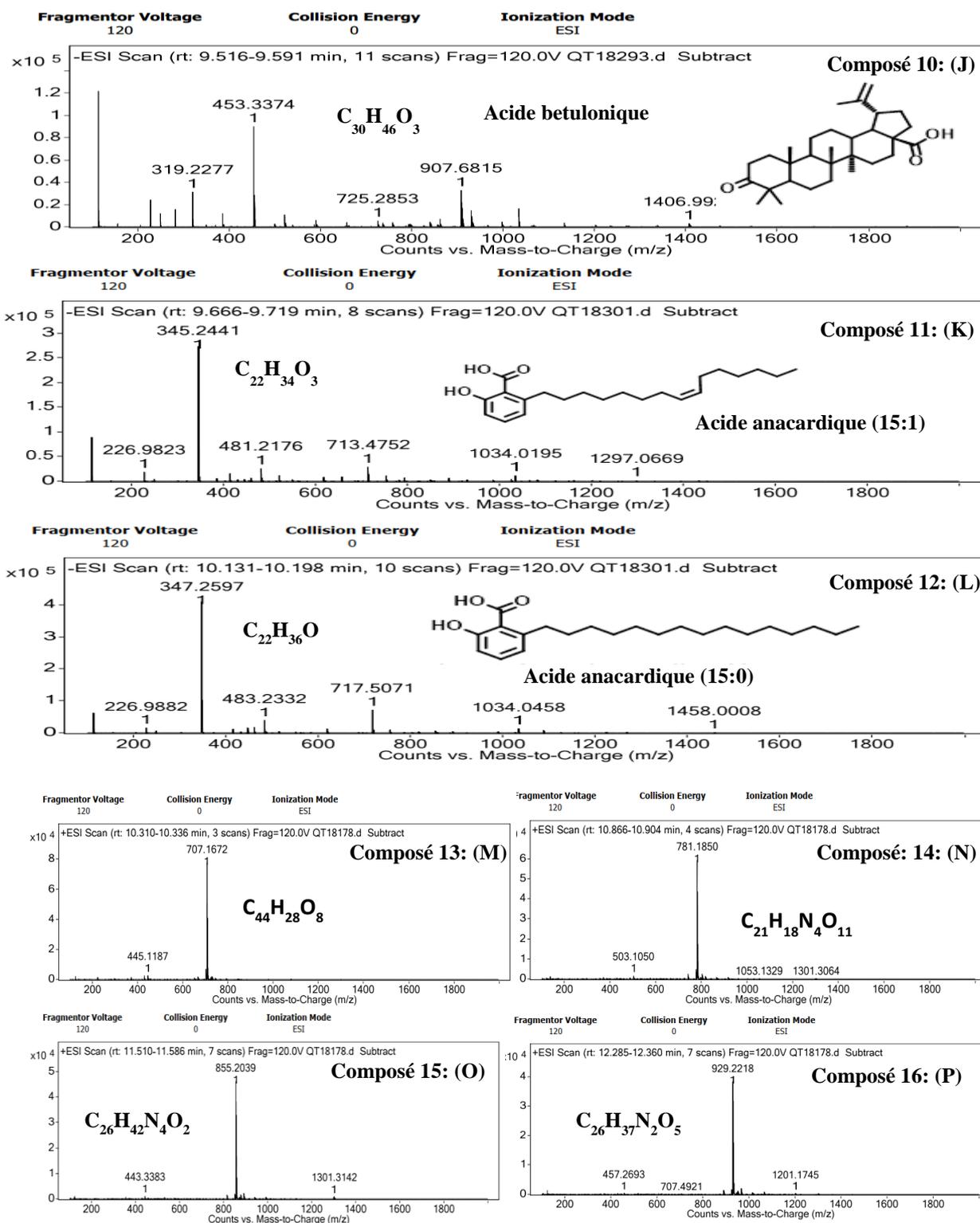
Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* est principalement constitué des triterpènes (les composés **7**, **8**, **9** et **10**) correspondant aux acides oleanonique, moronique, betulinique et betulonique respectivement, suivi des acides phénoliques : l'acide gallique (composé **2**), l'acide anacardique 15 :1 (composé **11**) et l'acide anacardique 15 :0 (composé **12**) et un composé dérivé de l'acide gallique, le méthylgallate (composé **3**). Les composés suivants ont également été identifiés, il s'agit de la catéchine qui est un flavonoïde de type flavanol (composé **4**), l'octan-1,2,3-triol qui est un alcool (composé **5**) et le glucose, un sucre réducteur (composé **1**). Cependant, cinq molécules n'ont pas pu être identifiées (composés **6**, **13**, **14**, **15** et **16**).

A travers le protocole d'identification, il a été possible de confirmer la présence de flavonoïde, des composés phénoliques et de sucre réducteur mis en évidence dans le screening phytochimique. La composition chimique des autres espèces de *Ozoroa* corrobore avec certaines classes de composés présentes dans *Ozoroa pulcherrima*. A l'exception de la catéchine, la majorité de ces classes de métabolites de *O. pulcherrima* a également été identifiée dans les écorces des racines de *Ozoroa insignis* (Ng'ang'a *et al.*, 2009), les brindilles de *Ozoroa obovata* (João *et al.*, 2020) et dans les feuilles de *O. mucronata* et de *O. paniculosa* (Ahmed *et al.*, 2014).



**Figure 48** ; Chromatogramme de HPLC-MS correspondant aux ions moléculaires [M-H]<sup>-</sup> (A) et [M+H]<sup>+</sup> (B) de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima*.





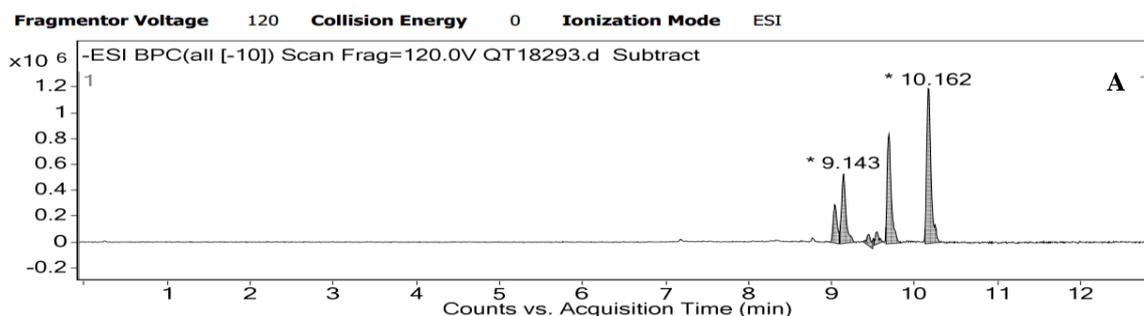
**Figure 49 :** Chromatogrammes de HPLC-MS correspondant aux structures putatives des composés identifiés dans l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* (A-P).

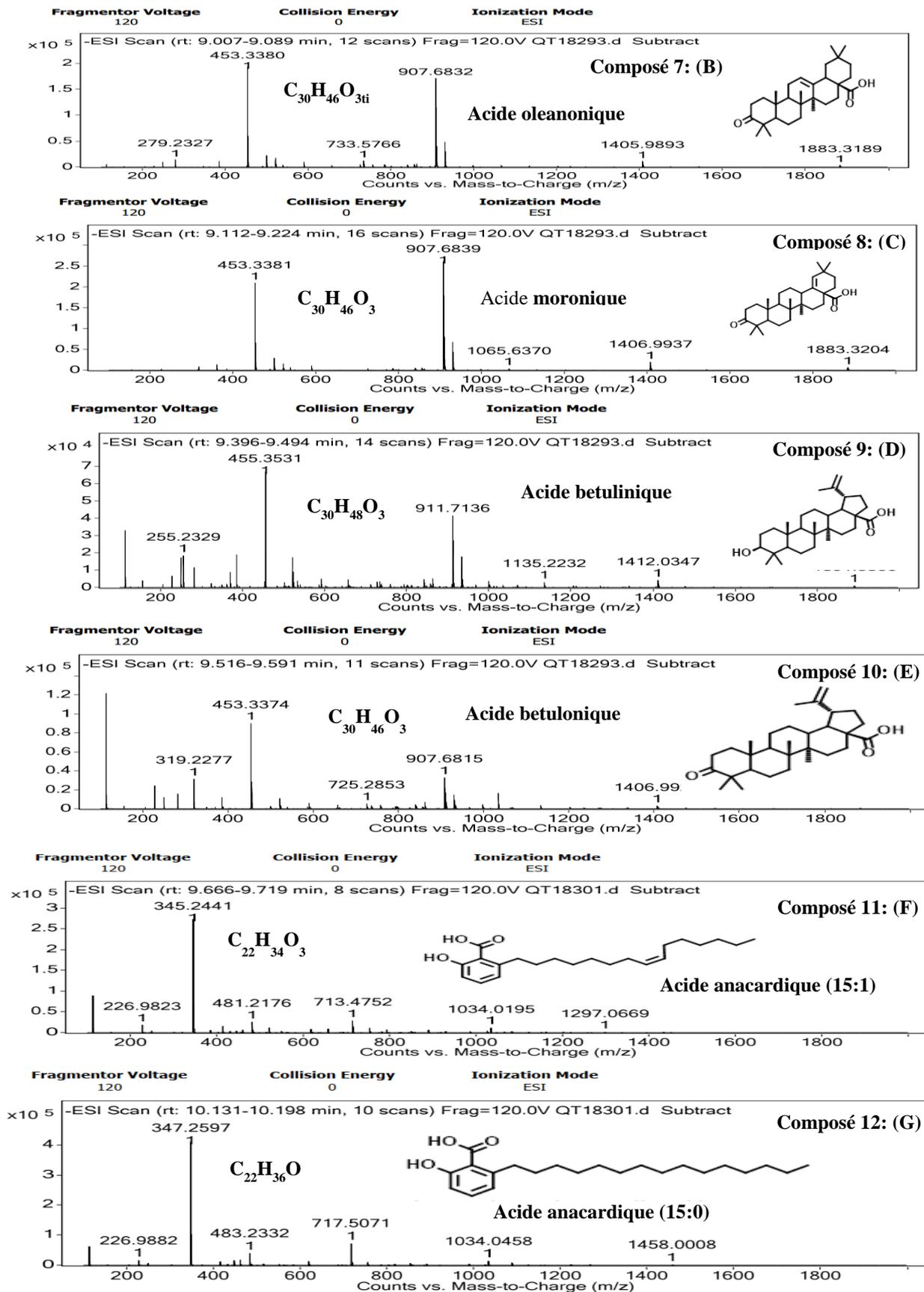
**Tableau XXVI :** Composés présents dans l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima*

| N° | TR (min) | $m/z$ [M-H] <sup>-</sup> ou [M+H] <sup>+</sup> |          | Autres pics   | UV $\lambda_{max}$ (nm) | Formules moléculaires  | Composés identifiés      |
|----|----------|--|----------|---------------|-------------------------|--|--------------------------|
|    |          | Exp.   | Calc.    |               |                         |  |                          |
| 1  | 0,33     | 179,0558                                       | 179,0556 | 149; 161      | 230                     | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>                  | Glucose                  |
| 2  | 0,95     | 169,0141                                       | 169,0137 | 125; 283      | 215; 275                | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>                   | Acide gallique           |
| 3  | 3,73     | 183,0293                                       | 183,0293 | 151; 297      | 215; 275                | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>                   | Methylgallate            |
| 4  | 3,81     | 289,0712                                       | 289,0712 | 271; 403      | 253; 320                | C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>                 | Catechine                |
| 5  | 4,72     | 163,1320*                                      | 163,1334 | 75; 83        | 230                     | C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>                  | Octan-1,2,3-triol        |
| 6  | 8.35     | 287,2235*                                      | 287,2222 | 309           | <200                    | C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>                 | NI                       |
| 7  | 9,04     | 453,3368                                       | 453,3369 | 279; 499; 907 | 220                     | C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>                 | Acide oleanonique        |
| 8  | 9,14     | 453,3381                                       |          | 499; 907      | 220                     | C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>                 | Acide moronique          |
| 9  | 9,44     | 455,3531                                       | 455,3525 | 255; 501; 911 | 240                     | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>                 | Acide betulinique        |
| 10 | 9,54     | 453,3374                                       | 453,3369 | 319; 453      | 225                     | C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>                 | Acide betulonique        |
| 11 | 9,69     | 345,2441                                       | 345,2430 | 226; 459; 713 | 250; 325                | C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>                 | Acide anacardique (15:1) |
| 12 | 10,16    | 347,2597                                       | 347,2686 | 226; 717      | 250;325                 | C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>                 | Acide anacardique (15:0) |
| 13 | 10,30    | 707,1672#                                      | 707,1682 | 445           | 225                     | C <sub>44</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>                 | NI                       |
| 14 | 11,46    | 503.1050*                                      | 503,1050 | 503           | <200                    | C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub> | NI                       |
| 15 | 11,55    | 443,3383*                                      | 443,3383 |               | <200                    | C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>  | NI                       |
| 16 | 12,30    | 457,2693                                       | 457,2702 |               | <200                    | C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>  | NI                       |

\*= [M+H]<sup>+</sup>; #= [M+Na]<sup>+</sup>; NI= Non Identifié ; TR= Temps de Rétention ; UV= Ultra Violet ; Exp= Expérimentale ; Calc= Calculée

L'analyse par HPLC-MS a révélé que la fraction au *n*-hexane de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* est composé de pics de composés chimiques avec des temps de rétention inférieurs à 11 minutes (Figure 50 A). La combinaison des données spectrales et des informations fournies par la littérature a permis l'identification de 6 composés (Tableau XXVI). Les composés ainsi obtenus sont identiques aux composés **7**, **8**, **9**, **10**, **11** et **12** identifiés dans l'extrait méthanolique et aux mêmes temps de rétention (Figure 50 B-G).



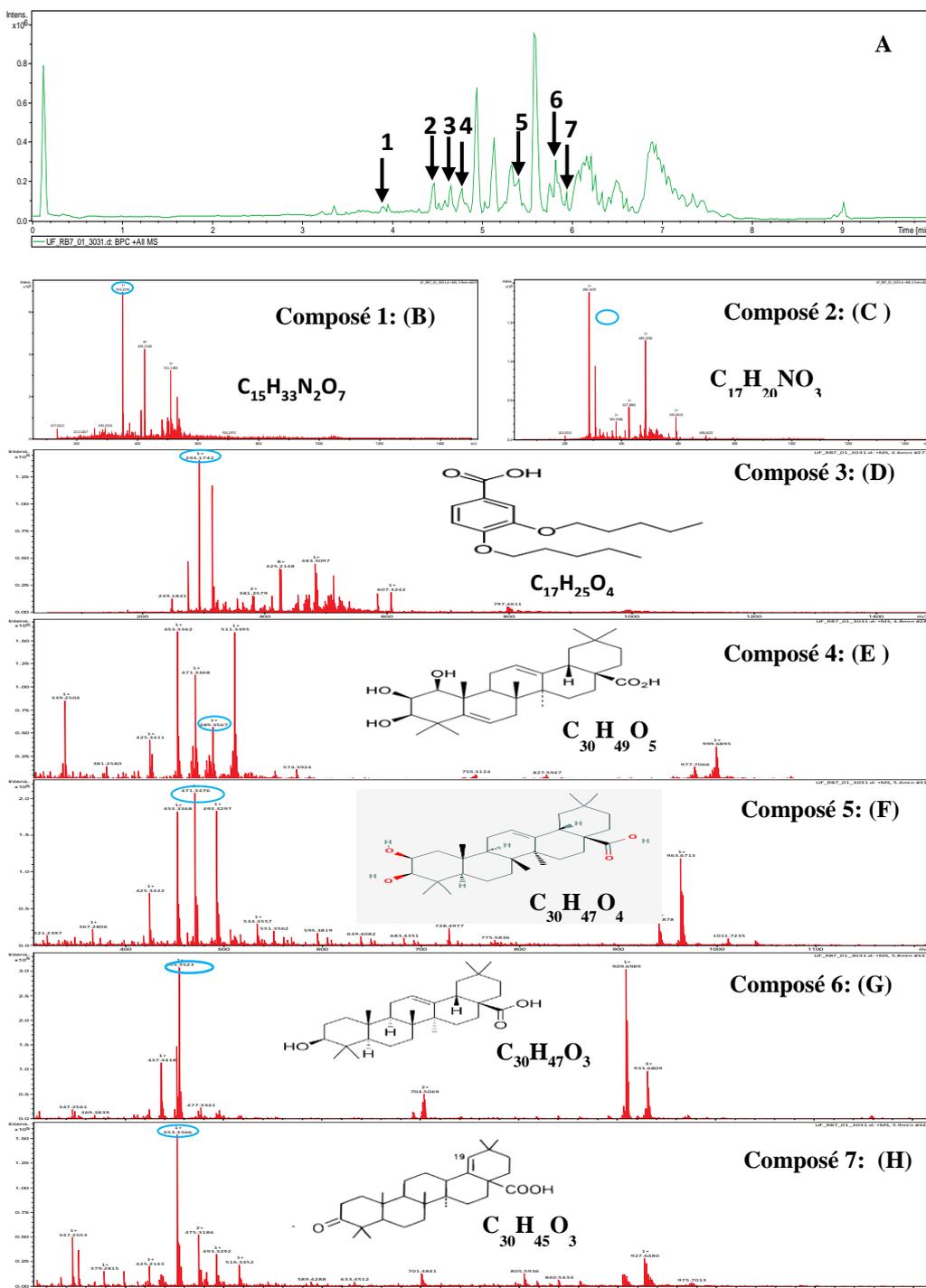


**Figure 50 :** Chromatogramme de la HPLC-MS correspondant aux ions moléculaires  $[M-H]^-$  (A) de la fraction au *n*-hexane de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* et les structure putatives des composés identifiés (B-G).

L'analyse par HPLC-MS a révélé que la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* est composée de pics de composés chimiques avec des temps de rétention inférieurs à 10 minutes. La combinaison des données spectrales et des informations fournies par la littérature a permis l'identification de 7 composés (numéro 1 à 7 sur le chromatogramme) (Figure 51 A).

Le spectre de masse du premier (composé 1) pic élué à 3,9 min et correspondant à l'ion moléculaire  $[M + H]^+$  détecté à  $m/z = 343$  a été crédité comme un alcaloïde avec une masse moléculaire de 353,25 (Figure 51 B). Le spectre de masse du pic élué à 4,5 min est caractérisé par un ion moléculaire  $[M + H]^+$  détecté à  $m/z = 286$ . En accordance avec les données obtenues, le composé 2 proposé a une masse moléculaire de 286,14 (Figure 51 C). Le composé 3 observé a un temps de rétention de 4,6 min avec l'ion moléculaire  $[M + H]^+$  détecté à  $m/z 293$  a été identifié comme l'acide dipentoxybenzoïque un flavonoïde (Figure 51 D). Le composé 4 obtenu en 4,8 min avec l'ion moléculaire  $[M + H]^+$  détecté à  $m/z 489$  et a été identifié comme l'acide oleatermalonique (Figure 51 E). Le composé 5 apparu en 5,4 min et correspondant à l'ion moléculaire  $[M + H]^+$  détecté à  $m/z 471$  a été identifié comme l'acide hydroxyoleanolique (Figure 51 F). Le composé 6 observé à 5,8 min correspondant à l'ion moléculaire  $[M + H]^+$  détecté à  $m/z = 455$  a été identifié comme l'acide oleanolique (Figure 51 G). Le pic élué à 5,9 min représente le composé 7 avec l'ion moléculaire  $[M + H]^+$  détecté à  $m/z = 453$  et a été identifié comme l'acide moronique (Figure 51 H).

Les composés **4, 5,6 et 7** sont des triterpènes. Les données spectrales des constituants identifiés de la fraction ont été comparées à celles des composés isolés des espèces du genre *Ozoroa*. A l'exception de l'acide moronique (composé **7**) qui a déjà été isolé de l'écorce des racines de *Ozoroa mucronata* (Hostettmann-Kaldas and Nakanishi, 1979), aucun de ces composés n'a précédemment pas été identifié des plantes du genre *Ozoroa*.



**Figure 51** : Chromatogramme de la HPLC-MS correspondant aux ions moléculaires  $[M+H]^+$  (A) de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* et les structures putatives des composés identifiés (B-H).

### III-2. Discussion

La répartition de la schistosomiase dans les zones endémiques, l'augmentation du taux d'infestation et le risque de résistance de certaines souches de schistosomes au praziquantel incitent à la nécessité de rechercher et de développer de nouveaux médicaments (Caffrey, 2007). La recherche axée sur les produits naturels a fourni d'impressionnants résultats; avec de découverte remarquable de nouveaux médicaments ou à des médicaments ayant conduit à contrôler plusieurs maladies. Ainsi, pour évaluer l'effet schistosomicide d'un médicament, il est important de comprendre la biologie du parasite. Selon Moraes *et al.* (2011), les composés à activité schistosomicide peuvent présenter leurs efficacités de différentes manières et à différent niveau; notamment en ayant un effet préventif (provoquant la mort des schistosomules), un effet supprimeur (inhibant l'oviposition) et un effet curatif (provoquant la mort du ver adulte). Plusieurs activités biologiques ont été décrites pour les espèces du genre *Ozoroa*, telles que les activités anti-prolifératives, antimicrobiennes, anti tumorales et anthelminthiques (Abreu *et al.*, 1999; Bogninou-Agbidinokoun *et al.*, 2016; Mølgaard *et al.*, 2001). Ces dernières années, un certain nombre d'études *in vitro* et *in vivo* ont été développées en utilisant des extraits bruts (El-Morsy *et al.*, 2022; Fadladdin, 2022; Kyere-Davies *et al.*, 2018), des huiles essentielles (Gomes *et al.*, 2022; Matos-Rocha *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2022) et des composés isolés (de Carvalho *et al.*, 2022; Matos-Rocha *et al.*, 2020) de plantes médicinales pour identifier une éventuelle substance qui pourrait être utilisée dans des essais précliniques dans le traitement expérimental de la schistosomiase. Dans la présente l'étude, il a été question d'évaluer les effets de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique ainsi que des fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur les dysfonctionnements liés à l'infestation par *Schistosoma mansoni* chez la souris.

Les infestations à schistosomes se produisent à la suite de la pénétration des cercaires dans l'organisme à travers la peau. Empêcher une telle pénétration des cercaires dans la peau est également une forme potentielle de contrôle de la transmission (Tekwu *et al.*, 2016). Au cours de ces dernières années, de nombreuses substances ont été évaluées pour leur capacité à bloquer la pénétration des cercaires dans la peau et plusieurs d'entre elles présentent de très bons résultats. Cependant, à cause de leur toxicité, de leur difficulté dans la formulation et/ ou l'application dans des conditions de terrain (Ramaswamy *et al.*, 2003), ces substances n'ont pas fait l'objet d'une étude clinique. Ainsi, la recherche des substances pouvant fournir de telle protection demeure stimulante. Dans un tel contexte, l'un des premiers aspects à analyser serait d'évaluer l'activité anti-cercarienne des potentiels composés.

Dans cette étude, les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et ses différentes fractions (*n*-hexane et acétate d'éthyle) possèdent une activité cercaricide contre les cercaires de *S. mansoni*. La présente observation a également montré que l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et ses fractions dérivées ont été plus actifs que l'extrait aqueux. Par ailleurs, il faut également relever que l'activité de ces substances était à la fois temps et concentration dépendante. Toutefois, l'extrait méthanolique a présenté la meilleure activité anti-cercaïenne. Ces résultats sont similaires à ceux de (Kiros *et al.*, 2014), (Tekwu *et al.*, 2017) et (Pereira *et al.*, 2022) qui ont signalé l'activité anti-cercarienne des fruits de *Glinus lotoides*, des feuilles et de l'écorce des tiges de *Rauwolfia vomitoria* et des huiles essentielles de *Dysphania ambrosioides* respectivement, en fonction du temps et de la concentration. Plus précisément, l'activité cercaricide de certaines plantes médicinales a été corrélée à leurs métabolites secondaires. Les flavonoïdes des graines de *Millettia thonningii* et un alcaloïde substitué au penta-pyridine du rhizome de *Jatropha elliptica* ont en effet montré de fortes activités cercaricides et schistosomicides contre *S. mansoni* (dos Santos *et al.*, 2014; Lyddiard *et al.*, 2002). En raison de la présence des flavonoïdes et des alcaloïdes dans l'extrait méthanolique de racines de *O. pulcherrima*, on pourrait ainsi dire que son activité cercaricide est liée à ces métabolites secondaires.

L'extrait aqueux, l'extrait méthanolique des racines de *O. pulcherrima* et ses fractions au *n*-hexane, à l'acétate d'éthyle et le résidu méthanolique ont entraîné la mortalité des schistosomes de manière concentration dépendante. L'exposition des schistosomes à l'extrait méthanolique (2000 µg/mL), à la fraction au *n*-hexane (500 et 1000 µg/mL) et à la fraction à l'acétate d'éthyle (1000 µg/mL) a entraîné 100 % de mortalité après 48 heures d'incubation. Ces résultats corroborent ceux obtenus avec les extraits de *Ozoroa insignis* (Mølgaard *et al.*, 2001), *Zanthoxylum naranjillo* (Braguine *et al.*, 2009), *Sida pilosa* (Jatsa *et al.*, 2015), *Rauwolfia vomitoria* (Tekwu *et al.*, 2017), *Casearia sylvestris* (Carvalho *et al.*, 2022), avec les huiles essentielles de *Baccharis trimera* (Less) (de Oliveira *et al.*, 2012), *Lippia alba* and *Lippia gracilis* (Gomes *et al.*, 2022) et avec les composés isolés terpène Nerolidol (Moraes *et al.*, 2013) et pipartine (isolé de *Piper tuberculativa*) (de Moraes, 2015) (de Carvalho *et al.*, 2022). Les concentrations de l'extrait méthanolique et ses différentes fractions responsables de 100 % de mortalité des schistosomes sont comprises dans la gamme des concentrations létales 100 (0,6 à 25 mg/mL) obtenues au cours du screening de nombreuses plantes communément utilisées contre la schistosomiase en Afrique du sud et au Zimbabwe (Duarte Galhardo de Albuquerque *et al.*, 2020; Mølgaard *et al.*, 2001). Le potentiel schistosomicide de cette plante serait dû à la présence des

composés tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les phénols, les anthraquinones, les triterpènes et les tanins identifiés dans l'extrait méthanolique et ses différentes fractions. Par ailleurs, l'analyse phytochimique de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et ses fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle à l'aide d'une technique plus puissante et sûre ; la HPLC-MS a ainsi été réalisée pour l'identification des classes de composés chimiques.

La fraction au *n*-hexane a entraîné un taux de mortalité de 100 % à la concentration de 1000 µg/mL après 24 heures incubation. Des études révèlent que la motricité du schistosome est associée avec d'importants neurotransmetteurs ou neuromédiateurs comme la sérotonine, la dopamine ou l'acétylcholine (Taman & Ribeiro, 2011). Ainsi, l'activité schistosomicide de la fraction au *n*-hexane serait due à la présence dans ce dernier des terpénoïdes avec leur capacité d'altérer le système nerveux cholinergique de *S. mansoni* (de Oliveira *et al.*, 2012) et des alcaloïdes connus pour leur action majeure sur le dommage du tégument de schistosome adulte (Moraes *et al.*, 2013). Les terpénoïdes constituent la plus grande famille d'hydrocarbures d'origine naturelle avec un très large éventail d'activités biologiques, notamment les propriétés antipaludiques (Ansari *et al.*, 2013), anticancéreuses (Ledwitch *et al.*, 2013) et antischistosomales (Huang *et al.*, 2012). Certains terpénoïdes sont connus pour tuer les vers adultes de *S. mansoni*. Leur activité schistosomicide est probablement due à leur capacité à altérer le système nerveux cholinergique de *S. mansoni* ; l'acétylcholine étant associée à la motilité du parasite (de Oliveira *et al.*, 2012). Les alcaloïdes sont largement distribués et ont été isolés de plusieurs espèces végétales. Plusieurs d'entre eux ont une activité schistosomicide en provoquant une perturbation importante du tégument, en ralentissant l'activité motrice du parasite ou en tuant des vers adultes de *S. mansoni* après une exposition *in vitro* ou *in vivo* (Moraes *et al.*, 2013; Neves *et al.*, 2015; Veras *et al.*, 2012). Récemment, il a été démontré que l'acide arachidonique tuait *in vitro* des schistosomes juvéniles et adultes. La destruction médiée par l'acide arachidonique est essentiellement due à une activation excessive de la sphingomyélinase neurale magnésium dépendant du schistosome, conduisant ainsi à l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide et en phosphorylcholine. Par conséquent, l'hydrolyse de la sphingomyéline provoquerait une augmentation de la perméabilité, de la flexion et de l'agrégation de la membrane ainsi que des perturbations dramatiques dans la teneur en lipides et la rigidité du schistosome (Tallima *et al.*, 2020).

L'activité motrice est souvent évaluée comme un important indicateur de l'activité biologique des espèces de schistosomes. Dans cette étude, le changement de la mobilité de *S. mansoni* variait selon les extraits aqueux et méthanolique et ses différentes fractions, les concentrations et la période d'exposition. Il a été observé que la fraction au *n*-hexane a causé la

majeure réduction de la mobilité des vers après 48 heures d'incubation. Une réduction de l'activité motrice des schistosomes après incubation aussi bien dans différentes préparations issues des plantes médicinales que dans les composés isolés ou même le praziquantel, a généralement été reportée dans la littérature (de Moraes, 2015; Jatsa *et al.*, 2015; Tekwu *et al.*, 2017). La réduction de l'activité motrice des vers marquée par de faibles mouvements des ventouses, des mouvements sporadiques du corps et un raccourcissement du corps après incubation dans l'extrait aqueux, dans l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et dans les différentes fractions résulterait d'une interférence des composés bioactifs de la plante avec les mécanismes de contraction-relaxation de la musculature lisse de schistosome. La motilité réduite des vers adultes de *Schistosoma mansoni* exposés à *O. pulcherrima* pourrait également être associée à l'altération du système de neurotransmetteur ou neuromodulateur du parasite. Les flavonoïdes isolés de *Millettia thomingii*, (Lyddiard *et al.*, 2002), de *Styrax pohlii* et de *styrax camporum* (Braguine *et al.*, 2012) ont été décrit comme susceptible d'exercer des effets bénéfiques sur une multitude de maladie parmi lesquelles la schistosomiase. Il a été reporté que les flavonoïdes qui réduisent de façon modérée l'activité motrice de schistosome *in vitro*, ont été identifiés comme les inhibiteurs sélectifs de l'enzyme catabolisant le NAD<sup>+</sup> de *S. mansoni* (SmNACE). La SmNACE est une importante cible localisée sur la face externe du tégument des vers adultes de schistosome et il est présumablement impliqué dans la survie du parasite en manipulant les voies de régulation immunitaire de l'hôte. La découverte des flavonoïdes qui inhibent la SmNACE dans une gamme de faible concentration permettrait de les considérer comme un médicament candidat et prometteur pour traiter la schistosomiase (Braguine *et al.*, 2012). Ainsi, la réduction importante de la motricité des schistosomes observée pourrait s'expliquer par l'action des flavonoïdes présents dans l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* et de ses fractions dérivées.

Considérant les effets schistosomicides *in vitro* contre les stades cercaires et vers adultes de *S. mansoni*, l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et sa fraction à l'acétate d'éthyle pourraient représenter un pas supplémentaire dans la recherche de nouveaux composés antischistosomaux à un moment où il y a un besoin urgent de nouveaux médicaments. Ainsi, une expérimentation pour évaluer *in vivo* les effets de cet extrait et sa fraction chez les souris infestées par *S. mansoni* a été menée.

Les résultats de cette étude ont montré que l'infestation par *Schistosoma mansoni* a entraîné une diminution du poids corporel à partir de la septième semaine post-infestation (p.i.) et une augmentation des poids relatifs du foie, de la rate et de l'intestin par rapport aux animaux sains. La diminution du poids corporel serait la conséquence d'une anémie provoquée par les

schistosomes qui dégradent l'hémoglobine dans les hématies de l'hôte. De plus, les vers de schistosomes utilisent le glucose de l'hôte pour leur nutrition et leur métabolisme ; plongeant ainsi ce dernier dans un état d'hypoglycémie qui aboutirait à une perte de poids corporel (Wang *et al.*, 2017). Cette hypoglycémie peut être également la conséquence d'une faible biodisponibilité en nutriments (glucose, acides aminés et acides gras) due d'une part, à une malabsorption de ces derniers suites aux dégâts causés par les œufs de *S. mansoni* au niveau de l'intestin, ou d'autre part au désordre métabolique résultant des lésions hépatiques causées par les œufs de *S. mansoni* (Huang *et al.*, 1999). L'hépatomégalie observée chez les souris infestées serait le résultat de la formation des granulomes bilharziens par stimulation des réactions inflammatoires autour des œufs de *S. mansoni* restés coincés dans le foie. La présence des œufs, à travers les réactions inflammatoires granulomateuses chroniques pourrait entraîner de sévères modifications fibrotiques ou une vacuolisation des hépatocytes, à l'origine de l'augmentation du poids de ces tissus et organes (Kadry *et al.*, 2013; Dkhil, 2014). La splénomégalie quant à elle, pourrait résulter d'une congestion passive ou d'une hyperplasie du système réticulo-endothélial de la rate (WHO, 1988), d'un élargissement de la pulpe blanche suite à une prolifération cellulaire (Al-Quraishy *et al.*, 2013) ou encore d'une vacuolisation des cellules spléniques (Dkhil, 2014).

L'administration de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* ou du praziquantel chez les souris infestées par *S. mansoni* a limité la perte du poids corporel et l'augmentation du poids relatif de la rate, pendant que sa fraction à l'acétate d'éthyle a évité l'augmentation des poids relatifs du foie et de l'intestin par rapport aux animaux infestés et non traités. Ces résultats s'expliqueraient par une réduction de la charge ovulaire dans ces organes, réduction consécutive à une diminution de la charge parasitaire après traitement. Ceci suggère que l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et sa fraction à l'acétate d'éthyle contiendraient des composés bioactifs capables d'entraîner la destruction des vers. En effet, ces résultats sont en corrélation étroite avec ceux obtenus *in vitro* où un taux de mortalité de 100 % a été obtenu après incubation des vers adultes avec l'extrait méthanolique ou sa fraction à l'acétate d'éthyle pendant 48 heures. Assurément, il a été démontré que les flavonoïdes et triterpènes, métabolites présents dans l'extrait méthanolique et la fraction à l'acétate d'éthyle de *O. pulcherrima*, possèdent un effet antischistosomal par la capacité qu'ils ont d'une part à perturber la fécondité des vers femelles de schistosomes réduisant ainsi l'oviposition et d'autre part, d'inhiber l'effet de la cholinestérase du ver adulte, entraînant ainsi sa mort par paralysie (Gomes *et al.*, 2022). De plus Wang *et al.* (2011) ont montré les activités hépatoprotective, anti-inflammatoire et antifibrotique des flavonoïdes et des triterpènes. Par ailleurs, l'amélioration observée après traitement au praziquantel est également le résultat de la

baisse des charges ovulaires consécutive à la réduction de la charge parasitaire. Effectivement, le praziquantel agit sur le schistosome adulte en augmentant la perméabilité des membranes cellulaires au calcium entraînant la contraction intense de la musculature du ver à l'origine d'une paralysie (Chan *et al.*, 2013; Doenhoff *et al.*, 2008). Le praziquantel est également à l'origine de la désintégration du tégument du ver à travers la formation de vacuoles qu'il y induit (Chai, 2013). Il a également été prouvé que le traitement au praziquantel entraîne une diminution de l'activité des enzymes de la glycolyse et une augmentation de l'activité des enzymes du cycle de Krebs et de la glycogénolyse.

Les résultats de cette étude tant *in vitro* que *in vivo* confirment l'activité schistosomicide de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et de ses différentes fractions. Cependant, l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et ses fractions dérivées étaient plus actifs *in vitro* et *in vivo* que l'extrait aqueux. Ainsi, on peut assigner la forte activité de l'extrait méthanolique et ses fractions dérivées à la présence dans les racines de *Ozoroa pulcherrima* des métabolites secondaires très actifs sur les schistosomes.

L'infestation par *Schistosoma mansoni* est connue pour sa capacité à induire une réponse inflammatoire initiée par la présence des œufs de schistosomes dans les parenchymes hépatiques et qui est également à l'origine d'une altération de la fonction du foie et augmente le taux circulant des enzymes hépatiques, comme les transaminases (Zhong *et al.*, 2022). De même, la synthèse des protéines est également altérée. Les résultats ont montré une augmentation de l'activité des transaminases (ASAT, ALAT), du taux de bilirubine totale et une baisse des protéines totales dans le plasma des animaux infestés à *S. mansoni* et non traités comparativement aux témoins sains. Dans cette étude, les concentrations élevées de transaminases (ASAT et ALAT) dans le plasma des animaux infestés et non traités traduiraient des fuites cellulaires et la perte de l'intégrité fonctionnelle de la membrane des cellules hépatiques qui est toujours associée avec la nécrose suite à la présence de granulomes inflammatoires au niveau du foie; en raison du dépôt important d'œufs aboutissant à une fibrose hépatique, de la présence de vers et de leurs toxines (Dkhil, 2014; Ramez *et al.*, 2021). Il a également été rapporté que dans l'infestation par *S. mansoni*, la baisse des activités de l'ASAT et de l'ALAT dans le foie et l'augmentation de leurs concentrations plasmatiques seraient la conséquence d'un trouble de la perméabilité ou d'une destruction de la membrane hépatocytaire résultant d'une surproduction de radicaux libres (Abu Almaaty *et al.*, 2021; Bin Dajem *et al.*, 2011). L'augmentation de la concentration en bilirubine totale suite à l'infestation serait liée à la dégradation de l'hémoglobine des globules rouges suite à l'action du ver, à un défaut de conjugaison de la bilirubine par le foie dû à la lyse des hépatocytes, ou à une

oblitération des canalicules biliaires suite à la fibrose hépatique (Thapa & Walia, 2007). En effet, pour sa nutrition, *S. mansoni* dégrade l'hémoglobine des globules rouges et l'hème qui en résulte se transforme en bilirubine sous l'action de l'hème oxygénase-1. De plus, les œufs coincés au niveau du foie entraînent la mort par nécrose des hépatocytes, ce qui limite la capacité du foie à conjuguer la bilirubine. La fibrose hépatique qui résulte de l'action des œufs de *S. mansoni* est également à l'origine d'une cholestase empêchant le passage de la bilirubine conjuguée vers la vésicule biliaire (Krier & Ahmed, 2009; Thapa & Walia, 2007). Tous ces facteurs seraient en faveur d'une augmentation de la concentration plasmatique de bilirubine.

Le traitement des animaux avec l'extrait méthanolique des racines de *O. pulcherrima* et sa fraction à l'acétate d'éthyle ou au praziquantel ont entraîné une normalisation de l'activité plasmatique des transaminases et de la concentration en bilirubine totale. La baisse de la concentration de ces marqueurs de la fonction hépatique serait imputée à la réduction des charges parasitaire et ovulaire chez les animaux traités. La normalisation ainsi observée serait due à la stabilisation de la membrane plasmique, ainsi qu'à la réparation des dommages de tissus hépatiques causés par les œufs de *S. mansoni*. Dans la présente étude, les données biochimiques sont en corrélation avec les résultats histomorphométriques, tous deux confirmant les atteintes hépatiques. Ainsi, la réduction de la concentration de ces marqueurs hépatiques pourrait également être liée à la baisse de production des fibres de collagène périvasculaire responsable de la fibrose hépatique. Par ailleurs, la baisse significative de l'ALAT et de la concentration en bilirubine totale observée, suggère que l'extrait méthanolique et la fraction à l'acétate d'éthyle (200 et 400 mg/kg) contiendraient des composés bioactifs à action inhibitrice sur les dégâts hépatiques causés par *S. mansoni*. En réalité, les glycosides et des phénols présents dans cet extrait et sa fraction agiraient en stimulant la synthèse des gènes responsables de la régénération cellulaire (Rajendran *et al.*, 2009).

La schistosomiase est également marquée par une diminution de la concentration plasmatique des protéines totales (Abu Almaaty *et al.*, 2021; Jatsa *et al.*, 2015b). L'infestation par *S. mansoni* s'est également traduite par une baisse de la concentration des protéines totales chez les animaux infestés et non traités. Cette hypoprotéïnémie serait liée d'une part à une surproduction de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées capables d'oxyder les protéines, les rendant ainsi vulnérables à l'action des protéases (Favier, 2003) et d'autre part, aux dommages hépatiques induits par l'infestation. Effectivement, en cas de nécrose hépatocytaire et de fibrose hépatique induits par *S. mansoni*, on assiste à une baisse de l'anabolisme protéique et à une augmentation du catabolisme protéique. Par ailleurs, grâce aux techniques d'électrophorèse bidimensionnelle et de

spectrophotométrie de masse, il a été prouvé qu'après huit semaines d'infestation par *S. mansoni*, il se produit une diminution de l'expression des enzymes associées aux cycles de l'acide citrique, des acides gras, de l'urée et au métabolisme des acides aminés. De plus, une malabsorption intestinale induite par les œufs de *S. mansoni* serait un facteur contribuant à la baisse de la synthèse des protéines par défaut d'absorption des acides aminés (Rizk *et al.*, 2006). Ce déséquilibre du métabolisme des protéines serait donc à l'origine de la baisse de la concentration en protéines totales. L'administration de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima*, ainsi que de sa fraction à l'acétate d'éthyle aux souris infestées a entraîné une normalisation de cette concentration, suggérant ainsi une inhibition de l'oxydation des protéines et la réduction du dépôt de collagène dans le foie par des composés à activités antioxydante et anti-fibrotique présents dans l'extrait et sa fraction. C'est le cas des polyphénols, des tanins, des flavonoïdes et des saponines révélés dans l'étude phytochimique de l'extrait et sa fraction et dont les activités antioxydante et anti-fibrotique ont été prouvées (Abu Almaaty *et al.*, 2021; Salama *et al.*, 2021). De plus, la diminution des charges parasitaire et ovulaires hépatique et intestinale chez les animaux traités avec l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et sa fraction à l'acétate d'éthyle serait à l'origine de la baisse de la production des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène, limitant ainsi l'attaque des protéines de l'hôte par ces derniers. Une part non négligeable de cette amélioration du taux de protéines plasmatiques serait imputée à la présence des protéines dans l'extrait et dans sa fraction.

Au cours de l'infestation par *S. mansoni* il se produit un stress oxydant résultant de la surproduction des espèces réactives de l'oxygène et de l'épuisement des antioxydants enzymatique et non enzymatique endogènes (El-Rigal *et al.*, 2006). Dans cette étude, l'infestation par *S. mansoni* a entraîné une augmentation significative de la concentration hépatique de malondialdéhyde (MDA) et une baisse significative de la concentration hépatique des nitrites. Plusieurs auteurs ont récemment rapporté que le stress oxydant causé par la schistosomiase entraîne une élévation des peroxydes lipidiques. L'augmentation de la concentration hépatique de malondialdéhyde dans cette étude traduit l'implication de l'infestation à *S. mansoni* dans l'augmentation de la peroxydation lipidique. En effet, le mécanisme complexe de la peroxydation lipidique nécessite la participation des espèces réactives d'oxygène telles que le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ) (Ndamse *et al.*, 2022). Il a été démontré que suite à une infestation par *S. mansoni*, l'évènement précoce est la surproduction de l'anion superoxyde qui donne naissance au peroxyde d'hydrogène (Essam & Ashraf, 2013). L'anion superoxyde réagirait avec le peroxyde d'hydrogène pour donner naissance au radical hydroxyle selon la réaction de Haber Weiss. En réalité, les leucocytes associés à la réponse granulomateuse produisent des EROs qui interagissent avec les

acides gras polyinsaturés et d'autres lipides pour former le MDA (Facundo *et al.*, 2004). Par ailleurs, il existe une corrélation positive entre le dépôt du collagène durant l'infestation par *S. mansoni* et la production du malondialdéhyde par les cellules hépatiques. Par contre, la diminution de la concentration des nitrites chez les animaux infestés et non traités serait liée à la réaction inflammatoire granulomateuse chronique qui inhibe l'activité des iNOS à la suite d'une réduction de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires due à la mort des phagocytes impliqués dans cette réaction (Hirata *et al.*, 2001). Cette diminution du NO serait également causée par un défaut de l'action de l'hème. En effet, la dégradation de l'hème par le ver adulte de *S. mansoni* entraîne un trouble de l'intégrité structurale des dimères des iNOS, qui va entraîner à son tour une baisse de leur activité (Hirata *et al.*, 2001).

