



UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI
FACULTE DES SCIENCES AGRONOMIQUES

Ecole doctorale : Sciences Agronomiques



THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

Option : Management des Ressources Animales

Spécialité : Biochimie-Substances-Naturelles-Santé

Présentée et soutenue par Abiodoun Pascal OLOUNLADE

Le 15 Décembre 2011

Titre :

Analyse phytochimique et propriétés anthelminthiques de *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seeman ex Bureau et de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler sur des Nématodes gastro-intestinaux animaux et humains

JURY

Pr Dominique KOKO SOHOUNHLOUE, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Dr Hervé HOSTE, Directeur de Recherche, INRA, Toulouse, France

Pr Joachim D. GBENOU, Maître de Conférences, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Pr Nicolas FABRE, Professeur Titulaire, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

Pr Alain Bertrand DONGMO, Maître de Conférences, Université de Douala, Cameroun

Pr Alexis VALENTIN, Professeur Titulaire, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

Pr Sylvie M.E HOUNZANGBE-ADOTE, Maître de Conférences, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Unité de recherche: Ethnopharmacologie et de Santé Animale

Directeur de Thèse : Pr Sylvie M.E Hounzangbé-Adoté, Maître de Conférences ; Université d'Abomey-Calavi

Superviseur de Thèse : Pr Alexis Valentin Professeur Titulaire, Université Paul Sabatier de Toulouse

Rapporteurs : Dr Hervé HOSTE, Pr Alain B. DONGMO Pr Joachim D. GBENOU

DEDI CACE

Je dédie la présente Thèse :

v A mon Père Ariori Emmanuel OLOUNLADE

v A ma Mère Thérèse A. DOMI NI QUE

Trouvez en ce travail, l'heureuse métamorphose des multiples peines et sacrifices que vous avez consentis pour faire de moi ce que je suis aujourd'hui. Cette œuvre constitue le troisième fruit de votre dévouement. Puisse Dieu vous garder longtemps parmi nous afin que vous jouissiez pleinement de ce fruit.

v A mes sœurs : A.O.J. Clotilde, O. Firmine et O. Yvette que votre soutien trouve ici leur couronnement.

v A mon frère Magloire OLOUNLADE pour toutes tes sollicitudes.

v A ma sœur Bamidélé Victoire OLOUNLADE et à mon cher Karamath AMI NOU pour le soutien inconditionnel. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude. Puisse cette thèse nous permettre de consolider d'avantage le lien fraternel et nous ouvrir la porte du bonheur.

v A mon cher ami Dr Latifou LAGNI KA, considère ce travail comme le fruit de nos efforts.

v A vous tous, mes oncles et mes tantes pour vos considérations et conseils.

v A vous tous mes cousins et mes cousines pour vos considérations et conseils.

v Enfin, à tous ceux qui témoignent d'une affection à notre endroit, nous leur exprimons toute notre sympathie.

Pascal A. OLOUNLADE

REMERCIEMENTS

A toutes les personnes qui ont permis que cette thèse se déroule dans un climat scientifique enrichissant, permettant un travail efficace.

Au **Pr. Sylvie M.E. HOUNZANGBE-ADOTE**, Maître de Conférences des Universités (CAMES) pour la confiance qu'elle m'a faite dès le premier jour en me proposant ce sujet, ses qualités intellectuelles, son esprit critique, sa disponibilité, son humilité, sa cordialité et sa modestie, durant ces quelques années de parasitologie et de collaboration scientifique très sincère et très fructueuse. Je saisis cette occasion solennelle pour lui exprimer toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude

Au **Pr. Alexis Valentin** qui a accepté m'accueillir dans l'Unité Mixte de Recherche 152 IRD de Toulouse, pour son enthousiasme constant et sans faille vis à vis de ce travail, pour ses conseils judicieux, ses blagues, ses nombreuses corrections de mes manuscrits.

Au **Pr. Isabelle Fourasté** de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse qui s'est occupée de la partie contrôle de qualité des matières premières de cette thèse. Sincère remerciement pour sa disponibilité, son enthousiasme, sa bienveillance, son intérêt pour mon travail, aussi pour m'avoir fait bénéficier de ses conseils judicieux, de ses corrections de mes manuscrits et de ses avis éclairés.

Au **Pr. Claude Moulis**, Professeur de pharmacognosie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse, qui m'a accueilli dans le Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Paul Sabatier de Toulouse pour les travaux en Pharmacognosie. Je garde en mémoire ses grandes qualités, tant humaines qu'intellectuelles, sa gentillesse et surtout son humour...

Au **Pr. Jean-François Magnaval** et à tout le personnel du Service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse, Rangueil qui ont bien voulu m'accueillir pour l'appropriation des techniques et la production massive des larves de *Strongyloides ratti* et *Strongyloides stercoralis*.

Au **Pr. Benjamin Fayomi** de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA) pour m'avoir soutenu moralement.

Au **Pr. Mensah Guy Apollinaire** de l'Institut National des Recherches Agricoles du Bénin pour sa franche collaboration.

Au **Dr Nicolas Fabre** pour ses conseils avisés en matière de phytochimie lors du fractionnement bio-guidé. Il a participé de façon très active à mon encadrement en m'accordant de ses temps précieux. Qu'il reçoive à travers cette thèse mes respectueux hommages.

Au **Dr Hervé Hoste** de l'équipe "Interaction tanins-nématodes digestifs" de l'UMR 1225 INRA/DGER "Interaction Hôte-Agent Pathogène", pour m'avoir accueilli chaleureusement dans son laboratoire lors de mes premiers jours en France avec la plus grande bienveillance. Ses conseils judicieux m'ont guidé tout au long de ce travail. En témoignage de ma profonde gratitude, trouvez ici mes remerciements les plus sincères.

Au **Pr. Joachim D. GBENOU**, Maître de Conférences des Universités (CAMES), pour avoir accepté de diriger mes différents points de thèse et pour son soutien technique et moral.

Au **Dr Ha Tam Bang**, pour ses conseils avisés en matière de phytochimie lors des fractionnements bio guidé, sa disponibilité, son enthousiasme, sa sympathie, la persévérance dont elle a fait preuve pendant ces années de collaboration et pour ses corrections multiples de mes manuscrits.

Au **Dr Alain Dongmo** de l'Université de Douala, Cameroun, pour les bons moments partagés ensemble au Bénin puis en France.

Au **Dr Gbaguidi A. Fernand** qui m'accueilli dans l'annexe du Laboratoire de Pharmacognosie, sis au Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique (CBRST) annexe de Porto-Novo pour les travaux de Pharmacognosie au Bénin.

A **Eric Leroy** et à **Catherine Claparols** de l'Université Paul Sabatier, Toulouse pour l'aide qu'ils m'ont apporté lors des analyses en spectrométrie de masse et GC / MS.

Phytochimie et propriétés anthelminthiques de *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seeman Ex Bureau et de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler sur des Nématodes gastro-intestinaux animaux et humains

A **Lyse Campo**, technicienne du Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Paul Sabatier de Toulouse. Merci pour ton aide précieuse lors des extractions et des dosages.

A **Valérie Cristofoli** pour son aide technique dans le traitement des photos d'anatomie, des plaques de chromatographie sur couche mince.

A L'équipe de **l'UMR 152 IRD/UPS** du **Pr. Françoise Nepveu** "Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores redox" pour m'avoir toujours accueilli lors de mes différents séjours en France dans l'Unité avec amitié.

Au laboratoire "Interaction tanins- Hôte-Agent Pathogène" de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse (ENVT) : **Dr Fotini Manolaraki, Dr Cintli Martinez-Ortiz de Montellano, Eric Pardo, Célia** ; merci pour votre disponibilité, votre bonne humeur et votre aide lors de mes séjours en France.

Aux membres de l'annexe du laboratoire de Pharmacognosie sis au Centre Béninois de la Recherche Scientifique, annexe de Porto-Novo : **Matias Ableto, Bamigbola bouraïma, Rafiou** ... ; merci pour votre assistance technique.

Aux membres du **Laboratoire d'Ethnopharmacologie et de Santé Animale (LESA)** de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Université d'Abomey-Calavi : **Erick, Isabelle, Guénolé, Yétognon, Irvine, Philémon, Francis, Nadège** ; merci pour votre bonne humeur inattaquable, votre convivialité et votre gentillesse sans borne et pour l'atmosphère propice au fonctionnement plus ou moins énergique de mes neurones. Je souhaite également bon courage à **Erick Virgyle Bertrand Azando**, dont le sujet de thèse complète le mien, pour la fin de sa rédaction. Aux étudiants en DEA, Master et aux autres doctorants, bonne continuation et bon courage pour la suite ...

Je tiens à exprimer ma plus vive gratitude à tous les enseignants de l'Ecole Doctorale de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Université d'Abomey-Calavi, particulièrement ceux du Département de la Production Animale pour m'avoir autorisé à suivre cette formation doctorale.

Comment faire figurer certaines personnes sans en froisser d'autres ? Je ne nommerai donc ici que les personnes que j'ai côtoyées au sein du laboratoire de Zootechnie : **Pr. Marcel**

Phytochimique et propriétés anthelminthiques de *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seeman Ex Bureau et de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler sur des Nématodes gastro-intestinaux animaux et humains

Houinato, Pr. N'Diaye Mama Adamou, Pr. Marcel Sènou, Pr. Claude Adandédjan, Dr Florian Daga, Dr Sévérin Babatoudé, Dr Christophe Chrysostome, Dr Armand Gbagboché, Dr Sébastien Adjolohoun, Dr René Nonfon, Dr Frédéric Houndonougbo, Evariste Aïssi, Aristide Adjovi, Marie-Ange Gbaguidi et Appolinaire EFFIO pour la bonne ambiance qu'ils y ont fait régner.

Je tiens à exprimer ma gratitude à tous les Directeurs et Censeurs des CEG Calavi, Godomey, Sainte Famille, Saint Augustin et Sainte Félicité, mais particulièrement à **Singbo Bendjamin, Amoussou Joseph, Soglo Pascal, Lisboa Pierre, Sœur Dagba Félicité, Ahimakin Théodore, Gambiala Dieu Donné, Badotodé Georges, Kouessi...**

Je remercie tous les Inspecteurs, les Conseillers Pédagogiques et Professeurs de Sciences physiques notamment **MM. Dadjo Basile, Houkpatin Kpedokpo, Zannoukpitti Casmir, Donhouédé Zacharie, Ahoglè Daniel, Affouda Bonaventure, Abou Nourou, Karima, Touré Adisa, Djohou Daniel, Yessoufou Arouna, Hadé Benjamin, Youssao Allassane, Agbomahèna Marcaire, Bancolé Paul, Lakoussan Abraham, M^{me} Allidé Germaine, MM. Gbinlo Michael, Fatoki Prince.....**

Mes remerciements sont particulièrement adressés à **Angèle, Agathe, Katel, Junior, Trésor, et Kathleen** pour m'avoir soutenu et encouragé durant ces années d'études universitaires, qui ne pourront que rester inoubliables pour nous.

Enfin, notre travail de thèse a été réalisé grâce au soutien financier :

Du **Ministère du travail** et de la **Fonction Publique du Bénin** par ma mise en stage dans la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Université d'Abomey-Calavi au Bénin.

De l'**Agence Universitaire de la Francophonie** (AUF) par l'attribution d'une bourse d'alternance Cotonou-Toulouse- Cotonou (2008-2009).

Du **Gouvernement Français** à travers les responsables du projet **CORUS₂ 6040** (Coopération pour la Recherche Universitaire et Scientifique) par le financement de l'achat du matériel pour la réalisation des travaux de recherche au Bénin, du voyage et du séjour en France (2010-2011).

Du **Service National de la Recherche Agricole** (SNRA) et l'**Institut National des Recherches Agricoles du Bénin** (INRAB) à travers le programme APRA 2006 par le financement des essais *in vivo*.

Du **Projet AHRES** (Appui à la Restructuration et à l'Harmonisation de l'Enseignement Supérieur) pour le déplacement d'une partie des membres du Jury de notre Thèse (France-Bénin-France).

De l'**Université d'Abomey-Calavi du Bénin**, par le financement du déplacement du reste des membres du Jury de notre Thèse.

LISTE DES PUBLICATIONS

Cette thèse est structurée sous forme d'une compilation d'articles scientifiques publiés, acceptés ou soumis pour publication dans les revues scientifiques suivantes : Veterinary Parasitology, Annales des Sciences Agronomiques (ASA) du Bénin, Revue de la médecine vétérinaire (RMV), International Journal of Biological and Chemical Sciences (IJBCS), Parasitology Research, Pharmaceutical Biology, African Journal of Agricultural Research (AJAR).

Articles publiés, intégrés dans la thèse :

1. Olounladé A.P., Azando E.V.B., Hounzangbé-Adoté M.S., Tam Ha T. B., Moulis C., Fabre N. Fourasté I. ; Hoste H., Valentin A., 2011. Etude *in vitro* de l'effet des tanins de *Newbouldia laevis* et de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* sur la migration des larves infestantes de *Haemonchus contortus*. Int. J. Biol. Chem. Sci. , 5 : 1414-1422

2. Olounladé A.P., Azando E.V.B., Hounzangbé-Adoté M.S., Tam Ha T. B., Moulis C., Fabre N. ; Hoste H., Valentin A., 2011. *In vitro* anthelmintic activity of essential oils of *Zanthoxylum zanthoxyloides* and *Newbouldia laevis* against *Strongyloides ratti* . Online in Parasitology Research DOI 10.1007/s00436-011-2645-4

3. Olounladé A.P., Hounzangbé-Adoté M.S., Azando E.V.B, Gbaguidi F., Attakpa E. Y., Tam Ha T. B., Moudachirou M., Hoste H., Valentin A., 2011. *In vitro* study on the role of the tannins of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* on infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. Accepté sous révision dans African Journal of Agricultural Research, (réf AJAR-11-1353)

4. Azando E.V.B., Hounzangbé-Adoté M.S., **Olounladé P.A.**, Brunet S., Fabre N., Valentin A., Hoste H., 2011. Involvement of tannins and flavonoids in the *in vitro* effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. Online in Veterinary Parasitology, 180, 292-297

5. Olounladé A.P., Azando E.V.B., Hounzangbé-Adoté S.M., Attakpa E.Y., Daga D.F., Hoste H., Valentin A., 2011. Effets anthelminthiques *in vivo* d'extrait de *Newbouldia laevis* sur les nématodes parasites gastro-intestinaux des ovins Djallonké. Annales des Sciences Agronomiques du Bénin. 15: 137-152

AUTRES ARTICLES PUBLIES, NON INTEGRES DANS LA THESE:

1. Azando E.V.B., **Olounladé A.P.**, Hounzangbé-Adoté M.S., Tam Ha T. B., Fabre N., Valentin A., 2011. Contrôle des parasitoses gastro-intestinales ovines par l'huile essentielle de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* (*Fagara zanthoxyloïdes*). Revue de Médecine Vétérinaire, Vd F.11.0202.1

2. Azando E.V.B., **Olounladé A.P.**, Hounzangbé-Adoté M.S., Hoste H., 2011. Effets anthelminthiques *in vivo* de la poudre de feuilles de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* et de *Newbouldia laevis* sur les nématodes parasites gastro-intestinaux des chevreaux Djallonké. International Journal of Biology and Chemical Sciences 5 (3) : 1054-1062

3. E.Y. Attakpa, **P.A. Olounladé**, R.H. Bosma, 2010 : Comparative study of the resistance of broilers to colisepticaemia after vaccination against infectious bursal disease and *Escherichia coli* inoculation. Annales de l'Université de Parakou, Bénin. 1: 90-98.

4. Ossokomack M., Kop L.D., Nack J., Mtonfo A. K., Azebaze A.G.B., **Olounladé A.P.**, S.M. Hounzangbé-Adoté, Dongmo A.B., 2011. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of *Daniella oliveri* (Verbenaceae) *Anogeissus leiocarpus* (Combretaceae) against *Haemonchus contortus*. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances (Accepté pour publication).

COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS :

1. Azando E.V.B., **Olounladé A.P.**, Hounzangbé-Adoté S., Hoste H., 2006. Traitement des parasitoses gastro-intestinales des petits ruminants par le *Zanthoxylum Zanthoxyloïdes* sous forme de poudre de feuilles et d'huiles essentielles. 3^e Atelier scientifique de l'INRAB, Abomey-Calavi, 16-19 Décembre 2006. Cotonou, Bénin.

2. Olounladé A.P., Azando E.V.B., Hounzangbé-Adoté S.M., Hoste H., 2007. Effets anthelminthiques de *Newbouldia laevis* sur les nématodes parasites gastro-intestinaux des ovins Djallonké. 1^{er} Colloque international des sciences cultures et technologies de l'Université Abomey Calavi du 25 au 29 juin 2007. Cotonou, Bénin.

3. Olounladé A.P., Attakpa E.Y., Azando E.V.B., Hoste H. And Hounzangbé-Adoté M.S., 2007. Anthelmintic effects of *Newbouldia laevis* on parasitic nematodes of the gastrointestinal tract of sheep. The 2st International Conference of World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. 19th- 23rd August 2007, Gent, Belgium.

4. Hounzangbe-Adote M. S., Azando, E. V. B., **Olounladé A.P.**, Valentin A. , Hoste H., 2009. Effet *in vitro* des extraits de deux plantes tropicales sur la migration larvaires de quelques nématodes parasites gastro-intestinaux ; Congrès constitutif de la Société Béninoise de Parasitologie- Mycologie (SOBEPAM), les 14, 15 et 16 janvier 2009, Cotonou, Bénin.

5. Azando E.V.B., **Olounladé P. A.**, Valentin A., Hoste H., Hounzangbé-Adoté M. S., 2009. Effet *in vitro* d'extraits de deux plantes tropicales *Newbouldia laevis* et *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* sur les larves infestantes de nématodes parasites gastro-intestinaux de petits ruminants, Congrès de Parasitologie de la Société Française de Parasitologie et de Mycologie, du 16 au 18 juin 2009 Poitiers, France.

6. Azebaze A.G.B., **Olounlade A.P.**, Hounzangbe-Adote S.M., Dongmo A.B., Nack J., Kop D.L., 2010. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of *Daniella oliveri* (Verbenaceae) against *Haemonchus contortus*., 3^{ème} Edition des rencontres biannuelles du consortium EG@. Septembre 2010 à Yaoundé.

7. Olounladé A.P., Azando E.V.B., Hounzangbé-Adoté M.S., Moulis C., Fabre N. ; Hoste H., Valentin A., 2010. Recherche bio guidée de molécules potentiellement anthelminthiques dans la biodiversité béninoise : *Newbouldia laevis* et *Zanthoxylum zanthoxyloïdes*. Atelier International de valorisation des programmes Corus et Aires Sud en sciences médicales, pharmaceutiques et vétérinaires du 22-26 Novembre 2010, Bobo Dioulasso, Burkina Faso.

8. Olounladé A.P., Azando E.V.B., Hounzangbé-Adoté M.S., Tam Ha T. B., Moulis C., Fabre N. ; Fourasté I., Hoste H., Valentin A., 2011. *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* (Lam.)

Zepernick & Timler (Rutaceae) used in folk medicine: anatomical, phytochemical, and biological studies". 12^{èmes} Rencontres Nationales Société Française de Pharmacie de la Méditerranée Latine (SFPML), du 11 et 12 septembre 2011 à Toulouse.

9. Olounladé A.P., Azando E.V.B., Hounzangbé-Adoté M.S., Tam Ha T. B., Moulis C., Fabre N. ; Fourasté I., Hoste H., Valentin A., 2011. Effet *in vitro* de *Newbouldia.laevis* et de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes*, deux plantes tropicales sur *Strongyloïdes stercoralis* parasite gastro-intestinal de l'Homme. 12^{èmes} Rencontres Nationales Société Française de Pharmacie de la Méditerranée Latine (SFPML), du 11 et 12 septembre 2011 à Toulouse.

10. Olounladé A.P., Azando E.V.B., Hounzangbé-Adoté M.S., Tam Ha T. B., Moulis C., Fabre N. ; Fourasté I., Hoste H., Valentin A., 2011. *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seeman ex Bureau (Bignoniaceae) used in folk medicine: anatomical features, preliminary phytochemical analysis and anthelmintic activity". III^{ème} Colloque des Sciences, Cultures et Technologies du 6 au 10 Juin 2011. CEVRA, Cotonou, Bénin.

11. Olounladé A.P., Azando E.V.B., Hounzangbé-Adoté M.S., Tam Ha T. B., Leroy E., Moulis C., Fabre N., Hoste H., Valentin A., 2011. Détermination par couplage GC/TOF des différents composants des huiles essentielles de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* et *Newbouldia laevis*. Congrès National de Spectrométrie de masse des 19 et 20 septembre 2011. Avignon, France

12. Azando E.V.B., **Olounladé A.P.**, Hounzangbé-Adoté, M.S., 2011. Contrôle des parasitoses gastro-intestinales ovines par l'huile essentielle de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* (Fagara) 6^{ème} Colloque International Turin-Sahel du 28 février au 02 mars 2011. Cotonou, Bénin

13. Olounladé P. A., Azando E. V. B.; Hounzangbé-Adoté M. S., Ha T. D., Fabre N., Moulis C., Hoste H., Valentin A., 2011. Activités anthelminthiques *in vitro* de quelques plantes antiparasitaires de la pharmacopée béninoise. 6^{ème} Colloque International Turin – Sahel Bénin du 28 février au 02 mars 2011. Cotonou, Bénin

14. Azando E.V.B, **Olounladé P.A.**, Hounzangbé-doté M.S., Gayrard V., Donnan A.A., Fabre N., Valentin A., Franck J., Hoste H., 2011. *In vitro* effects of two tropical plants on

resistant of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. Advances in the knowledge of parasite resistance of ruminant hosts and parasites. September 26th to October 7th, 2011. São Paulo, Brazil.

15. Olounladé P.A., Valentin A., 2011. Effet in vitro de *Newbouldia laevis* et de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes*, deux plantes tropicales sur *Strongyloïdes stercoralis* parasite gastro-intestinal de l'Homme. Concours de posters scientifiques deuxième édition 2011, Coopération scientifique France-Bénin (11^e prix)

16. Olounladé A.P., Azando E.V.B., Hounzangbé-Adoté M.S., Tam Ha T. B., Leroy E., Moulis C., Fabre N., Hoste H., Valentin A., 2011. Identification et évaluation de l'activité anthelminthique des huiles essentielles de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* et de *Newbouldia laevis*. 18th Annual Conference of the Cameroon Biosciences Society. 1^{er} au 3 Décembre 2011, Douala, Cameroun.

TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	III
REMERCIEMENTS.....	IV
LISTE DES PUBLICATIONS.....	I
TABLE DES MATIERES.....	VI
LEXIQUE DE BOTANIQUE.....	XI
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
ABREVIATIONS.....	XV
RESUME.....	XVI
INTRODUCTION.....	XX
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. CARACTERISTIQUES DES ZONES DE COLLECTE DES PLANTES ET DES TESTS <i>IN VIVO</i>.....	6
1.1. <i>Caractéristiques des zones de collecte des plantes.....</i>	6
1.2. <i>Caractéristiques de la zone de réalisation des tests in vivo sur les petits ruminants.....</i>	8
2. PARASIToses GASTRO-INTESTINALES.....	10
2.1. <i>Strongyloses gastro-intestinales des petits ruminants.....</i>	10
2.1.1. <i>Classification et taxonomie des nématodes, parasites gastro-intestinaux des petits ruminants.....</i>	12
2.1.2. <i>Morphologie des nématodes gastro-intestinaux des ovins.....</i>	12

2.1.2.1.	Structure générale.....	12
2.1.2.2.	Système digestif des strongles (Robert, 2006)	13
2.1.2.3.	Système excréteur des strongles.....	13
2.1.2.4.	Système reproducteur des strongles.....	13
2.1.2.4.1.	Système femelle des strongles.....	13
2.1.2.4.2.	Système mâle des strongles.....	14
2.1.3.	<i>Haemonchus contortus</i>	15
2.1.4.	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	16
2.1.5.	Cycle évolutif des strongles digestifs.....	16
2.1.5.1.	Phase exogène.....	16
2.1.5.2.	Phase endogène.....	17
2.1.6.	<i>Epidémiologie</i>	19
	Agents pathogènes	19
2.2.	Anguillulose.....	20
2.2.1.	<i>Biologie des anguillules</i>	20
2.2.1.1.	Classification et taxonomie des anguillules	20
2.2.1.2.	Cycle évolutif de <i>S. stercoralis</i>	21
2.2.1.3.	Morphologie de <i>S. stercoralis</i>	22
2.2.2.	Répartition géographique.....	24
2.2.3.	<i>Epidémiologie</i>	25
2.2.3.2.	Modalités de contamination	26
2.2.4.	Physiopathologie	27
2.3.	Lutte contre les parasitoses gastro-intestinales.....	27
2.3.1.	Lutte contre les strongyloses gastro-intestinales des petits ruminants	27
2.3.3.	Molécules anthelminthiques disponibles et leurs modes d'action	29
2.3.4.	Apparition de chimiorésistances.....	31
2.3.4.1.	Définition et importance de la chimiorésistance.....	31
2.3.4.2.	Mécanismes de développement des résistances.....	32
2.3.5.	SOLUTIONS ALTERNATIVES : LA LUTTE INTEGREE NON CHIMIQUE	
CONTRE LES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX.....	32	
2.3.5.1.	Diminution de la contamination du milieu extérieur	33
2.3.6.	Traitement de la parasitose par les molécules anthelminthiques naturelles.....	37
2.3.6.1.	Les flavonoïdes	37
2.3.6.2.	Tanins	39
2.3.6.2.1.	Tanins hydrolysables	39
2.3.6.2.2.	Tanins condensés.....	40
2.3.6.3.	Huiles essentielles	42
2.3.6.4.	Alcaloïdes	43

3. GENERALITES SUR LES PLANTES DE *N. LAEVIS* ET *Z. ZANTHOXYLOÏDES* **44**

3.1.	Description du genre <i>Newbouldia</i>.....	44
3.2.	Espèce <i>Newbouldia laevis</i>.....	44
3.2.1.	Appellation.....	44
3.2.2.	Classification dans la famille des <i>Bignoniaceae</i>	44
3.2.3.	Synonymes.....	44
3.2.4.	Description botanique.....	46
3.2.5.	Travaux récents sur <i>N. laevis</i>	48
3.2.5.1.	<i>Composition chimique de l'espèce N. laevis</i>	48
3.2.5.2.	Travaux biologiques sur <i>N. laevis</i>	49
3.2.6.	<i>Utilisation dans la médecine traditionnelle</i>	50
3.2.7.	Toxicité de <i>N. laevis</i>	51
3.3.	Espèce <i>Z. zanthoxyloïdes</i>	52
3.3.1.	Classification botanique dans la famille des <i>Rutaceae</i>	52
3.3.2.	Appellation.....	52
3.3.3.	Synonymes.....	53
3.3.4.	Travaux récents sur <i>Z. zanthoxyloïdes</i>	56
3.3.4.1.	<i>Composition chimique de l'espèce Z. zanthoxyloïdes</i>	56
3.3.4.2.	<i>Les activités biologiques de l'espèce Z. zanthoxyloïdes</i>	59
3.3.5.	<i>UTILISATION DANS LA MEDECINE TRADITIONNELLE</i>.....	61
3.3.6.	Toxicité de <i>Z. zanthoxyloïdes</i>	62

ETUDE PERSONNELLE 64

OBJECTIFS 65

CHAPITRE I..... 67

CARACTERISATION BOTANIQUE DES PLANTES 67

1- CARACTERISATION BOTANIQUE DES PLANTES DE *N. LAEVIS* ET DE *Z. ZANTHOXYLOÏDES* RECOLTEES AU BENIN 68

ARTICLE 1 : *NEWBOULDIA LAEVIS* (P. BEAUV.) SEEMAN EX BUREAU (BIGNONIACEAE) AND *ZANTHOXYLUM ZANTHOXYLOIDES* (LAM.) ZEPERNICK

Phytochimique et propriétés anthelminthiques de *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seeman Ex Bureau et de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* (Lam.) Zepernick et Timler sur des Nématodes gastro-intestinaux animaux et humains

& TIMLER (RUTACEAE) USED IN FOLK MEDICINE: ANATOMICAL FEATURES, PRELIMINARY PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTHELMINTIC ACTIVITY.86

CHAPITRE II..... 112

ARTICLE 2: *IN VITRO* ANTHELMINTIC ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OILS OF *ZANTHOXYLUM ZANTHOXYLOIDES* AND *NEWBOULDIA LAEVIS* AGAINST *STRONGYLOIDES RATTI*..... 122

ARTICLE 3: *VARIABILITY OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF NEWBOULDIA LAEVIS* AND *ZANTHOXYLUM ZANTHOXYLOIDES* RELATED TO *ENVIRONMENTAL FACTORS*..... 129

CHAPITRE III 157

IDENTIFICATION DES FRACTIONS ACTIVES ET QUANTIFICATION DES GROUPES CHIMIQUES RESPONSABLES DE L'ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE DE *N. LAEVIS* ET *Z. ZANTHOXYLOIDES* 157

TABLEAU 9 : FRACTIONS PREPAREES A PARTIR DES FEUILLES DE *N. LAEVIS* ET *Z. ZANTHOXYLOIDES*..... 169

PARTIE UTILISEE 169

FEUILLES 169

FEUILLES 169

ARTICLE 4 :INVOLVEMENT OF TANNINS AND FLAVONOIDS IN THE *IN VITRO* EFFECTS OF *NEWBOULDIA LAEVIS* AND *ZANTHOXYLUM ZANTHOXYLOIDES* EXTRACTS ON THE EXSHEATHMENT OF THIRD-STAGE INFECTIVE LARVAE OF GASTRO-INTESTINAL NEMATODES 173

ARTICLE 5 : ETUDE <i>IN VITRO</i> DE L'EFFET DES TANINS DE <i>NEWBOULDIA LAEVIS</i> ET DE <i>ZANTHOXYLUM ZANTHOXYLOÏDES</i> SUR LA MIGRATION DES LARVES INFESTANTES DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>.	179
ARTICLE 6: <i>IN VITRO</i> STUDY ON THE ROL OF THE TANNINS OF <i>NEWBOULDIA LAEVIS</i> AND <i>ZANTHOXYLUM ZANTHOXYLOIDES</i> ON INFECTIVE LARVAE OF <i>TRICHOSTRONGYLUS COLUBRIFORMIS</i>.	187
CHAPITRE IV.....	206
EVALUATION <i>IN VIVO</i> DE L'EFFET ANTHELMINTHIQUE D'EXTRAIT DE <i>N. LAEVIS</i> SUR LES NEMATODES PARASITES GASTRO-INTESTINAUX DES OVINS DJALLONKE	206
ARTICLE 7 : EFFETS ANTHELMINTHIQUES <i>IN VITRO</i> D'EXTRAITS DE FEUILLES DE <i>NEWBOULDIA LAEVIS</i> SUR LES NEMATODES PARASITES GASTRO-INTESTINAUX DES OVINS DJALLONKE.....	209
CHAPITRE V.....	225
DISCUSSION GENERALE	225
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	235
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	240
ANNEXES.....	266

LEXIQUE DE BOTANIQUE

Apex : sommet.

Carpelles : définissent les organes reproducteurs femelles formant le pistil ou gynécée.

Glabre : dépourvu de poils.

Monoaperturé : se dit d'un pollen présentant un seul pore (ou fente de sortie).

disparaît lors de la croissance de l'embryon. S'il persiste dans la graine, il est alors appelé périsperme.

Oppositifolié : inséré du côté opposé d'où naît la feuille.

Ovaire supère : l'ovaire est inséré dans la fleur au-dessus des pétales et sépales.

Pennée (nervation) : une nervure principale et des nervures secondaires régulièrement disposées de chaque côté.

Périanthe : l'ensemble des pétales (corolle) et des sépales (calice).

Péricarpe : enveloppe du fruit, provenant du développement des parois du carpelle.

Périsperme : tissu de réserve, diploïde, d'origine maternelle qui est le nucelle.

Placentation : désigne la disposition des ovules à l'intérieur de l'ovaire. Une placentation basilaire indique que les ovules sont fixés à la base des carpelles.

Stipules: petites pièces foliacées, à la base du pétiole, au niveau de son insertion sur la tige.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1:** Evolution de la pluviométrie, de l'ETP et de la température au Sud-Bénin
- Figure 2:** Schéma du tube digestif des ruminants
- Figure 3 :** Femelle adulte de *H. contortus*
- Figure 4:** Schéma général d'une larve L₃
- Figure 5 :** Cycle évolutif des strongles digestifs
- Figure 6 :** Cycle évolutif de *S. stercoralis*
- Figure 7:** Œuf de *S. stercoralis*
- Figure 8 :** Larve rhabditoïde de *S. stercoralis*
- Figure 9 :** Larve strongyloïde de *S. stercoralis*
- Figure 10 :** Répartition géographique de l'anguillulose
- Figure 11 :** Origine biosynthétique des flavonoïdes
- Figure 12.** Modèle de structure branchée des tannins condensés
- Figure 13 :** Structure de quelques composés rencontrés dans les huiles essentielles
- Figure 14 :** Répartition géographique de l'espèce *N. laevis* en Afrique
- Figure 15 :** Répartition géographique de l'espèce *N. laevis* en Afrique
- Figure 16 :** Structure de quelques flavonoïdes rencontrés dans *N. laevis*
- Figure 17:** *N. laevis* dont les branches ont été coupées jusqu'au tronc dans une cours pour la purification
- Figure 18 :** Répartition géographique de *Z. zanthoxyloïdes* en Afrique
- Figure 19:** Rameau de *Z. zanthoxyloïdes*
- Figure 20 :** Structure de quelques exemples d'alcaloïdes isolés de *Z. zanthoxyloïdes*
- Figure 21 :** Structure de quelques exemples flavonoïdes isolés de l'espèce *Z. zanthoxyloïdes*
- Figure 22 :** Structure de quelques exemples de composés volatiles isolés *Z. zanthoxyloïdes*
- Figure 23 :** *N. laevis* (P. Beauv.) Seeman ex Bureau
- Figure 24 :** *N. laevis* : Foliole en section transversale, Schéma général
- Figure 25 :** *N. laevis* : Foliole en section transversale-Détail au niveau de la nervure
- Figure 26 :** *N. laevis* : Foliole en section transversale , Détail au niveau du limbe
- Figure 27 :** *N. laevis* : Foliole en section transversale
- Figure 27 :** *N. laevis* : Foliole en section transversale
- Figure 28 :** *N. laevis* : Foliole pulvérisée
- Figure 29 :** *Z. zanthoxyloïdes* (Lam.) Zepernick et Timler
- Figure 30 :** Détail de la face inférieure de la foliole

Figure 31 : *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* Foliole en section transversale

Figure 31 : *Z. zanthoxyloïdes* : Foliole en section transversale

Figure 32 : *Z. zanthoxyloïdes* : Limbe en section transversale

Figure 33 : *Z. zanthoxyloïdes* (G x 400) C-Poche sécrétrice schizolysigène D-Détail du système conducteur E-en lumière polarisée

Figure 34 : *Z. zanthoxyloïdes* (Lam.) Zepernick et Timler

Figure 35 : Clevenger-type apparatus

Figure 36 : Cinétique d'hydrodistillation : A : de la poudre de feuilles de *N. laevis* et B : de la poudre des graines de *Z. zanthoxyloïdes* en fonction du temps

Figure 37: Structures chimiques des composés majoritaires de l'huile essentielle de *N. laevis*

Figure 38 : Structures chimiques des composés majoritaires de l'huile essentielle de graines de *Z. zanthoxyloïdes*

Figure 39 : Chromatogrammes : A. Huile essentielle de feuilles de *N. laevis* (DB5-ms) B. Huile essentielle des graines de *Z. zanthoxyloïdes* (DB5-ms)

Figure 40 : Schéma général de l'extraction des plantes

Figure 41 : Schéma général de l'obtention des alcaloïdes

Figure 42 : Schéma général de l'obtention des tanins

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales espèces de *Trichostrongles* gastro-intestinaux des petits ruminants au Bénin et leur localisation dans le tube digestif

Tableau 2 : Classification des *Trichostrongylidae*

Tableau 3: Classification des *Strongyloidae*

Tableau 4: Prévalence des infestations dues au *S. stercoralis* dans certains pays de l'Afrique

Tableau 5 : Principaux anthelminthiques actifs chez les petits ruminants

Tableau 6: Différents noms locaux de la plante de *N. laevis*

Tableau 7: Noms vernaculaires de l'espèce *Z. zanthoxyloides*

Tableau 8 : Extraits préparés à partir des feuilles de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloides*

Tableau 9 : Fractions préparées à partir des feuilles de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloides*

Tableau 10 : Effet des alcaloïdes, des extraits bruts des feuilles des plantes étudiées sur *S. ratti*

Tableau 11: Variation de l'inhibition de la migration larvaire en fonction du solvant d'extraction

Tableau 12: Variation de l'inhibition du dégainement larvaire de *H. contortus* en fonction du solvant d'extraction

Tableau 13 : Effet des alcaloïdes, des tanins et des flavonoïdes extraits des feuilles des plantes étudiées sur *H. contortus*

ABREVIATIONS

- AcOEt** : Acétate d'éthyle
AH : Anthelminthique
AlCl₃ : Chlorure d'aluminium
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CH₃CN (ACN) : Acétonitrile
Da(s) : Daltons
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EI : Impact électronique
EtOH : Ethanol
eV : électron volt
HCl : Acide chlorhydrique
IC₅₀ : Concentration Inhibitrice 50
L_{3s} : Larves de stade 3
LDI : Inhibition du dégainement larvaire
LMI : Inhibition de la migration larvaire
MS : Matière sèche
NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OPG : Œufs par gramme
PVPP : Polyvinyl polypyrrolidone
Rf : Rapport Frontal
RI : Indice de rétention
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium
TCs : Tanins condensés
THs : Tanins hydrolysables
TR : Temps de rétention
TT : Tanins totaux
WHO : World Health Organization

RESUME

Les strongyloses gastro-intestinales sont des nématodoses fréquentes chez les animaux de rente. L'anguillulose est une nématodose observée après l'infestation par des anguillules qui s'implantent dans le duodénum. Ces parasitoses sont parmi les premières causes de mortalité animale et humaine dans le monde. L'importance, en santé publique des nématodoses est en grande partie expliquée par l'émergence perpétuelle de chimiorésistances aux principaux anthelminthiques. La recherche de nouveaux traitements accessibles et efficaces contre les strongles gastro-intestinaux, constitue une urgence. Le travail exposé dans cette thèse porte sur un des axes porteurs de cette recherche : l'exploration phytochimique de deux plantes tropicales (*N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes*) utilisées dans la médecine traditionnelle au Bénin. Le contrôle de la matière première permet de s'assurer de l'identité de la plante. Le criblage phytochimique des feuilles de *Z. zanthoxyloïdes* et de *N. laevis* a révélé la présence de grandes familles de composés tels que des flavonoïdes, des tannins, des alcaloïdes, des huiles essentielles, des composés réducteurs, des coumarines et des mucilages. Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des plantes sélectionnées sont caractérisées par GC-MS. Cette analyse chimique a permis de décrire la composition des extraits. Ensuite une étude phytochimique bio-guidée est menée afin de faire la purification de molécules responsables de l'activité anthelminthique de ces deux plantes. L'huile essentielle des graines de *Z. zanthoxyloïdes* présente 27 molécules dont les principales sont l' γ -terpinène (18 %), un décane (14,8 %), le valencène (8,3 %), le décanal (8,3%) et le 3-carène (6,7%). L'huile essentielle des feuilles de *N. laevis* présente 42 molécules dont les principales sont le â-caryophyllène (36,1%) et l'eugénol (5,7%). La teneur en acide tannique pour 100 de plante est équivalente à $1,24 \pm 0,24$ g pour *Z. zanthoxyloïdes* et $1,70 \pm 0,46$ g pour *N. laevis*. L'activité anthelminthique des extraits totaux, des tanins condensés, des flavonoïdes, des alcaloïdes et des huiles essentielles est évaluée par les trois méthodes suivantes : *In vitro* un test d'inhibition de la migration larvaire (LMI) ; un test d'inhibition de l'éclosion des œufs ; l'inhibition du dégainement larvaire. Enfin l'activité anthelminthique des extraits des plantes est évaluée *in vivo* sur les ovins Djallonké. Les résultats de ces travaux ont montré une activité anthelminthique significative et une absence de toxicité pour l'ensemble des deux plantes. Des travaux sont en cours pour parachever l'isolement des molécules responsables de l'activité anthelminthique observée. Le mode d'action des extraits des deux plantes sur les parasites d'importance vétérinaire fait aussi l'objet des premiers résultats.

Mots clés : *Zanthoxylum zanthoxyloïdes*, *Newbouldia laevis*, Botanique, extraits, activité anthelminthique, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides stercoralis*, Toxicité, Bénin.

Abstract

Gastrointestinal strongyloses are nematode infections common in animals. Strongyloidiasis is an infection observed after infestation by nematodes that locate in the duodenum. These parasites are among the leading causes of animal and human death in the world. The importance, in public health of nematode infections is largely explained by the perpetual emergence of drug resistance to major anthelmintics. The search for new treatments available and effective against gastro-intestinal strongyloses constitutes an emergency. The work outlined in this thesis focuses on one of the main pivots of this research: the phytochemical exploration of two tropical plants (*Zanthoxylum zanthoxyloides* and *Newbouldia laevis*) used in traditional medicine in Benin. International standards require the control of the raw material. The phytochemical screening of the leaves of *Z. zanthoxyloides* and *N. laevis* revealed the presence of large families of compounds such as flavonoids, tannins, alkaloids, essential oils, reducing compounds, coumarins, mucilages. The essential oils obtained by steam distillation of selected plants were characterized by GC-MS. The chemical analysis has allowed describing the composition of the extracts. We then conducted a bio-guided phytochemical study for the purification of molecules responsible for the anthelmintic activity of these two Beninese plants. The essential oil of *Z. zanthoxyloides* seeds present 27 molecules the main ones being γ -terpinene (18 %), a decane (14.8 %), valencene (8.3 %), decanal (8.3 %) and 3-carene (6.7%). The essential oil of *N. laevis* leaves has 42 molecules which the main are α -caryophyllene (36.1 %) and eugenol (5.7 %). The concentration of tannic acid per 100 grams of plant is equivalent to 1.24 ± 0.24 g for *Z. zanthoxyloides* and 1.70 ± 0.46 g for *N. laevis*. The anthelmintic activity of total extracts, condensed tannins, flavonoids, alkaloids and essential oils was evaluated by three different methods: *in vitro*, a larval migration inhibition test (LMI), an egg hatch inhibition test and the inhibition of the larval unshathing process. Finally, the anthelmintic activity of plant extracts was evaluated *in vivo* on Djallonké sheep. The results of these studies show a significant anthelmintic activity and lack of cytotoxicity for all the two plants. Work is underway to complete the isolation of molecules responsible for anthelmintic activity observed. The mode of action of extracts of the two plants on parasites of veterinary importance is also the subject of preliminary results.

Key words: *Zanthoxylum zanthoxyloides*, *Newbouldia laevis*, botany, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides stercoralis*, anthelmintic activity, Toxicity.

INTRODUCTION

Introduction

Depuis des millénaires, l'Homme tire dans son environnement les connaissances nécessaires à sa survie et à son mieux être. Avant même de posséder l'usage du langage, il pouvait transmettre l'expérience de la médecine et de tout type de remèdes naturels pour finalement élaborer ce que nous appelons aujourd'hui « la médecine traditionnelle ». L'étude de ces connaissances ancestrales par les sciences modernes révèle progressivement quelques secrets de la nature qui permettent à l'Homme de poursuivre son évolution. C'est dans ce cadre que des disciplines hétérogènes telles que la botanique, la phytochimie, la biologie et bien d'autres sont mises en œuvre afin de décrire et d'interpréter les « pharmacopées traditionnelles » (Roumy, 2007).

Près de 80% des substances naturelles utilisées dans le domaine biomédical proviennent de plantes tropicales (Campa, 2005). Les strongyloses gastro-intestinales sont des parasitoses fréquentes chez les animaux de rente. Elles sont dues à une quinzaine de nématodes présents à divers niveaux du tube digestif de leur hôte occasionnant ainsi des dommages d'intensité variable telle une baisse des performances zootechniques comme la fertilité et la croissance réduite, diminution de la production en lait et en viande et parfois de la mortalité des animaux les plus infestés (Berrag, 2008). L'anguillulose est le fait de parasites qui s'implantent dans l'intestin grêle et plus particulièrement dans le duodénum. Elle prend diverses formes, selon l'espèce en cause (*Strongyloides stercoralis* ou *Strongyloides fuelleborni*), son origine géographique et l'âge de l'hôte. Cette affection se caractérise par une diarrhée survenant par intermittence, accompagnée de douleurs abdominales d'une hyper éosinophilie ainsi que d'une légère anémie peu nette. Souvent bénigne, elle peut dans certaines circonstances se transformer en une infection généralisée au pronostic sévère. C'est une helminthiase intestinale qui sévit en zone tropicale et subtropicale (Bethony *et al.*, 2006). Depuis la découverte des premières molécules anthelminthiques de synthèse (AHs) apparues à la fin des années 1950 (la phénothiazine) (Waller 2006), la maîtrise des strongyloses gastro-intestinales (GIs) a reposé traditionnellement sur l'emploi répété de ces anthelminthiques (AHs) administrés soit dans un but curatif (traitement prophylactique) ou préventif (traitement stratégique) (Manolaraki, 2011). Ces substances offrent de multiples avantages : efficacité sur un large spectre d'espèces de nématodes parasites, simplicité d'emploi. L'AH idéal peut être défini comme un traitement multivalent, non-toxique et rapidement éliminé par l'hôte, facile d'administration, d'un coût modéré et ne laissant de résidus dans aucune production. Pendant

de nombreuses années, les AHs de synthèse se sont avérés efficaces. Cependant, l'utilisation de ces molécules est confrontée désormais à diverses limites. Depuis quelques années, plusieurs éléments ont conduit à s'interroger sur la pérennité de cette technique de maîtrise du parasitisme reposant de manière trop exclusive sur la chimiothérapie. Certaines substances sont suspectées de présenter des conséquences non négligeables pour l'environnement par leur rémanence dans les fèces. Par ailleurs, les consommateurs s'inquiètent de plus en plus d'une trop large utilisation d'intrants chimiques en élevages et des risques de résidus dans les produits (viande, lait, laine...). Enfin, l'apparition inquiétante et la diffusion de résistances aux molécules modernes chez des populations de nématodes sont désormais établies à l'échelle mondiale en médecine vétérinaire et humaine. Les nématodes les plus cités dans le phénomène de résistance à divers anthelminthiques sont *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus spp* et *Strongyloïdes spp* (Gopal et al., 1999; Kaplan, 2004; Wolstenholme et al., 2004; Besier, 2007). La recherche de solutions alternatives visant à limiter, voire à éviter, l'usage des anthelminthiques chimiques est désormais une préoccupation majeure partagée par de nombreux pays.

Dans les pays en voie de développement, l'usage des molécules anthelminthiques de synthèse s'est heurté à d'autres limites : i) le coût élevé des médicaments, ii) l'état de fragilité financière des producteurs, iii) la non disponibilité des substances chimiques tant en quantité qu'en qualité, iv) la malfaçon et la contrefaçon des molécules anthelminthiques de synthèse et en fin, v) le manque d'encadrement en santé de la population. Aussi, la prévalence de la résistance des nématodes aux anthelminthiques y est particulièrement élevée (Jackson & Coop, 2000 ; Kaplan, 2004) et la demande de réduction d'emploi de produits chimiques en élevage dans le contexte de l'agriculture durable est de plus en plus forte. Ces éléments ont conduit à envisager de nouvelles méthodes de lutte antiparasitaire. Parmi les solutions alternatives de lutte contre les strongyloses et les anguilluloses, une approche prometteuse repose sur l'exploitation de plantes dotées de propriétés anthelminthiques. Il existe une gamme variée de plantes utilisées comme anthelminthiques dans la pharmacopée (Hammond et al., 1997 ; Niezen et al., 1996 ; Enwerem et al., 2001 ; Alawa et al., 2003).

Dans la pharmacopée traditionnelle locale, nombreuses sont les recettes qui ont fait et continuent de faire leurs preuves d'efficacité. L'exemple d'*Artemisia annua*, plante utilisée en Chine depuis plus de 2 millénaires, est éloquent: son principal principe actif, l'artémisinine, est devenu l'un des traitements de première ligne du paludisme et désormais inscrit sur la liste

de l'OMS des médicaments essentiels, après plus de 20 ans de recherches et de travaux (Willcox, 2004). Si, la plupart des études disponibles au Bénin traitent de la médecine et de la pharmacopée humaine, des travaux sont aussi réalisés sur l'utilisation de plantes en médecine vétérinaire (Koudandé, 1991 ; Deka, 1998 ; Hounzangbé-Adoté, 2001-2005a,b et c ; Ali, 2002 ; Gbaguidi, 2005 ; Martinez-Ortiz-De-Montellano, 2010 , Manolaraki, 2011).

A l'heure actuelle, les traitements à base de plantes médicinales sont peu valorisés car les études pour confirmer leur efficacité suivant une démarche scientifique et analyser les mécanismes d'action des substances responsables restent trop peu nombreux (Abadome et Geerts, 1993).

Le laboratoire d'Ethnopharmacologie et de Santé Animale, sous le label LESA-DPA-FSA-UAC, en collaboration avec l'UMR 1225 Interactions Hôte Agents Pathogène de l'INRA (Toulouse) et l'UMR 152 de la Faculté de Pharmacie (Toulouse), concentre une partie de leurs recherches sur la découverte de substances naturelles bioactives.

Une enquête réalisée par Hounzangbé-Adoté (2004) au sud du Bénin a permis de recenser de nombreux traitements traditionnels. *Z. zanthoxyloïdes*, *Carica papaya*, *N. laevis* et *Morinda lucida* quatre plantes sont retenues pour évaluer de manière plus scientifique leurs propriétés antiparasitaires. Parmi ces espèces d'intérêt, nous en avons choisi les deux suivantes pour faire l'objet de notre étude : *Z. zanthoxyloïdes* et *N. laevis*.

Notre travail s'inscrit dans une perspective de valorisation et de développement de la recherche sur les plantes médicinales afin de pouvoir satisfaire au besoin de santé des animaux; ceci reste une volonté des autorités sanitaires du Bénin suite à l'engagement de l'OMS à œuvrer dans ce domaine. Notre travail motivé par :

- ✓ la volonté de valoriser et de promouvoir les plantes médicinales au Bénin ;
- ✓ la nécessité de développer et de faciliter l'accès aux médicaments traditionnels améliorés à moindre coût surtout accessibles à la population locale compte tenu du coût élevé des médicaments conventionnels ;
- ✓ l'intérêt que suscite l'étude des molécules naturelles à activité anthelminthique ;
- ✓ la nécessité de standardiser les extraits aqueux de *Z. zanthoxyloïdes* et *N. laevis*.

Notre projet de recherche permet de donner une base scientifique à l'usage de ces plantes et de contribuer à l'amélioration des extraits botaniques à travers la mise en évidence

de leur activité anthelminthique ainsi que de celle des produits de leurs fractionnements chimiques. Les travaux présentés ici concernent plusieurs disciplines et ont pu être réalisés grâce à de très nombreux collaborateurs. L' étude concerne les plantes issues de différentes médecines traditionnelles du Bénin et utilisées contre les maladies négligées que sont : la strongylose et la strongyloïdose. L'objectif de notre travail de thèse a contribué à l'amélioration de la santé animale et à la caractérisation et la purification par bioguidage des substances naturelles anthelminthiques dans les feuilles ou dans les graines d'une Rutaceae, *Z. zanthoxyloïdes* (Lam.) Zepernick et Timler et d'une Bignoniaceae, *N. laevis* (P. Beauv.) Seeman ex Bureau.

Dans la première partie de cette thèse, nous présentons une analyse bibliographique sur la strongylose gastro-intestinale chez les petits ruminants et l'anguillulose humaine. Une actualisation sur la botanique et la phytochimie des espèces végétales étudiées terminent cette synthèse bibliographique.

La deuxième partie de la thèse correspondant à nos travaux personnels est consacrée à ce qui suit :

- la caractérisation botanique des plantes étudiées ;
- la variabilité liée à des facteurs environnementaux sur la composition chimique de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes*,
- la caractérisation des composés organiques volatils et à l'évaluation *in vitro* de l'activité biologique des huiles essentielles de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes* ;
- le fractionnement bio guidé des extraits actifs de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes* ;
- l'identification des fractions, le dosage et la concentration des molécules responsables de l'activité anthelminthique de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes* ;
- l'évaluation *in vivo* de l'effet anthelminthique d'extrait de *N. laevis* sur les nématodes parasites gastro-intestinaux des ovins Djallonké.

La troisième partie de la thèse est réservée à la discussion de nos résultats, suivie des perspectives envisagées pour terminer ce travail.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Caractéristiques des zones de collecte des plantes et des tests *in vivo*

1.1. Caractéristiques des zones de collecte des plantes

1.1.1. Commune de Bohicon

La commune de Bohicon est située dans la partie méridionale du plateau de Bohicon. Elle est comprise entre 6°55' et 7°08' de latitude Nord, 1°58' et 2°24' de longitude Est et se trouve dans le Département du Zou.

Dans son ensemble la commune de Bohicon présente un relief constitué de dépressions et surtout de plateaux.

La commune de Bohicon jouit d'un climat subéquatorial de transition, caractérisé par deux saisons de pluie (avril à juin et septembre à novembre) et deux saisons sèches (juillet à août et décembre à mars).

Le réseau hydrographique dépend largement du fleuve Zou et d'autres fleuves tels que le Couffo, l'Ouémé qui sert par endroit de frontière naturelle entre la commune de Bohicon et les départements du Couffo et de l'Ouémé.

Les formations végétales constituent également une variable très importante de l'environnement. De type équato-soudanien, la végétation est formée d'arbres à feuilles coriaces, vernissantes qui résistent à la chaleur. L'alternance saison sèche et saison humide induit un rythme phénologique chez les plantes.

Le sol est formé de terre de barre et apparaît comme le résultat d'une altération intense et profonde. Il est constitué d'un vaste plateau argilo-sableux homogène.

1.1.2. Commune d'Aplahoué

La Commune d'Aplahoué fait partie du nouveau département du Couffo, au sud-ouest du Bénin. La commune d'Aplahoué compte sept (07) arrondissements : Aplahoué, Atomey, Azovè, Dékpo, Godohou, Kissamey et Lonkly. La récolte des plantes médicinales utilisées dans cette étude a été faite dans l'arrondissement d'Azovè.

La Commune est située sur le plateau Adja ou le plateau Aplahoué. Ce plateau est limité au Nord par le plateau de Lonkly et à l'ouest par le lac Ahémé.

La commune d'Aplahoué est caractérisée par un climat subéquatorial comprenant deux (02) saisons sèches (de juillet à septembre et de novembre à février voire mars) et deux (02) saisons pluvieuses, l'une courte (septembre à novembre) et l'autre plus longue (avril à juillet).

Hydrographie

La commune d'Aplahoué ne dispose que de 27 hectares environ de forêt à Badjamè dans l'arrondissement de Lonkly, et de quelques îlots forestiers sous forme de forêts fétiches ou sacrées et forêts saxicoles mais de très petites dimensions. Le couvert végétal de la commune se réduit de plus en plus à la végétation artificielle. Au sud, dans l'arrondissement d'Azovè, la végétation a fait pratiquement place aux champs.

La commune d'Aplahoué dispose d'une variété de sols. Le substrat est essentiellement composé de sédiments du Continental Terminal. Ces sédiments sont généralement argilo-sableux. Sur le substrat géomorphologique se sont développés des sols sur terre de barre, de nature ferrallitique faiblement dénaturés. Ces sols ferrallitiques ou terre de barre se rencontrent au Sud de la Commune dans les arrondissements d'Azovè, de Kissamey et d'Aplahoué.

1.1.3. Commune d'Adjarra

La commune d'Adjarra est située dans le Département de l'Ouémé. Elle est subdivisée en six (06) Arrondissements : Adjarra I, Adjarra II, Honvié, Malanhoui, Aglogbè et Médédjonou.

La commune d'Adjarra a un relief presque monotone et très peu accidenté.

Cette commune jouit d'un climat tropical humide appelé climat subéquatorial. Ce climat est caractérisé par une forte humidité (75% en moyenne par an) et des températures variant entre 21,9 °C et 32,8 °C.

Le réseau hydrographique de la commune d'Adjarra est composé de la lagune de Porto-Novo au Sud et de la rivière Aguidi du Nord-Est.

La Commune d'Adjarra dispose de trois (03) types de sols : sols ferrallitiques, sols de coloration brune claire, et sols hydromorphes argileux.

1.1.4. Commune d'Abomey-Calavi

La commune d'Abomey Calavi, située dans la partie sud de la République du Bénin et du département de l'Atlantique, est limitée au Nord par la commune de Zè, au Sud par l'Océan

Atlantique, à l'Est par les communes de Sô-Ava et de Cotonou, et à l'Ouest par les communes de Tori-Bossito et de Ouidah. La commune d'Abomey-Calavi a un relief peu accidenté.

Le climat est de type sub-équatorial marqué par deux saisons pluvieuses et deux saisons sèches. Le réseau hydrographique est constitué essentiellement de deux plans d'eau que sont le lac Nokoué et la lagune côtière.

Le couvert végétal de la commune varie selon les faciès traversés. Ainsi, on y rencontre la mangrove à palétuviers et des cocoteraies dans la zone côtière, une savane dégradée sur le plateau avec une domination de la jachère à palmier à huile, et un groupement herbeux dans les marécages et le long des berges du lac Nokoué.

La plus grande partie du territoire de la commune d'Abomey Calavi est occupée par des sols ferrugineux tropicaux et des sols sablonneux peu propices à l'agriculture.

1.2. Caractéristiques de la zone de réalisation des tests *in vivo* sur les petits ruminants

Les expériences *in vivo* ont été réalisées sur la ferme de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Université d'Abomey- Calavi (FSA) située dans la commune d'Abomey-Calavi. Cette commune est caractérisée par un climat de type guinéen avec deux saisons de pluie (mi-mars à mi-juillet et mi-septembre à mi-novembre) et deux saisons sèches (mi-novembre à mi-mars et mi-juillet à mi-septembre). La pluviométrie moyenne annuelle est voisine de 1200 mm. On note une diminution du niveau des précipitations du Nord vers le Sud et de l'Est vers l'Ouest de la commune.

La température est l'un des facteurs importants pour l'élevage. La température moyenne mensuelle varie entre 27 °C et 31 °C avec un écart de 3,2 °C entre le mois le plus chaud (mars) et celui le moins chaud (août).

L'humidité relative de l'air est l'un des facteurs du pouvoir évaporant de l'atmosphère en relation avec la transpiration des plantes. Elle joue par conséquent un rôle important dans les écosystèmes. Les moyennes mensuelles de l'humidité relative varient de 76,84% (janvier) à 84,55% (juillet). La figure1 présente l'évolution de la pluviométrie, de l'ETP et de la température au Sud-Bénin en 2009.

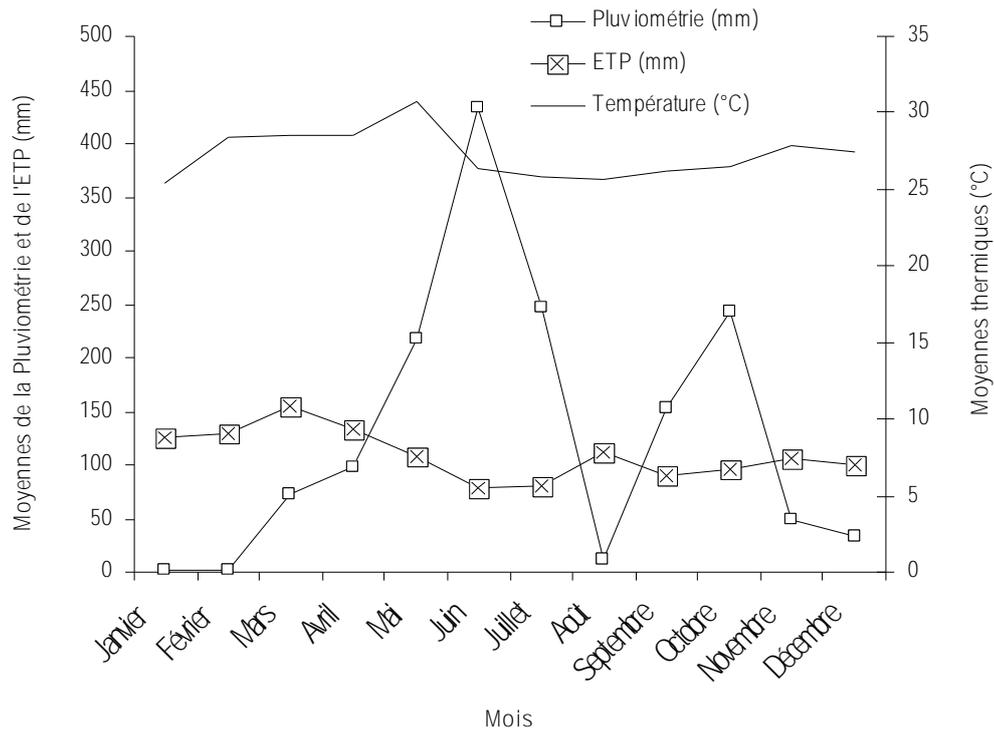


Figure 1: Evolution de la pluviométrie, de l'ETP et de la température au Sud-Bénin en 2009 (ASECNA, 2009)

2. Parasitoses gastro-intestinales

2.1. Strongyloses gastro-intestinales des petits ruminants

Les strongyloses gastro-intestinales sont des pathologies provoquées par des strongles vivant dans l'appareil digestif (figure 2) localisé essentiellement dans l'abomasum et l'intestin grêle. Plusieurs genres de strongles gastro-intestinaux infestent les ovins (tableau 1), mais certains d'entre eux sont plus pathogènes que d'autres avec des fréquences très différentes. Un des points communs des principaux strongles digestifs chez les ovins est leur multiplication sur les pâturages, source d'infestation des moutons.

Les strongyloses gastro-intestinales sont un des problèmes majeurs au sein des élevages de petits ruminants. Elles peuvent entraîner des pertes de production importantes (Paolini et *al.*, 2002). L'importance économique du parasitisme du tube digestif des ovins au Bénin réside surtout dans les déficits de production provoqués, bien qu'il puisse entraîner la mort chez les animaux les plus sensibles lors de fortes infestations parasitaires. Pour cette raison, l'impact de ce parasitisme est souvent sous-estimé. Charray et *al.* (1980) estiment que 97% des petits ruminants d'Afrique sont porteurs d'helminthes au niveau de l'appareil digestif. Au sud du Bénin, ce taux est de 84,64% (Salifou, 1996). En zones tropicales et sub-tropicales, *H. contortus* est très largement réparti et très pathogène (Urquhart et *al.*, 1996; Chartier et *al.*, 2000; O'connor et *al.*, 2006). *T. colubriformis* est également retrouvé dans les élevages des régions tropicales (Chartier et *al.*, 2000). La faune parasitaire des ruminants au Bénin est semblable à celle observée dans la plupart des pays ouest africains. D'autres études recensent les principaux strongles gastro-intestinaux affectant les ovins au pâturage au Bénin. Toutes s'accordent à démontrer que quelque soit la région considérée, les deux principales espèces rencontrées par leur fréquence et leur intensité sont *H. contortus*, strongle parasite de l'abomasum des petits ruminants, et *T. colubriformis*, appartenant au genre *Trichostrongylus*, qui parasite l'intestin grêle (Salifou, 1996 ; Hounzangbé et *al.*, 2000). La prévalence chez les petits ruminants de chacune de ces espèces est supérieure à 86%, loin devant *Oesophagostomum columbianum* (55,1%) (Salifou, 1996). Selon Salifou (1996), comparés aux caprins, les ovins ont les plus fortes prévalences. Cet auteur montre que le sexe des animaux n'a aucune influence sur l'infestation du tube digestif. Notre étude expérimentale concernera essentiellement *H. contortus*, et *T. colubriformis* de loin les plus fréquents sur le site où a lieu l'expérimentation *in vivo*.

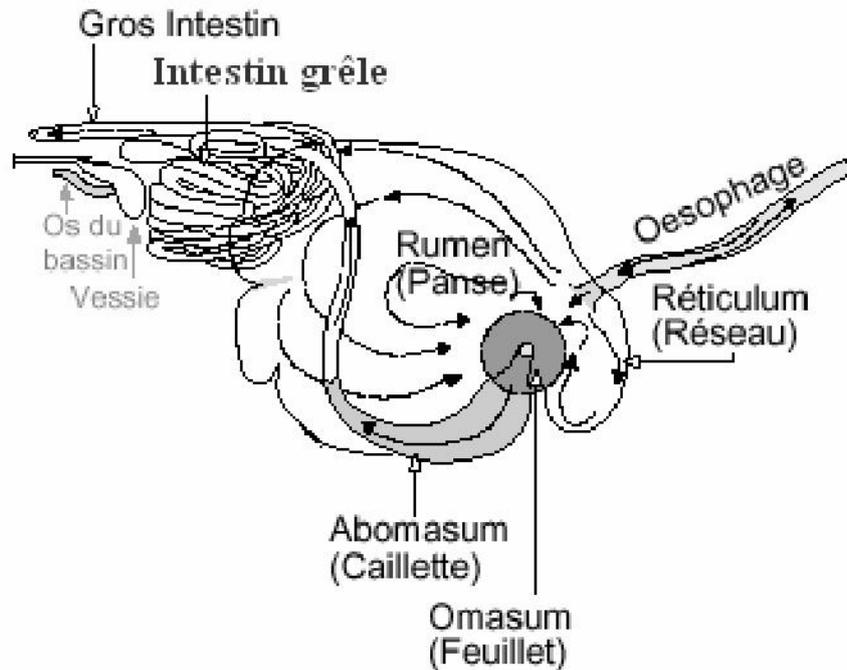


Figure 2: Schéma du tube digestif des ruminants (Robert, 2006)

Tableau 1: Principales espèces de *Trichostrongles* gastro-intestinaux des petits ruminants au Bénin et leur localisation dans le tube digestif (Salifou, 1996)

Sous-familles	Espèces	Localisation chez l'hôte	Hôtes	Prévalence (%)	
				Ovins	Caprins
<i>Haemonchinae</i>	<i>H. contortus</i>	Abomasum	Ovins, Caprins	92,6	78,7
		Intestin		87,0	55,8
<i>Trichostrongylinae</i>	<i>T. colubriformis</i>	Intestin grêle	Ovins, Caprins		
<i>Oesophagostominae</i>	<i>O. columbianum</i>	Colon	Ovins, Caprins	55,1	31,8
		Abomasum	Ovins, Caprins		
<i>Ostertagiinae</i>	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Abomasum	Ovins, Caprins		

2.1.1. Classification et taxonomie des nématodes, parasites gastro-intestinaux des petits ruminants

Les strongles gastro-intestinaux, parasites de la caillette ou de l'intestin des ruminants, sont des nématodes qui appartiennent à l'ordre des *Strongylidae* et à la super famille des *Trichostrongyloidea* (tableau 2). Les nématodes constituent une classe de l'embranchement des Némathelminthes : ce sont des vers ronds, pseudo-coelomates, à corps non segmenté et à tube digestif complet. Les sexes, mâle et femelle, sont séparés. Leur mode de vie est soit libre, soit parasite de végétaux ou d'animaux (Taylor *et al.*, 2007).