Chaque radical libre formé par l'organisme peut initier des séries de réactions en chaîne, qui vont continuer jusqu'à ce que les radicaux libres soient éliminés. Les radicaux libres disparaissent de l'organisme suivant les réactions avec d'autres radicaux libres, ou de façon plus importante, grâce aux actions du système antioxydant. Les cellules aérobies produisent d'importants antioxydants et plusieurs enzymes antioxydantes qui piègent les espèces réactives d'oxygène. La dismutation de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) par la superoxyde dismutase et de la dégradation de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par le glutathion et la catalase limitent l'effet cytotoxique de ces espèces réactives d'oxygène (Halliwell & Whiteman, 2004). L'infection à *S. mansoni* entraîne la baisse de la production d'antioxydant, tel que le glutathion réduit et des enzymes antioxydantes telles que la SOD et la catalase (Abu Almaaty *et al.*, 2021). Dans cette étude, l'infestation par *S. mansoni* a entraîné une baisse de la concentration hépatique de GSH, de SOD et de catalase. Les résultats de l'étude sont conformes à ceux de Dkhil, (2014) et de Ramez *et al.* (2021). La diminution de la concentration de GSH résulterait d'une surproduction des radicaux libres (Ndamse *et al.*, 2022) et d'une augmentation du potentiel cytotoxique du peroxyde d'hydrogène consécutive à l'inhibition de l'activité de la glutathion peroxydase (Ndamse *et al.*, 2022). La baisse de l'activité de la SOD résulterait d'une surproduction d'anions superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (Essam & Ashraf, 2013). En effet, les superoxydes dismutases constituent la première ligne de défense contre l'effet délétère des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule. Elles sont ainsi capables d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, formant avec deux superoxydes une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. La concentration du peroxyde d'hydrogène est elle-même régulée par la catalase qui accélère sa réaction de dismutation en oxygène et en eau (Favier, 2003). Par ailleurs, une inactivation des radicaux superoxydes aboutirait à la glycation de la catalase (Dkhil, 2014).

L'administration de l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* et de sa fraction à l'acétate d'éthyle ou du praziquantel aux souris infestées par *S. mansoni* a entraîné une baisse significative de la concentration hépatique du malondialdéhyde par rapport aux animaux du groupe témoin négatif. Au cours de cette étude, une augmentation significative de concentration hépatique de glutathion réduit et des activités de la superoxyde dismutase et de la catalase a été observée après administration de l'extrait méthanolique et de sa fraction à l'acétate d'éthyle ou du praziquantel. Par contre, l'extrait aqueux de *O. pulcherrima* a été sans effet sur la concentration hépatique de glutathion et sur l'activité de la catalase. L'ensemble de ces résultats suggère que l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et sa fraction à l'acétate d'éthyle contiendraient des composés bioactifs capables de séquestrer les radicaux libres présents dans le foie des souris infestées. Effectivement, la phytochimie de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et de sa fraction a révélé la présence des composés tels que les flavonoïdes, les tanins, les saponines, terpenoïdes, les phénols et les polyphénols dont les activités antioxydantes ont été prouvées. Assurément, les flavonoïdes ont la capacité de piéger les radicaux libres et de protéger les membranes cellulaires (El-Sawi & Sleem, 2010), de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des espèces réactives d'oxygène via les réactions de Fenton et Haber-Weiss, d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases, d'activer les enzymes antioxydantes et de réduire les radicaux  $\alpha$ -tocophéryl (Jomová *et al.*, 2019). Toutefois, en empêchant les ions ferreux ( $Fe^{2+}$ ), les flavonoïdes réputés comme bons chélateurs de fer, empêcheraient la production des radicaux hydroxyles ( $\cdot OH$ ) par la réaction de Fenton, limitant ainsi la peroxydation lipidique. Ils sont également connus pour faire un don d'hydrogène aux radicaux peroxydes ( $LOO\cdot$ ) rompant ainsi la chaîne des réactions de la lipoperoxydation (Simunkova *et al.*, 2021). En outre, les flavonoïdes sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants ( $R\cdot$ ) comme le superoxyde, le radical peroxyde, le radical alkoxyde et le  $OH\cdot$  par transfert d'hydrogène. Les polyphénols majeurs composant des plantes vertes, ont la capacité de protéger contre le stress oxydant et les maladies dégénératives en piégeant l'anion superoxyde (Jomová *et al.*, 2019). En effet, les propriétés antioxydantes des polyphénols proviennent de leur réactivité élevée comme donneurs d'hydrogène ou d'électrons, de leur capacité à stabiliser et à délocaliser les électrons non appariés et de leur capacité à agir comme chélateurs des métaux de transition (Simunkova *et al.*, 2021). En empêchant la formation des espèces réactives d'oxygène responsable de l'initiation de la lipoperoxydation ou en interceptant les radicaux propagateurs de la peroxydation lipidique, les polyphénols présents dans l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et sa fraction à l'acétate d'éthyle empêcheraient la

peroxydation lipidique. L'analyse de la HPLC-MS montre que les constituants majeurs de l'extrait méthanolique et ses fractions sont des polyphénols, particulièrement les catéchines, qui préviennent la peroxydation lipidique et qui ont une forte activité de piégeage des radicaux superoxyde, peroxyde d'hydrogène et de l'acide nitrique (El-Beshbishy *et al.*, 2011). Le traitement des animaux par la fraction à l'acétate d'éthyle de *O. pulcherrima* a entraîné une augmentation de la concentration des nitrites, ce qui suggère que la fraction contiendrait des métabolites bioactifs à même de potentialiser la synthèse des nitrites. C'est le cas des flavonoïdes qui auraient la capacité d'augmenter la synthèse de NO (Souza *et al.*, 2021). Dans cette étude, les données biochimiques sont en corrélation avec les résultats histomorphométriques et tous deux confirment les dommages hépatiques.

L'analyse histopathologique du foie des souris infestées par *S. mansoni* et non traitées a montré une augmentation du nombre et de la taille des granulomes, des miracidies viables, l'élargissement de la veine porte, la prolifération extensive du canal biliaire et l'accumulation extensive des tissus fibreux. Des études ont par ailleurs montré que la synthèse de collagène est maximale chez la souris 8 semaines post infestation avec 50 cercaires. De même, chez les souris infestées et non traitées, les foies étaient histologiquement fibrotiques et caractérisés par les dépôts de collagènes de type I. En effet, les œufs de *S. mansoni* provoquent des inflammations granulomateuses dans le foie de l'hôte pendant la phase aiguë et conduisent à des lésions hépatiques chroniques, qui pourraient progresser à la schistosomiase hépatosplénique avec dépôt de granulomes d'œufs et fibrose sur la paroi des vaisseaux (Chen, 2014; Chuah *et al.*, 2014). La cirrhose du foie est le stade avancé de la fibrose due à une inflammation chronique (Koyama & Brenner, 2017). Les cellules hépatiques de Kupffer sont activées et les macrophages dérivés de la moelle osseuse sont recrutés dans le foie lors d'une exposition à des inducteurs inflammatoires ou des lésions hépatiques (Luo *et al.*, 2017). Le TGF- $\beta$ 1 produit par les macrophages accélère la transformation des cellules de Ito en myofibroblastes responsables de la matrice extracellulaire, conduisant à la fibrose (Luo *et al.*, 2017).

Ces résultats sont également en accord avec ceux de Kadry *et al.* (2013), Ramez *et al.* (2021) qui ont trouvé la même artéculaire histopathologique du foie après l'infestation par *S. mansoni*. Le traitement avec l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et sa fraction à l'acétate d'éthyle a montré une réduction du nombre et de la taille des granulomes, des signes d'augmentation de la réaction immunitaire se manifestant par une couronne lymphocytaire entourant les granulomes, une diminution de la teneur en fibrose et en collagène et enfin la destruction des œufs de schistosomes. Les améliorations ainsi observées sur les coupes

histologiques du foie pourraient être attribuées à la propriété antioxydante de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et de sa fraction à l'acétate éthyle caractérisée par l'élimination des produits de réactions oxydantes et par l'assistance des médiateurs de l'immunité dans la destruction des œufs.

Les résultats des travaux de la présente étude sur *Ozoroa pulcherrima* indiquent que cette plante possède des propriétés pharmacologiques qui justifient son développement comme nouvelle source de composés de phytothérapie. De ce fait, il est nécessaire de caractériser son effet sur les systèmes biologiques, y compris des effets toxiques. Dans cette dernière partie du travail, un intérêt a été porté sur l'étude toxicologique de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima*, extrait plus efficace que l'extrait aqueux sur la schistosomiase à *Schistosoma mansoni* tant *in vitro* que *in vivo*.

La toxicité aiguë peut se définir comme l'ensemble des effets néfastes se produisant immédiatement ou peu de temps après une exposition unique ou répétée sur une période de moins de 24 heures à une ou plusieurs substances (Walum, 1998). Les données obtenues après un essai de toxicité aiguë chez l'animal peuvent être utilisées pour satisfaire à des besoins de classification du danger par le biais de la DL<sub>50</sub>, et pour l'évaluation des risques pour la santé humaine et/ou pour l'environnement (OECD, 2008a). L'étude de la toxicité aiguë de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* révèle que la DL<sub>50</sub> est supérieure à 5000 mg/kg. Selon l'OECD (2008a), une DL<sub>50</sub> supérieure à 5000 mg/kg permet de classer la toxicité de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* dans la catégorie 5 du système de classification globalement harmonisé (SGH) des substances chimiques, catégorie caractérisant les substances faiblement toxiques. Il en découle au regard de cette étude en toxicité aiguë que les seuls changements liés au traitement ont été observés les 30 premières minutes après administration de l'extrait : les souris présentaient à cet effet une manifestation d'étirement, mais ce symptôme était fugace. Aucun autre changement lié au traitement n'a été observé sur tout le reste de 14 jours d'observation, autant sur le poids corporel que sur le poids relatif des organes étudiés. Ces résultats suggèrent donc que l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* présente de très faibles risques pour la santé en administration orale unique.

Les études de toxicité subaiguë fournissent des informations sur la posologie, la toxicité des organes cibles et identifient les effets indésirables observables qui peuvent affecter la durée de vie moyenne des animaux de laboratoire. Par conséquent, dans cette étude, la toxicité subaiguë de l'extrait méthanolique des racines de *O. pulcherrima* a été évaluée chez les souris aux doses de 100, 200 et de 400 mg / kg pendant 28 jours. Les changements de poids corporel servent d'indication sensible de l'état de santé général des animaux (Hilaly *et al.*, 2004). Après 28 jours de

traitement avec l'extrait méthanolique, tous les animaux ont présenté une évolution normale du poids corporel. On peut ainsi dire que l'extrait métanolique de *O. pulcherrima* n'a pas interféré avec le métabolisme normal des animaux. Selon Féres *et al.* (2006), les animaux qui perdent 10 % de leur poids corporel initial ne survivront probablement pas, ce qui est une indication des effets secondaires indésirables. De même, les changements dans le poids des organes ont été utilisés comme indices de toxicité chez les animaux qui pourraient être évalués dans des études toxicologiques (Balogun *et al.*, 2014; Sireeratawong *et al.*, 2008). A l'exception de l'augmentation significative du poids relatif des poumons aux doses 100 mg/kg et de 400 mg/kg respectivement chez les souris mâles et femelles et qui était d'ailleurs réversible après arrêt du traitement, les résultats ont démontré que l'administration répétée de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* n'a pas induit des effets secondaires significatifs sur le poids relatif des organes vitaux.

Il est extrêmement important de tester les paramètres hématologiques car le système hématopoïétique est l'une des cibles les plus sensibles aux composés toxiques. Il est également utilisé pour mesurer l'état physiologique et pathologique des animaux et des humains (Olson *et al.*, 2000). L'administration de l'extrait n'a entraîné aucune différence significative sur le nombre total des globules rouges, le volume corpusculaire moyen, la concentration de l'hémoglobine, l'hématocrite et le nombre de plaquettes, ce qui suggère que l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* n'affecte pas l'érythropoïèse, la morphologie ou la fragilité osmotique des globules rouges (Odeyemi *et al.*, 2009). Les leucocytes sont la première ligne de défense cellulaire qui répondent aux agents infectieux, aux lésions tissulaires ou à toute inflammation. De plus, aucun changement significatif n'a été observé dans le taux de neutrophiles, de lymphocytes et de monocytes chez les souris ayant reçues l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima*, ce qui suggère que l'extrait ne pourrait pas influencer négativement sur le système immunitaire tant chez les mâles que chez les femelles.

L'évaluation de la biochimie sérique a été effectuée pour identifier les altérations possibles des fonctions hépatiques affectées par l'extrait. L'analyse de la fonction hépatique est très importante dans l'évaluation de la toxicité des médicaments et des extraits de plantes car elle est nécessaire à la survie d'un organisme. Des niveaux élevés de l'ALAT et de l'ASAT sont signalés dans les maladies du foie ou l'hépatotoxicité (Brautbar & Williams, 2002). Une diminution des protéines totales affecte également les fonctions hépatocellulaires et sécrétoires du foie. L'absence d'altérations significatives des niveaux de l'ALAT, de l'ASAT et de protéines totales, qui sont de bons indicateurs des fonctions hépatiques (Olorunnisola *et al.*, 2012), suggère que l'administration subchronique de l'extrait n'altère ni les hépatocytes, ni le métabolisme normal des souris. Ces

observations ont été confirmées par l'évaluation histologique des organes illustrée dans la partie résultat. Sur la base des résultats trouvés dans cette étude, nous pouvons ainsi conclure que l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* serait non toxique et pourrait être bien utilisé à des fins pharmacologique et thérapeutique. Certains facteurs associés à l'athérosclérose et aux maladies cardiovasculaires sont les taux de lipides et de lipoprotéines dans le sang (Wang *et al.*, 2010). Concernant le profil lipidique, exceptée la différence significative du cholestérol total observée à la dose de 100 mg/kg chez les souris femelles, aucun changement significatif du taux de cholestérol total et de triglycérides n'a été observé dans tous les autres groupes essais et satellites comparativement au groupe témoin sain.

La recherche des composés capables de tuer les parasites n'est pas difficile. Cependant, il est difficile de trouver une substance qui peut tuer le parasite sans altérer les cellules de l'hôte. Ainsi, les études *in vitro* sur des composés nouveaux devraient inclure la comparaison des données de la cytotoxicité des cellules humaines ou animales dans les tissus pour ainsi établir que le composé a une activité antischistosomale sélective et doit être rassurant pour l'utilisation clinique future chez les humains. L'efficacité des extraits et fractions de plante contre les schistosomes est définie comme curative en tuant le ver adulte et prophylactique en tuant les cercaires. Plusieurs paramètres à l'instar de la motricité et de la mortalité ont été évalués comme indicateurs biologiques de l'activité antischistosomale. Par contre, les tests de cytotoxicité utilisent des séries de concentrations croissantes de substances antischistosomes pour déterminer quelle concentration entraîne la mort de 50 % des cellules de l'hôte (CI<sub>50</sub>). L'extrait aqueux, l'extrait méthanolique et les fractions à l'acétate d'éthyle et au *n*-hexane de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* ont montrés les valeurs de concentration inhibitrice 50 (IC<sub>50</sub>) de 354,73 µg/mL; 45,55 µg/mL; 52,07 µg/mL et de 37,55 µg/mL respectivement. Ces résultats suggèrent que la fraction au *n*-hexane est relativement plus toxique que les autres substances. Selon le « United States Natural Compounds in CancerTherapy plant screening program », un extrait de plante est généralement considéré avoir une activité cytotoxique *in vitro*, si la valeur de sa CI<sub>50</sub> suivant l'incubation entre 48 heures et 72 heures est moins de 20 µg/mL (Boik, 2001). En se référant sur ce critère, toutes les valeurs des CI<sub>50</sub> obtenues dans cette étude sont supérieures à 20 µg/mL, indiquant ainsi que l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique et les fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle de *Ozoroa pulcherrima* sont faiblement cytotoxiques. Toutefois, il est important de noter que le niveau de toxicité de l'extrait aqueux et de l'extrait méthanolique et ses différentes fractions diffère considérablement. La composition chimique de ces deux extraits serait assez différente pour justifier une telle divergence.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Une première partie de ce travail a été consacrée à l'étude des effets pharmacologiques l'extrait aqueux de *O. pulcherrima* afin de mimer au mieux les conditions d'utilisation de la plante en médecine traditionnelle. Par ailleurs, une seconde partie du travail a été consacrée à l'étude des effets de l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et de sa fraction à l'acétate d'éthyle, dans le but de définir quel solvant permettrait d'obtenir la meilleure activité et optimiser ainsi l'utilisation traditionnelle de *Ozoroa pulcherrima*. Pour couronner, l'innocuité de la plante a été vérifiée à travers les études de toxicité orale aiguë et subaiguë de l'extrait méthanolique, ainsi que la cytotoxicité de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique et des fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima*. Ces résultats attestent ainsi que :

- L'extrait aqueux de *O. pulcherrima*, l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et les fractions au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique ont présenté un effet schistosomicide *in vitro* marqué par une mortalité accrue des cercaires et des vers adultes de *Schistosoma mansoni*, ainsi qu'une réduction importante de la motricité de schistosomes vivants. La fraction au *n*-hexane s'est avérée être la plus efficace avec une concentration létale 50 la plus faible ( $CL_{50} = 79,54 \mu\text{g/mL}$ ).
- L'extrait méthanolique et sa fraction à l'acétate d'éthyle possèdent également *in vivo* une activité antischistosomale marquée par une réduction de la charge parasitaire, de la charge ovulaire fécale hépatique et intestinale.
- L'administration de l'extrait méthanolique aussi bien que sa fraction à l'acétate d'éthyle a entraîné une normalisation des paramètres des marqueurs hépatiques, une amélioration des marqueurs du stress oxydant et la réduction du nombre et du volumes des granulomes bilharziens.
- Les résultats de la toxicité aiguë et subaiguë suggèrent que l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* est relativement rassurant lorsqu'il est administré par voie orale à des souris femelles et mâles. Ces données augmentent ainsi la confiance pour l'utilisation de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* dans le développement de produits pharmaceutiques. La dose de 200 mg/kg est ainsi la dose sans effet toxique observable.
- La cytotoxicité de l'extrait aqueux, de l'extrait méthanolique et de ses fractions dérivées est faible, indiquant ainsi que les extraits et fractions de *Ozoroa pulcherrima* possèdent un certain niveau de sécurité bien que leur utilisation nécessite d'être contrôlée pour éviter d'excéder la limite toxique.

D'une manière générale l'extrait méthanolique de *O. pulcherrima* et sa fraction à l'acétate d'éthyle ont été plus efficaces que l'extrait aqueux tant *in vitro* qu'*in vivo*. L'extrait méthanolique a eu la meilleure activité antischistosomale à la dose de 200 mg/kg. Cet extrait et sa fraction à l'acétate d'éthyle constitueraient ainsi une source potentielle pour la recherche des molécules alternatives et/ou complémentaires pour la lutte contre la schistosomiase.

Dans l'optique de mieux appréhender les différentes activités de *Ozoroa pulcherrima* et de valoriser cette plante médicinale, il sera question pour les études ultérieures :

- d'évaluer *in vitro et in vivo* les effets des composés isolés de l'extrait méthanolique sur les schistosomes et la pathologie à *Schistosoma mansoni*;
- de réaliser les mélanges extrait et des fractions de l'extrait méthanolique de *Ozoroa pulcherrima* à des proportions différentes et vérifier leurs activités antischistosomales *in vitro et in vivo*;
- de déterminer les effets de l'extrait méthanolique en traitement préventif sur la pathologie induite par *Schistosoma mansoni*;
- de vérifier le potentiel immunomodulateur de l'extrait méthanolique et composés isolés sur les cultures cellulaires et *in vivo* sur des modèles animaux immunodépressifs ;
- d'évaluer les effets de l'extrait méthanolique sur les complications nerveuses de la schistosomiase;
- de procéder à la standardisation de l'extrait méthanolique et fractions.

# REFERENCES

## REFERENCES

- Abdallahi, O. M., Hanna, S., De Reggi, M., & Gharib, B. (1999).** Visualization of oxygen radical production in mouse liver in response to infection with *Schistosoma mansoni*. *Liver*, *19*(6), 495–500. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.1999.tb00082.x>
- Abreu, P. M., Martins, E. S., Kayser, O., Bindseil, K. U., Siems, K., Seemann, A., & Frevert, J. (1999).** Antimicrobial, antitumor and antileishmania screening of medicinal plants from Guinea-Bissau. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, *6*(3), 187–195. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(99\)80008-7](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(99)80008-7)
- Abu Almaaty, A. H., Rashed, H. A. E.-H., Soliman, M. F. M., Fayad, E., Althobaiti, F., & El-Shenawy, N. S. (2021).** Parasitological and Biochemical Efficacy of the Active Ingredients of *Allium sativum* and *Curcuma longa* in *Schistosoma mansoni* Infected Mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(15), 4542. <https://doi.org/10.3390/molecules26154542>
- Adjanohoun, J., Aboubakar, N., Dramane, K., Ebot, M., Ekpere, J., Enow-Orock, E., Focho, D., Gbile, Z., A Kamanyi, Kamsu Kom, J., Keita, A., Mbenkum, T., Mbi, C., Mbiele, A., Mbome, I., Mubiru, N., Nancy, W., Nkongmeneck, B., Satabie, B., ... Wirmum, C. (1996).** *Contribution to ethnobotanical and floristic studies in Cameroon*. CSTR/OUA, CNPMS, Porto-Novo.
- Adjanohoun, J., Adjakidje, V., Ake, A., Ake, A., Akoègninou, A., d'Almeida, J., Apovo, F., Boukef, K., Chadare, M., Cusset, G., Dramane, K., Eyme, J., Gassita, J., Gbaguidi, N., Goudote, E., Guinko, S., Houngnon, P., LO, I., Keita, A., ... Zohoun, T. (1989).** *Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin*. Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris, France.
- Ahmed, A. S., McGaw, L. J., Moodley, N., Naidoo, V., & Eloff, J. N. (2014).** Cytotoxic, antimicrobial, antioxidant, antilipoxygenase activities and phenolic composition of *Ozoroa* and *Searsia* species (Anacardiaceae) used in South African traditional medicine for treating diarrhoea. *South African Journal of Botany*, *95*, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.07.013>
- Al-Quraishy, S., Al-Khalifa, M., & Dkhil, M. (2013).** Role of berberine on schistosomiasis-induced oxidative stress and damage in spleen of mice. *Life Science Journal*, *10*, 135–139.
- Al-Sherbiny, M. M., Osman, A. M., Hancock, K., Deelder, A. M., & Tsang, V. C. (1999).** Application of immunodiagnostic assays: Detection of antibodies and circulating antigens in human schistosomiasis and correlation with clinical findings. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *60*(6), 960–966. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.960>
- Ansari, M. T., Saify, Z. S., Sultana, N., Ahmad, I., Saeed-Ul-Hassan, S., Tariq, I., & Khanum, M. (2013).** Malaria and artemisinin derivatives: An updated review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *13*(13), 1879–1902. <https://doi.org/10.2174/13895575113136660097>

- Aubry, P., & Gaüzère, B.A. (2021).** Schistosomoses ou bilharzioses. *médecine tropicale*, 10.
- Ayoola, G. A., Coker, H. A., Adesegun, S. A., Adepoju-Bello, A. A., Obaweya, K., Ezennia, E. C., & Atangbayila, T. O. (2008).** Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1019–1024. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v7i3.14686>
- Badria, F., Abou-Mohamed, G., El-Mowafy, A., Masoud, A., & Salama, O. (2001).** Mirazid: A New Schistosomicidal Drug. *Pharmaceutical Biology*, 39(2), 127–131. <https://doi.org/10.1076/phbi.39.2.127.6253>
- Balogun, S. O., da Silva, I. F., Colodel, E. M., de Oliveira, R. G., Ascêncio, S. D., & Martins, D. T. de O. (2014).** Toxicological evaluation of hydroethanolic extract of *Helicteres sacarolha* A. St.- Hil. Et al. *Journal of Ethnopharmacology*, 157, 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.09.013>
- Barbarino, E., & Lourenço, S. O. (2005).** An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 17(5), 447–460. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-1641-4>
- Bargagli, E., Olivieri, C., Bennett, D., Prasse, A., Muller-Quernheim, J., & Rottoli, P. (2009).** Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: A review. *Respiratory Medicine*, 103(9), 1245–1256. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2009.04.014>
- Bin Dajem, S. M., Shati, A. A., Adly, M. A., Ahmed, O. M., Ibrahim, E. H., & Mostafa, O. M. S. (2011).** Green tea (*Camellia sinensis*) ameliorates female *Schistosoma mansoni*-induced changes in the liver of Balb/C mice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(4), 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.06.003>
- Bogninou-Agbidinokoun, Chalard P, Patel K, Delort L, Billard H, Figuerredo G, Avlessi F, Caldefie-Chezet F, Troin Y, & Sohounhloue D. (2016).** Chemical composition and antiproliferative activity of leaves and stems essential oils of *Ozoroa pulcherrima* upon breast cancer cells MCF-7. *International Journal of Advanced Research*, 4(1), 8.
- Boik, J. C. (2001).** *Natural Compounds in Cancer Therapy: Promising Nontoxic Antitumor Agents From Plants & Other Natural Sources* (1st edition). Oregon Medical Press.
- Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., & Delattre, J. (2003).** *Radicaux libres et anti-oxydants. IN: Biochimie pathologique: Aspects moléculaires et cellulaire* Médecine-sciences-Flammarion, pp. 59–81.
- Bourée, P. (2008).** *Aide-mémoire de parasitologie et de pathologie tropicale* (4<sup>o</sup> Éd.). Médecine-Sciences Flammarion.
- Braguine, C. G., Bertanha, C. S., Gonçalves, U. O., Magalhães, L. G., Rodrigues, V., Melleiro Gimenez, V. M., Groppo, M., Silva, M. L. A. E., Cunha, W. R., Januário, A. H., & Pauletti, P. M. (2012).** Schistosomicidal evaluation of flavonoids from two species of *Styrax* against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Pharmaceutical Biology*, 50(7), 925–929. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.649857>

- Braguine, C. G., Costa, E. S., Magalhães, L. G., Rodrigues, V., Filho, A. A. da S., Bastos, J. K., Silva, M. L. A., Cunha, W. R., Januário, A. H., & Pauletti, P. M. (2009).** Schistosomicidal Evaluation of *Zanthoxylum naranjillo* and its Isolated Compounds against *Schistosoma mansoni* Adult Worms. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 64(11–12), 793–797. <https://doi.org/10.1515/znc-2009-11-1207>
- Brautbar, N., & Williams, J. (2002).** Industrial solvents and liver toxicity: Risk assessment, risk factors and mechanisms. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 205(6), 479–491. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00175>
- Bruneton, J., & Poupon, E. (2016).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (5e éd). Lavoisier Tec & doc.
- Caffrey, C. R. (2007).** Chemotherapy of schistosomiasis: Present and future. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(4), 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.05.031>
- Carvalho, F. A., da Silva, B. C., Oda, F. B., Junior, J. C. P., Crevelin, E. J., Crotti, A. E. M., Caldas, L. G. M., & Dos Santos, A. G. (2022).** In Vitro Schistosomicidal Activities of the Leaf Extracts from *Casearia sylvestris* Varieties. *Chemistry & Biodiversity*, 19(2), e202100948. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100948>
- Chai, J.-Y. (2013).** Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: An update. *Infection & Chemotherapy*, 45(1), 32–43. <https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.1.32>
- Chan, J. D., Zarowiecki, M., & Marchant, J. S. (2013).** Ca<sup>2+</sup> channels and Praziquantel: A view from the free world. *Parasitology International*, 62(6), 619–628. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.12.001>
- Cheever, A. W. (1968).** Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bulletin of the World Health Organization*, 39(2), 328–331.
- Chen, M. (2014).** Assessment of morbidity due to *Schistosoma japonicum* infection in China. *Infectious Diseases of Poverty*, 3, 6. <https://doi.org/10.1186/2049-9957-3-6>
- Christensen, N., Grete, G., & Flemming, F. (1984).** *Parasitological techniques for use in routine Laboratory maintenance of schistosomes and for use in studies on the epidemiology of human and Bovine schistosomiasis*. Danish Bilharziasis Laboratory.
- Chuah, C., Jones, M. K., Burke, M. L., McManus, D. P., & Gobert, G. N. (2014).** Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends in Parasitology*, 30(3), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.12.009>
- Colley, D. G., Bustinduy, A. L., Secor, W. E., & King, C. H. (2014).** Human schistosomiasis. *Lancet (London, England)*, 383(9936), 2253–2264. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61949-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61949-2)
- de Carvalho, L. S. A., de Souza, V. C., Rodrigues, V. C., Ribeiro, A. C., Nascimento, J. W. L., Capriles, P. V. S. Z., Pinto, P. de F., de Moraes, J., & da Silva Filho, A. A. (2022).** Identification of Asiaticoside from *Centella erecta* (Apiaceae) as Potential Apyrase

- Inhibitor by UF-UHPLC-MS and Its In Vivo Antischistosomal Activity. *Pharmaceutics*, 14(5), 1071. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14051071>
- de Melo, N. I., Magalhaes, L. G., de Carvalho, C. E., Wakabayashi, K. A. L., de P Aguiar, G., Ramos, R. C., Mantovani, A. L. L., Turatti, I. C. C., Rodrigues, V., Groppo, M., Cunha, W. R., Veneziani, R. C. S., & Crotti, A. E. M. (2011).** Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against adult *Schistosoma mansoni* worms. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(1), 762–773. <https://doi.org/10.3390/molecules16010762>
- de Moraes, J. (2015).** Natural products with antischistosomal activity. *Future Medicinal Chemistry*, 7(6), 801–820. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.23>
- de Oliveira, C. N. F., Frezza, T. F., Garcia, V. L., Figueira, G. M., Mendes, T. M. F., & Allegretti, S. M. (2017).** *Schistosoma mansoni*: In vivo evaluation of *Phyllanthus amarus* hexanic and ethanolic extracts. *Experimental Parasitology*, 183, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.10.008>
- de Oliveira, R. N., Rehder, V. L. G., Santos Oliveira, A. S., Júnior, Í. M., de Carvalho, J. E., de Ruiz, A. L. T. G., Jeraldo, V. de L. S., Linhares, A. X., & Allegretti, S. M. (2012).** *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. *Experimental Parasitology*, 132(2), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.005>
- Denisov, E. T., & Afanas'ev, I. B. (2005).** *Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420030853>
- Djordjević, V. B., Zvezdanović, L., & Cosić, V. (2008).** [Oxidative stress in human diseases]. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, 136 Suppl 2, 158–165. <https://doi.org/10.2298/sarh08s2158d>
- Dkhil, M. A. (2014).** Role of berberine in ameliorating *Schistosoma mansoni*-induced hepatic injury in mice. *Biological Research*, 47(1), 8. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-8>
- Doenhoff, M. J., Cioli, D., & Utzinger, J. (2008).** Praziquantel: Mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(6), 659–667. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328318978f>
- dos Santos, A. F., Fonseca, S. A., César, F. A., de Azevedo Albuquerque, M. C. P., Santana, J. V., & Santana, A. E. G. (2014).** A penta-substituted pyridine alkaloid from the rhizome of *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. Is active against *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology Research*, 113(3), 1077–1084. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3743-2>
- Duarte Galhardo de Albuquerque, R. D., Mahomoodally, M. F., Lobine, D., Suroowan, S., & Rengasamy, K. R. (2020).** Botanical Products in the Treatment and Control of Schistosomiasis: Recent Studies and Distribution of Active Plant Resources According to Affected Regions. *Biology*, 9(8), E223. <https://doi.org/10.3390/biology9080223>

- Duvall, R. H., & DeWitt, W. B. (1967).** An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 16(4), 483–486. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1967.16.483>
- El Hilaly, J., Israili, Z. H., & Lyoussi, B. (2004).** Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.11.009>
- El-Beshbishy, H. A., Tork, O. M., El-Bab, M. F., & Autifi, M. A. (2011).** Antioxidant and antiapoptotic effects of green tea polyphenols against azathioprine-induced liver injury in rats. *Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology*, 18(2), 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2010.08.002>
- Ellman, G. L. (1959).** Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- El-Morsy, S. M. A., El-Tantawy, S. A. M., & El-Shabasy, E. A. (2022).** Antischistosomal effects of *Ficus carica* leaves extract and/or PZQ on *Schistosoma mansoni* infected mice. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, 46(1), 87–102. <https://doi.org/10.1007/s12639-021-01417-7>
- El-Rigal, N. S., Aly, S. A., Rizk, M., & Said, A. (2006).** effect of *ailanthus altissima* and *ziziphus spina christi* extracts on some hepatic marker enzymes and antioxidants in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 56(2), 199–206.
- El-Sawi, S. A., & Sleem, A. A. (2010).** Flavonoids and hepatoprotective activity of leaves of *Senna surattensis* (Burm.f.) in CCl<sub>4</sub> induced hepatotoxicity in rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(6), 1326–1333.
- Essam, A. M., & Ashraf, A. E. (2013).** *Effect of Curcumin on Hematological, Biochemical and Antioxidants Parameters in Schistosoma mansoni Infected Mice* (SSRN Scholarly Paper No. 2572263). <https://papers.ssrn.com/abstract=2572263>
- Facundo, H. T. F., Brandt, C. T., Owen, J. S., & Lima, V. L. M. (2004).** Elevated levels of erythrocyte-conjugated dienes indicate increased lipid peroxidation in schistosomiasis mansoni patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, 37(7), 957–962. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004000700003>
- Fadladdin, Y. A. J. (2022).** Evaluation of Antischistosomal Activities of Crude Aqueous Extracts of *Artemisia annua*, *Nigella sativa*, and *Allium sativum* against *Schistosoma mansoni* in Hamsters. *BioMed Research International*, 2022, e5172287. <https://doi.org/10.1155/2022/5172287>
- Favier, A. (2003).** *Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique*. 8.
- Féres, C. a. O., Madalosso, R. C., Rocha, O. A., Leite, J. P. V., Guimarães, T. M. D. P., Toledo, V. P. P., & Tagliati, C. A. (2006).** Acute and chronic toxicological studies of

*Dimorphandra mollis* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(3), 450–456. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.06.002>

**Figuroa, J. D., Fuentes-Lemus, E., Dorta, E., Melin, V., Cortés-Ríos, J., Faúndez, M., Contreras, D., Denicola, A., Álvarez, B., Davies, M. J., & López-Alarcón, C. (2019).** Quantification of carbonate radical formation by the bicarbonate-dependent peroxidase activity of superoxide dismutase 1 using pyrogallol red bleaching. *Redox Biology*, 24, 101207. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101207>

**Difiore, M. S. H. di, & Schmidt, I. G. (1981).** *Atlas of human histology*. Lea & Febiger.

**Gaeta, L. M., Tozzi, G., Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2002).** Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatric subjects. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 322(1–2), 117–120. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(02\)00163-8](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(02)00163-8)

**Gąsecka, M., Mleczek, M., Siwulski, M., & Niedzielski, P. (2016).** Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. *European Food Research and Technology*, 242(5), 723–732. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2580-1>

**Getilini, M., Caumes, E., Danis, M., Mouchet, J., Duflo, B., Lagardère, B., Richard-lenoble, D., & Brucker, G. (1993).** *Médecine tropicale*, Médecine-Sciences Flammarion.

**Gharib, B., Abdallahi, O. M., Dessein, H., & De Reggi, M. (1999).** Development of eosinophil peroxidase activity and concomitant alteration of the antioxidant defenses in the liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Journal of Hepatology*, 30(4), 594–602. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(99\)80189-5](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(99)80189-5)

**Gomes, D. S., Negrão-Corrêa, D. A., Miranda, G. S., Rodrigues, J. G. M., Guedes, T. J. F. L., de Lucca Junior, W., Sá Filho, J. C. F. de, Nizio, D. A. de C., Blank, A. F., Feitosa, V. L. C., & Dolabella, S. S. (2022).** *Lippia alba* and *Lippia gracilis* essential oils affect the viability and oviposition of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*, 231, 106434. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106434>

**Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949).** Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 177(2), 751–766.

**Gryseels, B. (2012).** Schistosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 383–397. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.004>

**Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2006).** *Textbook of medical physiology* (11th ed). Elsevier Saunders.

**Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004).** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>

**Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (2019).** Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(51), 19683–19708. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006217>

- Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z., & Rachlin, E. M. (1988).** Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 157(1), 87–94. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)80015-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)80015-9)
- Hirata, M., Hirata, K., Kage, M., Zhang, M., Hara, T., & Fukuma, T. (2001).** Effect of nitric oxide synthase inhibition on *Schistosoma japonicum* egg-induced granuloma formation in the mouse liver. *Parasite Immunology*, 23(6), 281–289. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00384.x>
- Hotez, P. J., Bundy, D. a. P., Beegle, K., Brooker, S., Drake, L., de Silva, N., Montresor, A., Engels, D., Jukes, M., Chitsulo, L., Chow, J., Laxminarayan, R., Michaud, C. M., Bethony, J., Correa-Oliviera, R., Shu-Hua, X., Fenwick, A., & Savioli, L. (2006).** *Helminth infections: Soil-transmitted helminth infections and schistosomiasis*. Oxford University Press and World Bank. <http://repository.kln.ac.lk/handle/123456789/19547>
- Huang, M., Lu, J.-J., Huang, M.-Q., Bao, J.-L., Chen, X.-P., & Wang, Y.-T. (2012).** Terpenoids: Natural products for cancer therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21(12), 1801–1818. <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.727395>
- Huang, Z., Willett, W. C., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Manson, J. E., Rosner, B., Speizer, F. E., & Hankinson, S. E. (1999).** Waist circumference, waist:hip ratio, and risk of breast cancer in the Nurses' Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 150(12), 1316–1324. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009963>
- Jatsa, H. B., Kenfack, C. M., Simo, D. N., Feussom, N. G., Nkondo, E. T., Tchuem Tchuente, L.-A., Tsague, C. D., Dongo, E., & Kamtchouing, P. (2015).** Schistosomicidal, hepatoprotective and antioxidant activities of the methanolic fraction from *Clerodendrum umbellatum* Poir leaves aqueous extract in *Schistosoma mansoni* infection in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15, 248. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0788-z>
- Jatsa, H. B., Pereira, C. A. de J., Pereira, A. B. D., Negrão-Corrêa, D. A., Braga, F. C., Maciel, G. M., Castilho, R. O., Kamtchouing, P., & Teixeira, M. M. (2015).** In Vitro Evaluation of *Sida pilosa* Retz (Malvaceae) Aqueous Extract and Derived Fractions on *Schistosoma mansoni*. *Pharmacology & Pharmacy*, 6(8), 380–390. <https://doi.org/10.4236/pp.2015.68039>
- Jatsa, H. B., Russo, R. C., Pereira, C. A. de J., Aguilar, E. C., Garcia, C. C., Araújo, E. S., Oliveira, J. L. R., Rodrigues, V. F., de Oliveira, V. G., Alvarez-Leite, J. I., Braga, F. C., Louis-Albert Tchuem Tchuente, null, Kamtchouing, P., Negrão-Corrêa, D. A., & Teixeira, M. M. (2016).** Improvement of the liver pathology by the aqueous extract and the n-butanol fraction of *Sida pilosa* Retz in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 180, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.017>
- Jatsa, H., Cannet, C., Ulrich, F., Gipwe, N., Dzeuffiet, P., Djomeni, D., Tchuem Tchuente, L.-A., & Kamtchouing, P. (2018).** Analyses histologiques du foie des souris infectées par *Schistosoma mansoni* après traitement par *Ozoroa pulcherrima* Schweinf. *Revue Française d'Histotechnologie*, 30(1), 31–49.

- Jatsa, H.B., Keugni, A.B., Tsague, D.C., Bogning, Z.C., Minoue, N.G., Dongo E., & Dongmo B.A. (2018).** Analgesic and anti-inflammatory properties of the ethyl acetate fraction from *Ozoroa pulcherrima* schweinf roots methanolic extract in animal models. *International Journal of Phytopharmacology*, 9, 78–87.
- João, D. A., Silva, T. da C., Prado, D. G., Martins, C. H. G., Santiago, M. B., Goulart, L. R., Martins, M. M., Aquino, F. J. T. de, Oliveira, A. de, Sousa, R. M. F. de, Cunha, L. C. S., & Morais, S. A. L. de. (2020).** Chemical profile of the twigs of *Ozoroa obovata* by HPLC-MS-ESI and antimicrobial activity. *Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação*, 5(2), 140–155. <https://doi.org/10.18554/rbcti.v5i2.4359>
- Jomová, K., Hudecova, L., Lauro, P., Simunkova, M., Alwasel, S. H., Alhazza, I. M., & Valko, M. (2019).** A Switch between Antioxidant and Prooxidant Properties of the Phenolic Compounds Myricetin, Morin, 3',4'-Dihydroxyflavone, Taxifolin and 4-Hydroxy-Coumarin in the Presence of Copper(II) Ions: A Spectroscopic, Absorption Titration and DNA Damage Study. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(23), E4335. <https://doi.org/10.3390/molecules24234335>
- Junqueira, L. C., Bignolas, G., & Brentani, R. R. (1979).** Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical Journal*, 11(4), 447–455. <https://doi.org/10.1007/BF01002772>
- Kadry EA. (2012).** Physiological effects of curcumin on mice infected with schistosoma mansoni. *Journal of Sebha University*, 11(1), 5–15.
- Kadry, M., Mohamed, Azza M., Farrag, E. M., & Fayed, D. B. (2013).** Influence of some micronutrients and *Citharexylum quadrangular* extract against liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected mice. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(38), 2628–2638. <https://doi.org/10.5897/AJPP12.620>
- Kamdem, S. D., Moyou-Somo, R., Brombacher, F., & Nono, J. K. (2018).** Host Regulators of Liver Fibrosis During Human Schistosomiasis. *Frontiers in Immunology*, 9, 2781. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02781>
- Kang, N., Shen, W., Gao, H., Feng, Y., Zhu, W., Yang, S., Liu, Y., Xu, Q., & Yu, D. (2018).** Antischistosomal Properties of Hederacolchiside A1 Isolated from *Pulsatilla chinensis*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(6), E1431. <https://doi.org/10.3390/molecules23061431>
- Katz, N., Chaves, A., & Pellegrino, J. (1972).** A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, 14(6), 397–400.
- Kiros, G., Erko, B., Giday, M., & Mekonnen, Y. (2014).** Laboratory assessment of molluscicidal and cercariacidal effects of *Glinus lotoides* fruits. *BMC Research Notes*, 7, 220. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-220>
- Komoroski, B. J., Zhang, S., Cai, H., Hutzler, J. M., Frye, R., Tracy, T. S., Strom, S. C., Lehmann, T., Ang, C. Y. W., Cui, Y. Y., & Venkataramanan, R. (2004).** Induction and inhibition of cytochromes P450 by the St. John's wort constituent hyperforin in human

- hepatocyte cultures. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 32(5), 512–518. <https://doi.org/10.1124/dmd.32.5.512>
- Koyama, Y., & Brenner, D. A. (2017).** Liver inflammation and fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(1), 55–64. <https://doi.org/10.1172/JCI88881>
- Krier, M., & Ahmed, A. (2009).** The asymptomatic outpatient with abnormal liver function tests. *Clinics in Liver Disease*, 13(2), 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2009.02.001>
- Krishna, M. (2013).** Microscopic anatomy of the liver. *Clinical Liver Disease*, 2(Suppl 1), S4–S7. <https://doi.org/10.1002/cld.147>
- Kyere-Davies, G., Agyare, C., Boakye, Y. D., Suzuki, B. M., & Caffrey, C. R. (2018).** Effect of Phenotypic Screening of Extracts and Fractions of *Erythrophleum ivorense* Leaf and Stem Bark on Immature and Adult Stages of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology Research*, 2018, 9431467. <https://doi.org/10.1155/2018/9431467>
- La Flamme, A. C., Patton, E. A., Bauman, B., & Pearce, E. J. (2001).** IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(3), 1903–1911. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.3.1903>
- Ledwith, K., Ogburn, R., Cox, J., Graham, R., Fritzsche, A., Gosnell, D., & Manning, T. (2013).** Taxol: Efficacy against oral squamous cell carcinoma. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(4), 509–521. <https://doi.org/10.2174/1389557511313040004>
- Liu, Z.-Q. (2019).** Enhancing Antioxidant Effect against Peroxyl Radical-Induced Oxidation of DNA: Linking with Ferrocene Moiety! *Chemical Record (New York, N.Y.)*, 19(12), 2385–2397. <https://doi.org/10.1002/tcr.201800201>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010).** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Luo, J., Liang, Y., Kong, F., Qiu, J., Liu, X., Chen, A., Luxon, B. A., Wu, H. W., & Wang, Y. (2017).** Vascular endothelial growth factor promotes the activation of hepatic stellate cells in chronic schistosomiasis. *Immunology and Cell Biology*, 95(4), 399–407. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.109>
- Lyddiard, J. R. A., Whitfield, P. J., & Bartlett, A. (2002).** Antischistosomal bioactivity of isoflavonoids from *Millettia thonningii* (Leguminosae). *The Journal of Parasitology*, 88(1), 163–170. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0163:ABOIFM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0163:ABOIFM]2.0.CO;2)
- Magalhães, L. G., de Souza, J. M., Wakabayashi, K. A. L., Laurentiz, R. da S., Vinhólis, A. H. C., Rezende, K. C. S., Simaro, G. V., Bastos, J. K., Rodrigues, V., Esperandim, V. R., Ferreira, D. S., Crotti, A. E. M., Cunha, W. R., & e Silva, M. L. A. (2012).** In vitro efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, 110(5), 1747–1754. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2695-7>
- Magalhães, L. G., Machado, C. B., Morais, E. R., Moreira, E. B. de C., Soares, C. S., da Silva, S. H., Da Silva Filho, A. A., & Rodrigues, V. (2009).** In vitro schistosomicidal activity

- of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology Research*, 104(5), 1197–1201. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1311-y>
- Mahmoud, A. M., Germoush, M. O., Al-Anazi, K. M., Mahmoud, A. H., Farah, M. A., & Allam, A. A. (2018).** *Commiphora molmol* protects against methotrexate-induced nephrotoxicity by up-regulating Nrf2/ARE/HO-1 signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 499–509. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.171>
- Makkar, H. P. S., Becker, K., Abel, H., & Pawelzik, E. (1997).** Nutrient contents, rumen protein degradability and antinutritional factors in some colour- and white-flowering cultivars of *Vicia faba* beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(4), 511–520. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199712\)75:4<511::AID-JSFA907>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199712)75:4<511::AID-JSFA907>3.0.CO;2-M)
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., & Kefalas, P. (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, 89(3), 411.
- Matos-Rocha, T. J., Cavalcanti, M. G. S., Veras, D. L., Santos, A. F., Freitas, C. F. de, Suassuna, A. S. C. L., Melo, E. S. de, Barbosa-Filho, J. M., Alves, L. C., & Santos, F. A. B. D. (2020).** In vivo effect of essential oil of *Mentha x villosa* and its active compound against *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira De Biologia*, 80(3), 582–588. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.216607>
- McManus, D. P., Gordon, C., & Weerakoon, K. G. A. D. (2018).** Testing of water samples for environmental DNA as a surveillance tool to assess the risk of schistosome infection in a locality. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 76, 128–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.09.022>
- Miranda, V. H. S., Gomes, T. R., Eller, D. E., Ferraz, L. de C. N., Chaves, A. T., Bicalho, K. A., Silva, C. E. C., Birbrair, A., Pascoal Xavier, M. A., de Goes, A. M., Corrêa-Oliveira, R., Alves, É. A. R., & Bozzi, A. (2020).** Liver damage in schistosomiasis is reduced by adipose tissue-derived stem cell therapy after praziquantel treatment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(8), e0008635. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008635>
- Mølgaard, P., Nielsen, S. B., Rasmussen, D. E., Drummond, R. B., Makaza, N., & Andreassen, J. (2001).** Anthelmintic screening of Zimbabwean plants traditionally used against schistosomiasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(3), 257–264. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00377-9](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00377-9)
- Moraes, J. de, Almeida, A. A. C., Brito, M. R. M., Marques, T. H. C., Lima, T. C., Sousa, D. P. de, Nakano, E., Mendonça, R. Z., & Freitas, R. M. (2013).** Anthelmintic Activity of the Natural Compound (+)-Limonene Epoxide against *Schistosoma mansoni*. *Planta Medica*, 79(3/4), 253–258. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328173>
- Moraes, J. de, Nascimento, C., Lopes, P. O. M. V., Nakano, E., Yamaguchi, L. F., Kato, M. J., & Kawano, T. (2011).** *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of pipartine. *Experimental Parasitology*, 127(2), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.021>

- Mostafa, O. M. S., Eid, R. A., & Adly, M. A. (2011).** Antischistosomal activity of ginger (*Zingiber officinale*) against *Schistosoma mansoni* harbored in C57 mice. *Parasitology Research*, 109(2), 395–403. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2267-x>
- Ndamse, C. C., Masamba, P., & Kappo, A. P. (2022).** Bioorganometallic Compounds as Novel Drug Targets against Schistosomiasis in Sub-Saharan Africa: An alternative to Praziquantel? *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 12(2), 283–297. <https://doi.org/10.34172/apb.2022.029>
- Neves, B. J., Andrade, C. H., & Cravo, P. V. L. (2015).** Natural products as leads in schistosome drug discovery. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(2), 1872–1903. <https://doi.org/10.3390/molecules20021872>
- Ng'ang'a, M., Hussain, H., Chhabra, S., Langat-Thoruwa, C., & Krohn, K. (2009).** *Chemical constituents from the root bark of Ozoroa insignis.* <https://doi.org/10.1016/J.BSE.2008.11.019>
- Odeyemi, O. O., Yakubu, M. T., Masika, P. J., & Afolayan, A. J. (2009).** Toxicological evaluation of the essential oil from *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis* leaves in rats. *Journal of Medicinal Food*, 12(3), 669–674. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0136>
- OECD. (2002a).** *Essai n° 420: Toxicité orale aiguë - Méthode de la dose prédéterminée.* Organisation for Economic Co-operation and Development. [https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-420-toxicite-orale-aigue-methode-de-la-dose-predeterminee\\_9789264070950-fr](https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-420-toxicite-orale-aigue-methode-de-la-dose-predeterminee_9789264070950-fr)
- OECD. (2002b).** *Essai n° 423: Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë.* Organisation for Economic Co-operation and Development. [https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-423-toxicite-orale-aigue-methode-par-classe-de-toxicite-aigue\\_9789264071018-fr](https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-423-toxicite-orale-aigue-methode-par-classe-de-toxicite-aigue_9789264071018-fr)
- OECD. (2008a).** *Essai n° 407: Toxicité orale à doses répétées - pendant 28 jours sur les rongeurs.* Organisation for Economic Co-operation and Development. [https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-407-toxicite-orale-a-doses-repetees-pendant-28-jours-sur-les-rongeurs\\_9789264070691-fr](https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-407-toxicite-orale-a-doses-repetees-pendant-28-jours-sur-les-rongeurs_9789264070691-fr)
- OECD. (2008b).** *Essai n° 425: Toxicité aiguë par voie orale: méthode de l'ajustement des doses.* Organisation for Economic Co-operation and Development. [https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-425-toxicite-aigue-par-voie-orale-methode-de-l-ajustement-des-doses\\_9789264071056-fr](https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-425-toxicite-aigue-par-voie-orale-methode-de-l-ajustement-des-doses_9789264071056-fr)
- Olorunnisola, O. S., Bradley, G., & Afolayan, A. J. (2012).** Protective effect of *T. violacea* rhizome extract against hypercholesterolemia-induced oxidative stress in Wistar rats. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(5), 6033–6045. <https://doi.org/10.3390/molecules17056033>
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Van Deun, K., Smith, P., Berger, B., & Heller, A. (2000).** Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals.

- Organisation mondiale de la santé. (2022).** *Schistosomiase*. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>
- Orian, L., & Flohé, L. (2021).** Selenium-Catalyzed Reduction of Hydroperoxides in Chemistry and Biology. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(10), 1560. <https://doi.org/10.3390/antiox10101560>
- Ouedraogo, H., Drabo, F., Zongo, D., Bagayan, M., Bamba, I., Pima, T., Yago-Wienne, F., Toubali, E., & Zhang, Y. (2016).** Schistosomiasis in school-age children in Burkina Faso after a decade of preventive chemotherapy. *Bulletin of the World Health Organization*, 94(1), 37–45. <https://doi.org/10.2471/BLT.15.161885>
- Pagès, J. R., Jourdane, J., Southgate, V. R., & Tchuem Tchuente, L.-A. (2003).** Reconnaissance de deux espèces jumelles au sein du taxon *Schistosoma intercalatum* Fisher, 1934, agent de la schistosomose humaine rectale en Afrique. Description de *Schistosoma guineensis* n. Sp. *Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites*, 2, 139–146.
- Parreira, N. A., Magalhães, L. G., Morais, D. R., Caixeta, S. C., de Sousa, J. P. B., Bastos, J. K., Cunha, W. R., Silva, M. L. A., Nanayakkara, N. P. D., Rodrigues, V., & da Silva Filho, A. A. (2010).** Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chemistry & Biodiversity*, 7(4), 993–1001. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900292>
- Pellegrino, J., & Siqueira, A. F. (1956).** [A perfusion technic for recovery of *Schistosoma mansoni* from experimentally infected guinea pigs]. *Revista Brasileira De Malariologia E Doencas Tropicais. Publicacoes Avulsas*, 8(4), 589–597.
- Pereira, L. P. L. A., Ribeiro, E. C. G., Brito, M. C. A., Araruna, F. O. S., Araruna, F. B., Leite, J. A. C., Silveira, D. P. B., de Oliveira, T. M., Cantanhede, S. P. D., Firmo, W. da C. A., Monteiro, O. D. S., Maia, J. G. S., da Franca Rodrigues, K. A., & Coutinho, D. F. (2022).** Molluscicidal and cercaricidal activities of the essential oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants: Implications for the control of schistosomiasis. *Acta Tropica*, 230, 106393. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106393>
- Pinto-Almeida, A., Mendes, T., de Oliveira, R. N., Corrêa, S. de A. P., Allegretti, S. M., Belo, S., Tomás, A., Anibal, F. de F., Carrilho, E., & Afonso, A. (2016).** Morphological Characteristics of *Schistosoma mansoni* PZQ-Resistant and -Susceptible Strains Are Different in Presence of Praziquantel. *Frontiers in Microbiology*, 7, 594. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00594>
- Pointier, J. P. (1993).** The introduction of *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) to the island of Saint Lucia (West Indies) and its role in the decline of *Biomphalaria glabrata*, the snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*, 54(1), 13–18. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(93\)90064-i](https://doi.org/10.1016/0001-706x(93)90064-i)

- Puchtler, H., Waldrop, F. S., & Valentine, L. S. (1973).** Polarization Microscopic Studies of Connective Tissue Stained with Picro-Sirius Red FBA. *Beiträge Zur Pathologie*, 150(2), 174–187. [https://doi.org/10.1016/S0005-8165\(73\)80016-2](https://doi.org/10.1016/S0005-8165(73)80016-2)
- Rajendran, R., Hemalatha, S., Akasakalai, K., Madhukrishna, C. H., Sohil, V. B., & Sundaram, R. M. (2009).** Hepatoprotective activity of *Mimosa pudica* leaves against carbontetrachloride induced toxicity. *Journal of Natural Products (India)*, 2, 116–122.
- Ramaswamy, K., He, Y. X., Salafsky, B., & Shibuya, T. (2003).** Topical application of DEET for schistosomiasis. *Trends in Parasitology*, 19(12), 551–555. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.10.001>
- Ramez, A. M., Elmahallawy, E. K., Elshopakey, G. E., Saleh, A. A., Moustafa, S. M., Al-Brakati, A., Abdo, W., & El-Shewehy, D. M. M. (2021).** Hepatosplenic Protective Actions of *Spirulina platensis* and Matcha Green Tea Against *Schistosoma mansoni* Infection in Mice via Antioxidative and Anti-inflammatory Mechanisms. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 650531. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.650531>
- Ramirez, B., Bickle, Q., Yousif, F., Fakorede, F., Mouries, M.-A., & Nwaka, S. (2007).** Schistosomes: Challenges in compound screening. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2(s1), S53-61. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.S1.S53>
- Rizk, M., Fayed, T., Badawy, H., & El-Rigal, N. (2006).** Effect of Different Durations of *Schistosoma mansoni* Infection on the Levels of Some Antioxidants in Mice. *Trends in Medical Research*, 1, 66–74. <https://doi.org/10.3923/tmr.2006.66.74>
- Rizk, M., Ibrahim, N., & El-Rigal, N. (2012).** Comparative in vivo antioxidant levels in *Schistosoma mansoni* infected mice treated with praziquantel or the essential oil of *Melaleuca armillaris* leaves. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 15(20), 971–978. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2012.971.978>
- Sachdev, S., & Davies, K. J. A. (2008a).** Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, 44(2), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.019>
- Sachdev, S., & Davies, K. J. A. (2008b).** Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, 44(2), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.019>
- Salama, W. M., El-Naggar, S. A., Harras, S. F., & El-Said, K. S. (2021).** An adjuvant effect of Metformin as an anti-fibrotic agent when administered with the anti-schistosomal Praziquantel in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Tropical Biomedicine*, 38(2), 205–213. <https://doi.org/10.47665/tb.38.2.059>
- Shaker, Y., Samy, N., & Ashour, E. (2014).** Hepatobiliary Schistosomiasis. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 2(3), 212–216. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2014.00018>
- Simunkova, M., Barbierikova, Z., Jomova, K., Hudcova, L., Lauro, P., Alwasel, S. H., Alhazza, I., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2021).** Antioxidant vs. Prooxidant Properties of the Flavonoid, Kaempferol, in the Presence of Cu(II) Ions: A ROS-Scavenging Activity,

- Fenton Reaction and DNA Damage Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1619. <https://doi.org/10.3390/ijms22041619>
- Sinha, A. K. (1972).** Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry*, 47(2), 389–394. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90132-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90132-7)
- Sireeratawong, S., Lertprasertsuke, N., Srisawat, U., Thuppia, A., Ngamjariyawat, A., Suwanlikhid, N., & Jaijoy, K. (2008).** *Acute and subchronic toxicity study of the water extract from Tiliacora triandra (Colebr.) Diels in rats*. 9.
- Smithers, S. R., & Terry, R. J. (1965).** The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology*, 55(4), 695–700. <https://doi.org/10.1017/s0031182000086248>
- Southgate, V. R., Jourdane, J., & Tchuente, L. A. (1998).** Recent studies on the reproductive biology of the schistosomes and their relevance to speciation in the Digenea. *International Journal for Parasitology*, 28(8), 1159–1172. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(98\)00021-6](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00021-6)
- Souza, M. A., Gonçalves-Santos, E., Gonçalves, R. V., Santos, E. C., Campos, C. C., Marques, M. J., Souza, R. L. M., & Novaes, R. D. (2021).** Doxycycline hyclate stimulates inducible nitric oxide synthase and arginase imbalance, potentiating inflammatory and oxidative lung damage in schistosomiasis. *Biomedical Journal*, S2319-4170(21)00179-7. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2021.12.007>
- Symmers, W. (1904).** Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of ova of *Bilharzia haematobium*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 9, 237–239.
- Tallima, H., Hanna, V. S., & El Ridi, R. (2020).** Arachidonic Acid Is a Safe and Efficacious Schistosomicide, and an Endoschistosomicide in Natural and Experimental Infections, and Cysteine Peptidase Vaccinated Hosts. *Frontiers in Immunology*, 11, 609994. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.609994>
- Taman, A., & Ribeiro, P. (2011).** Glutamate-mediated signaling in *Schistosoma mansoni*: A novel glutamate receptor is expressed in neurons and the female reproductive tract. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 176(1), 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.12.001>
- Tchuente, L.-A. (1993).** *Interactions hôte-parasite et compétition interspécifique dans le modèle Schistosoma intercalatum: Implantations épidémiologiques*. Université de Perpignan.
- Tchuente, L.-A., Dongmo Noumedem, C., Ngassam, P., Kenfack, C. M., Gipwe, N. F., Dankoni, E., Tarini, A., & Zhang, Y. (2013).** Mapping of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in the regions of Littoral, North-West, South and South-West Cameroon and recommendations for treatment. *BMC Infectious Diseases*, 13, 602. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-602>
- Tchuente, L.-A., Kamwa Ngassam, R. I., Sumo, L., Ngassam, P., Dongmo Noumedem, C., Nzu, D. D. L., Dankoni, E., Kenfack, C. M., Gipwe, N. F., Akame, J.,**

- Tarini, A., Zhang, Y., & Angwafo, F. F. (2012).** Mapping of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in the regions of centre, East and West Cameroon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3), e1553. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001553>
- Tchuem Tchuenté, L.-A., Kueté Fouodo, C. J., Kamwa Ngassam, R. I., Sumo, L., Dongmo Noumedem, C., Kenfack, C. M., Gipwe, N. F., Nana, E. D., Stothard, J. R., & Rollinson, D. (2012).** Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-tests for diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in Cameroon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(7), e1758. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001758>
- Tekwu, E. M., Anyan, W. K., Boamah, D., Baffour-Awuah, K. O., Keyetat Tekwu, S., Penlap Beng, V., Nyarko, A. K., & Bosompem, K. M. (2016).** Mechanically produced schistosomula as a higher-throughput tools for phenotypic pre-screening in drug sensitivity assays: Current research and future trends. *Biomarker Research*, 4, 21. <https://doi.org/10.1186/s40364-016-0075-2>
- Tekwu, E. M., Bosompem, K. M., Anyan, W. K., Appiah-Opong, R., Owusu, K. B.-A., Tettey, M. D., Kissi, F. A., Appiah, A. A., Penlap Beng, V., & Nyarko, A. K. (2017).** In Vitro Assessment of Anthelmintic Activities of *Rauwolfia vomitoria* (Apocynaceae) Stem Bark and Roots against Parasitic Stages of *Schistosoma mansoni* and Cytotoxic Study. *Journal of Parasitology Research*, 2017, 2583969. <https://doi.org/10.1155/2017/2583969>
- Tendler, M., Pinto, R. M., Oliveira Lima, A., Gebara, G., & Katz, N. (1986).** *Schistosoma mansoni*: Vaccination with adult worm antigens. *International Journal for Parasitology*, 16(4), 347–352. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(86\)90113-x](https://doi.org/10.1016/0020-7519(86)90113-x)
- Thapa, B. R., & Walia, A. (2007).** Liver function tests and their interpretation. *Indian Journal of Pediatrics*, 74(7), 663–671. <https://doi.org/10.1007/s12098-007-0118-7>
- Tsague, C., Hussain, H., Boukeng, H., Saleem, M., Abbas, G., Farooq, M., Wadaan, M., Dongo, E., & Al-Harrasi, A. (2017).** Ozoromide: A New Ceramide from the Stem Bark of *Ozoroa pulcherrima*. *Chemistry of Natural Compounds*. <https://doi.org/10.1007/s10600-017-2155-4>
- Tsague, D. C., Hussain, H., Dongo, E., Hermine, J.-M. B., Ahmed, I., & Krohn, K. (2011a).** Ozocardic A: A new alkylanicardic acid from *Ozoroa pulcherrima*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 13(1), 84–87. <https://doi.org/10.1080/10286020.2010.543898>
- Tsague, D. C., Hussain, H., Dongo, E., Hermine, J.-M. B., Ahmed, I., & Krohn, K. (2011b).** Two new alkylanicardic acids, ozocardic A and B, from *Ozoroa pulcherrima*. *Natural Product Communications*, 6(8), 1133–1134.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007a).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007b).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The*

*International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

- Veras, L. M., Guimaraes, M. A., Campelo, Y. D., Vieira, M. M., Nascimento, C., Lima, D. F., Vasconcelos, L., Nakano, E., Kuckelhaus, S. S., Batista, M. C., Leite, J. R., & Moraes, J. (2012).** Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. *Current Medicinal Chemistry*, 19(13), 2051–2058. <https://doi.org/10.2174/092986712800167347>
- Walker, A. J. (2011).** Insights into the functional biology of schistosomes. *Parasites & Vectors*, 4, 203. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-203>
- Walum, E. (1998).** Acute oral toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 106 Suppl 2, 497–503. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106497>
- Wang, Q., Da'dara, A. A., & Skelly, P. J. (2017).** The human blood parasite *Schistosoma mansoni* expresses extracellular tegumental calpains that cleave the blood clotting protein fibronectin. *Scientific Reports*, 7(1), 12912. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13141-5>
- Wang, X., Ikejima, K., Kon, K., Arai, K., Aoyama, T., Okumura, K., Abe, W., Sato, N., & Watanabe, S. (2011).** Ursolic acid ameliorates hepatic fibrosis in the rat by specific induction of apoptosis in hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology*, 55(2), 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.10.040>
- Wang, X., Zhang, W., Wang, Y., Peng, D., Ihsan, A., Huang, X., Huang, L., Liu, Z., Dai, M., Zhou, W., & Yuan, Z.-H. (2010).** Acute and sub-chronic oral toxicological evaluations of quinocetone in Wistar rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 58(3), 421–427. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.08.008>
- Weerakoon, K. G. A. D., Gobert, G. N., Cai, P., & McManus, D. P. (2015).** Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(4), 939–967. <https://doi.org/10.1128/CMR.00137-14>
- Wilbur, K., Bernhein, F., & Shapiro. (1949).** Determination of lipid peroxydation. *Archives of Biochemistry and Biophysic*, 24, 3959–3964.
- World Health Organization. Programme on Traditional Medicine. (2000).** *Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle* (WHO/EDM/TRM/2000.1). Organisation mondiale de la Santé. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/68476>
- World Health Organization. Regional Office for the Western Pacific. (1992).** *Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines*. WHO Regional Office for the Western Pacific. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/207714>
- World Health Organization. Schistosomiasis and other Trematode Infections Unit. (1988).** *Progress in assessment of morbidity due to Schistosoma mansoni infection: A review of recent literature* (WHO/SCHISTO/88.97. Unpublished). World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/62416>

**Younas, M., Hano, C., Giglioli-Guivarc'h, N., & Abbasi, B. H. (2018).** Mechanistic evaluation of phytochemicals in breast cancer remedy: Current understanding and future perspectives. *RSC Advances*, 8(52), 29714–29744. <https://doi.org/10.1039/c8ra04879g>

**Zhong, H., Gui, X., Hou, L., Lv, R., & Jin, Y. (2022).** From Inflammation to Fibrosis: Novel Insights into the Roles of High Mobility Group Protein Box 1 in Schistosoma-Induced Liver Damage. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(3), 289. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030289>

**PUBLICATIONS ISSUES DE  
LA THESE**



## ***In vitro* Activity of *Ozoroa pulcherrima* Schweinf. Extracts and Fractions on *Schistosoma mansoni* Cercariae and Adult Worms**

**Nestor Gipwe Feussom<sup>1,2</sup>, Hermine Boukeng Jatsa<sup>1,2\*</sup>,  
Mérime Christian Kenfack<sup>1,2</sup>, Emilienne Tienga Nkondo<sup>1,2</sup>,  
Ulrich Membe Femoe<sup>1,2</sup>, Joseph Bertin Kadji Fassi<sup>1,2</sup>,  
Christelle Dongmo Tsague<sup>3</sup>, Etienne Dongo<sup>3</sup>, Paul Désiré Djomeni Dzeufiet<sup>1</sup>  
and Louis-Albert Tchuem Tchuenta<sup>2,4</sup>**

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

<sup>2</sup>Centre for Schistosomiasis and Parasitology, P.O.Box 7244, Yaoundé, Cameroon.

<sup>3</sup>Laboratory of Phytochemistry, Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O.Box 812, Yaoundé, Cameroon.

<sup>4</sup>Laboratory of Biology, Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O.Box 812, Yaoundé, Cameroon.

### **Authors' contributions**

*This work was carried out in collaboration among all authors. Authors HBJ and LATT designed the study and wrote the protocol. Authors NGF, HBJ, MCK, ETN, UMF and JBKF performed in vitro experiments. Author ED designed and wrote the phytochemical protocol and author CDT performed it. Author PDDD managed the literature searches. Authors NGF and HBJ performed the statistical analysis and wrote the first draft of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.*

### **Article Information**

DOI: 10.9734/EJMP/2020/v31i830256

#### Editor(s):

(1) Dr. Joseph Oloro, Mbarara University of Science & Technology, Uganda.

(2) Prof. Marcello Iriti, University of Milan, Italy.

#### Reviewers:

(1) Manal Abdel Aziz Hamed, National Research Centre, Egypt.

(2) Carlos Graeff Teixeira, Federal University of Espirito Santo, Brazil.

(3) Maria João Castro Gouveia, University of Porto, Portugal.

Complete Peer review History: <http://www.sdiarticle4.com/review-history/55894>

**Original Research Article**

**Received 08 February 2020**

**Accepted 12 April 2020**

**Published 07 May 2020**

## ABSTRACT

**Aims:** Continuous attempts are being made to develop new and more effective drugs for the treatment of schistosomiasis. *Ozoroa pulcherrima* Schweinf. is a medicinal plant used in Africa for the treatment of dysmenorrhea, lower abdominal pain, dystocia and intestinal helminthiasis. This study provides findings on the cercaricidal and schistosomicidal activity of extracts and fractions of *Ozoroa pulcherrima* in *in vitro* assays.

**Methodology:** The aqueous and methanolic extracts from *Ozoroa pulcherrima* root parts (62.5 – 2000 µg/mL), as well as the methanol derived fractions (*n*-hexane and ethyl acetate: 31.25 – 1000 µg/mL) were tested on cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni*. Niclosamide-olamine 5% (1 µg/mL) and praziquantel (10 µg/mL) were respectively used as reference drugs. During the assays, the mortality of cercariae after 2 hours, and adult worms' mobility and mortality after 48 hours of incubation were evaluated.

**Results:** *Ozoroa pulcherrima* extracts and fractions significantly increased cercariae and worm mortality in a concentration-dependent manner. The methanolic extract was the most active on cercariae with a LC<sub>50</sub> of 20.65 µg/mL after 30 minutes, while the *n*-hexane fraction was the most active on worm with a LC<sub>50</sub> of 79.54 µg/mL (65.58 – 96.47 µg/mL) after 48 hours. Significant reduction of motor activity (18.47 to 100%) was recorded for surviving worms incubated in different concentrations of the extracts and fractions.

**Conclusion:** This study proves that *Ozoroa pulcherrima* extracts and fractions have cercaricidal and schistosomicidal activities. *Ozoroa pulcherrima* may have great potential as an anti-schistosomal agent for further research.

**Keywords:** *Ozoroa pulcherrima*; cercaricidal activity; schistosomicidal activity; *Schistosoma mansoni*.

## 1. INTRODUCTION

Schistosomiasis, caused by trematode flatworms of genus *Schistosoma* is one of the most significant neglected tropical diseases in the world. According to the World Health Organization [1], schistosomiasis affects more than 206.4 million people in tropical and sub-tropical areas. While chemotherapy with praziquantel (PZQ) is an important component in schistosomiasis control, health education, provision of safe water and sanitation, environmental management and snail control, are necessary for a comprehensive control program [2]. Despite the fact that praziquantel is effective against all forms of schistosomiasis, the dependence on this single drug is a concern because some strains can become resistant to it, as pointed out by some authors [3-6]. Praziquantel has little effect on immature worms [7], so pre-patent or newly acquired infections cannot be cured by praziquantel. In this context, the identification of new and effective schistosomicidal compounds is essential. The trend of using natural plant extracts as new, safe and effective drugs is promising and constitutes the basis for the development of lead chemicals for therapeutics [8,9].

Considered by the World Health Organization as a neglected tropical disease, little attention has been given to the research and development of new and effective antischistosomal drugs in the

last decade [10]. Recently, several *in vitro* studies have been performed to search for new active compounds from medicinal plants against *S. mansoni* and promising results have been reported [11-14]. *Ozoroa pulcherrima* Schweinf. belongs to family Anacardiaceae is found in the far north regions of Cameroon, Guinea, Togo, Benin, Central Republic, Ethiopia and Sudan [15]. Plants of this genus are extensively studied regarding their chemical composition and biological activity, as antimicrobial and antitumor [16], schistosomicidal effects [17] and antiproliferative activities on breast cancer cells [18]. To treat intestinal helminthiasis, it is recommended to mix the roots of young tree with water boil and drink 250 mL of decoction once post-prandial [12]. Our previous studies demonstrated the schistosomicidal activity of *O. pulcherrima* methanolic extract *in vivo* models [19]. Research has been carried out to investigate the phytochemical and chemical composition of *O. pulcherrima*. Secondary metabolites identified in the methanolic extract include: anthraquinones, terpenoids, flavonoids, saponins, tannins, phenols, cardiac glycosides, alkaloids, triterpenes and lipids. Three alkylnocardic acids, namely, ozocardic A, ozocardic A and ozocardic B were isolated from the methanol-dichloromethane extract [19-21].

Thus, this study aimed to evaluate the *in vitro* schistosomicidal effect of *Ozoroa pulcherrima* aqueous and methanolic extracts and its

methanolic-derived fractions, which have not yet been described.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Preparation of the Plant Extracts and Fractions

#### 2.1.1 Plant material

Roots of *O. pulcherrima* were harvested in July 2012 in the locality of Wakwa near Ngaoundere in the Adamawa region of Cameroon. Botanical identification of a plant sample was performed at the "National Herbarium", Yaoundé, Cameroon and a voucher specimen n° 13667/SRF/Cam were deposited.

#### 2.1.2 Extraction and fractionation

The roots of *O. pulcherrima* were dried at room temperature and powdered. The powder of *O. pulcherrima* was subjected to static maceration with distilled water (100 g/L) for 24 hours, at room temperature. The solution was filtered, frozen and then lyophilized to give the aqueous extract (OpAE), with a recovery rate of 13.6% w/w. Moreover, the powder (4130 g) was submitted to maceration in methanol during 48 h. The macerate was filtered under reduced pressure in a rotary evaporator (BÜCHI B-480) and dried in an oven at 50°C. Then, we obtained 138.12 g of *O. pulcherrima* roots methanolic extract (OpME), with a recovery rate of 3.34% w/w. The methanolic extract was fractionated by partition between immiscible solvents, as follows. The dried methanolic extract was suspended and sequentially partitioned with equal volumes (2x 50 mL) of *n*-hexane and ethyl acetate. Solvents were removed in a rotary evaporator, at a maximum temperature of 50°C. The process allowed obtaining the *n*-hexane fraction (93.30 mg), the ethyl acetate fraction (38.23 g) and the methanolic residue.

### 2.2 In vitro Bioassays Against Cercariae Stage of *Schistosoma mansoni*

#### 2.2.1 Preparation of the cercarial suspension

Infected *Biomphalaria pfeifferi* (snails) were obtained experimentally at the Centre for Schistosomiasis and Parasitology of Yaoundé (CSP). Snails known to shed cercariae were then pooled into a glass beaker containing 20 mL of distilled water and allowed to shed cercariae by exposing them to artificial light for 2 hours. An amount of 20 fresh cercariae were counted under inverted microscope and were used for cercaricidal evaluation.

#### 2.2.2 Bioassays of *Ozoroa pulcherrima* extracts and fractions

A series of crude plant extracts and different fractions concentrations (31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 µg/mL) were freshly prepared in a 24 microtiter well plate and analyzed alongside with the positive control Niclosamide-olamine 5% (1 µg/mL) (Jiangsu Aijin Agrochemical Co., Ltd, China). Aqueous extract was dissolved in distilled water, while methanolic extract and its derived fractions (ethyl acetate and *n*-hexane) were dissolved in DMSO 0.5%. Approximately, 20 cercariae were subjected in each concentration and each well contained a final volume of 1 mL. The negative control contained 0.5% DMSO or distilled water. Afterward, cercariae were monitored from 2 hours at 30 minutes intervals and bioactivity was assessed based on mortality. All experiments were done in quadruplicate and at least two tests were performed. Surviving and dead cercariae were observed with an inverted microscope (Olympus CK 2). Cercariae were presumed dead when they were motionless and sank down and their tails went into part [22,23]. The LC<sub>50</sub> value of the plant extracts and fractions on *Schistosoma mansoni* cercariae was determined by the log(agonist) vs. response - Variable slope (four parameters) regression model.

### 2.3 In vitro Bioassays of *Schistosoma mansoni* Adult Worms

#### 2.3.1 *Schistosoma mansoni* worms recovery

Balb/c mice were infected with 130 cercariae of *S. mansoni* released from experimentally infected *Biomphalaria pfeifferi* at the Centre for Schistosomiasis and Parasitology of Yaoundé (CSP). After 7 weeks of infection, adult worms were recovered under aseptic conditions by perfusion of the mesenteric veins and liver accordingly to the method described by Pellegrino and Siqueira [24]. Adult *S. mansoni* worms (male and female) recovered from infected animals were washed three times in a Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM) (Sigma, St Louis, USA) supplemented with an antibiotic-antimycotic solution (10,000 U/mL penicillin, 10,000 µg/mL streptomycin and 25 µg/mL amphotericin B (Atlanta Biologicals, Lawrenceville, USA) and gentamicine (40 µg/mL). To test the effect of *O. pulcherrima* crude extracts and derived fractions on *S. mansoni* adult worms, the bioassay followed the standard operating procedures that recommended at least 5 females and 5 males

per treatment [25]. In this bioassay, 5 males and 5 females adult worms were transferred to each well of a 24-well culture plate containing 1900  $\mu\text{L}$  of complete GMEM culture medium (GMEM medium buffered to pH 7.5 containing 20 mM of HEPES, 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamicine, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  penicillin, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  neomycin, 2 mM of L-glutamine and 5% heat-inactivated foetal bovine serum). The plates were then incubated for 2 hours at 37°C in a humid atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  prior addition of products.

### 2.3.2 Bioassays of *Ozoroa pulcherrima* extracts and fractions

Concentrations ranging from 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 50 mg/mL were generally used for *in vitro* screening of plants extracts or compounds for anti-schistosomal activity [11-14]. In this study, aqueous extract, methanolic extract and methanolic residue of *O. pulcherrima* were initially dissolved in distilled water and DMSO, respectively, filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  sterile syringe filter and diluted in a complete GMEM culture medium to final concentrations of 2000, 1000, 500, 250, 125 and 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The *n*-hexane and ethyl acetate fractions were dissolved in DMSO 10% and diluted in the culture medium to final concentrations of 1000, 500, 250, 125, 62.5 and 31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . It is important to mention that the final volume was 2 mL/well and the maximum concentration of DMSO in each well was 0.5% v/v. The positive control group was treated with a lethal concentration of praziquantel (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), whereas the negative control for the aqueous extract and methanolic residue was kept in GMEM medium, while GMEM medium containing 0.5% of DMSO was the negative control for organic fractions. Quadruplicate measurements were carried out for each concentration and two independent experiments were performed for each sample. Culture plates were kept at 37°C for 48 h in a 5%  $\text{CO}_2$  incubator. This test evaluated the motility and viability of the worms (males and females) at 24 h and 48 h using an inverted microscope (Olympus CK2). Reduction of motor activity was defined as the absence of worm motility apart from gut movements and occasional movement of the head and tail of schistosome. Parasite death was defined as the absence of motor activity during 2 minutes. The median lethal concentration ( $\text{LC}_{50}$ ) was calculated using the Trimmed Spearman-Kärber (TSK) method, version 1.5 software downloaded from the US Environmental Protection agency [26].

## 2.4 Statistical Analysis

Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism 7.00 software (San Diego, CA, USA). Significant differences were determined by two-way analysis of variance (ANOVA) for cercaricidal activity and by one-way analysis of variance (ANOVA) for schistosomicidal activity. The multiple comparison Dunnett test was used as post-test and the level of significance was set at  $P < .05$ . The results were presented as mean  $\pm$  SEM.

## 3. RESULTS

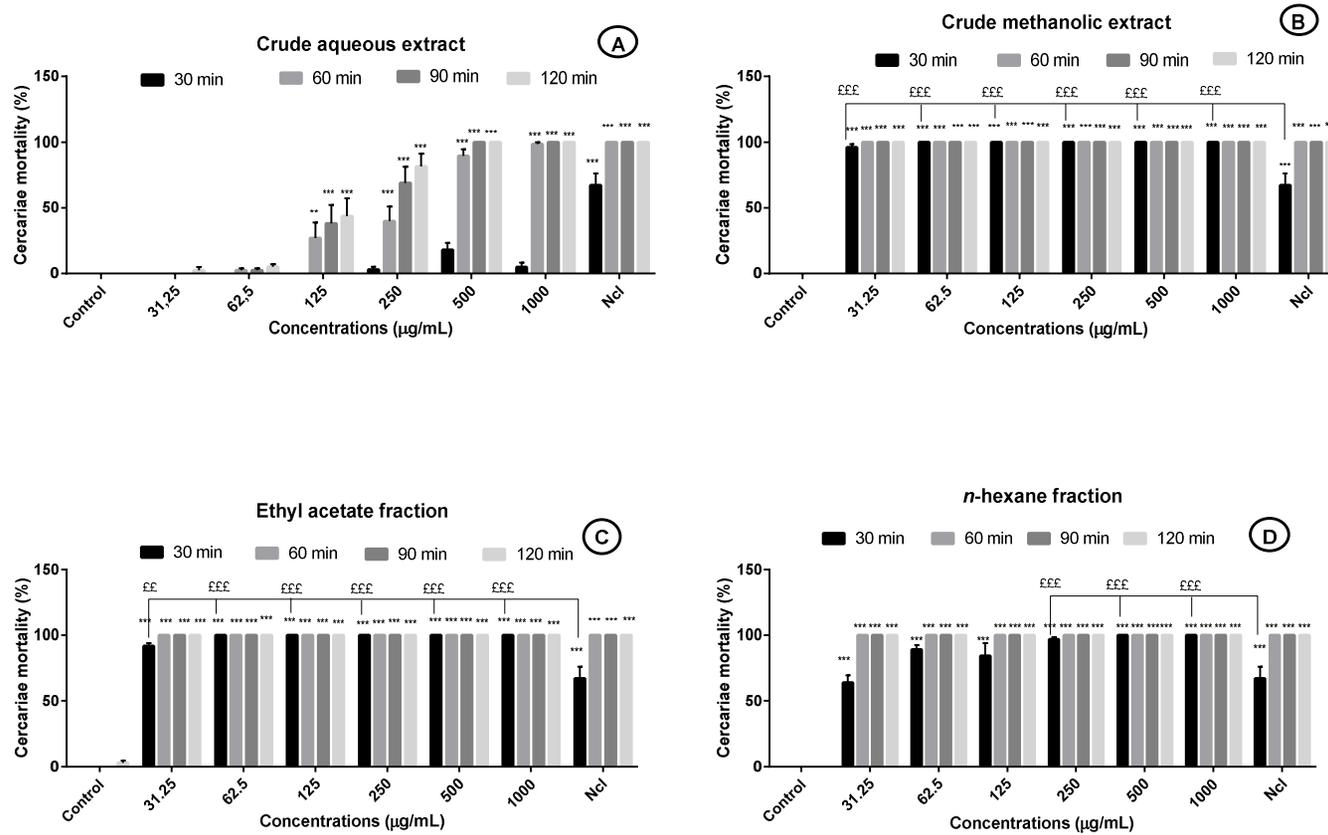
### 3.1 *In vitro* Cercaricidal Activity of *Ozoroa pulcherrima*

The effect of *Ozoroa pulcherrima* roots extracts and fractions on the mortality of cercariae after 2 hours of incubation is depicted in Fig. 1. The mortality was both time and concentrations dependent for *O. pulcherrima* aqueous extract which exhibited the highest mortality rate at 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  after 90 min of incubation. Following incubation with methanolic extract and its derived fractions at concentrations ranging from 31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , cercariae mortality increased significantly within 30 min. Since there was no dead in the aqueous extract at the lowest concentration of 31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  after 30 min of incubation, mortality rates were 96, 91 and 64% for the methanolic extract, ethyl acetate and *n*-hexane fractions respectively. After 30 min of incubation, the cercaricidal activities of the methanolic extract (31.25 – 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), the ethyl acetate fraction (31.25 – 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and *n*-hexane fraction (250 – 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were significantly higher than that of the reference molluscicidenclosamide-olamine 5%. Otherwise, a 100% of cercariae mortality was registered after one hour of incubation in *O. pulcherrima* methanolic extract, ethyl acetate fraction as well as in *n*-hexane fraction at all concentrations (31.25 - 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### 3.2 *In vitro* Schistosomicidal Activity of *Ozoroa pulcherrima*

#### 3.2.1 Mortality of *Schistosoma mansoni* adult worms

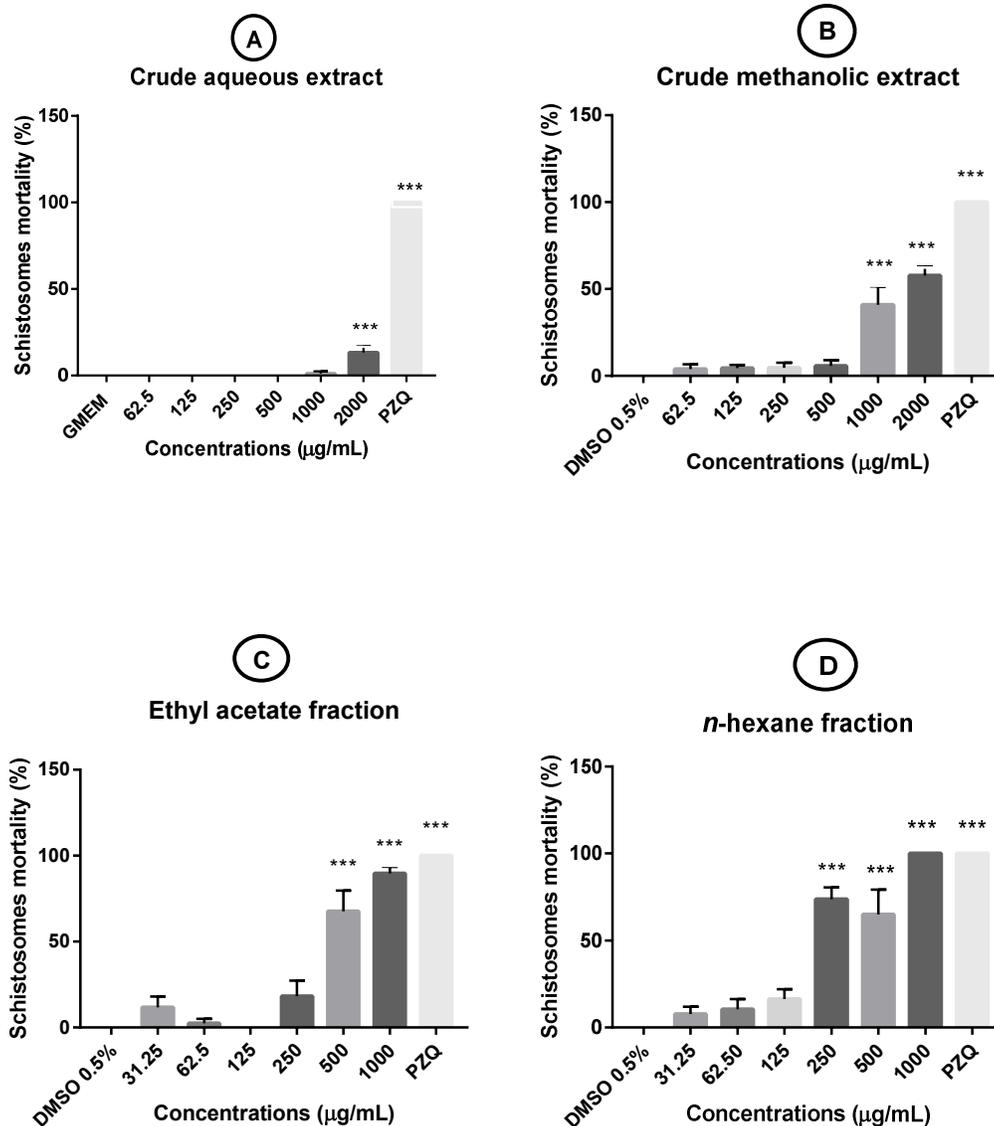
The schistosomicidal effect of the aqueous extract and the methanolic extract and its derived fractions was evaluated by *in vitro* bioassay on the viability of adult worms according to concentration and incubation time as



**Fig. 1. *In vitro* effect of *Ozorioa pulcherrima* aqueous extract, methanolic extract and derived fractions on the mortality of *Schistosoma mansoni* cercariae after two hours of incubation**  
 All values are expressed as mean ± SEM. \*\**P* = .01; \*\*\**P* = .001: significantly different from controls (distilled water or 0.5% DMSO).<sup>ff</sup>*P* = .01; <sup>fff</sup>*P* = .001: significantly different from the referencemolluscicidenclosamide-olamine5% (Ncl)

summarized in Fig. 2 and Fig. 3. There was a concentration-dependent increase in mortality of adult *S. mansoni* worms after incubation either with the aqueous extract or the methanolic extract and its derived fractions. After 24 hours of incubation of worms in *O. pulcherrima* aqueous or methanolic extracts, a low anti-schistosomal activity appears at the highest concentration of 2000 µg/mL with 13.30 and 57.81% mortality

rate, respectively. Fractions from *O. pulcherrima* methanolic extract showed a better anti-schistosomal activity than their extract since mortality rates of 89.72 and 100% were recorded after incubation of worms in 1000 µg/mL of the ethyl acetate and *n*-hexane fractions, respectively (Fig. 2). Incubation of worms with the residue of the methanolic extract did not show any worms' death.



**Fig. 2. In vitro effect of *Ozoroa pulcherrima* aqueous extract, methanolic extract and derived fractions on the mortality of *Schistosoma mansoni* adult worms after twenty-four(24) hours of incubation**

All values are expressed as mean ± SEM. \*\*\*P = .001: significantly different from controls (GMEM or DMSO 0.5%). GMEM: Glasgow minimum essential medium; PZQ: praziquantel

The schistosomicidal activity of *O. pulcherrima* was also time-dependent. In fact, after 48 hours of incubation of adult *S. mansoni* worms with 2000 µg/mL of the aqueous extract, the methanolic extract or its residue, 74.54, 100 and 7.50% mortality rates were recorded, respectively. Otherwise, incubation of worms in 250, 500 and 1000 µg/mL of the ethyl acetate fraction resulted in significant mortality of 56.28%, 88.75% and 98.61%, respectively. The *n*-hexane fraction was the most effective one with significant mortality rates of 41.14, 70, 79.43 and 100% recorded after incubation of worms in concentrations of 62.50, 125, 250 and 500 µg/mL, respectively (Fig. 3).

In the assays carried out with the control groups in which worms were kept in GMEM medium or 0.50%DMSO, they all remained alive for 48 hours. In the positive control group in which worms were treated with praziquantel, 100% of them died within a period of 24 hours at the lethal concentration of 10 µg/mL.

The evaluation of the medium lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of *O. pulcherrima* aqueous extract, methanolic extract and derived fractions was calculated after 48 h of incubation using Trimmed Spearman-Kärber method. The schistosomicidal activity can then be establish as follow: *n*-hexane fraction > ethyl acetate fraction > methanolic extract > aqueous extract. It then appears that the *n*-hexane fraction from *O. pulcherrima* methanolic extract was the most active with a LC<sub>50</sub> of 79.54 µg/mL (65.58 – 94.47 µg/mL) (Table 1).