Tableau 2 : Classification des *Trichostrongylidae* (Urquhart *et al.*, 1996 ; Hoste *et al.*, 1999)

Ordre	Superfamille	Famille	Genre	
<i>Strongylidae</i>	<i>Trichostrongyloidea</i>	<i>Trichostrongylidae</i>	<i>Trichostrongylus</i>	
			<i>Teladorsagia</i>	
			<i>Ostertagia</i>	
				<i>Hyostongylus</i>
			<i>Haemonchidae</i>	<i>Haemonchus</i>
			<i>Cooperiidae</i>	<i>Cooperia</i>
			<i>Molineoidea</i>	<i>Molineidae</i>
	<i>Strongyloidea</i>	<i>Strongylidae</i>	<i>Oesophagostomum</i>	

2.1.2. Morphologie des nématodes gastro-intestinaux des petits ruminants

2.1.2.1. Structure générale

Les nématodes ont une forme cylindrique. L'ensemble est recouvert par une cuticule translucide. L'hypoderme sécrète la cuticule et se projette vers l'intérieur pour former deux cordes latérales qui portent les tubes excréteurs et deux cordes dorsales qui portent les nerfs. Les muscles sont constitués de fibres musculaires qui courent longitudinalement sous l'hypoderme. La locomotion est due à des contractions alternées des muscles dorsaux et ventraux. La cavité cœlomique contient les autres organes et un liquide sous pression qui donne sa rigidité au ver. Les autres organes baignent dans ce liquide.

2.1.2.2. Système digestif des strongles

La bouche est souvent une simple ouverture éventuellement entourée de 2 à 3 lèvres et qui mène directement dans l'œsophage. Parfois, la bouche est large et donne dans une grande capsule buccale qui peut contenir des denticules. Chez ces espèces, le ver aspire un morceau de muqueuse et le digère ; dans certains cas, des enzymes anticoagulantes sont produites, ce qui explique les saignements qui persistent après le détachement du ver de la paroi interne des organes. Chez les vers munis d'une petite capsule buccale, les débris cellulaires et les fluides digestifs servent d'aliments (Robert, 2006).

L'œsophage est souvent musculaire et pompe la nourriture. Il est de forme variable et est utilisé pour identifier le groupe de vers. Chez les vers munis d'une capsule buccale, la gouttière œsophagienne amène le suc digestif de l'œsophage dans la capsule buccale pour digérer les tissus.

L'intestin est un simple tube muni d'une couche de cellules porteuses de microvillosités. Chez la femelle, il se termine à l'anus ; chez le mâle, il débouche dans un cloaque où débouchent également les canaux déférents et qui peut abriter les spicules.

2.1.2.3. Système excréteur des strongles

Il est très primitif et constitué de deux canaux excréteurs dans les deux cordes latérales ; ils fusionnent au pore excréteur en avant de l'œsophage.

2.1.2.4. Système reproducteur des strongles

Le système reproducteur est constitué de différentes structures filamenteuses.

2.1.2.4.1. Système femelle des strongles

Il comprend un ovaire, un oviducte et un utérus qui s'ouvre au vagin. L'ensemble peut être dupliqué. Le vagin peut être précédé d'une portion musculaire, l'ovojecteur, qui sert à la ponte. Un clapet vulvaire peut être présent.

2.1.2.4.2. Système mâle des strongles

Il comprend un testicule et un canal déférent qui se termine dans le cloaque par un canal éjaculateur. Les organes accessoires du mâle sont souvent utilisés pour l'identification :

- les spicules qui sont des organes chitineux souvent doubles insérés dans le vagin, au moment de l'accouplement, pour le maintenir ouvert. Leur forme est souvent caractéristique ;
- le gubernaculum aussi chitineux, sert de guide aux spicules ;
- la cuticule, peut être modifiée pour donner différentes structures comme :
 - la coronule, structure en palissade est constituée d'une rangée de papilles juste à l'extérieur de l'ouverture de la capsule buccale (coronule externe) ou juste en dedans (coronule interne) ;
 - les papilles cervicales ou caudales, structures souvent diamétralement opposées sont des expansions sensorielles ;
 - les ailes cervicales ou caudales sont des expansions aplaties en région oesophagienne ou caudale ;
 - les vésicules céphaliques et cervicales : dilatations de la cuticule dans ces deux régions
 - la bourse caudale ou copulatoire sert à maintenir la femelle lors de l'accouplement ; elle est constituée d'expansions caudales supportées par des papilles caudales très développées appelées les côtes de la bourse ; la bourse est constituée de deux lobes latéraux bien développés et d'un lobe médian plus réduit.

H. contortus et *T. colubriformis* sont les espèces de nématodes parasites gastro-intestinaux dominantes, elles ont été retenues comme modèles expérimentaux dans nos études sur les ovins. Quelques éléments de morphologie et de la physiopathologie des deux parasites seront donc indiqués.

2.1.3. *Haemonchus contortus*

H. contortus appartient à la famille des Trichostrongylidae qui sont des nématodes de petite taille, possédant peu d'appendices cuticulaires, une capsule buccale réduite et une bourse caudale bien développée chez le mâle avec un gubernaculum et deux spicules qui sont utilisés pour l'identification. C'est un parasite de l'abomasum que l'on trouve surtout en régions chaudes. Il est strictement hématophage (Hoste *et al.*, 1997).

Les adultes sont faciles à reconnaître grâce à leur localisation et leur grande taille (2 à 4 cm) ; chez la femelle (figure 3), l'ovaire blanc s'enroule autour du tube digestif rempli de sang et cela donne un aspect caractéristique. Au microscope, la bourse caudale paraît asymétrique avec un lobe dorsal muni d'une côte en Y ; les spicules sont munis de petites dents à leur extrémité ; la femelle porte un clapet vulvaire. Les deux sexes ont des papilles cervicales et une petite lancette à l'intérieur de la capsule buccale (Bussieras et Chermette, 1988)



Figure 3 : Femelle adulte de *H. contortus* (www.nematodes.org)

Les œufs de *H. Contortus* sont de taille moyenne, d'une longueur allant de 65 à 95 µm et d'une largeur de 36 à 50 µm. Ils sont de forme elliptique, régulière et large, avec des pôles larges et arrondis, pratiquement égaux, et des parois latérales égales, fortement bombées. La coque chitineuse est mince, de couleur jaune clair et à surface lisse, tapissée à l'intérieur d'une fine membrane vitelline. Les œufs contiennent un grand nombre de blastomères peu distincts, emplissant la presque totalité de l'œuf.

La larve infestante (L₃) de taille variant entre 657 µm et 733 µm est entourée d'une gaine . L'extrémité caudale est légèrement tordue à la base. La larve porte 16 cellules intestinales et 2 cellules terminales.

2.1.4. *Trichostrongylus colubriformis*

T. colubriformis appartient à la famille des trichostrongylidae. Il est rarement pathogène primaire mais il participe au syndrome de la gastro-entérite vermineuse.

Il possède une petite capsule buccale et sa forme rappelle celle d'un cheveu, d'où son nom. Les adultes mesurent en général moins de 7 mm et sont très difficiles à voir. Les vers n'ont pas de capsule buccale visible, une dépression cuticulaire dans la région œsophagienne, des spicules épais non divisés et inégaux ; chez la femelle, la queue est mousse et il n'y a pas de clapet vulvaire ; les œufs sont arrangés à la suite l'un de l'autre dans l'utérus.

Les œufs de *T. colubriformis* sont de taille moyenne, d'une longueur allant de 78 à 101 µm et d'une largeur allant de 38 à 50 µm. Ils ont une forme elliptique irrégulière avec des pôles inégaux, pas très larges, dont un est plus arrondi que l'autre et des parois latérales inégales, avec souvent une paroi aplatie. La coque chitineuse est mince à surface lisse et tapissée à l'intérieur d'une fine membrane vitelline. Les œufs contiennent de 16 à 32 blastomères.

La larve de *T. colubriformis* comporte 16 à 32 cellules intestinales et a une queue courte avec une tête arrondie.

2.1.5. Cycle évolutif des strongles digestifs

Les strongles digestifs des ruminants présentent un cycle évolutif monoxène (figure 5) c'est-à-dire qui n'implique qu'un seul hôte définitif (HD). Ce cycle est caractérisé par la succession de deux phases évolutives : une phase exogène, qui concerne le développement des œufs jusqu'au stade larvaire L₃, et une phase endogène, intéressant le développement des stades proprement parasites, larves L₄, juvéniles (stade 5) et adultes dans le tube digestif de l'hôte (Crapelet et Thibier, 1984 ; Urquhart, 1996 ; Jacquiet, 1997 ; Cabaret, 2000 ; Chartier *et al.*, 2000).

2.1.5.1. Phase exogène

Suite à leur émission au stade morula, mélangés aux fèces de l'hôte, les œufs doivent trouver dans le milieu extérieur des conditions favorables à leur embryonnement et à la formation de la larve L₁ (Euzéby, 1963 ; Smith et Sherman, 1994 ; Urquhart *et al.*, 1996). Celle-ci éclot

ensuite, se nourrit activement de microparticules et de microorganismes en suspension dans l'eau, grâce à un appareil valvulaire de type «Rhabditoïde» situé sur son œsophage, puis mue en larve L₂, qui se nourrit à son tour de la même façon, et mue en larve L₃ (figure 4) ou stade infestant. Après l'éclosion de l'œuf, la période d'évolution des larves L₁ et L₂ est de 2 jours et leur survie n'est possible que dans un milieu saturé d'humidité, à une température favorable et avec une quantité suffisante d'oxygène. La larve L₃, en revanche, présente un aspect et un comportement très différents : son œsophage est de type strongyloïde, dépourvu d'appareil valvulaire, et elle est entourée d'une gaine protectrice, qui correspond à l'exuvie du stade larvaire précédent et lui confère une résistance plus ou moins élevée vis-à-vis des facteurs de dessiccation. Elle ne se nourrit pas mais peut survivre plus ou moins longtemps grâce à ses réserves glycogéniques et lipidiques stockées dans ses cellules intestinales (O'Connor *et al.*, 2006).

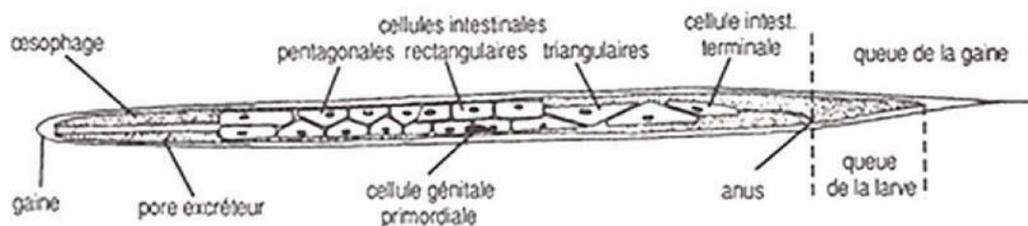


Figure 4: Schéma général d'une larve L₃ (Gevrey, 1971)

2.1.5.2. Phase endogène

Après leur ingestion, les larves L₃ infestantes se libèrent activement de leur gaine sous l'effet du pH et de la composition chimique de la caillette des ruminants (Jacquet, 1997 ; Hertzberg *et al.*, 2002). Cette libération s'accompagne de l'imprégnation du milieu par le fluide de dégainement dont le pouvoir antigénique est élevé, et qui stimule à son tour le dégainement des autres larves L₃ (Robert, 2006).

En général la larve L₃ mue rapidement en L₄. Celle-ci s'enfonce plus ou moins profondément dans les glandes de la paroi digestive ou dans les espaces entre les villosités intestinales. Les larves L₄ qui retournent dans la lumière digestive muent à leur tour pour donner les juvéniles (stade 5). Après acquisition de la maturité sexuelle, les mâles et femelles s'accouplent et ces dernières pondent des œufs rejetés avec les excréments de l'hôte (Euzéby, 1963).

Dans le cas le plus simple (primo-infestation d'un jeune animal au début de la saison de mise en pâture), le développement successif des stades parasites est continu, si bien que la durée

totale de la période prépatente est minimale et se situe aux alentours de 2 à 3 semaines chez la plupart des trichostrongylidés ou de 6 à 8 semaines chez les strongylidae (Etter et al., 2000 ; Jacquet, 2000). Le mode de nutrition des vers adultes est variable. Les plus pathogènes sont le plus souvent hématophages ou histophages et provoquent de ce fait des hémorragies et une lyse des tissus de la paroi digestive, grâce à leur armature buccale et à l'action des enzymes sécrétées par leurs glandes oesophagiennes (Dorchies, 2000 ; Enderlein, 2002 ; Penicaud, 2007). Les autres strongles sont chymophages, prélevant leurs aliments dans la lumière digestive. Le mode de nutrition des larves peut être similaire ou différent de celui des adultes (Dorchies, 2000). Les larves inhibées ne se nourrissent pas et leur métabolisme est très réduit. Elles sont très faiblement pathogènes et sont beaucoup moins sensibles à l'action des médicaments anthelminthiques que les larves actives et les vers adultes. En général, ces deux processus interagissent sur les parasites et leurs résultats se confondent (figure 5).

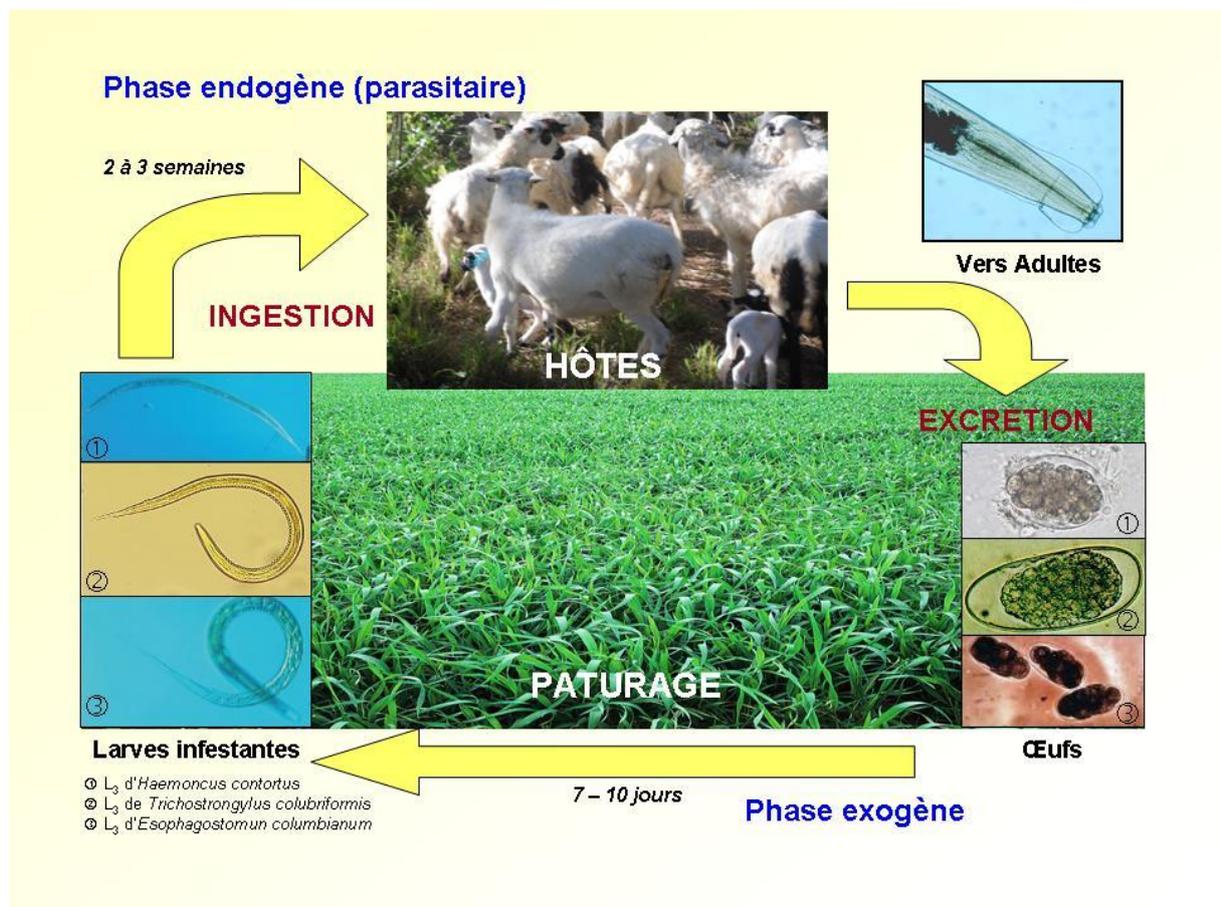


Figure 5 : Cycle évolutif des strongles digestifs (Hounzangbé-Adoté, 2004)

2.1.6. Epidémiologie

La majorité des espèces de strongles sont peu spécifiques et infestent les ruminants domestiques et sauvages, voire les porcins.

Plusieurs observations montrent qu'il existe une variabilité interraciales à l'infestation par les strongles digestifs. Ainsi chez des ovins de race Mérinos d'Australie, il a été démontré qu'il existe une corrélation entre le groupe sanguin et la moindre réceptivité des individus à l'infestation par *H. contortus*, bien qu'il ne s'agisse que d'un simple marquage et que la composante génétique spécifique à cette résistance n'ait pas encore été identifiée (Robert, 2006).

Les jeunes animaux et les femelles gestantes ou en état de lactation hébergent le plus souvent un nombre plus élevé de parasites, dû soit à une plus grande facilité d'installation des larves infestantes, soit à la reprise de l'activité des larves inhibées dans la paroi digestive. De même, les états de malnutrition et les maladies d'élevage associées, en diminuant la résistance de l'organisme, favorisent l'action pathogène des helminthes.

Agents pathogènes

Le terme « strongle » correspond à l'ordre des Strongylida auquel appartiennent tous les agents des strongyloses digestives, répartis au sein de deux super-familles : celle des **Trichostrongyloïdeae** et celle des **Strongyloïdeae**.

2.2. Anguillulose

L'**anguillulose** est une parasitose due à l'infestation par des anguillules qui s'implantent dans l'intestin grêle et plus particulièrement dans le duodénum. Elle prend diverses formes, selon l'espèce en cause (*Strongyloides stercoralis* ou *Strongyloides fulleborni*), l'origine et l'âge de l'hôte. Cette affection se caractérise par une diarrhée survenant par intermittence, accompagnée de douleurs abdominales et une hyperésinophilie fluctuante ainsi qu'une légère anémie peu nette. Souvent bénigne, elle peut dans certaines circonstances (immunodépression) se transformer en une infection généralisée au pronostic sévère.

2.2.1. Biologie des anguillules

2.2.1.1. Classification et taxonomie des anguillules

Le genre *Strongyloides* contient 53 espèces (Spear, 1989). Parmi ces espèces on distingue des *Strongyloïdes* naturellement parasites chez les humains qui sont *Strongyloïdes stercoralis*, *Strongyloïdes fulleborni* et *Strongyloïdes kellyi*. *S. fuelleborni* et *S. kellyi* provoquent des infections limitées chez l'homme (Viney 1990 ; Doris, 2002). Notre étude porte sur des *S. stercoralis*, parasites internes des humains. *S. stercoralis* appartient à l'ordre des *Rhabditidae* et à la famille de *Strongyloididae* (Tableau 3).

Tableau 3: Classification des *Strongyloïdæ* (Bavay, 1876)

Règne:	Animale
Embranchement :	<i>Némathelminthes</i>
Classe:	<i>Nématodes</i>
Ordre:	<i>Rhabditidae</i>
Super famille	<i>Rhabditoïdæ</i>
Famille:	<i>Strongyloïdidae</i>
Genre:	<i>Strongyloïdes</i>
Espèce:	<i>S. stercoralis</i>

2.2.1.2. Cycle évolutif de *S. stercoralis*

Le cycle évolutif (figure 6) est particulièrement complexe. Les femelles parthénogénétiques vivent profondément enchâssées dans la muqueuse duodénale de l'Homme, se nourrissent des tissus et ne sont pas hématophages. Elles pondent des œufs qui éclosent dans l'intestin. Des larves rhabditoïdes s'en échappent, elles ont trois destinées possibles.

Le cycle externe, asexué, direct se produit lorsque les conditions extérieures sont défavorables (température inférieure à 20 °C ; humidité insuffisante) : les larves rhabditoïdes émises dans les selles se transforment directement dans la nature en larves strongyloïdes infestantes. L'homme se contamine par voie cutanée en marchant pieds nus dans la boue, sur la terre, ou en se baignant dans un cours d'eau douce ou une piscine sans filtration; la contamination par voie buccale est exceptionnelle. Les personnes à risque sont celles qui travaillent dans les mines et les tunnels et chez celles qui pratiquent le jardinage à mains nues. Après avoir franchi les téguments, les larves migrent par voie sanguine au niveau du cœur droit, puis des poumons où elles changent de direction et remontent les bronchioles, les bronches, la trachée, jusqu'au carrefour aéro-digestif (Chevalier *et al.*, 2002). Elles sont alors dégluties ; après avoir franchi le pylore, elles deviennent des femelles parthénogénétiques. C'est à cette occasion que se manifeste le syndrome de Loëffler (toux, prurit, réaction allergique, éosinophilie) chez le sujet atteint.

Le cycle externe, sexué, indirect, ou hétérogonique apparaît lorsque les conditions extérieures sont favorables (plus de 20°C, humidité). Les larves rhabditoïdes muent en adultes stercoraux libres mâles et femelles. Les femelles fécondées pondent des œufs donnant naissance à des

larves rhabditoïdes. Les larves se transforment à leur tour en larves *strongyloïdes* infestant l'homme par voie transcutanée. Il se produit ainsi une multiplication parasitaire dans le milieu extérieur ; les stades ultérieurs du cycle sont identiques à ceux du précédent.

Le cycle interne, ou cycle d'autoinfestation (endogène), est un cycle court, avec transformation directe des larves rhabditoïdes en larves *strongyloïdes* dans l'intestin du malade, sans passage extérieur, sinon peut-être au niveau de la région anopérinéale ou dans le derme de la paroi abdominale, il explique la longévité de l'affection pouvant dépasser 30 ans, alors que la survie des femelles parthenogenetiques est relativement brève.

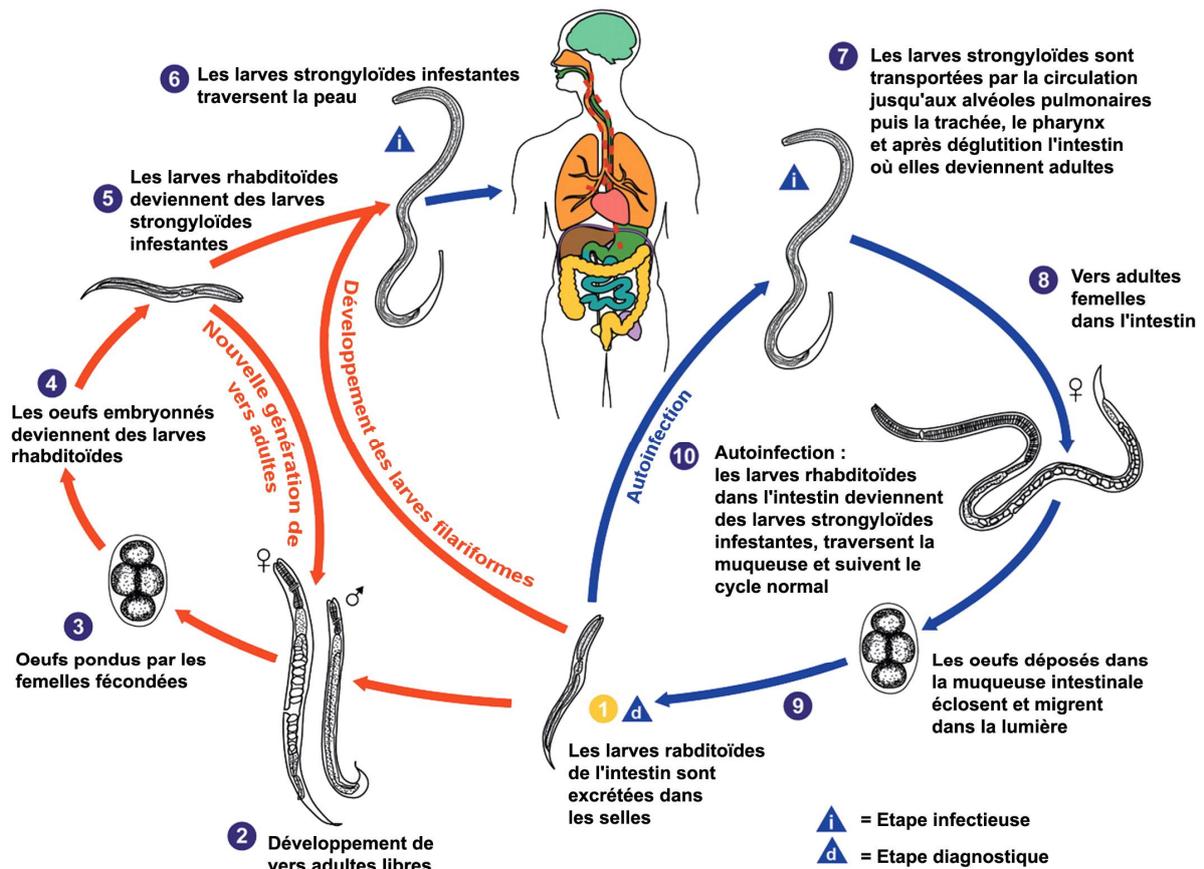


Figure 6 : Cycle évolutif de *S. stercoralis* (<http://fr.wikipedia.org>)

2.2.1.3. Morphologie de *S. stercoralis*

Dans l'intestin de l'homme on ne connaît que la femelle parthénogénétique qui est blanchâtre et mesure 2 à 3 mm de long sur 50 µm de diamètre. L'œsophage est cylindrique. Dans le milieu sont rencontrés des mâles et des femelles stercoraires libres. Le mâle adulte mesure 0,7 mm de long avec une extrémité postérieure recourbée en crochets munies de deux spicules. La femelle adulte mesure 1,2 mm de long et est modérément effilée (Nicolas, 2005).

L'œuf (figure 7) n'est habituellement pas retrouvé dans les selles, l'éclosion de l'œuf ayant lieu très rapidement dans l'intestin pour donner naissance à des larves rhabditoïdes qui passent dans la lumière intestinale. Il mesure de 50 à 55 μm de diamètre.



Figure 7: Œuf de *S. stercoralis* (<http://www2.vet-lyon.fr>)

Les larves sont de deux types : les larves rhabditoïdes (figure 8) et les larves strongyloïdes -les larves rhabditoïdes de *S. stercoralis* provenant soit des œufs pondus par la femelle parasite dans le duodénum : ce sont des larves de la première génération ; soit des œufs pondus par la femelle libre et fécondée par le mâle : ce sont les larves de la deuxième génération. Elles mesurent 250 à 300 μm de long et sont caractérisées par: un double renflement œsophagien, un stylet buccal court, une extrémité postérieure peu effilée. L'ébauche génitale est en principe bien visible.



Figure 8 : Larve rhabditoïde de *S. stercoralis* (<http://coursdeparasitologie.ifrance.com>)

- la larve strongyloïde (figure 9) de *S. stercoralis* infectante, présentant un seul renflement œsophagien et une queue tronquée bifide, n'a pas de gaine. Elles mesurent 500 à 600 μm de long.

Les larves sont incapables de survivre en dessous de 8°C et au-delà de 40°C.



Figure 9 : Larve strongyloïde de *S. stercoralis* (<http://coursdeparasitologie.ifrance.com>)

2.2.2. Répartition géographique

On estime que 30 à 100 millions de sujets sont parasités dans le monde. *S. stercoralis* a une distribution cosmopolite dans les régions tropicales et subtropicales (figure 10) partout où l'assainissement est déficient (Bethony *et al.*, 2006). L'anguillulose se voit donc dans tous les pays tropicaux et subtropicaux. Dans les pays tropicaux l'infestation est possible toute l'année sur un mode endémique : Antilles, Afrique tropicale, Maghreb, vallée du Nil, Madagascar. Dans les pays tempérés, la contamination est possible pendant l'été : sud des Etats-Unis, Europe du Sud. L'anguillulose figure parmi les dix infestations les plus fréquentes au monde. Elle est importante en santé publique, sur le plan local ou régional.

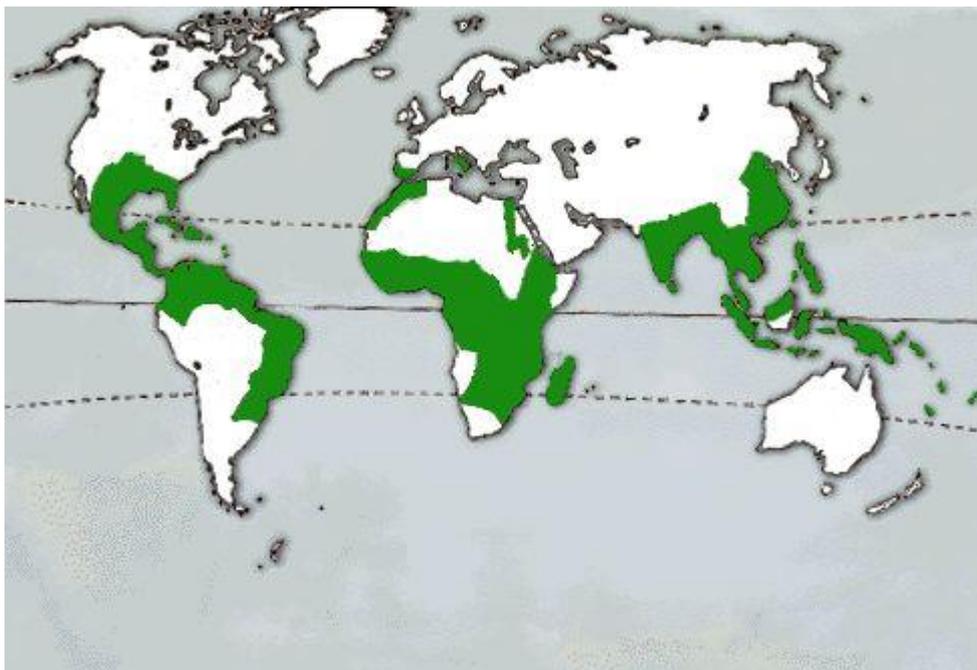


Figure 10 : Répartition géographique de l'anguillulose (Gentilini et Dufflo, 2000)

2.2.3. Epidémiologie

L'agent de l'anguillulose a été découvert par Louis Normand (1876) dans les matières fécales de soldats français atteints de diarrhées au retour de Cochinchine. Bavay nomma les formes découvertes dans les selles *Anguillula stercoralis* (du latin *anguilla* : anguille, et *stercoris* : excréments) et celle des parois de l'iléon *A. intestinalis*. Grassi (1879) montra qu'il s'agissait d'une même espèce sous deux formes parasitaires différentes. Kreis (1932) décrivit le cycle complet. Au terme de *A. stercoralis*, l'usage préfère celui de *Strongyloides stercoralis* (du grec *strogulos* : rond) (Aubry *et al.*, 1987 ; Mahmoud, 1996).

Il existe des interactions, d'une part, entre le parasite et l'environnement et, d'autre part, entre le parasite et son hôte : le parasitisme varie en fonction des zones géographiques, mais aussi des modes de vie humaine. La compréhension du parasitisme fait donc appel aux connaissances sur l'hôte et le parasite.

2.2.3.1. Prévalence des infestations par *S. stercoralis*

On peut estimer que la prévalence totale de l'ensemble des nématodoses est de 2400 millions (Bethony *et al.*, 2006). Des études ont été publiées au cours de la dernière décennie et estiment

la prévalence mondiale en croissance de 1984 à 2006, à 32 % en moyenne, avec une valeur plus élevée pour les enfants (< 17 ans) que pour les adultes (> 18 ans) (Bethony *et al.*, 2006). Ces chiffres ne tiennent pas compte de facteurs tels que le climat et la densité démographique [OMS, 1988]. Dans certains pays, la prévalence moyenne globale va de 16 à 48% et, pour un pays déterminé, peut aller de 0 à plus de 70%. Dans ces cas de nématodoses, on rencontre l'anguillulose qui trouve de bonnes conditions de développement favorisant le cycle externe du parasite dans toutes les régions chaudes et humides du globe où elle touche essentiellement les habitants des zones rurales travaillant dans les zones inondées où les boues protègent les larves. Dans ces conditions, l'ensemble de l'Afrique Noire, mises à part quelques zones arides, est une zone de prévalence obligatoire supérieure à 5%.

Au Bénin, une enquête menée dans la région méridionale, montre que 8,7 % chez 256 consultants du Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert Maga de Cotonou et 15,5 % chez 116 patients d'un Centre de Santé en milieu rural (Mazzougodji *et al.*, 1988) de cas d'anguillulose (Tableau 4).

Tableau 4: Prévalence des infestations dues au *S. stercoralis* dans certains pays de l'Afrique

Espèce parasite	Togo	Nigeria	Côte d'ivoire	Gabon	Cameroun	Sénégal	Congo	République de Centrafrique	Moyennes des prévalences
<i>Strongyloides stercoralis</i>	5,3 %	33 %	16,2 %	13 %	19 %	36 %	26 %	48 %	24,56 %

(Coulaud, 1990 ; Udoni *et al.*, 1996 ; Mahmoud, 1996 ; Nozais ,1998)

2.2.3.2. Modalités de contamination

La strongyloïdose à *S. stercoralis* est une maladie commune à l'Homme, au chien et chat. Mais l'Homme est le réservoir principal, le rôle du chat et du chien qui interviennent dans l'épidémiologie de la maladie étant mal défini. On pense que, dans certains foyers, l'infestation peut se transmettre d'une espèce à l'autre par le sol contaminé. Une contamination muqueuse et sexuelle est aussi possible (Nicolas *et al.*, 2005).

La larve strongyloïde contamine l'Homme par voie transcutanée. Elle gagne le poumon par voie lymphatique ou sanguine. Après avoir traversé la paroi de l'alvéole pulmonaire, elle gagne les bronches puis la trachée. Elle est déglutée, gagne l'intestin grêle, devient une femelle adulte parthénogénétique qui s'enfonce dans la muqueuse et y pond ses œufs. Les œufs

éclosent dans la muqueuse intestinale, les premières larves rhabditoïdes apparaissent dans les selles 27 jours après la contamination.

Une température du sol supérieure à 20°C, favorise la transformation des larves rhabditoïdes émises dans les selles en adultes libres stercoraux capables de fécondation. Elle aboutit à l'émission d'œufs puis de larves rhabditoïdes capables de devenir des larves strongyloïdes infestantes.

Dans l'intestin de l'homme, les larves rhabditoïdes peuvent se transformer en larves strongyloïdes capables de réinfestation à travers la muqueuse du tube digestif ou de la marge anale sans passage par le milieu extérieur.

2.2.4. Physiopathologie

Dans les infections chroniques humaines, *S. stercoralis* est capable d'élaborer une stratégie de survie en n'entraînant qu'un minimum de réaction inflammatoire dans la muqueuse intestinale, ce qui tend à expliquer avec l'autocontamination la longue tolérance de l'infection (Heyworth, 1996 ; Trajman et *al.*, 1997). Chez la souris, les lymphocytes B n'interviennent pas dans la réponse immune primaire (Herbert et *al.*, 2002). Les mécanismes étiopathogéniques rompant cet état d'équilibre et déterminant une réaction maligne en cas d'immunodépression demeurent inconnus à ce jour.

2.3. Lutte contre les parasitoses gastro-intestinales

2.3.1. Lutte contre les strongyloses gastro-intestinales des petits ruminants

La lutte contre le parasitisme gastro-intestinal des ovins est l'une des premières priorités pour tous les types d'élevage ; elle mobilise des moyens financiers considérables tant à l'échelle individuelle de l'éleveur qu'à l'échelle collective dans tous les pays. Des tentatives de vaccination contre les helminthes les plus pathogènes et des recherches génétiques de sélection d'animaux naturellement résistants ont bien été entreprises, mais n'ont pas encore abouti à des solutions réalisables en pratique. Actuellement, la lutte est fondée en partie sur des mesures sanitaires et zootechniques visant à diminuer le risque d'infestation par les

éléments parasitaires exogènes. Cependant, elle demeure très largement tributaire de l'utilisation des produits anthelminthiques pour la chimiothérapie et la chimioprévention.

L'intérêt des produits anthelminthiques utilisés à l'heure actuelle, et qui explique leur large diffusion, réside dans leur grande efficacité, leur innocuité et leur coût modéré. Mais actuellement, l'utilisation de ces médicaments se heurte dans beaucoup de pays à deux problèmes qui suscitent des inquiétudes quant à leur avenir et menace d'affaiblir les moyens de lutte contre les helminthoses : le problème des résidus et le phénomène de chimiorésistance.

Le problème des résidus dans les denrées d'origine animale, surtout la viande et le lait des animaux traités, est aggravé par l'extension de l'usage des nouveaux produits macrolides à large spectre et dont la rémanence dans l'organisme est très longue. Des réglementations sont mises en place concernant les autorisations de mise sur le marché, et les limites maximales annexées de résidus doivent être respectées.

La chimiorésistance s'étend progressivement à tous les continents et concerne toutes les familles d'anthelminthiques. L'amointrissement de l'efficacité de la plupart des anthelminthiques contre certains helminthes des petits ruminants est un phénomène qui menace gravement certains pays de l'hémisphère sud de pertes catastrophiques dans les élevages. Les régions de l'hémisphère nord, jusqu'à présent moins exposées, commencent à voir surgir et se multiplier les cas de chimiorésistance. D'où l'importance essentielle, à l'heure actuelle, de tenir compte de ce risque dans tout programme de lutte mis en place contre les helminthoses.

Dans ce contexte, le retour à des moyens de lutte plus naturels tels que l'emploi de plantes ou de champignons aux propriétés vermifuges démontrées, est une piste qui mérite d'être explorée.

2.3.2. Lutte contre l'anguillulose

Les interventions thérapeutiques individuelles, curatives, symptomatiques ou prophylactiques classiques sont accompagnées en zone tropicale de programmes internationaux ou nationaux de contrôle des grandes endémies parasitaires. Ces programmes de lutte ont pour objectif principal soit l'arrêt de la transmission de l'affection soit le contrôle direct de la morbidité-mortalité de la maladie. La prophylaxie de l'anguillulose repose sur la lutte contre le péril

fécal. Un traitement systématique est obligatoire chez tout patient susceptible d'avoir été infecté avant d'entreprendre ou de renouveler une corticothérapie.

2.3.3. Molécules anthelminthiques disponibles et leurs modes d'action

Le marché des anthelminthiques pour les Ruminants est considérable et les investissements engagés dans les différentes mesures de contrôle du parasitisme témoignent de l'impact économique majeur de ce problème en élevage. Bien que les anthelminthiques soient utilisés chez les espèces (y compris l'Homme), le marché concernant les Ruminants est de loin le plus important en termes de coût. Lanusse et Prichard (1993) ont rapporté que déjà près de 1,7 milliards de dollars étaient dépensés annuellement à travers le monde dans le cadre de la lutte antiparasitaire chez les Ruminants !

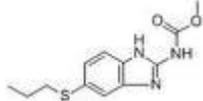
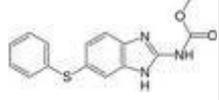
Etant donnée l'ampleur du problème, d'importants moyens ont été déployés afin de mettre au point des molécules douées d'une activité anthelminthique suffisamment puissante. Ainsi, un large panel de substances strongylicides les plus couramment utilisées en Afrique tropical, en particulier au Bénin (tableau 5) est disponible, avec ou sans autorisation de mise sur le marché (AMM) pour les ovins.

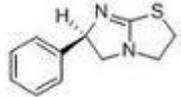
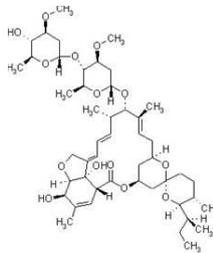
Le traitement de la strongyloïdose a été révolutionné par l'arrivée de l'ivermectine (Stromectol®), anthelminthique polyvalent qui a une efficacité d'environ 85-90% (Datry, 1994). Chez l'adulte, la posologie est de 200 µg/kg en prise unique, le matin, à jeun. Le patient doit rester à jeun pendant 2 h après la prise. L'efficacité s'évalue environ 2 à 3 mois après ce traitement. L'éosinophilie doit alors s'être normalisée : la constatation d'un chiffre supérieur à la normale (500 cellules/mm³) doit permettre d'effectuer un nouveau traitement. La cinétique de décroissance des titres sérologiques obtenus par ELISA est beaucoup plus lente, et le test peut mettre plus d'un an à se négativer (Zaha, 2000).

L'albendazole (Eskazole®, Zentel®), dérivé benzimidazolé, a une efficacité médiocre (38%) à la posologie recommandée dans le RCP, soit 400 mg/j pendant 3 jours (Datry, 1994 ; Zaha, 2000).

Le thiabendazole (Mintézol®), dérivé benzimidazolé, moyennement efficace et générateur d'effets secondaires marqués, ne doit plus être utilisé (Zaha, 2000). L'utilisation de cette molécule est d'ailleurs de moins en moins fréquente au Bénin.

Tableau 5 : Principaux anthelminthiques actifs chez les petits ruminants (liste non exhaustive) (Hoste, 2002 ; Hounzangbé-Adoté, 2004 ; Penicaud, 2007 ; Berrag, 2008)

Familles	Molécules	Noms déposés	Mode d'action	Doses et mode d'administration	Temps d'attente				
					Lait	Viande et abats (Jours)			
Benzimidazoles	Albendazole : N-propylthio-2-benzimidazolyle carbamate de méthyle 	Actifuge®, Bilutac®, Valbazen®, Mediamix V, Disthelm®, Rumifuge®, Proftril®	Action sur le métabolisme énergétique par inhibition de la fumarate réductase: Mort des parasites cibles par inanition	3,8 à 7,5 mg/kg selon les produits Voie orale	Interdit	10			
	Fenbendazole : ester méthylique de l'acide 5-phenylthio-2-benzimidazolyle carbamique 	Panacur®, Mediamix V, Fenben®					5 mg/kg selon les produits Voie orale	Nul	8
	Oxfendazole : 2-méthoxycarbonyl amino-56 phénylsulfinylbenzimidazole 	Oxfenil®, Synanthic®					5 mg/kg selon les produits Voie orale		

<p>Imidazothiazole</p>	<p>Lévamisole : 1-chlorhydrate de di (tétra) hydro-2,3,5,6-phenyl-6-imidazo [2,1-b] thiazole</p> 	<p>Anthelminthicide ® Lévamisole® Polystrongle®</p>	<p>Cholinomimétiques : Paralysie des vers cibles</p>	<p>5 à 10 mg/kg selon les produits Voie orale ou injectable</p>	<p>Interdit</p>	<p>3</p>
<p>Avermectine</p>	<p>Ivermectine : alpha-L-oleandrosyl-oleandroside lactone macrocyclique</p> 	<p>Ivomec® Ivermectine Eco® Qualimec®</p>	<p>Ils perturbent la fonction membranaire des synapses par leur activité « GABA like » ; ils se fixent sur les récepteurs « glutamates », provoquant l'ouverture des canaux chlore et la paralysie des parasites cibles</p>	<p>0,2 mg/kg selon les produits Sous-cutané</p>	<p>Interdit</p>	<p>42</p>

2.3.4. Apparition de chimiorésistances

2.3.4.1. Définition et importance de la chimiorésistance

Une population chimiorésistante est une population de parasites ayant génétiquement acquis la capacité de résister à des concentrations d'antiparasitaires habituellement mortelles pour des individus de la même espèce. C'est une situation où un dosage normal d'une molécule ne permet plus une réduction conséquente des vers ou des œufs éliminés. Elle résulte d'une pré-adaptation par mutation dont le déterminisme est génétique et la transmission héréditaire. L'anthelminthique ne fait donc que sélectionner les individus sensibles tout en préservant les résistants.

A l'heure actuelle, la chimiorésistance aux molécules anthelminthiques représente un problème très grave pour les grands pays d'élevage intensif, surtout dans l'hémisphère sud : Afrique du sud, Amérique latine, Australie, Nouvelle-Zélande. Le risque d'apparition de

nématodoses mortelles à large échelle a déjà poussé de nombreux éleveurs de ces pays à abandonner cette filière de production. Le phénomène, présent sur tous les autres continents avec une incidence plus faible, a cependant tendance à se généraliser rapidement et surtout à se manifester sous forme de multi résistances à plusieurs substances anthelminthiques. Les parasites qui présentent une chimiorésistance aux anthelminthiques sont en général les plus pathogènes : *H. contortus*, *T. colubriformis*, *O. columbianum*, *Strongyloïdes spp* (Besier, 2007).

2.3.4.2. Mécanismes de développement des résistances

L'apparition de la résistance aux anthelminthiques chez les parasites est un phénomène génétique évolutif, consistant en la sélection d'allèles de résistance, initialement présents dans la population mais à une fréquence extrêmement faible (de l'ordre de 10^{-6}). Sur le plan moléculaire, la résistance aux benzimidazoles de *T. colubriformis* ou *H. contortus* est due à une mutation ponctuelle affectant le gène de la β -tubuline et substituant un acide-aminé (la tyrosine : TYR) à un autre (la phénylalanine : PHE) (Silvestre et Cabaret, 2002). Les mécanismes biochimiques de la chimiorésistance sont, ici en relation avec le mode d'action principal (à l'échelle moléculaire) de l'anthelminthique sur une cible donnée de l'helminthe. Le médicament remplace, par mimétisme structurel, une molécule organique sur le site ou le récepteur de son action, ce qui empêche le déroulement de la réaction normale et aboutit à des perturbations des métabolismes. Lors de chimiorésistance, le site (ou le récepteur) est modifié. Il n'est probable que des processus de détoxification du médicament entrent également en jeu et deviennent plus actifs chez les helminthes résistants à l'anthelminthique.

2.3.5. Solutions alternatives : lutte intégrée non chimique contre les strongles gastro-intestinaux

En raison de l'apparition et de la pérennité des problèmes de chimiorésistances, mais également du fait des préoccupations croissantes des consommateurs quant à l'emploi de substances médicamenteuses en élevage, la nécessité impérieuse de trouver de nouveaux moyens de lutte contre les strongles gastro-intestinaux s'est faite ressentir. En effet, depuis quelques années, les consommateurs ont considérablement changé de point de vue sur l'élevage en général et sur la notion de traçabilité en particulier. Force est de constater qu'ils se sentent plus directement concernés par les problèmes médico-sanitaires de l'élevage,

surtout depuis des "crises" particulièrement médiatisées tel l'épisode de la maladie de la "vache folle"(Guillard, 2004).

C'est en outre sous l'effet de la "pression" des consommateurs que se sont développés des courants tels que l'agriculture biologique. Le public est en effet de plus en plus soucieux du bien-être des animaux, de leurs conditions d'élevage et de la pollution environnementale. Les solutions alternatives pour la maîtrise des infestations parasitaires se doivent donc d'être non seulement efficaces mais également en accord avec les attentes du public.

Nous choisirons de ne pas traiter ici de moyen alternatif qu'est l'homéopathie. Nous nous intéressons plus précisément aux méthodes visant à limiter la contamination du milieu extérieur ou à améliorer la résistance de l'hôte.

2.3.5.1. Diminution de la contamination du milieu extérieur

2.3.5.1.1. Gestion du pâturage

Elle a pour but de diminuer l'infestation des parcelles afin de réduire au maximum des possibilités de contact entre l'animal hôte et les larves L₃ (Hoste et Chartier , 1997). Pour cela, plusieurs techniques existent (Jackson, 2000 ; Cabaret, 2002):

-les méthodes dites "préventives" : elles consistent à introduire des animaux non parasités (comme des animaux jeunes n'ayant jamais pâture) sur des surfaces propres.

-Les méthodes "évasives" : les animaux parasités sont traités puis placés sur des parcelles non contaminées. Cette technique est toutefois à proscrire en cas de résistance des parasites car la contamination du milieu extérieur ne se ferait alors qu'avec des espèces résistantes.

On distingue ainsi deux grandes techniques d'assainissement des pâtures qui sont l'assainissement par mise au repos court ou prolongé de la parcelle et l'assainissement par pratiques culturales (Hoste et Chartier , 1997, Hoste et Chartier , 2002).

2.3.5.1.2. Lutte biologique : utilisation de champignons nématophages

Le principe est d'utiliser des prédateurs naturels des larves infectantes de Nématodes à savoir des champignons microscopiques naturellement présents dans la microflore, du sol qui parasitent les larves L₃ et utilisent leur contenu comme substance nutritive. L'objectif est de réduire au maximum la contamination du pâturage. Il existe deux groupes de champignons utilisés dans cette optique (Hoste et Chartier , 1997, Hoste et Dorchies , 2000)

-les champions prédateurs qui piègent les larves L₃ dans les fèces grâce à des structures spécialisées de leur mycélium, comme des boutons collants auxquels adhèrent les larves des réseaux à l'intérieur desquels les larves sont prises au piège.

-les champions endoparasites qui infestent avec leurs spores les larves de parasites directement dans le tube digestif de l'hôte.

2.3.5.2. Augmentation de la résistance de l'hôte

2.3.5.2.1. Production de vaccins

La vaccination semble, de prime abord très attractive dans le cadre de la lutte contre les strongles gastro-intestinaux des Ruminants. Si des résultats plus qu'encourageants ont été obtenus à l'étranger vis-à-vis d'un strongle respiratoire, *Dictycaulus viviparus*, chez les Bovins, il n'en est pas de même avec les nématodes du tube digestif.

Les principaux travaux concernant la vaccination contre les strongles gastro-intestinaux ont porté sur *H. contortus*, car l'espèce est très pathogène et qu'il existe de multiples souches résistances aux anthelminthiques.

Les étapes de la mise au point d'un vaccin sont dans un premier temps d'élire les fractions antigéniques les plus appropriées, c'est-à-dire celles permettant d'obtenir la meilleure réponse vaccinale, puis de les purifier, d'isoler les gènes qui les codent afin de produire des protéines recombinantes (Smith, 1995) .

Dans le cas des nématodes parasites, et plus particulièrement des trichostrongles du tractus digestif, les résultats les plus encourageants ont été obtenus dans la mise au point d'un vaccin contre *H. contortus* à partir du concept novateur d'« antigène caché » (Munn, 1997). Dans le cas d'*H. contortus*, l'antigène le plus étudié est une protéine membranaire de l'intestin du ver (protéine H₁₁) (Munn,1993). Par sa localisation interne, celle-ci correspond exactement à la définition d'un « antigène caché » car n'entraîne pas dans les conditions naturelles de stimulation de la réponse immune de l'hôte.

Les résultats positifs obtenus vis-à-vis d'*H. contortus* s'expliquent probablement en partie par le mode de nutrition particulier de cette espèce, hématophage, qui favorise un contact étroit, après vaccination, entre l'antigène et les effecteurs sanguins de la réponse de l'hôte. Pour d'autres genres de nématodes, tels *Trichostrongylus* qui ont un mode de nutrition différent (histophage), l'efficacité de tels vaccins risque et reste à explorer (Hounzangbé-Adoté, 2004 ; Robert , 2006).

Une des caractéristiques essentielles des infestations par les trichostrongles est le polyparasitisme. Les ruminants sont en général infestés simultanément par plusieurs espèces

dans les divers organes digestifs. Le vaccin idéal doit donc être polyvalent, mais un antigène caché, commun aux principaux genres pathogènes, n'a pas encore été identifié. Toutefois, à l'heure actuelle, aucun vaccin contre les strongyloses des Ruminant domestiques n'est disponible sur le marché et il est certain qu'il s'agit d'une solution à long terme (Guillard, 2004).

Quoi qu'il en soit, il est important de considérer la vaccination en parasitologie (ainsi que l'ensemble des solutions alternatives) plutôt comme un outil épidémiologique permettant de maintenir un degré minimale de contamination des pâtures que comme une arme visant à l'éradication totale des parasites chez l'animal (Smith, 1995).

2.3.5.2.2. Sélection génétique

Comme nous l'avons vu, à coté des facteurs liés à l'âge ou de l'état physiologique des animaux, des différences de réponse sont notées selon les races ou les individus (Baker *et al.*, 1992). A partir de cette constatation, de nombreux programmes ont été développés notamment chez le mouton, afin d'identifier ou de sélectionner des races ou des lignées intraraciales dotées de qualités particulières de résistance ou de résilience face à diverses espèces de trichostrongles. La sélection génétique afin d'améliorer la résistance au parasitisme gastro-intestinal est une méthode ayant un impact à moyen et à long terme. Toute fois le développement de tels programmes nécessite un investissement coûteux et important (Hounzangbé-Adoté, 2004 ; Robert , 2006).

2.3.5.2.3. Amélioration de la nutrition

Comme cela a déjà été dit, l'alimentation a un rôle prépondérant lors d'infestation parasitaire. Lorsque les aspects qualitatifs et/ou quantitatifs de la ration alimentaire ne sont pas satisfaisants, des priorités sont fixées au sein de l'organisme de l'animal favorisant ainsi certaines fonctions. Ainsi, plus une fonction est favorisée (croissance, reproduction, production de lait, de laine ...), donc prioritaire en terme de fourniture de nutriments moins elle sera affectée par les variables de nutrition (Etter, 2000). Les études ont plus particulièrement porté sur la part protéique de l'alimentation puisque l'on sait que le parasitisme affecte en priorité le métabolisme protéique.

De façon générale, on constate qu'une augmentation de l'apport protéique permet une meilleure résilience des animaux infestés se traduisant entre autres par une moindre chute des productions (Coop et Kyriazakis, 1999 ; Hoste *et al.*, 2001).

L'efficacité d'une supplémentation protéique sur la résistance des animaux au parasitisme a également été observée mais de façon moins systématique (Coop et Kyriazakis, 1999). Certaines études (Etter, 2000) ont révélé qu'un apport accru de protéines ne permettait pas de diminuer l'excrétion fécale ou la charge parasitaire tandis que d'autres ont montré que l'apport de farine de graine de coton à des Caprins infestés par *T. colubriformis* entraînait une diminution de ces mêmes paramètres.

Il est donc indispensable d'assurer une alimentation équilibrée et suffisante tant en quantité qu'en qualité à l'ensemble du troupeau et de veiller plus particulièrement à adapter la ration pour certaines catégories d'animaux, plus fragiles en matière de parasitisme.

Bien que l'alimentation ne représente pas encore une alternative plausible à l'emploi d'anthelminthiques en Agriculture Biologique. Elle contribue de façon primordiale à la lutte antiparasitaire (Guillard, 2004).

Une nouvelle voie dans les pratiques alimentaires est par ailleurs explorée depuis quelques temps, il s'agit de la distribution des plantes naturelles à vermifuge . Leur intérêt anthelminthique et économique suscite ainsi la plus grande attention de la part scientifique.

Plusieurs plantes ont des propriétés anthelminthiques. Leur utilisation faisait d'ailleurs partie des pratiques traditionnelles des éleveurs et de la médecine populaire partout dans le monde avant l'adoption généralisée des vermifuges de synthèse. Dans certains pays par exemple, il était de coutume d'utiliser des «sapinages» (branches de pins, épinettes ou sapins) pour vermifuger les moutons. Bien qu'il s'agisse là de sagesse populaire, la recherche vétérinaire s'est aussi penchée sur la question des plantes anthelminthiques, particulièrement avant la deuxième guerre mondiale dans les pays occidentaux puis, par la suite, dans les pays de l'Est et en Inde. On dispose donc de données sérieuses sur l'action de plusieurs plantes ou extraits de plantes sur certains parasites, ce qui nous permet de connaître les limites de ces substances. Certaines plantes vermifuges peuvent occasionner des effets secondaires chez les animaux. Les plus puissants vermifuges naturels sont le plus souvent des poisons potentiels. Il est donc important de respecter les doses recommandées. Une façon d'éviter les effets secondaires est d'administrer ces plantes sous forme de préparations homéopathiques. Les produits homéopathiques ont aussi l'avantage de ne pas nécessiter de période de jeûne préalable et de diète laxative après le traitement (Robert, 2006).

Dans les autres cas, il est conseillé d'accompagner tous les traitements vermifuges avec des produits naturels d'un jeûne sauf pour les petits qui tètent encore leur mère. Une période de jeûne de 12 à 48 heures doit précéder le traitement et une autre période de jeûne de six heures doit le suivre. Par après, une diète laxative ou une purgation est recommandée (Robert, 2006).

2.3.6. Traitement de la parasitose par les molécules anthelminthiques naturelles

2.3.6.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On attribue à ces flavonoïdes des propriétés variées : anti-inflammatoire, analgésique, antiplasmodique, antibactérienne, anthelminthique, hépatoprotectrice, etc (Bruneton, 2009). Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On distingue : les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanonols, les flavanes, les flavan-3-ols, etc. Les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune (Figure 11). Ce groupe de composés est défini par une structure générale en C_{15} , caractérisée par un enchaînement Ar- C_3 -Ar. Les flavonoïdes "lato sensu", comprennent les flavonoïdes "stricto sensu" (flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, l'ion flavylum, chalcones, aurones) et les isoflavonoïdes (Bruneton, 2009).

Les flavonoïdes "stricto sensu" dérivent d'une structure 1,3-diphénylpropane. L'enchaînement propanique est le plus souvent sous forme d'hétérocycle pyranique, à l'exception de deux groupes : les chalcones et les aurones. Au plan biosynthétique, les flavonoïdes résultent de la condensation de 3 unités C_2 (sous forme de 3 malonyl-CoA) qui va former le noyau A et d'un acide cinnamique activé qui sera à l'origine du noyau B et la chaîne propanique. Cette condensation est catalysée par la chalcone synthétase, enzyme-clé dans la formation des flavonoïdes qui conduit à un précurseur, la chalcone (Bruneton, 2009).

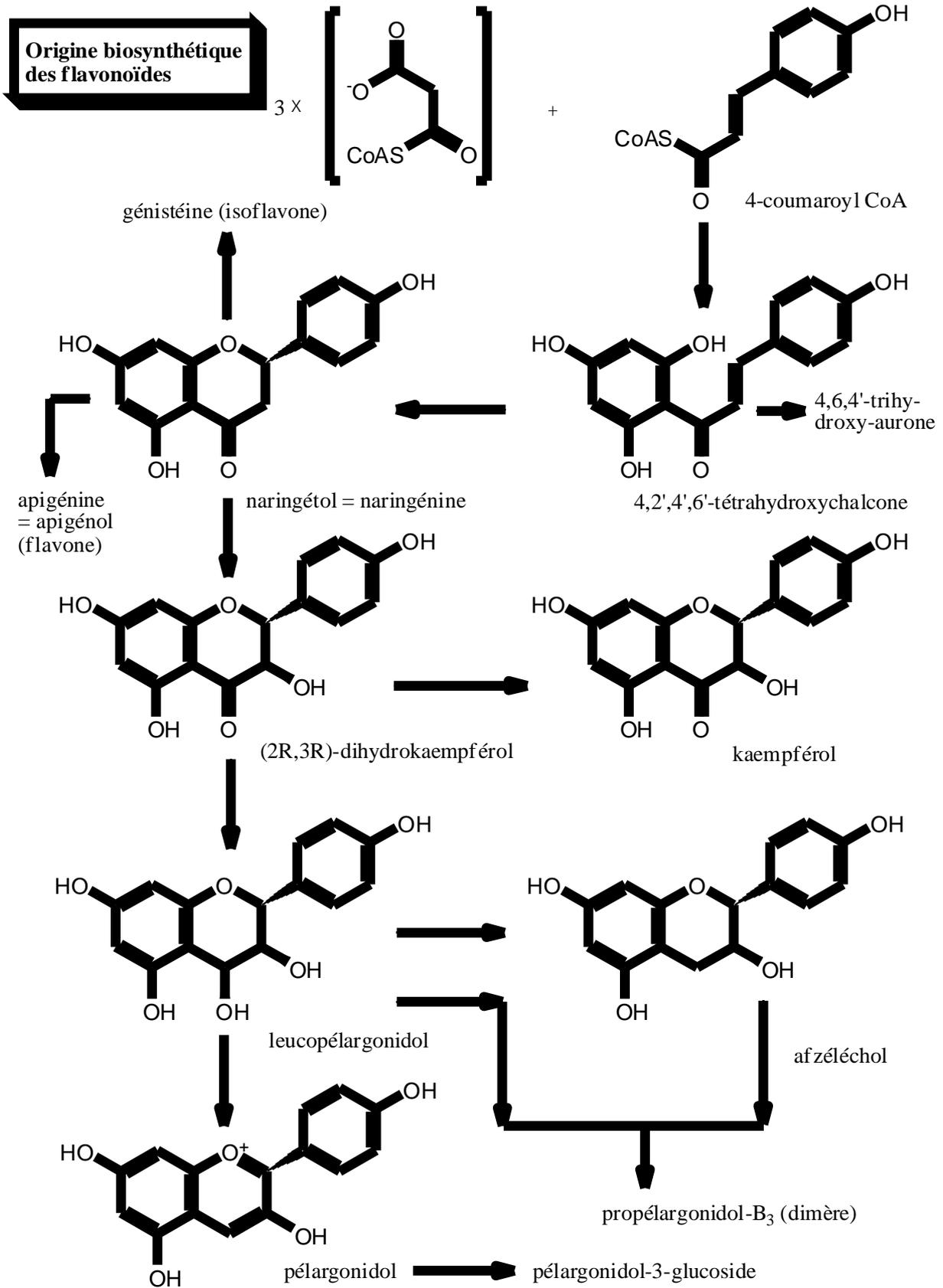


Figure 11 : Origine biosynthétique des flavonoïdes (Bruneton, 2009)

2.3.6.2. Tanins

Les tanins sont des substances d'origine végétale qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible, le cuir (Bruneton, 1999). Cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tanins et les fibres de collagène de la peau.

D'un point de vue biochimique, une première définition a été proposée par Bate-Smith (1973) : « des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3 000 Da qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines ». Même si cette définition reste valable, elle a été complétée grâce aux méthodes d'analyse récentes qui ont permis d'éclaircir la structure de ces polyphénols. Ainsi, les tanins sont désormais définis comme des polyphénols de masse moléculaire allant jusqu'à 20 000 Da (Haslam, 1989; Hagerman, 2002). Selon leur structure chimique, ils se divisent en deux catégories: les tanins hydrolysables (THs) (groupe principalement responsable des effets toxiques pouvant apparaître lors de la consommation de certaines plantes) et les tanins condensés (TCs) (ils ne traversent pas la barrière intestinale, ils sont donc beaucoup moins toxiques que les tanins hydrolysables) (Bruneton, 2009)

2.3.6.2.1. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables (THs) sont des oligo-ou poly-esters d'un sucre, en général le glucose, et de molécules d'acide-phénol (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999; Mueller-Harvey, 2001). Ils sont classés selon la nature de l'acide-phénol : les tanins galliques possèdent un acide gallique (Figure 5), alors que les tanins éllagiques ont un acide hexahydroxyphénique (Hagerman, 2002). Les tanins éllagiques sont obtenus suite à un couplage oxydatif entre les molécules d'acide gallique (Mueller-Harvey, 2001). Le terme « tannin hydrolysable » décrit leur sensibilité à l'hydrolyse acide. Ils sont notamment hydrolysés dans le tractus digestif des ruminants et leurs produits de dégradation sont absorbés. Ils peuvent être responsables d'intoxications, lors d'ingestion trop massive, et peuvent provoquer des lésions hépatiques et rénales, décrites chez les moutons (Zhu *et al.*, 1992) ou les bovins (Plumlee *et al.*, 1998).

2.3.6.2.2. Tanins condensés

Les tannins condensés (TCs), ou proanthocyanidols, sont des polyphénols appartenant à la famille des flavonoïdes (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Bruneton, 2009). En général, les TCs ont des PMs plus élevés que ceux des THs (Hagerman, 1992). L'unité de base (ou monomère) des TCs est un flavan-3-ol (Figure 12). Les TCs sont des polymères de flavan-3-ols liés par des liaisons de type C-C (Type B) ou C-OC (type A) (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Jean-Blain, 1998; Bruneton, 2009; Feucht et Treutter, 1999; Schofield *et al.*, 2001). Selon la nomenclature française, les noms des TCs se terminent en «-ols» car ce sont des flavonoïdes.

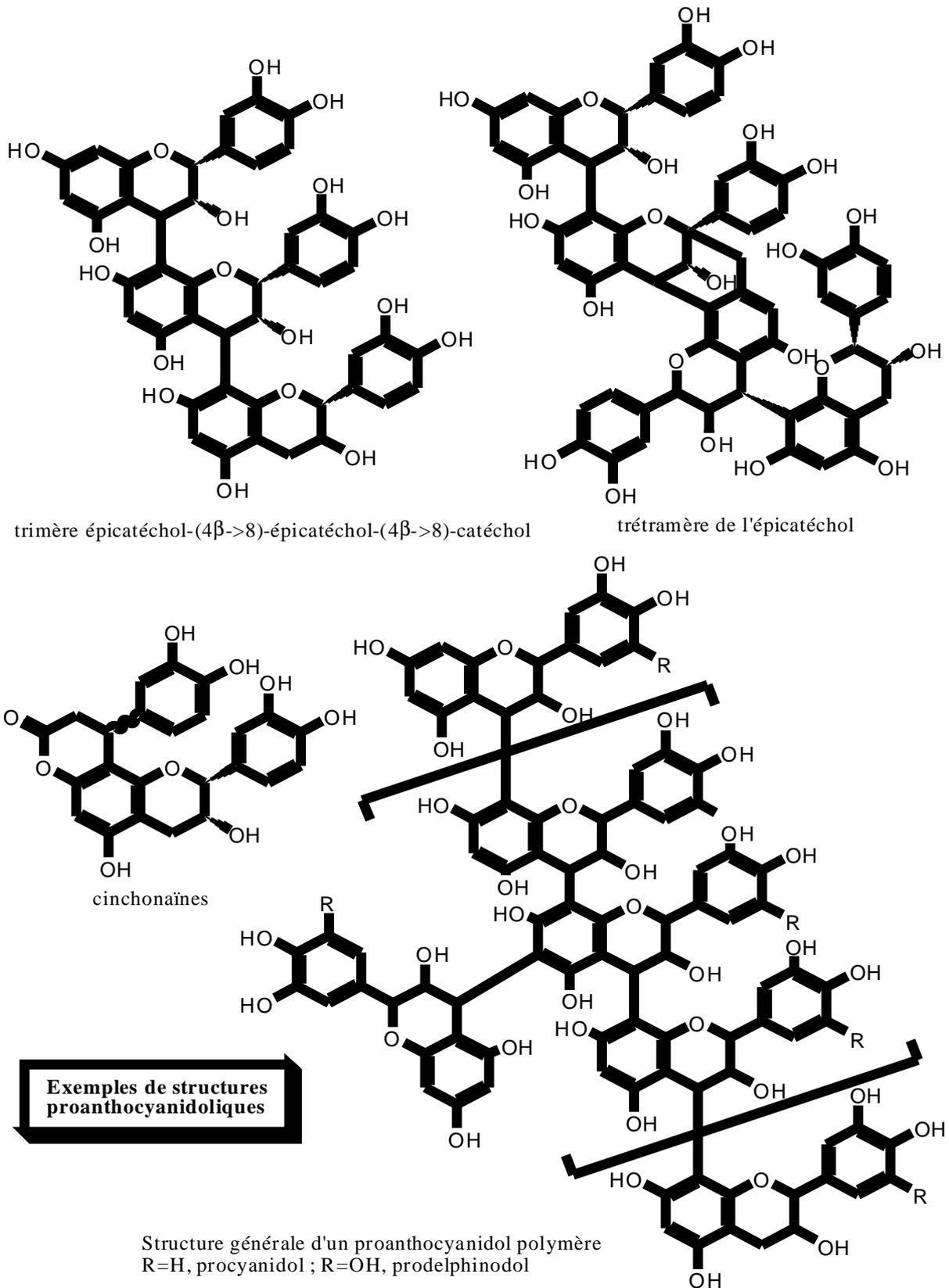


Figure 12. Modèle de structure branchée des tannins condensés (Bruneton, 2009).