### 3.2.2 Motor activity of *Schistosoma mansoni* adult worms

The motor activity of worms incubated in different concentrations of *O. pulcherrima* aqueous extract, methanolic extract and its various fractions was recorded after 24 and 48 hours and results are reported in Fig. 4. Control worms incubated only in the culture medium remained viable up to 48 hours even though some of them displayed weak reduced motor activity. The effect of the aqueous extract, the methanolic

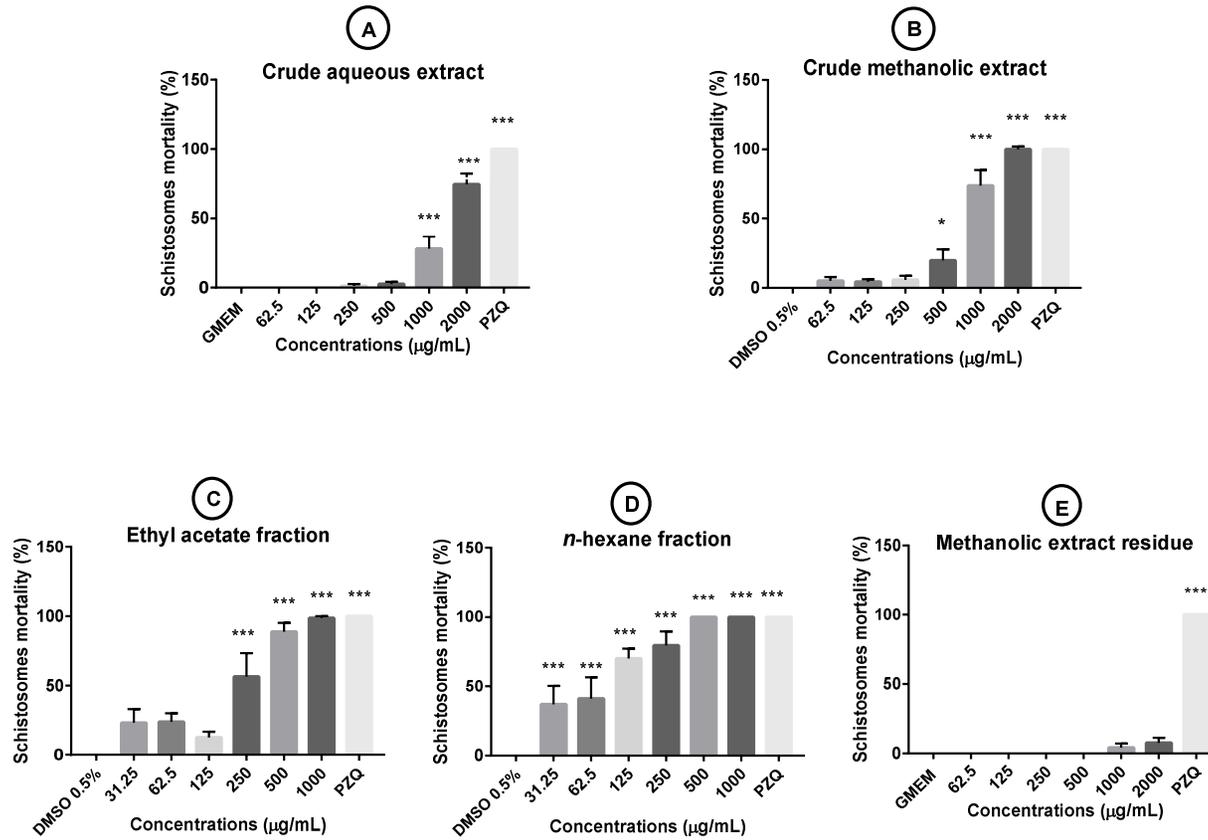
extract and its derived fractions on the motility of the worms was assessed as directly proportional to the concentration and the incubation period. In fact, after 24 hours of incubation, schistosome displayed slightly reduced motor activity and severely reduced motility after 48 hours of exposure, whatever the extract or the fraction. The reduction of motor activity reached 100% for worms exposed to *O. pulcherrima* methanolic extract at 2000 µg/mL or to its ethyl acetate fraction at 1000 µg/mL for 48 hours. With the most active schistosomicidal fraction *n*-hexane, a 62.92% reduction of motor activity was recorded at the concentration of 125 µg/mL. Schistosomes motor activity reduction was mainly marked by the weak movement of the suckers and occasional waves of the body.

## 4. DISCUSSION

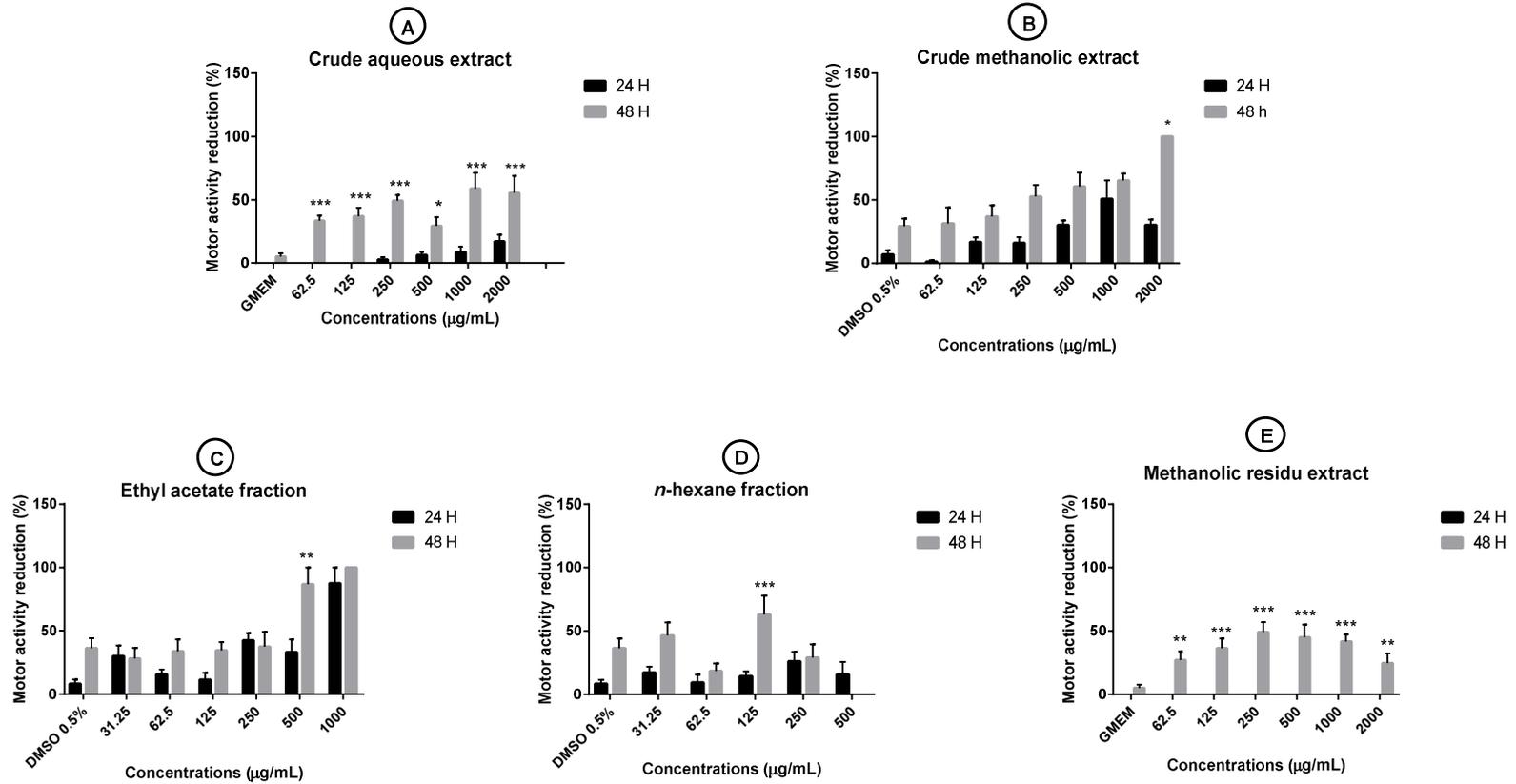
The spread of schistosomiasis in endemic areas and increasing infection rate support the need for new drug discovery and development [27]. Research on natural products has provided remarkable new drugs or drug leads for the control of several diseases. To evaluate the schistosomicidal effect of a drug, it is important to understand the biology of the parasite. According to Moraes et al. [28], compounds with schistosomicidal activity can be effective in different ways: prophylactically (causing the death of cercariae and/or schistosomula), suppressively (inhibiting oviposition) and curatively (causing the death of the adult worm). Several biological activities have been described for species of genus *Ozoroa*, such as anti-proliferative, antimicrobial, anti-tumor and anthelmintic [16-18]. Jatsa et al. [19] have previously shown the *in vivo* schistosomicidal activity of *O. pulcherrima* methanolic extract. In recent years a number of studies have been developed through *in vitro* screening using crude extracts, essential oil and isolate compounds from medicinal plants to identify a leading substance that can be used in preclinical trials for the treatment of experimental schistosomiasis [11,17]. In this study, we sought to investigate *in vitro* schistosomicidal potential of the *O. pulcherrima* aqueous extract, methanolic

**Table 1. Median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) values of *Ozoroa pulcherrima* aqueous extract, methanolic extract and derived fractions after forty-eight (48) hours of incubation**

| <i>Ozoroa pulcherrima</i> | LC <sub>50</sub> (µg/mL) | 95% low limit (µg/mL) | 95 % upper limit (µg/mL) |
|---------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Aqueous extract           | 1363.26                  | 1120.39               | 1658.77                  |
| Methanolic extract        | 773.25                   | 697.51                | 897.27                   |
| Ethyl acetate fraction    | 235.16                   | 205.39                | 268.85                   |
| <i>n</i> -Hexane fraction | 79.54                    | 65.58                 | 94.47                    |



**Fig. 3. *In vitro* effect of *Ozorioa pulcherrima* aqueous extract, methanolic extract and derived fractions on the mortality of *Schistosoma mansoni* adult worms after forty-eight (48) hours of incubation**  
 All values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P = .05$ ; \*\*\* $P = .001$ : significantly different from controls (GMEM or DMSO0.5%). GMEM: Glasgow minimum essential medium; PZQ: praziquantel



**Fig. 4. *In vitro* effect of *Ozoroa pulcherrima* aqueous extract, methanolic extract and derived fractions on the motor activity of *Schistosoma mansoni* adult worms after forty-eight (48) hours of incubation**  
 All values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P = .05$ ; \*\* $P = .01$ ; \*\*\* $P = .001$ : significantly different from controls (GMEM or DMSO 0.5%). GMEM: Glasgow minimum essential medium

extract and derived fractions at different concentrations.

The present observation showed that aqueous and methanolic extracts and derived fractions possess cercaricidal activity against *S. mansoni* cercariae. Our results showed that the methanolic extract and its derived fractions were more potent than the aqueous extract. The activity was both time and dose dependent. Our findings are in line with the reported data for *Phytolacca dodecandra* by Obare et al. [22] and *Rauwolfia vomitoria* by Tekwu et al. [23] who reported the cercaricidal activity of the plants extracts. More precisely, the cercaricidal activity of some medicinal plants has been correlated to their secondary metabolites. Isoflavonoids from the seeds of *Milletia thonningii* and a penta-substituted pyridine alkaloid from the rhizome of *Jatropha elliptica* have in fact exhibited strong cercaricidal and schistosomicidal activities against *S. mansoni* [29,30]. Due to the presence of flavonoids and alkaloids in *O. pulcherrima* roots methanolic extract [19], we could say that its cercaricidal activity might be linked to these secondary metabolites.

*Ozoroa pulcherrima* aqueous extract, methanolic extract and its fractions caused the death of *S. mansoni* in a concentration and time dependent manner. Our results corroborate similar studies on the crude extracts of *Ozoroa insignis* [17], *Zanthoxylum naranjillo* [31], *Zingiber officinale* [32], *Sidapilosa* [33], *Rauwolfia vomitoria* [23]; essential oil of *Piper cubeba* (Piperaceae) [34], *Baccharis trimera* [35] and isolate compounds terpene nerolidol [36] and piplartine [37]. Lethal concentrations of *O. pulcherrima* aqueous extract (2000 µg/mL), methanolic extract (2000 µg/mL) and its derived fractions (1000 µg/mL) were in the range of lethal concentrations (0.6 to 25 mg/mL) of plant species popularly used against schistosomiasis [11,12,17,33]. In the present study, assessment of the medium lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of the aqueous extract, the methanolic extract and its derived fractions disclosed the *n*-hexane fraction as the most active, with the LC<sub>50</sub> of 79.54 µg/mL. The potential effect of *O. pulcherrima* extracts and fractions may be due to the presence of bioactive chemical compounds. Our previous studies have identified the presence of reducing sugar, anthraquinones, terpenoids, tannins, phenols, flavonoids alkaloids, cardiac glycosides, triterpenes and lipid steroid in methanolic extract of *O. pulcherrima* [19]. Additionally, various terpenoids, flavonoids and new alkaloids have

been isolated and characterized in its ethyl acetate fraction [38].

Terpenoids are the largest naturally occurring family of hydrocarbons with a very broad range of biological activities including antimalarial [39], anticancer [40] and antischistosomal [41] properties. Some terpenoids are known to kill adult *S. mansoni* worms [35,36]. Their schistosomicidal activity is probably due to their ability to alter the cholinergic nervous system of *S. mansoni*; acetylcholine being associated with the parasite motility [35]. Alkaloids are widely distributed and have been isolated from several plant species. Several of them have schistosomicidal activity by causing extensive disruption of tegument, sloughing the parasite motor activity, or the death of *S. mansoni* adult worms after *in vitro* or *in vivo* exposure [42-44]. Recently it has been shown that a fatty acid named arachidonic acid, killed juvenile and adult schistosomes *in vitro*. The arachidonic acid mediated killing is essentially due to excessive activation of schistosome magnesium-dependent neural sphingomyelinase, leading to the hydrolysis of sphingomyelin to ceramide and phosphorylcholine. Consequently, sphingomyelin hydrolysis elicits an increase in membrane permeability, bending, and aggregation as well as dramatic perturbations in the lipid content and rigidity of the schistosome [45].

Motor activity is often evaluated as indicator of biological activity of schistosome species. In this study, change in the motility of *S. mansoni* varied according to the concentration of the crude extracts and derived fractions of *O. pulcherrima* and exposure period. It was observed that the *n*-hexane fraction caused major reduction of the parasite motor activity after 48 h. Studies revealed that motility of *S. mansoni* is associated with important neurotransmitters or neuromodulators such as acetylcholine, serotonin, neuropeptides and glutamate [34,35, 46,47]. Absence of motility apart from gut movement and reduction of peristaltic waves along schistosome body after incubation in *O. pulcherrima* could be the consequence of the plant interference with the mechanism of concentration-relaxation of worm smooth muscles [48]. Motility reduction of adult *S. mansoni* exposed to *O. pulcherrima* might also be associated with alteration in the neurotransmitter system of the parasite. It has been in fact reported that flavonoids which moderately reduce *S. mansoni* motor activity *in*

*vitro*, were identified as selective inhibitors of the *S. mansoni* NAD<sup>+</sup> catabolizing enzyme (SmNACE). SmNACE is an important target localized in the outer tegument of the adult parasite and it is presumably involved in the parasite survival by manipulating the host's immune regulatory pathways. The discovery of flavonoids that inhibit SmNACE in the low micromolar range has led to the consideration of flavonoids as promising drug candidate for treating schistosomiasis [49].

## 5. CONCLUSION

From the present study, it can be concluded that *Ozoroa pulcherrima* methanolic extract and derived fractions possess antischistosomal properties against two life stages of *Schistosoma mansoni*; cercariae and adult worms. Both methanolic extract and derived fractions showed different activity with respect to both time and concentration. Our results reported the *n*-hexane fraction being more active. Further investigations are in progress to disclose the important biological effects of this plant, whereas *Ozoroa pulcherrima* has great potential as a source of active compounds against *Schistosoma mansoni*.

## CONSENT

It is not applicable.

## ETHICAL APPROVAL

All procedures in this study followed the principles of laboratory animal use and care of the "European Community" guidelines (EEC Directive 2010/63/EEC) and were approved by the "Animal Ethical Committee" of the Laboratory of Animal Physiology of the Faculty of Sciences, University of Yaounde I Cameroon.

## ACKNOWLEDGEMENT

The present study was supported by "International Foundation for Science" (IFS) through the grant no F/3622-2F awarded to Hermine Boukeng Jatsa.

## COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

## REFERENCES

1. World Health Organization. Schistosomiasis: Epidemiological Situation. Fact sheet of 20 February; 2018.
2. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, Savioli L. Control of neglected tropical diseases. *N Eng J Med*. 2007;357:1018-27.
3. Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: Mechanisms of Action, Resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008; 21:659-67.
4. Fallon PG, Sturrock RF, Niang AC, Doenhoff MJ. Short report: Diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;53:61-62.
5. Gryseels D, Mbaye A, De Vlas, Stelma FF, Guisé F, Van Lieshout L, et al. Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. *Trop. Med. Int. Health*. 2001; 6:864-73.
6. Stelma FF, Talla I, Sow S, Kongs A, Niang M, Polman K, et al. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1995;53:167-70.
7. Abdul-Ghani RA, Loutfy N, Hassan A. Experimentally promising antischistosomal drugs: A review of some drug candidates not reaching the clinical use. *Parasitol. Res*. 2009;105:899-906.
8. Magalhães LG, Machado CB, Morais ER, De Carvalho Moreira EB, Soares CS, Da Silva SH, et al. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitol Res*. 2009; 104:1197-1201. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-008-1311-y>
9. Parreira NA, Magalhaes LG, Morais DR, Caixeta SC, De Sousa JP, Bastos JK, et al. Antiprotozoal, Schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chem Biodivers*. 2010;7: 993-1001.
10. World Health Organization. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. WHO Press. 2000;1-80.

11. De Melo NI, Magalhães LG, De Carvalho CE, Wakabayashi KA, Aguiar GP, Ramos RC, et al. Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against adult *Schistosoma mansoni* Worms. Mol. 2011;16:762-73. DOI:<http://dx.doi.org/10.3390/molecules16010762>
12. Adjanohoun JE, Aboubakar N, DramaneK, Ebot ME, Ekpere JA, Enow-Orock EG, editors. Traditional medicine and pharmacopoeia: Contribution to ethnobotanical and floristic studies in Cameroon. CSTR/OUA, CNPMS, Porto-Novo; 1996.
13. Jatsa HB, Endougou AM, Kemeta DR, Kenfack CM, TchuemTchunte LA, Kamtchouing P. *In vivo* antischistosomal and toxicological evaluation of *Sidapilosa Retz* on mice BALB/c. PhOL. 2009;3:531-38.
14. Jang DS, Park EJ, Kang YH, Su BN, Hawthorne ME, Vigo JS, et al. Compounds obtained from *Sidaacuta* with the potential to induce quinone reductase and to inhibit 7,12-dimethylbenz-[a] anthracene-induced preneoplastic lesions in a mouse mammary organ culture model. Arch. Pharm. Res. 2003;26:585-90. DOI:<http://dx.doi.org/10.1007/BF02976704>
15. Adjanohoun EJ, Adjakidje V, Ahyi MRA, editors. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin. Paris, France : Agence de Coopération Culturelle et Technique; 1989. French.
16. Abreu PM, Martins ES, Kayser O, Bindseil U, Siems K, Seemann A, et al. Anti-microbial, anti-tumor and anti-leishmania screening of medicinal plants from Guinea-Bissau. Phytomedicine. 1999; 6:187-95.
17. Molgaard P, Nielsen SB, Rasmussen DE, Drummond RB, Makaza N, Andreassen J. Anthelmintic screening of Zimbabwean plants traditionally used against schistosomiasis. J ethnopharmacol. 2001; 74:257-64. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00377-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00377-9)
18. Bogninou-Agbidinokoun S, Chalard P, Patel K, Delort L, Billard H, Figuerredo G, et al. Chemical composition and antiproliferative activity of leaves and stems essential oils of *Ozoroapulcherrima* upon breast cancer cells MCF-7. Int J Adv Res. 2016;4(1):1150-59.
19. Jatsa HB, Feussom GN, Nkondo TE, Kenfack CM, Simo ND, Fassi KJB, et al. Efficacy of *Ozoroa pulcherrima* Schweinf. methanolic extract against *Schistosoma mansoni*-induced liver injury in mice. J. Tradit. Complement. Med. 2019;9(4):304-11.
20. Tsague DC, Hussain H, Dongo E, Jatsa-Megaptche BH, Ahmed I, Krohn K. A new alkylnacardic acid from *Ozoroa pulcherrima*. J Asian Nat Prod Res. 2011; 13:84-7.
21. Tsague DC, Hussain H, Dongo E, Jatsa-Megaptche BH, Ahmed I, Krohn K. Two new alkylnacardic acids, Ozorcardic A and B, from *Ozoroa pulcherrima*. Nat Prod Commun. 2011;6:1133-34.
22. Obare BA, Yole D, Nonoh J, Lwande W. Evaluation of cercaricidal and miracidial activity of selected plant extracts against larval stages of *Schistosoma mansoni* .J. Nat. Sci. Res. 2016;6(22):24-31.
23. Tekwu ME, Bosompem MK, Anyankw, Appiah-OpongR, Owusu B-AK, Tettey DB, et al. *In vitro* assessment of anthelmintic activities of *Rauwolfia vomitoria* (Apocynaceae) stem bark and roots against parasitic stages of *Schistosoma mansoni* and cytotoxic study. J. Parasitol. Res. 2017;2017:1-8. DOI:<http://dx.doi.org/10.1155/2017/2583969>
24. Pellegrino J, Siqueira AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma Mansoni Emco las* experimentalmente infestadas. Rev Bras malariol doenças trop. 1986;8:589-97. Portuguese.
25. Ramirez B, Bickle Q, Yousif F, Fakorede F, Mouries MA, Nwaka S. Schistosomes: challenges in compound screening. Expert Opin. Drug Dis. 2007;2:S53-61. DOI:<http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2.s1.s53>
26. Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 1977;11:714-19. DOI:<http://dx.doi.org/10.1021/es60130a004>
27. Doenhoff MJ, Hagan P, Cioli D, Southgate V, Pica-Mattoccia L, Botros S, et al. Praziquantel: Its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and

- current research needs. *Parasitol.* 2009; 136:1825-1835.
28. De Moraes J, Nascimento C, Lopes POMV, Nakano E, Yamaguchi LF, Kato MJ, Kawano T. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of pipartine. *ExpParasitol.* 2011;127:357-364. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.021
  29. Lyddiard JRA, Whitfield PJ, Bartlett A. Anti schistosomal bioactivity of isoflavonoids from *Millettia thonningii* (Leguminosae). *J. Parasitol.* 2002;88:163-70.
  30. Dos Santos AF, Fonseca SA, César FA, De Azevedo Albuquerque MCP, Santana JV, Santana AEG. A penta-substituted pyridine alkaloid from the rhizome of *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. is active against *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*. *Parasitol. Res.* 2014;113:1077-84.
  31. Baguine CG, Costa ES, Magalhaes LG, Rodrigues V, da Silva Filho AA, Bastos JK, et al. Schistosomicidal evaluation of *Zanthoxylum naranjillo* and its isolated compounds against *Schistosoma mansoni* adult worms, *Zeitschrift für Naturforschung—Section C Journal of Biosciences.* 2010;64(11-12):793-97.
  32. Mostafa OMS, Eid RA, Adly MA. Antischistosomal activity of ginger (*Zingiber officinale*) against *Schistosoma mansoni* harbored in C57 mice. *Parasitol. Res.* 2011;109:395-403.
  33. Jatsa BH, Pereira JAC, Pereira DBA, Negrão-Corrêa AD, Braga CF, Maciel MG, et al. *In vitro* evaluation of *Sidapilosa Retz* (Malvaceae) aqueous extract and derived fractions on *Schistosoma mansoni*. *Pharmacol pharm.* 2015;6:380-90. DOI:http://dx.doi.org/10.4236/pp.2015.68039
  34. Magalhães LG, Souza, Julia M, Kamila AL, Wakabayashi, Laurentiz RS, et al. *In vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.* 2012;110(5):1747-54. DOI: 10.1007/s00436-011-2695-7
  35. De Oliveira NR, Rehder GLV, Oliveira SD, Júnior MI, De Carvalho EJ, De RuizGTA, et al. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. *Exp. Parasitol.* 2012;132 :135-43.
  36. Silva-Moraes V, Couto FFB, Vasconcelos MM, Araújo N, Coelho PMZ, Katz N, et al. Antischistosomal activity of a calcium channel antagonist on schistosomula and adult *Schistosoma mansoni* worms. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108:600-04.
  37. De Moraes J. Natural products with antischistosomal activity. *Future Med. Chem.* 2015;7(6):801-20.
  38. Jatsa BH, Feussom GN, Femoe MU, Kenfack MC, Nkondo TE, Fassi KJB, et al. Evaluation of the schistosomicidal, antioxidant and anti-inflammatory activities of the ethyl acetate fraction from *Ozoroa pulcherrima* Schweinf. Roots on *Schistosoma mansoni* induced liver pathology in mice and its phytochemical characterization. *J. Ethnopharmacol.* 2019; 238:111883.
  39. Ansari MT, Saify ZS, Sultana N, Ahmad I, Saeed-Ul-Hassan S, Tariq I, Khanum M. Malaria and artemisin in derivatives: An updated review. *Mini Rev. Med. Chem.* 2013;13:1879-1902.
  40. Ledwitch K, Ogburn R, Cox J, Graham R, Fritzsche A, Gosnell D, et al. Efficacy against oral squamous cell carcinoma. *Mini Rev Med Chem.* 2013;13:509-21.
  41. Huang M, Lu JJ, Huang MQ, Bao JL, Chen XP, Wang YT. Terpenoids: Natural products for cancer therapy. *Expert OpinInvestig. Drugs.* 2012;2:1801-18.
  42. De Moraes J, Almeida AAC, Brito MRM, Marques THC, Lima TC, De Sousa DP, et al. Anthelmintic activity of the natural compound (+)-limonene epoxide against *Schistosoma mansoni*. *Planta Med.* 2013; 79:253-58.
  43. Neves BJ, Andrade CH, Cravo PVI. Natural products as leads in schistosome drug discovery. *Molecules.* 2015;20(2):1872-1903.
  44. Veras LM, Guimaraes MA, Campelo YD, Vieira MM, Nascimento C, Lima DF, et al. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. *Curr. Med. Chem.* 2012;19:2051-58.
  45. El Ridi R, Tallima H. Equilibrium in lung schistosomula sphingomyelin breakdown and biosynthesis allows very small molecules, but not antibody, to access proteins at the host-parasite interface. *J Parasitol.* 2006;92:730-37.
  46. Tallima H, Salah M, El-Ridi R. *In vitro* and *in vivo* effects of unsaturated fatty acids on *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma*

- haematobium* lung-stage larvae. J Parasitol. 2005;9:1094-1102.
47. Marks NJ, Maule AG. Neuropeptides in helminths: Occurrence and distribution. Adv Exp Med Biol. 2010;692:49-77.
48. Taman A, Ribeiro P. Glutamate-mediated signaling in *Schistosoma mansoni*: A novel glutamate receptor is expressed in neurons and the female reproductive tract. Mol Biochem Parasitol. 2011;176:42-50.
49. Braguine CG, Bertanha CS, Gonçalves UO, Magalhães LG, Rodrigues V, Melleiro Gimenez VM, et al. Schistosomicidal evaluation of flavonoids from two species of *Styrax* against *Schistosoma mansoni* adult worms. Pharm Biol. 2012;50:925-29.

© 2020 Feussom 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://www.sdiarticle4.com/review-history/55894>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Traditional and Complementary Medicine

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/jtcm>

## Efficacy of *Ozoroa pulcherrima* Schweinf methanolic extract against *Schistosoma mansoni*-induced liver injury in mice

Hermine Boukeng Jatsa <sup>a,d,\*</sup>, Nestor Gipwe Feussom <sup>a,d</sup>, Emilienne Tienga Nkondo <sup>a,d</sup>,  
 MÉRIMÉ Christian Kenfack <sup>a,d</sup>, Nadège Distele Simo <sup>a</sup>, Joseph Bertin Kadji Fassi <sup>a,d</sup>,  
 Ulrich Membe Femoe <sup>a,d</sup>, Cyriaque Moaboulou <sup>a</sup>, Christelle Dongmo Tsague <sup>c</sup>,  
 Etienne Dongo <sup>c</sup>, Pierre Kamtchouing <sup>a</sup>, Louis-Albert Tchuem Tchuente <sup>b,d</sup>

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

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

<sup>c</sup> Laboratory of Phytochemistry, Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

<sup>d</sup> Centre for Schistosomiasis and Parasitology, P.O. Box 7244, Yaoundé, Cameroon

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 January 2017

Received in revised form

15 July 2017

Accepted 10 August 2017

Available online 25 August 2018

#### Keywords:

Liver injury

Oxidative stress

*Schistosoma mansoni*

*Ozoroa pulcherrima*

Inflammation

### ABSTRACT

The roots of *Ozoroa pulcherrima* Schweinf are used in traditional medicine to treat intestinal helminthiasis. The aim of this study was to assess the effect of *Ozoroa pulcherrima* roots methanolic extract (OPME) on liver injury induced by *Schistosoma mansoni* in mice. A preliminary phytochemical study of OPME was conducted. OPME was given daily and orally to *S. mansoni*-infected mice at 100, 200 or 400 mg/kg for 28 days, starting from the 36th day post-infection. Praziquantel was used as reference drug. Non-infected and infected-untreated mice served as controls. Worm burden and egg output, transaminases, total bilirubin, alkaline phosphatase and total protein; as well as malondialdehyde, catalase and reduced glutathione were evaluated. In OPME, total phenolic was  $79.61 \pm 0.25$  mg gallic acid equivalent/g, while total flavonoid was  $7.98 \pm 0.04$  mg rutin equivalent/g. Treatment of *S. mansoni*-infected mice with OPME produced significant reduction of worm burden and ova count in the faeces, liver and intestine. Significant reduction of alanine aminotransferase activity ( $p < 0.001$ ) as well as significant increase of total protein content ( $p < 0.001$ ) was recorded after OPME treatment at all doses. Total bilirubin level was also reduced ( $p < 0.01$ ). Administration of OPME at all doses corrected the high malondialdehyde level ( $p < 0.001$ ) induced by the infection. At 200 mg/kg, catalase activity and reduced glutathione concentration were significantly increased ( $p < 0.001$ ). OPME at 200 mg/kg showed moderate schistosomicidal effect, but was effective as the standard drug praziquantel in restoring the liver function after *S. mansoni* infection.

© 2017 Center for Food and Biomolecules, National Taiwan University. Production and hosting by Elsevier Taiwan LLC. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Corresponding author. Laboratory of Animal Physiology, Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon.

E-mail addresses: [mjatsa@yahoo.fr](mailto:mjatsa@yahoo.fr) (H.B. Jatsa), [feussomnesta@yahoo.fr](mailto:feussomnesta@yahoo.fr) (N.G. Feussom), [tiengemilie@yahoo.fr](mailto:tiengemilie@yahoo.fr) (E.T. Nkondo), [chrismertime@yahoo.fr](mailto:chrismertime@yahoo.fr) (M.C. Kenfack), [simosidina88@yahoo.fr](mailto:simosidina88@yahoo.fr) (N.D. Simo), [fassi.joseph@yahoo.fr](mailto:fassi.joseph@yahoo.fr) (J.B.K. Fassi), [ulrichfemoe10@gmail.com](mailto:ulrichfemoe10@gmail.com) (U.M. Femoe), [cyriaque.moaboulou@yahoo.fr](mailto:cyriaque.moaboulou@yahoo.fr) (C. Moaboulou), [tdchristelle@yahoo.fr](mailto:tdchristelle@yahoo.fr) (C.D. Tsague), [dongoet@yahoo.fr](mailto:dongoet@yahoo.fr) (E. Dongo), [pikam55@yahoo.fr](mailto:pikam55@yahoo.fr) (P. Kamtchouing), [tchuemtchuente@schisto.com](mailto:tchuemtchuente@schisto.com) (L.-A. Tchuem Tchuente).

Peer review under responsibility of The Center for Food and Biomolecules, National Taiwan University.

### 1. Introduction

Schistosomiasis is a chronic parasitic disease caused by a trematode blood fluke of the genus *Schistosoma*. It's one of the most prevalent parasitic diseases in tropics and subtropics and continues to be a significant cause of morbidity and mortality.<sup>1</sup> It is estimated that more than 249 million people are infected and approximately 800 million, mostly children, are at risk in 78 endemic countries.<sup>2</sup> *Schistosoma* infection is one of the most important causes of non-cirrhotic portal hypertension in Latin America, Africa and Asia. *Schistosoma mansoni*-induced liver injury results from a granulomatous inflammatory reaction around trapped *Schistosoma* eggs in

the presinusoidal periportal spaces. In early phases of the infection, a predominantly hypercellular nonfibrotic granuloma response produces liver dysfunction. Enlargement of the liver is clinically detectable. Chronicity is characterized by liver fibrosis and portal hypertension marked by splenomegaly.<sup>3</sup> In the liver, high rate of oxidative process occurs, precisely the formation of hepatic malondialdehyde due to the peroxidative damage of the liver microsomal membrane lipids. Moreover, impairment of the endogenous antioxidant defense characterizes schistosomiasis.<sup>4,5</sup>

Two decades of ambitious efforts have been devoted to develop an effective vaccine against schistosomiasis without resounding success. For this reason, praziquantel (PZQ) remains the mainstay of the disease control.<sup>6</sup> PZQ has high cure and egg reduction rates with only mild side effects, but suffers from two serious drawbacks. Firstly, it is active only at the adult stage of the worm which means that it exerts its action after sexual maturation and oviposition. Secondly, a series of laboratory studies and clinical trials have raised concerns about the possible development of resistance to PZQ.<sup>7</sup> This urges the need to develop complementary and/or alternative new anthelmintic agents that are both effective and have minimal side effects.<sup>8</sup>

The value of many plant species that have been used in traditional medicine to treat both veterinary and human helminths is increasingly being recognized.<sup>9</sup> Among them, *Nigella sativa*, *Clerodendrum umbellatum* and *Sida pilosa* have shown good activity against *S. mansoni* infection.<sup>10–12</sup> *Ozoroa pulcherrima* Schweinf (syn.: *Heeria pulcherrima* Schweinf), family Anacardiaceae, is a small shrub of about 1 m high. The leaves upper surface is puberulous while the underneath is covered with soft. Flowers are small and creamy white and mature fruits are black and stony. It is a sudano-zambezian species, widespread from Guinea to Cameroon, in Central African Republic, in Ethiopia and in Sudan.<sup>13</sup> In Benin, the stem and leaves are used to treat dystocia, hyperthermia and conjunctivitis,<sup>14</sup> while in Cameroon, the root is used to treat dysmenorrhea and intestinal helminthiasis.<sup>13</sup> Three alkylphenolic acids: ozocardic A, ozocardic B and ozocardic C have recently been isolated from *O. pulcherrima* roots methanol-dichloromethane extract.<sup>15,16</sup> At the present stage of our literature survey, only one pharmacological study on *O. pulcherrima* has been reported. Essential oils of its aerial parts have been proved to possess antiproliferative activity on breast cancer cells.<sup>17</sup> However, *Ozoroa insignis* which belongs to the same genera, disclosed several activities including antischistosomal, antitumor and antimicrobial.<sup>18–20</sup> The present study was undertaken to assess the effect of the methanolic extract of *O. pulcherrima* roots on *S. mansoni*-induced liver injury in mice.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals, reagents and instruments

Praziquantel was supplied by Merck S.A., Mexico, Mexico. Total bilirubin and alkaline phosphatase kits (Innesco kits) were purchased from Innesco, Wied, Germany. Transaminases kits were procured from Quibasa Quimica Basica Ltda, Belo Horizonte, Brasil. The following were products of Sigma-Aldrich, St Louis, USA: Ellman's reagent, serum albumin bovine (SAB), trichloroacetic acid (TCA), thiobarbituric acid (TBA), chemicals used for the preparation of the Biuret reagent and buffers. Methanol and others chemicals were of analytical grade. For parasitological study, we used a stereo-microscope (Zeiss, Hamburg, Germany) and a light microscope (Leica, Wetzlar, Germany). For biochemical analyses, we used the Genesys 20 spectrophotometer (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

### 2.2. Collection of plant material and extraction

Roots of *O. pulcherrima* were harvested in July 2012 in the locality of Wakwa near Ngaoundéré in the Adamawa region of Cameroon. Botanical identification of a plant sample was performed at the "National Herbarium", Yaoundé, Cameroon and a voucher specimen no 13667/SRF/Cam was deposited. The roots were thoroughly washed with water and cut into pieces. They were dried at room temperature and powdered. The powder (4130 g) was submitted to maceration in methanol during 48 h. The macerate was filtered under reduced pressure in a rotary evaporator (BÜCHI B-480) and dried in an oven at 50 °C. Then, we obtained 138.12 g of *O. pulcherrima* roots methanolic extract (OPME).

### 2.3. Phytochemical screening

The methanolic extract of *O. pulcherrima* roots was subjected to qualitative chemical tests in a bid to identify phytochemical constituents in the fraction. The screening of alkaloids, anthraquinones and cardiac glycosides was performed using the Mayer's test, the Bornträger's test and the Keller-Killiani's test respectively. The following tests were used: Ferric chloride test (FeCl<sub>3</sub>), for the identification of phenols and tannins, Fehling's test for reducing sugars, foam test for saponins and Liebermann-Burchard's test for steroids and triterpenes. The presence of flavonoids was revealed by the ammonia test, that of lipids by the grease spot test and terpenoids, by the Salkowski's test.<sup>21</sup>

### 2.4. Determination of the total phenolic content and flavonoid content in the extract

Folin-Ciocalteu's method described by Mansouri *et al.* was used to establish the total phenolic content in OPME.<sup>22</sup> Total phenolic content was calculated from the calibration curve of gallic acid serial dilutions and expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per g of dried extract. Spectrophotometric method described by Pal *et al.* was used to calculate the total flavonoid content in OPME.<sup>23</sup> Total flavonoid content was estimated by using a calibration curve of rutin and expressed as mg rutin equivalents per g of dried extract.

### 2.5. Animals and infection

Eight-week-old Balb/c mice, weighing 20–25 g bred at the "Centre for Schistosomiasis and Parasitology" of Yaoundé – Cameroon, were used for the study. All animals were housed in polypropylene cages with free access to food and water and maintained under natural 12 h light/12 h dark cycles and temperature between 22 and 25 °C. Animals were individually infected with 50 cercariae of *S. mansoni* (cameroonian strain) by the tail and legs immersion technique as described by Oliver and Stirewalt.<sup>24</sup> Cercariae were released from *Biomphalaria pfeifferi* snails, collected from the river "Afeme" (Yaoundé, Cameroon) and maintained in the laboratory under standardized conditions. All procedures in this study followed the principles of laboratory animal use and care of the "European Community" guidelines (EEC Directive 2010/63/EEC) and were approved by the "Animal Ethical Committee" of the Laboratory of Animal Physiology of the Faculty of Sciences, University of Yaoundé I – Cameroon.

### 2.6. Experimental design

*S. mansoni*-infected animals were divided into five (5) groups. Infected-untreated group, named Group IC (n = 6) was composed of mice receiving 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) (vehicle); group

PZQ (n = 6) was composed of mice receiving praziquantel at the dose of 100 mg/kg for 5 consecutive days followed by distilled water till the end of the experiment. In groups OPME 100 (n = 5), OPME 200 (n = 6) and OPME 400 (n = 6), mice were treated with *O. pulcherrima* methanolic extract at 100, 200 and 400 mg/kg respectively, for 28 consecutive days. The period of treatment and the choice of doses were done according to the prescription of traditional healers and on the basis of our previous findings.<sup>11–13</sup> All treatments started on the 36th day post-infection. The extract or praziquantel dissolved in 1% DMSO was given daily and *per os*. In addition, a group of uninfected mice named group HC (n = 6) was used and received vehicle only (1% DMSO). All animals were sacrificed on the 65th day post-infection by cervical dislocation.

### 2.7. Measuring body and organs weights

During the course of the experiment, each mice was weighed once a week in order to assess body weight variation between pre-infection and post-infection (65th day). The percentage of body weight gain was calculated as follows:

$$P = [(W_e - W_i) / W_e] \times 100$$

where P = percentage of weight gain;  $W_e$  = body weight at post-infection;  $W_i$  = body weight at pre-infection.

After sacrifice, liver and spleen were removed from each mouse, weighed and their relative weights (g of organ/100 g of body weight) was calculated.

### 2.8. Worm burden

On the 65th day post-infection, adult *S. mansoni* worms were recovered by perfusion from the porto-mesenteric system and the liver, as described by Duvall and Dewitt.<sup>25</sup> Recovered worms from each infected mouse were counted under a stereo-microscope. The percentage of reduction of worm number was calculated as follows<sup>26</sup>:

$$P = [(C - V) / C] \times 100$$

where P = percentage of reduction; C = mean number of worms recovered from infected-untreated mice; V = mean number of worms recovered from infected-treated mice.

### 2.9. Egg count in the faeces, liver and intestine

Faeces were collected from each infected mice the day before the sacrifice and weighed. After homogenization in 10 % buffered formaldehyde, the mixture was stored at 4 °C. Two aliquots of 100 µL each were counted on light microscope. After the sacrifice, the liver and the intestine were removed and weighed. They were digested separately in 4% KOH solution at 37 °C for 6 h until no sign of intact tissue was present. Tissue suspensions were then centrifuged at 1500 rpm for 5 min and supernatants removed.<sup>27</sup> After three cycles of washing and centrifugation, the number of eggs was determined in two aliquots of 100 µL each using a light microscope. Results were expressed in terms of mean number of eggs per gram of faeces or per gram of tissue for the liver and the intestine.

### 2.10. Evaluation of some liver function biomarkers

Some parameters of the liver function were measured in the plasma after the sacrifice. Blood from each mouse was then collected from the retro-orbital venous plexus in EDTA tube and centrifuged at 3500 rpm for 15 min. Plasma obtained was stored

at –70 °C for biochemical analysis. Total protein level was determined using the method of Biuret.<sup>28</sup> The amount of protein was calculated from a standard curve using serial concentrations of bovine serum albumin. Activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were assessed using Bioclin kits according to the method of Reitman and Frankel.<sup>29</sup> Alkaline phosphatase was estimated according to Tietz *et al.* by using Inmesco kit.<sup>30</sup> The decrease in absorbance was measured at 410 nm at 1 min intervals for 3 min and activities expressed as U/l. Total bilirubin was assayed according to the protocol described in the Inmesco kit. The red color developed after the reaction of bilirubin with sulfanilic acid was read at 546 nm against a blank.

### 2.11. Evaluation of some oxidative stress biomarkers in the liver

The liver (0.4 g) was homogenized in 2 ml of a Tris-HCl 50 mmol buffer, pH 7.4. The homogenate (20% w/v) was centrifuged at 3000 rpm for 25 min at 4 °C. The supernatant was collected and stored at –70 °C until assayed. Lipid peroxides were measured as thiobarbituric acid reactive substances. The product of the reaction between malondialdehyde and TBA was estimated as described by Wilbur *et al.*<sup>31</sup> The concentration of MDA was calculated using a molar extinction coefficient of  $1.56 \times 10^{-5} \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  and results expressed as nmol/g of liver. Catalase activity was assayed following the protocol described by Sinha.<sup>32</sup> Catalase activity was calculated from the standard curve and expressed as mol/min/g of liver. Reduced glutathione (GSH) was determined using the Ellman's reagent (5 mg of 2, 2-dithio-5, 5-nitrobenzoic acid + 250 ml phosphate buffer), as described by Ellman.<sup>33</sup> The concentration of GSH was calculated using a molar extinction coefficient of  $13600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  and results expressed as mmol/g of liver.

### 2.12. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM. Data were analyzed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows, by one-way analysis of variance (ANOVA) and differences between groups were assessed using the Newman-Keuls multiple comparison post-test. Differences were considered significant from  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Phytochemical constituents of *O. pulcherrima* roots methanolic extract

The qualitative phytochemical analysis of *O. pulcherrima* roots methanolic extract revealed the presence of anthraquinones, terpenoids, flavonoids, saponins, tannins, phenols, cardiac glycosides, alkaloids, triterpenes and lipids.

In *O. pulcherrima* roots methanolic extract, the total phenolic content was found to be  $79.61 \pm 0.25$  mg/g of dried extract, calculated as gallic acid equivalent ( $r^2 = 0.9994$ ) and the total flavonoid content was  $7.98 \pm 0.04$  mg/g of dried extract, calculated as rutin equivalent ( $r^2 = 0.9959$ ).

### 3.2. Effect of *O. pulcherrima* methanolic extract on the body, liver and spleen weights

As shown in Table 1, mice of all groups gained weight, although the weight gain of infected-untreated mice (IC) and infected-treated mice (PZQ, OPME 100, OPME 200, OPME 400) was significantly lower than the one of healthy mice (HC). However, the body weight gain of animals treated with praziquantel or *O. pulcherrima* methanolic extract at 100 or 400 mg/kg showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) as compared to infected-untreated mice (IC). No

**Table 1**Effect of *Ozorioa pulcherrima* methanolic extract on the body weight and organs weights of *Schistosoma mansoni*-infected mice.

| Groups   | Body weight (g) |                | Body weight gain (%)                      | Liver weight (g/100 body weight) | Spleen weight (g/100 body weight) |
|----------|-----------------|----------------|---|----------------------------------|-----------------------------------|
|          | Pre-infection   | Post-infection |   |                                  |                                   |
| HC       | 18.38 ± 0.56    | 26.08 ± 0.80   | 29.19 ± 3.04 (21.38–37.00)                | 6.69 ± 0.62                      | 0.58 ± 0.04                       |
| IC       | 23.93 ± 1.10    | 25.57 ± 0.66   | 6.36 ± 2.91 (-1.13–13.86) <sup>***</sup>  | 8.50 ± 0.69 <sup>*</sup>         | 1.36 ± 0.14 <sup>***</sup>        |
| PZQ      | 21.22 ± 1.04    | 26.00 ± 0.98   | 18.41 ± 1.84 (13.68–23.14) <sup>**#</sup> | 6.57 ± 0.46 <sup>##</sup>        | 0.43 ± 0.08 <sup>###</sup>        |
| OPME 100 | 19.78 ± 0.85    | 23.99 ± 1.22   | 17.25 ± 2.57 (10.12–24.38) <sup>*#</sup>  | 7.73 ± 0.39                      | 0.76 ± 0.07 <sup>###</sup>        |
| OPME 200 | 22.81 ± 0.85    | 26.42 ± 1.27   | 13.31 ± 2.24 (7.56–19.06) <sup>***</sup>  | 7.02 ± 0.34                      | 0.64 ± 0.10 <sup>###</sup>        |
| OPME 400 | 22.00 ± 0.80    | 26.76 ± 1.03   | 17.57 ± 2.34 (11.55–23.59) <sup>**#</sup> | 8.35 ± 0.65                      | 0.86 ± 0.12 <sup>##, ε</sup>      |

Data are expressed as mean ± SEM (n = 5 for group OPME 100 and n = 6 for others groups). HC: healthy animals; IC: infected-untreated animals; PZQ: infected animals treated with praziquantel; OPME 100, OPME 200 and OPME 400: infected animals treated with the methanolic extract of *O. pulcherrima* roots at 100, 200 and 400 mg/kg respectively. ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test. <sup>\*</sup>p < 0.05; <sup>\*\*</sup>p < 0.01; <sup>\*\*\*</sup>p < 0.001: values are significantly different from the healthy animals (group HC). <sup>#</sup>p < 0.05; <sup>##</sup>p < 0.01; <sup>###</sup>p < 0.001: values are significantly different from the infected-untreated animals (group IC). <sup>ε</sup>p < 0.05: values are significantly different from the infected animals treated with praziquantel (group PZQ). Values in brackets represent the 95 % confidence intervals.

statistical difference was recorded between *O. pulcherrima*-treated groups and PZQ-treated group (Table 1).

*S. mansoni* infection induced a significant increase of the liver weight ( $p < 0.05$ ) and spleen weight: ( $p < 0.001$ ) by 27.06% and 134.48% respectively when compared to healthy mice (HC). Comparatively to the liver weight of infected-untreated mice, the one of mice treated with praziquantel or OPME at 100 or 200 mg/kg was reduced. This reduction was statistically significant only in group PZQ ( $p < 0.01$ ). PZQ or OPME treatment also induced significant decrease of the spleen weight ( $p < 0.001$ ) by 68.38% (PZQ), 44.12% (OPME 100), 52.94% (OPME 200) and 36.76% (OPME 400) as compared to infected-untreated mice. The spleen weight of mice treated with OPME at 100 or 200 mg/kg was comparable to that of PZQ-treated mice (Table 1).

### 3.3. Effect of *O. pulcherrima* methanolic extract on parasitological parameters

The worm burden of infected-untreated mice was  $16.67 \pm 1.99$  worms. Treating the infected mice with OPME at 100, 200 or 400 mg/kg resulted in a significant decrease ( $p < 0.001$ ) of worm count by 53.21, 74.02 or 67.01% respectively, as compared to infected-untreated mice. Praziquantel treatment induced a high reduction of worm burden by 86.98% ( $p < 0.001$ ). The worm burden of mice treated with OPME at 200 or 400 mg/kg was comparable to that of PZQ-treated mice (Table 2).

Compared to infected-untreated mice, ova count in the faeces was significantly reduced by 92.45, 93.30 and 91.70% after administering the extract to infected mice at 100, 200 or 400 mg/kg respectively. Moreover, after treatment with OPME, a significant reduction of ova count in the liver by 75% ( $p < 0.05$ ) was recorded only at the dose of 200 mg/kg. In the intestine, the ova burden decreased significantly: 69.30, 89.28 or 81.43% at 100, 200 or 400 mg/kg of OPME respectively. Treatment with praziquantel

resulted in significant reduction of ova count by 100% in the faeces, 99.29% in liver and 99.91% in the intestine. Despite its significant reduction, the intestine ova burden of mice treated with OPME at 100 mg/kg was higher than in PZQ-treated mice. Between praziquantel and OPME at 200 mg/kg, there was no statistical significant difference in their capacity to reduce ova burden in the faeces, the liver and the intestine (Table 2).

### 3.4. Effect of *O. pulcherrima* methanolic extract on some parameters of the liver function

The present study showed that *S. mansoni* infection induced significant increase of transaminases activities (ALT and AST) in the plasma. Oral administration of praziquantel or OPME at the doses of 100, 200 or 400 mg/kg to infected mice resulted in significant decrease of ALT activity by 50.50%, 36.90%, 50.77% or 28.19% respectively, as compared to infected-untreated mice. OPME at 100 and 200 mg/kg was as effective as praziquantel. A significant reduction of AST activity ( $p < 0.05$ ) was recorded only in PZQ-treated mice (Table 3).

The total bilirubin concentration which was increased by the infection ( $p < 0.001$ ), showed a significant reduction by 36.69%, 52.48% or 24.92% after treatment of infected mice with PZQ or the extract at 200 or 400 mg/kg respectively. The efficacy of OPME at these two doses was comparable to that of praziquantel in reducing total bilirubin level (Table 3).

As shown in Table 3, *S. mansoni* infection resulted in significant reduction of total proteins level and alkaline phosphatase (ALP) activity in the plasma. Compared to infected-untreated animals, total protein level significantly increased ( $p < 0.001$ ) by 58.28%, 57.14%, 45.71% or 65.14% after treatment with PZQ or OPME at 100, 200 or 400 mg/kg respectively. Used at different doses, OPME was as effective as praziquantel, since no statistical significant difference was recorded between OPME-treated groups and PZQ-treated

**Table 2**Effect of *Ozorioa pulcherrima* methanolic extract on the worm burden and ova count in the feces, the liver and the intestine of *Schistosoma mansoni*-infected mice.

| Groups   | Worm burden                   | Ova count (number of ova/g of organ) |                              |                                     |
|----------|-------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
|          |                               | Feces                                | Liver                        | Intestine                           |
| IC       | 16.67 ± 1.99                  | 2639.50 ± 602.51                     | 3534.65 ± 1165.61            | 19549.60 ± 2700.30                  |
| PZQ      | 2.17 ± 0.70 <sup>###</sup>    | 00.00 ± 00.00 <sup>###</sup>         | 25.13 ± 18.39 <sup>##</sup>  | 17.86 ± 11.40 <sup>###</sup>        |
| OPME 100 | 7.80 ± 1.43 <sup>###, ε</sup> | 199.16 ± 62.88 <sup>###</sup>        | 2614.45 ± 543.70             | 6001.81 ± 1147.89 <sup>###, ε</sup> |
| OPME 200 | 4.33 ± 1.05 <sup>###</sup>    | 176.88 ± 29.81 <sup>###</sup>        | 883.58 ± 260.44 <sup>#</sup> | 2095.17 ± 469.72 <sup>###</sup>     |
| OPME 400 | 5.50 ± 1.36 <sup>###</sup>    | 218.98 ± 68.04 <sup>###</sup>        | 2205.99 ± 601.62             | 3629.90 ± 646.36 <sup>###</sup>     |

Data are expressed as mean ± SEM (n = 5 for group OPME 100 and n = 6 for others groups). IC: infected-untreated animals; PZQ: infected animals treated with praziquantel; OPME 100, OPME 200 and OPME 400: infected animals treated with the methanolic extract of *O. pulcherrima* roots at 100, 200 and 400 mg/kg respectively. ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test. <sup>\*</sup>p < 0.05; <sup>\*\*</sup>p < 0.01; <sup>\*\*\*</sup>p < 0.001: values are significantly different from the infected-untreated animals (group IC). <sup>ε</sup>p < 0.05: values are significantly different from the infected animals treated with praziquantel (group PZQ).

**Table 3**  
Effect of *Ozoroa pulcherrima* methanolic extract on some parameters of the liver function of *Schistosoma mansoni*-infected mice.

| Groups   | Total proteins (mg/mL) | AST (U/mL)          | ALT (U/mL)                                | ALP (U/L)         | Total bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ ) |
|----------|------------------------|---------------------|---|-------------------|---------------------------------------|
| HC       | 2.78 $\pm$ 0.07        | 159.27 $\pm$ 6.48   | 345.57 $\pm$ 37.48                        | 41.36 $\pm$ 6.72  | 8.11 $\pm$ 0.39                       |
| IC       | 1.75 $\pm$ 0.08***     | 303.09 $\pm$ 64.92* | 791.29 $\pm$ 32.20***                     | 8.96 $\pm$ 2.58** | 24.20 $\pm$ 1.68***                   |
| PZQ      | 2.77 $\pm$ 0.09###     | 168.13 $\pm$ 13.41# | 391.66 $\pm$ 31.85###                     | 28.95 $\pm$ 9.14  | 15.32 $\pm$ 1.76###                   |
| OPME 100 | 2.75 $\pm$ 0.19###     | 234.23 $\pm$ 6.93   | 499.32 $\pm$ 54.40###                     | 7.44 $\pm$ 2.25   | 22.21 $\pm$ 1.03                      |
| OPME 200 | 2.55 $\pm$ 0.19###     | 195.26 $\pm$ 15.37  | 389.51 $\pm$ 42.33###                     | 20.91 $\pm$ 6.65  | 11.50 $\pm$ 1.41###                   |
| OPME 400 | 2.89 $\pm$ 0.08###     | 231.93 $\pm$ 18.03  | 568.18 $\pm$ 37.66###, $\epsilon\epsilon$ | 15.62 $\pm$ 2.82  | 18.17 $\pm$ 1.20##                    |

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 5 for group OPME 100 and n = 6 for others groups). AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; HC: healthy animals; IC: infected-untreated animals; PZQ: infected animals treated with praziquantel; OPME 100, OPME 200 and OPME 400: infected animals treated with the methanolic extract of *O. pulcherrima* roots at 100, 200 and 400 mg/kg respectively. ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ : values are significantly different from the healthy animals (group HC). # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ ; ### $p < 0.001$ : values are significantly different from the infected-untreated animals (group IC).  $\epsilon\epsilon p < 0.01$ : values are significantly different from the infected animals treated with praziquantel (group PZQ).

group. The activity of ALP did not varied significantly after administration of OPME (Table 3).

### 3.5. Effect of *O. pulcherrima* methanolic extract on some liver oxidative stress biomarkers

This study showed that *S. mansoni* infection induced significant increase of malondialdehyde concentration in the liver by 332.64% ( $p < 0.001$ ). Treatment with OPME at 100, 200 or 400 mg/kg, showed significant decrease of hepatic malondialdehyde by 74.87%, 68.01% or 66.26% respectively as compared to infected-untreated mice ( $p < 0.001$ ). This result was comparable to that obtained with praziquantel (Fig. 1A).

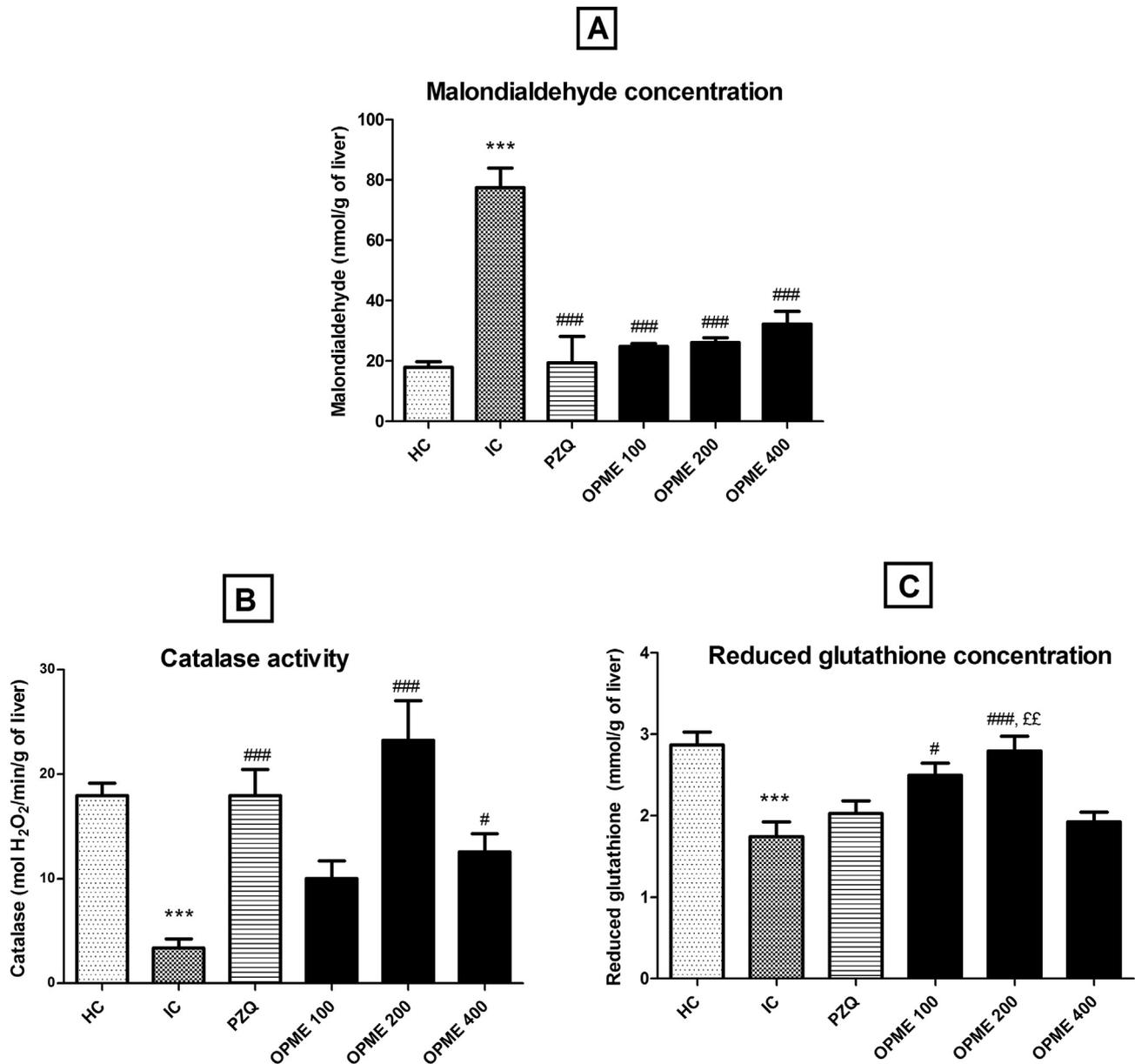
*S. mansoni* infection also induced a significant reduction ( $p < 0.001$ ) of catalase activity by 81.38% and reduced glutathione level by 39.37% (Fig. 1B and C). Regarding catalase activity, treatment with praziquantel or OPME at 200 or 400 mg/kg resulted in significant increased by 437.12%, 595.37% or 275.19% respectively as compared to infected-untreated mice. OPME at these doses was effective as praziquantel (Fig. 1B). Reduced glutathione concentration showed significant increase by 43.68% or 60.34% in mice treated with OPME at 100 or 200 mg/kg respectively, as compared to infected-untreated mice. Treatment with praziquantel induced no variation of reduced glutathione concentration and OPME at 200 mg/kg was more effective than praziquantel ( $p < 0.01$ ) (Fig. 1C).

## 4. Discussion

*S. mansoni* infection is mostly due to *Schistosoma* eggs trapped in the host tissues where they induce inflammatory and fibrotic lesions. It's one of the most important causes of non-cirrhotic portal hypertension in Latin America, Africa and Asia.<sup>3</sup> Epidemiological studies conducted in *S. mansoni*-endemic regions in Brazil and in Africa have revealed that *S. mansoni* infection is associated with growth retardation and chronic hepatosplenomegaly among children.<sup>34,35</sup> Results from Table 1 revealed that *S. mansoni*-infected mice exhibited significant growth retardation and hepatosplenomegaly. Enlargement of the liver is thought to be due to eggs deposition in the hepatic tissue and enlargement of the spleen is due to passive congestion of blood flow and reticuloendothelial hyperplasia.<sup>35,36</sup> The mechanism behind hepatosplenomegaly is probably related to immune response. In fact, Mwatha *et al.* have demonstrated that childhood hepatosplenomegaly is associated with high levels of Th1 response (TNF and IFN $\gamma$ ).<sup>37</sup> A 3-year mass drug administration with praziquantel has shown to be effective in reducing hepatomegaly and splenomegaly around the Poyang Lake region in China.<sup>38</sup> In this study, as shown on Table 1, administration of praziquantel to *S. mansoni*-infected mice resulted in a significant reduction of hepatomegaly and splenomegaly. Also, OPME treatment improves the growth of infected mice significantly as well as

it reduces their spleen weight. The reduction of hepatosplenomegaly could be the consequence of the reduction of the number of eggs trapped in different organs. This study has effectively disclosed the reduction of egg load in the liver and intestine after praziquantel or OPME treatment (Table 2). The reduction of the worm burden as reported in this study will lead to the reduction of the egg load in the faeces, the liver and the intestine. OPME is lethal to *S. mansoni* adult worms as the aqueous extract and the organic fractions of some medicinal plants.<sup>10–12</sup> Chemical compounds with anthelmintic property could be responsible for the antischistosomal activity of OPME. The phytochemical screening of this extract has revealed the presence of alkaloids, flavonoids, tannins and terpenoids which are directly active against helminths, affecting their viability, mobility and fecundity.<sup>39,40</sup> The results of this study are in line with findings reported by Jatsa *et al.* who attributed the antischistosomal activity of *C. umbellatum* and *S. pilosa* to alkaloids and tannins present in those plants extracts.<sup>11,12</sup> The antischistosomal potential of OPME could be attributed to alkaloids, flavonoids, tannins and terpenoids present in the extract.

In *S. mansoni* infection, the granuloma response produces liver dysfunction. The degree of hepatoprotection by OPME was measured by means of estimating biochemical parameters, such as transaminases, total bilirubin, alkaline phosphatase (ALP) and total protein in the plasma. High deposition of schistosome eggs in the liver induces hepatocellular injury, which in turn, leads to the release of transaminases from the injured hepatic cells to the bloodstream. Hence, the increase of plasmatic activities of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT).<sup>40,41</sup> The current investigation showed that *S. mansoni* infection induced significant increase of AST and ALT activities in the plasma. There was a considerable rise of total bilirubin concentration while ALP activity and total protein concentration decreased significantly (Table 3). High levels of serum bilirubin generally reflect an imbalance between production and conjugation. During the course of schistosomiasis, worms continuously deteriorate hemoglobin from the host, thus increasing the concentration of bilirubin, a yellow pigment generated by hemoglobin breakdown.<sup>42,43</sup> Moreover, a rise of direct bilirubin is very specific for biliary tract obstruction by schistosomes and their eggs.<sup>44</sup> The reduction of alkaline phosphatase activity is generally related to severe anemia as recorded in patients suffering from schistosomiasis.<sup>42</sup> *S. mansoni* infection is also characterized by a reduction of the activity of enzymes associated with citric acid cycle, fatty acid cycle, urea cycle as well as amino acid metabolism but an increase of the level of proteins associated with stress responses, acute phase reactants and structural components.<sup>45</sup> As shown on Table 3, administration of OPME to *S. mansoni*-infected mice leads to a significant reduction of ALT activity in the plasma. Moderate to low levels of ALT and AST in blood denote a healthy liver or a liver which is recovering from a



**Fig. 1.** Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=5 for group OPME 100 and n=6 for others groups). HC: healthy animals; IC: infected-untreated animals; PZQ: infected animals treated with praziquantel; OPME 100, OPME 200 and OPME 400: infected animals treated with the methanolic extract of *O. pulcherrima* roots at 100, 200 and 400 mg/kg respectively. ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test. \*\*\* $p < 0.001$ : values are significantly different from the healthy animals (group HC). # $p < 0.05$ ; ### $p < 0.001$ : values are significantly different from the infected-untreated animals (group IC). ££ $p < 0.01$ : values are significantly different from the infected animals treated with praziquantel (group PZQ).

given disease in most cases.<sup>42</sup> The beneficial effect of OPME in protecting the liver can be attributed to secondary metabolites as anthraquinones, alkaloids, flavonoids, tannins, phenols, terpenoids and saponins present in the extract. These phytochemicals possess anti-inflammatory activity and probably act by reducing the migration of inflammatory cells such as eosinophils, neutrophils, lymphocytes and macrophages around schistosome eggs trapped in the liver.<sup>46–49</sup> Through its antiproliferative activity, cardiac glycosides could also protect the liver from the invasion of inflammatory cells.<sup>50</sup> Antiproliferative property of essential oils rich in hydrogenated monoterpenes from *O. pulcherrima* leaves has been demonstrated by Bogninou-Agbidinokoun *et al.*<sup>17</sup> Furthermore, the hepatoprotective role of flavonoids, tannins, saponins and terpenoids has been demonstrated in other models of hepatotoxicity. Flavonoids and tannins effectively reduce the hepatic toxicity of

alcohol, acetaminophen and hepatocarcinogenic compounds and protect hepatocytes from oxidative stress.<sup>51</sup> Saponins stimulate the protein synthesis which accelerates the regeneration process and the production of liver cells.<sup>52</sup> Terpenoids inhibit the effect of carbon tetrachloride on the liver mitochondrial swelling and consequently prevent the membrane fragility, the enzyme leakage and the hepatocytes degeneration.<sup>53</sup> Hepatocellular regeneration resulting from the anti-inflammatory activity of OPME phytochemicals might explain the restoration of ALT activity, total bilirubin concentration and total protein level after the treatment of *S. mansoni*-infected with OPME.

In *S. mansoni* infection, oxidative stress occurs in the liver at the site of inflammation in the vicinity of *S. mansoni* eggs. Schistosomiasis reduces the level of protective endogenous antioxidants and increases generation of free radicals that leads to a state of oxidative

stress.<sup>4,5,54–56</sup> The overproduction of reactive oxygen species (ROS) induces lipid peroxidation that leads to an increase of malondialdehyde concentration in liver tissue.<sup>46</sup> Our findings presented on Fig. 1 revealed a significant increase of malondialdehyde concentration and a significant decrease of catalase activity and reduced glutathione concentration in *S. mansoni*-infected mice. These results are in agreement with the literature on both human and experimental *S. mansoni* infection.<sup>11,12,54–57</sup> Depletion of catalase activity mostly resulted from its utilization in scavenging reactive oxygen species overload generated during schistosome infection.<sup>46,54,58</sup> El Rigal et al. attributed the reduction of reduced glutathione level to the increasing oxidative stress and the cytotoxicity of hydrogen peroxide.<sup>56</sup> OPME treatment of *S. mansoni*-infected animals restored malondialdehyde concentration as well as catalase activity and reduced glutathione level (Fig. 1). This result demonstrated the capacity of the extract to scavenge reactive oxygen species, thus protecting the liver from their deleterious effect. Such antioxidant potential is probably linked to flavonoids, phenols, tannins, saponins and terpenoids present in the extract. In fact, total phenolic and flavonoid contents have been quantified in OPME. Thus, OPME phenolic compounds can donate hydrogen to free radicals and break the chain reaction of lipid oxidation. Flavonoid compounds might limit reactive oxygen species formation and scavenge them, while tannins can stop lipid oxidation. In addition, flavonoid compounds are able to increase antioxidant synthesis by the liver cells.<sup>58</sup> Antiperoxidative and antioxidant properties have been also ascribed to saponins. In normal rats, crude saponins from the fruits of *Solanum anguivi* significantly decreased the malondialdehyde concentration and increased superoxide dismutase and catalase activities.<sup>59</sup> Furthermore, the role of triterpenoids in scavenging free radicals as superoxide anions and hydroxyl radicals has been demonstrated by Gao et al.<sup>53</sup> and Wu et al.<sup>60</sup> These overall actions would contribute to increase the liver antioxidant capacity and protect it from oxidative stress.

## 5. Conclusion

The treatment of *S. mansoni* infection with the methanolic extract of *O. pulcherrima* roots at the medium dose of 200 mg/kg showed a reduction of worm and egg burdens as well as an increase of the anti-inflammatory and the antioxidant capacities of the host. These activities were comparable to those disclosed by the standard drug praziquantel. The present work suggested that *O. pulcherrima* roots methanolic extract could be the source of new molecules against hepatic dysfunction in *S. mansoni* infection. Toxicity tests are needed in further investigation to ensure the safety of this extract.

## Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

The present study was supported by “International Foundation for Science” (IFS) through the grant no F/3622-2F awarded to Hermine Boukeng Jatsa.

## References

- Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect.* 2006;6:411–425.
- World Health Organization. Schistosomiasis (bilharziasis). *Fact Sheet.* 2014;115:1–4.
- Cavalcanti MG, de Araujo-Neto JM, Peralta JM. Schistosomiasis: clinical management of liver disease. *Clin Liver Dis.* 2015;6:59–62.
- El-Sokkary GH, Omar HM, Hassanein AF, Cuzzocrea S, Reiter RJ. Melatonin reduces oxidative damage and increases survival of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Free Rad Biol Med.* 2002;32:319–332.
- El-Shenawy NS, Soliman MFM. Evaluation of the protective effect of two antioxidative agents in mice experimentally induced with *Schistosoma mansoni*: biochemical and parasitological aspects. *J Egypt Ger Soc Zool.* 2003;40:201–216.
- Quack T, Beckmann S, Grevelding CG. Schistosomiasis and molecular biology of the male-female interaction of *S. mansoni*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2006;119:365–372.
- Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21:659–667.
- El-Banthawey VA, Ashry MA, El-Ansary AR, Aly SA. Praziquantel on *Schistosoma mansoni* infected mice liver-histological and histochemical studies. *Indian J Exp Biol.* 2007;45:877–889.
- Hammond JA, Fielding D, Bishop SC. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Vet Res Commun.* 1997;21:213–228.
- El Shenawy NS, Soliman MM, Reyad SI. The effect of antioxidant properties of aqueous garlic extract and *Nigella sativa* as anti-schistosomiasis agents in mice. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2008;50:29–36.
- Jatsa HB, Kenfack CM, Simo DN, et al. Schistosomicidal, hepatoprotective and antioxidant activities of the methanolic fraction from *Clerodendrum umbellatum* Poir leaves aqueous extract in *Schistosoma mansoni* infection in mice. *BMC Compl Altern Med.* 2015;15:248–256.
- Jatsa HB, Russo RC, Pereira CA, et al. Improvement of the liver pathology by the aqueous extract and the *n*-butanol fraction of *Sida pilosa* Retz in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J Ethnopharmacol.* 2016;180:114–123.
- Adjanohoun JE, Aboubakar N, Dramane K, et al. *Contribution to Ethnobotanical and Floristic Studies in Cameroon*. Porto-Novo: CSTR/OUA, CNPMS; 1996.
- Adjanohoun EJ, Adjakidje V, Ahyi MRA, et al. *Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin*. Paris, France: Agence de Coopération Culturelle et Technique; 1989.
- Tsagué DC, Hussain H, Dongo E, Jatsa-Megaptche BH, Ahmed I, Krohn K. A new alkylnacardic acid from *Ozoroa pulcherrima*. *J Asian Nat Prod Res.* 2011;13:84–87.
- Tsagué DC, Hussain H, Dongo E, Jatsa-Megaptche BH, Ahmed I, Krohn K. Two new alkylnacardic acids, Ozorcardic A and B, from *Ozoroa pulcherrima*. *Nat Prod Commun.* 2011;6:1133–1134.
- Bogninou-Agbidinokoun S, Chalard P, Patel K, et al. Chemical composition and antiproliferative activity of leaves and stems essential oils of *Ozoroa pulcherrima* upon breast cancer cells MCF-7. *Int J Adv Res.* 2016;4:1150–1157.
- Mølgaard P, Nielson SB, Rasmussen DE, Drummond RB, Nakaza N, Andreassen J. Anthelmintic screening of Zimbabwean plants traditionally used against schistosomiasis. *J Ethnopharmacol.* 2001;74:257–264.
- Abreu PM, Martins ES, Kayser O, et al. Antimicrobial, antitumor and anti-leishmania screening of medicinal plants from Guinea-Bissau. *Phytomedicine.* 1999;6:187–195.
- Nyaberi MO, Onyango CA, Mathooko FM, Maina JM, Makobe M, Mwaura F. Bioactive fractions in the stem charcoal of *Ozoroa insignis* used by the pastoral communities in West Pokot to preserve milk. *J Appl Biosci.* 2010;26:1653–1658.
- Trease GE, Evans WC. *Pharmacognosy*. London: Bailliere Tindall; 1989.
- Mansouri A, Embarek G, Kokkalou E, Kefalas P. Phenolic profile and antioxidant activity of the algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem.* 2005;89:411–426.
- Pal R, Girhepunje K, Upadhyay A, Thirumoorthy N. Antioxidant and free radical scavenging activity of ethanolic extract of the root of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). *Afr J Pharm Pharmacol.* 2012;6:278–282.
- Olivier L, Stirewalt MA. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *S. mansoni*. *J Parasitol.* 1952;38:19–23.
- Duwall RH, Dewitt WB. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *Am J Parasitol.* 1967;7:293–297.
- Tendler M, Pinto RM, Oliveira LA, Gelara G, Katz N. *Schistosoma mansoni* vaccination with adults' worm antigens. *Int J Parasitol.* 1986;16:352–374.
- Cheever AW. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bull World Health Organ.* 1968;39:328–331.
- Gornall AG, Bradwill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem.* 1949;77:167–182.
- Reitman S, Frankel S. A colorimetric determination of serum glutamic transaminase. *Am J Clin Pathol.* 1957;28:56–63.
- Tietz NM, Rinker AD, Shaw LM. IFCC method for alkaline phosphatase. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1983;21:731–748.
- Wilbur KM, Bernhein F, Shapiro OW. Determination of lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 1949;24:3959–3964.
- Sinha KA. Colorimetric assay of catalase. *Anal Biochem.* 1972;47:389–394.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82:70–77.
- Assis AMO, Barreto ML, Prado MS, Reis MG, Parraga IM, Blanton RE. *Schistosoma mansoni* infection and nutritional status in schoolchildren: a randomized, double-blind trial in northeastern Brazil. *Am J Clin Nutr.* 1998;68:1247–1253.
- Wilson S, Vennervald BJ, Dunne DW. Chronic hepatosplenomegaly in African school children: a common but neglected morbidity associated with

- schistosomiasis and malaria. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5:e1149.
36. Hamed MA. Potency of detergents in enhancing *Schistosoma mansoni* tegumental antigen. *J Infect Dev Ctries*. 2011;5:209–215.
  37. Mwatha JK, Kimani G, Kamau T, et al. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *J Immunol*. 1998;160:1992–1999.
  38. Wang W, Liang Y. Mass drug administration (MDA) for schistosomiasis. *J Infect Dis*. 2014;1–2.
  39. Miranda MA, Magalhães LG, Tioosi RFJ, et al. Evaluation of the schistosomicidal activity of the steroidal alkaloids from *Solanum lycocarpum* fruits. *Parasitol Res*. 2012;111:257–262.
  40. Kadry SM, Mohamed AM, Farrag EM, Fayed DB. Influence of some micro-nutrients and *Citharexylum quadrangular* extract against liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2013;7:2628–2638.
  41. Wilson K, Manasa V, Vijusha M, Suthakaran R. Hepatoprotective activity of methanolic extract of leaves of *Rostellularia procumbens* by using ethanol induced model in rats. *Asian J Pharm Clin Res*. 2015;8:263–265.
  42. Thapa BR, Walia A. Liver function tests and their interpretation. *Indian J Pediatr*. 2007;74:663–671.
  43. Wasilewski MM, Lim KC, Phillips J, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation *in vitro* and decrease worm burden and egg production *in vivo*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;81:179–189.
  44. Allan LA, Kutima HL, Muya S, Ayonga D, Yole D. The efficacy of a herbal drug, schitozim over praziquantel in the management of *Schistosoma mansoni* infection in BALB/c mice. *J Biol Agric Health*. 2014;4:77–87.
  45. Harvie M, Jordan TW, La Flamme AC. Differential liver protein expression during schistosomiasis. *Infect Immun*. 2007;75:736–744.
  46. Dkhil MA. Role of berberine in ameliorating *Schistosoma mansoni*-induced hepatic injury in mice. *Biol Res*. 2014;47:8–14.
  47. Souto AL, Tavares JF, da Silva MS, Diniz MFFM, de Athayde-Filho PF, Filho JMB. Anti-inflammatory activity of alkaloids: an update from 2000 to 2010. *Molecules*. 2011;16:8515–8534.
  48. Barbosa AP. An overview of the biological and pharmacological activities of saponins. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014;6:47–50.
  49. Syed SG, Mohib K, Tabassum R. Anti-inflammatory activity of *Ficus dalhousiae* Miq roots ethanolic extract in wistar albino rats. *Asian J Pharm Clin Res*. 2015;8:117–119.
  50. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001;6835:342–348.
  51. Madrigal-Santillán E, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, et al. Review of natural products with hepatoprotective effects. *World J Gastroenterol*. 2014;20:14787–14804.
  52. Firdous Koneri R, Haldar P, Burdipad G. Evaluation of hepatoprotective activity of saponin of *Momordica dioica* Roxb. against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Pharmacologyonline*. 2008;3:487–494.
  53. Gao J, Tang X, Dou H, Fan Y, Zhao X, Xu Q. Hepatoprotective activity of *Terminalia catappa* L. leaves and its two triterpenoids. *J Pharm Pharmacol*. 2004;56:1449–1455.
  54. Gharib B, Abdallahi OMS, Dessein H, De Reggi M. Development of eosinophil peroxidase activity and concomitant alteration of the antioxidant defenses in the liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J Hepatol*. 1999;30:594–602.
  55. Rizk M, Fayed TA, Badawy M, Sabaa el-Regal N. Effects of different durations of *Schistosoma mansoni* infection on the level of antioxidants in mice. *Med J Islam World Acad Sci*. 2006;16:25–34.
  56. El-Rigal N, Metwally MN, Mohamed MA, Mohamed ZN, Rizk ZM. Protection against oxidative damage induced by *Schistosoma mansoni* using susceptible/resistant nucleoproteins from *Biomphalaria alexandrina* snails. *Asian J Biol Sci*. 2011;4:445–456.
  57. El Sammak MY, Al-Sharkaweey RM, Ragab MS, Amin A, Kandil MH. IL-4 and reactive oxygen species are elevated in Egyptian patients affected with schistosomal liver disease. *Parasite Immunol*. 2008;30:603–609.
  58. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des*. 2004;10:1677–1694.
  59. Elekofehinti OO, Adanlawo LG, Komolafe K, Ejelonu OC. Saponins from *Solanum anguivi* fruits exhibit antioxidant potential in Wistar rats. *Ann Biol Res*. 2012;3:3212–3217.
  60. Wu H, Tang S, Huang Z, Zhou Q, Zhang P, Chen Z. Hepatoprotective effects and mechanisms of action of triterpenoids from Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) on  $\alpha$ -amanitin-induced liver injury in mice. *Int J Med Mushrooms*. 2016;18:841–850.



## Evaluation of the schistosomicidal, antioxidant and anti-inflammatory activities of the ethyl acetate fraction from *Ozoroa pulcherrima* Schweinf. Roots on *Schistosoma mansoni*-induced liver pathology in mice and its phytochemical characterization

Hermine Boukeng Jatsa<sup>a,d,\*</sup>, Nestor Gipwe Feussom<sup>a,d</sup>, Ulrich Membe Femoe<sup>a,d</sup>,  
Mérime Christian Kenfack<sup>a,d</sup>, Emilienne Tienga Nkondo<sup>a,d</sup>, Joseph Bertin Kadji Fassi<sup>a,d</sup>,  
Nadège Distele Simo<sup>a,d</sup>, Cyriaque Moaboulou<sup>a,d</sup>, Calvin Noumedem Dongmo<sup>c,d</sup>,  
Christelle Dongmo Tsague<sup>b</sup>, Etienne Dongo<sup>b</sup>, Pierre Kamtchouing<sup>a</sup>,  
Louis-Albert Tchuem Tchuente<sup>c,d</sup>

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

<sup>b</sup> Laboratory of Phytochemistry, Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

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

<sup>d</sup> Centre for Schistosomiasis and Parasitology, P.O. Box 7244, Yaoundé, Cameroon

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Ozoroa pulcherrima* Schweinf.  
Liver function  
Granulomas  
Oxidative stress  
*Schistosoma mansoni*  
Chemical constituents

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Ozoroa pulcherrima* Schweinf. (syn.: *Heeria pulcherrima* Schweinf.) is a small shrub belonging to the family Anacardiaceae. In Africa, the stem and the leaves are used to treat dystocia, hyperthermia, and conjunctivitis, while the root is used to treat dysmenorrhea and intestinal helminthiasis.

**Aim of the study:** The aim of this study was to assess the schistosomicidal, antioxidant and anti-inflammatory effects of the ethyl acetate fraction from *O. pulcherrima* roots methanolic extract (EAO) on *S. mansoni*-induced liver pathology in mice. Additionally, its phytochemical composition was elucidated.

**Material and methods:** The phytochemical characterization of EAO was carried out by High-Performance Liquid Chromatography-Mass spectrometry (HPLC-MS). Total phenolic and flavonoid contents were also quantified in the fraction. *S. mansoni*-infected mice received daily and *per os*, for 28 days, EAO at 200 or 400 mg/kg, starting from the 36<sup>th</sup> day post-infection. Praziquantel was used as reference drug. Uninfected-untreated, uninfected-treated and infected-untreated mice served as controls. At the 65<sup>th</sup> day post-infection mice were sacrificed and parasitological burden monitored. Transaminases, total bilirubin, and total proteins levels were determined in the plasma. Malondialdehyde (MDA), nitrites, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and reduced glutathione (GSH) levels were measured in the liver as biomarkers of the oxidative stress. Liver histology and morphometric analysis of granulomas were also conducted.

**Results:** The HPLC-MS analysis data of EAO revealed the presence of four triterpenes namely oleaterminaloic acid, hydroxyoleanoic acid, moronic acid, and oleanolic acid; a flavonoid dipentoxibenzoic acid and two alkaloids. Its total phenolic content was  $76.46 \pm 0.01$  mg GAE/g and total flavonoid content  $6.26 \pm 0.31$  mg rutin equivalent/g. The reductions of worm burden (48.89 and 75.56%), fecal egg count (77.76 and 69.52%) and egg load in the liver (65.33 and 77.18%) and intestine (78.06 and 84.63%) were significant after EAO treatment. EAO at all doses significantly ( $p < 0.001$ ) reversed the increasing transaminases activities and total bilirubin level induced by the infection. A normalization of total proteins concentration was also recorded. Treatment of *S. mansoni*-infected mice with EAO at 200 or 400 mg/kg resulted in a significant reduction ( $p < 0.001$ ) of MDA concentration by 73.20% and 67.78% respectively. The level of nitrites which was reduced by the infection significantly increased after the treatment. EAO significantly increased by 4.67 and 5.69-fold

\* Corresponding author. Laboratory of Animal Physiology, Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon.

E-mail addresses: [mjatsa@yahoo.fr](mailto:mjatsa@yahoo.fr) (H.B. Jatsa), [feussomnesta@yahoo.fr](mailto:feussomnesta@yahoo.fr) (N.G. Feussom), [ulrichfemoe10@gmail.com](mailto:ulrichfemoe10@gmail.com) (U.M. Femoe), [chrimerime@yahoo.fr](mailto:chrimerime@yahoo.fr) (M.C. Kenfack), [tiengemilie@yahoo.fr](mailto:tiengemilie@yahoo.fr) (E.T. Nkondo), [fassi.joseph@yahoo.fr](mailto:fassi.joseph@yahoo.fr) (J.B. Kadji Fassi), [simosidina88@yahoo.fr](mailto:simosidina88@yahoo.fr) (N.D. Simo), [cyriaque.moaboulou@yahoo.fr](mailto:cyriaque.moaboulou@yahoo.fr) (C. Moaboulou), [dongmonoumec@yahoo.fr](mailto:dongmonoumec@yahoo.fr) (C.N. Dongmo), [tdchristelle@yahoo.fr](mailto:tdchristelle@yahoo.fr) (C.D. Tsague), [dongoet@yahoo.fr](mailto:dongoet@yahoo.fr) (E. Dongo), [pikam55@yahoo.fr](mailto:pikam55@yahoo.fr) (P. Kamtchouing), [tchuemtchuente@schisto.com](mailto:tchuemtchuente@schisto.com) (L.-A. Tchuem Tchuente).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111883>

Received 21 January 2019; Received in revised form 9 April 2019; Accepted 11 April 2019

Available online 15 April 2019

0378-8741/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

the CAT activity and by 126.67% the GSH level. Histologically, a significant reduction of the number (66.39 and 57.82%) and the volume (52.25 and 34.81%) of liver inflammatory granulomas was recorded after EAOp treatment at all doses.

**Conclusions:** These results suggest that the liver pathology in *S. mansoni* infection is improved by EAOp which disclosed good schistosomicidal, antioxidant and anti-inflammatory activities. Its effects on the liver dysfunction and the hepatic oxidative stress were comparable to that of praziquantel. These findings justified the traditional use of *O. pulcherrima* for the treatment of intestinal helminthiasis. This fraction can be considered as a promising source for schistosomicidal agents.

## 1. Introduction

Human schistosomiasis remains a major public health problem and is considered after malaria as the most prevalent and debilitating neglected diseases in tropics and subtropics. It is associated with severe morbidity and mortality (Steinmann et al., 2006). The majority of schistosomiasis in humans is caused by blood flukes of three different species: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, and *Schistosoma japonicum*. In Latin America, Africa, and Asia, *Schistosoma* infection is one of the most important causes of noncirrhotic portal hypertension (Cavalcanti et al., 2015). In *S. mansoni* infection, parasite eggs from adult worms penetrate the mucosa of the intestine, pass through the mucosa into the lumen and could be released into the environment with host feces. However, more than 50% of the eggs are trapped in the perisinusoidal spaces of the liver, thus causing periportal granulomatous inflammation (Chen et Mott, 1988). Granulomas are formed of eosinophils, neutrophils, lymphocytes, macrophages, giant cells, and fibroblasts surrounding schistosome eggs trapped in the liver (Lenzi, 1998). In the acute phase of *S. mansoni* infection, a predominantly hypercellular nonfibrotic granuloma response produces liver dysfunction. At this stage, enlargement of the liver is clinically detectable. The chronic phase of the disease is characterized by liver fibrosis and portal hypertension marked by splenomegaly (Cavalcanti et al., 2015). The *S. mansoni*-induced granulomatous reaction is associated with the generation of reactive free radicals and the reduction of endogenous antioxidants levels (El-Rigal et al., 2011; Rizk et al., 2012; Dkhil, 2014; Dkil et al., 2015, 2016; Jatsa et al., 2015, 2016; 2018a; Al-Olayan et al., 2016; Hassan et al., 2016). Current treatment of schistosomiasis relies on praziquantel, a low-cost anthelmintic that is effective against all human schistosome species. However, praziquantel is ineffective against schistosomules and does not prevent reinfection (Magnussen, 2003). In addition, available evidence indicates the appearance of praziquantel resistance by schistosomes (Melman et al., 2009). This reinforces the need to develop complementary and/or alternative new anthelmintic agents that are both effective and safe. Nowadays, many medicinal plants have shown to be effective against *S. mansoni* infection (Rizk et al., 2006, 2012; Mostafa et al., 2011; Jatsa et al., 2015, 2016; 2018a; Al-Olayan et al., 2016; Hassan et al., 2016). *Ozoroa pulcherrima* Schweinf (syn.: *Heeria pulcherrima* Schweinf), family Anacardiaceae, is a small shrub of about 1 m high. The leaves upper surface is puberulous while the underneath is covered with soft. Flowers are small and creamy white and mature fruits are black and stony. It is a sudano-zambezian species, widespread from Guinea to Cameroon, in the Central African Republic, in Ethiopia and in Sudan (Adjanohoun et al., 1996). In Benin, the stem and leaves are used to treat dystocia, hyperthermia, and conjunctivitis, while in Cameroon, the root is used to treat dysmenorrhea and intestinal helminthiasis (Adjanohoun et al., 1989, 1996). Pharmacological study on *O. pulcherrima* has revealed that essential oils of its aerial parts possess antiproliferative activity on breast cancer cells (Bogninou-Agbidinokoun et al., 2016). Three alkylnacardic acids: ozocardic A, ozocardic B and ozocardic C, have recently been isolated from the ethyl acetate fraction of *O. pulcherrima* roots methanol-dichloromethane extract (Tsague et al., 2011a, 2011b). Ozoramide, a new ceramide was also isolated from an *n*-hexane-ethyl acetate fraction from *O. pulcherrima* stem bark methanolic extract

(Tsague et al., 2017). Recently, our studies demonstrated that *O. pulcherrima* roots methanolic extract was effective against *S. mansoni*-induced liver injury in mice (Jatsa et al., 2018a). Moreover, a histological study of the liver of *S. mansoni*-infected mice treated with *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction shown a reduction of inflammatory cells infiltration and collagen deposition around eggs (Jatsa et al., 2018b). The present study was carried out to assess the effect of oral administration of the ethyl acetate fraction from *O. pulcherrima* roots methanolic extract on pathological changes in *S. mansoni*-infected mice. Additionally, the chemical profile of this fraction was elucidated.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material, extraction, and fractionation

*Ozoroa pulcherrima* roots were harvested in the month of July 2012 in the locality of Wakwa near Ngaoundéré in the Adamawa region of Cameroon. Botanical identification of a plant sample was performed at the "National Herbarium" of Yaoundé, Cameroon. A voucher specimen of the plant was preserved in the "National Herbarium" under the reference 13667/SRF/Cam.