2.3.6.3. Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des produits odorants, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche ou soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage (Pharmacoopé Européenne, 2011). Une huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. Les huiles essentielles peuvent subir un traitement ultérieur approprié. Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont repartis dans un nombre limité de familles : Apiaceae, Lamiaceae, Rutaceae, etc. Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits, graines (Bruneton, 2009). Quantitativement, les teneurs en huiles essentielles sont plutôt faibles, assez souvent inférieures à 10mL/Kg. Pour une même espèce, la composition des essences peut varier d'un organe à l'autre. Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent, de façon exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et celui des composés aromatiques (figure 13) beaucoup moins fréquents d'autre part. Les huiles essentielles ont : un pouvoir antiseptique, des propriétés spasmolytiques et sédatives et des propriétés irritantes etc... (Bruneton, 2009).

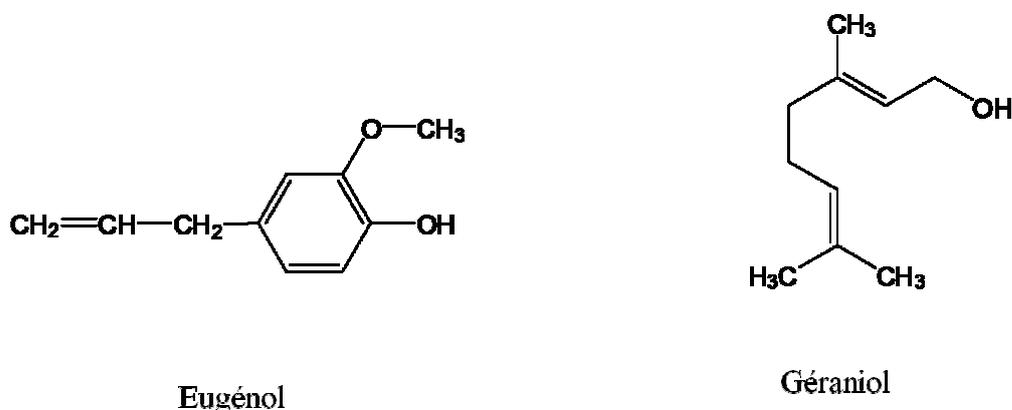


Figure 13 : Structure de quelques composés rencontrés dans les huiles essentielles
(Bruneton, 2009)

2.3.6.4. Alcaloïdes

Initialement définis comme des substances organiques, azotées, basiques, d'origine naturelle et de distribution restreinte, les alcaloïdes ont une structure complexe. Leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique et ils possèdent une activité pharmacologique marquée à faible dose. Pour certains auteurs, ils sont issus d'un seul règne végétal (Bruneton, 2009). Ils existent à l'état de sels et ils sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé. Le regroupement d'un tel ensemble est par ailleurs confirmé par des réactions communes de précipitation avec les réactifs généraux des alcaloïdes. Les plantes à alcaloïdes ne renferment que très rarement un seul alcaloïde, certes elles peuvent parfois contenir un composé très majoritaire. En règle général, tous les alcaloïdes d'une même plante ont une origine biogénétique commune, même si leurs structures peuvent paraître assez différentes (Bruneton, 2009). Pour une plante donnée, la teneur en alcaloïdes peut être très inégale selon les organes, certains pouvant en être dépourvu. Les teneurs en alcaloïdes sont variables mais tournent généralement autour de 1%. Le lieu de synthèse des alcaloïdes dans les plantes varient selon les espèces. Les tissus jeunes en phase de croissance et tissus périphériques (cellules épidermiques ou sous-épidermiques des feuilles, enveloppes des graines, racines) sont les sites privilégiés de production. Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leur activité pharmacologiques qui s'exercent dans les domaines les plus variés (Bruneton, 2009).

- Au niveau du système nerveux central qu'ils soient dépresseurs (morphine) ou stimulants (caféine)
- Au niveau du système nerveux autonome : sympathomimétiques ou sympatholytique, parasymphatomimétiques inhibiteurs des cholinestérases, anticholinergique, ganglioplégiques.

On notera aussi l'existence des curarisants, d'anesthésiques locaux, d'antifibrillants, d'antitumoraux, d'antipaludique, d'anthelminthique, etc... (Bruneton, 2009).

3. Généralités sur les plantes de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes*

3.1. Description du genre *Newbouldia*

Le genre *Newbouldia* est un genre particulier dans la famille des *Bignoniaceae* avec une seule espèce *Newbouldia laevis*, qui est répandu dans les régions tropicales des Etats unis d'Amérique, en Afrique Centrale et de l'Ouest. Il n'y a donc pas de différence entre la description du genre et de l'espèce.

3.2. Espèce *Newbouldia laevis*

3.2.1. Appellation

L'espèce étudiée a été nommée *N. laevis* par Berthode Carl Seeman lors de la révision du genre *Spathodea*, en 1863, dans le « Journal of Botany, British and Foreign. London »

3.2.2. Classification dans la famille des *Bignoniaceae*

Règne : *Plantaea*

Embranchement : *Magnoliophyta* (Plantes à fleurs)

Sous embranchement : *Angiospermae*

Classe : *Eudicotyledona*

Sous classe : *Asteridae*

Ordre : Lamiales

Famille : *Bignoniaceae*

Tribu : Tecomeae

Genre *Newbouldia*

Espèce : *N. laevis* (P. Beauv.) Seeman ex Bureau

3.2.3. Synonymes

Spathodea laevis avait été le nom donné par A. Palisot de Beauvois en 1801. Actuellement il est considéré comme un synonyme.

Dans la communauté Béninoise, l'espèce *N. laevis* est connu sous les noms figurant dans le tableau 6

Tableau 6: Différents noms locaux de la plante de *N. laevis*

Pays	Ethnies/Dialectes	Appellations	Références
Bénin	Goun- Mina Yoruba-Nagot Tcha de Bantè Adja Waci Bariba Kotafon Fon	Kpatima, Desretin Igi Akôkô Akôkô Desre, Aflama, Avenyon Hwenma Deebu Desre ?	(Burkill, 1985 ; Keay, 1989)
Côte d'Ivoire	Abe Adyukru Akan-Asante Baule Fula-Fulfulde	G-bâlie -K-palié K-poierem Tokonzui Tunzué Sukunde	(Burkill, 1985 ; Keay, 1989)
Guinea-Bissau	Bidyogo Crioulo Fula-Pulaar Mandyak Mankanya Nalu	Canhom Manduco de feticro Canhómburi Sucúndè Becuape Boukouf Singête	(Burkill, 1985 ; Keay, 1989)
Ghana	Akan-Asante Anyi-Aowin Baule Brong Fante Gbe-Vhe Wasa	Sesemasa Atronzuo Tonzue Sonsonangsayng Esisimansa Aviãtilifui Sesemasa	(Burkill, 1985 ; Keay, 1989)
Mali	Manding-Maninka	Kinkin- Moquiquiri-Tore	(Keay, 1989)
Nigeria	Anaang Bokyi Edo Efik Tiv Hausa Yoruba	Òni k Nso Íkhímì Óbóò Kontor Àdùrúkù Akoko, Igbo-Ogirisi	(Burkill, 1985 ; Keay, 1989)
Sénégal	Balanta Banyun Dioula Fula-Pulaar Konyagi Manding-Bambara Serer Wolof	Gingid Kibompor-Sibompol Bu gompa-egompa-Fugompefu Kôdomburu Pasal Kolokolo Gamb Gam-Ngam	(Burkill, 1985 ; Keay, 1989)
Togo	Gbe-Vhe Tem Yoruba-Ifè	Lifui Akinale aboboe	(Burkill, 1985)
France		Hysope africaine	(Burkill, 1985)

3.2.4. Description botanique

Espèce vivace, glabre et à croissance rapide, *N. laevis* (figure 14) est normalement un petit arbre qui peut atteindre 12 m de hauteur qui se recèpe lorsqu'on le coupe. Mais en raison de tailles fréquentes c'est le plus souvent, un arbuste ou buisson retrouvé autour des habitations et dans les forêts secondaires. La plante se propage par les graines ou les parties basales de la tige. La tige est ligneuse, en général courtement ramifiée, irrégulièrement torsadée, lisse et dotée de brindilles noueuses. Les feuilles sont portées par un pétiole d'environ 8 cm de long. Elles sont composées, longues d'environ 50 cm, imparipennées, opposées et parfois verticillées avec trois à six paires de folioles mesurant 10 à 20 cm de long et 5 à 10 cm de large. Le rachis est fortement renflé aux nœuds et porte deux glandes nectarifères. Les folioles sont oblancéolées, dentées, acuminées, sessiles ou brièvement pétiolées montrant deux glandes à base du pétiole. Le limbe foliaire est papyracé, lisse et marqué de nervures saillantes. L'inflorescence est une panicule racémeux terminale, dense, composée de fleurs tubulaires violet rougeâtre ou pourpres de 5 à 6 cm de long qui attirent souvent les fourmis. Le fruit est une capsule longue, déhiscente et pendante de 30 cm de long à valves trinervées qui porte des glandes attirant les fourmis. Les graines sont plates et ailées de 3 cm de long. La formule florale est $5S / 5P / (2-) 4(-5) St / 2C$. On obtient les fleurs dans la période allant du mois de Décembre à celui de Janvier et les fruits pendant le mois de Mars. *N. laevis* est disséminé en forêt et toujours vert. L'espèce *N. laevis* se retrouve dans la zone soudanienne où règne un climat humide, elle profite de l'eau de consommation autour des cases. Elle est souvent plantée en raison de sa facilité de reprise par bouture et, comme elle drageonne, elle vit en petits peuplements. Les graines peuvent se semer, mais le bouturage est plus rapide. La récolte est artisanale et se fait à la machette. *N. laevis* est une plante répandue en Afrique : au Cameroun en passant par la Guinée équatoriale, le Gabon et le Zaïre. En Afrique de l'Ouest elle s'étend au Bénin, en Côte d'Ivoire, au Gambie, au Ghana, en Guinée, au Libéria, au Nigéria, au Sénégal, en Sierra Leone et au Togo (Adam, 1971 ; Aubréville *et al.*, 1963 ; Berhaut, 1971 ; Burkill, 1985-2004 ; Jardin botanique national de Belgique, 1967 ; Keay, 1953-1972 ; S^t. John, 1973 ; Steenis, 1948 ; Turrill, 1952).



(<http://www.flickr.com/photos/36517976@N06>)

Figure 14 : Rameau de *N. laevis*

La carte de la figure 15 présente ces différentes régions :



Figure 15 : Répartition géographique de l'espèce *N. laevis* en Afrique (Adam, 1971 ; Aubréville *et al.*, 1963 ; Berhaut, 1971 ; Burkill, 1985-2004 ; Jardin botanique national de Belgique, 1967 ; Keay, 1953-1972 ; S^t. John, 1973 ; Steenis, 1948 ; Turrill , 1952)

3.2.5. Travaux récents sur *N. laevis*

3.2.5.1. Composition chimique de l'espèce *N. laevis*

Des études rapportent que l'analyse phytochimique a indiqué la présence, des quinones, des alcaloïdes, des mucilages, des traces d'huiles essentielles, des dérivés phénoliques (flavonoïdes, tannins, acides phénoliques, glucuronat de flavones et flavonols), des glucides dans les différents organes de *N. laevis* (Olounladé, 2005 ; Assob Nguedia *et al.*, 2005 ; Tanko *et al.*, 2008).

Ø Alcaloïdes

Dans les racines de *N. laevis* quatre alcaloïdes indoliques dont l'harmane C₁₂H₁₀N₂ (méthylpyriindol) ont été isolés (Adesanya *et al.*, 1994 ; Houghton *et al.*, 1994 ; Gafner *et al.*, 1996). D'autres alcaloïdes tels que : pyrazole, pyrrolo (1,2b), withasomine ont été également isolés de la racine de *N. laevis* (Adesanya *et al.*, 1994 ; Houghton *et al.*, 1994 ; Aladesanmi *et al.*, 1998). Un nouveau type structural d'alcaloïdes extrait de l'écorce de *N. laevis* récolté au Nigeria près de Anambra state a été nommé newbouldine (C₁₂H₁₄N₂) par (Gafner *et al.*, 1998).

Ø Polyphénols

- Flavonoïdes

La plante de *N. laevis* contient de l'apigénine (apigénol) et de la lutéoline (lutéolol) (Gafner *et al.*, 1996) qui sont des composés chimiques de la famille des flavones, une sous classe des flavonoïdes (figure 16).

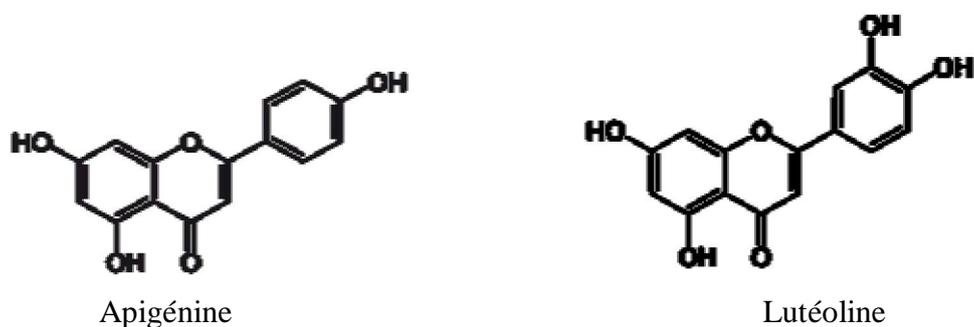


Figure 16 : Structure de quelques flavonoïdes rencontrés dans *N.laevis*

(Gafner *et al.*, 1996)

- Tanins

Lors des essais préliminaires, un précipité est obtenu avec le réactif au perchlorure de fer indiquant la présence de tannin dans la poudre de feuille de *N. laevis* (Olounladé, 2005 ; Tanko *et al.*, 2008). Jusqu'à ce jour aucune molécule du groupe de tannins n'a été isolée de *N. laevis*.

Ø Huile essentielle

Les molécules chimiques contenues dans l'huile essentielle de *N. laevis* n'ont jamais fait l'objet jusqu'à présent d'une identification chimique.

3.2.5.2. Travaux biologiques sur *N. laevis*

Les propriétés anthelminthiques, anti-microbiennes, d'extraits de différents organes de *N. laevis* ont été démontrées et justifiées (Ogunlana *et al.*, 1975 ; Ogunlana & Ogunlana, 2008 ; Hounzangbé-Adoté, 2004 ; Hounzangbé-Adoté *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c ; Kuete *et al.*, 2007). Les propriétés anti-malariales des extraits des feuilles et de racines de cette plante ont été approuvées (Gbéassor *et al.*, 2006 ; Eyong *et al.*, 2006). Les résultats de Joppa *et al.*, (2008) montrent que cette plante a un effet anti-falciformant évident *in vitro* et soutiennent l'intérêt de leur usage en médecine traditionnelle. Par les naphthoquinones, la mangniférine *N. laevis* est fongicide contre *Cladosporium cucumerinum*, *Candida krusei*, et *Candida albicans*, et antibactérien contre *Bacille subtilis* et *E. coli* (Assob Nguedia *et al.*, 2005). Les alcaloïdes de cette plante obtenus par les auteurs portugais exercent une action inhibitrice sur le tonus du duodénum isolé de lapin et l'iléon de cobaye à l'acétylcholine et à l'histamine (Correia Da Silva *et al.*, 1966). Les propriétés de l'harmane C₁₂H₁₀N₂ (méthyl-pyrindol) ou aribine ou loturine et ses dérivés hydroxy (harmol), méthoxy (harmine), dihydrométhoxy (harmaline) sont connues : elles sont comparables à celles des alcaloïdes des quinquinas, plus particulièrement à celles de la quinidine (isomère de la quinine). Les phénols contenus dans cette plante ont des activités antioxydant (Ogunlana & Ogunlana, 2008). Les extraits aqueux et éthanoliques des feuilles de *N. laevis* stimulent la contraction de l'utérus (Bafor *et al.*, 2009). Les propriétés anti-nociceptives, anti-inflammatoires, analgésiques et antidiabétiques des extraits éthanoliques des fleurs de *N. laevis* chez des souris et des rats ont été justifiées (Tanko *et al.*, 2008 ; Usman *et al.*, 2008 ; George *et al.*, 2009). L'extrait méthanolique de l'écorce de la tige de *N. laevis* a été évalué pour ses activités anti-inflammatoire,

antipyrétique, analgésique, anticonvulsivant, ainsi que pour son effet sur le temps de sommeil phénobarbital, en utilisant différents modèles animaux (Olajide, 2000). Les activités antimicrobienne et antimalariale *in vitro* des racines de *N. laevis* sont justifiées (Eyong, 2006 ; Kuete *et al.*, 2007). Les propriétés hépato protectrices des extraits de feuilles de *N. laevis* ont été montrées (Hassan *et al.*, 2010).

3.2.6. Utilisation dans la médecine traditionnelle

N. laevis encore appelé arbre fétiche « Vodoun xêbiosso » (figure 17) intervient souvent dans les cérémonies traditionnelles sous forme de bain purificateur (Hounzangbé, 2004) et est considéré comme un véritable marqueur territorial (Juhé-Beaulaton, 2010). Cette plante est souvent plantée comme de piquets de clôture. Elle est utilisée par les guérisseurs traditionnels en médecine traditionnelle pour traiter en usage interne : la diarrhée avec hémorragie, ictère (Tra-Bi, 1997), affections gastro-intestinales, les infections uro-génitales, les helminthiases, les hémorroïdes, le malaria aiguë, les maux de ventre, constipation, la dysenterie, l'éléphantiasis scrotal ; en usage externe : la draconculose, la morsure de serpent, les abcès, les ulcères, plus souvent pour les douleurs articulaires, les rhumatismes, les maladies cardiaques, les palpitations, les maladies sexuellement transmissibles, les caries dentaires, les arthrites douloureuses après massage ou non (Adam, 1974 ; Ayensu, 1978 ; Abbiw, 1990 ; Eyong *et al.*, 2005), les maux de dos, les infections de la peau, et d'autres maladies associées (Muhammad et Amusa, 2005). Elle fait l'objet du commerce ambulancier dans certains villages au Bénin. Les feuilles de cette plante sont utilisées traditionnellement contre la stérilité (Burkill, 1985 ; Adjanahoun *et al.*, 1991 ; Igoli *et al.*, 2002 ; Igoli *et al.*, 2003 ; Tor-Anyiin *et al.*, 2003). Les feuilles sont coupées et servies aux animaux comme vermifuge (Hounzangbé, 2004 ; Muhammad et Amusa, 2005). Les travaux de (Juhé-Beaulaton et Roussel, 2002) ont remarqué la prépondérance de *N. laevis* parmi les plantes liturgiques du culte vodou dans l'aire culturelle Aja-Tado (Sud du Bénin et du Togo). L'écorce de la racine de *N. laevis* est couramment utilisée en association avec l'écorce des racines de *Zanthoxylum macrophylla* dans le traitement préventif de la drépanocytose au Togo (Joppa *et al.*, 2008), seul pour ses propriétés cicatrisantes (Adjanahoun *et al.*, 1989). Elle est également utilisée dans le sud du Nigéria pour la stimulation de la contraction utérine, lors de la parturition et l'expulsion du placenta après la délivrance (Bafor, *et al.*, 2009). *N. laevis* est aussi utilisé en médecine traditionnelle à Brazzaville (Congo) pour traiter l'hypotension (Diafouka & Lejoly, 1993).



Figure 17: *N. laevis* dont les branches ont été coupées jusqu'au tronc dans une cours pour la purification (Molan Djah, 2009)

3.2.7. Toxicité de *N. laevis*

Le test de toxicité a montré que l'extrait éthanolique de *N. laevis* n'est pas toxique (Joppa *et al.*, 2008). L'étude de la toxicité subaiguë de l'extrait de *N. laevis* n'a révélé aucune atteinte hépatique et rénale à la dose de 1g/kg de poids corporel chez les rats mâles et femelles (Assob Nguedia *et al.*, 2005).

3.3. Espèce *Z. zanthoxyloides*

3.3.1. Classification botanique dans la famille des Rutaceae

Règne : *Plantae*

Sous règne : *Tracheobionta*

Embranchement : *Magnoliophyta* (Plantes à fleurs)

Sous embranchement : *Angiospermae*

Classe : *Magnoliopsida* (Dicotylédones)

Sous classe : *Rosidae*

Ordre : *Sapindales*

Sous ordre : *Rutinae*

Famille : *Rutaceae*

Genre : *Zanthoxylum* (Fagara)

Espèce : *Z. zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler

3.3.2. Appellation

L'espèce a été nommée *Fagara zanthoxyloides* pour la première fois par Chevalier de Lamarck en 1788. Le genre *Zanthoxylum* a été créé par Linné en 1757 et confondu avec le genre *Fagara*. En 1896, Engler a fait la distinction entre les deux genres par les caractères suivants : les espèces appartenant au genre *Zanthoxylum* présentent un périanthe simple, alors que celui des espèces appartenant au genre *Fagara* est double. Les travaux de Brizicky en 1962, grâce à la découverte d'espèces présentant un périanthe intermédiaire entre celui de *Zanthoxylum* et celui de *Fagara*, ont démontré que le périanthe simple de *Zanthoxylum* dérivait de celui de *Fagara* par avortement de quelques sépales, voir tous les sépales. De là, il a conclu que le genre *Fagara* était un sous-genre de *Zanthoxylum*. Ce n'est qu'en 1966 que Hartley regroupa *Zanthoxylum* et *Fagara* sous le nom de *Zanthoxylum* (Fish et Waterman, 1973), ce qui a été confirmé par Zepernick et Timler en 1981 et c'est sous cette dernière appellation que ce genre est répertorié dans «International Index of Plant Name ». Néanmoins, certains auteurs continuent d'utiliser le terme *Fagara* synonyme de *Zanthoxylum* (Chaaib, 2004).

3.3.3. Synonymes

Les synonymes les plus courants sont : *Fagara zanthoxyloides* L., *Fagara xanthoxyloides* L., *Xanthoxylum xanthoxyloides* L., *Fagara senegalensis* (DC.) A. Chev., *Zanthoxylum senegalense* (DC.) A. Chev., *Zanthoxylum polyganum* Schum (Dalziel, 1937 ; Kerharo et Adams, 1974 ; Burkill, 1997 ; Arbonier, 2000).

L'espèce *Z. zanthoxyloides* est appelée sous différents noms locaux, selon les régions et les dialectes (Tableau 7).

Tableau 7: Noms vernaculaires de l'espèce *Z. zanthoxyloides* (Kerharo et Adams, 1974 ; Adjanohou *et al.*, 1986 ; Burkill, 1997)

Pays	Ethnies/Dialectes	Appellations
Bénin	Fon-Goun Yoruba-Nagot	Hê Igui ata
Centrafrique	Babinga pygmées, Sango Gbaya Mbimo	Bolongo Nzototo Akumbo
Congo	Lingala Mbaamba, Ndassa Vili, Ndulu	Balongo Mbulula Ndungu
Mali	Bambara Malinké Peulh	Wo ; Gozo; nguia WuŃ Bulébarkélé ; barkéley
Niger	Haoussa	Fasa kuwari
Nigeria	Yoruba Ibo (igbo)	Igui ata ; ata ukoh
Sénégal	Wolof Horâpolé ala Socè Niom Serer Peul Dioula	Dengidek, Genidek, Nden,wo Samatiño Inok Inoc Barkeley ; Bulébarkele Busan ; Nisédet
Togo	Akassélem Akposso Moba Tem	Bidjakogoro Owlawu Djomédiaq Abalatchang'aï
France		Fagara jaune (Bailleul)
Anglais		Candlewood

Parmi les espèces appartenant au genre *Zanthoxylum*, l'espèce *Z. zanthoxyloïdes* (Lam.) Zepernick et Timler a fait l'un des objets de cette étude. Son utilisation en médecine traditionnelle et les criblages biologique et chimique effectués auparavant ont guidé ce choix.

Z. zanthoxyloïdes est un arbuste sarmenteux ou un petit arbre glabre, de 6 à 8 m de haut, à écorce parfumée, qui suit les secteurs côtiers dans les sols frais de la région ouest africaine. Il est ramifié près de la base, les branches sont ornementées de nombreuses épines crochues, robustes. Tous les organes dégagent quand on les froisse une odeur très aromatique poivrée citronnée ; les feuilles sont alternes, composées imparipennées. Le rachis de 10 à 15 cm, est épineux en dessous avec trois à cinq paires de folioles dont la nervure médiane est également souvent épineuse à la face inférieure ; les folioles ovales, rigides, oblongues ou oblancéolées, elliptiques, plus ou moins cunées à la base, obtuses et courtement acuminées au sommet, sont entières ou très finement crénelées sur les bords ; quelques fois elles sont émarginées à l'apex, subaiguës à la base, 5 à 10 cm de longueur, 2 à 4 cm de largeur ; le limbe est parsemé de nombreuses ponctuations translucides. Les fleurs sont petites, blanches, parfumées, groupées en panicules lâches, sphériques, axillaires ou terminales. Les fruits d'environ 6 mm de diamètre sont ellipsoïdes (Kerharo et Adam, 1974). *Z. zanthoxyloïdes* est une plante répandue en Afrique de l'Ouest et s'étend au Bénin, en Côte d'Ivoire, en Gambie, au Ghana, en Guinée, en Guinée-Bissau, au Mali, au Nigéria, au Sénégal et au Togo (Brunel *et al.*, 1984 ; Keay, 1989 ; Griffin *et al.*, 2000). La carte de la figure 18 présente ces différentes régions dans lesquelles l'espèce a été répertoriée:



Figure 18 : Répartition géographique de *Z. zanthoxyloides* en Afrique

(Brunel *et al.*, 1984 ; Keay, 1989 ; Griffin *et al.*, 2000)

Pour le présent travail, les folioles des feuilles de *Z. zanthoxyloides* (figure 19) ont été récoltées au Bénin. L'identification de l'espèce a été effectuée par un botaniste à l'Université d'Abomey-Calavi du Bénin et un échantillon de référence se trouve à l'herbier de l'Université d'Abomey-Calavi sous le numéro AA 6301/UNB.



Figure 19: Rameau de *Z. zanthoxyloides*

3.3.4. Travaux récents sur *Z. zanthoxyloïdes*

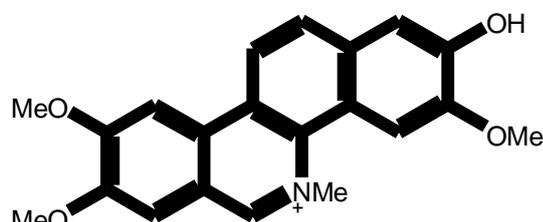
3.3.4.1. Composition chimique de l'espèce *Z. zanthoxyloïdes*

Le screening phytochimique de la poudre de feuilles de *Z. zanthoxyloïdes* (fait apparaître la présence de nombreux constituants appartenant à différentes classes chimiques : alcaloïdes, huile essentielle, lignanes et composés apparentés, amides et polyphénols (Olounladé, 2005).

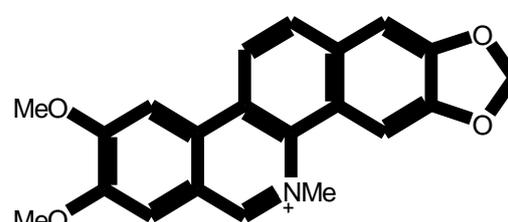
Ø Alcaloïdes

Les alcaloïdes forment une classe chimique très importante du genre *Zanthoxylum*. La majeure partie des alcaloïdes dérive de deux voies biosynthétiques dont celle de l'acide anthranilique qui aboutit à la plupart des alcaloïdes de la famille Rutaceae et celle de la tyrosine qui aboutit aux alcaloïdes de type benzylisoquinoline, aporphine, protoberberine, protopine, furoquinolines, canthinones et benzo[*c*]phénanthridine, qui caractérisent le genre *Zanthoxylum* (Fish et Waterman, 1973 ; Kerharo et Adam, 1974 ; Frank *et al.*, 1980 ; Krane *et al.*, 1984 ; Couillerot *et al.*, 1994 ; Tringali *et al.*, 2001 ; Hesse, 2002 ; Adesina, 2005).

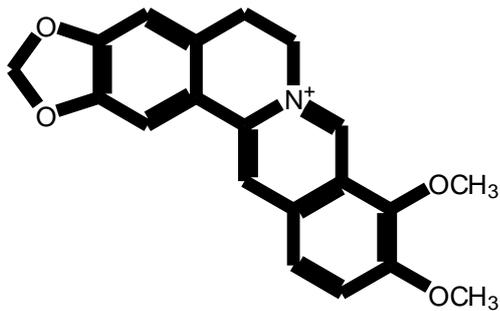
Les alcaloïdes de type benzophénanthrine : nitidine (figure 20 b), chélérythrine, etc (Odebiyi et Sofowora, 1973 ; Kerharo et Adam, 1974), fagaronine (figure 20 a) (Messmer *et al.*, 1972 ; Kerharo et Adam, 1974), les alcaloïdes de type aporphine : berbérine (figure 20 c), tembétarine, magnoflorine, (Messmer *et al.*, 1972 ; Odebiyi et Sofowora, 1973 ; Chaaïb, 2003) ; les alcaloïdes de types furoquinolines : méthoxydictamine, skimmianine, 3-diméthylallyl-4-méthoxy-2-quinolone (Atarine) (figure 20 d) (Paris *et al.*, 1947 ; Kerharo et Adam, 1974 ; Odebiyi et Sofowora, 1979 ; Adesina, 1986) ont été isolés de l'espèce *Z. zanthoxyloïdes*.



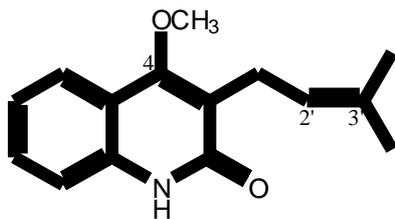
Fagaronine (a)



Nitidine (b)



Berberine (c)



Atarine (d)

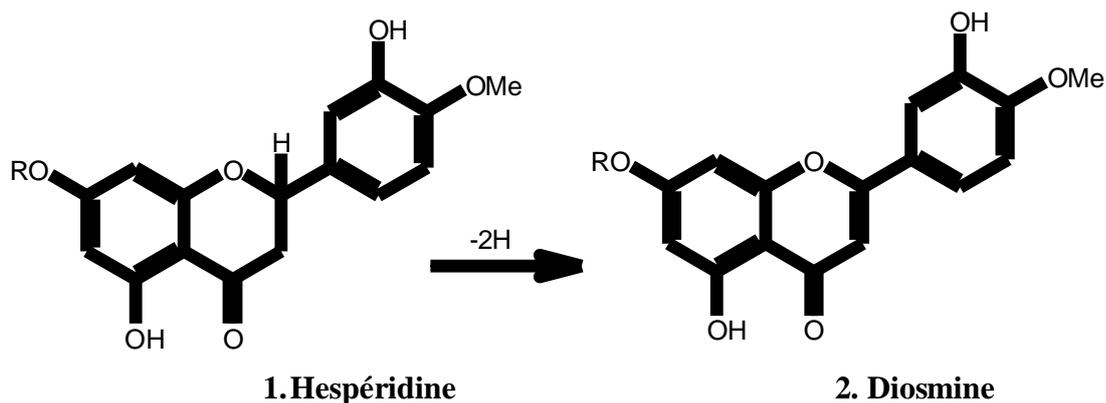
Figure 20 : Structure de quelques exemples d'alcaloïdes isolés de *Z. zanthoxyloïdes*

(Paris et Moyse Mignon, 1947 ; Messmer *et al.*, 1972 ; Kerharo et Adam, 1974 ; Odebiyi et Sofowora, 1973; Odebiyi et Sofowora, 1979 ; Adesina, 1986 ; Chaaïb, 2003)

Ø Polyphénols

Flavonoïdes

Chez *Z. zanthoxyloïdes*, les flavonoïdes sont surtout représentés par des hétérosides de flavones, flavonols et flavanones. La flavanone glycosylée : l' hespéridine, est largement répandue. Par oxydation elle se transforme en diosmine (Bruneton, 1999). Cette réaction se fait rapidement *in vitro*. De cela, il est facilement concevable que chez les Rutaceae, les flavanones sont probablement des précurseurs des flavones correspondantes (Harborne, 1983).

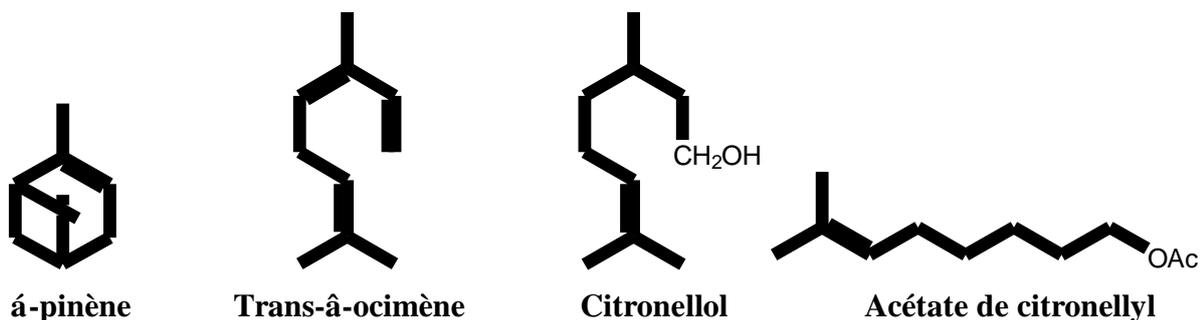


Flavone glycosylé hespéridine ; Diosmine : R = Glc¹-⁶Rha

Figure 21 : Structure de quelques exemples flavonoïdes isolés de l'espèce *Z. zanthoxyloïdes* (Bruneton, 1999).

Ø Huile essentielle

La plupart des représentants des *Rutaceae* possèdent des poches sécrétrices d'un type particulier appelées poches schizolysigènes dans lesquelles seront élaborées les huiles essentielles. Avec le développement des techniques analytiques comme la GC/MS, des investigations dans plusieurs espèces du genre *Zanthoxylum* ont été réalisées pour déterminer leur composition en huile essentielle. Des travaux (Ayedoun, 1995 ; Ngassoum et al., 2003), ont permis de mettre en évidence dans les fruits secs et les feuilles de *Z. zanthoxyloïdes*, de nombreux composés volatils, parmi lesquels le α -pinène, composé majoritaire de cette huile essentielle, le trans- α -ocimène, le citronellol, l'acétate de citronellyl, le α -terpinolène, le α -phellandrène, le géraniol, le limonène, le linalol et le α -myrcène.



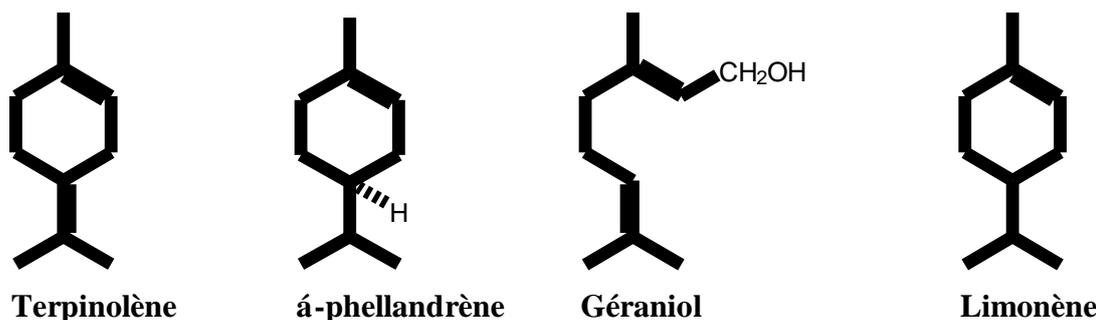


Figure 22 : Structure de quelques exemples de composés volatiles isolés *Z. zanthoxyloïdes*
(Ayedoun, 1995 ; Ngassoum *et al.*, 2003)

3.3.4.2. Les activités biologiques de l'espèce *Z. zanthoxyloïdes*

L'acide hydroxy-2-méthyl-benzoïque isolé de l'espèce *Z. zanthoxyloïdes* est commercialisé sous forme de comprimés par un laboratoire togolais, qui a reçu une autorisation de sa mise sur le marché, sous le nom de Drépanostat® pour le traitement de la drépanocytose (Pousset, 2002). Les travaux de Okogun et Essien (1976) sur les racines de *Z. zanthoxyloïdes* ont révélés que la flavanone glycosylée, l'héspéridine ; les lignanes: sésamine, asarinine, ainsi que le xanthoxyloïl, isolés de *Z. zanthoxyloïdes* sont responsables de l'activité drépanocytaire de cette espèce. Une étude pharmacologique comparative entre la Dihydroergotoxine Hydergine® d'une part, et l'association de poudres de *Fagara Zanthoxyloïdes* et *Calotropis procera* d'autre part , réalisée sur les enfants en crise drépanocytaire, montre que la poudre des deux plantes associées sous forme de gélules s'est révélée, *in vitro*, inhibitrice de la falciformation des globules rouges et *in vivo* sur la crise drépanocytaire (Isaac-Sodoyé *et al.*, 1975 ; Guissou, 1990). Certains travaux ont montré que les extraits de *Z. zanthoxyloïdes* perturbent le cycle de développement de *Plasmodium falciparum* (Kassim *et al.*, 2005)

L'héspéridine, isolée de *Z. zanthoxyloïdes* possède de nombreuses activités: antimicrobienne, anticarcinogène, antioxydante, antiinflammatoire, protectrice des capillaires en cas de troubles veineux et immunomodulatrice (Garg *et al.*, 2001). La sésamine montre des activités antioxydantes et anti-inflammatoire (Utsunomiya, 2003)

La canthin-6-one, la chélérythrine, canadine et la berbérine isolés des racines de *Z. zanthoxyloïdes* sont alcaloïdes responsables de l'activité antimicrobienne, antileucémique, analgésique, anti-inflammatoire et antivirale de cette espèce (Guisso, 1990, Taiwo *et al.*, 1999). Des travaux ont montré que la berbérine, la fagaronine, la nitidine, la 5-

méthoxycanthin-6-one, la 4-méthylthiocanthin-6-one, l'acronycine, et la skimmianine isolés de l'espèce *Z. zanthoxyloïdes* possèdent une activité antitumorale spécifique contre certains types de cancers. L'atarine, isolé de *Z. zanthoxyloïdes*, au cours des essais biologiques effectués, *in vitro*, cet alcaloïde a montré une activité antiparasitaire sur les larves de *Schistosoma mansoni* et *Ostertagia circumcincta*, des trématodes qui infectent l'homme et la forme adulte et larvaire de *Caenorhabditis elegans*, un nématode terrestre (Perrett et Whitfield, 1995). L'évaluation *in vitro* au Bénin des propriétés de l'extrait total de cette plante a montré des activités anthelminthiques intéressantes (Hounzangbé-Adoté, 2004 ; Hounzangbé-Adoté *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c). Une étude Nigérienne rapporte que les extraits de *Z. zanthoxyloïdes* possèdent des propriétés anthelminthiques contre l'infection des rats par l'*Ascaris* (Barnabas *et al.*, 2011). Les travaux de (Fish et Waterman, 1973 ; Adesina, 2005) ont montré que l'isobutylamide a une activité insecticide, la fagaramide, ainsi que la N-isobutyldécadiénamide, sont des anesthésiques locaux, isolées de *Z. zanthoxyloïdes*. Les travaux de Ngassoum *et al.* (2003), ont permis de mettre en évidence dans les fruits secs de *Z. zanthoxyloïdes*, de nombreux composés volatils, qui ont montré une activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Escherichia faecalis*, parmi lesquels le α -pinène, le trans- α -ocimène, le citronellool, l'acétate de citronellyl, le α -terpinolène, le α -phellandrène, le géraniol, le limonène et le α -myrcène.

Les extraits dichlorométhanique et méthanolique de l'écorce de racine de *Z. zanthoxyloïdes* ont montré une forte activité antifongique, antibactérienne et une toxicité à 100 % envers les larves du moustique *Aedes aegypti* (Chaaïb, 2004). Les extraits méthanoliques, dichlorométhanique de *Z. zanthoxyloïdes* réagissent au test antiradicalaire avec le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH). Ceci s'explique par la présence de composés phénoliques dans les extraits polaires, dont l'activité antiradicalaire a été largement étudiée (Potterat, 1997). Un di-glycoside de stigmastadienol isolé des feuilles de *Z. zanthoxyloïdes* a une activité antiradicalaire (Hegnauer, 1973 et 1983 ; Bhatt *et al.*, 1981). Puisque les tanins n'ont jamais été décrits dans cette espèce (en général se sont les tanins qui sont responsables de l'effet molluscicide, comme l'ont montré Schaufelberger et Hostettmann (1982) avec la disparition de l'effet après que les extraits actifs ont été débarrassés de ces dérivés polyphénoliques). Les extraits polaire et apolaire de *Z. zanthoxyloïdes* possèdent une activité bloquant la dégradation de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme qui joue un rôle important dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Ce sont généralement les alcaloïdes (physostigmine, galanthamine, alcaloïdes stéroïdiques des Solanaceae, etc.) qui sont responsables de cet effet (Marston *et al.*, 2002). L'espèce *Z. zanthoxyloïdes* contient des

alcaloïdes de type benzo[c] phénanthridines, qui peuvent contribuer à cette activité (Ulrichova *et al.*, 1983). L'utilisation de certains insecticides synthétiques (dérivés organophosphorés, carbamates, etc.), qui se sont révélés de puissants inhibiteurs de cholinestérases [Weins et Jork, 1996] pour protéger la culture de cette plante. L'activité bactéricide et bactériostatique de l'huile essentielle des *Z. zanthoxyloïdes* a été évaluée *in vitro* contre trois bactéries pathogènes : *Listeria monocytogenes*, *Salmonelle enteritidis* et *Staphylococcus aureus* (Gardini *et al.*, 2009). Une autre étude camerounaise montre que l'huile essentielle de *Z. zanthoxyloïdes* récolté au Cameroun a des propriétés antimicrobiennes (Ngassoun *et al.*, 2003). Au Nigéria, une étude rapporte que les extraits méthanoliques de *Z. zanthoxyloïdes* possèdent des activités antimicrobiennes avérées (Olayemi *et al.*, 2010).

3.3.5. Utilisation dans la médecine traditionnelle

Le *Zanthoxylum* constitue un énorme réservoir de molécules naturelles potentiellement actives contre les virus, les bactéries et certaines cellules cancéreuses et fait partie de la pharmacopée béninoise. L'espèce *Z. zanthoxyloïdes* est utilisée en médecine traditionnelle et son activité a été confirmée dans le traitement de plusieurs affections. Elle est utilisée pour le traitement des affections gastro-intestinales. Elle est considérée partout où elle se trouve comme un parasiticide polyvalent interne et externe douée d'une activité indéniable (Arbonnier, 2004), comme un fongicide, antiparasitaire, anti-inflammatoire (De Souza, 1988). Les feuilles de cette plante sont utilisées sous forme d'infusion dans le traitement de la gale des maladies inflammatoires, contre la malaria (Ogwal-Okeng, 2003). En médecine traditionnelle, les racines et les tiges de *Z. zanthoxyloïdes* sont utilisées en usage interne contre les ictères, l'angine pharyngite, les hémorroïdes, (Bossokpi, 2003), les entérites, les dysenteries, les diarrhées profuses, les urétrites, les blennorragies et comme vermifuge. L'écorce de racine et les feuilles sont fréquemment utilisées comme anti-odontalgique et pour traiter les stomatites, les gingivites et les caries (Rotimi *et al.*, 1988 ; Kerharo et Adam, 1974 ; Arbonnier, 2004). Les racines constituent des frotte-dents particulièrement appréciés (Malgras, 1992 ; Chaaib, 2004). En usage externe, l'écorce de racine est utilisée pour traiter les plaies suppurantes et les morsures de serpent. Les feuilles et les écorces de tige écrasées sont utilisées en aromathérapie contre les migraines et les névralgies selon diverses modalités (applications sur la tête ou le front, répartition sur la couche du malade) (Kerharo et Adam, 1974 ; Arbonnier, 2004). Par ailleurs, l'extrait aqueux de la plante est employé comme antirépanocyttaire et les principes actifs responsables de cette activité ont été isolés. Il s'agit

de l'acide hydroxyméthyl-benzoïque et du xanthoxyloï (Sofowora *et al.*, 1975 ; Chaabib, 2004).

Aujourd'hui comme hier, il n'existe de société capable de progresser sans se rattacher à ses racines, à ses savoirs et à ses traditions. En Afrique, et au Bénin particulièrement, où des voix commencent à s'élever pour la valorisation de la médecine traditionnelle, il importe de déterminer les espèces susceptibles d'être utiles à l'Homme. *Z. zanthoxyloïdes*, espèce typiquement africaine, aux usages à la fois multiples et uniques, fait certainement partie de celles-ci. Cette espèce a grandement besoin d'être préservée, multipliée et valorisée, en s'assurant bien entendu préalablement, par des études complémentaires, que le rapport bénéfice/risque soit positif dans les indications pour lesquelles l'espèce est utilisée.

De nouvelles pistes pourraient d'ailleurs être ouvertes, comme par exemple celle du traitement de la crise drépanocytaire. De nombreuses plantes ont été proposées, en effet, pour le traitement de cette maladie hémolytique, courante parmi les populations de race noire, due à une anomalie de l'hémoglobine qui rend les globules rouges plus rigides et falciformes. La découverte fortuite de l'activité antifalciforme de la racine de *Z. zanthoxyloïdes* dans les années 1970, puis la confirmation de cette même activité pour d'autres plantes africaines du même genre telles que *Z. gillettii*, a transformé le regard que l'on portait sur ces espèces (Sofowora, 1971 ; Adenasya et Sofowora, 1983). Dorénavant, elles figure en bonne place sur la liste des traitements thérapeutiques de la crise drépanocytaire.

3.3.6. Toxicité de *Z zanthoxyloïdes*

Les essais de toxicité effectués sur la souris ont montré que l'écorce de racine est toxique et que son administration par voie sous-cutanée, à une dose correspondant à 10 g/kg, provoque la mort de 80% des souris. Chez le chien chloralisé, l'extrait d'écorce de racine provoque par voie intraveineuse une action dépressive sur le cœur. Sur l'intestin isolé, l'infusé à 10^{-4} provoque une diminution de l'amplitude et surtout du tonus. Cette toxicité est due à la présence d'alcaloïdes: fagaronine, skimmianine et atarine (Kerharo et Adam, 1974). L'écorce des tiges, ainsi que les feuilles se sont révélées moins toxiques (Neuwinger, 1996). L'activité ichtyotoxique des racines a été signalée par (Ajanonhoun *et al.*, 1985). Certains travaux menés sur la toxicité aiguë d'une administration orale de l'extrait méthanolique

de l'écorce de la racine de *Z. zanthoxyloïdes* ont montré que ce dernier est pratiquement sans danger. Les résultats de cette étude ont donné une DL₅₀ d'environ 5 g/Kg de poids corporel (Ogwal-Okeng, 2003). Notons néanmoins que la toxicité de certaines espèces du genre *Zanthoxylum* a été rapportée dans la littérature. C'est le cas de *Z. americanum* Miller et *Z. clavaherculis* L., deux espèces du nord- américaines, qui ont été jugées responsables de la mort du bétail (Ovin et bovin) qui en avait consommé des quantités importantes. La nature du mécanisme d'action a été élucidée chez l'animal et correspondrait principalement à un blocage au niveau de la jonction neuromusculaire (Bowen *et al.*, 1996). D'autres espèces du genre *Zanthoxylum* sont réputées toxique par voie parentérale. C'est notamment le cas d'espèces africaines comme *Z. chalybeum* Engl. et *Z. gilletii* (De Wild.) P.G. Waterman, qui ont été utilisées comme poisson de flèches dans divers pays africains (Neuwinger, 1996 ; Roberts et Wink, 1998).

ETUDE PERSONNELLE

OBJECTIFS

L'objectif général de la présente thèse est de contribuer à l'amélioration de la santé des Animaux et des Hommes par la connaissance des substances naturelles de plantes à propriétés anthelminthiques. Et plus spécifiquement :

1. Contrôler la qualité de la matière première et établir des données de taxonomie fiable pour les espèces *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes*.
2. Evaluer l'influence de la variabilité des facteurs environnementaux sur la composition chimique de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes*.
3. Déterminer la composition chimique des huiles essentielles de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes* à extraire et évaluer leurs activités anthelminthiques
4. Fractionner par des tests bio-guidés les extraits actifs, et quantifier les familles chimiques de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes*.

CHAPITRE I : CARACTERISATION BOTANIQUE DES PLANTES

1- Caractérisation botanique des plantes de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes* récoltées au Bénin

1.1. Introduction

Pour isoler des substances nouvelles de plantes thérapeutiques et orienter la stratégie d'isolement, il convient de faire la caractérisation botanique avec soin. La non prise en compte de ce critère décourage le phytochimiste et la recherche pharmacologique dans l'efficacité des plantes (Stace, 1965). C'est particulièrement le cas quand on a à faire à des genres ou des espèces de plantes étroitement liés. La recherche et le développement des principes actifs issus de matières premières végétales obligent à nous s'inscrire dans une démarche globale de sécurisation de l'approvisionnement des matières premières.

Le but de cette recherche est de faire le contrôle de la qualité de la matière première et l'établissement de données de taxonomie fiable pour les espèces *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes* récoltées au Bénin en vue de leur identification et détermination botanique la plus facile et la plus précise possible pour la collecte des plantes. Ce travail met en relief les caractéristiques anatomiques et morphologiques des deux espèces. Il décrit le degré et donne la mesure à laquelle, ces caractéristiques peuvent être utilisées pour identifier les grandes classes de molécules contenues dans les feuilles de chacune des espèces.

1.2. Matériel et Méthode

1.2.1. Matériel végétal

Les folioles fraîches ou sèches de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes* ont été récoltées matures et authentifiées à l'Herbier National de l'Université d'Abomey-Calavi, respectivement sous les numéros **AA 6301 / HNB** et **AA 6302 /HNB**. Après récolte et mondage du rachis, les folioles ont été séchées en couche mince dans une salle climatisée (20°C) pendant 5 jours.

1.2.2. Préparation des coupes de folioles

La base de la foliole comprenant la nervure principale et une partie du bulbe y adhérent est incorporé dans de la moelle de sureau préalablement fendue longitudinalement et partiellement évidée. Les coupes sont plongées immédiatement dans l'hypochlorite de sodium

à 10% pendant au moins 10 minutes puis retirées et lavées 2 à 3 fois à l'eau distillée. Elles sont ensuite plongées dans le réactif Carmino-vert-aluné de Mirande (1920) pendant 3 minutes. Après 2 lavages à l'eau distillée, chaque coupe nettoyée et colorée est déposée délicatement sur une lame porte-objet sur laquelle a été précédemment déposée une goutte de glycérine. L'ensemble est recouvert d'une lamelle tout en évitant la formation de bulles d'air.

1.2.3. Montage des poudres de folioles

Sur une lame porte-objet une très petite quantité de poudre de folioles est déposée dans une goutte de réactif de Gazet du Chatelier (Baytop, 1956). Une petite goutte de réactif est déposée sur la lamelle couvre-objet. La lame et lamelle sont assemblées en mettant en contact les deux gouttes de réactif.

1.2.4. Observation microscopique

L'observation microscopique, avant ou après chauffage de la préparation microscopique, a été faite à l'aide d'un microscope optique de marque LEICA DMMLB muni d'une Caméra reliée à un ordinateur. Des photos ont été réalisées après examen de la préparation au faible grossissement (X100) puis au fort grossissement (X400). L'observation sans chauffage nous a permis d'observer des produits de sécrétion et des appareils sécréteurs, des cristaux d'oxalate de calcium. L'observation de la préparation microscopique dans le réactif de Gazet après chauffage nous a permis d'identifier les éléments cellulaires en particulier les vaisseaux de bois (annelés, spiralés, réticulés, ponctués), les éléments du sclérenchyme, le suber (coloré en rouge-brun et présentant une structure secondaire), les épidermes (stomates, poils).

1.3. Résultats

1.3.1. Etudes morphologique et anatomique de l'épiderme de la foliole de *N. laevis* récoltée au Bénin

Dans le but d'identifier des lots successifs de *N. laevis*, une description botanique (morphologique et anatomique) a été entreprise.

1.3.1.1. Description morphologique

La foliole sèche (figure 23B), non brisée, vert pâle, mesure environ 10 à 20 cm de long et 5 à 10 cm de large. Elle est coriace, entière, glabre, irrégulièrement dentée sur les bords, oblancéolée, longuement acuminée au sommet. La nervation est pennée. La nervure principale saillante à la face inférieure, s'accompagne de trois à cinq nervures secondaires qui s'anastomosent en arcs souples sur les bords. Elle est sessile ou très courtement pétiolée et présente deux nectaires à la base.

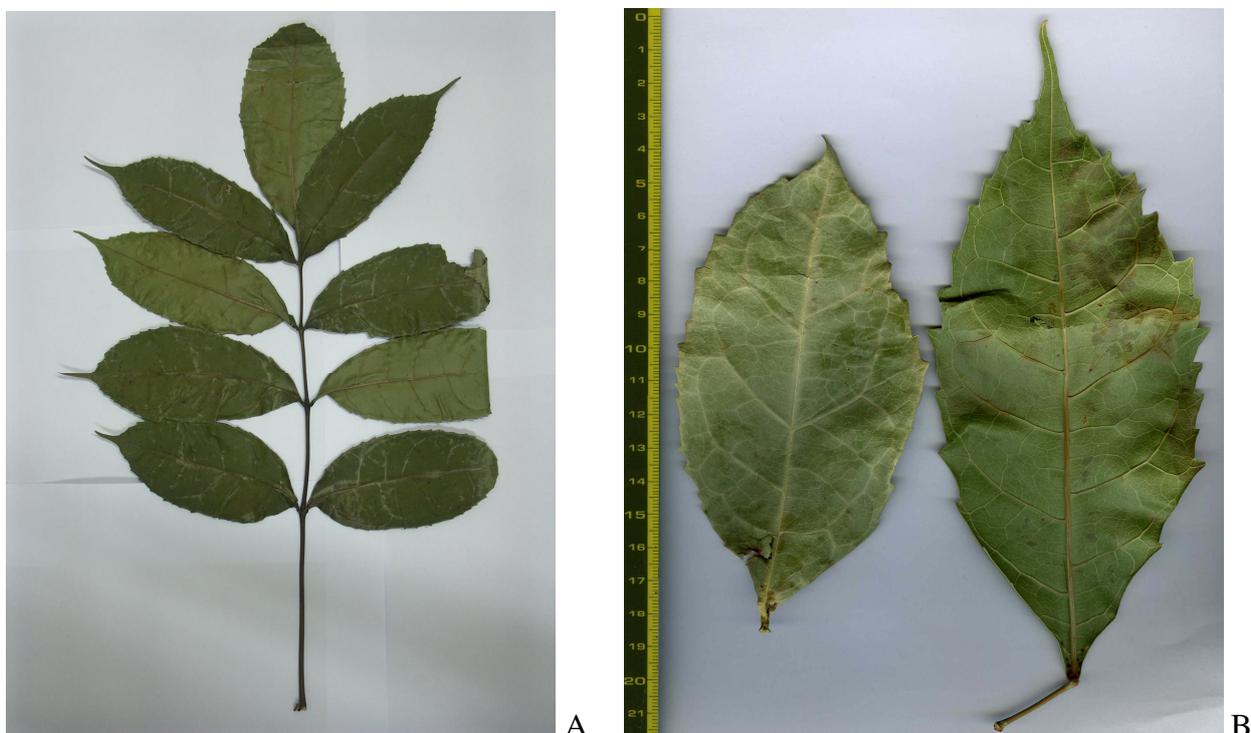


Figure 23 : *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seeman ex Bureau

A – Feuille

B – Folioles (Olounladé, 2011)

1.3.1.2. Description anatomique

La section transversale présente au niveau de la nervure principale une face supérieure légèrement bombée et une face inférieure très saillante. Le limbe représente environ le quart de la hauteur de la nervure.

Ø Nervure médiane

Les épidermes sont recouverts d'une cuticule striée, relativement épaisse (environ un tiers de l'épaisseur de l'épiderme). Ils sont constitués par une assise de cellules plus ou moins isodiamétriques, des poils tecteurs dressés, unicellulaires, à paroi épaissie et échinulée et des poils sécréteurs enfoncés dans l'épiderme, à pied unicellulaire et à tête pluricellulaire composé de 8 à 20 cellules.

La zone sous-épidermique est collenchymateuse et comporte cinq à dix assises de cellules à paroi épaissie en angle.

Le parenchyme est constitué de cellules arrondies laissant entre elles des méats. Près du système conducteur, ces cellules contiennent de nombreux petits cristaux aciculaires d'oxalate de calcium.

Le système conducteur est de structure secondaire. Il est constitué par un anneau libéro-ligneux principal, irrégulier, formé par la succession de faisceaux séparés par des rayons médullaires 2-3 sériés. Chaque faisceau est surmonté d'un amas de fibres péricycliques, lignifiées. De plus on a deux formations surnuméraires sont visibles : un petit faisceau situé entre l'épiderme supérieur et la partie supérieure de l'anneau principal et un arc de faisceaux non inversés, situé à l'intérieur de l'anneau principal. Des fibres lignifiées accompagnent chacune de ces formations surnuméraires. La moelle est composée de cellules arrondies, légèrement sclérifiées, laissant entre elles de larges méats.

Ø **Limbe**

Le limbe comprend des épidermes cuticularisés semblables à ceux de la nervure. Cependant seuls les poils sécréteurs sont présents. Des stomates sont visibles à la face inférieure. Un hypoderme à cellules régulières légèrement plus grandes que celles de l'épiderme double l'épiderme supérieur.

Le mésophylle est hétérogène asymétrique ; il est composé :

- d'un parenchyme palissadique qui ne comporte qu'une assise de cellules occupant environ le sixième de l'épaisseur du limbe ;

- d'un parenchyme lacuneux qui est fortement développé, laissant de larges lacunes entre les cellules. Les faisceaux conducteurs des nervures secondaires y sont localisés.

Tous les parenchymes contiennent de petits cristaux aciculaires d'oxalate de calcium particulièrement visibles en lumière polarisée [Pharmacopée Européenne, 2011]



Figure 24 : *N. laevis* : Foliole en section transversale, Schéma général (G x 60)

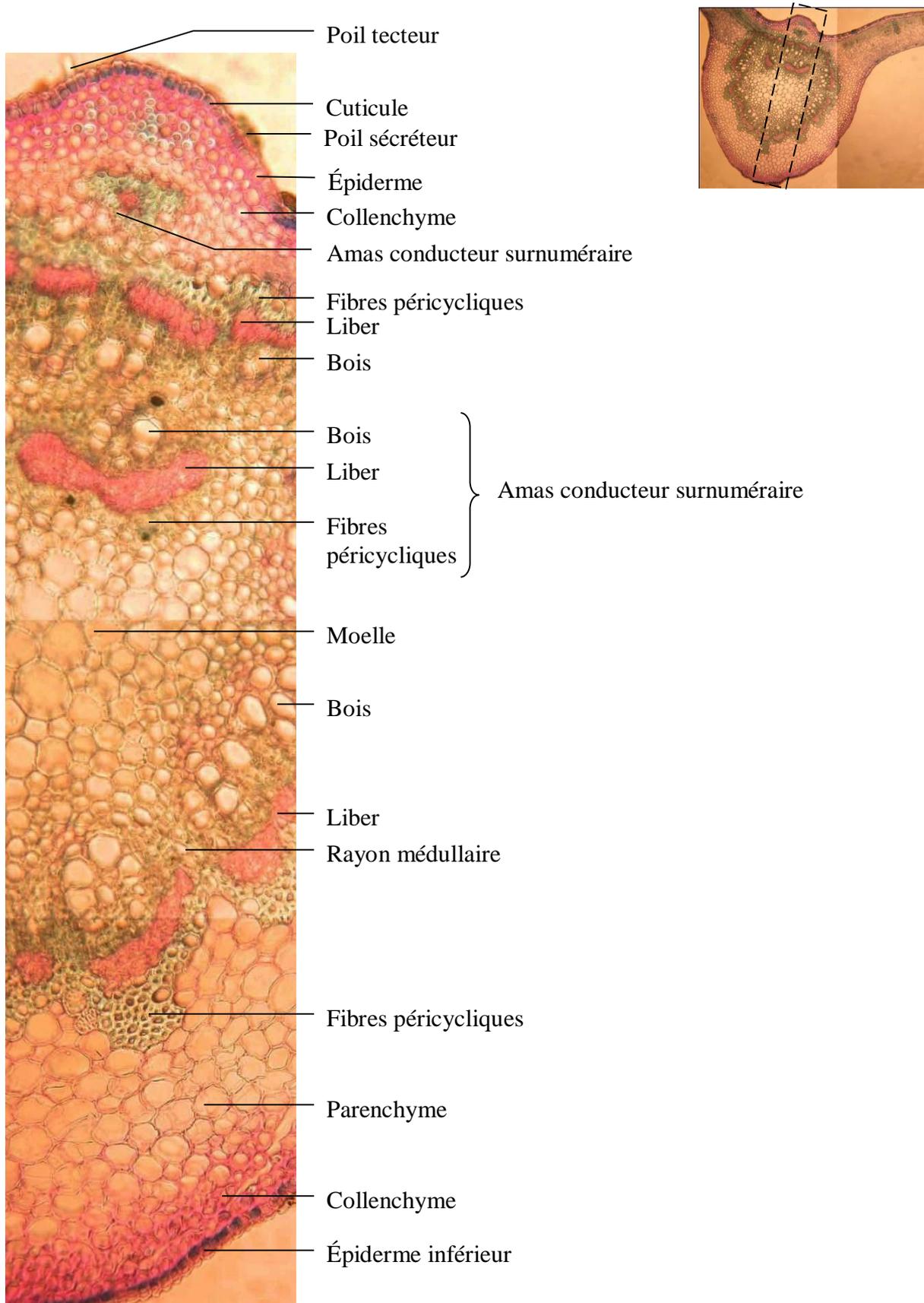


Figure 25 : *N. laevis* : Foliole en section transversale-Détail au niveau de la nervure (Gx200) (Olounladé, 2011)

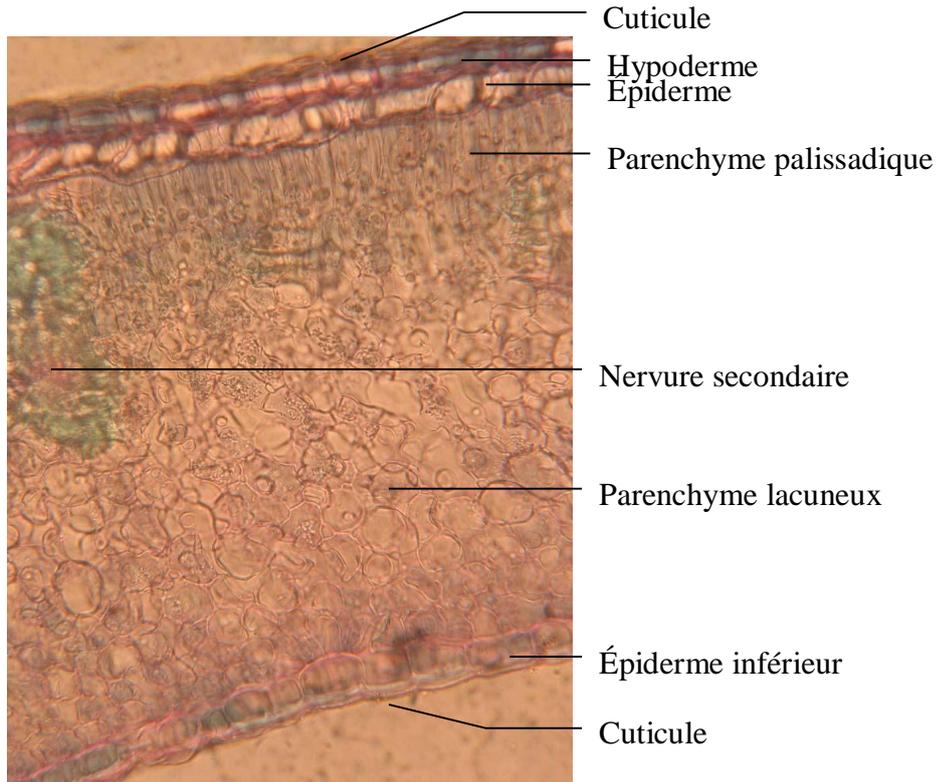
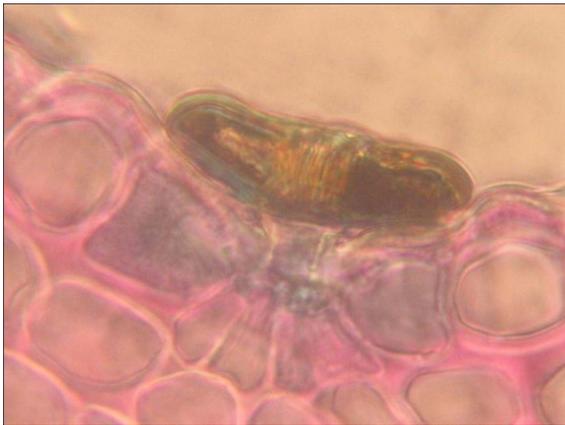


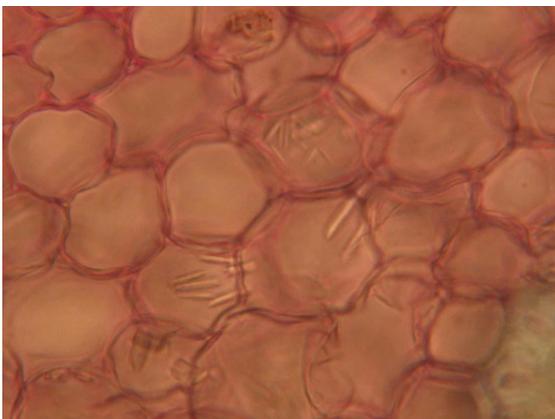
Figure 26 : *N. laevis* : Foliole en section transversale , Détail au niveau du limbe (Gx200)
(Olounladé, 2011)



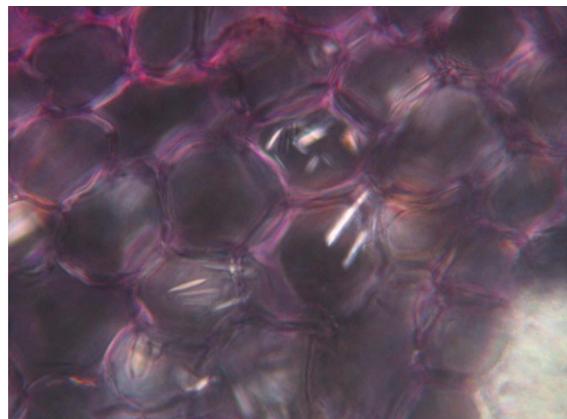
1



2



3



4

Figure 27 : *N. laevis* : Foliole en section transversale (G x 800)

(Olounladé, 2011)

- 1 – Détail : poil sécréteur à pied unicellulaire et tête pluricellulaire (figure 27.1)
- 2 – Détail : poil tecteur (figure 27.2)
- 3 -Parenchyme dont les cellules contiennent de petits cristaux aciculaires d'oxalate de calcium, en lumière artificielle(figure 27.3)
- 4 -Parenchyme dont les cellules contiennent de petits cristaux aciculaires d'oxalate de calcium, en lumière polarisée (figure 27.4)

Ø **Foliole pulvérisée**

La poudre de foliole de *N. laevis*, montée dans une solution d'hydrate de chloral présente :

- ü des poils sécréteurs, libres, vus de face et présentant une forme circulaire à 8 - 20 cellules (figure 28.1) ;
- ü des fragments d'épiderme inférieur, à cellules lobées, stomates de type anomocytique et des poils sécréteurs, parfois accompagnés de parenchyme lacuneux (figure 28.2);
- ü des fragments d'épiderme supérieur comportant des cellules à paroi rigide, irrégulièrement et finement épaissie et des poils sécréteurs, accompagné de parenchyme palissadique (figure 28.3);
- ü des fragments de fibres à paroi épaissie, de vaisseaux spiralés ou réticulés accompagnés de cellules contenant des cristaux aciculaires d'oxalate de calcium (figure 28.4), nettement visibles en lumière polarisée (figure 28.5);
- ü de rares poils tecteurs, pointus, unicellulaires, à paroi épaissie et échinulée.