*O. pulcherrima* roots were thoroughly washed with water and cut into pieces. They were air dried under shade to a constant weight. Dried roots were grinded to a coarse powder and then stored in an air-tight container at room temperature until the time of usage. The powder (4130 g) was submitted to maceration in methanol during 48 h. After filtration, the resulting filtrate was concentrated under reduced pressure and dried to give 138.12 g of *O. pulcherrima* roots methanolic extract. The yield was 3.34% w/w. This extract was then solvent partitioned into *n*-hexane and ethyl acetate. The resulting fractions were separately concentrated under reduced pressure and dried. This process allowed obtaining 38.23 g of *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction (EAOp).

### 2.2. Drugs and reagents

Praziquantel (Cesol<sup>®</sup>) was supplied by Merck S.A., Mexico, Mexico. Total bilirubin was purchased from Innesco, Wied, Germany. Transaminases kits were procured from Quibasa Quimica Basica Ltda, Belo Horizonte, Brasil. The following were products of Sigma-Aldrich, St Louis, USA: Ellman's reagent, serum albumin bovine (SAB), trichloroacetic acid (TCA), thiobarbituric acid (TBA), phosphoric acid, Potassium dichromate, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), adrenaline, naphthylethyl diamine, sulfanilamide, glacial acetic acid, potassium hydroxide (KOH), sodium citrate, sodium chloride (NaCl) and dimethyl sulfoxide (DMSO) as well as copper sulfate, monohydrate and pentahydrate sodium phosphate dibasic. Hematoxylin and eosin Y with 75290 and 45380 as color index respectively were also provided from Sigma-Aldrich. Methanol, acetonitrile and Na Formate were of HPLC grade and purchased at Sigma-Aldrich.

### 2.3. Phytochemical analysis of the ethyl acetate fraction of *Ozoroa pulcherrima*

#### 2.3.1. Preliminary phytochemical analysis

A qualitative chemical test of the ethyl acetate fraction from *O. pulcherrima* roots methanolic extract was conducted to determine groups of chemical constituents in the fraction. The screening was performed for the identification of alkaloids, phenols, condensed and hydrolyzable tannins, flavonoids, saponins, terpenoids, anthraquinones, cardiac glycosides, reducing sugars, lipids, steroids, and triterpenes (Trease and Evans, 1983).

#### 2.3.2. HPLC-MS analysis

**2.3.2.1. Sample preparation.** EAOp was dissolved in HPLC grade methanol at a concentration of 5 mg/mL and then filtrated through a syringe-filter-membrane. Aliquots of 5 µL were injected into the LC-DAD/MS Dionex Ultimate 3000 HPLC (Germany).

**2.3.2.2. HPLC-MS conditions.** High-resolution mass spectra were obtained with a quadrupole-time-of-flight (QTOF) Spectrometer (Bruker, Germany) equipped with a HESI source. The spectrometer was operated in positive mode (mass range: 100–1500, with a scan rate of 1.00 Hz) with automatic gain control to provide high-accuracy mass measurements within 0.40 ppm deviation using Na formate as calibrant. The following parameters were used for experiments: spray voltage of 4.5 kV, capillary temperature of 200 °C. Nitrogen was used as sheath gas (10 L/min). The spectrometer was attached to an Ultimate 3000 UHPLC system (Thermo Fisher, USA) consisting of LC-pump, Diode Array Detector (DAD) (λ: 190–600 nm), autosampler (injection volume 10 µL) and a column oven (40 °C). The separations were performed using a Synergi MAX-RP 100A (50 × 2 mm, 2.5µ particle size) with a H<sub>2</sub>O (+0.1% HCOOH) (A)/acetonitrile (+0.1% HCOOH) (B) gradient (flow rate 500 µL/min, injection volume 5 µL). Samples were analyzed using a gradient program as follows: 95% A isocratic for 1.5 min, linear gradient to 100% B over 6 min, after 100% B isocratic for 2 min, the system returned to its initial condition (90% A) within 1 min and was equilibrated for 1 min.

**2.3.2.3. Identification of peaks.** Identification of all constituents was performed by HPLC-MS analysis and by comparing the UV and MS spectra and MS/MS fragmentation of the peaks in the samples with those of data reported in the literature of the SciFinder database.

#### 2.3.3. Determination of the total phenolic and flavonoid contents

The Folin-Ciocalteu's method described by Mansouri et al. (2005) was used for the determination of the total phenolic content of *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction. Total phenolic content was calculated from the calibration curve of gallic acid serial dilutions and expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per g of dried extract. The spectrophotometric method described by Pal et al. (2012) was used for the determination of total flavonoid content estimated by using a calibration curve of rutin and expressed as mg rutin equivalents per g of dried extract.

### 2.4. Mice and infection

Two months old BALB/c mice from the animal house of the “Centre for Schistosomiasis and Parasitology” of Yaoundé-Cameroon, weighing 23–29 g were used in this study. They were housed in polypropylene cages with free access to food and water and maintained under natural 12 h light/12 h dark cycles and temperature between 22 and 25 °C. Mice were individually infected with 50 cercariae of *S. mansoni* (Cameroonian strain) using the method of tail and legs immersion as previously described (Jatsa et al., 2015). Cercariae were released from *Biomphalaria pfeifferi* snails, collected from the river “Afeme” (Yaoundé, Cameroon) and maintained in the laboratory under standardized

conditions.

All procedures performed on mice were approved by the Animal Ethical Committee of the Laboratory of Animal Physiology of the Faculty of Sciences, University of Yaoundé I – Cameroon and were conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC).

### 2.5. Experimental design

Twenty-four *S. mansoni*-infected mice were randomly divided into 4 groups of 6 mice each. Treatment by the oral route started at the 36<sup>th</sup> day post-infection for a duration of 28 days was conducted. Infected untreated mice (IC group) received 1% of dimethyl sulfoxide (DMSO) (vehicle). Mice of the positive control group (PZQ group) received praziquantel dissolved in distilled water at the dose of 500 mg/kg (100 mg/kg/day for 5 days, followed by distilled water for 23 days). Others infected mice were treated with the ethyl acetate fraction of *O. pulcherrima* roots respectively at the doses of 200 (EAOp 200 group) and 400 mg/kg (EAOp 400 group). The doses of the fraction and the duration of treatment were selected on the basis of traditional healers' prescription and on the basis of our previous studies (Adjanohoun et al., 1999; Jatsa et al., 2015, 2016, 2018a). In addition, uninfected mice (NIC group, n = 6) receiving the vehicle (1% DMSO) only and uninfected mice receiving *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction at 400 mg/kg (NIC 400 group, n = 6) were used. On 65<sup>th</sup> day post-infection, animals were sacrificed by cervical dislocation for the recovery of worms and different organs.

### 2.6. Measurement of the body and organs weights

During the course of the experiment, each mouse was weighed once a week in order to assess the body weight variation between pre-infection /pre-treatment and post-infection /post-treatment. The percentage of the body weight variation was calculated as follows:

$$P = [(W_e - W_i) / W_e] \times 100$$

Where P = percentage of weight variation; W<sub>e</sub> = body weight at post-infection /post-treatment; W<sub>i</sub> = body weight at pre-infection /pre-treatment.

After sacrifice, liver and intestine were removed from each mouse, weighed and their relative weights (g of organ /100 g of body weight) calculated.

### 2.7. Harvesting of adult worms from the portal system

To assess parasite burden, the circulatory system of each infected mouse was perfused after 65 days of *S. mansoni* infection, as described previously by Duwall and Dewitt (1967). Recovered worms from each infected mouse were counted under a stereo-microscope. The percentage of reduction of worm number was calculated as follows:

$$P = [(C - V) / C] \times 100$$

Where P = percentage of reduction; C = mean number of worms recovered from infected-untreated mice; V = mean number of worms recovered from infected-treated mice.

### 2.8. Eggs count in the feces, the liver, and the intestine

Feces from each infected mouse was collected the day before the sacrifice and weighed. After homogenization in 10% buffered formaldehyde, the mixture was stored at 4 °C. Two aliquots of 100 µL each were counted on a light microscope. After sacrifice, the left lobe of the liver and the intestine were removed, weighed and digested separately in 4% KOH as described in our previous study (Jatsa et al., 2015). The

number of eggs in each sample was determined in two aliquots of 100  $\mu$ L each using light microscope. Results were expressed in terms of a mean number of eggs per gram of feces or per gram of tissue for the liver and the intestine.

### 2.9. Evaluation of some liver function biomarkers

The day of sacrifice, blood from each mouse was collected from the retro-orbital venous plexus in EDTA tube and centrifuged at 3500 rpm for 15 min. The plasma obtained was stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  and used for the measurement of some parameters of the liver function in view of

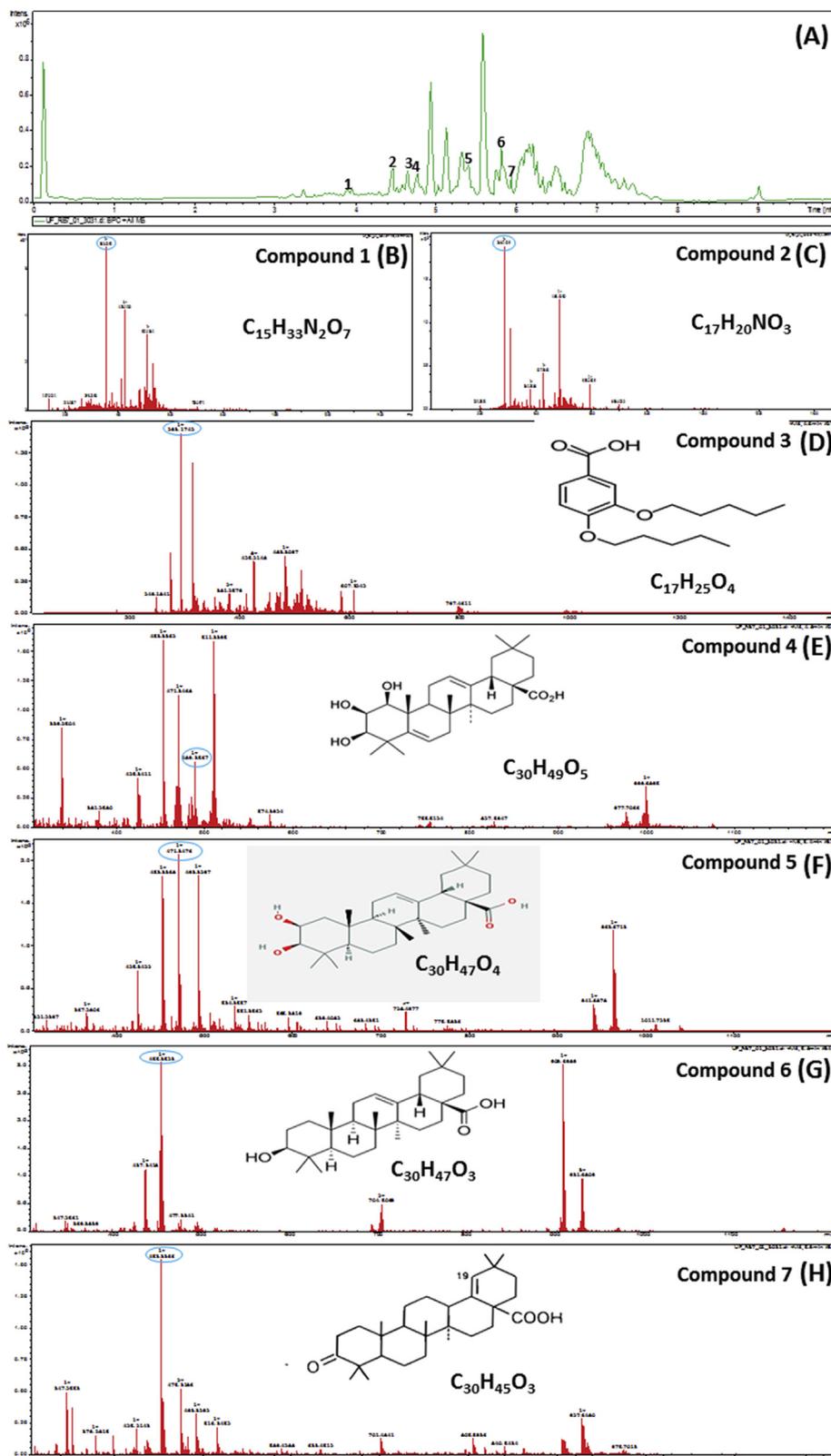


Fig. 1. HPLC-MS profile of *Ozorora pulcherrima* ethyl acetate fraction (A), mass spectra and putative structures of identified compounds (B – H).

evaluating the impact of the treatment with *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction on the liver function of *S. mansoni*-infected mice. Total proteins level was determined using the method of Biuret. The amount of protein was calculated from a standard curve using serial concentration of bovine serum albumin. Activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were assessed by using Bioclin kits (Belo Horizonte, Brasil) and according to the method described by Reitman and Frankel (1957). Total bilirubin was assayed according to the protocol described in the Inmesco kit (Wied, Germany). The red color developed after the reaction of bilirubin with sulfanilic acid was read at 546 nm against a blank.

### 2.10. Evaluation of some oxidative stress biomarkers

The effect of *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction treatment on *S. mansoni*-infected mice was evaluated on the hepatic oxidative stress. After sacrifice, 0.4 g of the right lobe of the liver was then homogenized in 2 mL of a Tris-HCl 50 mmol buffer, pH 7.4. The homogenate (20% w/v) was centrifuged at 3000 rpm for 25 min at 4 °C and the supernatant collected and stored at -70 °C until assayed.

Lipid peroxides were measured as thiobarbituric acid reactive substances. The product of the reaction between malondialdehyde and thiobarbituric acid was estimated as described by Wilbur et al. (1949). The concentration of MDA was calculated using a molar extinction coefficient of  $1.56 \times 10^{-5} \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  and results expressed as nmol/g of liver. Nitrites concentration was determined using the Griess reagent (1% N-1-naphthylethylene diamine + 1% sulfanilamide in 2.5% phosphoric acid) as described by Hibbs et al. (1988). The level of nitrites was calculated from a standard curve using serial concentration of sodium nitrite (1 mM) and expressed as  $\mu\text{mol/g}$  of liver.

Superoxide dismutase (SOD) activity was estimated according to the protocol described by Misra et Fridovich (1972). The enzyme activity was expressed as SOD units/g of liver and one unit of SOD is defined as the enzyme activity that inhibits by 50% the oxidation of adrenaline to adrenochrome. Reduced glutathione (GSH) was assayed following the method described by Ellman (1959) with the Ellman reagent (5 mg of 2, 2-dithio-5, 5-nitrobenzoic acid + 250 mL phosphate buffer). Catalase activity was assayed following the protocol described by Sinha (1972). The activity was determined from a standard curve and expressed as mol/min/g of liver. The concentration of GSH was calculated using a molar extinction coefficient of  $13600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  and results expressed as mmol/g of liver.

### 2.11. Histology of the liver and morphometric analysis of the liver inflammatory granulomas

The right lobe of the liver of each animal was immersed in 10% formaldehyde prepared in phosphate-buffered saline (PBS). After dehydration in successive baths of ethanol (50 °C - 100 °C) and xylene, tissue samples were paraffin embedded. Five micrometer thick sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for a qualitative analysis of the liver and for the evaluation of the inflammatory granulomatous reaction.

For the quantitative measurement of the liver granulomas induced by *S. mansoni* infection in all experimental groups, images were captured with an X10 objective at an X10 ocular magnification with a digital camera (DCM35; Scopotek®, China) and analyzed with ImageJ 1.32 software. All granulomas containing a single central egg with miracidia were selected for each mouse. Granulomas in which it was possible to observe more than one egg or granulomas in which the egg was not visible or destroyed were excluded from the analysis. The number of granulomas, as well as their volume, were determined. All granulomas per mouse were measured: the largest diameter and the diameter perpendicular to it were averaged. The volume of each granuloma was calculated assuming a spherical shape using the following formula: Volume of sphere =  $4/3 \pi R^3$  (the radius R was

obtained by dividing the main diameter of the lesion by two). The mean granuloma volume for each group was calculated (Allam, 2009; Souza et al., 2011).

### 2.12. Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows, by one-way analysis of variance (ANOVA) and differences between groups were assessed using the Newman-Keuls multiple comparison post-test. Student *t*-test was used to compare within a group, the body weight before and after treatment. Differences were considered significant from  $P < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Chemical constituents of *Ozoroa pulcherrima* ethyl acetate fraction

Qualitative phytochemical analysis of *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction (EAOp) revealed the presence of phenols, flavonoids, terpenoids, condensed and hydrolyzable tannins, triterpenes, saponins, reducing sugars, cardiac glycosides, lipids, and proteins. These groups of chemical compounds were also present in *O. pulcherrima* methanolic extract (Jatsa et al., 2018a).

Mass spectrometry is the most selective technique for the qualitative characterization and identification of compounds from natural extracts (Saltarelli et al., 2018). HPLC-MS was then used to determine the chemical profile of *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction (EAOp). This method confirmed the presence of triterpenes and flavonoids in the fraction. The HPLC-MS chromatogram recorded for EAOp was composed by peaks of chemical compounds, with retention times below 10 min (Fig. 1A). The combination of the MS spectral data and the information from the literature allows tentative identification of seven compounds (numbered 1 to 7 on the chromatogram). The peak eluted at 3.9 min (compound 1), corresponding to the molecular ion  $[M + H]^+$  + detected at  $m/z$  353 was credited to an alkaloid with a molecular mass of 353.23 (Fig. 1B). Compound 2 appears at RT 4.5 min and produced the molecular ion  $[M + H]^+$  + detected at  $m/z$  286. According to the obtained data, it was possible to infer the molecular mass of 286.14 for compound 2 (Fig. 1C). Compound 3 was observed at RT 4.6 min with a molecular ion  $[M + H]^+$  + detected at  $m/z$  293 and was identified as dipentoxybenzoic acid, a flavonoid (Fig. 1D). Compound 4 appears at RT 4.8 min with a molecular ion  $[M + H]^+$  + detected at  $m/z$  489 and was identified as oleaterminaloic acid (Fig. 1E). Compound 5 (RT 5.4 min) showed a molecular ion  $[M + H]^+$  + at  $m/z$  471 and was identified as hydroxyoleanolic acid (Fig. 1F). Compound 6 showed an RT at 5.8 min and  $[M + H]^+$  + at  $m/z$  455 and was identified as oleanolic acid (Fig. 1G). The peak eluted at 5.9 min represented compound 7 with a molecular ion  $[M + H]^+$  + detected at  $m/z$  453 and was identified as moronic acid (Fig. 1H). Compounds 4, 5, 6 and 7 are triterpenes. Excepted moronic acid which was isolated from the root bark of *Ozoroa mucronata* Bernh. (Hostettmann-Kaldas and Nakanishi, 1979), none of these compounds has been previously identified from plants of the genus *Ozoroa*. It is the first time, dipentoxybenzoic acid, oleaterminaloic acid, hydroxyoleanolic acid, oleanolic acid, and moronic acid were identified in *O. pulcherrima*.

The quantification of phenols and flavonoids in EAOp was as follows: total phenolic content was  $76.46 \pm 0.01$  mg gallic acid equivalent/g of dried extract ( $r^2 = 0.9994$ ) and total flavonoid content was  $6.26 \pm 0.31$  mg rutin equivalent/g of dried extract ( $r^2 = 0.9959$ ). Total phenolic and flavonoid contents of the ethyl acetate fraction from *O. pulcherrima* methanolic extract were comparable to those of the methanolic extract (Jatsa et al., 2018a). The substantial concentration of EAOp total phenolic content could predict for a good antioxidant property of this fraction. Shah et al. (2013) have in fact established a positive correlation between the total phenolic content of an extract and its antioxidant activity.

### 3.2. Body weight

In order to investigate the effect of *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction treatment on the body weight gain of both normal and *S. mansoni*-infected mice, body weight was measured before the infection or treatment and after the infection period or 28 days of treatment. The day of sacrifice, one mouse in group EAOp 400 died during blood collection from the retro-orbital venous plexus. At the end of the experiment, significant body weight gain was recorded in uninfected-untreated mice of group NIC ( $p < 0.001$ ), uninfected-treated mice with 400 mg/kg EAOp of group NIC 400 ( $p < 0.01$ ), as well as in infected-treated mice of groups PZQ ( $p < 0.001$ ), EAOp 200 ( $p < 0.01$ ) and EAOp 400 ( $p < 0.001$ ). Conversely, in infected-untreated mice, the body weight considerably decreased at post-infection comparatively to pre-infection ( $p < 0.05$ ). Moreover, at post-infection, the body weight of infected-untreated mice (IC) was significantly reduced than the one of uninfected-untreated mice (NIC) ( $p < 0.001$ ). (Table 1). These results are in accordance with the findings of Rizk et al. (2006) on *S. mansoni*-infected mice where considerable body weight loss was recorded. It is also in line with the conclusion of Assis et al. (1998) about the association between *S. mansoni* infection and growth retardation among children in endemic areas in Brazil. As shown in Table 1, the body weight gain of NIC mice was comparable to that of NIC 400 mice, attesting that *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction is without effect on the mice body weight variation. The body weight gain of infected-treated mice with PZQ or EAOp (200 or 400 mg/kg) was significantly different to the decreased body weight of infected-untreated mice (IC) ( $p < 0.001$ ). Treatment with praziquantel or *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction thus improved the growth of *S. mansoni*-infected mice. A similar result was also recorded with the methanolic extract of the plant (Jatsa et al., 2018a). These data coincide with the data of other authors who found that curcumin, *Melaleuca armillaris* Sol. ex. Gaertn. essential oil or *Clerodendrum umbellatum* Poir. Methanolic fraction improves the body weight of *S. mansoni*-infected mice (Rizk et al., 2006; Allam, 2009; Jatsa et al., 2015).

### 3.3. Relative organs weights

The body weight loss of *S. mansoni*-infected and untreated mice (IC) was accompanied by significant increase in the liver, spleen and intestine relative weights by 83.50%, 378.26%, and 198.69% respectively ( $p < 0.001$ ) (Table 2). Epidemiological studies conducted in *S. mansoni*-endemic areas in Africa have revealed that *S. mansoni* infection is commonly associated with chronic hepatosplenomegaly (Vennervald et al., 2004; Wilson et al., 2011). During its life cycle, less than 40% of the eggs deposited in the intestinal wall by *S. mansoni* are able to pass to the gut lumen to be expelled in the feces. The majority will remain in

the intestine wall or travel to the liver and trigger immune-mediated granuloma formation (Lenzi et al., 2008). The enlargement of the liver, the spleen and the intestine may be attributed to both egg deposition by worms and several metabolites released by *S. mansoni* which affect the host tissues (Hamed, 2011). It has been also stipulated that spleen enlargement could be due to passive congestion of blood flow and reticuloendothelial hyperplasia and/or the increase in its matrix components, especially type IV collagen (Hamed, 2011; Wilson et al., 2011). Furthermore, hepatosplenomegaly which is associated with high levels of inflammatory cytokines TNF and IFN $\gamma$  has a detrimental effect on the growth of children since the production of those cytokines adversely affects the production of the growth hormone IGF-1 by the liver (Mwatha et al., 1998; Wilson et al., 2011). This is an explanation of the growth retardation of *S. mansoni*-infected mice. During a 3-year follow-up period, significant regression of hepatosplenomegaly had occurred after treatment of school-aged children from Kambu in Kenya, or the population around the Poyang Lake region in China with praziquantel (Vennervald et al., 2005; Wang and Liang, 2014). Results from this study demonstrated a significant reduction of hepatomegaly by 49.04%, splenomegaly by 69.09% and intestine enlargement by 63.71% after praziquantel administration to *S. mansoni*-infected mice. Also, treatment of *S. mansoni*-infected mice with *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction resulted in significant decrease of the liver relative weight by 18.09% ( $p < 0.05$ ) for mice of group EAOp 400 and of the intestine relative weight ( $p < 0.001$ ) by 43.85% (EAOp 200) and 47.10% (EAOp 400). This treatment failed to significantly reduce splenomegaly. Praziquantel was statistically more effective than EAOp in reducing liver, spleen and intestine enlargement. *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction has no significant effect on the liver, spleen and intestine relative weights of uninfected-treated mice (NIC 400) as compared to uninfected-untreated ones (NIC). (Table 2). Our results agree with those of some authors who shown regression of hepatosplenomegaly after treatment of *S. mansoni*-infected mice with *S. pilosa* Retz. Aqueous extract (Jatsa et al., 2009a), curcumin (Allam, 2009), *Melaleuca armillaris* Sol. ex. Gaertn. essential oil (Rizk et al., 2006) or *Clerodendrum umbellatum* Poir. Aqueous extract or methanolic fraction (Jatsa et al., 2009b, 2015). Hamed (2011) also demonstrated that vaccination of mice with the tegumental antigen of *S. mansoni* adult worms prior to infection prevent the liver and spleen relative weights increase. The reduction of hepatomegaly and intestine enlargement after praziquantel or *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction treatment could be the consequence of the reduction of schistosome eggs load in those organs.

### 3.4. Worm burden and egg load in the feces, the liver, and the intestine

The schistosomicidal effect of *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction

**Table 1**  
Effect of *Ozoroa pulcherrima* ethyl acetate fraction on the body weight of *Schistosoma mansoni*-infected mice.

| Groups   | Body weight (g)              |                                 | Body weight variation (%)                         |
|----------|------------------------------|---------------------------------|---|
|          | Pre-infection /pre-treatment | Post-infection /post-treatment  |   |
| NIC      | 26.88 $\pm$ 0.96             | 35.15 $\pm$ 1.06 <sup>SSS</sup> | +32.08 $\pm$ 7.97 (11.59 – 52.58)                 |
| NIC 400  | 22.41 $\pm$ 1.65             | 30.18 $\pm$ 1.00 <sup>SS</sup>  | +37.09 $\pm$ 7.07 (18.92 – 55.26)                 |
| IC       | 28.05 $\pm$ 1.34             | 23.88 $\pm$ 1.76 <sup>S</sup>   | -15.24 $\pm$ 2.66 (-22.63 – -7.84) <sup>***</sup> |
| PZQ      | 26.29 $\pm$ 0.55             | 34.70 $\pm$ 0.98 <sup>SSS</sup> | +31.95 $\pm$ 1.57 (27.91 – 35.99) <sup>###</sup>  |
| EAOp 200 | 24.17 $\pm$ 0.44             | 29.65 $\pm$ 1.45 <sup>SS</sup>  | +22.41 $\pm$ 4.24 (11.51 – 33.32) <sup>###</sup>  |
| EAOp 400 | 23.91 $\pm$ 0.46             | 30.20 $\pm$ 1.10 <sup>SSS</sup> | +26.65 $\pm$ 6.08 (9.78 – 43.53) <sup>###</sup>   |

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 5 for group EAOp 400 and n = 6 for others groups). NIC: uninfected mice; NIC 400: uninfected mice receiving *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction at 400 mg/kg; IC: infected-untreated mice; PZQ: infected mice treated with praziquantel; EAOp 200 and EAOp 400: infected mice treated with *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction at 200 and 400 mg/kg respectively.

Student *t*-test was used to compare values at pre-infection /pre-treatment and values at post-infection /post-treatment: <sup>S</sup> $p < 0.05$ ; <sup>SS</sup> $p < 0.01$ ; <sup>SSS</sup> $p < 0.001$ ; values are significantly different from those at pre-infection /pre-treatment. ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test was also used for statistical analysis. <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$ : values are significantly different from those of uninfected mice (group NIC). <sup>###</sup> $p < 0.001$ : values are significantly different from those of infected-untreated mice (group IC). Values in brackets represent the lower and upper 95% confidence intervals.

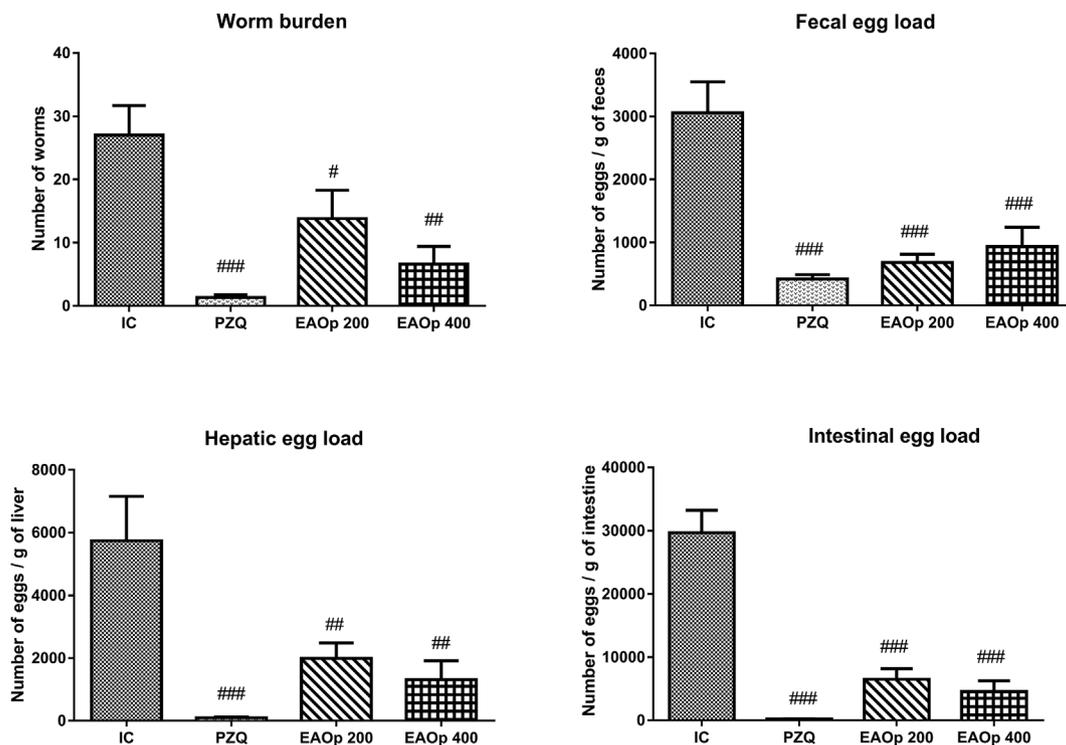
**Table 2**Effect of *Ozoroa pulcherrima* ethyl acetate fraction on the relative organs' weights of *Schistosoma mansoni*-infected mice.

| Groups   | Liver weight           |               | Spleen weight  |               | Intestine weight   |               |
|----------|------------------------|---------------|----------------|---------------|--------------------|---------------|
|          | (g/100 g BW)           | Variation (%) | (g/100 g BW)   | Variation (%) | (g/100 g BW)       | Variation (%) |
| NIC      | 5.09 ± 0.27            |               | 0.23 ± 0.02    |               | 3.81 ± 0.21        |               |
| NIC 400  | 6.67 ± 0.20            |               | 0.37 ± 0.02    |               | 4.49 ± 0.29        |               |
| IC       | 9.34 ± 0.54***         | +83.50        | 1.10 ± 0.18*** | +378.26       | 11.38 ± 0.73***    | +198.69       |
| PZQ      | 4.76 ± 0.10###         | -49.04        | 0.34 ± 0.04### | -69.09        | 4.13 ± 0.25###     | -63.71        |
| EAOp 200 | 9.01 ± 0.70***         | /             | 0.87 ± 0.15*** | /             | 6.39 ± 0.48###, EE | -43.85        |
| EAOp 400 | 7.65 ± 0.32***, #, EEE | -18.09        | 0.93 ± 0.09*** | /             | 6.02 ± 0.30###, E  | -47.10        |

Data are expressed as mean ± SEM (n = 5 for group EAOp 400 and n = 6 for others groups). NIC: uninfected mice; NIC 400: uninfected mice receiving *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction at 400 mg/kg; IC: infected-untreated mice; PZQ: infected mice treated with praziquantel; EAOp 200 and EAOp 400: infected mice treated with *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction at 200 and 400 mg/kg respectively. g/100 g BW: g of organ per 100 g of body weight (relative organ weight). ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test was also used for statistical analysis. \*\*\*p < 0.001: values are significantly different from those of uninfected mice (group NIC). ###p < 0.001: values are significantly different from those of infected-untreated mice (group IC). <sup>E</sup>p < 0.05; <sup>EE</sup>p < 0.01; <sup>EEE</sup>p < 0.001: values are significantly different from those of infected mice treated with praziquantel (group PZQ).

was evaluated on *S. mansoni*-infected mice treated daily with 200 or 400 mg/kg body weight for 28 days, started from 36<sup>th</sup> day post-infection. The number of worms recovered from infected-untreated mice (IC) was 27.00 ± 4.69 worms. Compared to the IC mice, EAOp treatment significantly reduced the worm burden by 48.89% (p < 0.05) at the dose of 200 mg/kg and 75.56% (p < 0.01) at the dose of 400 mg/kg. In addition, the number of eggs excreted in the feces was significantly (p < 0.001) reduced by 77.76 and 69.52% at 200 and 400 mg/kg of EAOp respectively. At these same doses, egg load was significantly reduced in the liver (p < 0.01) by 65.33 and 77.18%, and the intestine (p < 0.001) by 78.06 and 84.63% when compared to the IC mice. Praziquantel significantly (p < 0.001) decreased the worm count by 95.07% and the egg burden by 86.29% in the feces, 98.28% in the liver and 99.32% in the intestine. No significant difference was recorded between praziquantel and EAOp 200 as well as EAOp 400 in their

capacity to reduce the worm burden and egg load in the feces, the liver and the intestine (Fig. 2). Treatment of infected mice with the ethyl acetate fraction from *O. pulcherrima* methanolic extract produced comparable results to the treatment with the extract itself (Jatsa et al., 2018a). It appears from the results of this study that the reduction of worm burden is followed by the reduction of egg output in the feces and egg burden in tissues. Riad et al. (2009) have demonstrated a positive linear relationship between the egg output and the worm burden. Furthermore, the reduction of egg burden in tissues could justify the regression of liver and intestine enlargement after EAOp or PZQ treatment. These results demonstrated the efficacy of *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction against *S. mansoni* worms. A possible explanation of these findings may be a direct toxic effect of EAOp on *S. mansoni* worms or interference with their fecundity. According to Githiori et al. (2006), plants with antiparasitic activity usually contain alkaloids, tannins,



**Fig. 2.** Effect of *Ozoroa pulcherrima* ethyl acetate fraction on the worm burden and ova count in the faeces, the liver and the intestine of *Schistosoma mansoni*-infected mice. Data are expressed as mean ± SEM (n = 5 for group EAOp 400 and n = 6 for others groups). IC: infected-untreated mice; PZQ: infected mice treated with praziquantel; EAOp 200 and EAOp 400: infected mice treated with *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction at 200 and 400 mg/kg respectively. ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test was used for statistical analysis. #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001: values are significantly different from the infected-untreated mice (group IC).

polyphenols, terpenoids, saponins, terpenes, lactones, glycosides, and phenolic compounds. The presence in EAOp of phytochemicals with anthelmintic property like tannins (Hoste et al., 2015), flavonoids (Da Silva et al., 2008), phenols (Ndjonka et al., 2014), terpenoids, triterpenes (Githiori et al., 2006) and saponins (Wang et al., 2010a; Ali et al., 2011) can support its efficacy against *S. mansoni*.

### 3.5. Histoarchitecture of the liver and morphometry of the liver inflammatory granulomas

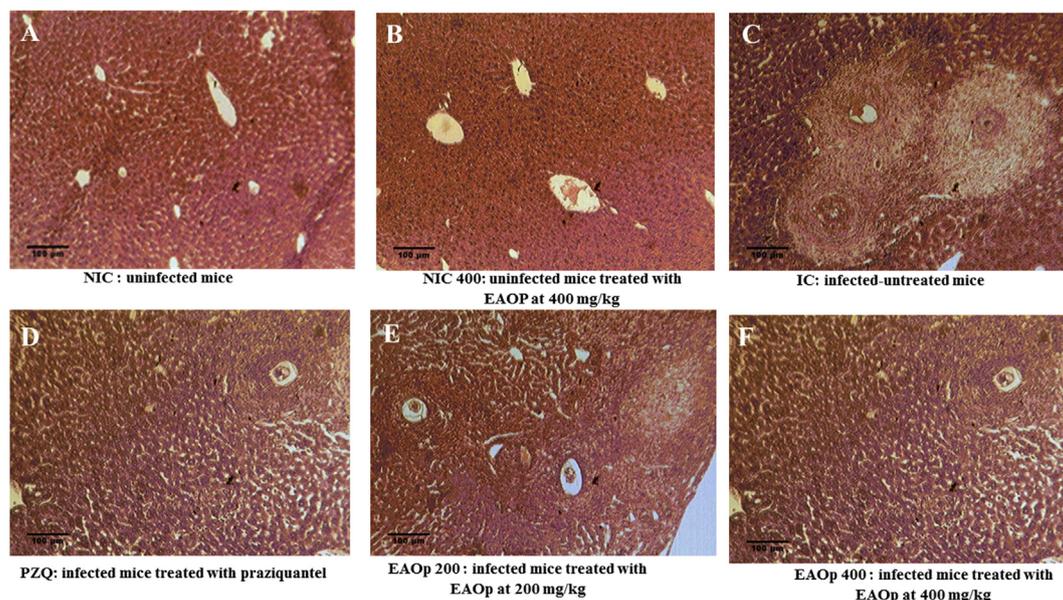
Eggs laid by *S. mansoni* adult worms stay in the liver and lead to severe syndrome including inflammation, granuloma, and tissue fibrosis (Lenzi et al., 2008). In order to investigate the effect of *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction on the liver histology and its inflammatory status, a qualitative analysis of liver sections was conducted and the number and volume of hepatic granulomas determined. Histological examination of H&E stained liver sections of uninfected-untreated mice (NIC) showed a normal portal triad and hepatic lobules formed of normal hepatocytes radiating from the central vein to the periphery of the lobule (Fig. 3A). A similar structure was also observed on the liver sections of uninfected-treated mice with *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction at 400 mg/kg (NIC 400) (Fig. 3B). This result demonstrated that EAOp did not produce a toxic effect on the liver parenchyma after 28 days of administration. The liver of *S. mansoni*-infected mice showed multiple granulomatous lesions composed of centrally localized embedded ova surrounded by laminated layers of condensed connective fibrous tissue associated with inflammatory cells at the periphery (Fig. 3C). Lenzi (1998) has described the granuloma as a dynamic and complex structure which consists of eosinophils, neutrophils, lymphocytes, macrophages, giant cells, and fibroblasts surrounding schistosome eggs trapped in the liver. Noticeable improvement of the liver parenchyma was observed in EAOp 200 and EAOp 400 mice with mononuclear and polymorphonuclear leucocytes around the egg and less condensed fibrous tissue (Fig. 3E and F). In the liver sections of PZQ mice, few inflammatory cells were noticed and the liver parenchyma seems to be normal (Fig. 3D).

As depicted in Fig. 4, EAOp administration significantly ( $p < 0.001$ ) decreased the granulomas number of EAOp 200 mice by 66.39% and of EAOp 400 mice by 57.82%, compared to the IC mice.

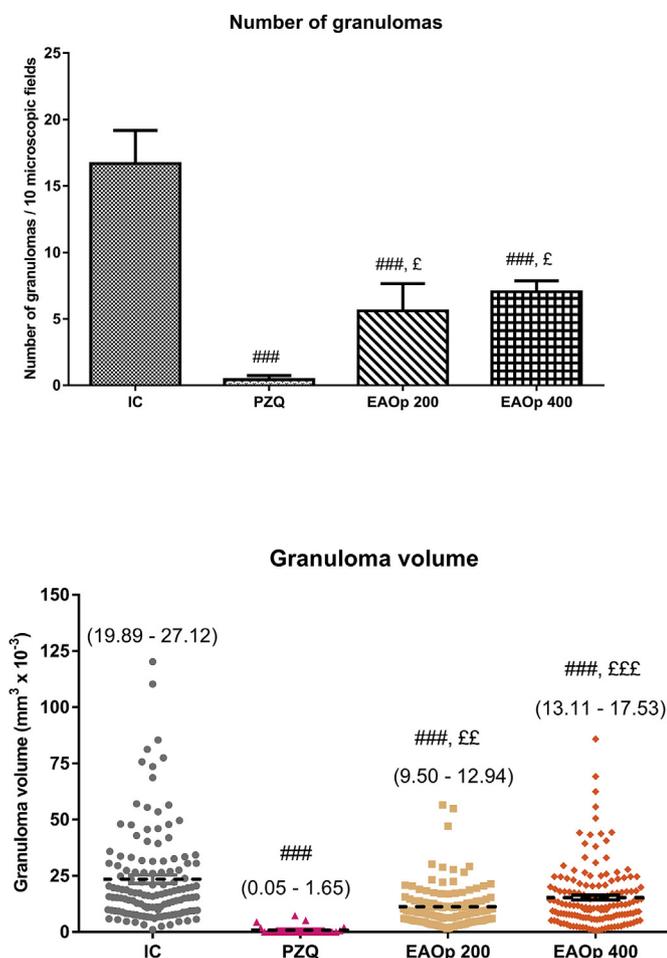
Moreover, the granuloma volume ( $\text{mm}^3 \times 10^{-3}$ ) that was  $23.50 \pm 1.83$  in infected-untreated mice (IC), significantly ( $p < 0.001$ ) regressed to  $11.22 \pm 0.87$  in EAOp 200 mice and to  $15.32 \pm 1.12$  in EAOp 400 mice, corresponding to a reduction percentage of 52.25% and 34.81% respectively. With a 97.48% reduction of granulomas number and a 96.38% reduction of granuloma volume, praziquantel was statistically more efficient than EAOp. Reduction of granulomas number and/or granuloma size (volume or diameter) have been previously reported after treatment of *S. mansoni*-infected mice with curcumin (Allam, 2009), *Zingiber officinale* Roscoe. rhizomes (Mostafa et al., 2011), berberine (Dkhil, 2014), *Ceratonia siliqua* L. pod (Al-Olayan et al., 2016), gold or selenium nanoparticles (Dkhil et al., 2015, 2016) or vaccination of mice with the tegumental antigen of *S. mansoni* adult worms prior to infection (Hamed, 2011). These histological findings go hand in hand with those of previous authors using other treatments (Allam, 2009; Mostafa et al., 2011; Dkhil, 2014; Dkhil et al., 2015, 2016; Al-Olayan et al., 2016). The qualitative and quantitative improvement of the liver of infected mice after EAOp or PZQ treatment could be attributed to the decrease of worm and egg burdens. The inflammatory granulomatous reaction leads to the destruction of an extensive area of the organ where it occurs. Besides the reduction in worm and egg burdens, if granuloma formation could be prevented or suppressed, the development of severe disease might be averted (Allam, 2009). Our previous study has demonstrated that when treated with EAOp, the liver sections of *S. mansoni*-infected mice shown an important reduction of inflammatory cells and collagen deposition around eggs, attesting the anti-inflammatory and anti-fibrogenic activities of the fraction (Jatsa et al., 2018b). Reduction of granuloma number and size after EAOp treatment could also be justified by the decrease of soluble egg antigens (SEA) production and/or inactivation and/or suppression of Th1 and Th2 lymphocytes and their cytokines which mediate granuloma formation and development (Mostafa et al., 2011). By considerably decreasing the granulomas number and volume, *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction would attenuate the severity of *S. mansoni* infection and thus reducing the morbidity.

### 3.6. Liver function biomarkers

To evaluate the capacity of *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction to



**Fig. 3.** Effect of *Ozoroa pulcherrima* ethyl acetate fraction on the liver histoarchitecture of *Schistosoma mansoni*-infected mice evaluated by hematoxylin-eosin staining. The liver sections of NIC (A) and NIC 400 mice (B) showed normal structure. However, livers of IC mice (C) exhibited multiple and voluminous granulomas surrounded with fibrous tissue. In the liver sections of PZQ mice (D), only few inflammatory cells were noticed. Liver sections of EAOp 200 (E) and EAOp 400 mice (F) showed few granulomas and few fibrous tissues.