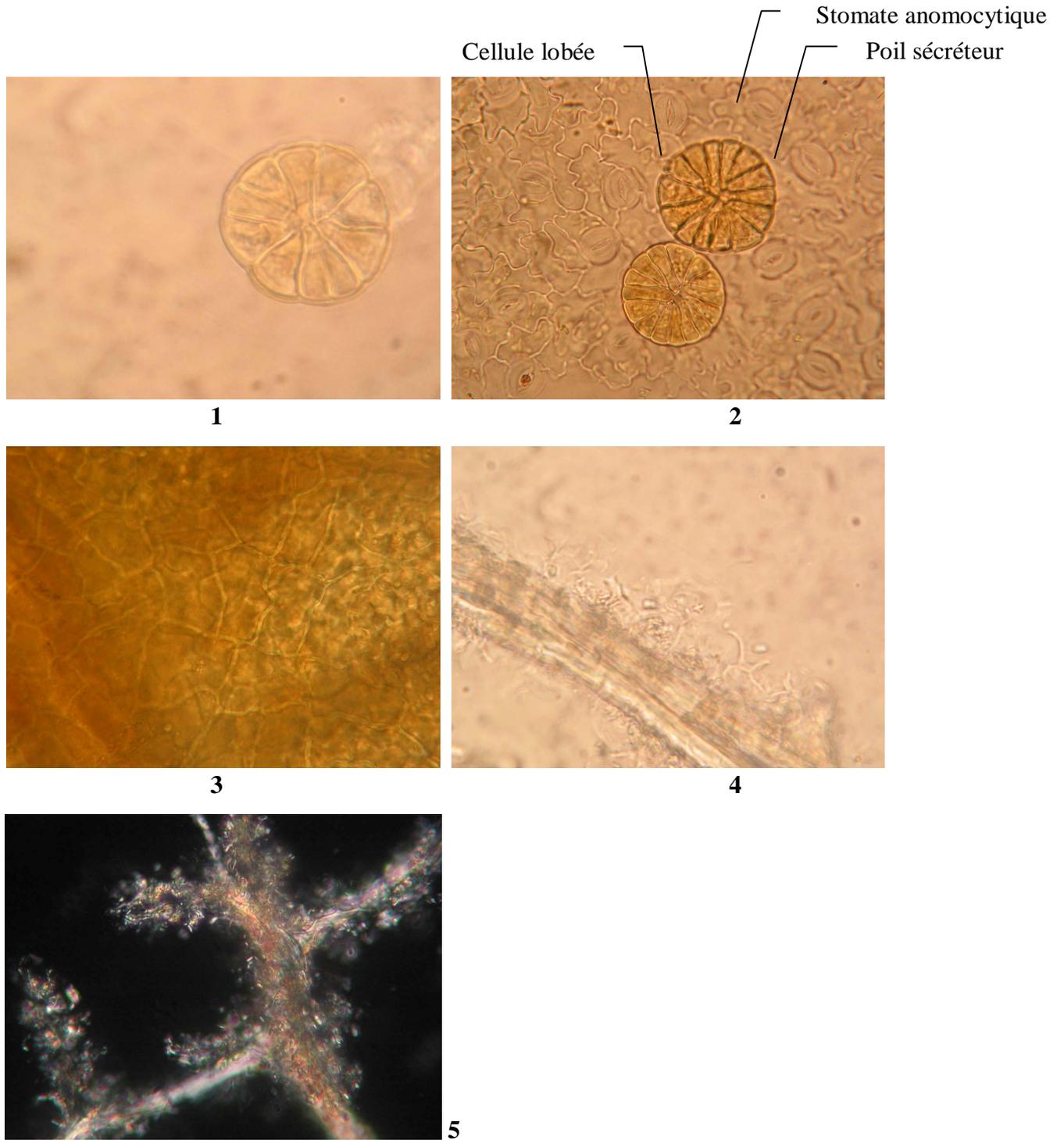


Figure 28 : *N. laevis* : Foliolle pulvérisée

1 - Poil sécréteur libre, vu de face (G x 600)

2 - Épiderme inférieur (G x 400)

3 - Épiderme supérieur (G x 400)

4 - (G x 200)

5 (G x 200)

1.3.2. Etudes morphologique et anatomique de l'épiderme de la foliole chez *Z. zanthoxyloides* récoltée au Bénin

1.3.2.1. Description morphologique

La foliole (figure 29. B) sèche est pétiolée, coriace, ovale, oblongue à oblancéolée, plus ou moins cunée à la base et très courtement acuminée au sommet ; certaines folioles sont émarginées. Elle mesure environ 5-10 cm de long sur 3 cm de large. La face supérieure est vert foncé alors que la face inférieure est nettement plus pâle. Des ponctuations translucides parsèment le limbe.

De la nervure principale, nette à la face inférieure, partent de nombreuses nervures secondaires, fines et peu marquées. De rares épines recourbées en crochet, noirâtres, sont présentes sur la nervure principale de la foliole, soit sur la face supérieure, soit sur la face inférieure.

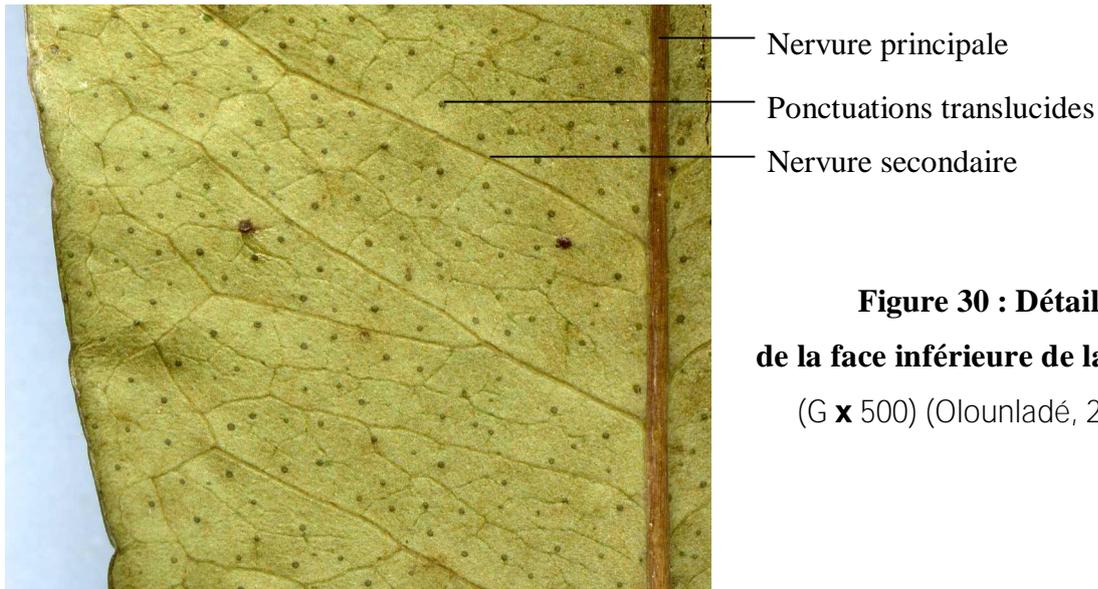


Figure 29 : *Z. zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler

A – Feuille

B – Folioles

(Olounladé, 2011)



**Figure 30 : Détail
de la face inférieure de la foliole**
(G x 500) (Olounladé, 2011)

1.3.2.2. Description anatomique

L'étude de la structure anatomique des échantillons ainsi que celle de la poudre a été réalisée afin d'être en mesure de vérifier l'identité de notre matière première, d'un lot à l'autre. L'ensemble de la description anatomique est réalisé par observation microscopique de la section transversale de la foliole, colorée par le réactif au Carmino-Vert Aluné dit « Réactif de Mirande » (Mirande, 1900).

Ø Section transversale de la foliole

La section présente au niveau de la nervure principale une face supérieure plane et une face inférieure nettement bombée. Le limbe représente environ le quart de la hauteur de la nervure.



**Figure 31 : *Zanthoxylum zanthoxyloides*
Foliole en section transversale (G x 100) (Olounladé, 2011)**

Allure générale

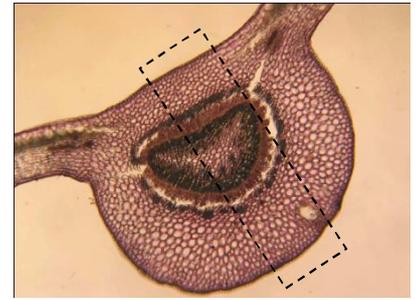
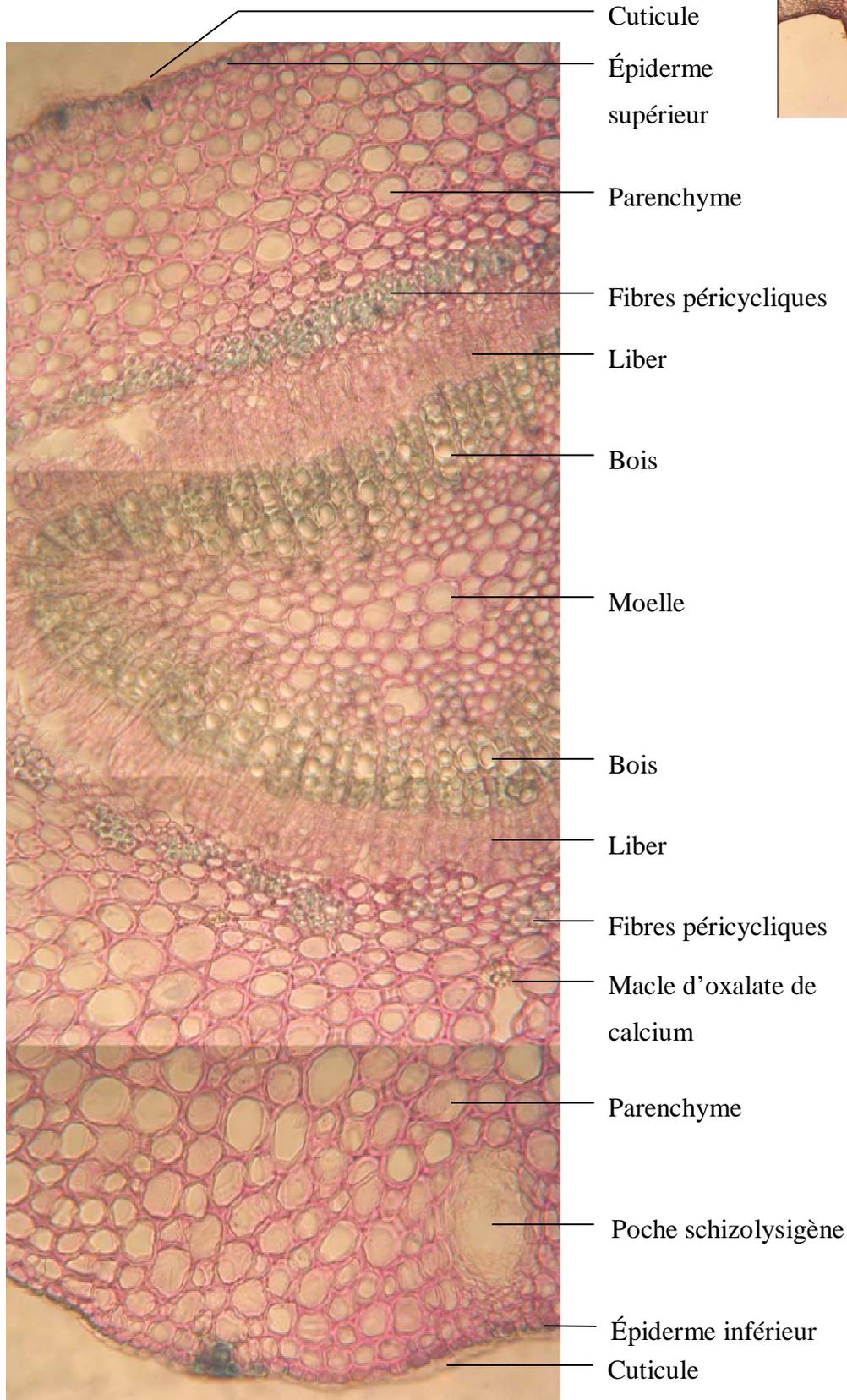


Figure 31 : *Z. zanthoxyloides* : Foliolle en section transversale (G x 200)

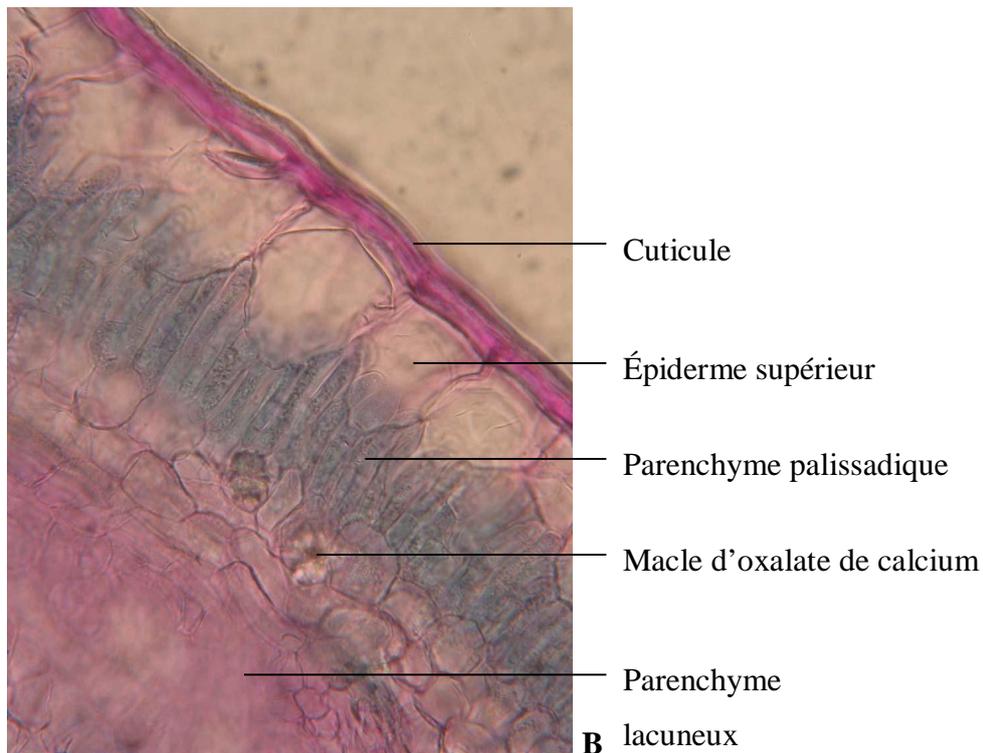
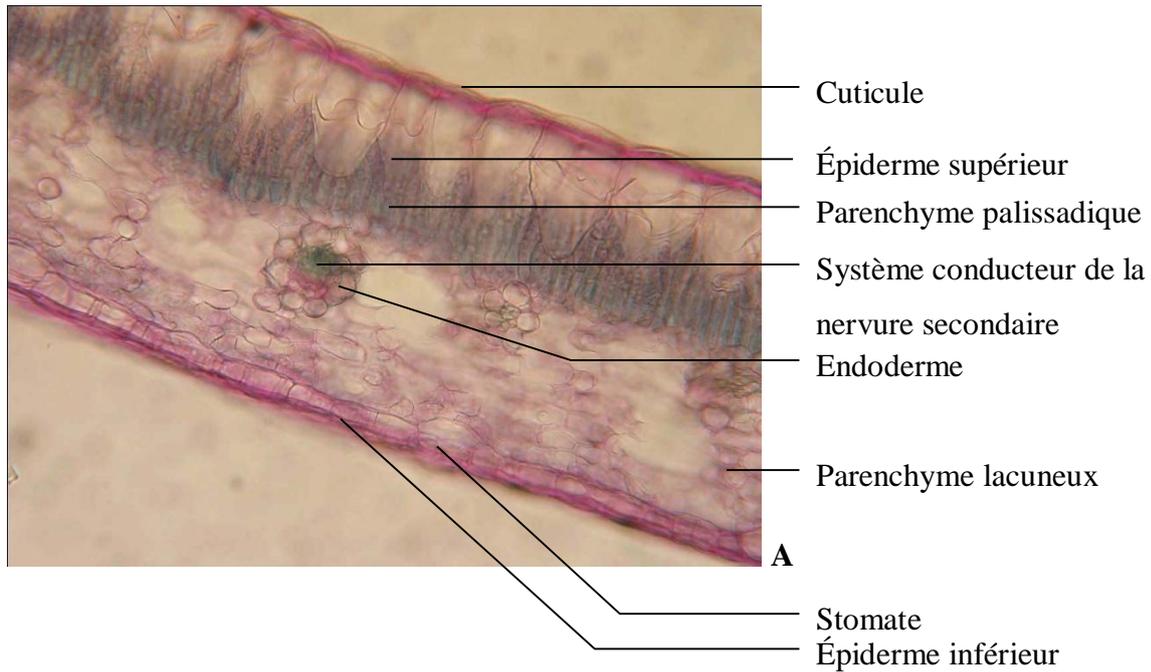


Figure 32 : *Z. zanthoxyloides* : Limbe en section transversale

A - (G x 200)

B - (G x 400)

(Olounladé, 2011)

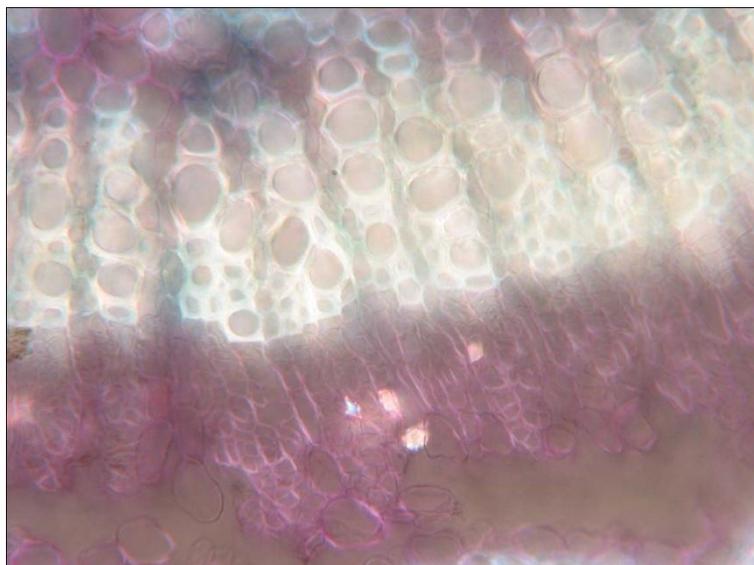
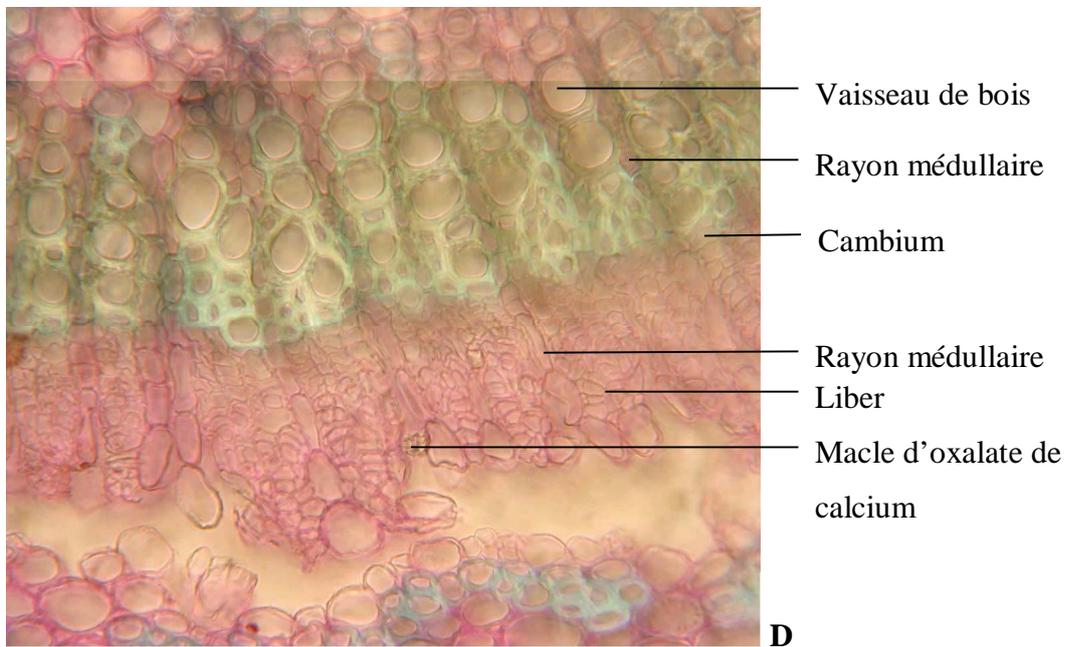
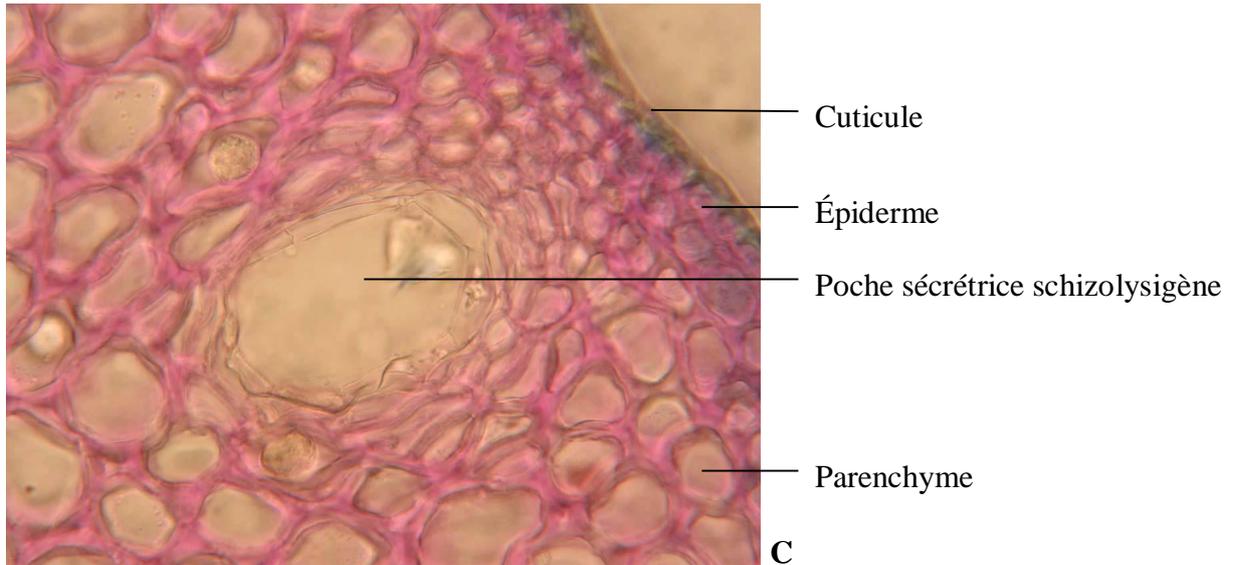


Figure 33 : *Z. zanthoxyloides* (G x 400)

C-Poche sécrétrice schizolysigène

D-Détail du système conducteur

E-en lumière polarisée

(Olounladé, 2011)

Ø Poudre

La poudre de foliole de *Z. zanthoxyloïdes*, montée dans la solution aqueuse d'hydrate de chloral à 4000g/L) présente :

- ü des fragments de l'épiderme inférieur à cuticule striée, cellules à paroi rigide et stomates de type anomocytique à 4-6 cellules annexes (figure 34. A) ; des éléments du parenchyme lacuneux en réseau polyédrique net ainsi que des poches sécrétrices accompagnent fréquemment ces fragments (figure 34. B);
- ü des fragments d'épiderme supérieur, recouvert d'une cuticule finement striée à cellules polyédriques à paroi rigide (figure 34. C) accompagnées de parenchyme palissadique, nettement visible sous les parois anticlinales (figure 34. D) ; des masses sphéro-cristallines composées de fines aiguilles situées dans une cellule ou de part et d'autre de deux cellules épidermiques sont souvent visibles (figure 34. E). En présence d'hydroxyde de potassium à 20 g/L dans l'alcool, les cristaux sont solubles et le montage prend une coloration jaune évoquant la nature flavonoïdique des cristaux (figure 34. F) ;
- ü des faisceaux conducteurs, comportant des vaisseaux spiralés ou annelés (figure 34. G) entourées de cellules du parenchyme lacuneux en forme de L ou \perp à paroi fine (figure 34. H)
- ü des poches sécrétrices, le plus souvent fragmentées comportant des cellules sécrétrices fines et un contenu huileux jaune (figure 34. J)
- ü de petites macles d'oxalate de calcium, libres (figure 34. K), ou incluses dans des cellules de parenchyme (figure 34. L) nettement visibles en lumière polarisée (figure 34. M).

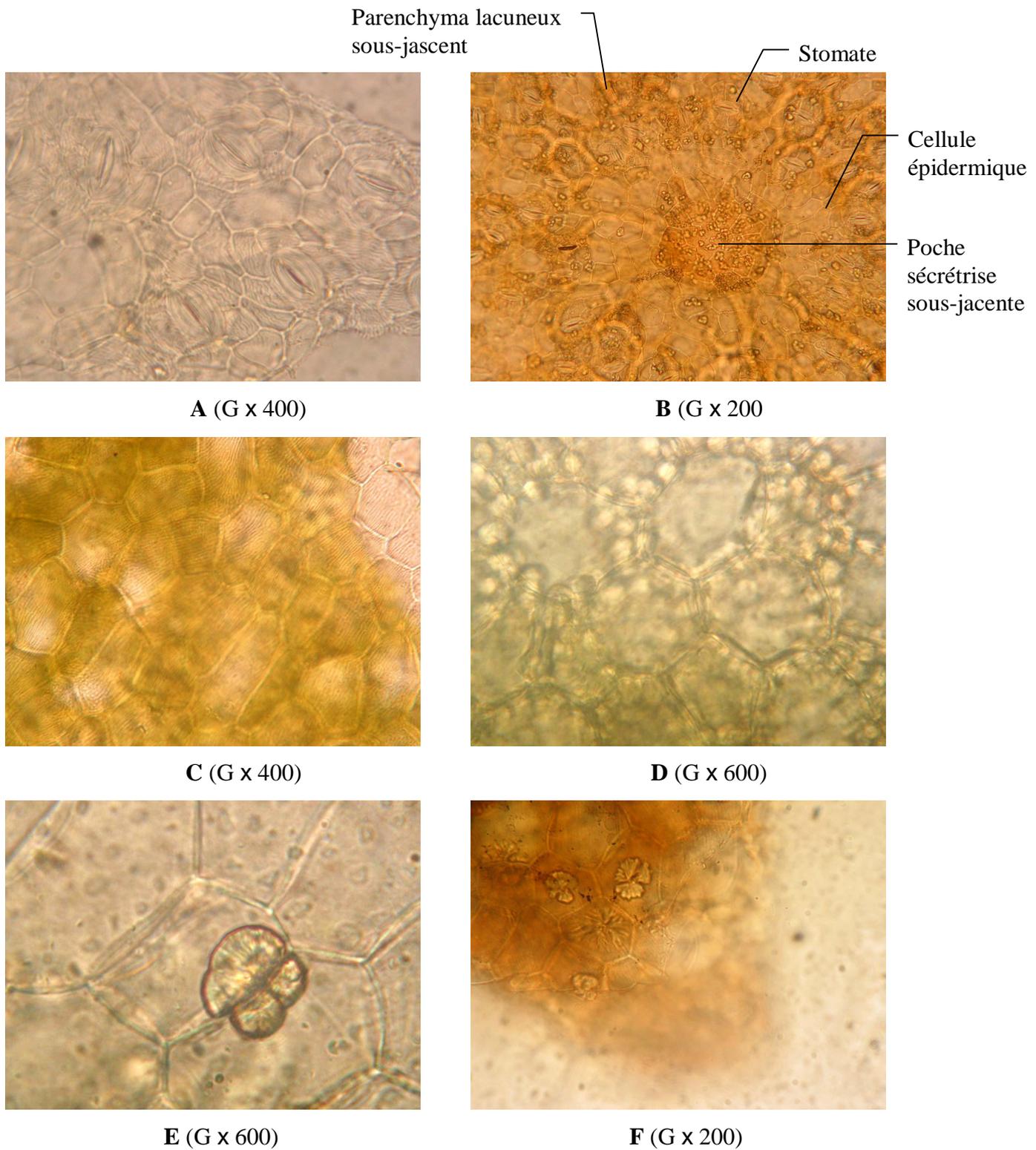


Figure 34 : *Z. zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Olounladé, 2011)

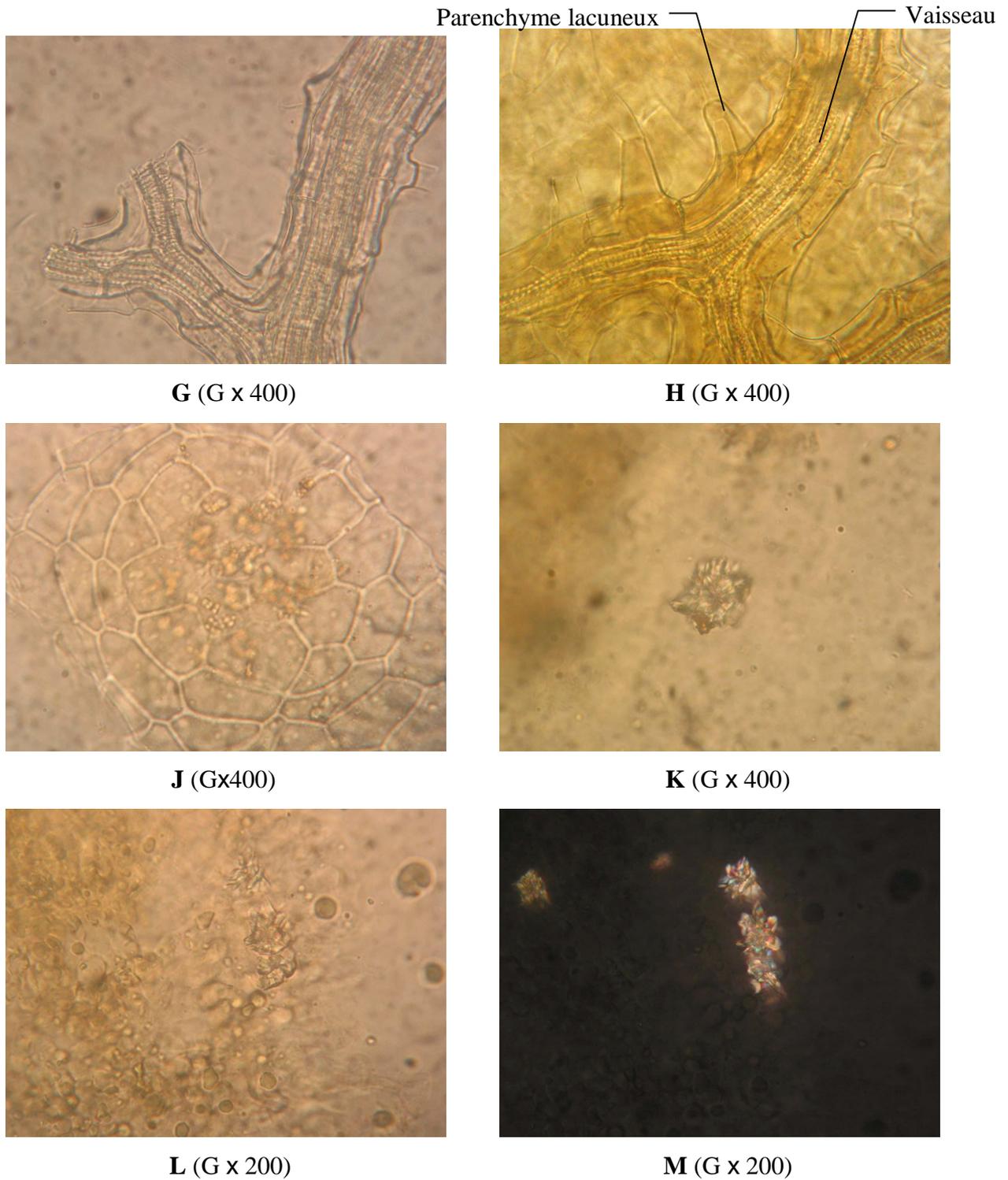


Figure 34: *Z. zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler

Article 1 : *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seeman ex Bureau (Bignoniaceae) and *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick & Timler (Rutaceae) used in folk medicine: anatomical features, preliminary phytochemical analysis and anthelmintic activity

2011 Manuscrit en préparation

P. A. Olounladé^{a,b,c}, E. V. B. Azando^{a,d}; M. S. Hounzangbé-Adoté^a, T. B. Tam Ha^b; I. Fourasté^c, C. Moulis^c, N. Fabre^c, H. Hoste^{d,e}, A. Valentin^{c*}

^a*Laboratoire d’Ethnopharmacologie et de Santé Animale, Faculté des Sciences Agronomiques, Université d’Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou – Bénin*

^b*Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, Université de Toulouse III, 35 Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, Cedex 9 France.*

^c*Pharma-Dev -UMR 152, Faculté de Pharmacie, Université de Toulouse III, 35 Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, Cedex 9 France.*

^d*INRA, UMR 1225 Interactions Hôte Agents Pathogènes 23, Chemin des Capelles, F-31076 Toulouse, France.*

^e*Université de Toulouse, ENVT, UMR 1225, F-31076 Toulouse, France.*

*** Corresponding author. A. Valentin, 35 Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse Cedex 9, France. Tel. 33 (0)5 62 25 68 93, Email: valentin@cict.fr**

Abstract

Newbouldia laevis (P. Beauv.) Seeman ex Bureau is a Bignoniaceae widely distributed in USA, Central Africa and West Africa. *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick & Timler is a Rutaceae widely distributed in West Africa. They have been commonly used in folk medicines against human and animal external and gastrointestinal parasites. In this study, the botanical identification criteria as well as a preliminary phytochemical composition and an anthelmintic activity of these species are reported. Extracts of both plants were prepared by use of chloroform, acetone/water (70:30), ethanol/water (70:30) and their anthelmintic activity was measured by the larval migration inhibition assay (LMI) applied on the abomasale species *H. contortus*. Then anatomical and phytochemical examinations were performed. Anatomical study has shown that *N. laevis* presents: lower epidermis with sinuous wall-cells and anomocytic stomata, acicular calcium oxalate crystals, unicellular echinulate covering trichomes, 8-20 cell-head glandular trichomes. Anatomical study has shown that the leaflet of *Z. zanthoxyloides* presents as anatomic features: epidermis with polygonal-cells and wavy striated cuticle, calcium oxalate clusters and sphaerocrystalline masses of flavonoid compounds. The phytochemical screening revealed the presence of flavonoids, tannins, alkaloids, volatile oil, anthocyanins, leucoanthocyanins, reducing compounds and coumarins in the leaves of the studied species. Saponins, cyanogenic and cardiac glycosides were absent in all the studied plants parts. Mucilages were present in *Zanthoxylum zanthoxyloides* while quinones were present in *Newbouldia laevis*. Chloroform, acetone and ethanol extracts were used for anthelmintic studies.

The extracts of *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* inhibit *in vitro* the larval migration of *H. contortus*. This effect is dose depending ($p < 0,001$). Acetonic extracts seem to be more active especially in high doses. These extracts from *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides*, identified in the

ethno knowledge could be used as improved traditional medicines and may contain compounds with potential anthelmintic activity.

Key words: *Anatomical, phytochemical, anthelmintic, Newbouldia laevis, Zanthoxylum zanthoxyloides, Benin.*

Introduction

Drug chemotherapy still remains one of the major curative options worldwide (Ugbabe et al., 2010). Currently, attention is being given to the use of herbal medicinal products and therapy for the treatment of most ailments whether physiological disorder or of bacterial, viral or parasitic origin. Screening of plant extracts for anthelmintic, antiviral or antiparasitic properties are one of the basic steps in identifying target drugs after extraction (Ugbabe et al., 2010).

The World Health Organization (WHO) reported that more than 80% of the world's population depends mainly on traditional medicine. Traditional treatment involves mainly the use of plant extracts. Herbal prescriptions and natural remedies are commonly employed in developing countries for the treatment of various diseases, this practice being an alternative way to compensate some perceived deficiencies in orthodox pharmacotherapy (Sofowora, 1989). Unfortunately, there is limited scientific evidence regarding safety and efficacy to back up the continued therapeutic application of these remedies. The rationale for the utilization of these remedies rested largely on long term clinical experience. But now, with the upsurge in the use of herbal medicine, a thorough scientific investigation of the plants will go a long way in validating their folkloric usage (Sofowora, 1989).

The genus *Newbouldia* (Bignoniaceae) comprises a unique species *Newbouldia laevis*, which occurs in several tropical zones of America, Central and West Africa. *Newbouldia laevis*, also called «fetish tree» can grow to a height of about 12 m but is most often a shrub or a bush. It is commonly used in African folk medicine for the treatment of several diseases such as diarrhea and icterus (Tra-Bi, 1997). It is also employed against malaria, sexually transmitted disease, dental caries, arthritis pain, gastroenteritis, dysentery and as vermifuge (Ayensu, 1978; Abbiw, 1990; Eyong et al, 2005). Leaves are used against infertility (Burkill, 1985; Adjanahoun et al, 1991; Igoli et al, 2002; Igoli et al, 2003; Tor-Anyiin et al, 2003).

The genus *Zanthoxylum* (Rutaceae) comprises a large number of species, which occur in several tropical and temperate zones of America, Africa and Asia. In Africa, many species are used in folk medicine. *Zanthoxylum zanthoxyloides* is a scandent shrub or a small tree; it has a fragrant bark and grows in coastal areas of West Africa (Griffin et al., 2000). The tree branches are adorned with numerous spines. It has been commonly used against human and animal parasites (Arbonnier, 2004). Leaves have been used as tea against inflammatory diseases and against malaria. Roots and stems have been used to treat jaundice, sore throat, hemorrhoids, gastroenteritis, dysentery, gonorrhoea and as vermifuge. Root bark and leaves are used as anti-odontalgic and to treat stomatitis, gingivitis and dental caries. Roots are used for tooth friction (Malgras, 1992; Chaaïb, 2004).

In Benin, stock breeding is an economically important activity because it represents one of the most important sources of jobs and income. It contributes for about 4 to 6 % in the Gross domestic product of Benin. Except the functions of prestige and savings, the animals of breeding intervene to increase the income of the breeders through on one hand, the sale of animals and their by-products and on the other hand through the use of the fertilizer for the fertilization of farms (Savy et al , 2005). However, this breeding is confronted with numerous constraints: the high cost of medicines, state of financial fragility of the producers, disturbing appearance of crossed resistances in the modern molecules, the lack of sanitary frame of the breeders and the traditional system of the managements of the herds. Among the constraints, one of the essential factors of limitation of the animal productions is the animal health. The levying of these constraints requires the implementation of the efficient practices of fight by the use of the available endogenous resources. Among these resources, we can quote healing plants. Helminthes infection is a major threat to small ruminant production leading to enormous economic losses particularly in areas where extensive grazing is practiced (Waller, 1997).

The plants were chosen on the basis of a recent questionnaire survey in Benin which indicated that they were frequently used by small scale farmers against parasitic infections or to treat associated clinical signs (Hounzangbé-Adoté, 2000). *H. contortus* is a gastrointestinal nematode parasite of the small ruminants with which the economic consequences are particularly marked in developing countries. As all the digestive strongyles, their biological cycle is monoxene and divides in an external phase (free life) and in a phase of parasitic life (Craplet & Thibier, 1984) Eggs of the nematodes, rejected with feces by animals, eclose to give larvae of the first age L₁. These last ones undergo a metamorphosis to give larvae of 2nd age L₂ which undergo in turn a metamorphosis to give larvae of 3rd age L₃. L₃ is characterized by its inclusion in the exuviae of the stage L₂ and represents the infective stage. The exit of the larva L₃ from its girdle establishes the passage of the life.

This paper deals with an anatomical identification, a preliminary phytochemical analysis and an anthelmintic evidence of the leaves of *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* found in Benin.

Materials and methods

Plant material

Sample collection was made in the department of the Atlantic Ocean for the South of Benin and identification made by the National Herbarium of Abomey-Calavi University (Herbier National de l'Université d'Abomey-Calavi). Classification of the species was performed by means of the key according to Cronquist (Cronquist, 1988). Voucher specimens are kept at the Herbarium of Abomey-Calavi University for *Zanthoxylum zanthoxyloides* under N° AA 6301 / HNB and *N. laevis* under N° AA 6302 / HNB.

Anatomical study

Slices of leaflets were obtained by standard techniques and disaggregated by a 10% solution of sodium hypochlorite during 10 min. They were stained by an alum-carmin-green mixture

called Mirande's reagent (Mirande, 1920). Leaflet transverse sections were mounted on glass slides using glycerin gel. Leaf powder was observed using chloral hydrate solution (80g/20mL). All observations were performed using a LEICA DMLB microscope. Pictures were taken with a Digital Camera Power Shot S40CANON photo-micrographic system.

Phytochemical analysis

Phytochemical screening

The standard methods of Odebiyi & Sofowora (1990), Trease & Evans (2002), Fadeyi et al. (1989), Potterat (1997) and Banso & Ngbede (2005) were adopted for the phytochemical screening. Chloroform, acetone and ethanol extracts of the leaves were used for the anthelmintic screening studies.

Preparation of extracts

Leaves were dried indoors at room temperature and a large part was reduced into powder for extraction. 50 grams of leaf powder was refluxed in a water bath under magnetic stirring during one hour in 500 mL of chloroform. The solution was cooled then filtered. The operation was repeated twice and chloroform was removed under reduced pressure at T = 40°C. The residue was freeze-dried; it was weighed, and then refluxed under magnetic stirring during one hour in 500 mL of acetone-water (70: 30). The solution was cooled then filtered. The operation was repeated twice and acetone and water were removed under reduced pressure. The residue was freeze-dried; it was weighed, and then refluxed under magnetic stirring during one hour in 500 mL of 70 % ethanol. The solution was cooled then filtered. The operation was repeated twice and ethanol-water was removed under reduced pressure. The residue was freeze-dried.

Bioassays: Larval migration inhibition assay

The larval migration inhibition (LMI) bioassay was used as described by Rabel et al. (1994) adapted for the plant extracts (Jackson & Hoste, 2010), in order to measure inhibiting activity against infective larvae. *H. contortus* L₃ were obtained by fecal culture. Eggs reached the stage L₃ after 10 days. The L₃ were then collected by sedimentation using Baermann's devices. Larvae were incubated for 3 h at 20 °C in PBS plant extract solutions, at concentrations of 150,300, 600 or 1200 µg/mL at the rate of 3 repetitions by concentration. The larvae were then washed three times in phosphate buffer (PBS) (pH 7.2, 0.15 M) and centrifuged. After the last washing, 800 µL of larvae at a concentration of 1000 L₃/mL was pipetted onto a 20 µm mesh. The sieve was inserted into a conical tube, so that it just touched the surface of the PBS contained therein. Three replicates were run at room temperature (23°C) for each plant concentration. In addition, negative (larvae incubated in PBS) and positive (larvae incubated in levamisole at concentrations of 62,5 , 125, 250 and 500 µg /mL) controls were run in parallel. After 3 h, the L₃ above the sieve were discarded and those which had actively migrated through the mesh into the PBS below, were counted under an optical microscope (at 40 x magnification), based on a 10% aliquot technique.

The percentage of LMI was calculated as $[(T-M)/T \times 100]$ where T is the total number of L₃ deposited in the sieve and M the number of L₃ having migrated through the mesh into the PBS.

Statistical analyses

The experiment was to determine the efficacy of the extracts, based on the inhibition of larval migration (L₃) of *H. contortus*.

The percentage (%) of inhibition of larval migration was calculated using the formula (modified according to Coles et al., 1992): $\text{Inhibition (\%)} = 100 (1 - P_{\text{test}}/P_{\text{control}})$, where P_{test} is the number of L₃ having migrated in test extracts or levamisole and P_{control} is the number of L₃

having migrated in the negative control (PBS). The mean values were calculated using the Excel statistical package.

Larval migration test was transformed by the formula: $\log(x+1)$ and submitted to analysis of one-way variance and compared by the Tukey test, with 5% significance level, using the Prism 5.04 program. The dose response relationship was determined considering the statistical level of significance at $P < 0.05$

Results

Anatomical characterization of plants

Anatomical characterization of *Newbouldia laevis*

The leaflet anatomy showed abundant cells containing small acicular calcium oxalate crystals in the centre of the mesophyll. The vascular bundles were surrounded by fibers. Two supernumerary vascular bundles were observed inside the major vascular ring, as well as a small vascular bundle located between the upper epidermis and the major vascular ring. The mesophyll showed the upper epidermis accompanied by a hypodermis, one layer of palisade cells and spongy parenchyma. The lower epidermis showed sinuous wall cells and anomocytic stomata (4-6 guard cells). Unicellular, thick-walled, echinulate covering trichomes were observed. Glandular trichomes were embedded in the epidermis; they had a unicellular foot and a flattened, circular, 8-20-cell head (Fig.1 1-6).

Anatomical characterization of *Zanthoxylum zanthoxyloides*

In transverse section, the leaflet shows abundant cells containing calcium oxalate clusters in the centre of the mesophyll. The vascular bundles in ring shape are surrounded by fibers. The mesophyll shows an upper epidermis with mucilage cells, one layer of palisade cells and spongy parenchyma. Both epidermis have polygonal cells with wavy striated cuticle, the lower epidermis shows anomocytic stomata. Schizogenous oil glands are observed in

parenchyma. In the chloral hydrate solution, the upper epidermis shows in several cells sphaerocrystalline masses composed of fine needles. In presence of potassium hydroxide (20 g/L in ethanol) those crystals disaggregated. (Fig. 2 7-15).

Phytochemical analysis

The phytochemical investigation revealed the presence of alkaloids, flavonoids, tannins, volatile oil, anthocyanins, leucoanthocyanins, reducing compounds, coumarins and the absence of saponins, cyanogenic and cardiac glycosides in the leaflet of both plants. Besides, mucilages were present in *Zanthoxylum zanthoxyloides* and quinones were present in *N. laevis* (Table 1).

Ratio drug/ extract (mass/mass)

Newbouldia laevis: the ratios drug/extract (mass/mass) were 10:1 for chloroform, 20:1 for acetone and 8:1 for ethanol.

Zanthoxylum zanthoxyloides: the ratios drug/extract (mass/mass) were 10:1 for chloroform, 10:1 for acetone and 9:1 for ethanol.

***In vitro* anthelmintic activity of plant extracts**

The migration rate observed for the larvae of negative control was 87 %. The positive control, levamisole was highly effective.

The percentage of inhibition of larval migration increased significantly ($P < 0.001$) with the increasing concentrations of chloroform, acetone and ethanol extracts (Fig. 4 and Fig. 6) Overall, the inhibition rates obtained with ethanol and chloroform extracts ($P < 0.001$) were lower than those obtained with acetone extract at similar concentrations ($P < 0.001$).

Levamisole was more effective than the extracts, but the compounds in the extracts have more or less similar dose-response profiles (Fig. 3 and Fig. 5). The *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* extracts appeared to inhibit larval migration.

Discussion

According to the obtained results, a complete ring of vascular bundles observed in *N. laevis* leaves could be a characteristic of the Bignoniaceae family since generally transverse section of the leaf shows midrib in the form of a continuous arc (Ayodele & Olowokudejo, 1997). *N. laevis* leaves present non-reverse supernumerary bundles inside the vascular ring, this is uncommon in plants. The presence of a hypodermis in the upper face of the lamina is rather frequent in tropical plants. The calcium oxalate crystals in fine needles observed in the whole of the parenchyma of *N. laevis* leaves, are rarely found in plants. This feature may be an identification criterion of *N. laevis* leaves in the family of Bignoniaceae. The specific trichomes, either unicellular straight covering trichomes with echinulate wall, located on the rib, or glandular trichomes with unicellular foot and peltate multicellular head are observed. The lower epidermis shows sinuous wall cells. All these characteristics would be a good criterion for identification of *N. laevis* in Bignoniaceae family.

According to our observations, we find in *Z. zanthoxyloides* leaflet the characters common to the Rutaceae family such as the presence of a vascular ring at the midrib (genera *Citrus*, *Jaborandi*, *Barosma*) (Jackson, 1990), the presence of an internal secretor apparatus consisting of schizogenous oil glands, the presence of calcium oxalate crystals. The distinctive characteristics such as the absence of an external secretor apparatus, yet common in many species of the family, the presence of mucilage located in hypertrophied cells in the upper epidermis of the lamina, a similar organization is found in the genus *Barosma*, the presence, in chloral hydrate solution, of flavonoid compounds that crystallize in

masses or in fan-shaped fine needles. This phenomenon has already been described in several species such as *Citrus* leaflets (Perrot , 1942) or in species not belonging to the Rutaceae family but known for their high content of flavonoids such as *Sophora japonica* flower (Ph. Eu. 7th edition).

The phytochemical investigation revealed the presence of alkaloids, flavonoids, tannins, volatile oil, anthocyanins, leucoanthocyanins, reducing compounds, coumarins and quinones, and the absence of mucilages, saponins, cyanogenic and cardiac glycosides in the leaf of *Newbouldia laevis*. *Z. zanthoxyloides* leaves gave similar results, except for mucilage which was present and quinones which were absent. For *Newbouldia laevis*, a wide diversity of secondary metabolites has also been described depending on the part of the plant used. In root bark, the presence of naphthoquinones and anthraquinones has been reported (Eyong et al., 2005, 2006) whereas in the leaves, the presence of flavonoids, tannins and terpenes has also been mentioned (Gafner et al., 1997; Samy & Gopalkrishnakone, 2008). Quaternary alkaloids have also been identified (Kerharo & Adam, 1974). This showed that *N. laevis* contain many secondary metabolites. In similar studies alkaloids (Perrett & Whitfield, 1995), tannins (Banso & Ngbede, 2006), flavonoids (O'Sullivan, 1983; Ayres & Loike, 1990), coumarins (Gray, 1983) were found in the leaf extracts of *Z. zanthoxyloides*. The presence of such metabolites suggests that the plant might be of great importance in phytomedicine. For instance, the presence of alkaloids, flavonoids and tannins might be responsible for the use of this plant as vermifuge in Benin against parasitosis (Burkill, 1997; Hounzangbé-Adoté, 2000). The presence of tannins and flavonoids in plant extracts suggest that the plant has anthelmintic activity. The presence of tannins could also mean that it is an astringent, helping in wound healing and an antiparasitic which is in line with its folkloric use. Tannins also contain different type of acids, for example catechic, chlorogenic acids, gallo and ellagic acids (epigallitannins), which are inhibitors of HIV replication

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Tannin>). Tannins have shown potential antiviral, antibacterial, antiparasitic effects. Their potential effects against cancer through different mechanisms have been studied. Presence of volatile oil in the leaves suggests that it can be used in natural body cosmetic and scents. This is even more important since the oil was active on all the test organisms. This shows that it can be topically used to cure skin infections. Since it was also highly antimicrobial, anthelmintic, it can be used to treat infections.

Larvae L₃ establish an important stage of the parasitic cycle of *H. contortus*. They are the infective stage and are at the origin of the losses of production at the host and the contamination of the outside environment (Paolini et al., 2003; Hounzangbé-Adoté et al., 2004).

The decrease of migration of the larvae is due to their immobility or to their mortality. One of the objectives of the study was to establish the effects of *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* extracts on larval migration of *H. contortus*. An analogous method has been used for the test of larvicidal effects of plant extracts (Lorimer et al., 1996; Molan et al., 2003) according to the modifications of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance (Coles et al., 1992). Acetone and ethanol were selected as suitable extractants as they extract compounds of a wide polarity range, are miscible with organic and aqueous solvents, and are non-toxic to test organisms (Eloff, 1998), and indeed organic solvents extract more plant material than water. Besides, chloroform acetone and ethanol extract largest amounts of compounds from plants compared to dichloromethane and hexane (Bizimenyera et al., 2005). The *in vitro* model reported in this study demonstrated larvicidal effects of chloroform, acetone and ethanol extracts of *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* against *H. contortus*. Acetone extracts mainly tannins from herbal drugs. The inhibitive effect of the migration of *H. contortus* larva could be assigned to tannins.

The mechanism of the anthelmintic action is yet to be determined. Tannins in plant extracts have anthelmintic activity, attributed to physical astringent action on helminths (Athanasiadou et al., 2001; Molan et al., 2000). The present study showed that the larvicidal actions of the leaf extracts were nearly similar, yet the polyphenol content of the leaves of Tropical plants is much lower than that of the root and bark (Bizimenyera et al., 2005). The mode of action of the anthelmintic compounds could be similar to that of levamisole, judging from the dose-response curves, but more work needs to be done for rational conclusions

The traditional use of the *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* extracts against diarrhea, dysentery and unthriftiness, may also be due to their anthelmintic activity, as these signs are consistent with parasitic gastroenteritis. The anthelmintic activity of *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* extracts, in addition to the antibacterial, antioxidant and anti-HIV activities further support the traditional use of the plants. Research work is ongoing for determining better methods of plant extraction, elucidation of the chemical structure of the active compounds, and for *in vivo* tests in suitable target livestock. This work may lead, not only to possible isolation of novel anthelmintics from the plants, but also to identification of better methods of plant extraction which are readily adaptable for use by rural communities against helminthosis.

Conclusions

In conclusion, the result of this study in anatomical point of view supports largely the demarcation of the taxonomy of the families of Bignoniaceae and Rutaceae by Hutchinson and Dalziel (1954). A rigorous and relevant approach of determination and botanical identification of *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* allowed us to raise a real "ID card" to this raw material and to assure the reproducibility and the traceability. The presence of a variety of secondary metabolites and the activity of the extracts on *H. contortus* suggest that the plants can be exploited for phytomedicine development.

Further study is necessary for isolation and characterization of the active principles from the acetone fractions obtained from *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* leaves.

Acknowledgements

This work was supported by the CORUS project No. 6040. Mr. A.P. OLOUNLADE acknowledges receiving a scholarship from AUF to undergo his PhD studies.

Mr. E.V.B. AZANDO is a grateful recipient of a grant provided from ARHES. The authors would like to thank sincerely Valérie CRISTOFOLI for her technical assistance in the treatment of anatomical photos.

References

- Abbiw DK. (1990): *Useful plants of Ghana: West African uses of wild and cultivated plants*. Intermediate Technology Publications, Royal Botanic Gardens, Kew Ed. London, pp 154-157.
- Adjanahoun E, Ahyi MRA, Ake-Assi L, Elewude JA, Fadoju SO, Gbile ZO, Goudole E, Johnson CLA, Keita A, Morakinyo O, Ojewole JAO, Olatunji AO, Sofowora EA. (1991). *Traditional medicine and pharmacopoeia. Contribution to ethnobotanical floristic studies in Western Nigeria*, Pub. Organization of African Unity, Scientific Technical and Research Commission. Lagos, Nigeria, p. 420.
- Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. (2001). Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Vet Parasitol*, 99, 205-219.
- Arbonnier M (2004). *Tree, Shrubs and Liana of West Africa dry zones*. CTA, Postbus 380 6700 AJ Wageningen, Netherlands
- Ayensu ES. (1978). *Medicinal Plants of West Africa*. USA: Reference Publications Inc, pp 36-39.
- Ayodele AE, Olowokudejo JD. (1997). Systematic Importance of Leaf and Epidermal Characters in West African Species of Family Myrtaceae. *Bolm Soc broteriana*, 2, 35-72.
- Ayres DC, Loike JD. (1990). *Lignans. Chemical, Biological and Clinical Properties*. Cambridge, University Press, Cambridge.
- Banso A, Ngbede JE. (2006). Phytochemical screening and *in vitro* antifungal properties of *Fagara zanthoxyloides*. *Int J Food Env*, 4, 8-9.
- Bizimenyera ES, Swan GE, Chikoto H, Eloff JN. (2005). Rationale for using *Peltophorum africanum* (Fabaceae) extracts in veterinary medicine. *J S Afr Vet Assoc*, 76, 54-58.

- Burkill HM.(1985). *The Useful Plants of West Tropical Africa*. 2nd Edition Volume1, Familles A-D Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond,United Kingdom, pp 252-269.
- Burkill HM. (1997). *The Useful Plants of West Tropical Africa*. Royal Botanic Gardens Kew, pp 658-661
- Chaaib KF. (2004) : Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) (Rutaceae). Thèse de doctorat de la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, Genève
- Coles GC, Borgsteede F, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ. (1992). World Association for Advancement in Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol*, 44, 35-43.
- Craplet C, Thibier M. (1984). *Pathologie de la gestation*. In: Le mouton. 4^èm ed. Vigot, Paris.
- Cronquist A. (1988). *The evolution and classification of flowering plants*. New York: New York Botanic Gardens, p 555.
- Eloff JN.(1998). Which extractant should be used for screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J Ethnopharmacol*, 60, 1-8.
- Eyong KO, Folefoc GN, Kuete V, Beng PV, Krohn K, Hussain H, Nkengfack EA, Saefel M, Sarite SR, Hoerauf A. (2006). Newbouldiaquinone A: a naphthoquinone-anthraquinone ether coupled pigment, as a potential antimicrobial and antimalarial agent from *Newbouldia laevis*, *Phytochem*, 67, 605-609.
- Eyong KO, Krohn K, Hussain H, Folefoc GN, Nkengfack AE, Schulz B, Hu Q.(2005). Newbouldiaquinone and newbouldiamide: a new naphthoquinone-anthraquinone coupled pigment and a new ceramide from *Newbouldia laevis*. *Chem Pharm Bull* (Tokyo), 53, 616-619.

- Fadeyi MG, Adeoye AE, Olowokudejo JD. (1989). Epidermal and Phytochemical studies with genus of *Boerhvia* (Nyctangiaceae). *Int. J. Crude Drug Res*, 29,178-184.
- Gafner S, Wolfender JL, Nianga M, Hostettmann K. (1997). Phenylpropanoid Glycosides from *Newbouldia laevis* Roots. *Phytochem*, 44, 687-690.
- Gray AI. (1983). *Structural diversity and distribution of coumarins and chromones in the Rutales*. In: Waterman, P.G., Grundon, M.F (eds.), *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press, London, UK, pp 97-146.
- Griffin CT, Chaerani R, Fallon D, Reid AP, Downes MJ. (2000). Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp., and *Heterorhadtis indica* in Indonesia. *J. Helminthol*, 74,143-150.
- Hounzangbé-Adoté MS. (2004). Propriétés anthelminthiques de 4 plantes tropicales testées *in vitro* et *in vivo* sur les nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants Djallonké. Thèse doctorat, Université d'Abomey-Calavi, Bénin, p 240.
- Hounzangbé-Adoté MS. (2000). La pharmacopée en médecine vétérinaire au sud Bénin (cas des ovins et caprins).Colloque Européen d'Ethnopharmacologie du 11 au 13 mai 2000. Société Française d'ethnopharmacologie, Metz.
- Hutchinson J, Dalziel JM. (1954). *Flora of West Tropical African*. Crown Agents for Oversea Government and Administrations London, 2, 383-388.
- Igoli JO, Tor-Anyiin TA, Usman SS, Oluma HOA, Igoli NP. (2002). Folk medicines of the lower Benue valley of Nigeria. *Recent Progress in Medicinal Plants* 7, 327-338.
- Igoli JO, Igwue IC, Igoli NP. (2003). Traditional Medicinal Practices amongst the Igede people of Nigeria. *J Herbs Spices Med Plants*, 10, 1-10
- Jackson F, Hoste H (2010). *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In “*In vitro* screening of plant resources for extra nutritional attributes in ruminants nuclear and related methodologies”

- P Vercoe, HPS Makkar and AC Schlink Eds, Springer/International Atomic Energy Agency Edition *Dordrecht*, pp 25-45.
- Jackson BP, Snowdon DW. (1990). *Atlas of microscopy of medicinal plants, culinary herbs and spices*, 18-19.
- Kerharo J, Adam JG. (1974). *La pharmacopée Sénégalaise traditionnelle*. Editions Vigot Frères Paris, p 1011.
- Lorimer SD, Perry NB, Foster LM, Burgess EJ. (1996). A nematode larval motility assay for screening plant extracts and natural products. *J Agricult Food Chem*, 44, 2842–2845.
- Malgras D. (1992). *Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes*. Edits. Karthala, Paris, pp, 315-316.
- Mirande R.(1920).Sur le Carmin aluné et son emploi, combiné avec celui du vert d'iode, en histologie végétale. *C R Acad Sci*,170, 197-199.
- Molan AL, Meagher LP, Spencer PA, Sivakumaran S. (2003). Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol*, 33, 1691-1698.
- Molan AL, Alexander RA, Brookes IM, Mc Nabb WC. (2000). Effects of an extract from *sulla* (*Hedysarum coronarium*) containing condensed tannins on the migration of three sheep gastrointestinal nematodes *in vitro*. *Proc. N.Z. Soc. Anim*, 60, 21-25.
- Odebiyi A, Sofowora AE. (1990). Phytochemical screening of Nigerian medicinal plants. Part III. *Lloydia* 41, 234–246.
- O’Sullivan J. (1983). *Structural diversity and distribution of lignans in the Rutales*. In: Waterman, P.G., Grundon, M.F (eds.), *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press, London, UK, pp. 267-279.
- Paolini V, Bergeaud JP, Griez C, Prevot F, Dorchies P, Hoste H. (2003). Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Res*, 34, 1-9.

- Perrot E, 1943-1944. *Matières premières usuelles du règne végétal*. Edition Masson (Paris).
Tome II, 1138-1139
- Perrett S, Whitfield PJ. (1995). Atanine (3-dimethylallyl-4-methoxy-2-quinolone), an alkaloid with anthelmintic activity from the Chinese medicinal plant, *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med*, 61, 276-278.
- Pharmacopée-Européenne. (2011). Monographie du Sophora. 7^{ème} Edition : *Conseil de l'Europe*. Europe, 3829-3831
- Potterat O. (1997). Antioxydants and free radical scavengers of natural origin. *Curr Org Chem*, 1, 415-440.
- Rabel B, McGregor R, Dough PGC.(1994). Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintic on nematode larval migration. *Int J Parasitol*, 24, 671-676.
- Samy RP, Gopalakrishnakone P. (2008). Therapeutic potential of plants as antimicrobials for drug discovery. *Bioinformation*, 3, 100-110.
- Savy M, Martin-Prével Y, Sawadogo P, Kamli Y, Delpuch F. (2005). Use of variety/diversity scores for diet quality measurement: relation with nutritional status of women in a rural area in Burkina Faso. *Eur J Clin Nutr*, 59, 703-716.
- Sofowora EA.(1989). *Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa*. 1st edition. Spectrum Books Ltd. Ibadan -Nigeria.
- Tor-Anyiin TA, Shaato R, Oluma HOA. (2003). Ethnobotanical survey of Antimalarial medicinal plants amongst the Tiv People of Nigeria. *J Herbs Spices Med Plants*, 10, 61-74.
- Tra-Bi FH(1997). Utilisation des plantes par l'homme, dans les forêts classées du Haut-Sassandra et de Scio, en Côte-d'Ivoire. Thèse de 3^{ème} Cycle, Université de Cocody, Abidjan, p. 215.

Trease GE, Evans WC. (2002). Pharmacognosy, 15th Ed. *Saunders Publishers*. Ltd., London.
pp 42-393

Ugbabe GE, Ezeunala MN, Edmond IN, Apev J, Salawu OA. (2010). Preliminary phytochemical, antimicrobial and acute toxicity studies of the stem, bark and the leaves of a cultivated *Syzygium cumini* Linn. (Family: Myrtaceae) in Nigeria. *Afr J Biotechnol*, 9, 6943-6947.

Waller PJ. (1997). Anthelmintic resistance. *Vet Parasitol*, 72, 391- 412.

Table 1

Phytochemical analysis of the leaves of *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides*.

Test	<i>Newbouldia laevis</i>	<i>Z. zanthoxyloides</i>
Tannins	+	+
Flavonoids	+	+
Anthocyanins	+	+
Leucoanthocyanins	+	+
Cyanogenic glycosides	-	-
Saponins	-	-
Coumarins	+	+
Mucilages	-	+
Alkaloids	+	+
Reducing compound	+	+
Cardiac glycosides	-	-
Quinones	+	-
Volatile oil	+	+

KEY: (+) = Present, (-) = Absent

Illustrations

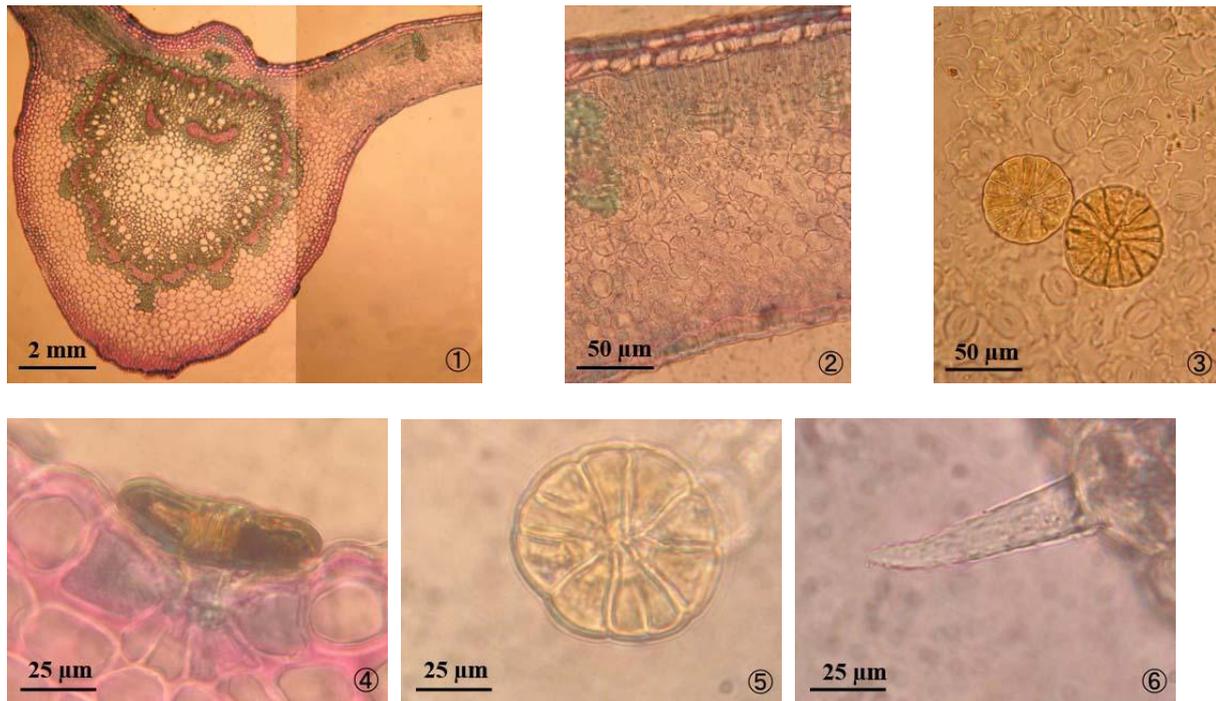


Fig. 1. 1-6 Photomicrographs of *N. laevis* leaflet

(1) Leaflet transverse section: supernumerary vascular bundles, groups of fibers, calcium oxalate crystals (scale bar: 2mm). (2) Mesophyll: upper epidermis, hypodermis, palisade cells, spongy parenchyma, and lower epidermis (scale bar: 50 μ m). (3) Upper epidermis in surface view: straight wall cells and glandular trichomes (scale bar: 50 μ m). (4) Glandular trichoma in transverse view showing the unicellular foot (scale bar: 25 μ m). (5) Glandular trichoma in surface view showing the multicellular head (scale bar: 25 μ m). (6) Unicellular echinulate covering trichoma (scale bar: 25 μ m).