**Fig. 4.** Effect of *Ozorioa pulcherrima* ethyl acetate fraction on the number and volume of hepatic granulomas of *Schistosoma mansoni*-infected mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 5 for group EAOp 400 and n = 6 for others groups). IC: infected-untreated mice; PZQ: infected mice treated with praziquantel; EAOp 200 and EAOp 400: infected mice treated with *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction at 200 and 400 mg/kg respectively. ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test was used for statistical analysis. ###  $p < 0.001$ : values are significantly different from the infected-untreated mice (group IC). £  $p < 0.05$ ; ££  $p < 0.01$ ; £££  $p < 0.001$ : values are significantly different from the infected mice treated with praziquantel (group PZQ). Values in brackets represent the lower and upper 95% confidence intervals.

ameliorate the liver pathology induced by *S. mansoni* infection, the activity of transaminases (ALT and AST), as well as total protein and total bilirubin concentrations, were measured in the plasma. As shown

**Table 3**

Effect of *Ozorioa pulcherrima* ethyl acetate fraction on some parameters of the liver function of *Schistosoma mansoni*-infected mice.

| Groups                                  | NIC                | NIC 400            | IC                               | PZQ                              | EAOp 200                         | EAOp 400                         |
|---|--------------------|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| ALT (U/mL) % change                     | 325.82 $\pm$ 14.99 | 330.61 $\pm$ 18.40 | 757.98 $\pm$ 51.66***<br>+132.64 | 367.35 $\pm$ 2.87###<br>- 51.54  | 350.40 $\pm$ 13.69###<br>- 53.77 | 350.51 $\pm$ 18.30###<br>- 53.76 |
| AST (U/mL) % change                     | 278.68 $\pm$ 22.97 | 242.21 $\pm$ 12.73 | 865.83 $\pm$ 78.86***<br>+210.69 | 267.41 $\pm$ 17.77###<br>- 69.11 | 324.71 $\pm$ 20.82###<br>- 62.50 | 280.39 $\pm$ 16.40###<br>- 67.62 |
| Total protein (mg/mL) % change          | 1.56 $\pm$ 0.04    | 1.55 $\pm$ 0.06    | 0.98 $\pm$ 0.05***<br>- 37.18    | 1.61 $\pm$ 0.10###<br>+64.29     | 1.39 $\pm$ 0.08###<br>+41.84     | 1.63 $\pm$ 0.02###<br>+66.33     |
| Total bilirubin ( $\mu$ mol/L) % change | 32.44 $\pm$ 1.84   | 31.01 $\pm$ 0.47   | 69.86 $\pm$ 2.43***<br>+115.35   | 37.68 $\pm$ 0.82###<br>- 46.06   | 34.86 $\pm$ 1.66###<br>- 50.10   | 32.96 $\pm$ 1.73###<br>- 52.82   |

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 5 for group EAOp 400 and n = 6 for others groups). AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; NIC: uninfected mice; NIC 400: uninfected mice receiving *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction at 400 mg/kg; IC: infected-untreated mice; PZQ: infected mice treated with praziquantel; EAOp 200 and EAOp 400: infected mice treated with *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction at 200 and 400 mg/kg respectively.

ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test was used for statistical analysis. \*\*\*  $p < 0.001$ : values are significantly different from those of uninfected mice (group NIC). ###  $p < 0.001$ : values are significantly different from those of infected-untreated mice (group IC).

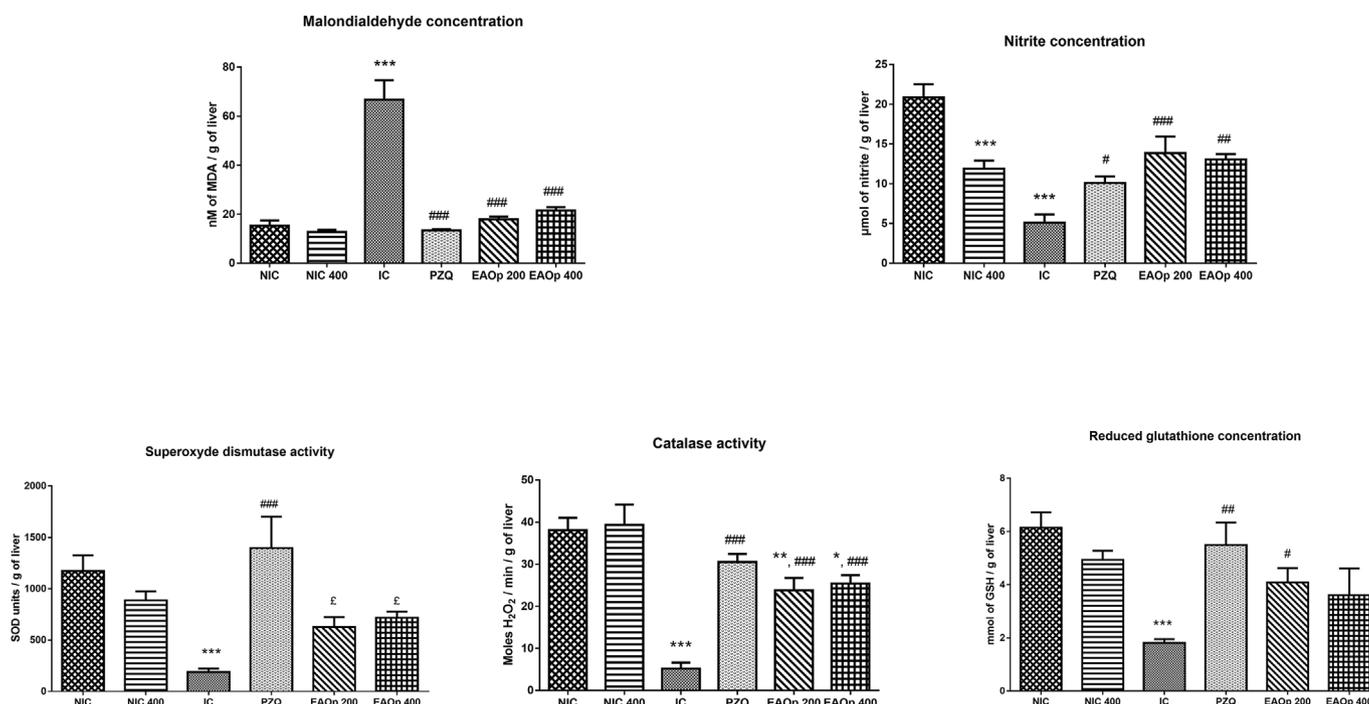
in Table 3, there was no statistically significant difference in the activity of ALT and AST and the concentration of total protein and total bilirubin between the NIC and NIC 400 mice. This result demonstrated that *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction did not interfere with the hepatic function which remains normal. The infected-untreated mice (IC) showed significant elevated plasmatic activities of ALT and AST ( $p < 0.001$ ) and total bilirubin concentration ( $p < 0.001$ ) while total protein concentration decreased ( $p < 0.001$ ), compared to NIC mice. Determination of liver enzyme function, reflected by ALT and AST levels is commonly used to assess the liver damage caused by schistosomal infection (Allam, 2009; Dkhil, 2014; Madrigal-Santillán et al., 2014; Jatsa et al., 2015, 2018a; Al-Olayan et al., 2016). The increased plasmatic activities of ALT and AST in *S. mansoni* infection may be due to leakage of these enzymes from necrotic hepatic tissue to the bloodstream and the replacement of the normal liver tissue by granulomatous lesions and fibrosis (Allam, 2009; Al-Olayan et al., 2016). Our results are in accordance with those of Jatsa et al. (2015, 2018a) who reported increased plasmatic transaminases activity or with those of Allam (2009), Dkhil (2014) and Al-Olayan et al. (2016) who reported decreased AST and ALT levels in liver homogenates of *S. mansoni*-infected mice with concomitant increases in serum transaminases. Elevated total bilirubin concentration reflects the continuous deterioration of hemoglobin by schistosome worms, with the release of this yellow pigment in the bloodstream (Thapa and Walia, 2007). In *S. mansoni* infection, protein concentration begins to decline at six weeks post-infection as a result of protein anabolism decrease and protein catabolism increase (Rizk et al., 2012). Treatment of infected mice with PZQ or EAOp restores the transaminases activity, total protein, and total bilirubin concentrations in the plasma. Effectively, these biomarkers were maintained at near normal levels in the EAOp (200 and 400 mg/kg) and PZQ treatments groups. This is indicated by the significant ( $p < 0.001$ ) decrease in the ALT and AST activities and total bilirubin level, but the significant ( $p < 0.001$ ) increase of total protein level. EAOp (200 and 400 mg/kg) was effective as praziquantel since there was no significant difference in the levels of these hepatic biomarkers between the EAOp 200 /EAOp 400 and PZQ mice (Table 3). This amelioration of the liver function could be attributed to the reduction of hepatic granulomas number and volume as well as the regression of necrotic liver tissue in infected treated mice (Allam, 2009). Phytoconstituents with anti-inflammatory activity like flavonoids, phenols, tannins, and saponins present in EAOp may probably act by reducing the migration of inflammatory cells such as eosinophils, neutrophils, lymphocytes and macrophages around schistosome eggs trapped in the liver (Barbosa, 2014; Dkhil, 2014; Syed et al., 2015). Moreover, the hepatoprotective activity of the triterpene oleanolic acid identified in EAOp has been previously demonstrated. In fact, this compound increases nuclear accumulation of Nrf2, a key transcriptional regulator of antioxidant and detoxifying enzymes, thereby leading to the induction of Nrf2-dependent genes that play a role in the

protection of the liver (Reisman et al., 2009; Pollier and Goossens, 2012). A restoration of the liver function through normalization of the level of its biomarkers as transaminases, bilirubin, and protein would then follow. The role of flavonoids in regenerating hepatocytes has been demonstrated (El-Sawi and Sleem, 2010) and flavonoids and tannins have been reported to reduce hepatic toxicity of alcohol, acetaminophen, and hepatocarcinogenic compounds and protect hepatocytes from oxidative stress (Madrigal-Santillán et al., 2014). The hepatoprotective role of saponins has been discussed. It involved activation of hepatic regeneration via stimulation of protein and glycoprotein synthesis, acceleration of detoxification and excretion, prevention of lipid peroxidation and stabilization of hepatocellular membrane (Firdous et al., 2008; Elekofehinti et al., 2012).

### 3.7. Hepatic oxidative stress biomarkers

An early event following *S. mansoni* infection is the production of excessive reactive oxygen species (ROS) which induce hepatic oxidative stress (Rizk et al., 2012). In the present study, hepatic malondialdehyde concentration drastically increased in infected-untreated mice (IC) by approximately 3.37-fold ( $66.67 \pm 8.01$  vs  $15.27 \pm 2.19$  nmol/g) compared with uninfected-untreated mice (NIC) (Fig. 5). Several authors have reported that schistosomiasis is associated with elevation of malondialdehyde concentration (El-Rigal et al., 2011; Rizk et al., 2012; Dkhil, 2014; Dkhal et al., 2015, 2016; Jatsa et al., 2015, 2016, 2018a; Al-Olayan et al., 2016). Malondialdehyde is one of the final products of lipid peroxidation in host cells and serves as a marker of cellular oxidative stress. In *S. mansoni* infection, granuloma-inflammatory cells produced the superoxide and hydroxyl radicals which are involved in the generation of lipid peroxides (El-Rigal et al., 2011). The consequent overproduction of malondialdehyde would then impair the physicochemical properties, fluidity, and integrity of cell membranes and lead to damage and cell necrosis (Al-Olayan et al., 2016). The level of nitrite

was also measured in the liver homogenates. Schistosomiasis caused a significant ( $p < 0.001$ ) decrease by 75.50% of nitrite concentration compared with the NIC group (Fig. 5). Nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) has been for long considered as an inert oxidative end product of endogenous nitric oxide (NO) metabolism. In normoxia, NO synthase (NOS) is functional and generates NO, which is oxidized by cytochrome C oxidase and ceruloplasmin to nitrite. It is now accepted that nitrite also represents a stable reservoir that can be reduced to bioactive NO and other reactive nitrogen species during hypoxia (Lundberg et al., 2008; Shiva, 2013). Overproduction of hepatic NO or nitrite/nitrate in *S. mansoni* infection has been reported by many authors (Dkhil, 2014; Dkhil et al., 2015, 2016; Al-Olayan et al., 2016). During oxidative stress, NO coupled with anion superoxide ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) to produce peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ), a reactive nitrogen species that oxidize cellular structures, causing lipid peroxidation, and impairs the function of certain enzymes. During *S. mansoni* infection, the involvement of NO in the production of peroxynitrite could become predominant and therefore, its oxidation to nitrite would diminish and consequently the nitrite level. A decrease of NO level in the liver of *S. mansoni*-infected mice after 12 weeks of infection has been described by Hassan et al. (2016). They explained this reduction accordingly to the kinetics of NO production. In fact, NO production markedly increases following the deposition of *S. mansoni* eggs in the liver with a peak between 37 and 45 days of infection. NO concentration sharply declined thereafter such that by day 70 of infection, it has returned to the normal level (Brunet et al., 1999). The depletion of NO production could then induce the depletion of nitrite, the metabolite of NO oxidation. Non-infected mice who received *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction (NIC 400) showed a significant decrease of 43.05% of nitrite level, while malondialdehyde concentration and antioxidant levels were close to those of non-infected and untreated mice (NIC) (Fig. 5). EAOp thus interferes with nitrite concentration in the body. It has been demonstrated that reduction of nitrite to NO occurs in blood and tissues and proceeds through several enzymatic and non-enzymatic



**Fig. 5.** Effect of *Ozorora pulcherrima* ethyl acetate fraction on the levels on some hepatic oxidative stress biomarkers of *Schistosoma mansoni*-infected mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$  for group EAOp 400 and  $n = 6$  for others groups). NIC: uninfected mice; NIC 400: uninfected mice receiving *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction at 400 mg/kg; IC: infected-untreated mice; PZQ: infected mice treated with praziquantel; EAOp 200 and EAOp 400: infected mice treated with *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction at 200 and 400 mg/kg respectively. ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test was used for statistical analysis. \*\*\* $p < 0.001$ : values are significantly different from the uninfected mice (group NIC). \* $p < 0.05$ ; # $p < 0.01$ ; ### $p < 0.001$ : values are significantly different from the infected-untreated mice (group IC).  $^{\#}p < 0.05$ : values are significantly different from the infected mice treated with praziquantel (group PZQ).

pathways involving heme globins, molybdenum-containing enzymes, components of the mitochondrial electron transport chain, ascorbate and polyphenols (Lundberg et al., 2008; Shiva, 2013). In the presence of polyphenols, the acidic reduction of nitrite to NO is greatly enhanced with less generation of nitrosating ( $N_2O_3$ ) and nitrating ( $NO_2$ ) (Lundberg et al., 2008). Since EAOp contains remarkable amounts of polyphenols, its consumption by mice could lead to the enhancement of nitrite conversion to NO, and consequently to the reduction of nitrite concentration in the liver. Despite the fact that NO is involved in the generation of reactive nitrogen species, many studies described the therapeutic potential of nitrate/nitrite/NO in conditions such as myocardial infarction, stroke, systemic and pulmonary hypertension, and gastric ulceration (Lundberg et al., 2008). In this study, *S. mansoni* infection was also associated with the impairment of the antioxidant defense. Significant ( $p < 0.001$ ) decrease of superoxide dismutase activity, catalase activity and reduced glutathione concentration by 83.96%, 88.96%, and 70.72% respectively were recorded in infected-untreated mice (IC group) compared with the uninfected-untreated mice (NIC group) (Fig. 5). Several authors who also reported the reduction of enzymatic and non-enzymatic antioxidants attributed it to their utilization in scavenging the free radicals overload generated during schistosomiasis. They also pointed out that the depletion of the antioxidant barrier would result in an increase of reactive oxygen and nitrogen species which damage the liver tissue (El-Rigal et al., 2011; Rizk et al., 2012; Dkhal, 2014; Dkil et al., 2015, 2016; Jatsa et al., 2015, 2016; 2018a; Al-Olayan et al., 2016; Hassan et al., 2016).

Treatment of infected mice with *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction considerably reduces the lipoperoxidation and improves the enzymatic and non-enzymatic antioxidants. As shown in Fig. 5, comparatively to infected untreated mice (IC group), infected mice treated with EAOp at 200 or 400 mg/kg showed significant ( $p < 0.001$ ) decrease of malondialdehyde concentration by 73.20% and 67.78% respectively. Treatment of infected mice with EAOp tends to normalize the reduction of the nitrite level which decreases by the infection. In EAOp 200 and EAOp 400 groups, significant increases of nitrite concentration by 170.84% ( $p < 0.001$ ) and 155.58% ( $p < 0.01$ ) respectively were recorded. *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction suppressed the depletion of all antioxidants caused by the infection. When compared to that of infected-untreated mice (IC), catalase activity of infected mice treated with EAOp significantly ( $p < 0.001$ ) increased by 4.67-fold at the dose of 200 mg/kg and by 5.69-fold at 400 mg/kg. Superoxide dismutase activity also increased by 233.61% or 281.66% after this treatment whereas it was not statistically significant. Increased reduced glutathione concentration was 126.67% ( $p < 0.05$ ) after treatment with 200 mg/kg of EAOp. A non-significant 100.56% increase was recorded for mice of EAOp 400 group. No significant difference was recorded between praziquantel and EAOp in their capacity to restore malondialdehyde, nitrite, catalase, and reduced glutathione levels. Uninfected mice treated with EAOp at 400 mg/kg (NIC 400 group) didn't show a significant difference of the levels of malondialdehyde, superoxide dismutase, catalase, and reduced glutathione, compared to those of uninfected untreated mice (NIC group). This result demonstrated that in normal mice, EAOp did not interfere with the lipoperoxidation and the antioxidant defense. Thus, the ability of EAOp to restore oxidative stress biomarkers to their normal levels is not achieved through increasing antioxidant concentrations. This could be through its capacity to scavenge reactive oxygen species. According to Halliwell and Gutteridge (1999), mechanisms of antioxidant action can include suppressing reactive oxygen species formation either by inhibition of enzymes or chelating trace elements involved in free radical production, scavenging reactive oxygen species, and up-regulating or protecting antioxidant defenses. EAOp is, in fact, rich in polyphenols which are good donors of hydrogen to free radicals in view of breaking the chain reaction of lipoperoxidation (Vertuani et al., 2004). Flavonoids are also present in EAOp and their effects are twofold. They inhibit the enzymes responsible for superoxide anion production, such as

xanthine oxidase and protein kinase C. Flavonoids have been also shown to inhibit cyclooxygenase, lipoxygenase, microsomal mono-oxygenase, glutathione S-transferase, mitochondrial succinoxidase, and NADH oxidase, all involved in reactive oxygen species generation. Moreover, a number of flavonoids efficiently chelate trace metals (Pietta, 2000). Antiperoxidative and antioxidant properties have been also ascribed to tannins, saponins and terpenoids present in EAOp, which are able to scavenge superoxide anions and hydroxyl radicals and also increase superoxide dismutase and catalase activities in normal rats (Gao et al., 2004; Vertuani et al., 2004; Elekofehinti et al., 2012; Wu et al., 2016). The antioxidant activity of oleanolic acid, a triterpene identified in EAOp has been reported by several authors (Pollier and Goossens, 2012). Wang et al. (2010b) have recently shown that oleanolic acid is not only a free radical scavenger, but also that its main antioxidant activity is due to the Nrf2-mediated increased expression of antioxidant enzymes such as catalase and thioredoxin peroxidase, and the enhanced biosynthesis of the antioxidant glutathione. These overall actions of EAOp phytoconstituents would contribute to protecting hepatic tissue against oxidative damage. Furthermore, the reduction of the hepatic egg load, the number and the volume of hepatic granulomas after treatment of *S. mansoni*-infected mice with *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction or praziquantel could also attenuate the action of reactive free radicals on the liver tissue.

#### 4. Conclusions

Our study demonstrated, through the *S. mansoni* pathology, the anti-schistosomal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction. The effect of this fraction on the liver function and hepatic oxidative stress was similar to that of praziquantel. Oleaterminaloic acid, hydroxyoleanolic acid, moronic acid, and oleanolic acid; a flavonoid dipentoxibenzoic acid and two alkaloids were identified in *O. pulcherrima* ethyl acetate fraction and are likely to be, at least, in part responsible for activities disclosed by this fraction. These findings support the traditional use of *O. pulcherrima* for the treatment of intestinal helminthiasis and this fraction could be used as a starting point for the development of complementary or alternative molecules against *S. mansoni* infection.

#### Declarations of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### Author's contributions

HBJ, PK, and LTT designed the study. NGF, UMF, CMK, ETN, JBKF, DNS, CM, and CND performed pharmacological studies. HBJ and UMF conducted histological studies and performed statistical analyses. HBJ, NGF, and UMF have been involved in drafting the manuscript. ED and CDT conducted phytochemical studies. All authors contributed substantially to the manuscript, read and approved its final version.

#### Funding

This work was supported by the International Foundation for Science (IFS), grant F/3622 – 2F awarded to Hermine Boukeng Jatsa.

#### Acknowledgments

Authors are grateful to the Association PCD France (Pathologie – Cytologie – Développement) which kindly donated equipment and reagents for histological study.

## List of abbreviations:

|              |  |
|--------------|--|
| EAOp         | ethyl acetate fraction from <i>Ozoroa pulcherrima</i> roots methanolic extract |
| HPLC-MS      | high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry            |
| MDA          | malondialdehyde  |
| SOD          | superoxide dismutase   |
| CAT          | catalase   |
| GSH          | reduced glutathione  |
| GAE          | gallic acid equivalents  |
| PZQ          | praziquantel   |
| KOH          | potassium hydroxide  |
| EDTA         | ethylenediaminetetraacetic acid  |
| ALT          | alanine aminotransferase   |
| AST          | aspartate aminotransferase   |
| PBS          | phosphate-buffered saline  |
| H&E          | hematoxylin and eosin  |
| ANOVA        | analysis of variance   |
| SEM          | standard error of the mean   |
| TNF          | tumor necrosis factor  |
| IFN $\gamma$ | gamma interferon   |
| IGF-1        | insulin growth factor-1  |
| ROS          | reactive oxygen species  |
| NO           | nitric oxide   |
| NOS          | nitric oxide synthase  |
| NADH         | nicotinamide adenine dinucleotide.   |

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111883>.

## References

- Adjanohoun, E.J., Adjakidje, V., Ahyi, M.R.A., Ake, A.L., Akoègninou, A., d'Almeida, J., Apovo, F., Boukef, K., Chadare, M., Cusset, G., Dramane, K., Eyme, J., Gassita, J.N., Gbaguidi, N., Goudote, E., Guinko, S., Hounngon, P., Lo, I., Keita, A., Kinnifio, H.V., Kone-Bamba, D., Musampa, N.A., Saadou, M., Sodogandji, T., de Souza, S., Tchabi, A., Zinsou, D.C., Zohoun, T., 1989. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin. Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris.
- Adjanohoun, J.E., Aboubakar, N., Dramane, K., Ebot, M.E., Ekpere, J.A., Enow-Orock, E.G., Focho, D., Kamanyi, A., Kamsu, K.J., Kiela, A., Mbi, C.N., Mubiru, N.K., Nancy, W.L., Nkongmeneck, B., Satabie, B., Sofowora, A., Tamze, W., 1996. Contribution to ethnobotanical and floristic studies in Cameroon. Porto-Novo: CSTR/OUA, CNPMS.
- Ali, N., Shah, S.W.A., Shah, I., Ahmed, G., Ghias, M., Khan, I., 2011. Cytotoxic and anthelmintic potential of crude saponins isolated from *Achillea wilhelmssii* C. Koch and *Teucrium stocksianum* Boiss. BMC Complement Altern. Med. 11, 106–112. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-106>.
- Allam, G., 2009. Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine schistosomiasis mansoni. Immunobiology 214, 712–727. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.11.017>.
- Al-Olayan, E.M., El-Khadragy, M.F., Alajmi, R.A., Othman, M.S., Bauomy, A.A., Ibrahim, S.R., Moneim, A.E.A., 2016. *Ceratonium siliqua* pod extract ameliorates *Schistosoma mansoni*-induced liver fibrosis and oxidative stress. BMC Complement Altern. Med. 16, 434–444. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1389-1>.
- Assis, A.M.O., Barreto, M.L., Prado, M.S., Reis, M.G., Parraga, I.M., Blanton, R.E., 1998. *Schistosoma mansoni* infection and nutritional status in schoolchildren: a randomized, double-blind trial in northeastern Brazil. Am. J. Clin. Nutr. 68, 1247–1253. <https://doi.org/10.1093/ajcn/68.6.1247>.
- Barbosa, A.P., 2014. An overview of the biological and pharmacological activities of saponins. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 6, 47–50.
- Bogninou-Agbidinokoun, S., Chalard, P., Patel, K., Delort, L., Billard, H., Figueiredo, G., Avlessi, F., Caldefie-Chézet, F., Troin, Y., Sohounhloué, D., 2016. Chemical composition and antiproliferative activity of leaves and stems essential oils of *Ozoroa pulcherrima* upon breast cancer cells MCF-7. Int. J. Adv. Res. 4, 1150–1157.
- Brunet, L.R., Beall, M., Dunne, D.W., Pearce, E.J., 1999. Nitric oxide and the Th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *Schistosoma mansoni* infection. J. Immunol. 163, 4976–4984.
- Cavalcanti, M.G., de Araujo-Neto, J.M., Peralta, J.M., 2015. Schistosomiasis: clinical management of liver disease. Clin. Liver Dis. 6, 59–62. <https://doi.org/10.1002/cld.495>.
- Chen, M.G., Mott, K.E., 1988. Progress in assessment of morbidity due to *Schistosoma mansoni* infection. A review of recent literature. Trop. Dis. Bull. 85, R1–R56.
- Da Silva, V.C., de Carvalho, M.G., Borba, H.R., Silva, S.L.C., 2008. Atividade anti-helmíntica dos flavonóides isolados das raízes de *Andira anthelmia* (Leguminosae). Rev. Bras. Farmacogn. 18, 573–576. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400013>.
- Dkhal, M.A., 2014. Role of berberine in ameliorating *Schistosoma mansoni*-induced hepatic injury in mice. Biol. Res. 47, 8–14. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-8>.
- Dkhal, M.A., Bauomy, A.A., Diab, M.S.M., Al-Quraishy, S., 2015. Antioxidant and hepatoprotective role of gold nanoparticles against murine hepatic schistosomiasis. Int. J. Nanomed. 10, 7467–7475. <https://doi.org/10.2147/IJN.S97622>.
- Dkhal, M.A., Bauomy, A.A., Diab, M.S.M., Al-Quraishy, S., 2016. Protective role of selenium nanoparticles against *Schistosoma mansoni*-induced hepatic injury in mice. Biomed. Res. 27, 214–219.
- Duwall, R.H., Dewitt, W.B., 1967. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. Am. J. Parasitol. 7, 293–297. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1967.16.483>.
- Elekofehinti, O.O., Adanlawo, L.G., Komolafe, K., Ejelolu, O.C., 2012. Saponins from *Solanum anguivi* fruits exhibit antioxidant potential in Wistar rats. Ann. Biol. Res. 3, 3212–3217.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl group. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
- El-Rigal, N., Metwally, M.N., Mohamed, M.A., Mohamed, Z.N., Rizk, Z.M., 2011. Protection against oxidative damage induced by *Schistosoma mansoni* using susceptible/resistant nucleoproteins from *Biomphalaria alexandrina* snails. Asian J. Bio. Sci. 4, 445–456. <https://doi.org/10.3923/ajbs.2011.445.456>.
- El-Sawi, S.A., Sleem, A.A., 2010. Flavonoids and hepatoprotective activity of leaves of *Senna surattensis* (Burm.f.) in CCl4 induced hepatotoxicity in rats. Aust. J. Basic. Appl. Sci. 4, 1326–1334.
- Firdous, Koneri, R., Haldar, P., Burdipad, G., 2008. Evaluation of hepatoprotective activity of saponin of *Momordica dioica* Roxb. against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. Pharmacologyonline 3, 487–494.
- Gao, J., Tang, X., Dou, H., Fan, Y., Zhao, X., Xu, Q., 2004. Hepatoprotective activity of *Terminalia catappa* L. leaves and its two triterpenoids. J. Pharm. Pharmacol. 56, 1449–1455. <https://doi.org/10.1211/0022357044733>.
- Githiori, J.B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., 2006. Use of plants in novel approaches for gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. Vet. Parasitol. 139, 308–320. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.021>.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford.
- Hamed, M.A., 2011. Potency of detergents in enhancing *Schistosoma mansoni* tegumental antigen. J. Infect. Dev. Ctries. 5, 209–215. <https://doi.org/10.3855/jidc.1199>.
- Hassan, F.A.M., Abed, G.H., Abdel-Samii, M.A.Z., Omar, H.M., 2016. Antischistosomal activity of Ginger aqueous extract against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice. Biom. J. 2, 1–6. <https://doi.org/10.21767/2472-1646.100020>.
- Hibbs, J.B., Taintor, R., Vavrin, Z., Rachlin, E.M., 1988. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. Biochem. Biophys. Res. Commun. 157, 87–94. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)80015-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)80015-9).
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., Thamsborg, S.M., Terrill, T.H., 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. Vet. Parasitol. 212, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.026>.
- Hostettmann-Kaldas, M., Nakanishi, N., 1979. Moronic acid, a simple triterpenoid Keto Acid with antimicrobial activity isolated from *Ozoroa mucronata*. J. Med. Plants Res 37, 358–360.
- Jatsa, H.B., Endougou, A.M.E., Kemeta, D.R.A., Kenfack, C.M., Tchuem Tchunte, L.A., Kamtchouing, P., 2009a. *In vivo* antischistosomal and toxicological evaluation of *Sida pilosa* Retz on mice BALB/c. Pharmacologyonline 3, 531–238.
- Jatsa, H.B., Ngo Sock, E.T., Tchuem Tchunte, L.A., Kamtchouing, P., 2009b. Evaluation of the *in vivo* activity of different concentrations of *Clerodendrum umbellatum* Poir against *Schistosoma mansoni* infection in mice. Afr. J. Tradit., Complementary Altern. Med. 6, 216–221.
- Jatsa, H.B., Kenfack, C.M., Simo, D.N., Feussom, N.G., Nkondo, E.T., Tchuem Tchunte, L.A., Tsague, C.D., Dongo, E., Kamtchouing, P., 2015. Schistosomicidal, hepatoprotective and antioxidant activities of the methanolic fraction from *Clerodendrum umbellatum* Poir leaves aqueous extract in *Schistosoma mansoni* infection in mice. BMC Complement Altern. Med. 15, 248–256. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0788-z>.
- Jatsa, H.B., Russo, R.C., Pereira, C.A.J., Aguilar, A.C., Garcia, C.C., Araújo, E.S., Oliveira, J.L.R., Rodrigues, V.F., de Oliveira, V.G., Alvarez-Leite, J.I., Braga, F.C., Tchuem Tchunte, L.A., Kamtchouing, P., Negrão-Corrêa, D.A., Teixeira, M.M., 2016. Improvement of the liver pathology by the aqueous extract and the *n*-butanol fraction of *Sida pilosa* Retz in *Schistosoma mansoni*-infected mice. J. Ethnopharmacol. 180, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.017>.
- Jatsa, H.B., Feussom, N.G., Nkondo, E.T., Kenfack, C.M., Simo, D.N., Fassi, J.B.K., Femoe, U.M., Moaboulou, C., Tsague, C.D., Dongo, E., Kamtchouing, P., Tchuem Tchunte, L.A., 2018a. Efficacy of *Ozoroa pulcherrima* Schweinf methanolic extract against *Schistosoma mansoni*-induced liver injury in mice. J. Trad. Complement. Med. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2017.08.009>.
- Jatsa, H.B., Cagnet, C., Femoe, U.M., Feussom, N.G., Dzeufiet, P.D.D., Tchuem Tchunte, L.A., Kamtchouing, P., 2018b. Analyses histologiques du foie des souris infectées par *Schistosoma mansoni* après traitement par *Ozoroa pulcherrima* Schweinf. Rev. Fr. Histotechnol. 30, 31–50.
- Lenzi, J.A., 1998. Estudo do modelo *Calomys callosus* Renger, 1830 (Rodentia: Cricetidae) na infecção por *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Parâmetros parasitológicos e histopatológicos. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.
- Lenzi, H.L., Jurberg, A.D., Coelho, P.M.Z., Lenzi, J.A., 2008. Migração e desenvolvimento

- de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: Carvalho, O.S., Coelho, P.M.Z., Lenzi, H.L. (Eds.), *Schistosoma Mansoni & Esquistossomose. Uma Visão Multidisciplinar*. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 85–145.
- Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Gladwin, M.T., 2008. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 156–167. <https://doi.org/10.1038/nrd2466>.
- Madrigal-Santillán, E., Madrigal-Bujaidar, E., Álvarez-González, I., Sumaya-Martínez, M.T., Gutiérrez-Salinas, J., Bautista, M., Morales-González, A., González-Rubio, M.G.-L., Aguilar-Faisal, J.L., Morales-González, J.A., 2014. Review of natural products with hepatoprotective effects. *World J. Gastroenterol.* 20, 14787–14804. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14787>.
- Magnussen, P., 2003. Treatment and re-treatment strategies for schistosomiasis control in different epidemiological settings: a review of 10 years' experiences. *Acta Trop.* 86, 243–254. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(03\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00045-7).
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P., 2005. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem.* 89, 411–426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.051>.
- Melman, S.D., Steinauer, M.L., Cunningham, C., Kubatko, L.S., Mwangi, I.N., Wynn, N.B., Mutuku, M.W., Karanja, D.M.S., Colley, D.G., Black, C.L., Secor, W.E., Mkoji, G.M., Loker, E.S., 2009. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 3, 504–510. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000504>.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. Determination of the Level of Superoxide Dismutase in Whole Blood. Yale University Press, New Haven.
- Mostafa, M.S.O., Eid, A.R., Adly, A.M., 2011. Antischistosomal activity of ginger (*Zingiber officinale*) against *Schistosoma mansoni* harbored in C57 mice. *Parasitol. Res.* 109, 395–403. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2267-x>.
- Mwatha, J.K., Kimani, G., Kamau, T., Mbugua, G.G., Ouma, J.H., Mumo, J., Fulford, A.J., Jones, F.M., Butterworth, A.E., Roberts, M.B., Dunne, D.W., 1998. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 160, 1992–1999d.
- Ndjonka, D., Abladam, E.D., Djafsia, B., Ajonina-Ekoti, I., Achukwi, M.D., Liebau, E., 2014. Anthelmintic activity of phenolic acids from the axle wood tree *Anogeissus leiocarpus* on the filarial nematode *Onchocerca ochengi* and drug-resistant strains of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Helminthol.* 88, 481–488. <https://doi.org/10.1017/S0022149X1300045X>.
- Pal, R., Girhepunje, K., Upadhyay, A., Thirumoorthy, N., 2012. Antioxidant and free radical scavenging activity of ethanolic extract of the root of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 6, 278–282. <https://doi.org/10.5897/AJPP10.310>.
- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63, 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>.
- Pollier, J., Goossens, A., 2012. Oleanolic acid. *Phytochemistry* 77, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.12.022>.
- Reisman, S.A., Aleksunes, L.M., Klaassen, C.D., 2009. Oleanolic acid activates Nrf2 and protects from acetaminophen hepatotoxicity via Nrf2-dependent and Nrf2-independent processes. *Biochem. Pharmacol.* 77, 1273–1282. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.12.028>.
- Reitman, S., Frankel, S., 1957. A colorimetric determination of serum glutamic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56–63. <https://doi.org/10.1093/ajcp/28.1.56>.
- Riad, N.H.A., Taha, H.A., Mahmoud, Y.I., 2009. Effects of garlic on *Schistosoma mansoni* harboured in albino mice: I. A parasitological and ultrastructural study. *Trop. Med.* 26, 40–50.
- Rizk, M.Z., Fayed, T.A., Badawy, H.D., El-Rigal, N.S., 2006. Effect of different durations of *Schistosoma mansoni* infection on the levels of some antioxidants in mice. *Trends Med. Res.* 1, 66–74. <https://doi.org/10.3923/tmr.2006.66.74>.
- Rizk, M., Ibrahim, N., El-Rigal, N., 2012. Comparative *in vivo* antioxidant levels in *Schistosoma mansoni* infected mice treated with praziquantel or the essential oil of *Melaleuca armillaris* leaves. *Pakistan J. Biol. Sci.* 15, 971–978.
- Saltarelli, R., Palma, F., Gioacchini, A.M., Calcabrini, C., Mancini, U., De Bellis, R., Stocchi, V., Potenza, L., 2018. Phytochemical composition, antioxidant and anti-proliferative activities and effects on nuclear DNA of ethanolic extract from an Italian mycelial isolate of *Ganoderma lucidum*. *J. Ethnopharmacol.* (in press). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.041>.
- Shah, N.A., Khan, M.R., Ahmad, B., Noureen, F., Rashid, U., Khan, R.A., 2013. Investigation on flavonoid composition and anti-free radical potential of *Sida cordata*. *BMC Complement Altern. Med.* 13, 276–288. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-276>.
- Shiva, R., 2013. Nitrite: a physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. *Redox. Biol.* 1, 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.11.005>.
- Sinha, K.A., 1972. Colorimetric assay of catalase. *Anal. Biochem.* 47, 389–394. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90132-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90132-7).
- Souza, A.L.S., Souza, P.R.S., Pereira, C.A., Fernandes, A., Guabiraba, R., Russo, R.C., Vieira, L.Q., Corrêa Jr., A., Teixeira, M.M., Negrão-Corrêa, D., 2011. Experimental Infection with *Schistosoma mansoni* in CCR5-deficient mice is associated with increased disease severity, as CCR5 plays a role in controlling granulomatous inflammation. *Infect. Immun.* 79, 1741–1749. <https://doi.org/10.1128/IAI.00502-10>.
- Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., Utzinger, J., 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect. Dis.* 6, 411–425. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70521-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70521-7).
- Syed, S.G., Mohib, K., Tabassum, R., 2015. Anti-inflammatory activity of *Ficus dalhousiae* Miq roots ethanolic extract in wistar albino rats. *Asian J. Pharmaceut. Clin. Res.* 8, 117–119.
- Thapa, B.R., Walia, A., 2007. Liver function tests and their interpretation. *Indian J. Pediatr.* 74, 663–671.
- Trease, G.E., Evans, W.C., 1983. *A Textbook of Pharmacognosy*. Baillière Tindall Ltd, London.
- Tsague, D.C., Hussain, H., Dongo, E., Jatsa-Megapcthe, B.H., Ahmed, I., Krohn, K., 2011a. Ozocardic A: a new alkylnacardic acid from *Ozoroa pulcherrima*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 13, 84–87. <https://doi.org/10.1080/10286020.2010.543898>.
- Tsague, D.C., Hussain, H., Dongo, E., Jatsa-Megapcthe, B.H., Ahmed, I., Krohn, K., 2011b. Two new alkylnacardic acids, Ozocardic A and B, from *Ozoroa pulcherrima*. *Nat. Prod. Commun.* 6, 1133–1134.
- Tsague, D.C., Hussain, H., Jatsa-Megapcthe, H.B., Saleem, M., Abbas, G., Farooq, M., Wadaan, M.A.M., Dongo, E., Al-Harrasi, A., 2017. Ozoromide: a new ceramide from the stem bark of *Ozoroa pulcherrima*. *Chem. Nat. Comp.* 53, 923–925. <https://doi.org/10.1007/s10600-017-2155-4>.
- Vennervald, B.J., Booth, M., Butterworth, A.E., Kariuki, H.C., Kadzo, H., Ireri, E., Amaganga, C., Kimani, G., Kenty, L., Mwatha, J., Ouma, J.H., Dunne, D.W., 2005. Regression of hepatosplenomegaly in Kenyan school-aged children after praziquantel treatment and three years of greatly reduced exposure to *Schistosoma mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2004.06.009>.
- Vennervald, B.J., Kenty, L., Butterworth, A.E., Kariuki, C.H., Kadzo, H., Ireri, E., Amaganga, C., Kimani, G., Mwatha, J., Otedo, A., Booth, M., Ouma, J.H., Dunne, D.W., 2004. Detailed clinical and ultrasound examination of children and adolescents in a *Schistosoma mansoni* endemic area in Kenya: hepatosplenic disease in the absence of portal fibrosis. *Trop. Med. Int. Health* 9, 461–470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01215.x>.
- Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S., 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr. Pharmaceut. Des.* 10, 1677–1694. <https://doi.org/10.2174/1381612043384655>.
- Wang, G.X., Han, J., Zhao, L.W., Jiang, D.X., Liu, Y.T., Liu, X.L., 2010a. Anthelmintic activity of steroidal saponins from *Paris polyphylla*. *Phytomedicine* 17, 1102–1105. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.04.0120>.
- Wang, X., Ye, X.-L., Liu, R., Chen, H.-L., Bai, H., Liang, X., Zhang, X.-D., Wang, Z., Li, W.-L., Hai, C.-X., 2010b. Antioxidant activities of oleanolic acid *in vitro*: possible role of Nrf2 and MAP kinases. *Chem. Biol. Interact.* 184, 328–337. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.034>.
- Wang, W., Liang, Y., 2014. Mass drug administration (MDA) for schistosomiasis. *J. Infect. Dis.* 14, 1–2. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu506>.
- Wilbur, K.M., Bernhein, F., Shapiro, O.W., 1949. Determination of lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 24, 3959–3964.
- Wilson, S., Vennervald, B.J., Dunne, D.W., 2011. Chronic hepatosplenomegaly in African school children: a common but neglected morbidity associated with schistosomiasis and malaria. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 5, e1149. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001149>.
- Wu, H., Tang, S., Huang, Z., Zhou, Q., Zhang, P., Chen, Z., 2016. Hepatoprotective effects and mechanisms of action of triterpenoids from Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) on  $\alpha$ -amanitin-induced liver injury in mice. *Int. J. Med. Mushrooms* 18, 841–850. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i9.80>.

# ANALYSES HISTOLOGIQUES DU FOIE DES SOURIS INFECTÉES PAR SCHISTOSOMA MANSONI APRÈS TRAITEMENT PAR OZOROA PULCHERRIMA SCHWEINF

Hermine JATSA BOUKENG <sup>1,4,\*</sup>, Catherine CANNET <sup>2</sup>,  
Ulrich FEMOE MEMBE<sup>1,4</sup>, Nestor FEUSSOM GIPWE <sup>1,4</sup>,  
Paul Désiré DZEUFIET DJOMENI <sup>1</sup>, Louis-Albert TCHUEM TCHUENTÉ <sup>3,4</sup>  
et Pierre KAMTCHOUING <sup>1</sup>

\* mjatsa@yahoo.fr

1. *Laboratoire de Physiologie Animale, Département de Biologie et Physiologie  
Animales, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I,  
BP 812 YAOUNDÉ, Cameroun.*
2. *Laboratoire d'Histomorphométrie, Institut de Médecine Légale,  
BP 67085 STRASBOURG, France.*
3. *Laboratoire de Biologie Générale, Département de Biologie et Physiologie  
Animales, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I,  
BP 812 YAOUNDÉ, Cameroun.*
4. *Centre Schistosomiasés et Parasitologie,  
BP 7244 YAOUNDÉ, Cameroun.*

## RESUME

Dans l'infection à *Schistosoma mansoni*, la majorité des œufs pondus par les vers femelles sont embolisés dans l'intestin puis le foie où ils déterminent la formation de granulomes évoluant vers le stade fibrotique. L'utilisation intensive du praziquantel, médicament de choix contre la schistosomiase pourrait conduire à une résistance des souches de schistosomes, d'où l'importance de développer une chimiothérapie alternative ou complémentaire. Cette étude histologique a été conduite pour vérifier le potentiel antifibrotique de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* (EAO<sub>p</sub>) chez des souris infestées par *S. mansoni*. Un traitement quotidien à EAO<sub>p</sub> (100, 200 ou 400 mg/kg) a été réalisé pendant 28 jours à partir du 36<sup>ème</sup> jour post-infestation. Les souris ont été sacrifiées au 65<sup>ème</sup> jour post-infection, puis des paramètres parasitologiques et histologiques évalués dans le foie. Des coupes de foie de 5 µm ont été colorées à l'hématoxyline-éosine afin d'évaluer les infiltrations leucocytaires et la réaction granulomateuse. La coloration au picrosirius a été également entreprise pour la mise en évidence du collagène, ainsi que la coloration au Giemsa pour visualiser les œufs du parasite et la larve qu'ils renferment. Le traitement à EAO<sub>p</sub> a entraîné une réduction significative des charges parasitaire ( $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ ) et ovulaire hépatique ( $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ ) à toutes les doses. L'analyse histologique après traitement aussi bien à EAO<sub>p</sub> qu'au praziquantel a révélé une diminution de l'infiltration des cellules inflammatoires dans le parenchyme hépatique. De plus, le nombre et la taille des granulomes hépatiques ont été considérablement réduits. L'effet de cette plante a été aussi marqué par la diminution du dépôt de collagène autour des œufs du parasite. Cette étude est une preuve de l'activité antifibrotique de la fraction à l'acétate d'éthyle de *Ozoroa pulcherrima* et confirme ainsi l'utilisation empirique de cette plante dans le traitement des helminthiases intestinales. EAO<sub>p</sub> pourrait être considérée comme thérapie alternative ou complémentaire au praziquantel.