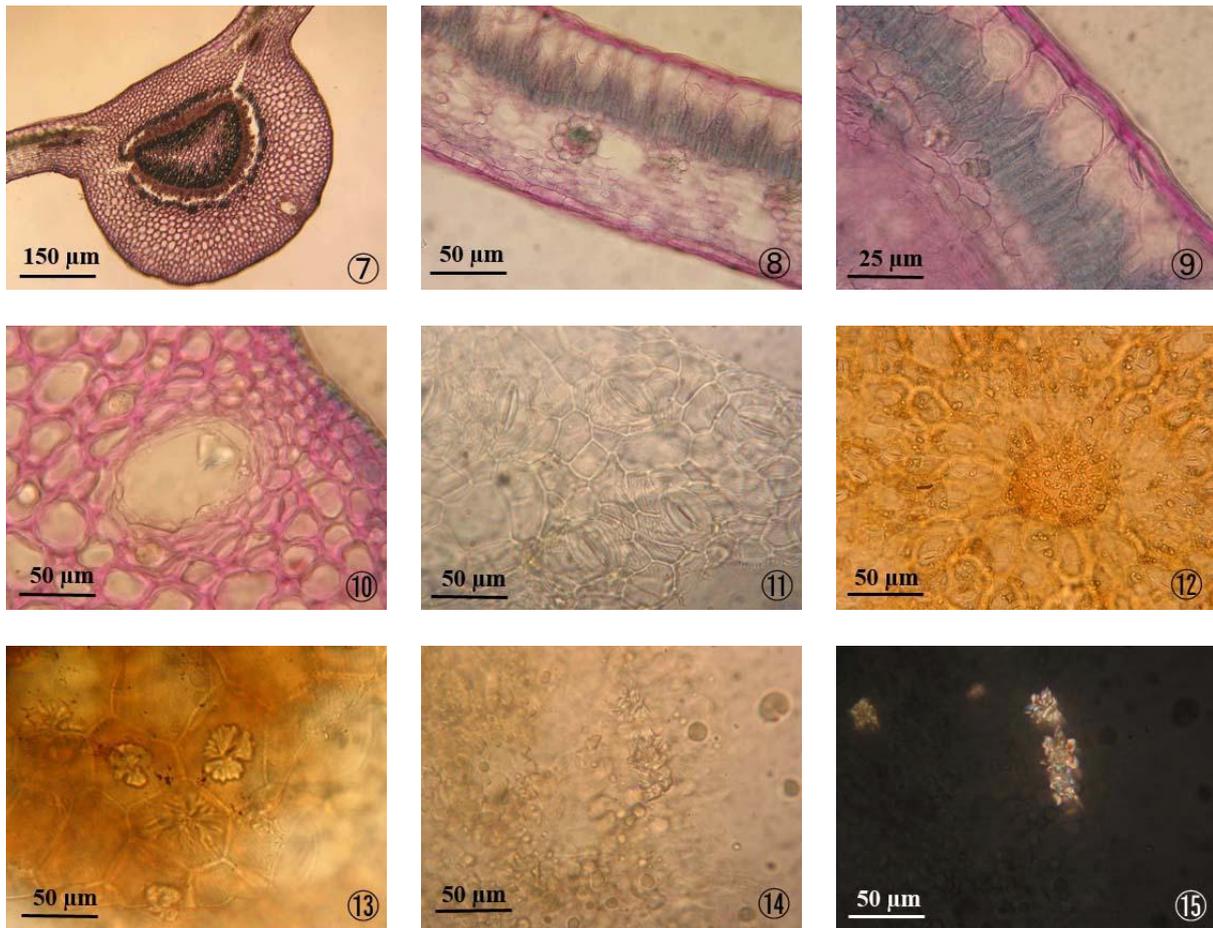


Fig. 2. 7-15 Photomicrographs of *Zanthoxylum zanthoxyloides* leaflet

(7) Leaflet transverse section in the midrib: showing the typical ring-shape vascular bundle (scale bar: 150μm). (8-9) Mesophyll: upper epidermis with mucilage cells, palisade cells, spongy parenchyma with calcium oxalate clusters, lower epidermis (scale bar :50μm - 25μm). (10) Schizogenous oil gland in transverse section (scale bar: 50μm). (11) Lower epidermis with polygonal cells, anomocytic stomata (scale bar: 50μm). (12) Upper epidermis with underlying schizogenous oil gland (scale bar: 50μm). (13) Upper epidermis with polygonal cells and sphaerocrystalline masses of flavonoid compounds (scale bar: 50μm). (14) Calcium oxalate cluster in day light (scale bar: 50μm). (15) Calcium oxalate cluster in polarized light (scale bar: 50μm).

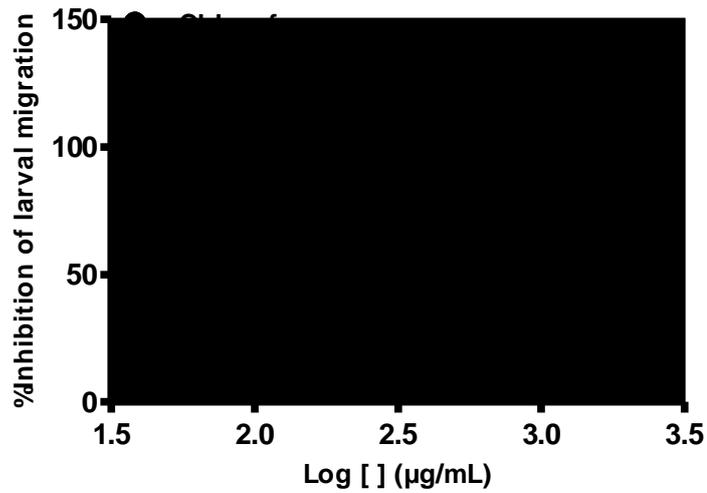


Fig. 3. Dose-response profile for inhibition of larval migration (L₃) of *Haemonchus contortus* by *Newbouldia laevis* extracts.

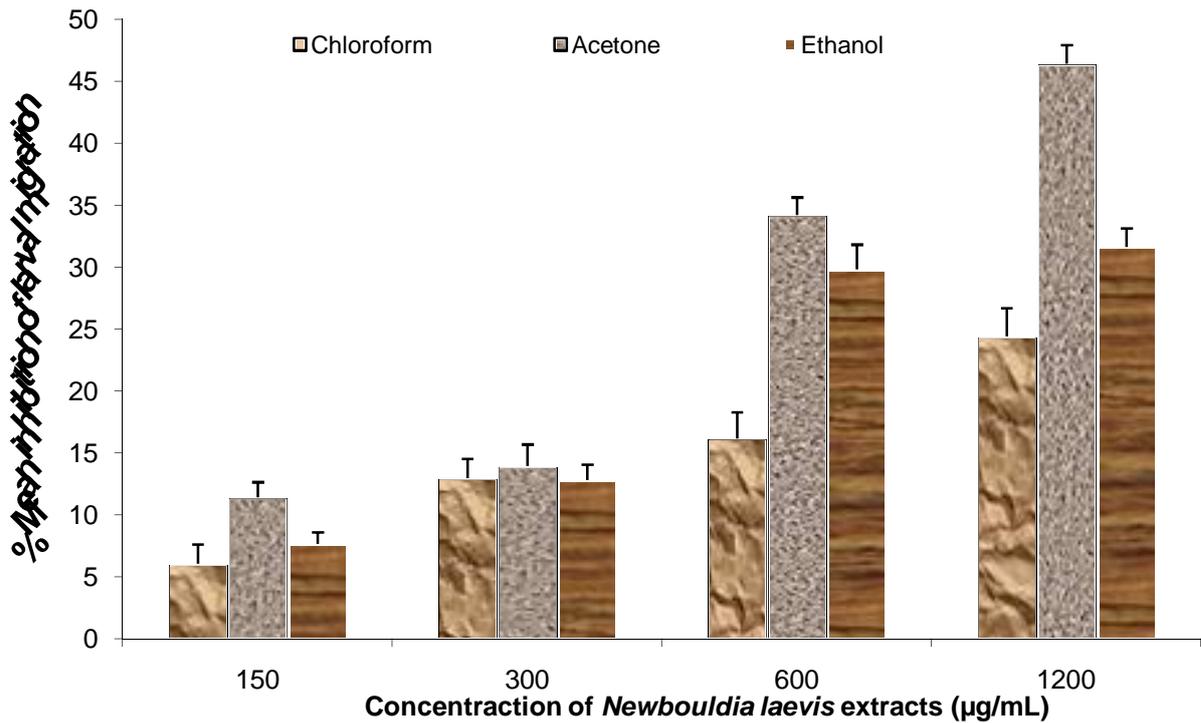


Fig. 4. Percentage of inhibition of larval migration (L₃) of *H. contortus* by *N. laevis* extracts.

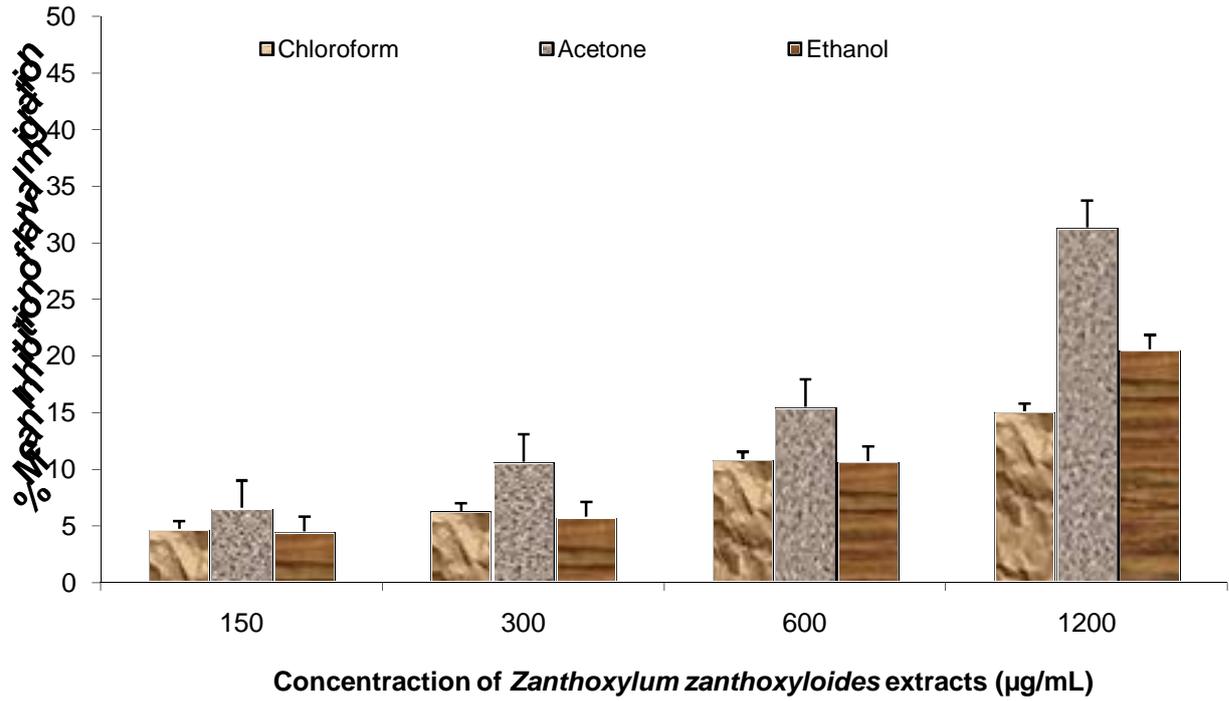


Fig. 6. Percentage of inhibition of larval migration (L_3) of *H. contortus* by *Z. zanthoxyloides* extracts.

CHAPITRE II : CARACTERISATION CHIMIQUE DES
COMPOSES ET EVALUATION *IN VITRO* DE L'ACTIVITE
ANTHELMINTHIQUE DES EXTRAITS DE *N. LAEVIS* ET DE
Z. ZANTHOXYLOIDES

2. Caractérisation chimique des composés et évaluation *in vitro* de l'activité anthelminthique des extraits de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes*

2.1. Introduction

Près de 80% des substances naturelles utilisées dans le domaine biomédical proviennent de plantes tropicales (Campa, 2005). C'est le cas de la vincristine et de la vinblastine, deux alcaloïdes dimères recherchés pour leur activité anti-tumorale. Extraits de *Catharanthus roseus*, pervenche originaire de Madagascar, ces composés sont très faiblement accumulés dans la plante (teneurs inférieures à 0.001% de la matière sèche). Aussi, d'importantes récoltes sont nécessaires (50 tonnes par an) pour obtenir la matière active indispensable aux besoins thérapeutiques mondiaux. De plus, le niveau de production des métabolites secondaires varie suivant l'organe (Endo *et al*, 1987), les individus (Levy *et al*, 1984), les lieux de récolte ou les conditions de culture (Daddona *et al*, 1976), les facteurs climatiques (Manolaraki, 2011) mais également selon le stade de développement de la plante (Reda, 1978 ; Manolaraki, 2011). Le but de ce travail est d'étudier la variabilité liée à des facteurs environnementaux sur la composition chimique de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes* et faire la caractérisation chimique des composés organiques volatiles et l'évaluation *in vitro* de l'activité biologique des huiles essentielles de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes*.

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Matériel végétal

Les feuilles de *Z. zanthoxyloïdes* (Fagara), de *N. laevis*, ont été récoltées matures dans quatre zones agro écologiques (départements de l'Ouémé, Atlantique, Zou et Couffo) pendant les saisons sèche et pluvieuse suivant les prévisions de l'ASECNA Bénin et authentifiées à l'Herbier National de l'Université d'Abomey-Calavi. D'une part les feuilles de *Z. zanthoxyloïdes* et de *N. laevis* ont été séchées en salle climatisée (20 °C) pendant 5 jours et sont ensuite réduites en poudre dans un broyeur. Des tests chimiques ont été effectués sur l'extrait aqueux et sur les échantillons de poudre en utilisant des procédures standard pour

identifier les constituants tels que décrits par Harborne (1973), Sofowara (1993), Williamson et al. (1996), Trease et Evans (2002) et Banso et Ngbede (2006). D'autre part les graines de *Z. zanthoxyloïdes* et les feuilles de *N. laevis* ont été fractionnées par hydrodistillation pour l'extraction des huiles essentielles. Les différents extraits et fractions obtenus sont ensuite caractérisés par des analyses chimiques et biologiques.

2.2.2. Hydrodistillation

Une fois que la matière végétale récoltée est broyée, la poudre de feuilles de *N. laevis* ou la poudre de graines de *Z. zanthoxyloïdes* est introduite dans un ballon de 2 litres. L'extraction a été répétée 6 fois. La quantité d'eau et la masse de matière végétale ont été identiques. Pour chaque extraction 200 g de poudre ont été mixés avec 300 mL d'eau distillée, puis hydrodistillés pendant 3 heures (Figure 35). L'extraction de l'huile essentielle a été répétée six fois.



Figure 35 : Clevenger-type apparatus

A la fin de l'hydrodistillation les deux huiles essentielles ont été récupérées et mises dans un flacon à bouchon en téflon taré selon le cas afin de calculer le rendement.

2.2.3. Calcul de la teneur en matière sèche et du rendement en huile essentielle

La teneur en eau et en matières volatiles (ou humidité) relative, est déterminée selon la norme française NF V 03-909. Elle correspond à la perte de masse subie par l'échantillon après chauffage dans une étuve à 103 ± 2 °C jusqu'à poids constant. La teneur en eau et en matières volatiles est exprimée en pourcentage massique par la formule suivante :

$$\% \text{ Eau} = [(m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100] = (H) \text{ Où}$$

m_0 est la tare de la coupelle en g

m_1 est la masse de la coupelle et de la prise d'essai avant chauffage en g

m_2 est la masse de la coupelle et du résidu après chauffage jusqu'à poids constant en g

La teneur en eau et en matières volatiles peut-être exprimée aussi en pourcentage en masse, la teneur en matière sèche de l'échantillon, se déduit de la valeur de H :

$$\% \text{ Matière sèche} = 100 - H = [(m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \times 100]$$

Trois mesures ont été effectuées sur le même échantillon. Ensuite le rendement de chaque extraction est calculé.

2.2.4. Etude cinétique de l'extraction par hydrodistillation

Dans le but d'optimiser la durée d'extraction, nous avons étudié la cinétique du rendement en huile essentielle par rapport à la matière sèche pour chaque échantillon

2.2.5. Composition chimique des huiles essentielles

Une fois l'extrait le plus représentatif obtenu, l'analyse chimique permet d'identifier et de quantifier constituants chimiques qui le composent. La composition de chaque huile essentielle est déterminée par chromatographie en phase gazeuse à ionisation de flamme couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) à haute résolution (GCT Premier WATERS). La séparation chromatographique des composés volatiles a été effectuée sur colonne DB5-ms (prog : 70°C, 2 – 10°/min – 250°C).

L'identification des composés chimiques des huiles essentielles est réalisée à l'aide des indices de rétention calculés sur la base des n-alcane C₆-C₂₀, des spectres de masse obtenus en ionisation par impact électronique (EI, 70eV) comparées aux bases de données NIST (2008) et des données de la littérature (Mc Lafferty, 2005).

Le calcul de l'indice de rétention permet de s'affranchir de la variabilité des temps de rétention avec les conditions opératoires (Castello, 1999). Pour un composé donné, il ne dépend que de la phase stationnaire et non des conditions chromatographiques, ce qui a permis la publication de banques de données d'indices de rétention relatifs à différentes phases stationnaires (Adams, 2001). Le calcul s'appuie sur le principe suivant : lorsqu'on injecte un mélange de composés appartenant à une série homologue de n-alcane ou d'esters méthyliques linéaires, les temps de rétention croissent linéairement avec le nombre d'atomes de carbone (n) (alcane ou esters) correspondants. Initialement développé par Kovats en mode isotherme (Kovats, 1958), le calcul des indices de rétention a évolué pour tenir compte de la programmation de température. Ainsi, l'équation linéaire développée par Vandendool et Kratz (Vandendool *et al.*, 1962) est utilisée pour calculer les indices de rétention pour chaque composé analysés en programmation de température. La formule est basée sur les temps de rétention de deux alcane (à n et n + 1 atome de carbone) qui encadrent le composé inconnu (X) sur le chromatogramme :

$$IR_X = 100n + 100[(t_R(X) - t_R(n)) / (t_R(n+1) - t_R(n))]$$

2.2.6. Evaluation de l'activité anthelminthique des Huiles Essentielles

Les tests biologiques ont été réalisés sur *Strongyloides ratti* modèles d'étude des *Strongyloides stercoralis*. Le test d'Inhibition de la Migration Larvaire décrit par Rabel *et al.* (1994) et modifié par Jackson & Hoste (2010) puis le test d'inhibition de l'éclosion des œufs décrit par Coles *et al.* (1992) ont été utilisés pour évaluer l'**effet anthelminthique** des huiles essentielles des plantes

2.3. Résultats

2.3.1. Variabilité liée à des facteurs environnementaux sur la composition chimique de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes*

La présente étude a montré que, les deux plantes tropicales étudiées renferment des substances appartenant globalement aux mêmes familles de composés dans les différentes zones agro écologiques quelles que soient la saison et la zone de récolte. Les cardénolides, les dérivés cyanogénétiques, anthracéniques libres, les O- hétérosides et les hétérosides cardiotoniques ne sont pas présents dans la poudre des feuilles de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes*. Notons également que les mucilages sont présents dans la poudre de *Z. zanthoxyloïdes* et absents dans la poudre *N. laevis* alors que les dérivés quinoniques sont présents dans la poudre de *N. laevis* et absents dans la poudre de *Z. zanthoxyloïdes*.

2.3.2. Caractérisation physique et chimique des composés organiques volatiles et l'évaluation *in vitro* de l'activité anthelminthique des huiles essentielles de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes*.

L'huile essentielle des feuilles de *N. laevis* obtenue par hydrodistillation est un liquide limpide, de couleur jaune à tendance verte. Elle a une odeur caractéristique, forte et aldéhydée. Celle des graines de *Z. zanthoxyloïdes* est un liquide limpide, de couleur jaune à odeur caractéristique, fruitée.

Les rendements de l'hydrodistillation sont : $0,05 \pm 0,01$ % par rapport à la matière sèche pour la poudre de feuilles de *N. laevis* et $0,65 \pm 0,01$ % par rapport à la matière sèche pour *Z. zanthoxyloïdes*. Le rendement de l'hydrodistillation varie de manière significative selon l'origine de la plante et apparait relativement faible par rapport à ceux obtenus par d'autres auteurs (Orav *et al.*, 2001). L'intensité de la couleur dépend de la quantité de chamazulène présent dans l'extrait, ce dernier provient de la dégradation de la matricine durant l'hydrodistillation (Orav *et al.*, 2001). Figure 36 illustre la cinétique de l'extraction par hydrodistillation de la poudre de feuilles de *N. laevis* et celle des graines de *Z. zanthoxyloïdes*.

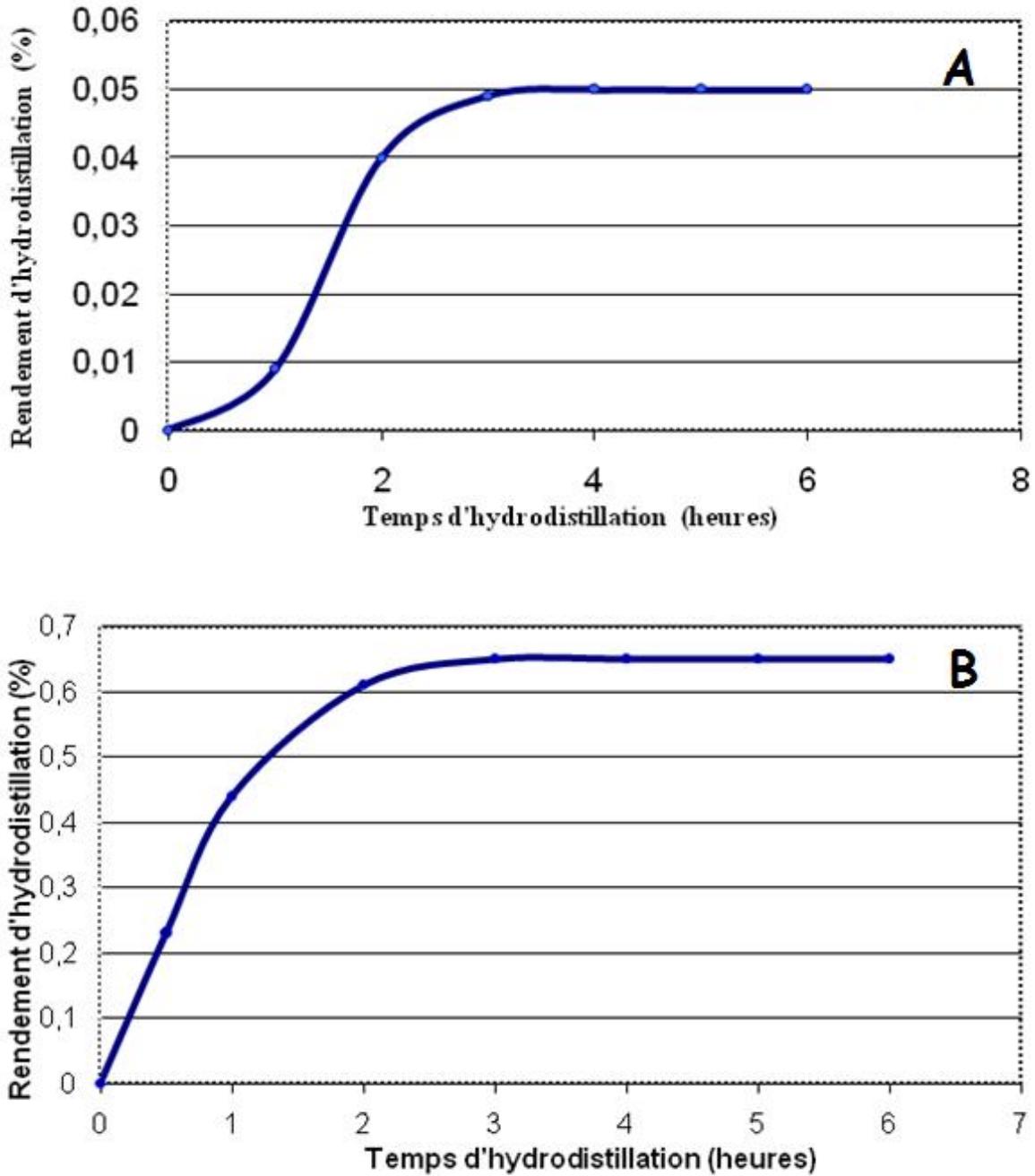


Figure 36 : Cinétique d'hydrodistillation : A : de la poudre de feuilles de *N. laevis* et B : de la poudre des graines de *Z. zanthoxyloides* en fonction du temps

La vitesse d'extraction augmente progressivement jusqu'à 3h pour atteindre un plateau. Le temps optimum de ces hydrodistillations est d'environ chacune de 3h. Ce qui est en accord avec les travaux d'hydrodistillation de Chaker (2010).

L'huile essentielle de feuilles de *N. laevis* est un mélange complexe de 51 composés, parmi eux 41 composés ont été identifiés soit 81% de la quantité totale de l'huile essentielle. La fraction de sesquiterpène (1 α -caryophyllène (36,08 %) et γ -caryophyllène (3,17%) sont les constituants majeurs de l'huile essentielle, puis viennent les composés aromatiques, comme l'eugénol (5.76 %) (figure 37). Dans cette huile nous n'avons pas pu identifier un composé ($C_{16}H_{26}O$) qui à lui seul, constitue 6.56 % n'a pu être identifié. Les structures chimiques de quelques composés majoritaire de l'HE est représentée dans la figure 37.

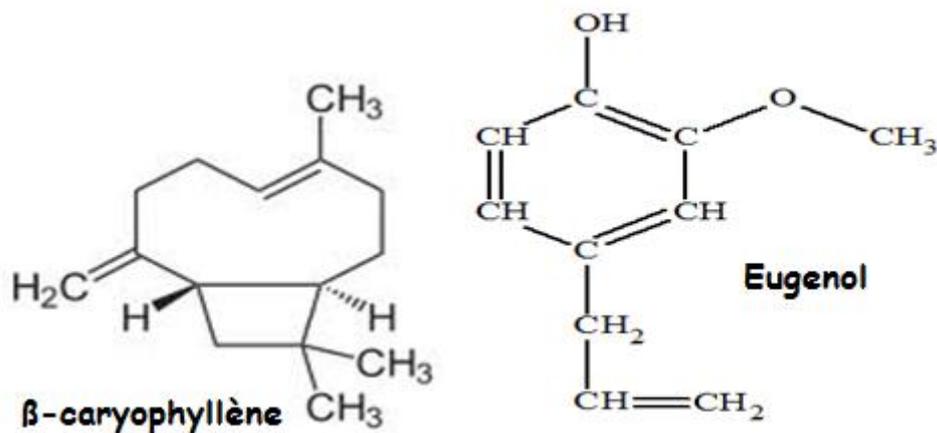


Figure 37: Structures chimiques des composés majoritaires de l'huile essentielle de *N. laevis*

31 composés volatiles (COVs) ont été détectés dont 27 ont été identifiés dans l'huile essentielle de graines de *Z. zanthoxyloïdes*, correspondant à 86% de l'extrait. Les composés majoritaires de l'huile essentielle sont : le γ -terpinène (18,01%), l'undecane (14,84 %), le Valencène (8,31 %), le decanal (8,3 %) et le 3-carene (6,7 %). La structure chimique de quelques composés majoritaires de l'huile essentielle de graines de *Z. zanthoxyloïdes* est représentée dans la figure (figure 38).

La figure 39 illustre les chromatogrammes des huiles essentielles obtenues avec la colonne DB5-ms

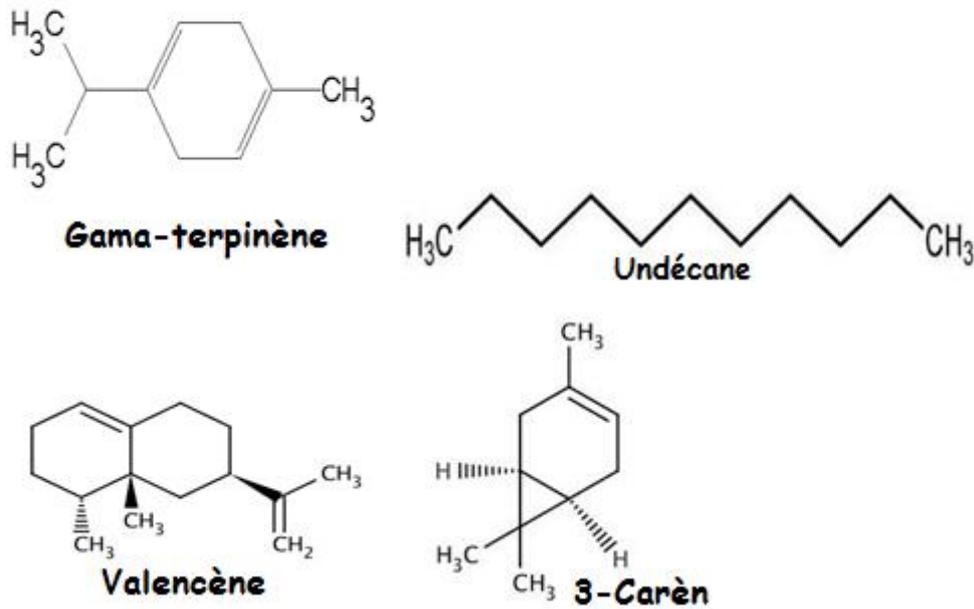
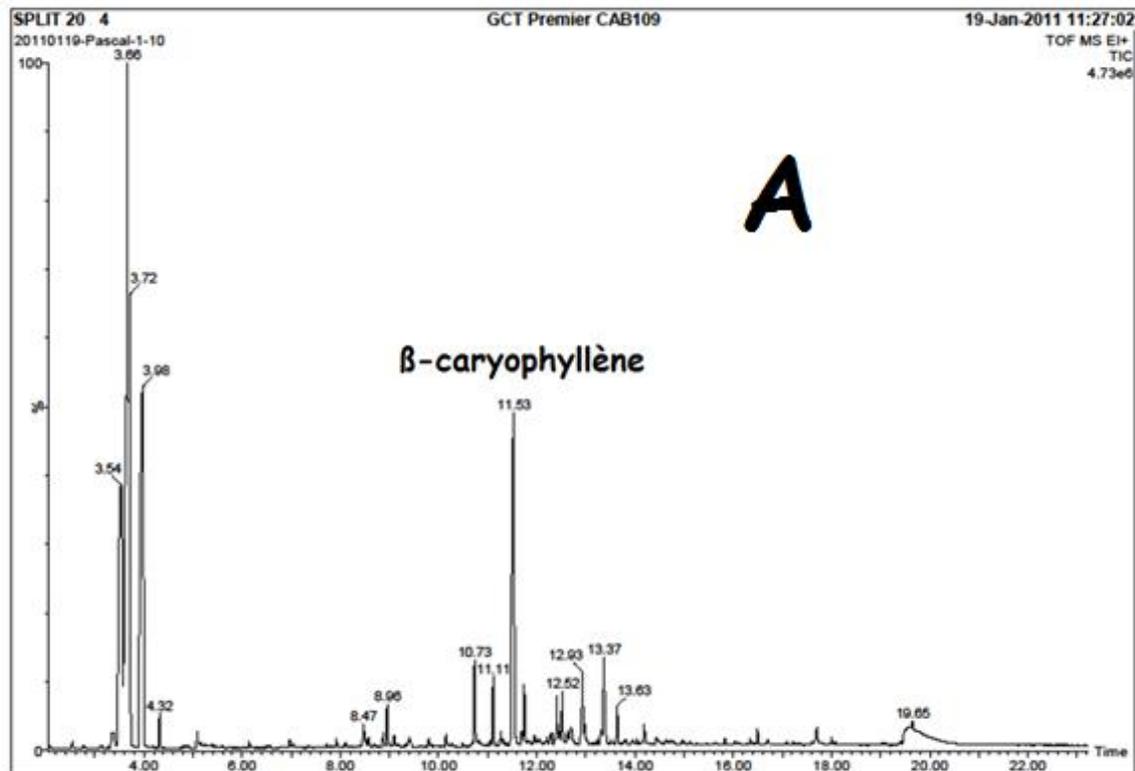


Figure 38 :Structures chimiques des composés majoritaires de l'huile essentielle de graines de *Z. zanthoxyloïdes*



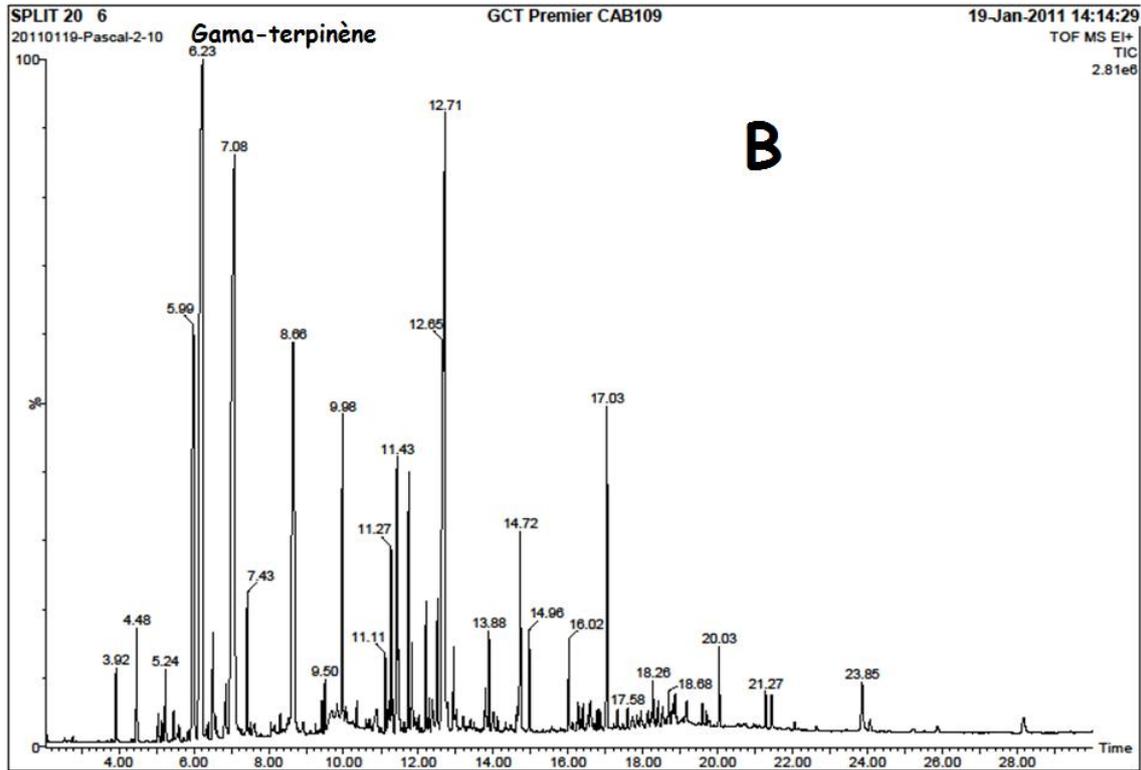


Figure 39 : Chromatogrammes : A. Huile essentielle de feuilles de *N. laevis* (DB5-ms) B. Huile essentielle des graines de *Z. zanthoxyloides* (DB5-ms)

Les huiles essentielles des deux plantes étudiées inhibent *in vitro* l'éclosion des œufs et la migration larvaire de *Strongyloides ratti* de façon dose dépendante.

Article 2: *In vitro* anthelmintic activity of the essential oils of *Zanthoxylum zanthoxyloides* and *Newbouldia laevis* against *Strongyloides ratti*.

Online Parasitology Research : DOI 10.1007/s00436-011-2645-4

AUTHOR'S PROOF!

JrnlID 436_ArtID 2645_Proof# 1 - 13/09/2011

Parasitol Res
DOI 10.1007/s00436-011-2645-4

ORIGINAL PAPER

In vitro anthelmintic activity of the essential oils of *Zanthoxylum zanthoxyloides* and *Newbouldia laevis* against *Strongyloides ratti*

P. A. Olounladé · E. V. B. Azando · M. S. Hounzangbé-Adoté · T. B. Tam Ha · E. Leroy · C. Moulis · N. Fabre · J. F. Magnaval · H. Hoste · A. Valentin

Received: 1 July 2011 / Accepted: 7 September 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract The need for new anthelmintic with no chemical residues is becoming urgent. In a program aiming at the evaluation of plant as sources of new active molecules, the anthelmintic activities of the essential oils (EOs) obtained from either *Zanthoxylum zanthoxyloides* seeds or *Newbouldia laevis* leaves were evaluated against *Strongyloides ratti* by analyzing the results of two *in vitro* bioassays. These two plants and their tested parts were retained after an ethnopharmacol-

ogy survey that confirmed their use by small-scale farmers for treatment of small ruminants affected by digestive helminths. The plants were harvested in Benin, and their EO were obtained by hydrodistillation. The EO yield of extraction was 0.65% (w/w) of for *Z. zanthoxyloides* seeds and 0.05% (w/w) for *N. laevis*. The chemical compositions of the two EOs were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The major constituents of the EO from *Z. zanthoxyloides* consisted of the following compounds: γ -terpinene (18 %), undecane (15 %), valencene (8.3 %), decanal (8.3 %), and 3-carene (6.7 %). In contrast, the major constituents of the EO from *N. laevis* leaves consisted of the following compounds: β -caryophyllene (36 %) and eugenol (5.8 %). An egg-hatching inhibition (EHI) assay was developed and a larval migration inhibition assay was used on *S. ratti* to examine the effects of the EOs and to evidence their inhibitory concentrations (IC₅₀ and IC₉₀) values on this nematode. Furthermore, the toxicity of the two EOs on Vero cell line was evaluated. When tested on *S. ratti* egg hatching, the two EOs resulted in similar IC₅₀ values (19.5 and 18.2 μ g/ml for *Z. zanthoxyloides* and *N. laevis*, respectively), which were about sevenfold higher than that of the control (thiabendazole, IC₅₀=2.5 μ g/ml). Larval migration was inhibited at similar concentrations for: *Z. zanthoxyloides* (IC₅₀=46 μ g/ml), *N. laevis* (IC₅₀=51 μ g/ml), and the control [levamisole (IC₅₀=36 μ g/ml)]. No cytotoxicity was found on Vero cells because both EOs had IC₅₀ values were higher than 50 μ g/ml. Therefore, we have concluded that the EOs from two plants, used in folk medicine, may contain compounds with anthelmintic activity and could be used as improved traditional medicines or, at least, as food additives in a combined treatment for the control of helminth infections.

P. A. Olounladé · E. V. B. Azando · M. S. Hounzangbé-Adoté
Laboratoire d'Ethnopharmacologie et de Santé Animale,
Faculté des Sciences Agronomiques,
Université d'Abomey-Calavi,
01 BP 526 Cotonou-Bénin, France

T. B. T. Ha · C. Moulis · N. Fabre · A. Valentin (✉)
Laboratoire de Pharmacognosie,
Pharma-Dev-UMR 152/Faculté de Pharmacie,
Université de Toulouse III,
35 Chemin des Maraichers,
31062 Toulouse, Cedex, France
e-mail: valentin@cict.fr

H. Hoste
INRA, ENVT, UMR 1225,
Université de Toulouse Interactions Hôte Agents Pathogène,
23, Chemin des Capelles,
31076 Toulouse, France

J. F. Magnaval
Service de Parasitologie-Mycologie,
Centre Hospitalier Universitaire Rangueil,
31403 Toulouse, Cedex 4, France

E. Leroy
CNRS, FR2599, Institut de Chimie de Toulouse,
31062 Toulouse, Cedex 09, France

Springer

55 **Introduction**

56 Parasitic nematodes of the gastrointestinal (GI) tract remain
 57 a major threat to both human beings and livestock. Overall,
 58 the number of people infected by soil-transmitted helminths
 59 is estimated to be over 1 billion, and infected people show
 60 symptoms of impaired health and cognition (Bethony et al.
 61 2006). Among helminth parasites, *Strongyloides stercoralis*
 62 is encountered in 30–100 million people, and the disease
 63 caused by this organism, strongyloidiasis, remains an
 64 important health problem in developing countries (Bethony
 65 et al. 2006). In tropical countries, nematode parasitism
 66 impairs health in livestock, causing a loss in production
 67 and, in severe cases, the death of infected animals
 68 (Bizimenyera et al. 2006).

69 Synthetic anthelmintics (AHs) have been used through-
 70 out the world for decades to control and minimize the
 71 losses caused by GI nematode infections; however, the use
 72 of these drugs has resulted in drug-resistant worm livestock
 73 populations (Wolstenholme et al. 2004). For GI nematodes
 74 of veterinary importance, AH drug resistance is becoming a
 75 major practical problem in many countries and could
 76 become a public health problem (Ademola et al. 2007;
 77 Geerts and Gryseels, 2000). Parasite resistance to AHs in
 78 livestock (particularly ruminants) is widespread, and this
 79 resistance provokes reduced production efficiency. Addi-
 80 tionally, synthetic AHs are expensive for small sheep and
 81 goat farmers in developing countries. Therefore, a strong
 82 impetus for researchers to develop alternative control
 83 methods, such as the use of traditional medicinal plants
 84 (Alonso-Díaz et al. 2008; Hoste et al. 2008), has recently
 85 been promoted.

86 Ethnopharmacological surveys and the proper evaluation
 87 of medicinal plants could reveal bioactive compounds that
 88 may be sustainable, affordable locally, and environmentally
 89 acceptable. These plants could also be used as improved
 90 traditional medicines (ITMs), either in medical or veteri-
 91 nary sciences, which could lead to the valorization of local
 92 productions and to less expensive treatments, compared
 93 with classic anthelmintic drugs (Willcox 2011). Moreover,
 94 in developing countries, the use of medicinal plants allows
 95 to reduce importation of commercial drugs, thus boosting
 96 economic self-reliance. There has been, recently, a resur-
 97 gence of interest in the evaluation of potential applications
 98 of plant extracts for medicinal use (Ademola et al. 2007).

99 Antiparasitic activities of *Zanthoxylum zanthoxyloides*
 100 and *Newbouldia laevis* have been reported either on blood
 101 parasites (*Plasmodium falciparum* or *Leishmania major*;
 102 Ahua et al., 2007; Kassim et al. 2009) or on gastrointestinal
 103 nematodes (Hounzangbé-Adote et al. 2005a, b). Thus, these
 104 two plants seem to be promising sources of traditional
 105 therapy against parasites or as sources of potentially active
 106 antiparasitic components.

We present, in this work, the composition and activities
 of the essential oils (EOs) distilled from *Z. zanthoxyloides*
 seeds and *N. laevis* leaves. For *Z. zanthoxyloides*, we
 decided to obtain the EO from the seeds because wide-
 spread use of the leaves in traditional pharmacopeia could
 lead to a decrease in the natural resources, and importantly,
 seed harvesting does not endanger the available quantities
 of the plant. We tested the anthelmintic activities of these
 two EOs on the egg hatching and larval motility of
Strongyloides ratti, a parasitic nematode of rats. The use
 of this laboratory model (*S. ratti*) allowed for an easy
 source of nematodes (larvae and eggs) and limited the size
 of the animal facilities. The use of *S. ratti* as a model could
 serve as an approach for evaluating plant extracts that are
 potentially useful for circumventing human helminth
 infection (Smout et al. 2010). In our model, the two EOs
 that were tested had efficiency close to that of the positive
 control molecules: thiabendazole and levamisole.

Materials and methods

Plants

Z. zanthoxyloides (Lam.) B. Zepernick & Timler (syn.
Fagara zanthoxyloides Lam.) (Rutaceae) seeds and *N.*
laevis (P. Beauv.) (syn. *Spathodea laevis*) (Bignoniaceae)
 leaves were collected from a natural grown shrub near the
 University of Abomey-Calavi and from the department
 (administrative subdivision) of l'Oueme (Benin), respec-
 tively. These two plants were chosen among others on the
 basis of a questionnaire survey leaded in Benin, which
 indicated that they were frequently used by small-scale
 farmers against parasitic infections or to treat associated
 clinical symptoms (Hounzangbé-Adote 2000). The speci-
 mens were identified in the "Herbier National" of Abomey-
 Calavi University under the numbers AA 6301/HNB
 (*Z. zanthoxyloides*) and AA 6302/HNB (*N. laevis*), where
 voucher specimens were also deposited. Plant material was
 dried, safe from sunlight, at room temperature, and then
 reduced to powder.

Extraction and analysis of the EOs

Dried leaves of *N. laevis* and seeds of *Z. zanthoxyloides*
 were hydrodistilled for 4 h with a Clevenger-type appar-
 atus. The amounts of the contents of each sample were
 calculated as percentages of the dry weight of the plant
 material. The EO compositions were analyzed on a
 Hewlett-Packard 6890 gas chromatography/mass spectrom-
 etry GC/MS system equipped with an autosampler and a
 DB-5 MS column (Agilent, 30 m×0.25 mm i.d., 0.25 µm
 film thickness). The oven temperature program was as

154	follows: 70°C held for 2 min then 70–250°C at 10°C/min.	203
155	Samples were prepared as follows: 1:10 in hexane, 1 ml;	204
156	with a split ratio of 1:20. The carrier gas, Helium, was kept	205
157	on constant flow mode. Mass spectrometer parameters were	206
158	as follows: interface and source temperature 250 and 180°C,	207
159	respectively; ionization mode, EI with an applied voltage	208
160	of 0.98 kV; and an acquisition mass range of 30–650 m/z	209
161	with a scan interval of 0.25 s. Data handling was supported	210
162	by the software GC/MS solution. The compounds present	211
163	in each EO were identified by comparing their MS spectra	212
164	and relative indices (RIs) to the current literature and MS	213
165	databases (Kondjoyan and Berdagué 1996), Adams' Li-	
166	brary (Adams 2007; Kobaisy et al. 2002) and NIST 08	
167	database Mass spectral Library (NIST 2008). The relative	
168	amount of each component was calculated by comparing its	
169	average peak area to the total area. The software adopted	
170	to handle mass spectra and chromatograms was a MAS-	
171	SLYNX Version 4.1.	
172	In vitro anthelmintic assays	
173	Three-week-old Wistar male rats (each weighing about 40 g)	
174	were experimentally infected by a subcutaneous injection in	
175	the nape of the neck, with an aqueous suspension of 1,300 <i>S.</i>	
176	<i>ratti</i> third stage larvae (L ₃). The anthelmintic efficacy of the	
177	EO from <i>N. laevis</i> was then evaluated on the eggs and larvae	
178	of <i>S. ratti</i> , which had been obtained from the feces of the	
179	rats. Any procedure involving animals conformed to Euro-	
180	pean regulations (EEC directive 86/609, dated 24 November	
181	1986). All experiments involving animals were carried out in	
182	the animal room of the Parasitology Department of the	
183	University Hospital Center (Toulouse, France).	
184	Egg-hatching inhibition assay	
185	In this study, an egg-hatching assay (EHA) to assess	
186	anthelmintic resistance was modified (Coles et al. 1992;	
187	Assis et al. 2003). Briefly, eggs were obtained from feces of	
188	infected Wistar rats, according to the method described by	
189	Hubert and Kerboeuf (1984). The feces were crushed in	
190	water, and after successive siftings, using 250, 125 and	
191	40 µm sieves, the eggs were collected and centrifuged	
192	(5 min, 3,500×g). The supernatant was removed, and a	
193	NaCl solution (350 g/l) was added. After homogenization,	
194	the mixture was centrifuged (5 min, 3,500×g), and floating	
195	eggs were extracted by pouring the supernatant onto a	
196	40 µm sieve and subsequently washing with water.	
197	The egg suspension was then distributed into 96-multiwell	
198	plates at a final concentration of 100 eggs/well into a total of	
199	200 µl of solution. Increasing twofold concentrations (7.5, 15,	
200	30, 60, or 120 µg/ml) of EOs in 0.15 M phosphate buffered	
201	saline (PBS, pH 7.2) were added to the wells, and each	
202	concentration was tested on four replicates. Positive (thiaben-	
	dazole at concentrations from 0.2 to 25 µg/ml) and negative	203
	controls (eggs with PBS alone) were also included.	204
	After incubation (for 48 h at 23°C), egg hatching was	205
	stopped by adding a formaldehyde solution (10% in PBS).	206
	Thereafter, the number of L ₁ larvae and eggs present per	207
	well were evaluated by counting 200 µl aliquots from each	208
	well, and the hatching percentage was determined by	209
	calculating the following ratio: [number of L ₁ larvae/	210
	(number of eggs+number of L ₁)]. Additionally, a mean	211
	value of three independent experiments was calculated for	212
	each EO concentration.	213
	LMI assay	214
	The LMI assay was adapted for plant extracts (Jackson and	215
	Hoste 2010). To measure the inhibitory activity of the EOs	216
	against infective larvae, <i>Sratti</i> L ₃ larvae were first obtained	217
	by fecal culture. After egg hatching, the L ₃ stage was	218
	reached within 7 days. The L ₃ larvae were collected by	219
	sedimentation using Baermann's devices and incubated for	220
	3 h at 20°C in PBS solutions of EO (7.5, 15, 30, 60 or	221
	120 µg/ml). Measurements were performed by triplicates for	222
	each concentration and tested. The larvae were then washed	223
	three times in PBS and centrifuged. After the last wash, 800 µl	224
	of larval suspension at a concentration of 1,000 L ₃ /ml was	225
	deposited onto a 20 µm mesh filter. The sieve was inserted	226
	into a conical tube and allowed to skim the surface of the	227
	PBS solution contained therein. Three replicates were run at	228
	room temperature (23°C) for each EO concentration.	229
	Negative (larvae incubated in PBS) and positive (larvae	230
	incubated with levamisole at twofold concentrations ranging	231
	from 31.25 to 250 µg/ml) controls were added. After 3 h, the	232
	L ₃ larvae above the sieve were discarded and those that had	233
	actively migrated through the mesh into the PBS below were	234
	counted using an optical microscope at 40× magnification,	235
	based on a 10% aliquot technique. The percentage of LMI	236
	was calculated as [(T-MYT X 100)], where T is the total	237
	number of L ₃ deposited in the sieve and M the number of L ₃	238
	that migrated through the mesh into PBS.	239
	Cytotoxicity	240
	Cytotoxicity was estimated on Vero cell lines as previously	241
	described (Cachet et al. 2009). Briefly, cells were seeded	242
	(10 ⁴ cells/well in 200 µl of RPMI (Cambrex, Belgium), 5%	243
	SVF (Cambrex)) and left overnight (37°C, 5% CO ₂) to	244
	adhere. The wells were then washed and increasing	245
	concentrations (ranging from 0.001 µg/ml to 100 µg/ml)	246
	of the EO were added (in triplicate) into the wells. Growth	247
	inhibition of the cells was followed by [³ H]-Hypoxanthine	248
	incorporation into the cells and their IC ₅₀ was determined	249
	graphically by plotting inhibition versus concentration	250
	(Cachet et al. 2009).	251

252 Statistical analysis
 253 Graphical representations and statistical analyses were per-
 254 formed by sigmoidal, non-linear regression of the
 255 concentration-response curves using the computer program
 256 Graph Pad Prism 5.0. For egg-hatching inhibition experiments,
 257 data were expressed as the means±S.E.M. of the mean (in 3
 258 independent experiments) of the quadruplicates after an
 259 ANOVA that exhibited no significant differences between the
 260 results of the three experiments. For the LMI assay, data were

t1.1 **Table 1** Composition of the essential oil from the seeds of *Zanthoxylum zanthoxyloides*

t1.2	Component	RI ^a	RI ^b	RC ^c (%)
t1.3	Nonane	900	900	0.55
t1.4	α-Pinene	937	937	0.89
t1.5	β-Pinene	989	983	0.49
t1.6	α-Phellandrene	1,003	1,004	0.32
t1.7	3-Carene	1,034	1,031	6.72
t1.8	γ-Terpinene	1,052	1,054	18.01
t1.9	Undecane	1,100	1,100	14.84
t1.10	1,3-Cyclohexadiene, 1,3,5,5-tetramethyl- ^d	1,129	–	1.21
t1.11	Decanal	1,207	1,206	8.30
t1.12	3,5-Dimethoxytoluene	1,268	1,260	0.30
t1.13	Tridecane	1,300	1,300	3.62
t1.14	α-Copaene	1,383	1,382	0.53
t1.15	1-β-Elementene	1,395	1,395	1.41
t1.16	n-Decyl acetate	1,407	1,408	3.50
t1.17	γ-Caryophyllene	1,431	1,428	2.10
t1.18	α-Bergamotene	1,438	1,437	0.66
t1.19	Ishwarane	1,467	1,467	0.93
t1.20	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1α,4α,8α)-	1,491	1,489	1.33
t1.21	Pentadecane	1,500	1,500	4.48
t1.22	Valencene	1,507	1,502	8.31
t1.23	δ-Cadinene	1,525	1,524	0.62
t1.24	Caryophyllene oxide	1,595	1,595	0.48
t1.25	Curzerenone	1,603	1,606	0.73
t1.26	8-Heptadecene	1,676	1,676	1.96
t1.27	Heptadecane	1,700	1,700	0.78
t1.28	C ₁₇ H ₂₈ ^d	1,794	–	0.69
t1.29	2,6,11,15-Tetramethyl-hexadeca-2,6,8,10,14-pentaene ^e	1,890	–	2.46

^a Experimental relative retention indices

^b Theoretical relative retention indices

^c Relative concentration (%)

^d Unidentified component (C₁₁H₂₈, MW=232). MS (EI): 232 (39%), 133 (20%), 119 (24%), 105 (52%), 94 (69%), 91 (100%), 79 (97%), 77 (37%), 67 (23%), and 55 (28 %)

^e The indication of theoretical retention is not available in the literature

Table 2 Composition of the leaf essential oil of *Newbouldia laevis*

Component	RI ^a	RI ^b	RC ^c (%)	t2.2
Cumene	926	927	1.47	t2.3
Propylbenzene	955	955	0.10	t2.4
1,2,3-Trimethylbenzene	962	962	0.14	t2.5
Benzaldehyde	966	966	0.17	t2.6
1-Octen-3-ol	978	979	1.13	t2.7
2-Pentylfuran	990	990	0.64	t2.8
(E)-2-(2-pentenyl)furan	999	1,002	0.42	t2.9
2,4-Heptadienal (E,E)	1,012	1,009	0.12	t2.10
2,6,6-Trimethylcyclohexanone	1,039	1,036	Tr	t2.11
Benzeneacetaldehyde	1,047	1,051	0.38	t2.12
4-Methyl-benzaldehyde	1,073	1,076	0.23	t2.13
Acetophenone	1,082	1,086	Tr	t2.14
Linalol	1,099	1,099	0.56	t2.15
n-Nonanal	1,115	1,117	0.14	t2.16
α-Cylocitral	1,123	1,119	0.15	t2.17
m-Xylenol	1,149	1,150	0.32	t2.18
iso-Menthone	1,161	1,163	0.56	t2.19
Ethylbenzoate	1,173	1,173	0.34	t2.20
Methylsalicylate	1,197	1,198	1.80	t2.21
Safranal	1,204	1,202	0.58	t2.22
Thymol methyl ether	1,230	1,230	2.25	t2.23
Isothymol methyl ether	1,240	1,244	0.68	t2.24
Ionene	1,261	1,266	0.99	t2.25
Bomyl acetate	1,288	1,289	0.51	t2.26
2-Methoxy-4-vinylphenol	1,313	1,312	0.89	t2.27
1,1,5,6-Tetramethylindane	1,322	1,311	0.33	t2.28
Eugenol	1,355	1,355	5.76	t2.29
(E)-β-damascenone	1,383	1,385	3.73	t2.30
β-Elementene	1,395	1,392	1.01	t2.31
β-Caryophyllene	1,415	1,415	36.08	t2.32
γ-Caryophyllene	1,431	1,428	3.17	t2.33
Nerylacetone	1,447	1,445	0.57	t2.34
β-Ionone	1,483	1,486	2.93	t2.35
n-Germacrene	1,491	1,489	3.00	t2.36
β-Selinene	1,500	1,496	1.01	t2.37
Cubene	1,525	1,525	4.64	t2.38
C ₁₆ H ₂₆ O ^d	1,561	–	6.56	t2.39
Megastigmatrienone I	1,572	1,568	0.35	t2.40
Megastigmatrienone II	1,582	1,585	2.06	t2.41
Megastigmatrienone III	1,617	1,620	0.37	t2.42
Megastigmatrienone IV	1,630	1,633	1.18	t2.43

Tr Trace (<0.1%)

^a Experimental relative retention indices

^b Theoretical relative retention indices

^c Relative concentration (%)

^d Unidentified component (C₁₆H₂₆O^c, MW=234). MS (EI): 234 (7%), 202 (53%), 187(28%), 159 (100%), 145 (71%), 131 (31%), 115 (21%), 105 (23%), 91 (41%), and 77 (22%)

261 presented as the means±S.E.M. of triplicates (corresponding to
 262 each dose tested). For cytotoxicity, the results were expressed
 263 as the mean of three independent experiments. Lastly, the IC₅₀
 264 of each sample was determined by graphic interpolation with
 265 specialized software ([http://www.antimalarial-icestimator.net/
 266 runregression1.2.htm](http://www.antimalarial-icestimator.net/runregression1.2.htm)).

267 **Results**

268 **Phytochemistry**

269 The hydrodistillation provided 0.65% (w/w) of essential oil
 270 from *Z. zanthoxyloides* seeds and 0.05% (w/w) of essential
 271 oil from *N. laevis* leaves. The name, molecular weight and
 272 structure of each component of the tested materials were
 273 then ascertained. Approximately 85% of the components
 274 were identified in the essential oil of the seeds of *Z.
 275 zanthoxyloides* (Table 1), and approximately 85% of the
 276 components were identified in the essential oil of the leaves
 277 of *N. laevis* (Table 2).

278 The EO of *Z. zanthoxyloides* seeds presented 27 compo-
 279 nents and the main constituents were as follows: γ-terpinene
 280 (18%), undecane (15%), valencene (8.3%), decanal (8.3%)
 281 and 3-carene (6.8%). The other components were relatively
 282 less abundant (Table 1). Finally, in the EO of *Z. zanthox-
 283 yloides* seeds, numerous minor components were encoun-
 284 tered, including an unidentified compound (C₁₇H₂₈; 0.69%).

285 The EO of *N. laevis* leaves contained 41 components,
 286 and its main constituents were β-caryophyllene (36%) and
 287 eugenol (5.8%). Additionally, an unidentified compound
 288 (C₁₆H₂₆O) was relatively abundant (6.6%; Table 2).

289 **Biological activities**

290 A clear dose-effect curve was obtained for the 2 EOs in the
 291 range of concentrations tested for the inhibition of egg hatching

Table 3 In vitro anthelmintic activities based on egg hatching and larval migration inhibition assays for the two essential oils of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides*

Egg hatching	Thiabendazole	<i>Z. zanthoxyloides</i>	<i>N. laevis</i>
IC ₅₀	2.5±0.2	18.2±0.5	19.5±0.8
IC ₉₀	9.7±0.2	29.1±0.6	37.9±1.0
Larval migration	Levamisole	<i>Z. zanthoxyloides</i>	<i>N. laevis</i>
IC ₅₀	36.0±3.1	46.6±8.5	51.7±7.7
IC ₉₀	162.5±3.8	165.1±10.5	145±9.6

(Fig. 1). The IC₅₀ and IC₉₀ values of thiabendazole, used as a control in the egg-hatching test, were 2.5 and 9.7 µg/ml, respectively. These values were approximately sixfold to sevenfold lower than the IC₅₀ and threefold to fourfold lower than the IC₉₀ of the EOs (Table 3). Such a difference could be due to only a few of the components being active during the biological test. The long incubation time which was necessary to inhibit egg hatching could have also allowed some EO compounds to evaporate. However, when comparing the IC₉₀ values, the difference between thiabendazole and the two EOs clearly diminished (Table 3, Fig. 1).

When evaluated by the LMI assay, the EOs were as efficient as the positive control (levamisole; Table 3). A clear dose-effect curve was, here again, obtained in the range of concentrations tested. The calculated IC₅₀ values of each of the EOs were twofold lower than that of the control (Fig. 2); however, the IC₉₀ of the EO from *Z. zanthoxyloides* and of levamisole were similar, and both were slightly better than that of *N. laevis* (145±9.6 vs. 162±3.8 µg/ml, respectively). Thus, the compounds contained in these EO samples were as efficient as levamisole for the inhibition of larval mobility (Table 3, Fig. 2).

No cytotoxicity was observed for the two EOs on Vero cells lines. In that model, the IC₅₀ values were 82 and >100 µg/ml for the *Z. zanthoxyloides* EO and *N. laevis* EOs, respectively (100 µg/ml being the highest concentration tested during three independent experiments).

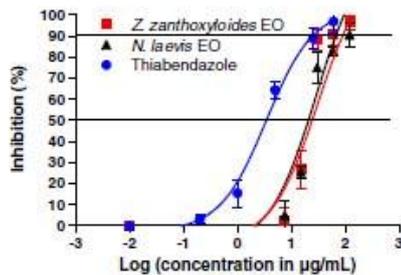


Fig. 1 Inhibition of egg hatching by the EOs of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides*. The two EOs had similar IC₅₀ values; however, thiabendazole (used as control) was more efficient. The IC₉₀ values were similar for all three compounds

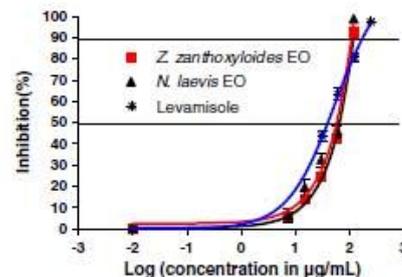


Fig. 2 Larval migration inhibition (LMI) by the EOs of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides*. LMI curves were similar for the two EOs and the control

319 **Discussion**

320 Helminth infections constitute serious health problems world-
 321 wide both in human beings and in animals. The human
 322 intestinal helminths are the most common infectious diseases
 323 in the developing world (Bethony et al. 2006). The hard
 324 affordability of commercially available anthelmintic agents in
 325 developing countries, and the risks represented by anthelmintic
 326 agent or by anthelmintic secondary metabolites in food
 327 derived from livestock which have recently been reported as a
 328 threat for human health (Cabaret 2008) reinforced the need
 329 for safe and cheap anthelmintic agents derived from plants
 330 (Fred-Jaiyesimi et al. 2011). Furthermore, the need to
 331 investigate and identify natural substances with anthelmintic
 332 activity is huge, because the molecules currently used for the
 333 control of helminths have group-restricted activity, they are
 334 expensive, and most of them lose their efficiency after one or
 335 two decades (Mehlhorn et al. 2010).

336 The purpose of the present study was to establish the
 337 effect of the EOs distilled from *Z. zanthoxyloides* seeds and
 338 *N. laevis* leaves on the egg hatching and larval motility of
 339 *S. ratti*. To our knowledge, it is the first time the EOs of *Z.*
 340 *zanthoxyloides* and *N. laevis* were analyzed and tested for
 341 anthelmintic activity. Despite the low yield of extraction,
 342 EOs are interesting as ITMs because they are quite easy to
 343 produce with easy to manage apparatus. The composition
 344 of the EO from *Z. zanthoxyloides* seeds was quite different
 345 from that of the EO of *Z. zanthoxyloides* leaves collected in
 346 Monteverde, Costa Rica (Setzer et al. 2005) or seeds from
 347 Cameroon (Ngassoum et al. 2003). We may thus consider
 348 the existence of many chemotypes, depending on the
 349 geographical localization and on the part of the plant that
 350 was distilled. Even if their chemical composition varies,
 351 EOs have been considered potentially promising compounds
 352 for the treatment of numerous parasitic diseases
 353 either due to protozoa (Benoit-Vical et al. 1999; Ahua et al.
 354 2007), cestodes (Maggiore et al. 2011), or nematodes
 355 (Bizimenyera et al. 2006; Macedo et al. 2010). The
 356 anthelmintic activity of *Z. zanthoxyloides* and *N. laevis*
 357 has previously been reported, but this effect was mainly
 358 linked to the tannins present in the samples (Hounzangbé-
 359 Adote et al. 2005a, b). Because no tannins are present in
 360 EOs, it can be thought that these plants act against
 361 nematodes by altering different targets, reinforcing the
 362 justification of their traditional use.

363 The observed effects on egg hatching and larval motility
 364 inhibition do not imply that the EOs will have an effect on
 365 adult worms. Hence, a conclusive response to that point can
 366 only be made following an appropriate in vivo study (von
 367 Samson-Himmelstjerna et al. 2000). However, the anthelmintic
 368 activity demonstrated here could be applicable to other
 369 helminth species because *Z. zanthoxyloides* and *N.*
 370 *laevis* are known to have such efficiency on *Haemonchus*

371 *contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* (Hounzangbé-
 372 Adote et al. 2005a, b). We have used *S. ratti* for these assays
 373 because it is considered to be a good model for the screening
 374 of anthelmintic activity (Smout et al. 2010). This model
 375 could help in limiting the size of the animal facility that is
 376 needed for a first screening of the activity of potential
 377 anthelmintic compounds. The cytotoxicity of the EO was
 378 tested against Vero cells; the values obtained were clearly
 379 very low and could allow for the planning of further in vivo
 380 tests. This potentially low toxicity is frequently encountered
 381 for the EO and that reinforce their potential use, in
 382 association with other anthelmintic drugs or, at least, as food
 383 additives as it has been proposed for cattle and small
 384 ruminants (Benchaar et al. 2006; Mehlhorn et al. 2010).

385 The traditional use of *Z. zanthoxyloides* and *N. laevis*
 386 against digestive disorders can be supported by their
 387 activities against nematodes. We can conclude, according
 388 to the results presented in this study, that a part of this
 389 activity may be due to some components of their EO. The
 390 EOs tested in this study must now to be fractionated and,
 391 at least for their major compounds, must be tested on a similar
 392 model before they are utilized in the fields.

393 **Acknowledgments** This work was supported by the CORUS project
 394 no. 6040. Mr. A.P. Olounlade acknowledges receiving a scholarship
 395 from AUF to undergo his PhD studies. Mr. E.V. Azando is a grateful
 396 recipient of a grant provided from ARHES.

399 **References**

- 400 Adams RP (ed) (2007) Identification of essential oils components by
 401 gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, 4th edn.
 402 Allured Publishing, Carol Stream, IL
 403 Ademola IO, Fagbemi BO, Idowu SO (2007) Anthelmintic activity of
 404 *Spigelia anthermia* extract against gastrointestinal nematodes of
 405 sheep. Parasitol Res 101:63–69
 406 Ahua KM, Ioset JR, Ioset KN, Diallo D, Mauel J, Hostettmann K
 407 (2007) Antileishmanial activities associated with plants used in
 408 the Malian traditional medicine. J Ethnopharmacol 110:99–104
 409 Alonso-Diaz MA, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA, Capetillo-
 410 Leal C, Brunet S, Hoste H (2008) Effects of four tropical
 411 tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration
 412 and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis*
 413 infective stage. Vet Parasitol 153:187–192
 414 Assis LM, Bevilacqua CM, Morais SM, Vieira LS, Costa CT, Souza JA
 415 (2003) Ovicidal and larvicidal activity in vitro of *Spigelia anthermia*
 416 Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. Vet Parasitol 117:43–49
 417 Benchaar C, Petit HV, Berthiaume R, Whyte TD, Chouinard PY
 418 (2006) Effects of addition of essential oils and monensin premix
 419 on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk
 420 composition in dairy cows. J Dairy Sci 89:4352–4364
 421 Benoit-Vical F, Valentin A, Mallié M, Bastide JM, Bessiere JM (1999)
 422 In vitro antimalarial activity and cytotoxicity of *Cochlospermum*
 423 *tinctorium* and *C. planchonii* leaf extracts and essential oils.
 424 Planta Med 65:378–381
 425 Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert
 426 D, Hotez PJ (2006) Soil-transmitted helminth infections: ascari-
 427 asis, trichuriasis, and hookworm. Lancet 367:1521–1532

Parasitol Res		
428	Bizimenyera ES, Githioni JB, Eloff JN, Swan GE (2006) In vitro activity of <i>Peltophorum africanum</i> Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode <i>Trichostrongylus colubriformis</i> . <i>Vet Parasitol</i> 142:336–343	473
429		474
430		475
431		476
432	Cabaret J (2008) Pro and cons of targeted selective treatment against digestive-tract strongyles of ruminants. <i>Parasite</i> 15:506–509	477
433		478
434	Cachet N, Hoakwie F, Bertani S, Bourdy G, Deharo E, Stien D, Houél E, Gornitzka H, Fillaux J, Chevalley S, Valentin A, Jullian V (2009) Antimalarial activity of simalikalactone E, a new quassinoid from <i>Quassia amara</i> L. (Simaroubaceae). <i>Antimicrob Agents Chemother</i> 53:4393–4398	479
435		480
436		481
437		482
438		483
439	Coles GC, Bauer C, Borgsteede FH, Goerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ (1992) World Association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. <i>Vet Parasitol</i> 44:35–44	484
440		485
441		486
442		487
443		488
444	Fred-Jaiyesimi AA, Adepoju A, Egbunmi O (2011) Anthelmintic activities of chloroform and methanol extracts of <i>Buchholzia coriacea</i> Engler seed. <i>Parasitol Res</i> 109:441–444	489
445		490
446		491
447	Goerts S, Gryseels B (2000) Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. <i>Clin Microbiol Rev</i> 13:207–222	492
448		493
449		494
450		495
451	Hoste H, Torres-Acosta JF, Alonso-diaz MA, Brunet S, Sandoval-Castro C, Adote SH (2008) Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. <i>Trop Biomed</i> 25:56–72	496
452		497
453		498
454	Houngangbé-Adote MS (2000) La pharmacopée en Médecine Vétérinaire au Sud Bénin (cas des ovins et des caprins). Colloque Européen d'ethnopharmacologie 11–13 mai. Société Française d'Ethnopharmacologie, Metz	499
455		500
456		501
457		502
458	Houngangbé-Adote MS, Paolini V, Fourasté I, Moutairou K, Hoste H (2005a) In vitro effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, <i>Haemonchus contortus</i> . <i>Res Vet Sci</i> 78:155–160	503
459		504
460		505
461		506
462	Houngangbé-Adote S, Fourasté I, Moutairou K, Hoste H (2005b) In vitro effects of four tropical plants on the activity and development of the parasitic nematode, <i>Trichostrongylus colubriformis</i> . <i>J Helminthol</i> 79:29–33	507
463		508
464		509
465		510
466	Hubert J, Kerboeuf D (1984) A new method for culture of larvae used in diagnosis of ruminant gastrointestinal strongylosis: comparison with fecal cultures. <i>Can J Comp Med</i> 48:63–71	511
467		512
468		513
469	Jackson F, Hoste H (2010) In vitro methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In "In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies." In Vercoe HM, Schlink AC (eds) Springer Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy Agency (FAO/IAEA). Edition Dordrech, pp 24–45	514
470		515
471		516
472		517
473		518
474		
475		
476		
477		
478		
479		
480		
481		
482		
483		
484		
485		
486		
487		
488		
489		
490		
491		
492		
493		
494		
495		
496		
497		
498		
499		
500		
501		
502		
503		
504		
505		
506		
507		
508		
509		
510		
511		
512		
513		
514		
515		
516		
517		
518		

Article 3: *Variability of the chemical composition of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* related to environmental factors*

2011. Manuscrit en préparation

P. A. Olounladé^{1, 2, 5*}, E. V. B. Azando^{1, 6}, F. Gbaguidi^{2, 3}, T. B. Tam Ha⁴, J. Gbenou³, H. Hoste^{6, 7}, A. Valentin⁵, M. Moudachirou^{2, 3}, M. S. Hounzangbé-Adoté¹

¹Laboratoire d’Ethnopharmacologie et de Santé Animale, Faculté des Sciences Agronomiques, Université d’Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou-Bénin

²Laboratoire de Pharmacognosie, Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique (CBRST) BP 06 Oganla Porto-Novo

³Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles, Faculté des Sciences et Techniques, Université d’Abomey-Calavi, 01BP 918, ISBA Champ de Foire, Cotonou, Bénin

⁴Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie de l’Université Paul Sabatier, 35 Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, Cedex 9 France.

⁵Pharma-Dev -UMR 152 / Faculté de Pharmacie, Université de Toulouse III, 35 Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, Cedex 9 France

⁶INRA, UMR 1225 Interactions Hôte Agents Pathogènes 23, Chemin des Capelles, F-31076 Toulouse, France

⁷Université de Toulouse, ENVT, UMR 1225, F-31076 Toulouse, France.

*Corresponding author. Olounladé Abiodoun Pascal, BP 1402 Abomey-Calavi, Bénin,
Tel. : +229 97 08 54 68 E-mail : abiodouno@yahoo.fr

Abstract

N. laevis and *Z. zanthoxyloides* leaves from departments of the Atlantic, Oueme, Mono and Zou Area of South Benin were screened for the presence of chemical compounds by standard methods and compared. The results revealed the presence of the following compounds: alkaloids, tannins, flavonoids, quinones (in *Newbouldia* only), and essential oils in the plant samples regardless of the area and the harvest season. Saponins, cardiac glycosides, cyanogenic glycosides were found to be absent in the leaves of *Z. zanthoxyloides* and *N. laevis* regardless of the area and the harvest season. The significance of the plants in traditional medicine and the importance of the distribution of the chemical constituents justified the traditional use of these plants for the treatment of tropical diseases. We recommend further research work on these plants leaves for possible use as a source of raw material for industrial and medical science utilization.

Keywords: Phytochemical, *Newbouldia laevis*, *Zanthoxylum zanthoxyloides*, agroecological zone, variability, environmental factors, Benin

INTRODUCTION

Nearly 80% of natural substances used in the biomedical field come from tropical plants (Campa, 2005). This is the case of vincristin and vinblastin, two dimeric alkaloids sought after for their anti-tumor activity. Extracted from *Catharanthus roseus*, periwinkle from Madagascar, these compounds are very weakly accumulated in the plant (values less than 0.001% of dry matter). Also, large crops are needed (50 tons per year) for the active ingredient essential to the therapeutic needs worldwide. In addition, the level of production of secondary metabolites varies with the organ (Endo et al. 1987), individuals (Levy et al. 1984), places of harvest or culture conditions (Daddona et al. 1976), climatic factors (Manolark, 2011) but also with stage of plant development (Reda, 1978 ; Manolaraki, 2011).

However, the plant related to the content and nature of plant secondary metabolites is probably one of the main sources of the variation. Based on the bibliography the quantity and the nature of tannins as well as other secondary metabolites, depend not only on the plant species, the variety (cultivar), the stage of development but also on the environmental conditions of culture (soil, season, climate, mode of culture) and the mode of conservation (Marais et al, 2000; Mueller-Harvey, 2006; Heckendorn et al, 2006; Haring, 2007; Manolaraki, 2011). The secondary metabolites content of a plant depends on several intrinsic factors, such the species and variety, plant part or stage, and extrinsic factors, such as climatic, soil, or the stress of predation (Mueller-Harvey and Mark Allan 1992, Jean-Blain, 1998; Norton, 1999; Waterman, 1999; Manolaraki, 2011).

Man has earlier discovered within his environment the wealth of importance of plants as therapeutic agents. Of the 300.000 plant species acclaimed world wide only about 5% have been investigated scientifically for their medicinal purposes (Sanusi and Rabo, 2004; Olusola, 2011). Researchers have reported that developing countries rely mainly on plants for the treatment of their prevailing ailments especially in areas where hospitals are not accessible (Lambo, 1979 ; Olusola, 2011). In industrialized countries it is known that over 30% of all prescription drugs are from plant origin (Iwu et al., 1999).

The genus *Newbouldia* (Bignoniaceae) comprises a unique species *Newbouldia laevis*, which occurs in several tropical zones of America, Central and West Africa. *Newbouldia laevis*, also called «fetish tree» can grow to a height of about 12 m but is most often a shrub or a bush (Tra-Bi, 1997).

The genus *Zanthoxylum* (Rutaceae) comprises a large number of species, which occur in several tropical and temperate zones of America, Africa and Asia. In Africa, many species are used in folk medicine. *Zanthoxylum zanthoxyloides* is a scandent shrub or a small tree; it has a fragrant bark and grows in coastal areas of West Africa (Keay et al., 1972; Brunel et al., 1984; Boudet et al., 1986; Guffin et al., 2000). The tree branches are adorned with numerous spines.

N. laevis and *Z. zanthoxyloides* are extensively used in herbal medicine in South Benin. Their various uses in traditional medicine are reviewed in Table 1. The active principles of many drugs found in plants are secondary metabolites (Ghani, 1990; Doelis, 1993). Therefore, basic phytochemical investigation of these plants for major phytoconstituents is also vital.

This research was aimed at investigating the possible variability related to environmental factors (Origin and season of harvest) of the chemical composition by quantifying the percentage of crude phytochemical constituents in *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides*, in order to support or refute the claims by traditional herbalists in Benin. Benin is divided into twelve departments which are: Alibori, Atacora, Atlantique, Borgou, Collines, Couffo, Donga, Littoral, Mono, Ouémé, Plateau and Zou. Benin, like all of Africa except North Africa and some countries of South Africa is in an area of tropical climate characterized by high temperatures and more or less regular rainfall. In the departments of Ouémé, Atlantic, Zou and Mono, soils are ferralitic. The vegetation is staggered and degrades when moving from south to north. These environmental factors can influence the chemical composition of medicinal plants from one region to another. Work reported in the south of Benin, in the departments of Atlantic, Oueme, Mono and Zou young plants of *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* are abundant and dendrometric characters are significant. These plants are not found in other departments in the north Benin (Orou et al., 2009). The departments targeted for this study are: Atlantic, Couffo, Ouémé and Zou.

Zou has a transition sub-equatorial climate, characterized by two rainy seasons (April to June and September-November) and two dry seasons (July-August and December-March). The vegetation is also a very important variable of the environment. Vegetation of equatorial Sudanian type consists of trees with coriaceous, varnishing leaves resistant to heat. Alternating dry season and wet season causes a phrenological rate in plants. The soil is made of “terre de barre” (laterite) and appears as the result of an intense and deep weathering. It consists of a

vast homogeneous sandy clay plateau. Almost everywhere, the ground shows a physical homogeneity. Of agronomic, it is low in organic matter, and is characterized by its great depth and high permeability.

Mono is characterized by a sub-equatorial climate with two (02) dry seasons (July to September and November to February or March) and two (02) rainy seasons, one short (September to November) and the other more long (April-July). The Aplahoué city has a variety of soils. The substrate is mainly composed of sediments of the Terminal Continental. These sediments are generally sandy clay.

The humid tropical climate of Oueme is called sub-equatorial climate. This climate is characterized by high humidity and temperatures between 21.9 ° C and 32.8 ° C. This department has three types of soil: ferralitic soils, lightbrown colored soils, and hydromorphic clay soils rich in organic matter.

The climate of the Atlantic department is sub-equatorial marked by two rainy seasons and two dry seasons. Most of the territory of the Atlantic department is occupied by tropical ferruginous soils and sandy soils.

MATERIALS AND METHODS

Collection and identification of Plant materials

Fresh sample of *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* were collected from departments of the Atlantic, Oueme, Mono and Zou of the South of Benin and verification of identity was done by Professor Akpovi AKOEGNINO, Curator of the National Herbarium of Abomey-Calavi University (Herbier National de l'Université d'Abomey-Calavi). Classification of the species was performed by means of the key according to Cronquist ([Cronquist, 1988](#)). Voucher specimens were deposited at the Herbarium of Abomey-Calavi University. Plants materials were harvested during rainy season and dry season. The Plants were dried indoors at room temperature and a large part is reduced into powder for extraction.

Plant extracts preparation

The aqueous extract of each sample was prepared by soaking 50 g of dried powdered samples in 500 mL of distilled water for 24 h. The extracts were filtered using Whatman filter papers No 1001 125 (125 mm).

Phytochemical screening

Chemical tests were carried out on the aqueous extract and on the powdered specimens using standard procedures to identify the constituents as described by Harborne (1973), Sofowara (1993), Williamson *et al.* (1996), Trease and Evans (2002) and Banso and Ngbede (2006).

Test for tannins: About 0.5 g of dried sample powder was boiled in 20 mL of water in a test tube and then filtered. A few drops of 0.1% ferric chloride was added, the mixture was observed for brownish green or a blue-black coloration.

Test for alkaloids : 3 g of extract was stirred with ethanol containing 3% tartaric acid. The filtrate was shared into 3 beakers and tested for alkaloids as follows: Into the first beaker, Hagar's reagent was added; into the second beaker, Mayer's reagent was added; and into the third beaker Marquin's reagent was added. Precipitations in any of the 3 tests indicate the presence of alkaloid.

Test for saponins : About 2 g of sample powder was boiled in 20 mL of distilled water in a water bath and filtered. 10 mL of the filtrate was mixed with 5 mL of distilled water and shaken vigorously for a stable persistent froth. The frothing was mixed with 3 drops of olive oil and shaken vigorously, then observed for the formation of emulsion.

Test for flavonoids : Three methods were used to determine the presence of flavonoids in the plant sample (Harbrone, 1973; Sofowara, 1993). 5 mL of dilute ammonia solution were added to a portion of the aqueous filtrate of each plant extract followed by addition of concentrated H₂SO₄. A yellow coloration observed in each extract indicated the presence of flavonoids. The yellow coloration disappeared on standing. Few drops of 1% aluminium solution were added to a portion of each filtrate. A yellow coloration was observed indicating the presence of flavonoids. A portion of the plant powder was in each case heated with 10 mL of ethyl acetate over a steam bath for 3 min. The mixture was filtered and 4 mL of the filtrate was shaken with 1 mL of dilute ammonia solution. A yellow coloration was observed indicating a positive test for flavonoids.

Test for steroids: 2 mL of acetic anhydride was added to 0.5 g ethanol extract of each sample with 2 mL H₂SO₄. The color changed from violet to blue or green indicating the presence of steroids.

Test for cardiac glycosides (Keller-Killani test) : 5 mL of each extract was treated with 2 mL of glacial acetic acid containing one drop of ferric chloride solution. This was underlayered with 1 mL of concentrated sulphuric acid (H₂SO₄). A brown ring at the interface indicates a deoxysugar characteristic of cardenolides. A violet ring may appear below the brown ring, while in the acetic acid layer, a greenish ring may form just gradually throughout thin layer

Test for cyanogenic glycosides

5 mL of each extract is placed in an Erlenmeyer flask that we recover immediately with a paper soaked in picric acid. After heating at 95 °C for 15 minutes, a brown coloration indicates the presence of cyanogenic derivatives.

Test for quinones (Borntrager test)

In an Erlenmeyer flask, 2 mL of 5% hydrochloric acid is mixed with 2 g of each plant powder. 20 mL of chloroform are added to this mixture and the whole is stirred continuously for 24 hours. After the maceration, 5 mL of ammonia was added. A purplish red color indicates a positive response.

Test for volatile oil

Dried leaves of *N. laevis* and seeds of *Z. zanthoxyloides* were hydrodistilled for 4 hours to obtain an essential oil from yellow to green trend by using the Clevenger-type apparatus.

Quantitative determination of the chemical constituents

Preparation of fat free sample: 2 g of the sample were defatted with 100 mL of diethyl ether using a Soxhlet apparatus for 2 h.

Determination of total phenols by spectrophotometric method : The fat free sample was boiled with 50 mL of ether for the extraction of phenolic components for 15 min. 5 mL of the extract was pipetted into a 50 mL flask, then 10 mL of distilled water was added. 2 mL of ammonium hydroxide solution and 5 mL of concentrated amyl alcohol were also added. The samples were made up to mark and left to react for 30 min for color development. This was measured at 505 nm.

Alkaloid determination using Harborne (1973) method : 5 g of the sample was weighed into a 250 mL beaker and 200 mL of 10% acetic acid in ethanol was added and covered and allowed to stand for 4 h. This was filtered and the extract was concentrated on a water bath to one-quarter of the original volume. Concentrated ammonium hydroxide was added drop wise to the extract until the precipitation was complete. The whole solution was allowed to settle

and the precipitated was collected and washed with dilute ammonium hydroxide and then filtered. The residue of alkaloids was dried and weighed.

Tannin determination by Van-Burden and Robinson (1981) method :

500 mg of the sample was weighed into a 50 mL plastic bottle. 50 mL of distilled water was added and the bottle was shaken for 1 h in a mechanical shaker. This was filtered into a 50 mL volumetric flask and made up to the mark. Then 5 mL of the filtrate was pipetted into a test tube and mixed with 2 mL of 0.1 M FeCl₃ in 0.1 N HCl and 0.008 M potassium ferrocyanide. The absorbance was measured at 120 nm within 10 min.

Flavonoid determination by the method of Bohm and Kocipai-Abyazan (1994) : 10 g of the plant sample was extracted repeatedly with 100 mL of 80% aqueous methanol at room temperature. The whole solution was filtered through Whatman filter paper No 1001 125 (125 mm). The filtrate was transferred into a crucible and evaporated into dryness over a water bath and to a constant weight.

Volatile oil determination

Dried leaves of *N. laevis* and seeds of *Z. zanthoxyloides* were hydrodistilled for 4 hours to obtain an essential oil from yellow to green trend by using the Clevenger-type apparatus. Their percentage contents were calculated on dry weight basis of the plant material.

Results

The present study carried out on the plant samples revealed the presence of the main classes of secondary metabolites: alkaloids, tannins, flavonoids, quinones, and essential oils. The phytochemical characters of the two medicinal plants investigated are summarized in Tables 2 and 3. As shown by the results reported in Tables 2 and 3, the plants in different areas (Mono, Oueme, Atlantic and Zou) contain substances belonging to the same families of compounds regardless of the harvest season. Saponins, cardiac glycosides, cyanogenic glycosides were found to be absent in the leaves of *Z. zanthoxyloides* and *N. laevis* regardless of the area and the harvest season. Also note that quinones are present in the leaves of *N. laevis* and absent in those of *Z. zanthoxyloides* regardless of the area and the harvest season.

Tables 4 and 5 present the results of a quantitative analysis, the percentage of crude chemical constituents in these medicinal plants are estimated for the four areas and for two harvest seasons. Tannins are more concentrated in the leaves of both plants and a concentration of tannins equal to 14.77% is obtained in the leaves of *Zanthoxylum zanthoxyloides* of Oueme

harvested during the rainy season. Volatil oils were obtained in the plants but the yields recorded were low: (0.01-0.52%) during the dry season and (0.04-0.67%) during the rainy season.

DISCUSSIONS

The various phytochemical compounds detected are known to have beneficial use in industries and medical sciences (Sofowara, 1993; Ngbede et al., 2008).

For many decades, Benin medicine has documented the effectiveness of plant therapies. These plants species have now been categorized according to their medicinal properties. The basic principles in formulation of their remedies have also been developed by these herbal therapy enthusiasts. Also, many of these plant extracts have been employed in formulation of modern drugs, chemicals and food. Therefore, plant extracts have now been used in industries and in medical sciences (Ngbede et al., 2008). Among the Benin and African herbal therapies, a principal herb denoted as emperor herb is chosen as the main therapeutic herb and minister herbs are selected to assist carrying the treatment to the specific channels and organs. The results of these formulations in many ways have proved a better alternative to some of the modern potentially toxic agents that are used in the treatment of infectious diseases. Most herbalists, especially the ancient ones knew more than we do today, at least about the benefits of using various wild plant species (Ngbede et al., 2008). Their connection with nature was much more profound.

The classes of compounds found in the leaves of *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* are known to show curative activity against several pathogens and therefore could explain their traditional use for treatment of wide array of illnesses (Hassan et al., 2004; Usman et al., 2005; Usman & Osuji, 2007). Tables 2 and 3 showed that the two plants contain different families of compounds (alkaloids, tannins, flavonoids, quinones, and essential oils), but all the samples show the same results irrespective of the origin and the harvest season. Moreover alkaloids (Diéguez-Hurtado et al., 2003; Tringali, 2001; Couillerot et al., 1994), flavonoids, terpenoids and coumarins (Mara et al., 1992) were isolated from different species of the genus *Zanthoxylum*. According to Kerharo and Adam (1994), samples of *Fagara zanthoxyloides* collected in West Africa (Senegal, Togo, Ivory Coast and Nigeria) have revealed the presence of tertiary and quaternary alkaloids and a flavone glycoside in the leaves. Traces of tannins in *Z. zanthoxyloides* were reported by Paris and Moyse Mignon (1947). So far no one has

quantified the tannins in the leaves of *N. laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides*. Tables 4 and 5 are interesting; the results show a fluctuation in the chemical composition, by region and by season. *Zanthoxylum* and *Newbouldia* harvested in Oueme contain more tannins than plants collected in other regions and especially in the rainy seasons, therefore according to the effect that one seeks, if the effect is due to the action of tannins, the plants harvested in Ouémé the rainy season will be more active. However variations in results have been observed. For example with regard to the quantity of condensed tannins, the influence of the cultivation location on polyphenol concentration was demonstrated by [Tiemann et al. \(2010\)](#). This seemed to be more related to the pH values ([Kraus et al, 2004](#)) than the soil fertilization ([Tiemann et al, 2010](#)). [Caygill and Mueller Harvey \(1999\)](#) have noticed that the synthesis of tannins in plants is a response to stress conditions, such as low fertility, water deficits or high temperature. The positive effect of a hot dried period on the flavan-3-ols concentrations in plants have also been described in several studies ([Donnelly, 1959](#); [Lees et al, 1994](#); [Feutch et al, 1997](#); [Vitti et al, 2005](#); [Assefa et al, 2008](#); [Manolaraki, 2011](#)). The quantity and the nature of tannins as well as other secondary metabolites, depend not only on the plant species, the variety (cultivar), the stage of development but also on the environmental conditions of culture (soil, season, climate, mode of culture) and the mode of conservation ([Marais et al, 2000](#); [Mueller-Harvey, 2006](#); [Heckendorn et al, 2006](#); [Haring, 2007](#)). In general, the highest concentrations are found in the fruits, flowers and leaves, and the lowest in the stems. For example, the leaves, flowers and stems of sainfoin contain respectively 0.31%, 0.30% and 0.07% of tannin ([Borreani et al, 2003](#)). For a given species, the vegetative stage also influences the content of tannins ([Jean-Blain, 1998](#)). Generally, during the growth of vegetative, a dilution of tannins is observed. In the leaves, the quantity and quality of tannins change during maturation. Similarly, the tannin content generally decreases during fruit ripening. For example, the maturation of oak leaves from April to September is accompanied by changes in the content and an increase in the degree of polymerization of tannins ([Makkar et al, 1991](#)). A similar process was observed in legumes. Thus, the content of sainfoin condensed tannins varies from 27 to 16g/Kg of dry matter during the growth phase ([Borreani et al, 2003](#)). The quality of condensed tannins varies depending on the vegetative stage ([Koupi-Abyazani et al, 1993](#), [Marais et al, 2000](#)). During the maturation of the leaves of sainfoin, variations in the degree of polymerization (5 to 8.5) and the percentage of prodelphinidols (60 to 95%) were observed ([Koupi-Abyazani et al, 1993](#)). The synthesis of tannins is generally increased in response to stress environmental whatever its origin, such as water stress, depletion of soil or too much sunlight ([Bennick, 2002](#); [Manolaraki, 2011](#)). In

addition, the proportion of condensed tannins in free form or associated with fiber or protein is also under the "influence of climatic conditions and nutritional stress (Frutos et al, 2002). So after a long period of drought, Feucht et al. (1997) observed an increase of 7.4 times of the amount of flavan-3-ols in yellowing leaves, compared to green leaves. Recently, a study on grapes (*Vitis vinifera L.*) also showed that the content of flavan-3-ols and distribution of TCs in the tissue depended on the exposure to light and weather conditions (Cadot et al, 2006; Manolaraki, 2011). The soil also affects the quality of condensed tannins as the grapes grown on sandy soil with little reserve water showed a lower proportion of DPs than those grown on a richer soil (Cadot et al, 2006). Finally, a stress from the aggression of plants by herbivores or pathogens induces an increased synthesis of secondary metabolites and a large storage of tannins particularly condensed tannins, in the area attacked (Woodward and Coppock, 1995, Feucht et al, 1997 ; Manolaraki, 2011). Tannins are inhibitors of enzymes (Zimmer and Cordesse, 1996). Other work has highlighted the antioxidant activities of tannins (Bruneton, 1999 ; Treutter and Feucht, 1999 ; Hässig et al., 1999, Lim et al., 2007). Antimutagenic and anticancer activities have been attributed to some tannins because of their antioxidant properties (Chung et al. 1998 ; Jung and Ellis, 2001, Richelle et al., 2001). The antiseptic activity of tannins has been widely described (Chung et al. 1998 ; Bruneton, 1999). Moreover tannins show antimicrobial (Chung et al., 1998, Hatano et al., 2005 ; Song et al., 2006), antifungal (Baba-Moussa et al., 1999; Bruneton, 1999) or antiviral effects (Chung et al., 1998, Yamaguchi et al., 2002, Song et al., 2005). However, current therapeutic applications are limited (Bruneton, 1999). It is interesting to recall that the tannins from the grape juice and wine have a preventive effect against cardiovascular disease (Bruneton, 1999). Tannins were reported to exhibit anthelmintic, antiviral, antibacterial and anti-tumor activities. It was also reported that some tannins are able to inhibit selectively HIV replication and is also used as diuretic (Haslem, 1989 ; Ngbede et al., 2008). Plant tannins have been widely recognized for their pharmacological properties and are known to make trees and shrubs a difficult meal for many caterpillars (Ngbede et al., 2008).

As far as alkaloids are concerned, the best results have been obtained with *Zanthoxylum* Atlantic harvested during the dry season and *Newbouldia* Zou harvested during the rainy season. Extracts of *N. laevis* collected in Nigeria near Anambra state are rich in alkaloids (Gafner et al., 1996, 1997). Indeed, *Datura innoxia* Mill. a plant of the Solanaceae family synthesizing secondary metabolites, including the tropane alkaloids, was used as a model for crops in hydroponics. Environmental parameters (biotic and abiotic) have improved growth

and production of secondary metabolites. The response of the plant depended on the oxygen supply of the nutrient solution, temperature level as seen from the aerial parts at root level. An increase in light intensity did not improve alkaloid content of the plant but the use of orange light causes a change in growth parameters and levels of alkaloids. [Vu \(2008\)](#) also reported that the presence of microflora in the culture medium causes a degradation of molecules of interest and alters their accumulation in the plant. [Campa \(2005\)](#) shows the importance of genetic factors over environmental factors on the alkaloid content of different organs of *Canavalia rosea*, a tropical plant, commonly known as pea-edge-de-mer. Most of the known functions of alkaloids are related to protection. Alkaloids show various properties : antiarrhythmic, anticholinergic, antitumor, vasodilating, antihypertensive, cough medicine, anesthetic, remedy for gout, analgesic, antihypertensive, muscle relaxant ,inhibitor of acetylcholinesterase , antiarrhythmic, antipyretics, antimalarial, antiprotozoal agent , sympathomimetic, vasodilator, antihypertensive ([Bruneton, 2009](#)).

Regarding essential oils, only *Z. zanthoxyloides* harvested in Oueme, Atlantic and Zou show significant results. For the same plant, the composition of essential oil can vary widely according to the organs (leaf, flower, fruit, wood), to the season, to growing conditions (sunshine, humidity, day length, soil fertility). For a species like thyme, we know seven chemical races ([El Kalamoun, 2010](#)).The composition of essential oil of *Z. zanthoxyloides* collected in Benin is very different from *Z. zanthoxyloides* collected in Monteverde, Costa Rica (leaves: [Setzer et al, 2005](#)), Cameroon (fruit: [Ngassoum et al, 2003](#)). This difference can be explained by the existence of several chemotypes according to climatic, geographical and origin of the plant. Essential oils have various biological effects. Effects and multiple targets are due to each chemical component, and to their multiplicity. Essential oils have the particular effects of antiseptics, antibiotics or anti-infective, anti-inflammatory drugs, antihypertensives, antihistamines, vasopressors, analgesics, sedatives, anxiolytic, anti-insomnia, anti-spasmodic, diuretic, laxative ([Bruneton, 2009](#)).

Regarding flavonoids, the best results are obtained with *Z. zanthoxyloides* from Oueme and *N. laevis* from Atlantic collected during the rainy season. Note also that the content of flavonoids of both plants regardless of the harvest season in the department of Oueme, Atlantic and Zou is not negligible. Indeed the secondary metabolites such as flavonoids are involved in many plant defense responses. Environmental factors, such as the supply of nutrient substrates, temperature, light or the concentration of carbon dioxide in the atmosphere can affect the flavonoid content of plant tissues ([Gayle, 2010](#)). Today, the properties of flavonoids are

widely studied in the medical field: anti-viral, anti-tumor, anti-inflammatory, anti-allergic, anti-cancerous activities are highlighted. The animal world is also very concerned by flavonoids. Bees instinctively put such implement the antifungal and antibacterial properties of polyphenols to sanitize their hive and seal the cracks. (<http://membres.multimania.fr/mourad/flavonoides.html>). Flavonoid has been referred to as nature's biological response modifiers because of strong experimental evidence of their inherent ability to modify the body's reaction to allergen, virus and carcinogens. They show anti-allergic, anti-inflammatory, antimicrobial and anti-cancer activities (Bruneton, 2009). Flavonoids have vasculoprotective and veinotonic properties, reducing the permeability of blood vessels. They would thus be beneficial for the heart, arteries, liver, and immune system or to muscle tissue. Flavonoids are particularly used to treat hemorrhoid crises, heavy legs and abnormal capillary fragility. (<http://complement-alimentaire.comprendrechoisir.com/comprendre/flavonoides-complements-alimentaires>).

Regarding phenols, no significant difference is observed between the plants collected from different areas and in different seasons.

N. laevis and *Z. zanthoxyloides* are commonly used in Benin to treat human and animal diseases. According to our results, one must keep in mind that the chemical composition of these two plants varies with the geographical origin and with the harvest season. The choice of the plant depends on the properties expected, the users should consider the content of the corresponding active components to take the right plant (origin and harvest season) in order to obtain the best activities and less side effects.

CONCLUSIONS

The studied plants can be seen as a potential source of useful drugs. Given the wealth of secondary metabolites, *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* could have the chance to be considered as food additives. Further studies on these plants are underway in order to isolate the bioactive compounds. The anthelmintic activities of these plants, as claimed by traditional healers, are also being investigated.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the CORUS project N° 6040. Mr. A.P. OLOUNLADE acknowledges receiving a scholarship from AUF to undergo his PhD studies. Mr. E.V.B. AZANDO is a grateful recipient of a grant provided from ARHES.

REFERENCES

- Abbiw, D.K., 1990. Useful plants of Ghana: West African uses of wild and cultivated plants. Intermediate Technology Publications, Royal Botanic Gardens, Kew Ed. London, pp. 154-157.
- Adeyanju, O., Olajide Olutayo, O., Afolayan M., Khan, I.Z., 2011. Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of the leaf extract of *Cassia singueana* Del. African Journal of Pure and Applied Chemistry 5(4), 65-68.
- Adjanahoun, E., Ahyi, M.R.A., Ake-Assi, L., Elewude, J.A., Fadoju, S.O., Gbile, Z.O., Goudole, E., Johnson, C.L.A., Keita, A., Morakinyo, O., Ojewole, J.A.O., Olatunji, A.O., Sofowora, E.A. 1991. Traditional medicine and pharmacopoeia. Contribution to ethnobotanical floristic studies in Western Nigeria, Pub. Organization of African Unity, Scientific Technical and Research Commission. Lagos, Nigeria, p. 420.
- Amos, S., Chindo, B., Edmond, I., Akah, P., Wambebe, C., Gamaniel, K. 2002. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of *Ficus platyphylla* extracts in mice and rats. J. Herbs, Spices Med. Pl. 9: 47- 53.
- Arbonnier, M. 2004. Tree, Shrubs and Liana of West Africa dry zones. CTA, Postbus 380 6700 AJ Wageningen, Netherlands.
- Assefa, G., Sonder, K., Wink, M., Kijora, C., Steinmueller, N., Peters, K.J., 2008. Effect of variety and harvesting management on the concentration of tannins and alkaloids in tagasaste (*Chamaecytisus palmensis*). Animal Feed Science and Technology 144, 242-256.
- Ayensu, E.S., 1978. Medicinal Plants of West Africa. USA: Reference Publications Inc, pp. 36-39.
- Azuine , M.A., Ibrahim,K., Enweren, M., Gramaniel, K., Wambebe, C.,1995. Citotoxic and anticancer activity of *Newbouldia laevis* in mice, West African. Journal of Pharmacology and Drug Research, 11, 72-79.
- Baba-Moussa, F., Akpagana, K., Bouchet, P., 1999. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. Journal of. Ethnopharmacology 66 (3), 335-338.
- Banso, A., Ngbede, J.E., 2006. Phytochemical screening and in vitro antifungal properties of *Fagara zanthoxyloides*. Int J Food Env 4, 8-9.
- Bennick, A., 2002. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. Critical Reviews in Oral Biology and Medecine 13, 184-196.

- Boham, B.A., Kocipai-Abyazan, R., 1994. Flavonoids and condensed tannins from leaves of Hawaiian *vaccinium vaticulatum* and *V. calycinium*. *Pacific Sci.* 48, 458-463.
- Borreani, G., Peiretti, P.G., Tabacco, E., 2003. Evolution of yield and quality of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) in the spring growth cycle. *Agronomy for Sustainable Development* 23, 193-201.
- Boudet, G., Lebrun J.P. , Demange, R. , 1986. Catalogue des Plantes Vasculaires du Mali. Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, Maisons Alfort, France.
- Brunel, J.F., Scholz, H., Hiepkö, P., 1984. Flore analytique du Togo. Phanérogames. Eschborn, Alle-magne, Gtz, p. 571 .
- Bruneton, J., 1999. Tannins. In: Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, TEC&DOC (Ed), Paris, pp. 369-404.
- Burkill, H.M.,1985. The Useful Plants of West Tropical Africa. 2nd Edition Volume1, Familles A-D Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond,United Kingdom, pp. 252-269.
- Cadot, Y., Miñ ana Castello, M.T., Chevalier, M., 2006. Flavan-3-ol compositional changes in grape berries (*Vitis vinifera L. cv Cabernet Franc*) before veraison, using two complementary analytical approaches, HPLC reversed phase and histochemistry. *Analytica Chimica Acta* 563, 65-75.
- Campa , C., 2005. Dossier de Candidature au Diplôme d'habilitation à diriger des recherches, Université Montpellier II , France
- Caygill, C.J., Mueller-Harvey, I., 1999. Secondary Plant Products: Antinutritional and beneficial actions in animal feeding. Nottingham University Press, UK , p. 129.
- Chaaïb, K.F., 2004. Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) (Rutaceae). Thèse de doctorat de la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, Genève.
- Chung, K.T., Wei, C.I., Johnson, M.G., 1998. Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Science and Technology* 9, 168-175.
- Couillerot, E., Caron, L., Audran, J.C., Molinatti, P., Le Men Olivier, L., Jardillet, J.C., Chenieux, J.C., 1994. Benzophenanthridine and furoquinoline accumulation in cell suspension culture of *Fagara zanthoxyloides*. *Phytochemistry* 37, 425-428.

- Cronquist, A., 1988. The evolution and classification of flowering plants. New York: New York Botanic Gardens, p. 555.
- Daddona, P.E., Wright J.L., Hutchinson, C.R., 1976. Alkaloid catabolism and mobilization in *Catharanthus roseus*. *Phytochem* 15 , 941-945
- Dieguez-Hurtado, R., Garrido, G., Prieto Gonzalez, S., Iznaga, Y., Gonzalz, L., Molina Tores, J., Curini, M., Epifano, F., Marcotullio, M.C. 2003. Antifungal activity of some Cuban *Zanthoxylum* species. *Fitoterapia* 74, 384-386.
- Donnelly, E.D, 1959. The effect of season, plant maturity and height on the tannin content of *Sericea lespedeza*, *L.cuneata*. *Agronomy Journal* 51, 71-73.
- EL Kalamouni, C., 2010. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse III, Toulouse.
- Endo, T., Goodbody, A., Misawa, M., 1987. Alkaloid production in root and shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Medica* 27,2147-2149
- Feucht, W., Treutter, D., Christ, E., 1997. Role of flavanols in yellowing beech trees of the Black forest. *Tree Physiology* 17, 335-340.
- Frutos, P., Hervas, G., Ramos, G., Giraldez, F.J., Mantecon, A.R., 2002. Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Animal Feed Science and Technology* 95, 215-226.
- Gafner S, Wolfender JL, Nianga M, Hostettmann K. (1997). Phenylpropanoid Glycosides from *Newbouldia laevis* Roots. *Phytochem*, 44, 687-690.
- Gafner, S. , Wolfender, J.L , Nianga, M. , Stoeckli, E.H, Hostetmann, K. , 1996. Antifongique et antibactérienne de naphtoquinones *Newbouldia laevis* racines, *Phytochimie* 42 (5), 1315-1320.
- Gayler, S.S., 2010 . Modélisation de l'effet de facteurs de l'environnement sur la répartition des ressources dans un système végétal mixte. Partage de l'espace chez les plantes. Académie d'Agriculture de France. Séance du 2 Juin.

- Gbeassor, M., Kedijagni, A.Y., Koumaglo, K., Despvza, C., Agbo, K., Aklikokou, K., Amegbo, K.A., 1990. *In vitro* antimalarial activity of six medicinal plants. *Phytotherapy Research*, 43, 116-117.
- Ghani, A., 1990. *Introduction to Pharmacognosy*. Ahmadu Bello University Press, Ltd. Zaria, Nigeria, pp: 45-47: 187-197.
- Harborne, J.B., 1973. *Phytochemical methods*, London. Chapman and Hall, Ltd. pp. 49-188.
- Haring, A., 2007. *Determinants of tannin concentrations in forage plants. Agronomic potential of tanniferous plants*. PhD thesis submitted to the Swiss Federal Institute of Technology, Zurich p. 226.
- Haslem, E., 1989. *Plant polyphenols: Vegetable tannins revisited-chemistry and pharmacology of natural products*. Cambridge University Press, p. 169.
- Haslam, E., 2007. *Vegetable tannins-Lessons of a phytochemical lifetime*. *Phytochemistry* 68, 2713-2721.
- Hassan, S.W., Salawu, K., Ladan, M.J., Hassan, L.G., Umar, R.A., Fatihu, M.Y., 2010. *Hepatoprotective, Antioxidant and Phytochemical Properties of Leaf Extracts of Newbouldia laevis*. *International Journal of PharmTechResearch* 2 (1) , 573-584.
- Hassan, M.M., Oyewale, A.O., Amupitan, J.O., Abdullahi, M.S., Okonkwo, E.M., 2004. *Preliminary Phytochemical and antibacterial investigation of crude extracts of the root bark of Detarium microcarpum*. *Journal Chemical Society of Nigeria* 29 (1), 26-29
- Hässig, A., Schwabl, H., Stampfli, K., 1999. *Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character*. *Medical Hypotheses* 52, 479-481.
- Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T-o., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T., 2005. *Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 66, 2047-2055.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H., 2006. *Effect of sainfoin (Onobrychis viciifolia) silage and hay on established populations of Haemonchus contortus and Cooperia curticei in lambs*. *Veterinary Parasitology* 142, 293-300.
- Hounzangbé-Adoté M.S., 2004. *Propriétés anthelminthiques de 4 plantes tropicales testées in vitro et in vivo sur les nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants Djallonké*. Thèse doctorat, Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Bénin, p 240.

- Hounzangbé-Adoté M.S., 2000. La pharmacopée en médecine vétérinaire au sud Bénin (cas des ovins et caprins). Colloque Européen d'Ethnopharmacologie du 11 au 13 mai 2000. Société Française d'ethnopharmacologie, Metz.
- Igoli, J.O., Ogaji, O. G., Tor-Anyiin, T.A. , Igoli, N. P., 2005. Traditional medicine practice amongst the Igede people of Nigeria. Part II. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 2 (2), 134-152.
- Igoli, J.O, Igwue, I.C., Igoli, N.P., 2003. Traditional Medicinal Practices amongst the Igede people of Nigeria. *J Herbs Spices Med Plants* 10, 1-10.
- Igoli, J.O., Tor-Anyiin, T.A., Usman, S.S., Oluma, H.O.A., Igoli, N.P., 2002. Folk medicines of the lower Benue valley of Nigeria. *Recent Progress in Medicinal Plants* 7, 327-338.
- Iwu, M.W., Duncan, A.R., Okunji, C.O., 1999. New antimicrobials of plant origin. In: J Janick (ed.), *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA. pp. 457-462.
- Jean-Blain, C., 1998. Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 149, 911-920.
- Jung, Y.D., Ellis, L.M., 2001. Inhibition of tumour evasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *International Journal of Experimental Pathology*, 82, 309-316.
- Kerharo, J., Adam, J.G., 1974. *La pharmacopée Sénégalaise traditionnelle*. Editions Vigot Frères Paris, p. 1011.
- Koupai-Abyazani, M.R., Muir, A.D., Bohm, B.A., Towers, G.H.N., Gruber, M.Y., 1993. The proanthocyanidin polymers in some species of *Onobrychis*. *Phytochemistry* ,34, 113-117.
- Kraus, T.E.C, Zasoski, R.J, Dahlgren, A.R, 2004. Fertility and pH effects on polyphenol and condensed tannin concentrations in foliage and roots. *Plant and Soil* 262, 95-109.
- Lambo, J.O. 1979. *The healing power of herbs with special reference to obstetric and Gynecology in African medicinal* (2nd ed). Ife press Nigeria, pp. 24-27.
- Le Grand, A., Wondergem P.A., Verpoormte, R., Pousset, J.L., 1988. Anti-infectious phytotherapies of the tree savannah of Senegal [West Africa] Antimicrobiol activity of 33 species. *Journal of Ethnopharmacology* 22, 25-31.

- Lees, G.L., Hinks, C.F., Suttill, N.H., 1994. Effect of high temperature on condensed tannin accumulation in leaf tissues of big trefoil (*Lotus uliginosus Schkuhr*). *Journal of the Science of the Food and Agriculture* 65, 415-421.
- Levy, A., Milo, J., Ashri, A., Palevitch, D., 1984. Heterosis and correlation analysis of the vegetative components and ajmalicine content in the roots of the medicinal plant *Catharanthus roseus* L.G. Don. *Euphytica*, 32 : 557-564
- Lim, Y.Y., Lim, T.T., Tee, J.J., 2007. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry* 103, 1003-1008.
- Makkar, H.P., Dawra, R.K., Singh, B., 1991. Tannin levels in leaves of some oak species at different stages of maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54, 513-519.
- Malgras, D., 1992. *Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes*. Edits. Karthala, Paris, pp, 315-316.
- Manolaraki, F., 2011. Propriétés anthelminthiques du sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) : Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués. Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse III, Toulouse.
- Mara, S.P., Arruda Jao, B., Fernandes Paulo, C., Viera, M., Fatima Das, G.F., Da Silva Jose, R.P. 1992. Chemistry of *Zanthoxylum rhoifolium*. A new secofuraquinoline alkaloids. *Biochem. System Ecol.* 20 ,173-178.
- Marais, J.P.J., Mueller-Harvey, I., Brandt, E.V., Ferreira, D., 2000. Polyphenols, condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3440-3447.
- Mass, A., 1991. Inventaire des produits traditionnels contre la diarrhée des petits ruminants. Enquête dans le département du Mono. Rapport de stage. Direction de la recherche agronomique. Projet de recherche appliquée en milieu réel. République du Bénin, Ministère du développement rural, p. 39.
- Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 2010-2037.

- Mueller-Harvey, I., Mark Allan, A.B., 1992. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology* 1, 151-217.
- Ngassoum, M. B., Essia-Ngang, J. J, Tatsadjieu, L. N., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Adjoudji, O., 2003. Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon in *Fitoterapia*, 74, 284-287
- Ngbede, J. , Yakubu, Z.R.A. , Nyam, D.A., 2008. Phytochemical Screening for Active Compounds in *Canarium schweinfurthii* (Atile) leaves from Jos North, Plateau State, Nigeria. *Research Journal of Biological Sciences* 3 (9) , 1076-1078.
- Norton, B.W., 1999. The significance of tannins in tropical animal production. In: *Tannins in livestock and human nutrition: ACIAR Proceedings of International Workshop*, Brooker, (Ed), Adelaide, Australia, 92, 14-23,.
- Ogunlana, E.O., Ramstard, E., 1975. Investigations into the antibacterial activities of local plants *Planta Medica* 72, 347-354
- Ogunwolu E.O., Odunlami, A.T. , 1996 . Suppression o f seed bruchid (*Callosobruchus maculatus* F.) development and damage on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) with *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Waterm. (Rutaceae) root bark powder when compared to neem seed powder and pirimiphos-methyl. *Crop Protection*, 15: 603-607.
- Ogwal-Okeng, J.W., Obua, C., Anokbonggo, W.W. 2003. Acute Toxicity. Effects of Methanolic Extract of *Fagara chalybeum* Root Bark. *African Health Sciences* 3, 124-126.
- Orou, B., 2009. Inventaire des plantes antiparasitaires des animaux dans trois zones agro climatiques du Bénin et les caractéristiques dendrométriques de quatre plantes dans le bas Bénin. Mémoire d'Ingénieur Agronome de l'Université d'Abomey-Calavi, Bénin
- Paris, R., Moysse Mignon , H.,1947 . Etude préliminaire du *Fagara Xanthoxyloïdes* Lam. *Ann Pharma fr*, 5, 410-420
- Reda, F., 1978. Distribution and accumulation of alkaloids in *Catharanthus roseus* G. Don during development. *Pharmazie*, 33 , 233-234
- Richelle, M., Tavazzi, I., Offord, E., 2001. Comparison of the antioxidant activity of commonly beverages (coffee, cacao, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3438-3442.

- Roig, J.T., 1988. Plantas medicinales, aromáticas O Venenosas de Cuba. Editorial científico Taenica.
- Sanusi, S.S., Rabo, E.T., 2004. An inventory of Medicinal plant the Nigeria Savannah Leviathan book Lagos, pp. 21- 24.
- Setzer, W.N., Noletto, J.A., Lawton, R.O., Haber, W.A., 2005. Leaf essential oil composition of five *Zanthoxylum* species from Monteverde, Costa Rica. Mol Divers. 9, 3-13.
- Sofowara, A., 1993. Medicinal plants and Traditional medicine in Africa. Spectrum Books Ltd, Ibadan, Nigeria, p. 289.
- Song, J.H., Kim, S.-K., Chang, K.-W., Han, S.K., Yi, H.K., Jeon, J.G., 2006. *In vitro* inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Archives of Oral Biology 51, 1131-1140.
- Song, J.M., Lee, K.H., Seong, B.L., 2005. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. Antiviral Research 68, 66-74.
- Tiemann, T.T, Franco, L.H, Ramírez, G, Kreuzer, M, Lascano, C.E, Hess, H.D, 2010. Influence of cultivation site and fertilisation on the properties of condensed tannins and *in vitro* ruminal nutrient degradation of *Calliandra calothyrsus*, *Flemingiamacrophylla* and *Leucaena leucocephala*. Animal Feed Science and Technology 157,30-40.
- Tor-Anyiin, T.A., Shaato, R., Oluma, H.O.A., 2003. Ethnobotanical survey of Antimalarial medicinal plants amongst the Tiv People of Nigeria. J Herbs Spices Med Plants, 10, 61-74.
- Tra-Bi, F.H., 1997. Utilisation des plantes par l'homme, dans les forêts classées du Haut-Sassandra et de Scio, en Côte-d'Ivoire. Thèse de 3^{ème} Cycle, Université de Cocody, Abidjan, p. 215.
- Trease, G.E., Evans, W.C., 2002. Pharmacognosy, 15th Ed. Saunders Publishers. Ltd., London. pp. 42-393.
- Feucht, W., D. Treutter, 1999. The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defence. In: S. Inderjit, K.-M.-M. Dakshini, C.-L. Foy (eds.): Principles and Practices in Plant Ecology, pp. 307-338. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Treutter, D., 1989. Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. J. Chromatography 467, 185-193.

- Treutter, D., Santos-Buelga, C., Gutmann, M., Kolodziej, H., 1994. Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high-performance liquid chromatography and chemical reaction detection. *Journal of Chromatography* 667, 290-297.
- Tringali, C., Carmela, C., Valeria Cali, V., 2001. Simmonds M.S.J. Antifeedant constituents from *Fagara macrophylla*. *Fitoterapia* 72, 538-543.
- Usman, H. , Osuji, J.C., 2007. Phytochemical and in vitro antibacterial assay of the leaf extract of *Newbouldia laevis*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 4: 476-480.
- Usman , H., Haruna, A.K., Akpulu, I.N., Ilyas, M., Ahmadu, A.A., Musa, Y.M., 2005. Phytochemical and Antimicrobial Screenings of the leaf Extracts of *Celtis integrifolia* Lam. *J. Trop. Biosci* , 5 (2),72-76.
- Van-Burden, T.P., Robinson, W.C., 1981. Formation of complexes between protein and Tannin acid. *J. Agric. Food Chem*, 1-77.
- Vitti, D.M.S.S, Nozella, E.F, Abdalla, A.L, Bueno, I.C.S, Filho, J.C.S, Costa, C., Bueno, M.S, Longo, C., Vieira, M.E.Q, Filho, S.L.S.C, Godoy, P.B, Mueller-Harvey, I., 2005. The effect of drying and urea treatment on nutritional and anti-nutritional components of browses collected during wet and dry seasons. *Animal Feed Science and Technology* 122, 123-133.
- Vu, T. D., 2008. Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez *Datura innoxia* Mill. cultivé en conditions hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques. Thèse de doctorat en Sciences agronomiques, INPL.
- Waterman, P.G., 1999. The tannins an overview. In : *Tannins in livestock and human nutrition: ACIAR Proceedings of International Workshop*, Brooker, (Ed.), Adelaide, Australia , p. 10–13.
- Williamson, E.M., Okpako , D.G., Evan F.J., 1996. *Pharmacological methods in phytotherapy research*. Vol. 1 selection. Preparation and pharmacological evaluation of plant material. John Wiley and Sons Ltd. Chichester. England, pp. 9-13.

- Woodward, A., Coppock, D.L., 1995. Role of plant defense in the utilization of native browse in southern Ethiopia. *Agroforestry Systems* 32, 147-161.
- Yamaguchi, K., Honda, M., Ikigai, H., Hara, Y., Shimamura, T., 2002. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Research* 53, 19-34.
- Zimmer, N., Cordesse, R. 1996. Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Prod. Anim.* 9 (3), 167-179.

Table 1. Review of the various medicinal uses of the studied plants

Species, Family, Local plant name	Traditional use	Reference
<i>Z. zanthoxyloides</i> Rutaceae Fon-Goun : Hê Yoruba-Nagot : Igui ata	It has been commonly used against human and animal parasites	Arbonier, 2004
	Leaves have been used as tea against inflammatory diseases, anaemia, contraceptive and against malaria.	Ogunwolu et al., 1996; Ogwali-Okeng, 2003; Chaaïb, 2004; Igoli et al., 2005
	Roots and stems have been used to treat jaundice, sore throat, hemorrhoids, gastroenteritis, dysentery, gonorrhoea and as vermifuge	Malgras, 1992; Chaaïb, 2004; Mass, 1991 ; Hounzangbé-Adoté, 2004
	Root bark and leaves are used as anti-odontalgic , to treat stomatitis, gingivitis, dental caries and for tooth friction	Malgras, 1992; Chaaïb, 2004
	Diarrhoea, Gastrointestinal disorders	Roig, 1988; Hounzangbé-Adoté, 2000
	antifungal	Diéguez-Hurtado et al. 2003
	Leaves are used against cough, infertility,	Burkill, 1985; Adjanahoun et al, 1991; Igoli et al, 2002; Igoli et al, 2003; Tor-Anyiin et al, 2003
	Treatment of diarrhoea, icterus, malaria Remedy for dysentery,	Burkill, 1985 ; Gbeassor et al., 1990 ; Tra-Bi, 1997
	Employed against sexually	Ayensu, 1978; Abbiw, 1990;

<i>N. laevis</i>	transmitted disease, dental caries, arthritis pain, gastroenteritis, dysentery and as vermifuge	Mass, 1991; Hounzangbé-Adoté, 2004; Eyong et al., 2005
Bignoniaceae		
Goun-Mina: Kpatima, Desretin	Sedative in rats , antifungal , antibacterial properties, in the fight against trypanosomiasis	Gafner et al. 1996 ; Amos et al., 2002
Yoruba-Nagot: Igi Akôkô	Hepatoprotective, antioxidant properties	Hassan et al. 2010
Tcha de Bantè: Akôkô	Treatment of breast cancers	Burkill, 1985 ; Azuine et al. 1995
Adja: Desre, Aflama, Avenyon	gastrointestinal disorders	Hounzangbé-Adoté , 2000
Waci: Hwenma	Antibacterial, antineoplastic activities	Ogunlana and Ramstard, 1975 ; Le Grand et al. 1988
Bariba: Deebu		
Kotafon: Desre	Exudates from scrapings of inner root bark squeezed onto wound dressing and circumcision	Burkill, 1985 ; Adjanahoun et al., 1991 ; Igoli et al., 2002 ; Tor-Anyiin et al., 2003 ; Igoli et al., 2003 ;

Table 2. Qualitative phytochemical analysis of the medicinal plants for rainy season

Rainy season	MONO (Azove)		OUEME (Adjarra)		ATLANTIC (Abomey-Calavi)		ZOU (Bohicon)	
	Nb	Zz	Nb	Zz	Nb	Zz	Nb	Zz
Tannins	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoids	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponins	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyanogenic glycosides	-	-	-	-	-	-	-	-
Alkaloids	+	+	+	+	+	+	+	+
Cardiac glycosides	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinones	+	-	+	-	+	-	+	-
Volatile oil	-	-	+	+	+	+	+	+

Key: + = Presence of constituent; - = Absence of constituent;

Nb: *N. laevis* ; Zz: *Z. zanthoxyloides*

Table 3. Qualitative phytochemical analysis of the medicinal plants for dry season

Dry season	MONO (Azove)		OUEME (Adjarra)		ATLANTIC (Abomey-Calavi)		ZOU (Bohicon)	
	Nb	Zz	Nb	Zz	Nb	Zz	Nb	Zz
Tannins	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoids	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponins	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyanogenic glycosides	-	-	-	-	-	-	-	-
Alkaloids	+	+	+	+	+	+	+	+
Cardiac glycosides	+	-	+	-	+	-	+	-
Quinones	+	-	+	-	+	-	+	-
Volatile oil	-	-	+	+	+	+	+	+

Key: + = Presence of constituent; - = Absence of constituent;

Nb: *N. laevis* ; Zz : *Z. zanthoxyloides*

Table 4. Percentage of crude phenols, tannins, flavonoids, alkaloids and essential oil in the medicinal plants investigated during rainy seasons.

Area and season	Plants	Rainy seasons				
		P (%)	T(%)	F(%)	A(%)	Eo(%)
MONO	Nb	0.25±0.04	01.00±0.07	0.11±0.10	0.12±0.07	0.00±0.01
	Zz	0.15±0.04	01.14±0.08	0.07±0.06	0.11±0.08	0.00±0.01
OUEME	Nb	0.13±0.05	12.08±0.20	0.70±0.14	3.03±0.05	0.04±0.02
	Zz	0.20±0.02	14.77±0.26	1.47±0.11	3.64±0.30	0.59±0.05
ATLANTIC	Nb	0.06±0.01	10.02±0.19	0.72±0.05	1.24±0.19	0.08±0.02
	Zz	0.27±0.02	12.72±0.28	0.84±0.03	2.24±0.19	0.67±0.15
ZOU	Nb	0.05±0.01	12.03±0.02	0.58±0.02	3.11±0.11	0.05±0.01
	Zz	0.44±0.20	11.75±0.17	0.73±0.07	4.14±0.20	0.63±0.04

Nb : *N. laevis* ; Zz : *Z. zanthoxyloides* ; A : Alkaloids ; F : Flavonoids ; P : Phenols ; T : Tannins ; Eo : Essential oil

Table 5. Percentage of crude phenols, tannins, flavonoids, alkaloids and volatile oil in the medicinal plants investigated during dry seasons

Area and season	Plants	Dry seasons				
		P (%)	T(%)	F(%)	A(%)	Eo(%)
MONO	Nb	0.25±0.04	0.13±0.12	0.07±0.11	0.12±0.07	0.00±0.01
	Zz	0.13±0.08	0.01±0.02	0.07±0.11	0.06±0.05	0.00±0.01
OUEME	Nb	0.11±0.02	7.97±0.10	0.67±0.08	2.16±0.07	0.01±0.02
	Zz	0.15±0.02	9.74±0.28	0.79±0.15	2.69±0.31	0.46±0.20
ATLANTIC	Nb	0.08±0.06	6.49±0.08	0.42±0.05	0.24±0.09	0.04±0.02
	Zz	0.22±0.15	10.16±0.33	0.61±0.03	5.37±0.31	0.33±0.01
ZOU	Nb	0.04±0.02	9.97±0.11	0.50±0.05	2.12±0.10	0.05±0.1
	Zz	0.44±0.11	8.93±0.28	0.67±0.11	3.38±0.39	0.52±0.08

Nb : *N. laevis* ; Zz : *Z. zanthoxyloides* ; A : Alkaloids ; F : Flavonoids ; P : Phenols ; T : Tannins ; Eo : Essential oil

CHAPITRE III : IDENTIFICATION DES FRACTIONS
ACTIVES ET QUANTIFICATION DES GROUPES
CHIMIQUES RESPONSABLES DE L'ACTIVITE
ANTHELMINTHIQUE DE *N. LAEVIS* ET *Z.*
ZANTHOXYLOIDES

3. Identification des fractions actives, quantification des groupes chimiques responsables de l'activité anthelminthique de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloides*

3.1. Introduction

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels de domaines tels que la biotechnologie et la chimie computationnelle. Cela tient principalement au fait que le règne végétal est une source inépuisable d'une immense variété de médicaments potentiels, tout en étant accessible au plus grand nombre. De plus, cette science évolue et s'affine sans cesse avec l'amélioration des instruments d'investigation (méthodes préparatives et analytiques, tests de dépistage d'activité) et de l'accès à l'information scientifique (Ferrari, 2002). La pharmacognosie et la phytochimie sont donc en totale adéquation avec les objectifs d'une recherche moderne de composés à visée thérapeutique. «Le chemin qui mène de la plante à ses constituants purs est très long» (Hostettmann, 1997). Cette affirmation démontre à elle seule l'importance d'une prise en charge rationnelle du matériel végétal, dès qu'il a été sélectionné pour l'investigation phytochimique. Pour ce faire, le phytochimiste a, à sa disposition, des méthodes d'évaluation des extraits bruts, qui sont regroupées dans les classes suivantes: criblages chimique, biochimique et biologique. Un autre critère de choix, parfois oublié, mais qui peut se révéler de la première importance, est la quantité d'extrait brut à disposition. Quoi de plus frustrant en effet, que d'entreprendre le long fractionnement d'un extrait, pour finalement constater qu'il fallait plus de matériel pour isoler des quantités suffisantes à l'identification des composés purs (Ferrari, 2002). Le but de ce travail est d'identifier les molécules responsables de l'activité anthelminthique de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloides*

3.2. Matériel et Méthodes

3.2.1. Matériel végétal

Les feuilles des plantes de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloides* ont été récoltées matures de Juillet à Octobre 2008 et authentifiées à l'Herbier National de l'Université d'Abomey-Calavi, respectivement sous les numéros **AA 6301 / HNB** et **AA 6302 / HNB**. Elles ont été séchées en salle climatisée (23 °C) pendant 7 jours et sont ensuite réduites en poudre dans un broyeur

ultracentrifugeuse de type ZM/RETSH (Tamis Inox 0,12 mm Po). Les poudres de feuilles ainsi obtenues sont conservées dans un bocal hermétique à la température ambiante.

3.2.2. Matériel animal

En vue de préparer l'étude de ces deux plantes sur des strongles d'importance médicale, une étude rétrospective (2004–2008) portant sur 10237 échantillons de selles et une étude prospective sur 77 échantillons frais ont été menées. Il en ressort que l'anguillule se retrouve dans une faible proportion de 0,6% [Fatondé et Togbé, 2009]. Ce résultat justifie l'indisponibilité de *S. stercoralis*. D'où le choix de travailler sur le modèle murin proche, *S. ratti* chez le rat.

3.2.2.1. Production de larves d'anguillule

Les larves de *S. stercoralis* ont été obtenues à partir de la matière fécale d'un patient, mise en culture sur charbon à température de 23°C pendant 5 jours. Les larves ont ensuite été extraites de la masse fécale par le dispositif de Baermann.

Les larves de rats (*S. ratti*) sont obtenues par coproculture à partir de matières fécales des rats Wistar donneurs préalablement infestés artificiellement par des souches pures de parasites (*S. ratti*), laissées en culture à température variante entre 26°C à 28°C pendant 5 jours. Les larves sont ensuite extraites de la masse fécale par le dispositif de Baermann dont le principe repose sur l'hygrotopisme des larves. Les larves L₃ obtenues seront maintenues à une température ambiante.

3.2.2.2. Production de larves infestantes de nématodes d'ovins

Les larves infestantes (L₃) ont été obtenues par coproculture à partir de matières fécales d'animaux donneurs préalablement infestés artificiellement par des souches pures des 2 espèces étudiées (*H. contortus* ou *T. colubriformis*), laissées en culture à température ambiante pendant 10 jours. Les larves ont ensuite été extraites de la masse fécale par le dispositif de Baermann dont le principe repose sur l'hygrotopisme des L₃s. Les larves de parasites obtenues seront maintenues à une température de +4°C.

3.2.3. Criblages chimique, biochimique et biologique générale des plantes étudiées

3.2.3.1. Etude de l'influence de la variabilité polaire des solvants d'extraction

3.2.3.1.1. Préparation des extraits bruts de plantes

- **Extraction aqueuse**

L'extrait aqueux a été obtenu par macération. 50 grammes de poudre de feuilles de chacune des plantes ont été laissés en contact prolongé avec 500 mL d'eau distillée à température ambiante pour en extraire les principes actifs. L'opération est reprise deux fois et après filtration, l'eau distillée est évaporée sous pression haute à 50 °C et l'extrait aqueux brut obtenu est lyophilisé.

- **Extraction méthanolique**

L'extraction est effectuée de la manière suivante : 50 grammes de poudre de feuilles sont transvasés dans un ballon de 1L pourvu d'un col rodé. On a ajouté 500 mL d'éthanol absolu et un barreau aimanté. Après avoir adapté le réfrigérant à reflux, l'ensemble est chauffé à ébullition sous agitation magnétique pendant une heure. Le chauffage est arrêté et la solution est refroidie puis filtrée. L'opération est reprise deux fois et le méthanol est évaporé sous pression réduite à la température $T = 40^{\circ}\text{C}$. L'extrait méthanolique sec obtenu est lyophilisé.

- **Extraction à l'acétate d'éthyle**

La procédure d'extraction est la suivante : 50 grammes de poudre de feuilles sont transvasées dans un ballon de 1L pourvu d'un col rodé. On a ajouté 500 mL d'acétate d'éthyle et un barreau aimanté. Après avoir adapté le réfrigérant à reflux, l'ensemble est chauffé à ébullition sous agitation magnétique pendant une heure. Le chauffage est arrêté et la solution est refroidie puis filtrée. L'opération est reprise deux fois et l'acétate d'éthyle est évaporé sous pression réduite à la température $T = 50^{\circ}\text{C}$. L'extrait acétate d'éthyle sec obtenu est lyophilisé.

- **Extraction cyclohexanique, chloroformique, éthanolique et acétonique**

L'extraction a été faite par le Cyclohexane dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux et chauffé au bain-marie sous agitation magnétique. 50 g de poudre de feuilles sont

transvasées dans un ballon de 1L pourvu d'un col rodé. On a ajouté 500 mL du Cyclohexane et un barreau aimanté. Après avoir adapté le réfrigérant à reflux, l'ensemble est chauffé à ébullition sous agitation magnétique pendant une heure. Le chauffage est arrêté et la solution est refroidie puis filtrée. L'opération est reprise deux fois de suite. Le cyclohexane est évaporé sous pression réduite à la température $T = 40^{\circ}\text{C}$. L'extrait Cyclohexanique sec obtenu est lyophilisé. Le résidu recueilli est pesé, puis remis à reflux et chauffé au bain-marie sous agitation magnétique pendant une heure dans 500 mL de chloroforme. Le chauffage est arrêté et la solution est refroidie puis filtrée. L'opération est reprise deux fois de suite et le chloroforme est évaporé sous pression réduite à la température $T = 40^{\circ}\text{C}$. L'extrait chloroformique sec obtenu est lyophilisé. Le résidu recueilli est pesé, puis remis à reflux et chauffé au bain-marie sous agitation magnétique pendant une heure dans 500 mL d'éthanol absolu. Le chauffage est arrêté et la solution est refroidie puis filtrée. L'opération est reprise deux fois de suite et l'éthanol est évaporé sous pression réduite à la température $T = 40^{\circ}\text{C}$. L'extrait éthanolique sec obtenu est lyophilisé. Le résidu recueilli est pesé, puis remis à reflux et chauffé au bain-marie sous agitation magnétique pendant une heure dans 500 mL d'acétone-eau (70 : 30). Le chauffage est arrêté et la solution est refroidie puis filtrée. L'opération est reprise deux fois de suite et enfin l'acétone et l'eau sont évaporés sous pression réduite à la température $T = 40^{\circ}\text{C}$. L'extrait acétonique sec obtenu est lyophilisé. De manière générale, les extraits ont été obtenus selon le schéma de la figure x avec divers solvants.