## MOTS CLES

***Schistosoma mansoni*, histologie, foie, hématoxyline et éosine, Picrosirius, Giemsa et *Ozoroa pulcherrima***

## ABSTRACT

During *Schistosoma mansoni* infection, eggs released by female worms are embolized mostly in the intestine and the liver, where they induce granuloma formation which is sometimes followed by fibrosis. The intensive use of praziquantel for the treatment of schistosomiasis has raised concerns about the possible emergence of drug-resistant schistosomes. The search for alternative drugs has become a priority. The aim of this study was to histologically assess the antifibrotic potential of the ethyl acetate fraction from *Ozoroa pulcherrima* (EAO<sub>p</sub>) roots methanolic extract on *S. mansoni*-infected mice. The fraction at 100, 200 and 400 mg/kg was administered orally and daily to infected mice for 28 days, starting from 36<sup>th</sup> day post-infection. All mice were sacrificed at 65<sup>th</sup> day post-infection. Parasitological burden and histology of the liver were conducted. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed to evaluate the inflammatory infiltration and the granulomatous reaction. Liver sections were also stained by picrosirius method for collagen evaluation. Giemsa staining method was also performed to visualize parasite eggs and the larvae inside it. The treatment produced significant reduction of the worm burden ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ ) and the number of eggs accumulated in the liver ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ ) at all doses. Histological analysis showed that after treatment of *S. mansoni*-infected mice with EAO<sub>p</sub> or praziquantel, inflammatory cells infiltration, the number and consistence of liver's granuloma were reduced. This was characterized by an important reduction of collagen deposition around the eggs. This study is a histologically proof of the antifibrotic activity of *Ozoroa pulcherrima* ethyl acetate fraction and also supports the traditional use of this plant for the treatment of intestinal helminthiasis. EAO<sub>p</sub> could then be consider as an alternative or complementary therapy to praziquantel.

## KEY WORDS

***Schistosoma mansoni*, liver, histology, hematoxylin-eosin, Picrosirius, Giemsa, *Ozoroa pulcherrima***

## INTRODUCTION

La schistosomiase ou bilharziose est une maladie tropicale négligée causée par un ver plat du genre *Schistosoma*. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), elle affecte plus de 258 millions de personnes dans le monde dont plus de 90% en Afrique. Elle demeure un réel problème de santé publique car la morbidité et la mortalité liées à cette pathologie restent élevées [1, 2]. La pathologie dans l'infection à *Schistosoma mansoni* est principalement causée par les œufs embolisés dans le foie de l'hôte définitif, où ils déterminent la formation de granulomes et l'initiation de la réponse immunitaire de l'hôte [3]. Le granulome bilharzien peut évoluer et faire place à une fibrose irréversible associée à une accumulation excessive de collagène [4]. La lutte contre la schistosomiase repose principalement sur le traitement de masse par le praziquantel (PZQ), unique médicament actif contre toutes les espèces de schistosomes [5]. Seulement, son utilisation intensive pourrait conduire à un risque de résistance au traitement, une augmentation du niveau de tolérance du parasite vis-à-vis de la molécule et à des probables échecs thérapeutiques [6, 7]. Il s'avère donc important de développer des mesures thérapeutiques alternatives et/ou complémentaires au praziquantel. La phytothérapie étant de nos jours considérée comme une source potentielle de molécules bioactives contre les maladies tropicales négligées, nous nous sommes intéressés à *Ozoroa pulcherrima*, plante de la famille des Anacardiaceées qui est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des helminthiases

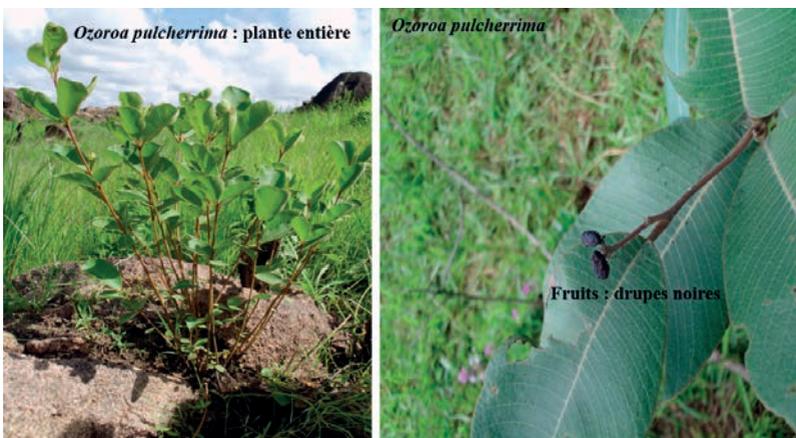


Figure 1 : Photo de *Ozoroa pulcherrima* (prise à Wakwa au Cameroun en juillet 2012).

intestinales. Encore appelée *Heeria pulcherrima*, cet arbuste mesure environ 1 m de haut. Ses feuilles sont verticillées par trois, l'inflorescence est en panicule terminale ou axillaire. La fleur blanc crème a cinq sépales triangulaires et cinq pétales. Le fruit est une drupe noire à maturité. Cette espèce est très répandue du Sénégal au Cameroun (**Figure 1**) [8]. Les résultats des travaux antérieurs entrepris sur cette plante ont montré que l'extrait méthanolique de ses racines était doué de propriétés schistosomicide, antiinflammatoire et antioxydante [9]. En outre, trois acides alkylnacardiques : Ozocardic A, Ozocardic A et Ozocardic B ; ainsi qu'une céramide nommée Ozoromide ont été isolés de *O. pulcherrima* [10, 11, 12]. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'activité schistosomicide et, par des analyses histologiques, le potentiel antifibrotique de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait au méthanol des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur le foie des souris infectées par *Schistosoma mansoni*.

## MATERIELS ET METHODES

### 1. Récolte de la plante et préparation de la fraction à l'acétate d'éthyle

Les racines de *Ozoroa pulcherrima* ont été récoltées dans la localité de Wakwa près de la ville de Ngaoundéré dans la région de l'Adamaoua au Cameroun en juillet 2012. La plante a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun par comparaison à l'échantillon N° 13667 SRF/Cam. L'extrait au méthanol a été préparé par macération de 4130 g de poudre dans du méthanol pendant 48 heures. La solution a été filtrée puis le solvant éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif (BUCHI B-480) à 40°C sous pression réduite. L'extrait méthanolique obtenu (rendement d'extraction : 3,34%) a été épuisé successivement à l'hexane, puis à l'acétate d'éthyle. Après évaporation du solvant, nous avons obtenu 38,23g de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait au méthanol des racines de *Ozoroa pulcherrima* (EAOp).

### 2. Infestation et traitement des animaux

Les animaux utilisés pour notre expérimentation étaient des souris blanches de la souche Balb/c âgées d'environ 60 jours. Elles ont été individuellement infestées

avec 50 cercaires de *S. mansoni* provenant des mollusques hôtes intermédiaires *Biomphalaria pfeifferi*, par la technique d'immersion de la queue et des pattes [13]. A partir du 36<sup>ème</sup> jour post-infestation, un traitement quotidien pendant 28 jours à EAOp aux doses de 100 (groupe EAOp 100), 200 (groupe EAOp 200) et 400 mg/kg (groupe EAOp 400) a été effectué. Trois groupes témoins ont été constitués : l'un de souris infestées et traitées au praziquantel (Cesol<sup>®</sup>, Merck) à la dose de 100 mg/kg pendant 5 jours (PZQ), l'autre de souris infestées et non traitées (IC), ainsi qu'un groupe de souris saines (TS). Après cette période de traitement, les animaux ont été sacrifiés au 65<sup>ème</sup> jour post-infestation.

L'utilisation des animaux dans cette étude a respecté les principes d'éthique et d'utilisation des animaux de laboratoire et la réglementation de la "Communauté Européenne" (EEC Directive 2010/63/EEC). Cette étude a été approuvée par le Comité d'Ethique Animale du Laboratoire de Physiologie Animale de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I-Cameroun.

### 3. Sacrifice et évaluation des charges parasite et ovulaire hépatique

Après anesthésie par injection de pentobarbital, les souris ont été sacrifiées puis disséquées. Elles ont été perfusées en utilisant la méthode décrite par Duvall et De Witt, 1967 [14] puis modifiée par Lewis et al., 2013 [15]. Les vers logés dans les veines mésentériques et hépatiques ont ainsi été séparément collectés par souris puis comptés au stéréo-microscope.

L'évaluation de la charge ovulaire hépatique de chaque souris a été effectuée selon le protocole décrit par Cheever et al., 1968 [16]. Le lobe gauche du foie a ainsi été dilacéré dans une solution de KOH 4% à 37°C pendant 6h. Après centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot suspendu dans du NaCl 9%. Une série de 3 lavages (centrifugation - élimination du surnageant - suspension du culot dans le liquide physiologique) a été effectuée et le culot renfermant les œufs de *S. mansoni* utilisé pour le comptage au microscope optique (objectif x10) de marque LEICA. Deux aliquots de 100 µL ont été montés sur des lames et recouverts de papier cellophane préalablement imbibé de solution de Kato-Katz. Les œufs ont été comptés par souris et leur nombre par gramme de foie évalué.

## 4. Analyses histologiques

Le lobe carré du foie a été prélevé puis fixé dans du formol à 10% tamponné, pH 7,2 pendant 4 semaines. A l'issue de la fixation, les tissus ont été déshydratés dans des bains d'éthanol de degré croissant (70% à 100%), éclaircis dans du xylène et inclus en paraffine. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été effectuées à l'aide d'un microtome (Reichert-Jung 2030, Germany). Les sections obtenues ont été dépliées dans un bain marie à 40°C et placées sur des lames porte-objet. Trois jeux de lames ont été préparés par animal, puis les lames ont été séchées dans une étuve (Memmert, Germany) à 45°C pendant 24 heures. Après séchage, les coupes ont été déparaffinées dans trois bains de xylène par séjour de 5 min/bain. Elles ont ensuite été réhydratées par passages successifs dans une série de trois bains d'éthanol 100° (10 min/bain), puis un bain d'éthanol 95° (5 min) et enfin un bain d'éthanol 70° (5 min). Les lames ont ensuite été rincées à l'eau distillée puis les colorations à l'hématoxyline-éosine (H&E), au Picrosirius (PS) et au Giemsa réalisées.

### 4.1. Coloration à l'hématoxyline-éosine

Cette coloration a été effectuée afin d'évaluer les infiltrations leucocytaires et la réaction granulomateuse liée à la schistosomiase chez la souris. Pour ce faire, après rinçage à l'eau distillée, les lames ont été immergées pendant 10 min dans un bac contenant de l'hématoxyline (Color Index (CI) 75290, Sigma-Aldrich), préparée selon Mayer, 1896 [17] pendant 10 min, puis rincées à l'eau courante du robinet pendant 10 min. Elles ont ensuite été plongées tour à tour dans un bain d'éthanol à 70% puis d'éthanol à 95% pendant 5 min et enfin contre-colorées dans une solution d'éosine Y (Color Index (CI) 45380, Sigma-Aldrich) à 0,5% dans l'éthanol à 95% pendant 5 min. Les coupes ont ensuite été déshydratées par immersion des lames dans trois bains d'éthanol à 100% (5 min/bain), puis éclaircies après trois séjours de 5 min chacun dans du xylène. Le montage des lames a ensuite été effectué à l'aide d'une lamelle après ajout de quelques gouttes de résine Pertex® (Histolab).

### 4.2. Coloration au picrosirius

Cette coloration a été entreprise pour mettre en évidence la fibrose et typer le collagène au niveau des foyers granulomateux hépatiques. Le Sirius F3BA, entrant dans la composition du picrosirius est un colorant spécifique du collagène qui

permet de différencier les collagènes I et III lorsqu'il est observé en lumière polarisée [18, 19]. La préparation des colorants est décrite ci-après.

- L'hématoxyline de Weigert a été préparée à partir d'un mélange volume/volume (v/v) d'hématoxyline alcoolique (préparée par dissolution de 1 g d'hématoxyline (Color Index (CI) 75290, Sigma-Aldrich) dans 100 mL d'éthanol à 95%) et d'une solution de chlorure ferrique acide (mélange de 11,6 g de chlorure de fer anhydre (Sigma-Aldrich) et 10 mL d'acide chlorhydrique à 25% dans 990 mL d'eau distillée).
- L'eau acétifiée à 0,5% a été obtenue à partir d'un mélange de 0,5 mL d'acide acétique glacial (Sigma-Aldrich) avec 99,5 mL d'eau distillée.
- La solution de Picrosirius a été préparée par dissolution de 0,1 g de rouge Sirius (Sirius F3B (Color Index (CI) 35782, Sigma-Aldrich) dans 100 mL d'une solution d'acide saturée picrique (référence 197378, Sigma-Aldrich).

Les lames déparaffinées et réhydratées ont été plongées dans la solution d'hématoxyline de Weigert pendant 12 min, puis rincées à l'eau courante du robinet pendant 10 min et à l'eau distillée pendant 3 min. Après ce lavage, les lames ont été introduites dans la solution de Picrosirius pendant 1 heure et différenciées dans deux bains d'eau acétifiée à 0,5% (20 à 30 secondes/bain). À l'issue de cette étape de différenciation, les lames ont été égouttées pendant deux minutes, puis déshydratées dans deux bains d'éthanol 100% (5 min/bain), éclaircies dans du xylène (3x5 min) et enfin montées sous résine Pertex® (Histolab).

### 4.3. Coloration au Giemsa

Cette coloration a été réalisée afin de mettre clairement en évidence les œufs du parasite ainsi que la larve (miracidium) qu'ils renferment.

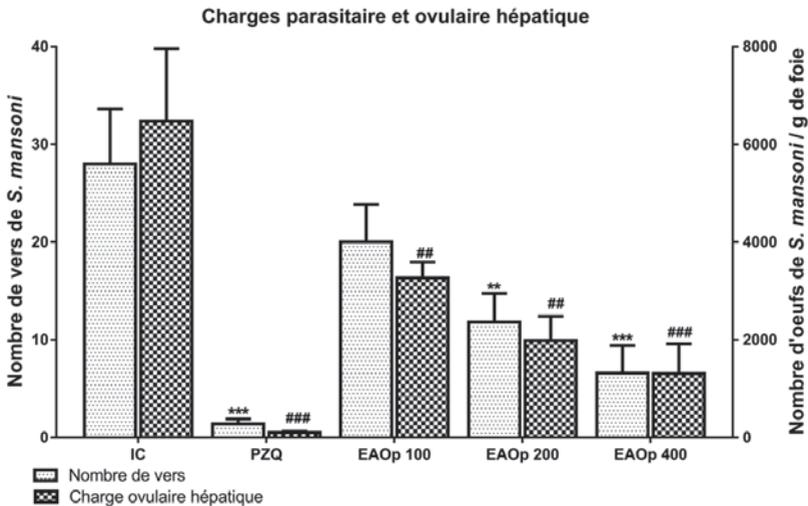
Les lames déparaffinées et réhydratées ont été plongées dans une solution de tampon phosphate pH 6,8 (Référence 95411, Sigma-Aldrich) pendant 5 min puis mises une nuit à 37°C, dans une solution de travail de Giemsa préparée à partir d'une solution mère (Référence 320300, RAL) diluée à 4% dans du tampon phosphate pH 6,8. Après refroidissement de la solution les coupes ont été différenciées sous microscope dans de l'acide acétique à 0,5% jusqu'à obtention d'un fond de coupe rose. Les lames ont ensuite été égouttées pendant deux minutes, puis déshydratées dans deux bains d'éthanol à 100% (2 min/bain), éclaircies dans du xylène (3x3 min) et montées sous résine Pertex® (Histolab).

#### 4.4. Analyses microscopiques

Après quelques heures de séchage à l'air, toutes les lames ont été observées au microscope optique (Axioscope A1, Zeiss®) connecté à une caméra digitale 3CCD 2 millions de pixels (Jai200Ge, JAI). Les images ont été capturées et analysées à l'aide des logiciels Archimed® et Histolab®, (Microvision Instruments).

## RESULTATS

Le traitement à la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait au méthanol des racines de *Ozoroa pulcherrima* (EAOp) a entraîné une réduction significative de la charge parasitaire de 57,85% ( $p < 0,01$ ) et 76,42% ( $p < 0,001$ ) aux doses de 200 et 400 mg/kg respectivement par rapport à celle des animaux infestés et non traités. Ce traitement a également entraîné une diminution significative et dose-dépendante de la charge ovulaire hépatique de 49,52% ( $p < 0,01$ ), 69,27% ( $p < 0,01$ ) et 79,98% ( $p < 0,001$ ) aux doses de 100, 200 et 400 mg/kg respectivement (**Figure 2**).

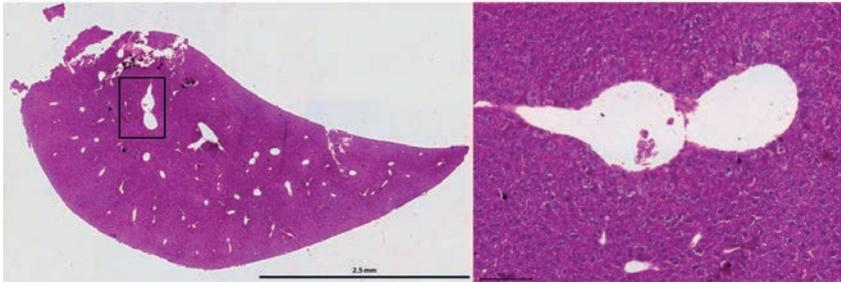


**Figure 2 :** Effets de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur la charge parasitaire et la charge ovulaire hépatique. Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  ESM ( $n = 5$ ).

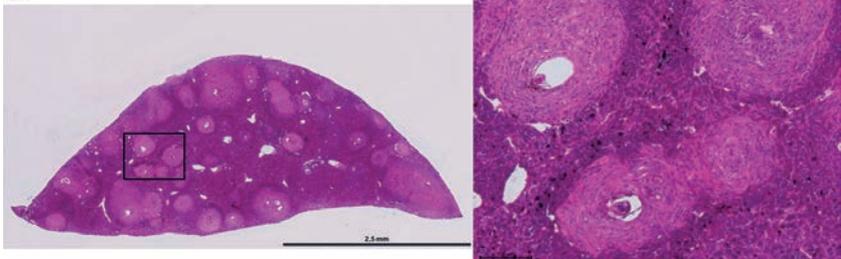
\*, # $p < 0,05$ ; \*\*, ## $p < 0,01$ ; \*\*\*, ### $p < 0,001$ : différences significatives entre les groupes tests (EAOp) et le groupe témoin (IC). IC (témoin négatif): souris infestées et non traitées; PZQ (témoin positif): souris infestées et traitées au praziquantel à 100 mg/kg; EAOp 100, EAOp 200 et EAOp 400 (groupes essais): souris infestées et traitées à la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses respectives de 100, 200 et 400 mg/kg.

La coloration H&E des coupes de foie des souris saines (TS) montre une structure hépatique normale avec des lobules hépatiques, unités structurelles et fonctionnelles du foie. Chaque lobule est composé de travées d'hépatocytes irriguées par un réseau de capillaires sinusoides qui confluent dans la veine centrolobulaire. Au carrefour de plusieurs lobules, se trouve l'espace porte de Kiernan formé d'une triade constituée par une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte et le canalicule biliaire (**Figure 3a**). Chez les souris infestées par *S.mansoni* et non traitées (IC), de nombreux et volumineux granulomes bilharziens associés à une intense infiltration leucocytaire sont visibles sur les coupes de foie colorées à H&E (**Figure 3b**). De l'observation des coupes de foie de souris infestées à *S. mansoni* puis traitées à EAOp (EAOp100 et EAOp400), il ressort que ce traitement entraîne une réduction tant du nombre que du volume des granulomes bilharziens (**Figures 3c et 3d**). Chez les souris infestées puis traitées au praziquantel (PZQ), les granulomes bilharziens sont pratiquement inexistantes sur les coupes de foie ; seules quelques cellules inflammatoires sont visibles (**Figure 3e**).

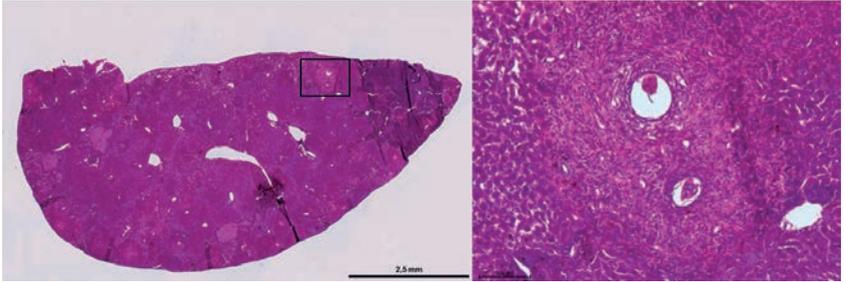
3a. TS



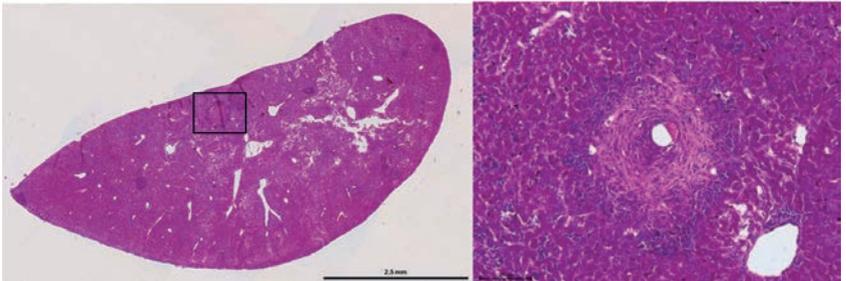
3b. IC



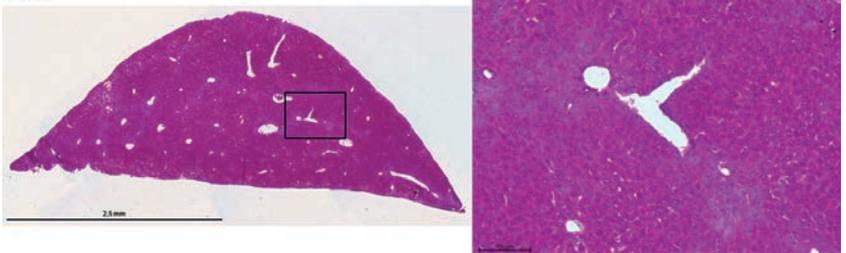
**3c. EAOp 100**



**3d. EAOp 400**



**3e. PZQ**



**Figure 3 :** Coupes histologiques du foie de souris colorées à l'hématoxyline-éosine

- TS : souris saines non traitées
- IC : souris infestées par *Schistosoma mansoni* et non traitées
- PZQ : souris infestées puis traitées au praziquantel à la dose de 100 mg/kg
- EAOp 100 : souris infestées puis traitées à la dose de 100 mg/kg de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima*
- EAOp 400 : souris infestées puis traitées à la dose de 400 mg/kg de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima*

L'infection à *S. mansoni* (groupe IC) entraîne une réponse granulomateuse intense qui est réduite après traitement à EAOp à la dose de 100 ou de 400 mg/kg (groupes EAOp 100 et EAOp 400) ou disparaît quasiment après traitement au praziquantel (groupe PZQ).

Sur des coupes de foie de souris saines (TS), la coloration au picosirius a permis de visualiser le collagène sous-endothélial coloré en rouge au niveau de la veine centrolobulaire. En polarisation, ce collagène apparaît en rouge-orangé, ce qui atteste que c'est du collagène de type I (**Figure 4a**). D'intenses foyers fibrotiques caractérisés par des dépôts importants de collagène de type 1 sont visibles sur les coupes du foie des souris infestées et non traitées (IC). La polarisation rouge-orangé du collagène au niveau des granulomes bilharziens indique que ces nodules parasitaires sont « anciens », c'est-à-dire résultent d'une infection chronique dans le temps (**Figure 4b**). Après traitement à EAOp (EAOp100 et EAOp400), il se produit une diminution des nodules parasitaires fibrotiques ; le collagène étant moins dense (**Figures 4c et 4d**). Les fibres de collagène sont absentes sur le parenchyme hépatique de souris infestées puis traitées au praziquantel (**Figure 4e**).

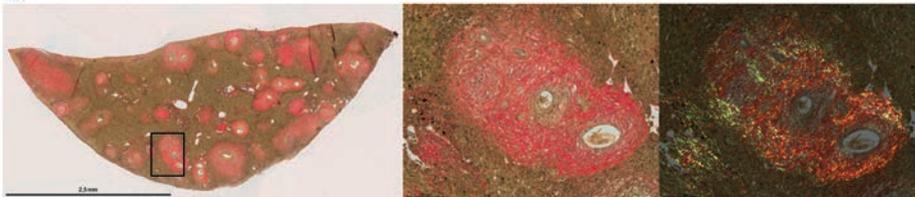
4a.

TS



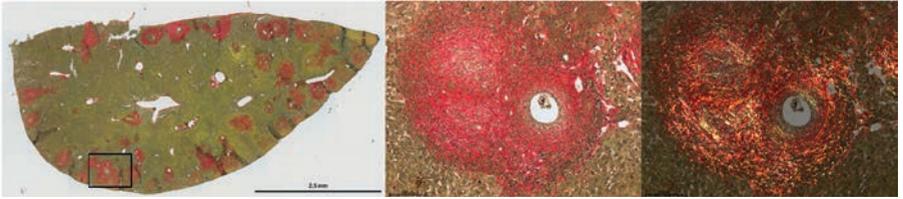
4b.

IC



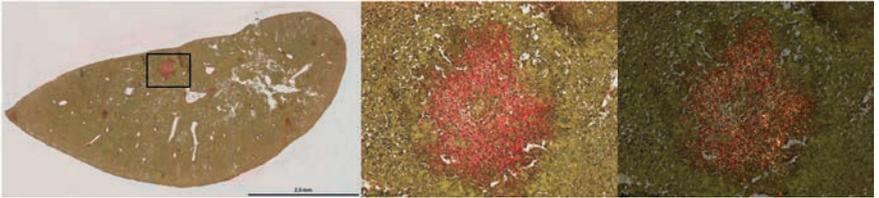
4c.

EAOp 100



4d.

EAOp 400



4e.

PZQ

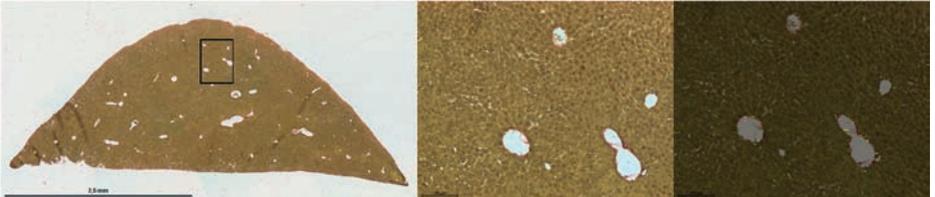


Figure 4 : Coupes histologiques du foie de souris colorées au Picrosirius

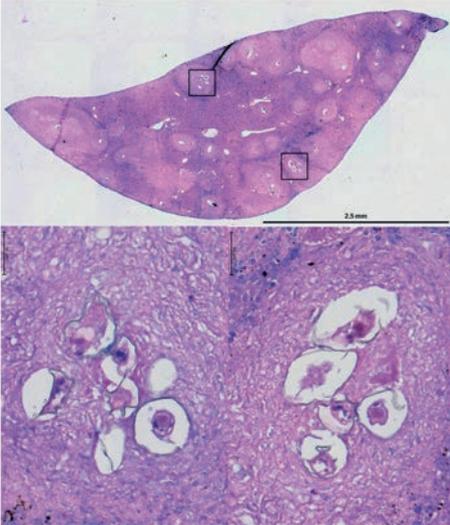
- TS : souris saines non traitées
- IC : souris infestées par *Schistosoma mansoni* et non traitées
- PZQ : souris infestées puis traitées au praziquantel à la dose de 100 mg/kg
- EAOp 100 : souris infestées puis traitées à la dose de 100 mg/kg de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima*
- EAOp 400 : souris infestées puis traitées à la dose de 400 mg/kg de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima*

Les coupes de foie des souris infestées par *S. mansoni* montrent d'intenses foyers fibrotiques qui diminuent considérablement après traitement par EAOp. Le traitement au praziquantel entraîne une quasi-disparition des fibres de collagène.

La coloration au Giemsa a permis de mettre en évidence sur des coupes de foie de souris infestées et non traitées (IC) des nodules parasitaires contenant de nombreux œufs du parasite renfermant la larve (miracidium) (**Figure 5a**). Une diminution du nombre d'œufs du parasite est observée chez les souris traitées à EAOp (**Figure 5b**).

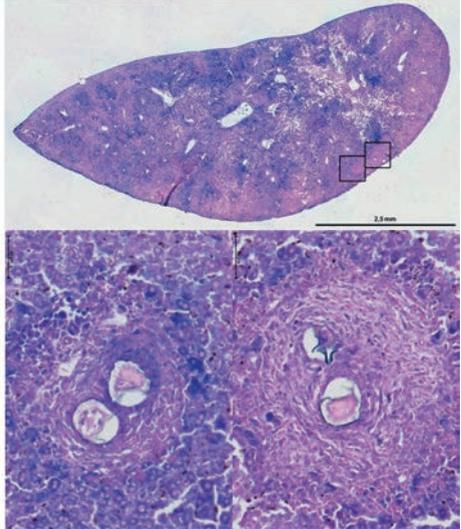
5a.

IC



5b.

EAOp 400



**Figure 5 :** Coupes histologiques du foie de souris colorées au Giemsa

- IC : souris infestées par *Schistosoma mansoni* et non traitées
- EAOp 400 : souris infestées puis traitées à la dose de 400 mg/kg de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima*

Des nodules parasitaires renfermant de nombreux œufs de *S. mansoni* sont visibles sur les coupes de foie des souris du groupe IC tandis que chez les souris traitées à EAOp, le nombre d'œufs de parasite diminue.

## DISCUSSION

Le phénomène classique associé à l'infection à *S. mansoni* est une réaction inflammatoire granulomateuse multicellulaire autour des œufs du parasite piégés dans les tissus [3, 20]. Dans le parenchyme hépatique, cette réaction inflammatoire périovulaire est mise en place pour protéger les hépatocytes contre les antigènes hépatotoxiques et cytolytiques sécrétés par le miracidium retrouvé à l'intérieur de

l'œuf du parasite. Ces antigènes entraînent en fait la lyse des cellules environnantes. La réaction inflammatoire est caractérisée par un recrutement intense de leucocytes, principalement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [20]. On y retrouve également les lymphocytes B et T CD8<sup>+</sup>, les macrophages de type M2 et les polynucléaires éosinophiles et neutrophiles [21, 22]. Simultanément, le granulome s'enrichit en fibroblastes, en fibres réticulaires, en cellules plasmiques et en fibres de collagène qui forment une architecture concentrique à l'origine d'une fibrose [21, 23]. La fibrose résulte ainsi d'un déséquilibre entre la fibrogénèse, processus actif de synthèse et de dépôt des constituants de la matrice extracellulaire (MEC) et la fibrolyse, processus de dégradation de ces constituants par les métalloprotéinases matricielles [24, 25]. Parmi les constituants de la matrice extracellulaire, les collagènes I et III sont les constituants majeurs, car représentant 95% de la MEC d'un foie fibrotique [25, 26]. A côté de la détermination des concentrations sériques des différents types de collagène, l'analyse histologique du foie constitue la méthode directe de diagnostic de la fibrose [24].

Les granulomes bilharziens sont parfaitement identifiés sur des coupes histologiques de foie colorées à l'hématoxyline-éosine où les différents types de cellules inflammatoires sont bien visibles. La coloration au picosirius quant à elle, permet de mettre en évidence la fibrose et de typer le collagène au niveau des foyers granulomateux hépatiques. En effet, le Sirius F3BA qui entre dans la composition du picosirius est un colorant spécifique du collagène qui permet de différencier les collagènes I et III lorsqu'il est observé en lumière polarisée [18, 19]. Des données de la littérature ont révélé que chez des personnes souffrant de schistosomiase hépatosplénique (*Schistosoma mansoni*) ou urinaire (*Schistosoma haematobium*), tout comme dans le modèle murin de schistosomiase à *Schistosoma mansoni* ou à *Schistosoma japonicum*, les collagènes I et III sont présents sur les coupes histologiques de foie fibrotique [24, 25, 26]. Une augmentation des concentrations sériques de procollagène III marque cependant une activité fibrogénique intense (24). Au cours de l'évolution du granulome hépatique dans l'infection à *Schistosoma mansoni* chez des souris, deux types de collagène apparaissent successivement : d'abord le collagène de type III contenant des fibres réticulaires qui est par la suite remplacé par le collagène de type I contenant des fibres de collagène [27]. La fibrose hépatique peut cependant être réversible en cas de traitement au cours de la phase aigüe de l'infection. En effet, dans le modèle murin de la schistosomiase, plusieurs auteurs ont rapporté une régression de la fibrose après traitement durant

la phase aigüe de l'infection de souris infestées au praziquantel, à la pentoxifylline ou par la plante médicinale *Sida pilosa* [25, 26, 28]. Sur les coupes histologiques de foie de souris infestées puis traitées en phase aigüe de l'infection (7<sup>ème</sup> semaine post-infection) au praziquantel, le collagène de type III est complètement absent, tandis que le collagène de type I diminue considérablement [26]. Au cours de notre étude, il ressort de l'observation des coupes histologiques de foie des souris infestées à *S. mansoni* puis traitées à la fraction à l'acétate d'éthyle de *O. pulcherrima* (EAO<sub>p</sub>) que non seulement les granulomes hépatiques sont réduits en nombre et en taille, mais également, le collagène III est absent et le collagène I est diminué de ces granulomes. Nos résultats corroborent ceux de El-Badrawy et al., 1991 [26] et ceux de Xiong et al., 2003 [25] qui ont aussi observé une diminution du collagène I des granulomes hépatiques. Dans cette étude, la réduction du nombre et de la taille des granulomes bilharziens après traitement des souris infestées par EAO<sub>p</sub> serait la conséquence de la diminution de la charge ovulaire hépatique consécutive à la diminution de la charge parasitaire. En effet, la diminution de la charge parasitaire et de la charge ovulaire hépatique des souris infestées après traitement par EAO<sub>p</sub> aux doses de 100 et 400 mg/kg semblent proportionnelles à la réduction du nombre et de la taille des foyers fibrotiques. La dose de 400 mg/kg apparaît comme étant plus efficace que celle de 100 mg/kg. La régression de la fibrose après le traitement à EAO<sub>p</sub> pourrait également faire suite à une diminution considérable de la synthèse du collagène et/ou à une augmentation de sa dégradation. EAO<sub>p</sub> pourrait ainsi inhiber la fibrogénèse et activer la régénération cellulaire [29, 30].

## CONCLUSION

Cette étude a permis de prouver l'activité anti-helminthiase de *Ozoroa pulcherrima* ainsi que son potentiel antifibrotique dans l'infection à *Schistosoma mansoni* et confirme ainsi l'utilisation empirique de cette plante. Cette plante constituerait un bon candidat pour la mise sur pied d'un médicament schistosomicide.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions l'association Pathologie, Cytologie et développement (PCD) pour la réalisation de l'étude histologique ainsi que la Fondation Internationale pour la Science (FIS) pour son appui technique dans la réalisation de la partie expérimentale de ce travail à travers le financement F / 3622-2F octroyé au Dr Jatsa Boukeng Hermine.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

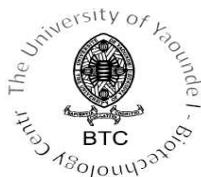
1. SARVEL AK, OLIVEIRA AA, SILVA AR, LIMA AC, KATZ N: Evaluation of a 25-year-program for the control of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. *PLoS. Negl. Trop.Dis.* 2011, **5**, e990.
2. WHO. Schistosomiasis. Fact sheet N°115, World Health Organization, Geneva, 2017.
3. LAMBERTUCCI JR, COTA GF, PINTO-SILVA RA, SERUFO JC, GERSPACHER-LARA R, DRUMMOND S: Hepatosplenic schistosomiasis in field-based studies: a combined clinical and sonographic definition. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz*, 2001, **96**, 147-150.
4. VAN DER KLEIJ D, LATZ E, BROUWERS JF, KRUIZE YC, SCHMITZ M, KURT-JONES EA: A novel host parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 48122–48129.
5. WHO. Schistosomiasis: Progress report 2001–2011 and strategic plan 2012–2020. World Health Organization, Geneva, 2013.
6. SILVA LM, MENEZES RM, DE OLIVEIRA SA, ANDRADE Z A: Chemotherapeutic effects on larval stages of *Schistosoma mansoni* during infection and reinfection of mice. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2003, **36**, 335-341.
7. TAMER E, GAMAL E: Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review. *J. Adv. Res.*, 2013, **4**, 445-452.
8. ADJANOHOUN JE, ABOUBAKAR N, DRAMANE K, EBOT ME, EKPERE JA, ENOW-OROCK EG, FOCHO D, GBILE ZO, KAMANYI A, KAMSU KOM J, KEITA A, MBENKUM T, MBI CN, MBIELE AL, MBOME IL, MUBIRU NK, NANCY WL, NKONGMENECK B, SATABIE B, SOFOWORA A, TAMZE V. & WIRMUM CK. Traditional medicine and pharmacopoeia: contribution to ethnobotanical and floristic studies in Cameroon. CSTR/OUA, CNPMS, Porto-Novo, 1996.

9. JATSA HB, FEUSSOM NG, NKONDO ET, KENFACK CM, SIMO DN, FASSI JBK, FEMOE UM, MOABOULOU C, TSAGUE CD, DONGO E, KAMTCHOUING P, TCHUEM TCHUENTE L-A: Efficacy of *Ozoroa pulcherrima* Schweinf methanolic extract against *Schistosoma mansoni*-induced liver injury in mice. *J. Trad. Complement. Med.*, 2017, in press
10. TSAGUE DC, HUSSAIN H, DONGO E, JATSA-MEGAPTCHE BH, AHMED I, KROHN K: A new alkylnacardic acid from *Ozoroa pulcherrima*. *J. Asian. Nat. Prod. Res.*, 2011a, **13**, 84-87.
11. TSAGUE DC, HUSSAIN H, DONGO E, JATSA-MEGAPTCHE BH, AHMED I. KROHN K: Two new alkylnacardic acids, Ozorcardic A and B, from *Ozoroa pulcherrima*. *Nat. Prod. Commun.*, 2011b, **6**, 1133-1134.
12. TSAGUE DC, HUSSAIN H, JATSA-MEGAPTCHE HB, SALEEM M, ABBAS G, FAROOQ M, WADAAN MAM, DONGO E, AL-HARRASI A: Ozoramide: a new ceramide from the stem bark of *Ozoroa pulcherrima*. *Chem. Nat Comp.*, 2017, **53**, 923-925.
13. SMITHERS SE, TERRY RJ: The infection of laboratory hosts with cercariae of *S. mansoni* and recovery of worms. *J. Parasitol.*, 1965, **55**, 695-700.
14. DUWALL RH, DEWITT WB: An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *Am. J. Parasitol.*, 1967, **7**, 293-297.
15. LEWIS FA, FRIETAS TC, TUCKER MS, KARUNARATNE LB, LIANG Y-S: Schistosomiasis. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2013, **19**, 1-19.
16. CHEEVER AW: Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bull. World Health Org.*, 1968, **39**, 328-331.
17. MAYER P: Uber schleimfärbung. *Mitt. Zool. Stn. Neapel.*, 1896, **12**, 303.
18. PUCHTLER H, WALDROP FS, VALENTINE LS: Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr. Pathol.*, 1973, **150**, 174-187.
19. JUNQUEIRA LC, BIGNOLAS G, BRENTANI RR: Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.*, 1979, **11**, 447-455.
20. HAMS E, AVIELLO G, FALLON PG: The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Front. Immunol.*, 2013, **4**, 1-8.
21. LENZI HL, KIMMEL E, SCHECHTMAN H, PELAJO-MACHADO M, ROMANHA SW, PACHECO GR, MARIANO M, LENZI AJ: Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biochemical approaches. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, 1998, **93**, 141-151.

22. HERBERT DR, HOLSCHER C, MOHRS M, ARENDSE B, SCHWEGMANN A, RADWANSKA M: Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immun.*, 2004, **20**, 623-635.
23. ANDRADE Z: Schistosomiasis and liver fibrosis. *Para. Immunol.*, 2009, **31**, 656–663
24. SHAHIN M, SCHUPPAN D, WALDHERR R, RISTELI J, RISTELI L, RAZEK SMM, EL RUBY O, KOCH A, SEITZ HK: Serum procollagen peptides and collagen type VI for the assessment of activity and degree of hepatic fibrosis in schistosomiasis and alcoholic liver disease. *Hepatology*, 1992, **15**, 637-644.
25. XIONG L-J, ZHU J-F, LUO D-D, ZEN L-L, CAI S-Q: Effects of pentoxifylline on the hepatic content of TGF- $\beta$ 1 and collagen in *Schistosomiasis japonica* mice with liver fibrosis. *World. J. Gastroenterol.*, 2003, **9**, 152-154.
26. EL-BADRAWY NM, ABDEL HADI AM, VOSS B, METWALLY AA, F. EBEID F: Effect of praziquantel on the distribution of interstitial collagen types I and III and basement membrane collagen types IV and V in murine hepatic schistosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1991, **85**, 752-755.
27. LENZI HL, KIMMEL E, SCHECHTMAN H, PELAJO-MACHADO M, VALE BS, PANASCO MS, LENZI JA: Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1999, **32**, 639-643.
28. JATSA HB, RUSSO RC, PEREIRA CAJ, AGUILAR AC, GARCIA CC, ARAÚJO ES, OLIVEIRA JLR, RODRIGUES VF, DE OLIVEIRA VG, ALVAREZ-LEITE JI, BRAGA FC, TCHUEM TCHUENTE L-A, KAMTCHOUING P, NEGRÃO-CORRÊA DA, TEIXEIRA MM: Improvement of the liver pathology by the aqueous extract and the *n*-butanol fraction of *Sida pilosa* Retz in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J. Ethnopharmacol.*, 2016, **180**, 114-123.
29. ANDRADE Z: Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression. *Act. Trop.*, 2008, **108** 79–82.
30. RAJENDRAN R, HEMALATHA S, AKASAKALAI KM, ADKUKRISHRA CH, SOHIL B, SUNDARAM RM: Hepatoprotective activity of *Mimosa pudica* leaves against carbon tetrachloride induced toxicity. *J. Natur. Prod.*, 2009, **2**, 116-122.

# **ANNEXE**

Centre de Recherche et Formation Doctorale, Science de la Vie, Santé et Environnement (CRFD-SVSE)  
Centre for Research and Graduate Studies in Life Health & Environment Sciences  
University of Yaoundé I (UYI)



Joint Institutional Review Board for Animal & Human Bioethics (JIRB)  
Email: [jirbsecretariat@gmail.com](mailto:jirbsecretariat@gmail.com)

21 March 2022

**Feussom Gipwe Nestor, Ph.D. Student**  
Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science  
University of Yaoundé 1

**Ethical Clearance Reference N°: BTC-JIRB2022-027** (please use this reference number for all correspondences)

**Protocol Title: « Effets pharmacologiques des extraits aqueux et méthanolique et des fractions des racines de *Ozoroa pulcherrima* Scheweinf. (Anacardiaceae) sur l'infection à *Schistosoma mansoni* chez la souris blanche BALB/c»**

**Investigator(s) Name(s):** Feussom Gipwe Nestor, Ph.D. Student; Prof. Dzeufiet Djomeni Paul Désiré & Prof. Tchuem Tchuente Louis-Albert, Supervisors.

The proposed research protocol and related documents have been reviewed and deliberated by the JIRB of the Centre for Research and Graduate Studies in Life, Health & Environment Sciences (CRFD-SVSE) at the Biotechnology Centre, UY1, on the 21<sup>st</sup> of January 2022.

The JIRB is satisfied with the current version of the research protocol and supporting documents and agreed that there is no objection on ethical grounds to the proposed study, and is therefore pleased to approve the consideration that the research team will strictly abide by the conditions of the approval below:

- Strictly follow the plan of the approved protocol. Any changes to the approved protocol will require prior JIRB approval.
- Must be promptly reported to the JIRB: (1) Any deviations from or changes to the protocol which are made to eliminate immediate hazards to the fauna/study participant; (2) All risks that may be rare or remote and especially those which may entail serious consequences or compromise potential benefits or that would affect the conduct of the research
- Must prepare and submit a standard progress report of the research study to the JIRB at completion or one year from the date of issue of the approval letter and thereafter, on an annual basis.
- Must notify the JIRB when the research is completed. Failure to submit an annual progress report on the study may affect the conditions of approval.

The current ethical clearance is given for one-year renewable, on the condition that a progress report is submitted to the JIRB. While the JIRB has given its approval for this study on a satisfactory ethical basis, the investigators must comply with animal care requirements by strictly following national and international regulations.

Sincerely,

**Professor Wilfred F. Mbacham**  
Coordinator of the CRFD-SVSE  
Chair of the JIRB



**Ass. Prof. Frederic Nico Njayou**  
Coordinator for Animal Research Bioethics, Faculty  
of Science, UYI