3.2.3.1.2. Caractérisation qualitative

Une première analyse des extraits bruts a été effectuée par chromatographie sur couche mince (CCM), en phase normale avec des plaques de Silicagel 60 F254 déposées sur feuille d'aluminium (Merck), ce qui constitue la phase stationnaire. Ces plaques sont ensuite plongées dans des cuves conventionnelles en verre (Camag), remplies à environ 0,5 cm avec une phase mobile, qui peut être généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, selon le type de séparation recherchée. Dans notre cas, les systèmes de solvants ainsi que les réactifs chimiques spécifiques utilisés pour les différentes classes de composés sont les suivants : Extrait Chloroformique [CHCl_3 -MeOH (80:20)] ; Extrait Méthanolique [CHCl_3 -MeOH- H_2O (65:35:5)]; Extrait Acétonique [CHCl_3 -MeOH (95:5)]. Les observations sous

UV à 254 nm et 336 nm, après révélation avec des réactifs chimiques spécifiques (cf infra), permettent d'avoir une première idée des classes des composés présents car certains composés présentent un spectre UV caractéristique et sont facilement détectables dans l'extrait brut (ex : Flavonoïdes). D'autre part, certains fragments spécifiques apportent des informations supplémentaires pour déduire la structure de base de ces substances.

Vanilline sulfurique (Révélateur universel) : Ce réactif à l'arge spectre permet la détection des terpenoïdes, des dérivés de type phenylpropane et des phénols. Il est obtenu à partir du mélange (v/v) d'une solution éthanolique d'acide sulfurique et d'une solution éthanolique de vanilline à 1%. Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110 °C pendant 1 minute environ. Les colorations apparues sur la plaque varient selon le type de composés.

Réactif de NEU : NP/PEG : Ce réactif est préparé à partir de 2 solutions : une solution 1 méthanolique de diphenylboryloxyéthylamine et une solution 2, éthanolique de polyéthylène glycol à 5%. Pour préparer ces solutions, on dissout 1,5 g de diphenylboryloxyéthylamine et 2,5 g de polyéthylène glycol, respectivement dans 50 ml de méthanol et 50 ml d'éthanol. Les solutions sont conservées à 4°C. La réaction est positive lorsqu'on observe une fluorescence en UV à 365 nm après pulvérisation des deux réactifs :

Réactif de Dragendorff selon Munier : composés azotés et alcaloïdes ; Ce réactif permet de repérer les alcaloïdes qui apparaissent sous forme de taches orange (Wagner et Bladt, 1996).

Chlorure de fer III (Réactif caractéristique des composés phénoliques) ; Ce réactif est préparé à partir d'une solution de chlorure de fer III (1 à 5% dans de l'acide chlorhydrique 0,5 N). Après vaporisation, les zones correspondant aux phénols se colorent en bleu ou virent sur le vert.

3.2.3.1.3. Dosage des phénols totaux et les tanins totaux

Le dosage des tanins a été effectué par différentes méthodes : la méthode de Diffusion Radiale (Hagerman, 1987) et la Pharmacopée Européenne (2011)

Les phénols totaux (TP) et les tannins totaux (TT) ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu (Makkar *et al.*, 1995 ; Brunéton, 1999 ; Makkar, 2000 ; Makkar, 2003; Schofield *et al.*, 2001)

3.2.3.1.4. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les analyses sur couches mince sont réalisées sur plaques d'aluminium avec deux supports différents : En phase normale, ont été utilisées des plaques recouvertes d'un gel de silice Silicagel 60 F254 (Merck) et en phase inverse, les plaques ont été recouvertes d'un gel de silice Silicagel 60 RP-18 F254S (Merck). Le développement des plaques a été réalisé dans les cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm). Le réactif utilisé pour la révélation des plaques a été dans ce cas la vanilline sulfurique qui a été préparée comme il est décrit ci-dessus.

3.2.3.1.5. Chromatographie sur colonne ouverte et flash (CC)

Les chromatographies sur colonnes ont été réalisées avec plusieurs types de phases stationnaires dans des colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et la résolution souhaitée. Les phases stationnaires utilisées ont été du gel de silice 60 Å 40-63 µm (Merck) et du gel de silice 60 Å RP-18 40-60 µm (Merck). La quantité de silice utilisée est généralement 30 à 40 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. Les échantillons à fractionner ont été déposés sous forme solide mélangé avec la silice ou sous forme liquide.

3.2.3.1.6. Chromatographie liquide sous moyenne pression (MPLC)

Le fractionnement du Totum alcaloïdique a été entrepris en utilisant la chromatographie liquide sous moyenne pression (MPLC). Cette chromatographie a été réalisée à l'aide d'une pompe Büchi 688, sur colonnes de chromatographie moyenne pression en verre Büchi ®. Comme phase stationnaire, il a été utilisé un gel de silice 60 Å 6-35 µm (SDS). Le Totum a été introduit sous forme solide, mélangé à la phase stationnaire. La colonne a été éluée avec un débit compris entre 10 et 20 mL/min et la pression a été en moyenne de 2 Bars.

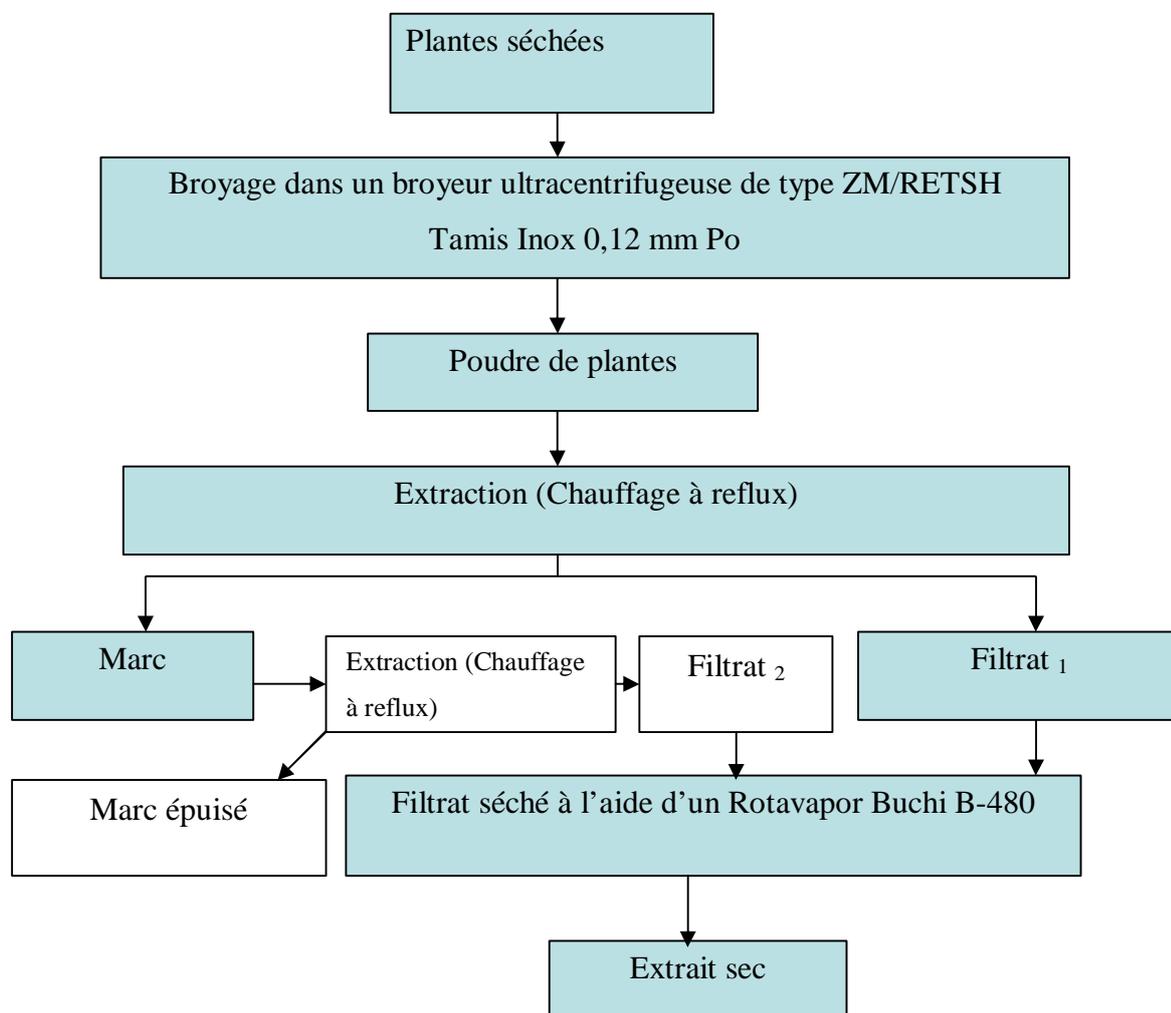


Figure 40 : Schéma général de l'extraction des plantes

3.2.3.2. Fractionnement liquide / liquide

3.2.3.2.1. Fractionnement de l'extrait brut chloroformique

Le résidu sec chloroformique est repris avec 150 ml d'acide chlorhydrique (type A–Fisher) à 5 % au pH₃ puis transvasé dans une ampoule à décanter de 1000 ml. On a ajouté 50 ml d'éther de pétrole. La phase étherée qui contient les graisses est éliminée. La phase aqueuse a été lavée avec deux fois 50 ml d'éther de pétrole. La phase aqueuse acide contenant les alcaloïdes a été basifiée par l'ammoniaque officinale à 32 % au pH₉. La solution alcaline est extraite par quatre fois 150 ml de chloroforme, et laissée reposer pendant 15 minutes à la température ambiante. La phase chloroformique a été évaporée à sec sous vide à 40 °C par un Rotavapor type Bruchi. Le résidu sec, constitué d'alcaloïdes totaux, a été pesé puis repris par le méthanol à 5% pour les tests biologiques. La phase étherée est récupérée puis l'éther de pétrole a été évaporé à sec sous vide à 40 °C par un Rotavapor type Bruchi. Le résidu sec, a été pesé puis repris par le méthanol à 5% pour les tests biologiques. La figure 41 illustre le schéma général de l'obtention des alcaloïdes

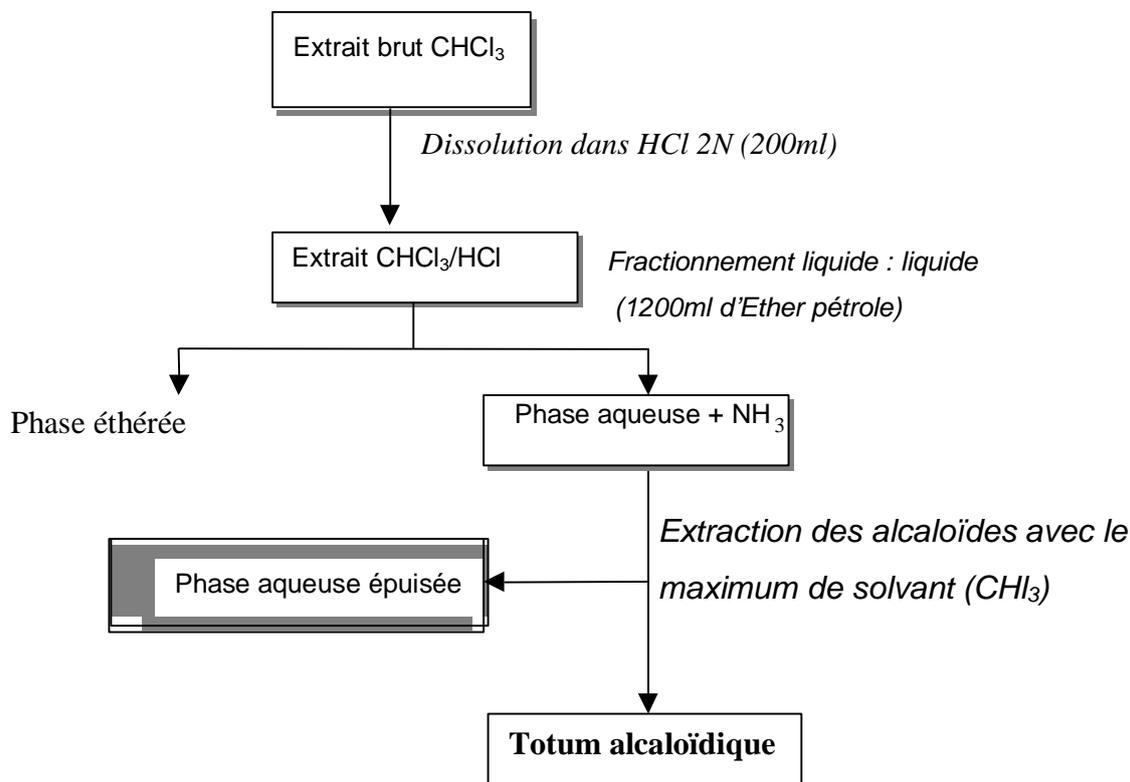


Figure 41 : Schéma général de l'obtention des alcaloïdes

3.2.3.2.2. Fractionnement de l'extrait brut acétonique

L'extrait sec acétonique est dissout dans 50 ml d'eau distillée. La solution aqueuse obtenue est lavée trois fois au dichlorométhane pour éliminer les pigments et les lipides. Le dichlorométhane est évaporé sous pression réduite à la même température. La solution aqueuse obtenue est lavée trois fois à l'acétate d'éthyle. L'acétate d'éthyle est évaporé sous pression réduite à la même température. Enfin, la phase aqueuse est congelée (-70°C), puis lyophilisée et la fraction sèche obtenue est constituée d'un assemblage de **tannins** ayant un poids moléculaire élevé. La figure 42 illustre le schéma général de l'obtention des tanins

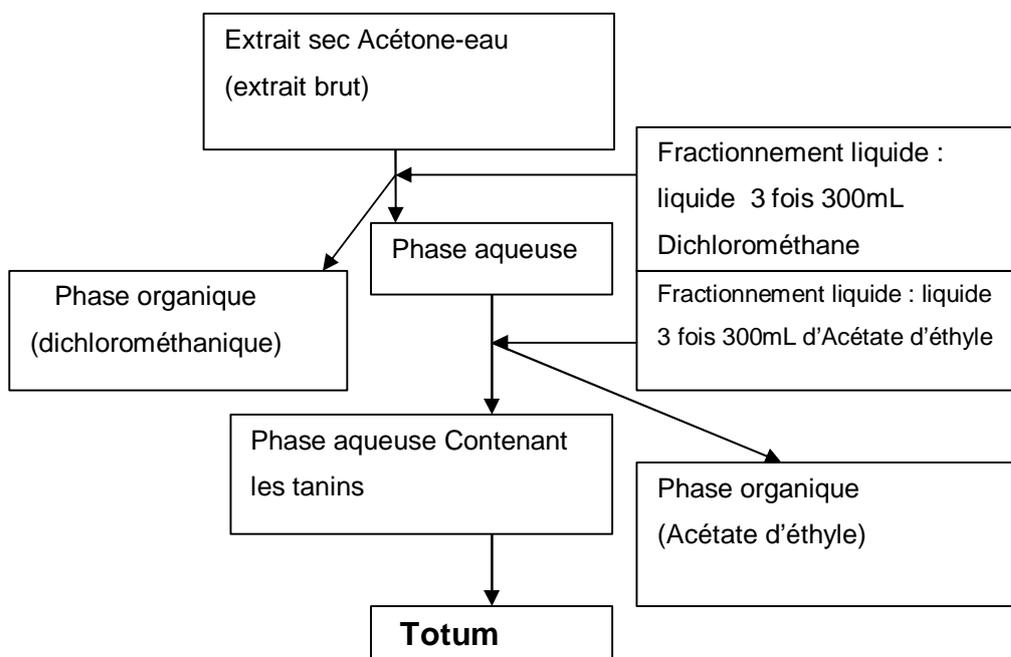


Figure 42 : Schéma général de l'obtention des tanins

3.2.3.2.3. Activité biologique des extraits et fractions de plantes

Les 14 extraits bruts et les 6 fractions obtenus ont également été soumis aux tests biologiques (tests d'inhibition de la Migration (Rabel *et al.*, 1994) et du Dégainement [Bahuaud *et al.*, 2006] des larves L₃ des nématodes parasites gastro-intestinaux. (*H. contortus*, *T.*

colubriformis, *S. stercoralis* et *S. ratti*.) menés en routine dans notre laboratoire, afin de déterminer leur potentiel bioactif.

Pour mettre en évidence l'effet des tanins dans la migration et dans le dégainement larvaire, les extraits ont été mis en contact pendant 2 heures dans un rapport de 1:50 avec la polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) qui a la propriété de capter les molécules de tanins, bloquant ainsi leur action (Makkar, 2006). Les solutions ont ensuite été centrifugées (4500 RPM, 5 min, 20 °C) avant d'être mises en contact avec des larves

3.2.4. Résultats

3.2.4.1. Préparation des extraits bruts

Dans le présent travail, 14 extraits bruts ont été préparés à partir des feuilles de *N laevis* et *Z. zanthoxyloïdes*. Le résultat de ces extractions est présenté dans le Tableau 8

Tableau 8 : Extraits préparés à partir des feuilles de *N laevis* et *Z. zanthoxyloïdes*

Plantes	Partie utilisée	Extraction	Rendement (%)
<i>N. laevis</i>	Feuilles	Aqueuse	14,24±0,67
		Méthanol	07,90±0,78
		Acétate d'éthyle	07,32±0,56
		Acétonique	05,3 ±0,40
		Ethanolique	12,88 ±0,70
		Chloroformique	09,71 ±0,86
		Cyclohexanique	08,52±0,87
<i>Z. zanthoxyloïdes</i>	Feuilles	Aqueuse	15,13 ±0,79
		Méthanol	12,40 ±0,47
		Acétate d'éthyle	07,19 ±0,30
		Acétonique	09,79 ±0,43
		Ethanolique	12,64 ±0,56
		Chloroformique	10,22 ±0,35
		Cyclohexanique	10,98 ±0,71

3.2.4.2. Préparation des fractions

6 fractions ont été préparés à partir des extraits chloroformique, acétonique et éthanolique des feuilles de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes*. Le résultat de ce fractionnement est présenté dans le Tableau 9

Tableau 9 : Fractions préparées à partir des feuilles de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes*

Plantes	Partie utilisée	Extraits bruts	Totum	Rendement (%)
<i>N. laevis</i>	Feuilles	Trichlorométhanolique	Alcaloïde	0,26 ± 0,02
		Acétonique	Tanin	1,51 ± 0,06
		Ethanolique	Flavonoïde	0,34 ± 0,04
<i>Z. zanthoxyloïdes</i>	Feuilles	Trichlorométhanolique	Alcaloïde	0,21 ± 0,04
		Acétonique	Tanin	2,06 ± 0,11
		Ethanolique	Flavonoïde	0,92 ± 0,04

L'analyse sur plaque TLC a permis de mettre en évidence la présence de flavonoïdes dans tous les extraits bruts apolaires étudiés. Dans les extraits bruts polaires, de nombreux glycosides de flavonoïdes ont été détectés. La révélation des plaques TLC au chlorure de fer a montré la présence systématique, dans les extraits bruts polaires, de tanins sur la ligne de dépôt (coloration rouge) (Wagner et Bladt, 1996). Bien que les tanins ne soient pas encore isolés de chacune des plantes étudiées, leur présence peut être révélée par ce biais. L'observation des plaques TLC après vaporisation du réactif de Dragendorff a permis de mettre en évidence des alcaloïdes dans les extraits étudiés.

3.2.4.3. Séparation des tanins

Pour la séparation du Totum tanique des deux plantes tropicales étudiées, les différentes méthodes chromatographiques utilisées ont échoué. Cet échec est peut être lié au poids moléculaire très élevé des tanins présents. Pour cette raison la teneur en tanins dans chacune des plantes a été déterminée

3.2.4.4. Détermination de la teneur en tanins

La teneur en acide tannique pour 100 grammes de plante est équivalente à $1,24 \pm 0,24$ g pour *Z. zanthoxyloïdes* et $1,70 \pm 0,46$ g pour *N. laevis*. L'observation des disques de précipitation révèle que contrairement à *Z. zanthoxyloïdes* et aux autres plantes qui présente un disque unique et homogène, *N. laevis* présente deux disques superposés de couleur différente. Les composés polyphénoliques des deux extraits de plantes : les TP et TT ont été respectivement de 5,40 et 1,18 equiv. g d'acide tannique pour *N. laevis* et 7,76 et 3,19 equiv. g d'acide tannique pour *Z. zanthoxyloïdes*.

3.2.4.5. Séparation des alcaloïdes

Les différentes méthodes chromatographiques utilisées nous ont permis d'obtenir 6 profils chromatographiques à partir du Totum alcaloïdique de *N. laevis*. La chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant comme révélateur la vanilline sulfurique, montre après observation en lumière visible et sous UV (254 et 336 nm) une tache mais le spectre de masse montre que les molécules obtenues ne sont pas pures et qu'elles nécessitent des étapes de purifications supplémentaires. La purification des 5 profils chromatographiques du totum alcaloïde de *N. laevis* et la séparation du totum alcaloïdique de *Z. zanthoxyloïdes* sont en cours.

3.2.4.6. Criblage biologique et biochimique général

Les tableaux 18, 19, 20 et 21 présentent les résultats du criblage biologique opéré sur les fractions et extraits bruts préparés.

Tableau 10 : Effet des alcaloïdes, des extraits bruts des feuilles des plantes étudiées sur *S. ratti*

Plantes	Partie utilisée	Totum (1200 µg/mL)	Inhibition de l'éclosion (%)
<i>N. laevis</i>	Feuilles	Alcaloïde	47,24
		Tanin	33,56
		Flavonoïde	36,98
<i>Z. zanthoxyloïdes</i>	Feuilles	Alcaloïde	42,28
		Tanin	28,19
		Flavonoïde	37,82

Tableau 11: Variation de l'inhibition de la migration larvaire en fonction du solvant d'extraction

Plantes	Partie utilisée	Extrait (1200 µg/mL)	Inhibition de la migration larvaire (%)			
			<i>H. contortus</i>	<i>T. colubriformis</i>	<i>S. stercoralis</i>	<i>S. ratti</i>
<i>N. laevis</i>	Feuilles	Acétonique	30,47	20,96	-6,42	22,97
		Ethanolique	46,22	38,38	-	23,29
<i>Z. zanthoxyloides</i>	Feuilles	Acétonique	23,45	9,59	25	24,23
		Ethanolique	30,25	16,85	-	13,28

Tableau 12: Variation de l'inhibition du dégagement larvaire de *H. contortus* en fonction du solvant d'extraction

Plantes étudiées	Solvant utilisé	00 min	20 min	40 min	60 min	Observation
<i>N. laevis</i> 1200 µg/mL	Eau	0,00	6,12	51,02	100,00	-
	Méthanol	0,00	0,00	0,00	0,00	++++
	Acétate d'éthyle	0,00	3,64	24,59	66,10	+
	Acétone	0,00	0,00	0,00	0,00	++++
	Ethanol	2,78	10,26	18,29	25,37	++
	Chloroforme					+
	Cyclohexane	0,00	0,00	1,96	1,89	+++
<i>Z. zanthoxyloides</i> 1200 µg/mL	Eau	0,00	100,00	100,00	100,00	-
	Méthanol	0,00	0,00	1,86	0,00	++++
	Acétate d'éthyle	0,00	14,58	34,09	51,02	++
	Acétone	0,00	4,76	18,18	17,78	+++
	Ethanol	4,17	14,12	14,18	17,76	+++
	Chloroforme					++
	Cyclohexane	0,00	0,00	3,33	8,16	++++

Tableau 13 : Effet des alcaloïdes, des tanins et des flavonoïdes extraits des feuilles des plantes étudiées sur *H. contortus*

Plantes utilisées	Extraction	00min	20min	40min	60min	Observation
<i>N.laevis</i> 240 µg/mL	Alcaloïde	0,00	13,33	92,86	100,00	++
	Tanin	0,00	24,00	63,64	96,00	+++
	Flavonoïde	0,00	8,47	76,19	95,83	++
<i>Z. zanthoxyloïdes</i> 240 µg/mL	Alcaloïde	0,00	28,00	56,25	96,97	+++
	Tanin	0,00	10,00	58,53	97,62	+++
	Flavonoïde	0,00	0,00	66,67	100	+++

On peut retenir de ce screening biologique que les nématodes parasites gastro-intestinaux ne se comportent pas de la même manière au contact avec les extraits ou fractions des deux plantes. Il ressort de cette étude que les extraits chloroformiques ont inhibé la migration des *S. ratti* et les extraits acétonique ont plus empêché le dégagement des larves d'*H. contortus* (article 4).

Article 4 :Involvement of tannins and flavonoids in the *in vitro* effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastro-intestinal nematodes

Author's personal copy

Veterinary Parasitology 180 (2011) 292–297



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Involvement of tannins and flavonoids in the *in vitro* effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes

E.V.B. Azando^{a,*}, M.S. Hounzangbé–Adoté^a, P.A. Olounladé^a, S. Brunet^c, N. Fabre^b, A. Valentin^b, H. Hoste^{c,d}

^a Laboratoire d'Éthnopharmacologie et de Santé Animale, Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou, Bénin

^b Unité Mixte de Recherche 152, IRD/UPS, Pharmacochimie des substances naturelles et pharmacophores redox, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université de Toulouse III, 35 Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, Cedex France

^c INRA, UMR 1225 Interactions Hôte Agents Pathogènes 23, Chemin des Capelles, F-31076 Toulouse, France

^d Université de Toulouse: ENVT, UMR 1225; F-31076 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 August 2010

Received in revised form 2 March 2011

Accepted 10 March 2011

Keywords:

Haemonchus contortus

Trichostrongylus colubriformis

Larval exsheathment inhibition assay

Tannins

Zanthoxylum zanthoxyloides

Newbouldia laevis

ABSTRACT

The present study aimed at examining the possible role of tannins and flavonoids on the *in vitro* anthelmintic properties of the extracts of two plants from the southern area of Western Africa, i.e. *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides*. Extracts of the two plants were prepared by use of acetone/water (70/30) and their anthelmintic activity was measured by use of the larval exsheathment inhibition assay (LEIA) applied on the abomasal species, *Haemonchus contortus* and the intestinal species *Trichostrongylus colubriformis*. Three concentrations of extracts were evaluated to examine the possible dose effect. In addition, the possible involvement of tannins and flavonoids was examined by comparing the levels of inhibition of larval exsheathment obtained with the same extracts, after or not addition of PVPP which forms complexes with these compounds. The results indicate significant effects with both plants and both nematode species. In the range of concentrations examined, the results were dose-dependent for *N. laevis* extracts but not for *Z. zanthoxyloides* because the three doses applied provoked a similar highly significant inhibition whatever the tested dose. The use of PVPP indicated for both plant and nematode species, that tannins and flavonoids are involved partly in the effect but that some other biochemical compounds were also involved in both plants.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Worldwide, infections of the gastrointestinal tract by parasitic nematodes remain one of the main pathologies impairing the production in small ruminants. In tropical countries, both infections by the abomasal species, *Haemonchus contortus* or by the intestinal one,

Trichostrongylus colubriformis are highly prevalent. The presence of these nematodes provokes production losses, clinical signs and even can lead to deaths in sheep or goats. Until now, the control of these worms usually relied on the repeated, strategical or tactical use of commercialised anthelmintics. However, resistance to chemical drugs is nowadays a widespread phenomenon in most countries and for most nematode species (Kaplan, 2004). In addition, multiresistant strains of nematodes, i.e. resistant to all the currently commercialised anthelmintics, have been described (Van Wyk et al., 1997; Chandrawathani et al.,

* Corresponding author. Tel.: +229 90094969; fax: +229 21303084.
E-mail address: verickaz@yahoo.fr (E.V.B. Azando).

2004). Moreover, in developing countries, the cost and affordability of these chemical molecules often represent a major restriction for their use.

For these reasons, alternative strategies to chemical anthelmintics for the control of parasitic nematodes in sheep and goats has received a strong impetus since the last 15 years (Waller and Thamsborg, 2004; Waller, 2006). In developing countries, the control of nematode infections in livestock remains largely dependent on the traditional knowledges concerning medicinal plants (Hammond et al., 1997; Akhtar et al., 2000; Githiori et al., 2005; Chandrawathani et al., 2006). Because they represent sustainable, affordable and potentially valuable alternatives to conventional chemotherapy, the number of studies aimed at the scientific validation of the anthelmintic properties of such plants, identified through the ethnoveterinary knowledges in the different continents, has been increasingly expanding in the recent years. (Waller, 1997; Githiori et al., 2003; Bendixsen et al., 2005; Athanasiadou et al., 2007; Hoste et al., 2008). For example, in Western and Central Africa, results acquired from *in vitro* studies have accumulated indicating the potential anthelmintic activities of plants belonging to a wide range of botanical families. (see for example, Dichl et al., 2004; Monglo et al., 2006; Ademola et al., 2005). Some previous results acquired in our laboratory have measured the efficient activity of extracts of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* against both *H. contortus* and *T. colubriformis* by relying on various *in vitro* assays to assess the AH effects on different nematode stages i.e. the Egg Hatch Assay (EHA), the Larval Migration Inhibiting Assay (LMIA) and the Adult Motility Inhibition Assay (AMIA) (Hounzangbé-Adoté et al., 2005a,b). For *Z. zanthoxyloides*, some *in vivo* confirmations of the AH properties have been obtained in a series of studies in infected sheep (Hounzangbé-Adoté et al., 2005c). However, the question of the biochemical nature of the plant compounds responsible for the effects remains unsolved; This question is crucial to be addressed to a better understand the mode of action against Trichostrongyles, since the occurrence of a wide range of potentially active compounds from various chemical families, has been mentioned in tropical plants (Stepek et al., 2004; Anthony et al., 2005; Hammond et al., 1997; Hoste et al., 2006).

For *Z. zanthoxyloides*, phytochemical analyses have revealed the occurrence of alkaloids (Perrett and Whitfield, 1995), saponins (Hegnauer, 1983), tannins (Banso and Ngbede, 2006), flavonoids, lignans (O'Sullivan, 1983; Ayres and Loike, 1990), coumarins (Gray, 1983), amides (Adesina, 1986). For *N. laevis*, a wide diversity of secondary metabolites has also been described depending on the part of the plant used. In root bark, the presence of napthoquinones and anthraquinones has been reported (Eyong et al., 2005, 2006) whereas in the leaves, the presence of flavonoids, tannins and terpenes has also been mentioned (Gafner et al., 1997; Samy and Gopalakrishnakone, 2008). The occurrence of quaternary alkaloids has also been identified (Kerharo and Adam, 1974).

The current study was therefore designed to explore the hypothesis that tannins, which are present in the two plants, play a main role in the AH effects of both *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* against *H. contortus* and *T. colubriformis*.

The *in vitro* measurements of the AH activity were performed based on a recently developed, sensitive assay (the larval exsheathment inhibition assay = LEIA) (Jackson and Hoste, 2010). For the two plants, extracts were produced after acetone/water (70/30) extraction processes in order to obtain essentially flavonoids and tannins. The comparison of responses was made between the effects obtained after or not addition to the extracts of PVPP, a biochemical compound known for its ability to complex tannins and polyphenols. In a second step, the occurrence of a possible dose effects was examined.

2. Materials and methods

2.1. Collection and identification of plants

The leaves of *Z. zanthoxyloides* (*Fagara*), and *N. laevis*, were collected in a mature state at the beginning of the great rainy season on the site of the agronomic faculty of science of Abomey Calavi and identified in the "Herbier National de l'Université d'Abomey-Calavi." *Z. zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick & Timler (Rutaceae family) was identified under the number AA 6301/HNB and *N. laevis* (P.Beauv.) Seemann ex (Bignoniaceae family) was identified under the number AA 6302/HNB. They were put to dry safe from sun then reduced to powder.

2.2. Extraction procedure

For each plant species, 50 g of dried leaves were chopped. The chopped material was placed in a mixer containing acetone:water (70:30) and ascorbic acid (1 g L^{-1}) to limit oxidation. The mixture was sonicated for 20 min (Branson 5510®). Then, the extract was filtered. Acetone was removed at 40°C under reduced pressure. The aqueous solution was defatted and plant pigments like chlorophyll, were removed by washing three times with dichloromethane ($3 \times 300 \text{ ml}$) and ethyl acetate ($3 \times 200 \text{ ml}$). Then the remaining aqueous fractions were lyophilized and kept at -70°C . The yields of extraction (mass/mass) were 9.77% for *Z. zanthoxyloides* and 5.32% for *N. laevis*.

2.3. Evaluation of polyphenolic compounds of plant extracts

Total phenols, total tannins, condensed tannins and the biological activity of the tannins (ability to form complexes with proteins) were measured for the two plants in order to give a quantitative profile of the polyphenolic compounds and possibly to correlate them with the AH effects.

The Folin-Ciocalteu method was used to determine the total amount of phenols (TP) and of tannins (TT) in the plant extracts (Makkar, 2003). The TP were determined first then the TT by difference after adding polyvinyl polypyrrolidone (PVPP). The quantification of tannins was performed using a diode array spectrophotometer at 725 nm (Agilent 8453®). Standard solutions were formulated with the Folin-Ciocalteu reagent and the calibration curve was made with tannic acid. The tannins were expressed as grams tannic acid equivalent/100 g of dried plant.

The biological activity of the plant samples, related to the tannin content was measured using the Radial Diffusion Method which is based on the distribution of complexes between tannins and Bovine Serum Albumin (BSA) in an agarose gel (Hagerman, 1987). Ninety μl of the aqueous extract was deposited in wells dug in the agarose by fraction of 15 μl . Positive controls (15 μl of tannic acid, Sigma Ltd.) and negative control (15 μl of gramineous hay extracts) were also included in the assay. After 24 h of incubation, the diameters of the formed disks were measured with a digital micrometer. These diameters were related to the biological activity of the tannins of the plant, which can be evaluated according to the following formula: $\% = (\text{PPA extracts} \times 100) / \text{tannic acid PPA}$, $\text{PPA} = [(D^2 - d^2) \times (\text{vol. extract} / \text{vol. deposit})] / (\text{mass of sample})$; D : diameter of the disks formed (mm); d : diameter of the well (mm); results were expressed as grams tannic acid equivalent/100 g of dried plant.

2.4. Bioassays: larval artificial exsheathment assay

The assay was performed as previously described (Bahuaud et al., 2006). Briefly, ensheathed larvae of *H. contortus* L₃ (c. 1000) or *T. colubriformis* L₃ of the same two month-old batch were incubated for 3 h at 20 °C with each plant extract at the concentrations of 0, 300 and 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS before being re-suspended. After incubation, the larvae were washed and centrifuged (1000 rpm) three times in PBS (pH 7.2). The larvae were then submitted to an artificial exsheathment process by contact with a solution of sodium hypochloride (2% w/v) and sodium chloride (16.5% w/v) diluted in 1–300 in PBS (pH 7.2). The kinetics of larval exsheathment between the different experimental treatments were then monitored by microscopic observation (200 \times). The percentages of exsheathed larvae were identified at 10 min interval up to 60 (for *H. contortus*) or 70 min (for *T. colubriformis*) after the beginning of the experiment. Six replicates were run per plant extract to examine the changes in the proportion of exsheathed larvae with time.

Role of tannins in the AH activity: Polyvinyl pyrrolidone (PVPP) forms complexes with tannins and polyphenols and thus blocks their potential biological activity (Makkar, 2003). PVPP was added to the 2 plant extracts at a concentration of 1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 2 h in a 1:50 ratio (Barrau et al., 2005). These solutions were then centrifuged at 4500 RPM (5 min, 20 °C). After centrifugation, the supernatant and the extracts without adding PVPP were used to incubate ensheathed infective larvae of both *H. contortus* and *T. colubriformis* (c. 1000). Thereafter, the LEI assay was performed according to the procedure described previously.

2.5. Statistical analyses

Larval artificial exsheathment assay: A GLM (general linear model) statistical test was performed to determine the difference in the mean percentage of exsheathment rates between the control and the different dose groups (0, 300 and 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$) across time (Systat Ltd, 1999). The same test was applied for the comparison of response in the

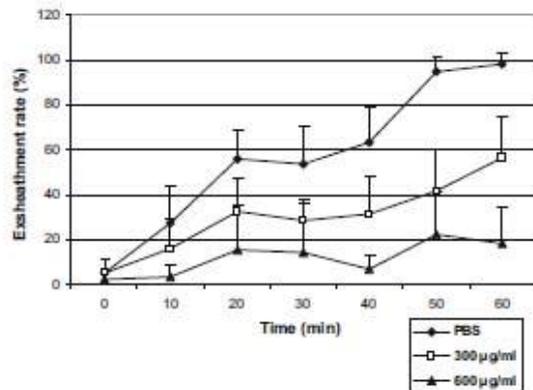


Fig. 1. Variations in the inhibition of the artificially induced exsheathment rate measured by the LEI assay for *Haemonchus contortus* third stage larvae for control or after contact with 300 or 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ extracts of *Newbouldia laevis*.

experiment with the extracts at 1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ with or without PVPP.

3. Results

3.1. Polyphenolic compounds and in vitro biological activity of two plant extracts

The TP, TT and values of biological activity (BA) were respectively 5.40, 1.18 and 1.56 equiv. g of tannic acid for *N. laevis* and 7.76, 3.19 and 2.92 equiv. g of tannic acid for *Zanthoxyloides*.

3.2. Effects of extracts on *H. contortus*

For the sake of clarity, the results will be illustrated first with an example concerning the effects of *N. laevis* on *H. contortus* (Figs. 1 and 2). Then, a summary of the compared values of exsheathment inhibition relative to control values are provided in Tables 1 and 2.

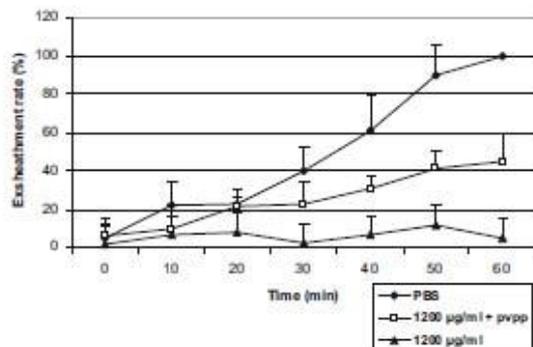


Fig. 2. Variations in the inhibition of the artificially induced exsheathment rate measured by the LEI assay for *Haemonchus contortus* third stage larvae for control or after contact with *Newbouldia laevis* extracts 1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ with or without addition of PVPP.

Table 1
Exsheathment rate (%) on *H. contortus* according to plants, doses and compounds.

Parasites	Plants	Doses (µg/ml)	Time (min)	
			30	60
<i>H. contortus</i>	<i>N. laevis</i>	00	53.69 ± 16.54	98.04 ± 04.80
		300	28.85 ± 08.59	56.85 ± 18.24
		600	14.52 ± 22.07	18.35 ± 16.72
		1200	39.82 ± 13.12	100.00 ± 00.00
	<i>Z. zanthoxyloides</i>	00	02.50 ± 03.91	05.19 ± 08.51
		1200+PVPP	22.94 ± 10.97	44.95 ± 14.27
		00	66.06 ± 13.31	98.81 ± 02.92
		300	04.25 ± 05.16	11.97 ± 15.25
<i>Z. zanthoxyloides</i>	600	00.98 ± 02.40	01.85 ± 04.54	
	00	49.88 ± 19.73	93.61 ± 07.68	
	1200	03.90 ± 06.26	00.93 ± 02.27	
	1200+PVPP	31.41 ± 15.86	35.24 ± 15.95	

After 60 min, the exsheathment rates in the control were respectively equal to 98 and 100% for both plant species (Figs. 1 and 2).

Compared to the control values, the inhibition of the larval exsheathment with the *N. laevis* extracts was nearly total at 1200 µg/ml (Table 1) ($P < 0.01$). In contrast, although still significant ($P < 0.05$) the reduction in the exsheathment process was less pronounced at the 300 and 600 µg/ml concentrations (Fig. 1). At the doses tested, the effects were thus dose dependent ($P < 0.05$).

Compared to the control values, the contact with the extracts of *Z. zanthoxyloides* induced a highly significant ($P < 0.01$), nearly total inhibition of the exsheathment process for the larvae observed at the concentrations of 1200, 600 and 300 µg/ml (Table 1). At the doses tested, the phenomenon was not dose dependent.

After addition of PVPP to the 1200 µg/ml extracts, the difference in the rate of exsheathment of *Haemonchus* larvae remained significantly different from the control values ($P < 0.01$) with both plant extracts. However, for both plant extracts, by comparison to the untreated extracts, the addition of PVPP provoked a restoration towards the control values. This process was slightly more pronounced for *Fagara* (back to 38% of exsheathment rate after 60 min) than for *Newbouldia* (restoration towards 45% of the control values after 60 min) although no statistical difference evidenced.

3.3. Effects of extracts on *T. colubriformis*

After 70 min, the exsheathment rates in the controls ranged, respectively, from 71.6% to 93.5% for *N. laevis* and from 85.3% to 98% for *Z. zanthoxyloides* extracts (in the various experiments) (Table 2).

Compared to the control values, the contact with the *Z. zanthoxyloides* extracts induced a highly significant ($P < 0.001$), nearly total inhibition of the larval exsheathment process at the concentrations of 300, 600, and 1200 µg/ml (Table 2). This total inhibition evidenced that the phenomenon was not dose dependent at the doses tested.

With the *N. laevis* extracts, the inhibition of the larval exsheathment, compared to the control rates after 70 min, reached the respective values of 49.6% and 78.6% at the concentrations of 300, 600 µg/ml ($P < 0.001$) and 94.1% (Table 2) with the extract at 1200 µg/ml ($P < 0.001$). However, the difference between the rates observed after contact with the extracts at 300 and 600 µg/ml did not significantly differed.

The addition of PVPP to the *N. laevis* extracts provoked a weak restoration towards control values (Table 2). However, this was sufficient to make the difference significant between the exsheathment rates measured with the extracts having been or not completed with PVPP ($P < 0.05$). With the *Z. zanthoxyloides* extracts, the restoration towards

Table 2
Exsheathment rate (%) on *T. colubriformis* according to plants, doses and compounds.

Parasites	Plants	Doses (µg/ml)	Time (min)	
			30	70
<i>T. colubriformis</i>	<i>N. laevis</i>	00	61.85 ± 27.81	93.47 ± 07.46
		300	13.58 ± 08.47	47.15 ± 27.67
		600	12.76 ± 11.42	20.02 ± 21.88
		00	12.06 ± 05.18	71.62 ± 10.09
		1200	03.45 ± 02.99	04.22 ± 06.83
		1200+PVPP	08.43 ± 06.11	13.38 ± 02.83
	<i>Z. zanthoxyloides</i>	00	22.36 ± 21.67	85.25 ± 19.70
		300	01.19 ± 02.92	07.23 ± 03.03
		600	01.45 ± 02.25	00.98 ± 02.40
		00	45.67 ± 23.27	98.04 ± 04.80
		1200	02.40 ± 02.69	00.72 ± 01.77
		1200+PVPP	05.96 ± 07.70	35.23 ± 20.58

the control values was also partial but made the results significantly different from those observed with the untreated extracts (Table 2).

4. Discussion

The AH properties of both *Z. zanthoxyloides* and *N. laevis* have been measured previously, relying on three different *in vitro* bioassays i.e.: the egg hatch assay (EHA), the larval migration inhibition assay (LMIA) and the adult motility inhibition assay (AMIA). These studies were performed on both *H. contortus* (Hounzangbè-Adoté et al., 2005a) or *T. colubriformis* (Hounzangbè-Adoté et al., 2005b). For both plants and for the 3 bioassays significant effects were found. However, this is the first report measuring the possible inhibition of the larval exsheathment after contact with these 2 plant extracts.

The advantages to perform the LEI assay compared to the different bioassays which have been previously applied are its simplicity, its sensitivity, its low cost and reproducibility from one laboratory to another. In addition, it has been related to processes which have been described *in vivo* (Brunet et al., 2007). Last, when a wide range of concentrations is applied, the LEIA makes possible the calculation of an Inhibitory Dose 50% (ID50). In contrast, calculations of ID50 are usually not feasible with the LMI or the AMI assays because values over 50% of inhibition are rarely observed.

The present results confirmed the AH properties of both *Z. zanthoxyloides* and *N. laevis*. The contact with the Fagara extracts at the 3 concentrations tested, resulted in a nearly total inhibition of exsheathment, which was found with the two nematode species. The inhibitory effects observed with the *Newbouldia* extracts were less important than with the *Fagara* ones. These effects of *Newbouldia* extracts were dose dependent for *H. contortus* in the range of doses tested. The inhibitions were more pronounced but not dose-related for *T. colubriformis*.

Several results acquired from experimental studies performed in small ruminants suggested that a difference in susceptibility to the AH effects of the same bioactive plant might exist depending on the on parasite species. In particular, differences between abomasal and intestinal nematode species have been shown in sheep (Athanasiadou et al., 2001) receiving quebracho or sainfoin (Heckenroth et al., 2007) or in goats consuming hay of *Lespedeza cuneata* (Shaik et al., 2006). Nevertheless, most results obtained from *in vitro* studies comparing the activity of the same plant extracts on larvae of different trichostrongyle species suggest only the existence of minor differences in susceptibility either with the LMI assay (Athanasiadou et al., 2001; Paolini et al., 2004; Alonso-Díaz et al., 2008a,b) or with the LEI assay (Bahnaud et al., 2006; Alonso-Díaz et al., 2008a,b).

The main objective of the present study was to gain indications on the nature of the active compounds responsible for the AH effects of *Z. zanthoxyloides* and *N. laevis*. In particular we tested the hypothesis that tannins and/or polyphenols were involved in this activity by comparing the effects of the same extracts with or without addition of PV/PP which is known to create complexes with polyphenols in particular tannins (Makkar, 2003). The lack of effect

of PV/PP by itself on the larval exsheathment has been tested previously when setting up the LEI assay but such methodological verification was not repeated on the control in the current study. For both plants and both nematode species, significant differences were found between the inhibitory values observed with PV/PP extracts when compared to both the control values and the values observed with the fully active extract. This partial restoration towards the control values, was interpreted as the sign that for both *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* (1) tannins and/or polyphenols are involved in the antiparasitic activity; but also (ii) that other biochemical compounds, differing from tannins, might also be responsible of the AH properties since some inhibition of exsheathment was still measured.

For tannin-rich Legume forages dotted with AH properties, a full restoration towards control values after addition of either PEG or PV/PP to extracts has been described (Paolini et al., 2004; Bahnaud et al., 2006). This has led to the conclusion that flavonoids and, in particular tannins, were mainly responsible for the activity. On the other hand, for some extracts of woody plants from various botanical families which composed the vegetation of Mediterranean rangelands and garriques only a partial restoration towards control values was observed after addition of PEG or PV/PP, like in the current study (Bahnaud et al., 2006; Manolaraki et al., 2010). This has led to the conclusion that, besides polyphenols, some other classes of biochemical compounds can also participate in the bioactivity. For example, this was found with chestnut or pine tree extracts when using the LEIA (Bahnaud et al., 2006) or with *Psittacia lentiscus* and *Ceratonia siliqua* with the LMIA (Manolaraki et al., 2010). These results underlined the need to further perform a bioguided biochemical analysis of the various fractions to identify precisely which are the active compounds.

Acknowledgments

This work was supported by the CORUS project no. 6040. Mr. E.V.B. Azando acknowledges receiving a scholarship from ARHES to undergo his PhD studies. Mr. P.A. Olounlade is a grateful recipient of a grant provided by AUF.

References

- Adernola, I.O., Akanbi, A.I., Idowu, S.O., 2005. Comparative nematocidal activity of chromatographic fractions of *Leucosium leucocephala* seed against gastrointestinal sheep nematodes. *Pharm. Biol.* 43, 599–604.
- Adesina, S.K., 1986. Further novel constituents of *Zanthoxylum zanthoxyloides* root and pericarp. *J. Nat. Prod.* 49, 715–716.
- Akhtar, M.S., Iqbal, Z., Khan, M.N., Latif, M., 2000. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo Pakistan subcontinent small rumin. *Research* 38, 99–107.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H., 2008a. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* exposed to four tropical tanniniferous plants. *Vet. Parasitol.* 153, 313–319.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Capellillo-Leal, C., Brunet, S., Hoste, H., 2008b. Effects of four tropical tanniniferous plants on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet. Parasitol.* 153, 187–192.
- Anthony, J.P., Pyfe, L., Smith, H., 2005. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? *Trends Parasitol.* 21, 462–468.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastroin-

- testinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Vet. Parasitol.* 99, 205–219.
- Athanasiadou, S., Githiori, J., Kyriazakis, I., 2007. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Animal* 1, 1392–1400.
- Ayres, D.C., Loike, J.D., 1990. *Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties*. Cambridge University Press, Cambridge, 405p ISBN 0-521-r30421-0.
- Bahuaud, D., Martinez-Ortiz de Montellano, C., Chaveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 132, 545–554.
- Banso, A., Ngbede, J.E., 2006. Phytochemical screening and *in vitro* antifungal properties of *Fagara zanthoxyloides*. *Int. J. Food Env.* 4, 8–9.
- Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., Hoste, H., 2005. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology* 131, 531–538.
- Bendixsen, T., Hanh, T.H., Dong, V.V., Binh, D.V., Lien, P.S., 2005. A preliminary investigation of Vietnamese indigenous plants for anti-parasitic activities in goats. In: Ledin, I. (Ed.), *Proceedings of International Workshop of Small Ruminant Production and Development in SE Asia*. Hanoi, pp. 97–99.
- Brunet, S., Aufferre, J., El Babili, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology* 134, 1253–1262.
- Chandrawathani, P., Yusoff, N., Wan, L.C., Ham, A., Waller, P.J., 2004. Total anthelmintic failure to control nematode parasites of small ruminants on government breeding farms in Sabah, East Malaysia. *Vet. Res. Com.* 6, 479–489.
- Chandrawathani, P., Chang, K.W., Nurulaini, R., Waller, P.J., Adnan, M., Zaini, C.M., Jannah, O., Khadijah, S., Vincent, N., 2006. Daily feeding of fresh neem leaves (*Azadirachta indica*) for worm control in sheep. *Trop. BioMed.* 23, 23–30.
- Dichl, M.S., Atindéhou, K., Tere, H., Betschart, B., 2004. Prospect for anthelmintic plants in the Ivory Coast using ethnobotanical criteria. *J. Ethnopharmacol.* 95, 277–284.
- Eyong, K.O., Krohn, K., Hussain, H., Folefoc, G.N., Nkengfack, A.E., Schulz, B., Hu, Q., 2005. Newbouldiaquinone and newbouldiamide: a new naphthoquinone-antraquinone coupled pigment and a new ceramide from *Newbouldia laevis*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 53, 616–619.
- Eyong, K.O., Folefoc, G.N., Kuete, V., Beng, V.P., Krohn, K., Hussain, H., Nkengfack, A.E., Saettel, M., Sarite, S.R., Hoerauf, A., 2006. Newbouldiaquinone A: a naphthoquinone-antraquinone ether coupled pigments, as a potential antimicrobial and antimalarial agents for *Newbouldia laevis*. *Phytochemistry* 67, 605–609.
- Gafner, S., Wolfender, J.L., Nianga, M., Hostettmann, K., 1997. Phenylpropanoid glycosides from *Newbouldia laevis* roots. *Phytochemistry* 44, 687–690.
- Githiori, J.B., Höglund, J., Waller, P.J., Leyden Baker, R., 2003. Evaluation of anthelmintic properties of extracts from some plants used as livestock dewormers by pastoralist and smallholder farmers in Africa against *Heligmosomoides polygyrus* infections in mice. *Vet. Parasitol.* 118, 215–226.
- Githiori, J., Höglund, J., Waller, P.J., 2005. Ethnoveterinary plant preparations as livestock dewormers: practices, popular beliefs, pitfalls and prospects for the future. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 91–103.
- Gray, A.I., 1983. Structural diversity and distribution of coumarins and chromones in the Rutales. In: Waterman, P.G., Grundon, M.F. (Eds.), *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press, London, UK, pp. 97–146.
- Hagerman, A.E., 1987. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *J. Chem. Ecol.* 13, 437–449.
- Hammond, J.A., Fielding, D., Bishop, S.C., 1997. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Anim. Health Res. Rev.* 21, 213–228.
- Heckendorn, F., Hüring, D.A., Maurer, V., Senn, M., Hertzberg, H., 2007. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Vet. Parasitol.* 146, 123–134.
- Hegnauer, R., 1983. Chemical characters and the classification of the rutales. In: Waterman, P.G., Grundon, M.F. (Eds.), *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press, London, UK, pp. 401–439.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 22, 253–261.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Alonso-Díaz, M.A., Brunet, S., Sandoval-Castro, C., Houzangbe-Adote, S., 2008. Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Trop. BioMed.* 25, 56–72.
- Houzangbé-Adoté, S., Paolini, V., Fouraste, I., Moutairou, K., Hoste, H., 2005a. *In vitro* effects of four tropical plants on the intestinal parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* 78, 155–160.
- Houzangbé-Adoté, S., Paolini, V., Fouraste, I., Moutairou, K., Hoste, H., 2005b. *In vitro* effects of four tropical plants on the intestinal parasitic nematode, *T. colubriformis*. *J. Helminthol.* 79, 29–33.
- Houzangbé-Adoté, S., Zinsou, F.E., Hounkpè, V., Moutairou, K., Hoste, H., 2005c. *In vivo* effects of fagara leaves on sheep infected with gastrointestinal nematodes. *Trop. Anim. Health Product* 37, 205–214.
- Jackson F., Hoste H. 2010. *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In "In vitro screening of plant resources for extra nutritional attributes in ruminants nuclear and related methodologies" P Vercoe, HPS Makkar and AC Schlink Eds, Springer/International Atomic Energy Agency Edition Dordrecht pp 25–45.
- Kaplan, R.M., 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.* 20, 477–481.
- Kerharo, J., Adam, J.G., 1974. La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. In: *Plantes médicinales et toxiques*. Vigot frères, Paris, 1007 p.
- Makkar, H.P., 2003. Quantification of tannins in tree and shrub foliage. In: *A Laboratory Manual Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy Agency (FAO/IAEA)*, Vienna, Austria, pp. 49–53.
- Manolaraki, F., Sotiraki, S., Stefanakis, A., Skampardonis, V., Volanis, M., Hoste, H., 2010. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology* 137, 685–696.
- Monglo, D., Njongmeta, L.M., Musongong, G., Ngassoum, M., Nukenine, E.N., 2006. Evaluation of anthelmintic potential of ethanolic plant extracts from Northern Cameroon against eggs and infective larvae of *Haemonchus contortus*. *J. Biol. Sci.* 6, 426–433.
- O'Sullivan, J., 1983. Structural diversity and distribution of lignans in the Rutales. In: Waterman, P.G., Grundon, M.F. (Eds.), *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press, London, UK, pp. 267–279.
- Paolini, V., Fouraste, I., Hoste, H., 2004. *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin on third-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology* 129, 69–77.
- Perrett, S., Whitfield, P.J., 1995. Atanine (3-dimethylallyl-4-methoxy-2-quinolone), an alkaloid with anthelmintic activity from the Chinese medicinal plant, *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med.* 61, 276–278.
- Samy, R.P., Gopalakrishnakone, P., 2008. Therapeutic potential of plants as antimicrobials for drug discovery. *Bioinformation* 3, 100–110.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Kaplan, R.M., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2006. *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Vet. Parasitol.* 139, 150–157.
- Steppek, G., Behnke, J.M., Buttle, D.J., Duce, I.R., 2004. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? *Trends Parasitol.* 20, 322–327.
- Van Wyk, J.A., Malan, F.S., Randles, J.L., 1997. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? *Vet. Parasitol.* 70, 111–122.
- Waller, P.J., 1997. Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. *Vet. Parasitol.* 71, 195–207.
- Waller, P.J., Thamsborg, S.M., 2004. Nematode control in 'green' ruminant production systems. *Trends Parasitol.* 20, 493–497.
- Waller, P.J., 2006. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Am. Feed Sci. Technol.* 126, 277–289.

Article 5 : Etude *in vitro* de l'effet des tanins de *Newbouldia laevis* et de *Zanthoxylum zanthoxyloides* sur la migration des larves infestantes de

H



Available online at <http://ajol.info/index.php/ijbcs>

Int. J. Biol. Chem. Sci. x(x): xx-xx, xxxxx

International Journal
of Biological and
Chemical Sciences

ISSN 1991-8631

Original Paper

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Etude *in vitro* de l'effet des tanins de *Newbouldia laevis* et de *Zanthoxylum zanthoxyloides* sur la migration des larves infestantes de *Haemonchus contortus*

P. A. OLOUNLADE^{1*}, E. V. B. AZANDO¹, M. S. HOUNZANGBE-ADOTE¹, T. B. TAM HA², C. MOULIS³, N. FABRE³, I. FOURASTE³, H. HOSTE⁴ et A. VALENTIN³

¹Laboratoire d'Ethnopharmacologie et de Santé Animale, Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou – Bénin

²Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de l'Université Paul Sabatier, 35 Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, Cedex 9 France.

³Pharma-Dev-UMR 152 / Faculté de Pharmacie, Université de Toulouse III, 35 Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, Cedex 9 France.

⁴UMR 1225 INRA/ ENVT, 23, Chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex France.

*Auteur correspondant, E-mail : abiodouno@yahoo.fr ; BP 1402 Abomey-Calavi, Bénin, Tel. : (+229) 97 08 54 68 / 94 27 9310

RESUME

Dans le but d'aborder le mécanisme d'action des extraits acétoniques et éthanoliques de *Newbouldia laevis* (Bignoniaceae) et de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Rutaceae), leur effet inhibiteur a été évalué *in vitro* sur la migration larvaire de *Haemonchus contortus*. Le test d'inhibition de la migration larvaire (LMI) a été appliqué sur les larves infestantes (L₃), âgées de 2 à 3 mois incubées avec des extraits végétaux à différentes concentrations : 150, 300, 600 et 1200 µg/mL mis ou non en contact avec la polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). Un témoin négatif (tampon PBS) a été inclus dans chaque test. L'observation sous microscope et le dénombrement des L₃ ayant migré par rapport au nombre total de larves déposées dans l'insert ont permis de calculer le taux de la migration larvaire. Les extraits de *Newbouldia laevis* et de *Zanthoxylum zanthoxyloides* inhibent *in vitro* la migration larvaire de *Haemonchus contortus*. Cet effet est dose-dépendant (p<0,001). Les extraits hydroéthanoliques ont eu plus d'effet surtout aux fortes doses. Le contact des extraits des plantes avec la polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) annule tout ou une partie de l'effet anthelminthique des extraits. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la migration larvaire est en partie due à l'action des tanins. Le pourcentage d'inhibition dû aux tanins est de 28,60% quel que soit la plante et quel que soit le solvant d'extraction.

© 2011 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : *Haemonchus contortus*, migration larvaire, tanins, *Zanthoxylum zanthoxyloides*, *Newbouldia laevis*, Bénin

INTRODUCTION

Dans de nombreux pays ouest africains, l'avènement de la médecine moderne et ses progrès avaient conduit les populations à se détourner quelque peu de la médecine traditionnelle, essentiellement basée sur la

phytothérapie (Dramane et al., 2010). Cependant, depuis ces dernières décennies, l'usage des plantes médicinales connaît un regain d'intérêt. Selon les estimations de l'OMS (2002), plus de 80% de la population africaine utilisent encore la médecine traditionnelle pour

© 2011 International Formulae Group. All rights reserved.

répondre à leurs besoins de soins de santé et à ceux des animaux. Ceci est lié à la toxicité des produits de synthèse, au coût élevé de ces médicaments, à la malfaçon et la contrefaçon de ces médicaments, à l'éloignement et/ou l'insuffisance des centres de santé humaine et animale surtout en milieu rural, qui limitent une prise en charge véritable des problèmes de santé publique (Fajimi et Taiwo, 2005). De même les éleveurs ne confient leurs animaux aux vétérinaires qu'en cas d'insuccès (Hammond et al., 1997).

Par ailleurs, la maîtrise des affections parasitaires devient complexe du fait de l'émergence de parasites résistants à de nombreux anthelminthiques conventionnels. De nombreux cas de parasites résistants sont rapportés dans le monde et ont pris une importance considérable dans les pays tropicaux (Jabbar et al., 2006). En Afrique du Sud, plus de 90% des élevages ovins sont confrontés à ce phénomène (Van Wyk et Malan, 1988). Certains élevages ovins ont été éliminés pour des raisons économiques. Pourtant les affections parasitaires sont comptées parmi les maladies opportunistes les plus dangereuses pour les sujets vulnérables tels que les jeunes animaux et les femelles gestantes (Dramane et al., 2010).

Au Bénin, les enquêtes parasitologiques effectuées chez les petits ruminants ont mis en évidence l'existence d'un polyparasitisme à strongles au sens large (Salifou, 1996). Les taux de prévalences aux strongles digestifs sont élevés et varient entre 4,4 à 92,6% (Salifou, 1996). La faune parasitaire du tractus digestif des animaux (ovins et caprins) est dominée par des strongles, notamment *Haemonchus contortus* hématophage par sa fréquence et par son intensité. Selon Salifou (1996), comparés aux caprins, les ovins ont les plus fortes prévalences.

Face à ces problèmes de santé animale, les plantes médicinales pourraient apporter une réponse thérapeutique adaptée aux moyens financiers et à l'environnement socioculturel des populations. Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc une voie prometteuse pour le développement de médicaments

traditionnels améliorés. Pour cette raison, des études descriptives ethnobotaniques (Adjanohoun et al., 1989) d'évaluation des propriétés biologiques et chimiques (Hounzangbé-Adoté, 2000 ; Lagnika, 2005), ont été menées sur la flore béninoise.

Le contrôle des strongyloses gastro-intestinales des ruminants domestiques a reposé, pendant de nombreuses années, sur l'emploi de molécules anthelminthiques de synthèse. Dans les pays en voie de développement, ces produits coûtent chers et ne sont pas disponibles tant en quantité qu'en qualité. Aussi, la prévalence de la résistance des nématodes aux anthelminthiques est particulièrement élevée (Jackson et Coop, 2000; Kaplan, 2004) et la demande de réduction d'emploi de produits chimiques en élevage dans le contexte de l'agriculture durable est de plus en plus forte. Ces éléments ont conduit à envisager de nouvelles méthodes de lutte antiparasitaire. Parmi les solutions alternatives de lutte contre les strongyloses, une approche prometteuse repose sur l'exploitation de plantes dotées de propriétés anthelminthiques. Il existe une gamme variée de plantes utilisées comme anthelminthiques dans la pharmacopée vétérinaire (Hammond et al., 1997; Enwerem et al., 2001; Alawa et al., 2003). Des travaux précédents ont révélé que certaines plantes médicinales riches en tanins auraient les mêmes actions que les vermifuges classiques : empêcher l'éclosion des œufs, tuer les vers adultes ou réduire leur prolificité (Hounzangbé-Adoté et al., 2004), immobiliser les larves infestantes (L₃) (Hounzangbé-Adoté, 2004) ou empêcher leur dégainement (Brunet et Hoste, 2006).

In vitro, les extraits alcooliques (60%) de feuilles sèches de deux espèces de plantes tropicales, *Newbouldia laevis* (Bignoniaceae) et *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Rutaceae) communément appelé Fagara, cités par les éleveurs comme ayant des propriétés antiparasitaires (Hounzangbé-Adoté, 2000) ont limité l'éclosion des œufs, la migration larvaire et la viabilité des vers adultes de *Haemonchus contortus* (Hounzangbé-Adoté et al., 2005).

Ce travail a été entrepris afin d'évaluer *in vitro* l'effet des tanins de *Newbouldia laevis* et

de *Zanthoxylum zanthoxyloides* sur la migration des larves infestantes de *Haemonchus contortus*.

MATERIEL ET METHODES

Récolte des plantes

Les feuilles de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Fagara), de *Newbouldia laevis*, ont été récoltées matures et authentifiées à l'Herbier National de l'Université d'Abomey-Calavi. *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick & Timler de la famille des Rutaceae est identifié sous le numéro AA 6301 /HNB et *Newbouldia laevis* (P.Beauv.) Seemann ex Bureau de la famille des Bignoniaceae est identifié sous le numéro AA 6302 / HNB. Elles ont été séchées en salle climatisée (20 °C) pendant 7 jours et sont ensuite réduites en poudre dans un broyeur ultracentrifugeuse de type ZM/RETSH. La poudre de feuilles ainsi obtenue est conservée dans un bocal hermétique à la température ambiante.

Extraction de plantes

Extraction hydroéthanolique

50 grammes de poudre de feuilles ont été extraits avec 500 ml de mélange éthanol : eau dans les proportions 70 : 30 pendant 1 heure à reflux avec agitation (T=50 °C). Après filtration, l'éthanol a été évaporé sous pression réduite à la même température. La solution aqueuse obtenue a été lavée trois fois au dichlorométhane pour éliminer les pigments et des lipides. Enfin, l'extrait a été congelé (-70 °C), puis lyophilisé. Le lyophilisat a été pesé pour chiffrer le ratio extrait/drogue (m/m).

Extraction hydroacétonique

50 grammes de poudre de feuilles ont été extraits avec 500 ml de mélange acétone: eau dans les proportions 70 : 30 pendant 1 heure à reflux avec agitation (T=50 °C). Après filtration, l'acétone a été évaporée sous pression réduite à la même température. La solution aqueuse obtenue a été lavée trois fois au dichlorométhane pour éliminer les pigments et des lipides. Enfin, l'extrait a été congelé (-70 °C), puis lyophilisé et le ratio extrait/drogue (m/m) a été chiffré.

Dosage des tanins par la méthode de la Pharmacopée Européenne (2011)

Pour le dosage des tanins dans les plantes testées (*Zanthoxylum zanthoxyloides* et *Newbouldia laevis*), selon la méthode décrite par la Pharmacopée Européenne, l'extraction aqueuse de 1 g de poudre de plante séchée dans 150 mL d'eau distillée chauffée au bain-marie a été faite pendant 30 minutes. Après filtration, les polyphénols totaux et les polyphénols non absorbés sur la poudre de peau ont été dosés. Pour le dosage des polyphénols totaux, 2 ml de l'extrait dilué au 1/5^e a été mis en présence de 1 mL de réactif phosphomolybdotungstique et 10 mL d'eau distillée et ajusté à 25 mL avec du carbonate de sodium à 290 g/L. Après 30 minutes, l'absorbance a été mesurée à 760 nm avec l'eau distillée comme liquide de compensation (A₁).

Pour le dosage des polyphénols non absorbés par la poudre de peau, 10 mL du filtrat ont été ajoutés à 0,1 g de poudre de peau puis mis sous agitation pendant 1 heure. Après filtration et dilution au 1/5^e, 2 ml de l'extrait dilué ont été mis en présence de 1 mL de réactif phosphomolybdotungstique et 10 mL d'eau distillée, et ajusté à 25 mL avec du carbonate de sodium à 290 g/L. Après 30 minutes, l'absorbance a été mesurée à 760 nm (A₂).

Parallèlement aux extraits de plante, une solution de 50 mg de Pyrogallol dissous dans 100 mL d'eau distillée puis dilué à 1/20^e dans le même solvant a été utilisée comme témoin positif selon la méthode décrite précédemment (A₃). La teneur en tanins des plantes, exprimée en pyrogallol, a été calculée selon la formule :

$$T_e = \frac{62,5 (A_1 - A_2) m_2}{A_3 \times m_1}$$

T_e = teneur en tanins

A₁ = absorbance des polyphénols totaux

A₂ = absorbance des polyphénols non absorbés par la poudre de peau

A₃ = absorbance des pyrogallol

m₁ = masse de poudre de plante testée en grammes

m₂ = masse de pyrogallol en grammes

Préparation des larves

Les larves infestantes ont été obtenues par coproculture à partir de matières fécales de chèvres préalablement infestés artificiellement par des souches pures de parasites (*Haemonchus contortus*), laissées en culture à température ambiante pendant 10 jours. Les larves ont ensuite été extraites de la masse fécale par le dispositif de Baermann dont le principe repose sur l'hygrotopisme des larves.

Inhibition de la migration larvaire (L₃)

Le test appliqué repose sur la mesure du taux de migration des larves de parasites à travers une membrane après contact avec les extraits à tester. Le pourcentage de larves ayant traversé la membrane permet de calculer l'inhibition de la migration larvaire (LMI) associée aux extraits de plantes (Rabel et al., 1994). Une quantité connue de larves L₃ (1000 L₃/mL) est mise en contact pendant 3 heures à 20 °C avec chaque extrait de plante à tester à différentes concentrations (1200, 600, 300 et 150 µg/mL) à raison de 4 répétitions par concentration. Un témoin négatif (tampon PBS, pH 7 et 0,15 M) a permis d'évaluer la migration des larves en l'absence de plantes. Les larves L₃ sont ensuite rincées 3 fois et centrifugées (Micro centrifugeuse Hettich EBA 12R ; 4 500 RPM, 5 min, 20 °C), puis laissées en migration à travers des mailles de 20 µm de diamètre pendant 3 heures à une température de 23 °C. Les larves ayant migré sont reprises dans un volume de 1,5 mL. Le nombre de larves est alors compté dans 200 µL. Le pourcentage d'inhibition de la migration larvaire (LMI = Larval Migration Inhibition) a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$LMI = \frac{T - M}{T} \times 100 \text{ où } T \text{ est le nombre}$$

total de L₃ ayant été en contact du PBS et M le nombre de L₃ en contact avec les extraits.

Mise en évidence de l'effet des tanins

Pour mettre en évidence l'effet des tanins dans la migration larvaire, les extraits ont été mis en contact pendant 2 heures dans un rapport de 1 : 50 avec la polyvinylpyrrolidone

(PVPP) qui a la propriété de capter les molécules de tanins, bloquant ainsi leur action (Makkar, 2006). Les solutions ont ensuite été centrifugées (4500 RPM, 5 min, 20 °C) avant d'être mises en contact avec des larves.

Analyse statistique des données

Le logiciel Excel a servi à calculer les moyennes, les écarts types de la migration larvaire et a généré les graphiques d'illustration. Les comparaisons entre les divers traitements et l'analyse de l'importance d'un effet dose ont été effectuées à l'aide du modèle GLM (Systat 9 Ltd). L'effet dose-réponse a été déterminé en considérant le niveau statistique de signification à P < 0,05.

RESULTATS

Ratio extrait sec/drogue (m/m)

Le ratio extrait sec/drogue (m/m) est estimé à 13% pour *Zanthoxylum zanthoxyloides* et pour *Newbouldia laevis* pour l'extraction hydroéthanolique alors que le ratio extrait sec/drogue (m/m) est estimé à 9,8% pour *Zanthoxylum zanthoxyloides* et à 5,3% pour *Newbouldia laevis* pour l'extraction hydroacétonique.

La teneur en tanins des plantes

La méthode de la Pharmacopée Européenne nous a permis de montrer que dans 100 g de poudre de feuilles de *Newbouldia laevis*, il y a 0,045 g de tanins exprimés en pyrogallol tandis que dans 100 g de poudre de feuilles de *Zanthoxylum zanthoxyloides* il y a 0,5 g de tanins exprimés en pyrogallol. Ces résultats mettent en évidence que les feuilles de *Zanthoxylum zanthoxyloides* sont 11 fois plus riches en tanins que les feuilles de *Newbouldia laevis*.

Inhibition de la migration larvaire

Les extraits de *Newbouldia laevis* et de *Zanthoxylum zanthoxyloides* inhibent *in vitro* la migration larvaire de *Haemonchus contortus* (Figure 1). Cet effet varie en fonction de la dose de traitement (p<0,001) et du solvant d'extraction (acétone-eau ou éthanol-eau). Les

extraits hydroéthanoliques semblent avoir plus d'effet surtout aux fortes doses.

Le contact des extraits de plantes avec la polyvinyl pyrrolidone (PVPP) annule totalement l'effet de l'extrait hydroacétonique de *Z. zanthoxyloïdes* et réduit partiellement l'effet de l'extrait hydroéthanolique de la même plante sur *H. contortus* (Figure 2). Avec *N. laevis*, la PVPP ne réduit que très partiellement

l'effet de la plante quel que soit le solvant d'extraction (acétone-eau ou éthanol-eau). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la migration larvaire est en partie due à l'action des tanins et qu'en dehors de ceux-ci, les extraits des deux plantes contiendraient d'autres métabolites secondaires perturbant la migration des larves L₃.

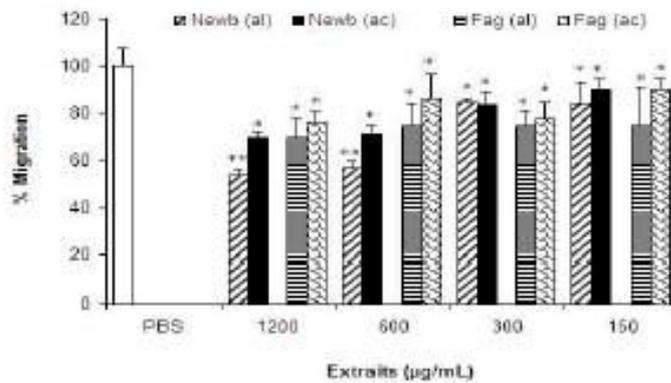


Figure 1 : Variation de la migration larvaire de *Haemonchus contortus* en fonction des extraits de plantes : *N. laevis* (Newb), *Z. zanthoxyloïdes* (Fag), alcoolique (al), acétonique (ac)
*P<0,05 ; **P<0,01

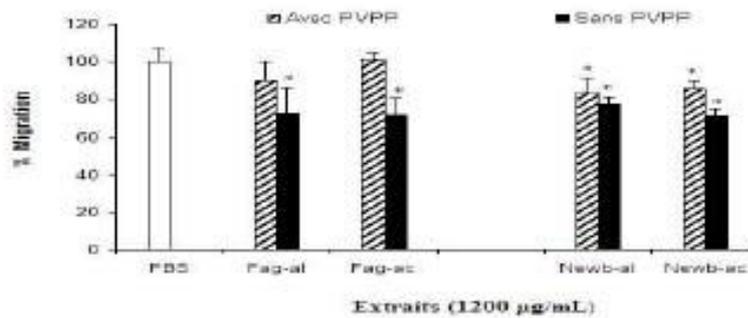


Figure 2 : Variation de l'effet des extraits de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes* en présence (Avec) ou non (Sans) du PVPP sur la migration larvaire de *Haemonchus contortus*
*P<0,05

DISCUSSION

L'objectif de l'étude est de montrer l'importance des tanins de *Newbouldia laevis* et de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes*, deux plantes tropicales, sur la migration larvaire de

Haemonchus contortus, hématoophage, parasite gastro-intestinal des petits ruminants. L'acétone et l'éthanol ont été choisis comme solvant d'extraction car ils extraient les composés polaires des plantes, sont miscibles avec des

solvants organiques et aqueux et sont non toxiques pour des organismes utilisés lors des tests (Eloff, 1998). L'acétone et l'éthanol extraient de plus grandes quantités de composés de végétaux comparativement au dichlorométhane et à l'hexane (Bizumenyera et al., 2005). Le contrôle des parasitoses gastro-intestinales par les plantes réside entre autres dans la capacité de celles-ci à agir sur la viabilité ou la fertilité des vers adultes, à réduire l'excrétion des œufs ou à limiter l'installation des larves par leur immobilisation ou l'inhibition de leur dégainement bloquant ainsi le cycle de vie des parasites. La diminution de la migration larvaire est due à leur immobilité ou à leur mortalité. L'espèce abomasale *Haemonchus contortus* a eu un pourcentage de migration moins important après contact avec les extraits de plantes tropicales. Cette inhibition de la migration larvaire varie en fonction de la concentration des différents extraits de plantes.

Les extraits hydroacétoniques et hydroéthanoliques de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloides* inhibent donc *in vitro* la migration des larves infestantes de *H. contortus* et les tanins y jouent un rôle essentiel. Brunet et al. (2007) ont montré que l'extrait de sainfoin, une plante riche en tanins, affecte la cinétique de dégainement des L₃ de *H. contortus* et que cet effet inhibiteur dépend de la concentration en extrait. De même, Bahaud et al. (2006) avaient montré que certaines plantes plus ou moins riches en tanins pouvaient inhiber partiellement ou complètement la migration *in vitro* des larves L₃. Mais l'efficacité de ces tanins dépendrait de leur structure et de la nature des monomères comme l'ont montré les travaux de Brunet et Hoste (2006). Les plantes doivent ces propriétés anthelminthiques à leur composition phytochimique et les résultats de l'inhibition tannique suggèrent l'activité d'autres métabolites secondaires. On soupçonne entre autres les alcaloïdes mais d'après Barreau et al. (2005) des flavonoïdes pourraient aussi expliquer les propriétés anthelminthiques des plantes bio actives. *N. laevis* renferme selon OLOURLADE (2005) des familles des composés tels que les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les anthocyanes, les dérivés

quinoniques, les saponosides, les mucilages, les stéroïdes et les triterpénoïdes. Cette plante est également riche en quinones telle la newbouldiquinone (Eyong et al., 2006) ou céramide (Eyong et al., 2005) et en alcaloïdes associés à des pigments. Plusieurs molécules d'alcaloïdes, (Tringali, 2001; Diéguez-Hurtado et al., 2003), de flavonoïdes, de terpénoïdes et de coumarines (Mara et al., 1992) ont été isolées des différents organes d'espèces appartenant au genre *Zanthoxylum*.

Par ailleurs, Brunet et al. (2008) ont observé des lésions structurelles sur des L₃ ayant été en contact avec des extraits de sainfoin. Outre l'inhibition de la migration larvaire, *N. laevis* et *Z. zanthoxyloides* induiraient probablement sur les larves infestantes des altérations structurelles et fonctionnelles sur lesquelles il serait intéressant de faire la lumière. Une inhibition dose-dépendante de la migration des larves L₃ de *H. contortus* a été mise en évidence par Houzangbè-Adoté (2004). La présence des tanins dans ces deux plantes tropicales, *N. laevis* et *Z. zanthoxyloides* pourrait justifier les propriétés anthelminthiques observées. Toutefois, les molécules responsables de leur effet anthelminthique sont encore mal connues et restent à identifier. Les flavonoïdes et les tanins contenus dans la fraction polaire de *Leucecena leucocephala* (Ademola et al., 2005) et les glycosides de flavonols dans le sainfoin (*Onobrychis vicifolia*) (Barrau et al., 2005) ont montré un effet sur la migration des larves L₃ de *H. contortus*. Les tanins contenus dans nos extraits de plantes sont probablement des tanins condensés. En effet, on connaît des tanins condensés (composés polyphénoliques) qui exercent une activité anthelminthique sur les différents stades du cycle parasitaire des nématodes lors des tests *in vivo* chez des moutons et des chèvres (Bahaud et al., 2006; Hoste et al., 2006).

Conclusion

Les résultats de la présente étude ont révélé la part des tanins de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloides* dans l'inhibition de la migration des larves L₃ de *H. contortus*. L'utilisation

traditionnelle des feuilles de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes* par des éleveurs comme anthelminthique semble être justifiée. Cependant il serait nécessaire de réaliser des essais toxicologiques *in vivo* et des études parasitologiques pour considérer le facteur de polyparasitisme dans le bétail et le métabolisme des extraits dans le tube digestif de l'animal. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la nature exacte des tanins présents dans les extraits des feuilles de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes*.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le gouvernement français à travers les responsables du projet CORUS 6040 (Coopération pour la Recherche Universitaire et Scientifique), de l'AUF (Agence Universitaire de la Francophonie) et du projet AHRES (Appui à la Restructuration et à l'Harmonisation de l'Enseignement Supérieur) pour leur appui financier.

REFERENCES

Adémola IO, Akanbi AI, Idowu SO. 2005. Comparative nematocidal activity of chromatographic fraction of *Leucaena leucocephala* seed against gastrointestinal sheep nematodes. *Pharm. Biol.*, 43: 599-604.

Adjanonhoun EJ, Adjakidje V, Ahyun RA, Ake AL. 1989. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République du Bénin. (Médecine traditionnelle et pharmacopée), Agence de coopération culturelle et technique (ACCT): Paris.

Alawa CBI, Adamu AM, Gefu JO, Ajanusi OJ, Abdu PA, Chiezey NP, Alawa JN, Bowman DD. 2003. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. *Veterinary Parasitology.*, 113: 73 – 81.

Bahuaud D, Martinez-Ortiz De Montellano C, Chauveau S, Prevot F, Torres-Acosta F, Fouraste I, Hoste H. 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of

parasitic nematodes. *Parasitology.*, 132: 545-554.

Barrau E, Fabre N, Fouraste I, Hoste H. 2005. Effect of bioactive compounds from sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology.*, 131: 531-538.

Bizimenyera ES, Swan GE, Chikoto H, Eloff JN. 2005. Rationale for using *Peltophorum africanum* (Fabaceae) extracts in veterinary medicine. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 76: 54-58.

Brunet S, Jackson F, Hoste H. 2008. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *Int. J. Parasitol.*, 38:783-790.

Brunet S, Aufrere J, Elbabili F, Fourasté I, Hoste H. 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology.*, 135: 1-10.

Brunet S, Hoste H. 2006. Les monomères des tannins condensés affectent le dégainement des larves des nématodes parasites des ruminants *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 54 : 7481-7487.

Craplet C, Thibier M. 1984. Pathologie de la gestation. In: Le mouton. 4^e ed. Vigot, Paris.

Dieguez-Hurtado R, Garrido G, Prieto Gonzalez S, Iznaga Y, Gonzalz L, Molina Tores J, Curini, M, Epifano F, Marcotullio MC. 2003. Antifungal activity of some Cuban *Zanthoxylum* species. *Fitoterapia.*, 74: 384-386.

Dramane S, Witabouna KM, Kagoyire K. 2010. Evaluation of Antimicrobial and Free Radical Scavenging Activities of Some Bioactif Taxons from Côte D'ivoire. *Eur J Sci Res.*, 40: 307-317.

Eloff JN. 1998. Which extractant should be used for screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J. Ethnopharmacol.*, 60 :1-8.

- mucus and anthelmintic on nematode larval migration. *Int. J. Parasitol.*, **24** :671-676.
- Salifou S. 1996 . Nématodes et nématodose du tube digestif des petits ruminants du Sud Bénin : Taxonomie, Epidémiologie et les facteurs de variation. Thèse de doctorat, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal, p.162.
- Tringali C, Carmela C, Valeria Cali V, Simmonds MSJ. 2001. Antifeedant constituents from *Fagara macrophylla*. *Fitoterapia* ,**72** : 538-543.
- Van Wyk JA; Malan FS. 1988. Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Veterinary Record.*, **123**: 226-228.

uncorrected proof

Article 6: *In vitro* study on the role of the tannins of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* on infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*.

Accepté sous revision dans African Journal of Agriculture

In vitro study on the role of the tannins of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* on infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*

P. A. Olounladé^{1,2,6*}, M. S. Hounzangbé-Adoté¹, E. V. B. Azando^{1,7}, F. Gbaguidi², E. Y. Attakpa³, J. Gbenou⁴, T. B. Tam Ha⁵, M. Moudachirou^{2,4}, H. Hoste^{7,8}, A. Vaientin⁶

¹Laboratoire d'Ethnopharmacologie et de Santé Animale, Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou-Bénin

²Laboratoire de Pharmacognosie, Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique (CBRST) PB 06 Oganla Porto-Novo

³Faculté d'Agronomie, Université de Parakou, BP 123 Parakou, Bénin

⁴Laboratoire de Pharmacognosie et huiles essentielles, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, 01BP 2126, Cotonou, Bénin

⁵Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, Université Paul Sabatier, 35 Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, Cedex 9 France.

⁶Pharma-Dev -UMR 152 / Faculté de Pharmacie, Université de Toulouse III, 35 Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, Cedex 9 France

⁷INRA, UMR 1225 Interactions Hôte Agents Pathogènes 23, Chemin des Capelles, F-31076 Toulouse, France

⁸Université de Toulouse, FNVT, UMR 1225, F-31076 Toulouse, France

*Corresponding author Abiodoun Pascal Olounladé, Po Box 1402 Abomey-Calavi, Bénin,

Tel : +229 97 08 54 68 / 94 27 93 10 E-mail : abiodouno@yahoo.fr

Abstract

Trichostrongylus colubriformis is an important cause of parasitic gastroenteritis in small ruminants, in which it causes diarrhea, weakness, delay of the growth, fast loss of weight, loss of production and death. The *in vitro* efficacy of tannins of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* was determined against this parasitic nematode. Larvae migrations of *T. colubriformis* were incubated at 23 °C in the leaf extracts of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* at concentrations of 150, 300, 600 and 1200 µg mL⁻¹ for three hours, respectively. PBS was used as negative controls. Inhibition of larval migration was significantly ($P < 0.05$) observed with increasing concentrations of the extracts. In the range of concentration examined, the results were dose-dependent for *N. laevis* but not for *Z. zanthoxyloides*. The plants extracts added to polyvinylpolypyrrolidone inhibits total or part of the anthelmintic effect. These results suggest that the larval migration is partially due to the action of tannins. These results support the traditional use of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* against parasites nematodes. Further research is required to isolate and structurally identify the active anthelmintic compounds, and to improve methods of plant extraction of the effective anthelmintic components that will be readily adaptable for use by rural communities against helminthosis.

Keywords: Larval migration, Tannins, *Trichostrongylus colubriformis*; *Newbouldia laevis*, *Zanthoxylum zanthoxyloides*, Benin

INTRODUCTION

Gastrointestinal nematodes remain a major constraint to economic productivity of livestock throughout the world, being the chief parasitoses responsible for disease-related production losses arising from stock mortality, severe weight loss and poor production, especially in small ruminants (Chiejina, 2001; Bizimenyera et al., 2006). *Trichostrongylus colubriformis*, an intestinal nematode, is one of the most important causes of parasitic enteritis causing protracted diarrhoea, weakness, loss of production and death (Bizimenyera et al., 2006).

The infective larvae (L₃) of *T. colubriformis* have a high capacity to survive even in adverse weather conditions (Urquhart et al., 1996). In tropical areas, the high temperatures and rainfall favour the development of the free-living stages to infective stage throughout the year (Bizimenyera et al., 2006).

In the last 30 years, control of gastrointestinal nematode infections of ruminants has been achieved almost exclusively by use of pharmaceutically derived anthelmintics. Indeed, synthetic and semi-synthetically produced anthelmintics have for long been considered the only effective method of controlling helminthoses (Bizimenyera et al., 2006). However, in the extreme situations of subsistence farming where anthelmintics are either unavailable or unaffordable, massive mortalities of young stock are tragically commonplace in tropical Africa and Asia (Griggs, 1996; Bizimenyera et al., 2006). At the other extreme, misuse and or widespread intensive use of sometimes poor quality synthetic or semi-synthetic anthelmintics has led to development of a high level multiple anthelmintic resistance that may lead to failure of control of worm parasites in ruminants (Wolstenholme et al., 2004; Bizimenyera et al., 2006). These constraints indicate that entire reliance on pharmaceutically derived anthelmintics may present difficulties in the management of gastrointestinal parasitic infections in livestock, necessitating alternative methods of helminth control (Sanyal, 2001; Bizimenyera et al., 2006).

In Benin, the breeding is an economically important activity because it represents one of the most important sources of jobs and income. The breeding contributes for about 4 to 6 % in the Gross domestic product of Benin. Except prestige and savings functions, breeding animals contribute to increase the income of the breeders through on one hand, the sale of animals and their by-products and on the other hand through the use

of the fertilizer for the fertilization of farms. However, this breeding is confronted with numerous constraints: the high cost of medicines, state of financial fragility of the producers, disturbing appearance of crossed resistances in the modern molecules, the lack of sanitary frame of the breeders and the traditional system of the managements of the herds. Among the constraints, animal health is one of animal production essential limitation. The levying of these constraints requires the implementation of the efficient practices of fight by the use of the available endogenous resources. Among these resources, we can quote healing plants. Helminthes infection is a major threat to small ruminant production leading to enormous economic losses particularly in areas where extensive grazing is practiced (Waller, 1997).

In recent times, there has been an increasing interest in ethnomedical and ethnoveterinary practices across the world, especially as it relates to the use of medicinal plants in treating various ailments (Bizimenyera et al., 2006). Use of indigenous plants preparations as livestock dewormers is gaining ground as one of the alternative and sustainable methods readily adaptable to rural farming communities (Hammond et al., 1997). Important opportunities exist through research on the traditional use of herbal medicine, since 80% of people in developing countries rely on phytomedicine for primary healthcare in both humans and animals (Bizimenyera et al., 2006). As ethnomedicine does not follow western paradigms of scientific proof of efficacy and safety, most medical and veterinary professionals distrust the use of herbs, and know little about them (Thompson, 1997). Numerous plant species and extracts have been evaluated and research efforts have mainly focused on condensed tannins (Hoste et al., 2006; Alonzo-Diaz et al., 2008). Due to the quantity of the different types of secondary compounds that exist in plants that could potentially be used as anthelmintics, rapid and cost-effective in vitro screening is necessary (Whitney et al., 2011).

The plants were chosen on the basis of a recent questionnaire survey in Benin which indicated that they were frequently used by small scale farmers against parasitic infections or to treat associated clinical signs (Hounzangbé-Adoté, 2000). *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* have commonly been used in African folk medicine for the treatment of several diseases such as diarrhea, jaundice, hemorrhoids, dysentery, sore throat, gonorrhea and icterus (Arbonnier, 2004). They are also employed against malaria, sexually transmitted disease, dental caries,

arthritis pain, gastroenteritis, dysentery and as vermifuge (Eyong et al, 2005). Leaves are used against infertility (Adjanahoun et al, 1991) .

The aim of the present in vitro study was to establish the effects of tannins of leaves of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* on the larvae L₃ migration of the intestinal parasite of sheep and goats, *T. colubriformis*.

MATERIALS AND METHODS

Collection and preparation of plant material

Sample collected in South of Benin (atlantic department) was identified made by the National Herbarium of Abomey-Calavi University (Herbier National de l'Université d'Abomey-Calavi). Classification of the species was performed by means of the key according to Cronquist (Cronquist, 1988). Voucher specimens are kept at the Herbarium of Abomey-Calavi University for *Zanthoxylum zanthoxyloides* under N° AA 6301 / HNB and *Newbouldia laevis* under N° AA 6302 / HNB . The plants were dried indoors at room temperature and a large part is reduced into powder for extraction.

Plants extracts preparation

Acetone and ethanol have been shown to be a good extractants of compounds from plants (Eloff, 1998). The study on extraction of bioactive compounds from plants (Bizimenyera et al., 2005) showed that acetone and ethanol extracted the largest amount of material from the plant when compared to dichloromethane and hexane.

Hydro-ethanolic extract

50 grams of each plant powder is refluxed in a water bath under magnetic stirring during one hour in 500 mL of ethanol-water (70: 30) mixture. The solution is cooled then filtered. The operation is repeated twice and ethanol are removed under pressure at T = 40°C. The aqueous solution was defatted and plant pigments like chlorophyll, were removed by washing three times with dichloromethane (3 ×300 mL) and ethyl acetate (3 ×200 mL). Then the remaining aqueous fractions were lyophilized and kept at -70 °C. The yields of extraction (mass/mass) were calculated.

Hydro-acetonic extract

50 grams of plant powder is refluxed in a water bath under magnetic stirring during one hour in 500 mL of acetone-water (70:30) mixture. The solution is cooled then filtered. The operation is repeated twice and acetone is removed under pressure at $T = 40^{\circ}\text{C}$. The aqueous solution was defatted and plant pigments like chlorophyll, were removed by washing three times with dichloromethane ($3 \times 300 \text{ mL}$) and ethyl acetate ($3 \times 200 \text{ mL}$). Then the remaining aqueous fractions were lyophilized and kept at -70°C . The yields of extraction (mass/mass) were calculated.

Determination of condensed tannins (CT) by the method of Butanol-HCl

The determination of CT was performed by the colorimetric method of Butanol-HCl developed by Porter et al. (1986), based on the depolymerization reaction of CT in acid medium. This reaction leads to the release of anthocyanidins (colored molecules) corresponding to the cleaved monomer (Makkar, 2000 ; Schofield et al., 2001). It allows a semi-quantitative determination of CT as the released terminal monomers do not produce the corresponding anthocyanidins and therefore they are not dosed (Schofield et al., 2001). In the plant, the CTs are present in different forms: free or bound, ie attached to proteins or plant fibers (Schofield et al., 2001). The existence of these two forms (free or bound) made the determination of CT more difficult. CTs content was analysed using the Butanol-HCl assay according to Makkar (2000).

Larval preparation

Infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis* L₃ were obtained by fecal culture of goats previously artificially infected with pure strains of *T. colubriformis*. After egg hatching, L₃ stage was reached after 10 days. The L₃ were then collected by sedimentation using Baermann's devices. This batches of 1-to-2-month-old larvae were used in the assays.

Bioassays: Larval migration inhibition assay

The larval migration inhibition (LMI) assay was used as described by Rabel et al. (1994) adapted for plant extracts (Jackson and Hoste, 2010), in order to measure inhibiting activity against infective larvae. Larvae were incubated for 3 h at 20 °C in PBS plant extract solutions, at concentrations of 150, 300, 600 or 1200 µg/mL at the rate of 3 repetitions by concentration. The larvae were then washed three times in phosphate buffer (PBS) (pH 7.2, 0.15 M) and centrifuged. After the last washing, 800 µL of larvae at a concentration of 1000 L₃/mL was pipetted onto a 20 µm mesh. The sieve was inserted into a conical tube, so that it just touched the surface of the PBS contained therein. Three replicates were run at room temperature (23°C) for each plant concentration. In addition, negative (larvae incubated in PBS) control was run in parallel. After 3 h, the L₃ above the sieve were discarded and those which had actively migrated through the mesh into the PBS below, were counted under a optical microscope (at 40 x magnification), based on a 10% aliquot technique.

The percentage of LMI was calculated as $[(T-M)/T \times 100]$ where T is the total number of L₃ deposited in the sieve and M the number of L₃ having migrated through the mesh into the PBS.

Involvement of the tannins in the anthelmintic activity: Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) forms complexes with tannins and polyphenols and thus blocks their potential biological activity (Makkar, 2003). PVPP was added to the plant extracts at a concentration of 1200 µg/mL for 2 hours in a 1:50 ratio (Barrau et al., 2005). These solutions were then centrifuged at 4500 RPM, (5 min, 20°C). After centrifugation, the supernatant and the extracts without adding PVPP were used to incubate sheathed infective larvae of *T. colubriformis*. Thereafter, the LMI assay was performed according to the procedure described previously.

Statistical data analysis

Larval migration bioassay: Excel software was used to calculate averages, standard deviations of larval migration and to generate graphical illustration. A GLM (general linear model) statistical test was performed to determine the difference in the mean percentage of LMI rates between the control and the different dose groups (150, 300,

600 and 1200 µg/mL) procedures using Systat 9 software (SPSS Ltd.). The dose-response effect was determined by considering the level of statistical significance at $P < 0.05$. The same test was applied for the comparison of response in the experiment with the extracts at 1200 µg/mL with or without PVPP.

RESULTS

Yield extractions

From the two selected plants, four extracts were obtained. The Table 1 shows the yields obtained for each plant extracts. These results show that the hydro-ethanolic extracts gave the best yields.

The condensed tannin content of plants

The method of Butanol-HCl showed that the condensed tannins of *Zanthoxylum zanthoxyloides* were estimated at 2.5% of the dry matter, while condensed tannins of *Newbouldia laevis* were estimated at 1.0%. These results showed that *Zanthoxylum zanthoxyloides* leaves contain 2.5 times more rich in condensed tannins (CTs) than those of *Newbouldia laevis*.

Inhibition of larval migration

The extracts of *Zanthoxylum zanthoxyloides* and *Newbouldia laevis* inhibit *in vitro* migration of larvae of *Trichostrongylus colubriformis* (Figure 1). This effect depends on the dose of the treatment ($p < 0.001$) and the extraction solvent (acetone-water or ethanol-water) (Figure 1). Ethanol-water extracts seem to have more effect. However, *T. colubriformis* seems less sensitive to the dose effect of *Z. zanthoxyloides* ($p < 0.07$).

Adding polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) to the plant extracts completely inhibits the effect of acetone-water extract of *Z. zanthoxyloides* and partially reduces the effect of the ethanol-water extract on parasites (Figure 2). With *N. laevis*, the PVPP can only partially reduce the effect of the plant on *T. colubriformis*, regardless of the extraction solvent (acetone-water or ethanol-water). These results suggest that the inhibition of larval migration is partly due to the action of tannins and that apart from these, the extracts of plants contain two other secondary metabolites disturbing the migration of L₃ larvae of *T. colubriformis*.

DISCUSSIONS

L₃ stage is very important for the parasite cycle. L₃ larvae are the infective stage. An *in vivo* study on West African Dwarf goats showed anthelmintic activity of *Z. zanthoxyloides* and *N. laevis* on the most important gastrointestinal parasites nematodes in small ruminants. The powders of leaves of *Z. zanthoxyloides* and *N. laevis* reduced excretion of strongyles eggs without dose-effect but with a greater efficiency for *N. laevis* (Azando et al., 2011). Paolini et al. (2003) have shown the effects of quebracho extract tannins on L₃ larvae.

The decrease in migration of L₃ larvae of *T. colubriformis* after incubation with plant extracts is due to their immobility or mortality. This inhibition of larval migration depends on the concentration of plant extracts and regardless of the extraction solvent.

The aim of the study was show the involvement of the tannins of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides*, two tropical plants, in the larval migration of *Trichostrongylus colubriformis*, a gastrointestinal hematophagous parasite of small ruminants. Acetone and ethanol were chosen as extraction solvents because they extract polar compounds from plants, are miscible with organic and aqueous solvents and are nontoxic to the organisms used in the tests (Eloff, 1998). The acetone and ethanol extract larger amounts of compounds from plants compared with dichloromethane and hexane (Bizimenyera et al., 2005). Control of gastrointestinal parasites by plants lies among others in the ability of these to affect the viability or fertility of adult worms, to reduce egg excretion or to limit the installation of larvae by their immobilization or by inhibition of their exsheathment, thus blocking the life cycle of parasites. The reduction in larval migration is due to their immobility or mortality. Aqueous-acetone and Aqueous-ethanolic extracts of *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* therefore inhibit *in vitro* migration of infective larvae of *T. colubriformis* and tannins play an essential role. Brunet et al. (2007) showed that the extract of sainfoin "a plant rich in tannins," affects the kinetics of unsheathing of strongyle L₃ and that this inhibitory effect depends on the extract concentration. Similarly, Bahuaud et al. (2006) showed that some plants more or less rich in tannins can inhibit partially or completely *in vitro* migration of L₃ larvae. But the effectiveness of these tannins depend on their structure and nature of the monomers as shown by the work of

Brunet and Hoste (2006). Tannins have potential in the inhibition of lipid peroxidase. They are scavengers of free radicals, inhibiting the formation of superoxide ion (Bruneton, 1999). The anthelmintic properties of the plants are due to their phytochemical composition and the results of inhibition tannins suggest the activity of other secondary metabolites. Alkaloids are suspected among other but according to Bar et al. (2005) flavonoids might also explain the anthelmintic properties of bioactive plants. Some studies have shown that *N. laevis* contains families of compounds such as tannins, flavonoids, alkaloids, anthocyanins, quinone derivatives, saponins, mucilages, steroids, triterpenoids and essential oils (Olounladé, 2005). This plant is also rich in quinones such as newbouldiaquinone (Eyong et al, 2006) or ceramide (Eyong et al., 2005) and alkaloids associated with pigments. Several alkaloids (Diéguez-Hurtado et al., 2003), flavonoids, terpenoids and coumarins (Mara et al., 1992) were isolated from different organs of species of the genus *Zanthoxylum*.

Otherwise, Brunet et al. (2008) found structural damage on L₃ having been in contact with sainfoin extracts. In addition to the inhibition of larval migration, *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* probably induce, on the infective larvae, structural and functional alterations on which it would be interesting to clear. A dose-dependent inhibition of the migration of L₃ larvae of *T. colubriformis* was highlighted by Hounzangbé-Adoté (2004). The presence of condensed tannins in the both tropical plants, *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* could justify the observed anthelmintic properties. However, the molecules responsible for their anthelmintic effect are still unknown and remain to be identified. Flavonoids and tannins in the polar fraction of *Leuceana leucocephala* (Ademola et al., 2005) and flavonol glycosides in sainfoin (*Onobrychis vicifolia*) (Barrau et al., 2005) showed an effect on the migration of larvae strongle L₃ larvae. The tannins in our plant extracts are partly condensed tannins. Indeed, we know of condensed tannins (polyphenolic compounds) that are active anthelmintic on the different stages of the parasitic cycle of nematodes when tested *in vivo* in sheep and goats (Bahuaud et al. 2006; Hoste et al. 2006; Alonzo-Diaz et al., 2008).

CONCLUSIONS

The traditional use of the *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* extracts against malaria, drepanocytose, sexually transmitted disease, dental caries, diarrhoea, arthritis pain, gastroenteritis, and dysentery, may also be due to anthelmintic activity, as these

signs are consistent with parasitic gastro-intestinal. The anthelmintic activity of *N. laevis* and *Z. zanthoxyloides* extracts, in addition to the antibacterial, antimalaria, antioxidant, hepatoprotective and antihypertensive activities, further support the traditional use of the plants. Research work is ongoing for determining better methods of plants extraction, elucidation of the chemical structure of active compounds, and for *in vivo* tests in suitable target livestock. This work may lead, not only to possible isolation of novel anthelmintics from the plants, but also to the development of better methods of plants extraction which are readily adaptable for use by rural communities against helminthoses.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the CORUS project N° 6040. Mr. A.P. OLOUNLADE acknowledges receiving a scholarship from AUF to undergo his PhD studies. Mr. E.V.B. AZANDO is a grateful recipient of a grant provided from ARHES.

Table 1. Yield extractions

Plants used	Plant part	Type of extraction	Yield (%)
<i>Newbouldia laevis</i>	leaves	Hydro-ethanolic	13 ± 0.7
		Hydro-acétonic	5.3 ± 0.4
<i>Z. zanthoxyloides</i>	leaves	Hydro-ethanolic	13 ± 0.5
		Hydro-acetonic	9.8 ± 0.4

Figure legends

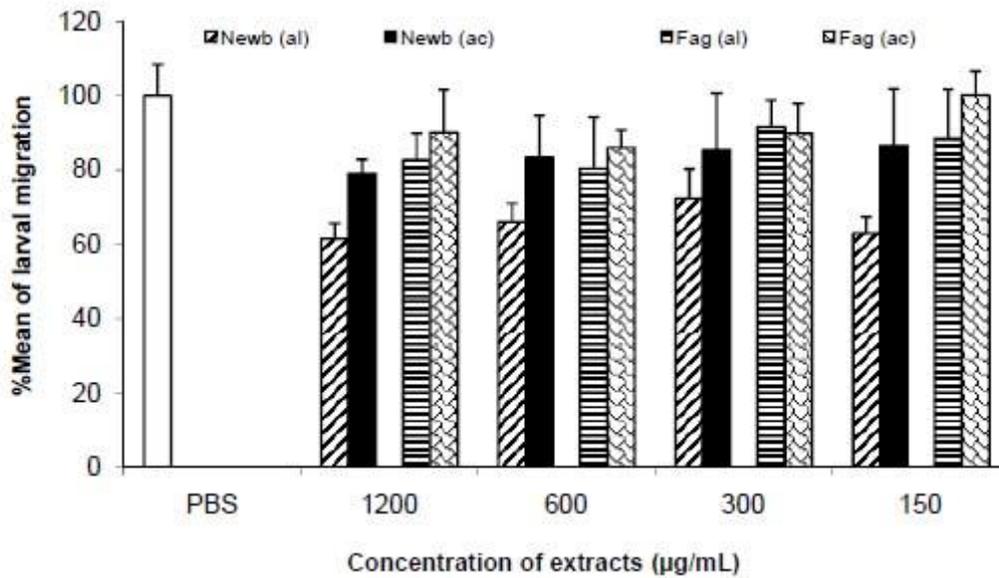


Figure 1. Percent mean of larval migration of *Trichostrongylus colubriformis* incubated with leaf extracts of *Newbouldia laevis* (Newb) and *Z. zanthoxyloides* (Fag), ethanolic (al), acetonetic (ac)

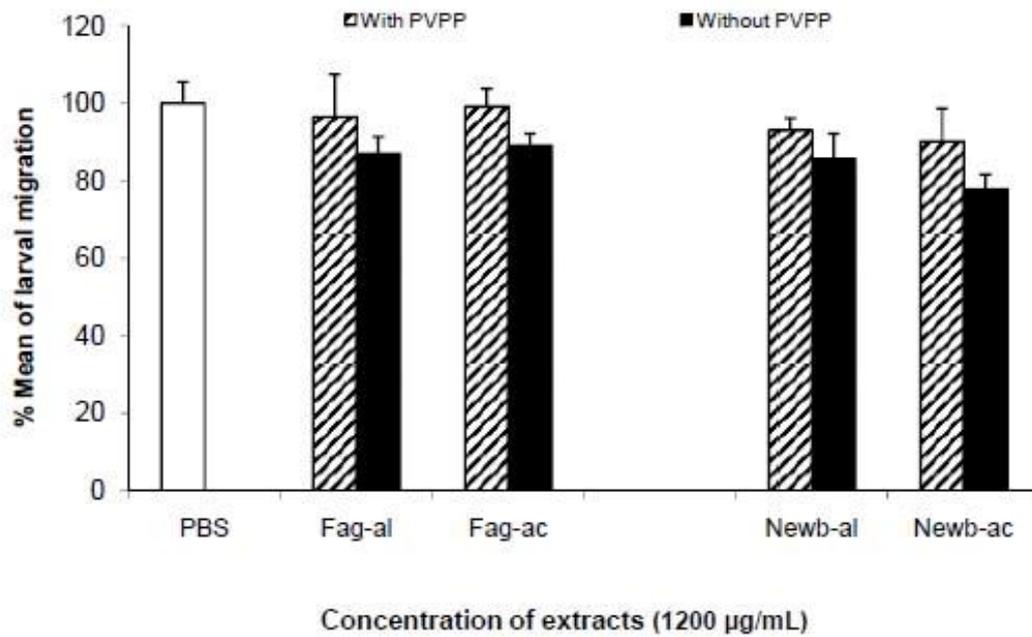


Figure 2 . Percent mean of larval migration of *Trichostrongylus colubriformis* incubated with leaf extracts of *Newbouldia laevis* and *Z. zanthoxyloides* , with or without PVPP .

References

Ademola IO, Akanbi AI, Idowu SO (2005). Comparative nematocidal activity of chromatographic fractions of *Leucaena leucocephala* seed against gastrointestinal sheep nematodes. *Pharm. Biol.* 43 : 599-604.

Adjanahoun E, Ahyi MRA, Ake-Assi L, Elewude JA, Fadoju SO, Gbile ZO, Goudole E, Johnson CLA, Keita A, Morakinyo O, Ojewole JAO, Olatunji AO, Sofowora EA. (1991). Traditional medicine and pharmacopoeia. Contribution to ethnobotanical floristic studies in Western Nigeria, Pub. Organization of African Unity, Scientific Technical and Research Commission Lagos, Nigeria, p. 420.

Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Capetillo Leal C, Brunet S, Hoste H(2008). Effects of four tropical tanniferous plants on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet. Parasitol.* 153:187-192.

Arbonnier M (2004). Tree, Shrubs and Liana of West Africa dry zones. CTA, Postbus 380 6700AJ Wageningen. The Netherlands

Azando EVB, Hounzangbé-Adoté MS, Olounladé AP, Brunet S, Fabre N, Valentin A, Hoste H (2011). Involvement of tannins and flavonoids in the *in vitro* effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* doi:10.1016/j.vetpar.2011.03.010

Bahuaud D, Martinez-Ortiz De Montellano C, Chauveau S, Prevot F, Torres-Acosta F, Fouraste I, Hoste H (2006). Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology.* 132:545-554.

Bar NG, Epshtein V, Ruckenstein AE, Rafikov R, Mustaev A, Nudler E (2005). A ratchet mechanism of transcription elongation and its control. *Cell* 120:183-193 .

Barrau E, Fabre N, Fouraste I, Hoste H (2005). Effect of bioactive compounds from sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology*. 131: 531-538.

Bizimenyera ES, Githiori JB, Eloff JN, Swan GE (2006). *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* 142:336-343

Bizimenyera ES, Swan GE, Chikoto H, Eloff JN (2005). Rationale for using *Peltophorum africanum* (Fabaceae) extracts in veterinary medicine. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 76: 54-58.

Brunet S, Jackson F, Hoste H (2008). Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *Int. J. Parasitol.* 38:783-790.

Brunet S, Aufrere J, Elbabili F, Fourasté I, Hoste H (2007). The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology*. 135: 1-10.

Brunet S, Hoste H (2006). Les monomères des tannins condensés affectent le dégainement des larves des nématodes parasites des ruminants *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 : 7481-7487.

Bruneton J (1999). Tannins. In: Tec & Doc (Ed.), *Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales*, Paris, pp 369-404.

Chiejina SN (2001). The epidemiology of helminth infections of domesticated animals in the tropics with emphasis on fascioliasis and parasitic gastroenteritis. In: Chowdhury, N., Tada, I. (Eds.), *Perspectives on Helminthology*. Science Publishers Inc., Enfield, pp 41–87.

Cronquist A (1988). *The evolution and classification of flowering plants*. New York: New York Botanic Gardens, p 555.

Dieguez-Hurtado R, Garrido G, Prieto Gonzalez S, Iznaga Y, Gonzalaz L, Molina Tores J, Curini, M, Epifano F, Marcotullio MC (2003). Antifungal activity of some Cuban *Zanthoxylum* species. *Fitoterapia*.74: 384-386.

Eloff JN (1998). Which extractant should be used for screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J. Ethnopharmacol.* 60 :1- 8.

Eyong KO, Folefoc GN, Kuete V, Beng PV, Krohn K, Hussain H, Nkengfack EA, Saefel M, Sarite SR, Hoerauf A (2006). Newbouldiaquinone A: a naphthoquinone-anthraquinone ether coupled pigment, as a potential antimicrobial and antimalarial agent from *Newbouldia laevis*, *Phytochemistry.* 67: 605-609.

Eyong KO, Krohn K, Hussain H, Folefoc GN, Nkengfack AE, Schulz B, Hu Q (2005). Newbouldiaquinone and newbouldiamide: a new naphthoquinone-anthraquinone coupled pigment and a new ceramide from *Newbouldia laevis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo).* 53:616-619.

Griggs T (1996). Worms can't wriggle out of this one. In: Lee, B., Lehane, R. (Eds.), *The Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR). Production N° 9.* pp. 19–24.

Hammond JA, Feiling D, Bishop SC (1997). Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Vet. Res. Comm.* 21: 213 – 228

Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg SM, Hoskin SO (2006). The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 22: 253-261.

Houngangbé-Adoté MS (2004). Propriétés anthelminthiques de 4 plantes tropicales testées *in vitro* et *in vivo* sur les nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants Djallonké. PhD dissertation, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin.

Houngangbé-Adoté MS (2000). La pharmacopée en médecine vétérinaire au sud Bénin (cas des ovins et caprins). Colloque Européen d'Ethnopharmacologie. Société Française d'ethnopharmacologie. Metz du 11 au 13 mai 2000.

Igoli JO, Igwue IC, Igoli NP (2003). Traditional Medicinal Practices amongst the Igede people of Nigeria. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 10, 1-10

Jackson F, Hoste H (2010). *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In "In vitro screening of plant resources for extra nutritional attributes in ruminants nuclear and related methodologies" P Vercoe, HPS Makkar and AC Schlink Eds, Springer/International Atomic Energy Agency Edition Dordrecht, pp 25-45.

Makkar HPS (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rum.Res.* 49 : 241- 256.

Makkar H P S (2000). In Quantification of tannins in tree foliage : Working document, FAO/IAEA, Vienna.

Mara SP, Arruda Jao B, Fernandes Paulo C, Viera M, Fatima Das GF, Da Silva Jose RP (1992). Chemistry of *Zanthoxylum rhoifolium*. A new secofuraquinoline alkaloids. *Biochem. System Ecol.* 20: 173-178.

Olounladé AP (2005). Effets anthelminthiques des feuilles de *Newbouldia laevis* testées *in vivo* sur les nématodes gastro-intestinaux (*Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis*) chez les moutons Djallonké. DEA , Université de Lomé, Lomé, Togo.

Paolini V, Bergeaud JP, Griez C, Prevot F, Dorchies P, Hoste H (2003). Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitol.* 113 : 253-261.

Perry BD, Randolph TF (1999). Improving assessment of the economic impact of parasitic diseases and their control in production animals. *Vet. Parasitol.* 84, 145–168.

Porter LJ, Hrstich LN ,Chan BG (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphinidin. *Phytochemistry.* 25: 223-230.

Rabel B, McGregor R, Dough PGC (1994). Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintic on nematode larval migration. *Int. J. Parasitol.* 24 :671-676.

Sanyal PK (2001). Integrated management of parasitic gastroenteritis in ruminants. In: Chowdhury, N., Tada, I. (Eds.), *Perspectives on Helminthology*. Science Publishers Inc., Enfield, pp. 439–460.

Schofield P, Mbugua DM, Pell AN (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91: 21-40.

Thompson A (1997). As patients embrace herbal remedies, dearth of scientific evidence frustrates clinicians. *Am. J. Health Syst. Pharmacol.* 54: 2656–2664.

Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW (1996). *Veterinary Parasitology*, Blackwell, 2nd ed., Oxford, pp. 10-26.

Waller PJ (1997). Nematode parasite control of livestock in the tropics/subtropics: the need for novel approaches. *Int. J. Parasitol.* 27:1193-1201.

Whitney TR, Lee AE, Klein DR, Scott CB, Craig TM, Muir JP (2011). A modified *in vitro* larvae migration inhibition assay using rumen fluid to evaluate *Haemonchus contortus* viability. *Vet. Parasitol.* 176 : 217-225.

Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard RK, Von Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol.* 20: 469-476.

**CHAPITRE IV : EVALUATION *IN VIVO* DE L'EFFET
ANTHELMINTHIQUE D'EXTRAIT DE *N. LAEVIS* SUR
LES NEMATODES PARASITES GASTRO-INTESTINAUX
DES OVINS DJALLONKE**

4. Evaluation in vivo de l'effet anthelminthique d'extrait de *N. laevis* sur les nematodes parasites gastro-intestinaux des ovins djallonké

4.1. Introduction

Parker et Palmer (1991) ont mis en évidence que *Calliandra calothyrsus* (légumineuse fourragère) réduit la population de nématodes (*H. contortus*, *T. colubriformis*) présents chez les moutons. Cette plante affecterait la viabilité de leurs œufs. Muhammad Lateef *et al.*, [2003] révèlent que les racines *Adhatoda vasica* induisent une réduction maximale du nombre d'œufs par gramme (OPG) chez les moutons traités, mais bien que cette plante ait révélé une propriété anthelminthique contre les nématodes, cette activité était bien inférieure à celle du lévamisole. La consommation de plantes riches en tanins a été associée à des effets néfastes sur les nématodes gastro-intestinaux (GIs) et à une amélioration de la résilience de l'hôte vis-à-vis du parasitisme GI. Il a été suggéré que les tanins affecteraient la capacité des larves infestantes (L3s) de s'installer chez l'hôte. Dans cette étude, nous avons testé ces hypothèses en utilisant *N. laevis*, une plante tropicale connue pour être utilisée par les éleveurs dans le traitement des nématodoses GI (Hounzangbé-Adoté, 2004).

Cette étude avait pour objectif d'évaluer *in vivo* l'efficacité des extraits de feuilles de *N. laevis* sur les strongles gastro-intestinaux des ovins Djallonké. *H. contortus* et *T. colubriformis* sont les nématodes parasites gastro-intestinaux prédominants au Bénin. Ce travail a été réalisé en milieu contrôlé (Ferme FSA). Les traitements ont été administrés par voie orale.

4.2. Matériel et méthodes

Pour évaluer l'effet anthelminthique de *Newbouldia laevis*, deux types d'infestations ont été réalisées.

Infestation artificielle : 12 agneaux Djallonké, exemptes de nématodes GIs, ont été réparties en 3 groupes expérimentaux selon leur poids. Les animaux témoins sont sans traitement. Les animaux des 2 autres groupes ont reçu l'extrait de poudre de feuilles de *N. laevis* à la dose de 0,8 g/Kg ou 1,6 g/Kg selon le cas pendant 3 jours consécutifs. Les agneaux ont été infestés par un mélange de 3000 L₃s d'*H. contortus* et de *T. colubriformis*. Les animaux ont été sacrifiés 15 jours après le dernier traitement. Le comptage de larves et des vers présents dans l'abomasum et l'intestin grêle, ont été réalisés pour chaque animal.

Infestation naturelle : 21 agneaux Djallonké, exposés à une infestation naturelle, ont été réparties en 3 groupes expérimentaux selon leur poids en pâturant dans des enclos séparés. Les animaux témoins ne subissent pas de traitement. Les animaux des 2 autres groupes ont été traités sur 3 jours consécutifs par voie orale par l'extrait de poudre de feuilles de *N. laevis* à raison respectivement de 0,8 g/Kg et de 1,6 g/Kg de poids vif. Les animaux ont été pesés toutes les semaines pendant 5 semaines au total et les fèces ont été collectées également de façon bihebdomadaire afin de mesurer l'excrétion parasitaire. La fertilité individuelle des vers femelles a été mesurée par la technique décrite par KLOOSTERMAN et al. (1978). Parallèlement, les moutons ont subi un prélèvement sanguin au niveau de l'oreille toutes les semaines et l'hématocrite a été déterminé par centrifugation (12000g, 5 minutes) du sang total prélevé dans des microtubes capillaires. Les animaux ont été sacrifiés à la fin de l'expérimentation pour effectuer un bilan parasitaire qui consiste à identifier et à comptabiliser des parasites intestinaux présents et leurs stades larvaires.

4.3. Résultats

N. laevis sous la forme d'extrait de poudre de feuilles s'est montré efficace sur les nématodes gastro-intestinaux des agneaux Djallonké à travers une réduction sensible du taux d'excrétion des œufs, une diminution du nombre des vers adultes, une limitation de l'installation des larves de *T. colubriformis*, une régression du nombre d'œufs dans l'utérus des vers femelles de *T. colubriformis* et un maintien de l'hématocrite. Etant donné l'absence d'une relation dose-effet sur ces paramètres, cette plante pourrait donc être utilisée sous la forme d'extrait à la dose de 0,8 g/kg du poids vif par voie orale sur 3 jours chez les agneaux dans le contrôle des parasitoses gastro-intestinales, ce qui constituerait une méthode alternative ou complémentaire aux anthelminthiques dans la maîtrise du parasitisme digestif en milieu tropical.

Article 7 : Effets anthelminthiques *in vitro* d'extraits de feuilles de *Newbouldia laevis* sur les nématodes parasites gastro-intestinaux des ovins Djallonké.

Sous presse dans les Annales des Sciences Agronomiques

Annales des Sciences Agronomiques 15 (2) : 137-152, 2011 ISSN 1659-5009

**EFFETS ANTHELMINTHIQUES IN VIVO D'EXTRAITS DE FEUILLES DE
NEWBOULDIA LAEVIS SUR LES NÉMATODES PARASITES GASTRO-
INTESTINAUX DES OVINS DJALLONKÉ**

P.A. OLOUNLADE*** ; E.V.B. AZANDO****; D. F. DAGA* ; E.Y. ATTAKPA****; A. VALENTIN**; H. HOSTE***& M.S. HOUNZANGBE-ADOTE*

*Laboratoire d'Ethnopharmacologie et de Santé Animale, FSA-UAC, 01 BP 526 Cotonou (Bénin) – email : syladote@yahoo.fr

**Pharma-Dev -UMR 152 / Faculté de Pharmacie, Université de Toulouse III, 35 Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, Cedex France.

***UMR 1225 Interactions Hôtes Agents Pathogènes, Institut National de Recherche Agronomique, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (France)

****Faculté d'Agronomie, Université de Parakou, BP 123 Parakou, Benin

RÉSUMÉ

Dans le but d'évaluer les propriétés anthelminthiques d'extraits alcooliques de feuilles de *Newbouldia laevis* sur *Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis*, des agneaux Djallonké âgés de 4 à 6 mois ont été traités par voie orale à raison de 0,8 g/Kg ou de 1,6 g/Kg de poids vif pendant 3 jours lors d'infestation naturelle ou d'infestation artificielle avec des larves infestantes L₃ d'*Haemonchus contortus* et de *Trichostrongylus colubriformis* à raison de 3000 larves par animal. En infestation contrôlée, le traitement a considérablement limité l'installation des larves infestantes de *T. colubriformis* ($p < 0,05$) mais le traitement n'a pas empêché le développement des larves infestantes d'*H. contortus* ($p > 0,05$) quelle que soit la dose de l'extrait de feuilles de *N. laevis*. Par rapport aux témoins négatifs (non traités), l'extrait alcoolique de feuilles de *N. laevis* a significativement ($p < 0,05$) réduit l'excrétion des œufs de strongles ainsi que la viabilité des vers adultes d'*H. contortus* de manière dose indépendante. Le traitement à l'extrait de feuilles de *N. laevis* est sans effet sur le nombre de vers adultes de *T. colubriformis*. L'hématocrite durant la phase d'expérimentation a révélé que les agneaux traités, étaient moins anémiés. Cette étude justifie l'utilisation traditionnelle de *N. laevis* pour le traitement de la parasitose gastro-intestinale des petits ruminants.

Mots clés : Agneaux, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, bilan parasitaire, hématocrite, *Newbouldia laevis*.

**IN VIVO ANTHELMINTIC EFFECTS OF NEWBOULDIA LAEVIS EXTRACTS
ON GASTROINTESTINAL PARASITIC NEMATODE OF DJALLONKÉ SHEEP**

ABSTRACT

In order to evaluate the anthelmintic properties of alcoholic extract of *Newbouldia laevis* on *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*, Djallonké lambs aging between 4 and 6 months at the start of the experiment, were treated orally at 0.8 g / kg or 1.6 g / kg bodyweight for 3 days during natural infection or experimental infection with L₃ infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* at a rate of 3000 third-stage larvae per animal that had been obtained from an infected donor sheep. In experimental infection, the treatment has greatly limited the installation of infective larvae of *T. colubriformis* ($p < 0.05$) but did not prevent the development of infective larvae of *H. contortus* ($p > 0.05$) regardless of the dose of extract of *N. laevis*. Compared to negative control, the alcoholic extract of *N. laevis* has significantly ($p < 0.05$) reduced the excretion of strongyle eggs and the viability of adult worms of *H. contortus* in a dose independent manner. Treatment with extract of *N. laevis* has no effect on the number of adult worms of *T. colubriformis*. The cell coat during the experimental phase showed that sheep treated with *N. laevis* were less anemic. This study has justified the traditional use of *N. laevis* for the treatment of gastrointestinal nematodes of small ruminants.

Keywords : lambs, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Newbouldia laevis*, cell coat, parasitic assessment.

INTRODUCTION

L'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques, pratique multiséculaire, connaît depuis ces deux dernières décennies une certaine réémergence. En effet, le regain d'intérêt pour les plantes médicinales après plus d'un demi-siècle d'usage massif des molécules chimiques de synthèse, s'explique non seulement par la poursuite de leur utilisation séculaire par des populations des pays du Sud, mais aussi et surtout par le fait que les molécules de synthèse ont tôt fait de montrer leurs limites. Ainsi, des effets secondaires de plus en plus dangereux s'observent après l'utilisation de ces dernières (Hopkins, 1996 ; de Larochequet, 1999). Dans les pays en développement comme le Bénin, ces produits coûtent chers et ne sont pas disponibles tant en quantité qu'en qualité (OMS, 1990). Aussi, la prévalence de la résistance des nématodes aux anthelminthiques est particulièrement élevée et la demande de réduction d'emploi de produits chimiques en élevage dans le contexte de l'agriculture durable est de plus en plus forte (Hammond *et al.*,

1997 ; Waller, 2004). Ces éléments ont conduit à envisager de nouvelles méthodes de lutte antiparasitaire.

Il existe une gamme variée de plantes utilisées comme anthelminthiques dans la pharmacopée vétérinaire (Enwerem *et al.*, 2001 ; Alawa *et al.*, 2003). Au Bénin, au nombre des plantes d'usage courant se trouve *Newbouldia laevis* dont les multiples vertus prônées (Adjanohoun *et al.*, 1989) méritent d'être prouvées.

Sur le plan mondial, beaucoup de travaux ont été effectués sur les propriétés biologiques des différents types d'extraits de plantes, dans le but de mieux comprendre leurs vertus thérapeutiques et d'évaluer leur toxicité (Adjagba, 2004). Les tests menés par Hounzangbé-Adoté (2004) ont mis en évidence *in vitro* l'effet anthelminthique de certaines plantes locales comme *Newbouldia laevis*, *Carica papaya*, *Zanthoxylum zanthoxyloïdes*, et *Morinda lucida* sur les nématodes gastro-intestinaux.

Ces traitements sont peu valorisés car les tests pouvant confirmer leur efficacité restent peu nombreux. Les tests *in vivo* présentent l'avantage de permettre après infestation expérimentale, la maîtrise de la population de parasites ciblée. Il s'avère donc nécessaire de poursuivre ces travaux afin d'évaluer l'effet des autres plantes en particulier *N. laevis* qui s'est révélée très efficace *in vitro* (Hounzangbé-Adoté, 2004). *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seeman ex Bureau est une Bignoniaceae largement répartie aux Amériques, en Afrique centrale et Afrique de l'Ouest. Cette plante a été couramment utilisée en médecine traditionnelle contre les affections humaines et animales, des parasites externes et digestifs (Tra-Bi, 1997 ; Tor-Anyiin *et al.*, 2003). Le but de cette étude est d'évaluer *in vivo* l'efficacité des extraits de feuilles de *Newbouldia laevis* sur les strongles gastro-intestinaux des ovins, parasites les plus dominants au Bénin.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Le matériel végétal, composé des feuilles de *N. laevis* a été identifié et un échantillon de référence se trouve à l'Herbier National de l'Université d'Abomey-Calavi au Bénin, sous le numéro AA 6302 / HNB. Les feuilles récoltées au Sud du Bénin, séchées en salle climatisée (25 °C), sont ensuite réduites en poudre. Une quantité de 50 g de cette poudre mélangée à 500 mL d'éthanol 30 % est mise sous agitation continue pendant 72 heures. Le mélange a été filtré et le filtrat est passé à l'évaporateur rotatif. Ainsi, il a été obtenu un concentré d'environ 100 mL, qui est mis au four Poupinel à 50 °C pour séchage. L'extrait sec obtenu a une masse de 6,25 g. Le rendement de l'opération était de 12,5 %.

Matériel animal

Des agneaux Djallonké de poids vif corporel moyen $10,44 \pm 1,69$ Kg ont été identifiés à l'aide de plaques de bois numérotées et logés dans une bergerie, en matériaux locaux, bien aérée. Ces agneaux ont disposé de fourrages secs de *Panicum maximum* C₁ et ont reçu un complément alimentaire (200 g/animal/jour) composé de tourteaux de palmiste (40 %), d'épluchures de manioc (40 %), de son de blé (10 %), de la poudre de coquille d'huître (10 %) et des pierres à lécher à volonté. Les animaux ont été vaccinés avant le début des expériences contre la Peste des Petits Ruminants. Ils ont été déparasités dans un bain détiqueur à base d'Amitraz (Tactic®) pour éliminer les parasites externes. De même, les agneaux utilisés pour l'infestation artificielle ont été traités contre les endoparasites avec l'albendazole 7,5 mg/Kg de poids vif, quinze jours avant l'infestation.

Méthodologie

L'approche méthodologique utilisée a comporté des mesures indirectes basées sur l'excrétion fécale des œufs et des mesures directes fondées sur les bilans parasitaires et l'hématocrite. Pour ce qui est de l'analyse coprologique, le nombre d'œufs de parasites par

Effet de Newbouldia laevis sur les parasites

gramme de fécès (OPG) est déterminé suivant la technique de Mc Master (Hansen et Perry, 1995). Après abattage les contenus abomasal et intestinal sont retenus pour le dénombrement des vers adultes. La fertilité individuelle des vers femelles est déterminée par la technique décrite par Kloosterman *et al.*, (1978).

Infestation expérimentale : Pour évaluer l'effet dose de l'extrait de feuilles de *N. laevis* sur l'implantation des larves infestantes L₃, douze agneaux Djallonké de poids moyen de 10,5 Kg ± 1,73, âgés de 4 à 6 mois ont été infestés artificiellement avec un mélange de 3 000 larves de *H. contortus* et de *T. colubriformis* et ont été répartis en 3 lots de 4 têtes chacun comme suit :

Lot₁ : lot témoin (sans traitement) ;

Lot₂ : lot traité à l'extrait de poudre de feuilles de *N. laevis* à la dose de 0,8 g/Kg ;

Lot₃ : lot traité à l'extrait de poudre de feuilles de *N. laevis* à la dose de 1,6 g/Kg.

Le traitement à l'extrait de poudre de feuilles de *N. laevis* a été fait pendant 3 jours consécutifs : la veille de l'infestation (J₋₁), le jour de l'infestation (J₀) et le premier jour après l'infestation (J₊₁). Les animaux ont été sacrifiés 15 jours après le dernier traitement à l'extrait afin d'effectuer le bilan parasitaire consistant à l'identification et au dénombrement des parasites intestinaux.

Infestation naturelle : Pour évaluer l'effet dose de l'extrait de feuilles de *N. laevis* sur l'excrétion fécale, la viabilité des vers adultes et la prolificité des vers femelles, vingt et un agneaux Djallonké de poids moyen de 9,71 Kg ± 0,70, âgés de 4 à 6 mois, infestés naturellement, sélectionnés après une coprologie initiale au jour J₀, ont été répartis en 3 lots constitués de 7 têtes chacun :

Lot₁ : lot témoin (sans traitement) ;

Lot ₂ : lot traité à l'extrait de poudre de feuilles de *N. laevis* à raison de 0,8 g/ Kg ;

Lot ₃ : lot traité à l'extrait de poudre de feuilles de *N. laevis* à raison de 1,6 g/Kg.

Les animaux des lots 2 et 3 ont été traités pendant 3 jours consécutifs : J₉, J₁₀, et J₁₁ après la mise en claustration (J₀). Les examens coprologiques bihebdomadaires des fèces directement prélevés du rectum des animaux, ont permis d'évaluer l'impact de la plante sur l'excrétion des œufs. Au bout de 2 semaines (J₂₃) après le traitement, les animaux ont été abattus et les vers adultes de *H. contortus* ont été dénombrés dans la caillette et ceux de *T. colubriformis* dans l'intestin grêle. Les vers femelles sont introduits individuellement dans 200 µl de solution d'hypochlorite 0,4 % et laissés pendant 2 à 5 min pour l'éclatement. Le comptage des œufs libérés est effectué dans 30 % du volume total. Le nombre N obtenu est rapporté à la totalité selon la formule :

$N = (N_1 + N_2) \times 100 / 30$, où N₁ et N₂ représentent les nombres d'œufs comptés dans 2 aliquotes.

Evaluation de l'effet dose de l'extrait de feuilles de *N. laevis* sur l'hématocrite : Le degré d'anémie des ovins a été évalué au moyen de prélèvements hebdomadaires de sang au niveau de l'oreille dans des microtubes capillaires, centrifugés à 12000 tours/min pendant 5 min. La valeur de l'hématocrite est mesurée à l'aide d'un lecteur d'hématocrite du type Sigma®.

Analyses statistiques

La comparaison des traitements s'est faite au moyen de test de comparaison de moyenne (test T de Student) sur le logiciel Statistica® et les différences sont considérées significatives au seuil de 5 %. Pour minimiser les variations, les OPG ont subi une transformation $\log(x + 1)$ avant les analyses statistiques. L'effet dose

a été mis en évidence à l'aide du modèle linéaire général (GLM) sur Systat 9 (SPSS Ltd).

RÉSULTATS

Effet de l'extrait de feuilles de N. laevis sur l'installation des larves

Lors d'infestation expérimentale par des larves L₃ de *T. colubriformis* et d'*H. contortus*, le nombre de vers de *T. colubriformis* dénombrés chez les animaux témoins (555 vers) est plus élevé ($p < 0,05$) que ceux des animaux traités (160 à 183 vers). Toutefois, il y a une grande variabilité entre ces valeurs (Tableau 1). Par contre, les vers d'*H. contortus* sont plus abondants (mais pas significatif, $p > 0,05$) dans la caillette des animaux traités (640 à 710 vers) indépendamment de la dose de l'extrait de feuilles de *N. laevis* que dans celle des animaux non traités (390 vers). L'extrait de *N. laevis* a donc mieux limité l'installation des larves de *T. colubriformis* que de celles d'*H. contortus*.

Tableau 1. Variation de la population des vers adultes après infestation artificielle

Type de traitement	Nombre de vers	
	<i>T. colubriformis</i>	<i>H. contortus</i>
Témoins	555 ± 275,77 a	390 ± 212,13 c
<i>N. laevis</i> 0,8 g/Kg	182,5 ± 47,87 b	640 ± 318,22 c
<i>N. laevis</i> 1,6 g/Kg	160 ± 27,08 b	710 ± 151,66 c

Les valeurs moyennes sur une même colonne pour chacune des 2 espèces de vers parasites surmontées de lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$.

Effet de l'extrait de feuilles de N. laevis sur l'excrétion des œufs

Lors de l'infestation naturelle, l'excrétion des œufs par les vers adultes a varié de 900 à 1.500 OPG (Figure 1). Après les trois (3) jours de traitement (J₉, J₁₀ et J₁₁) le niveau d'excrétion des œufs de strongles a progressivement diminué ($p < 0,05$) dans les lots traités. Cette réduction est sensible à partir de J₁₅. Le maximum de réduction a été observé au J₂₃ en fonction de la dose (Figure 1). Ces résultats montrent que *N. laevis* a réduit l'excrétion des œufs chez les animaux traités quelle que soit la dose administrée.

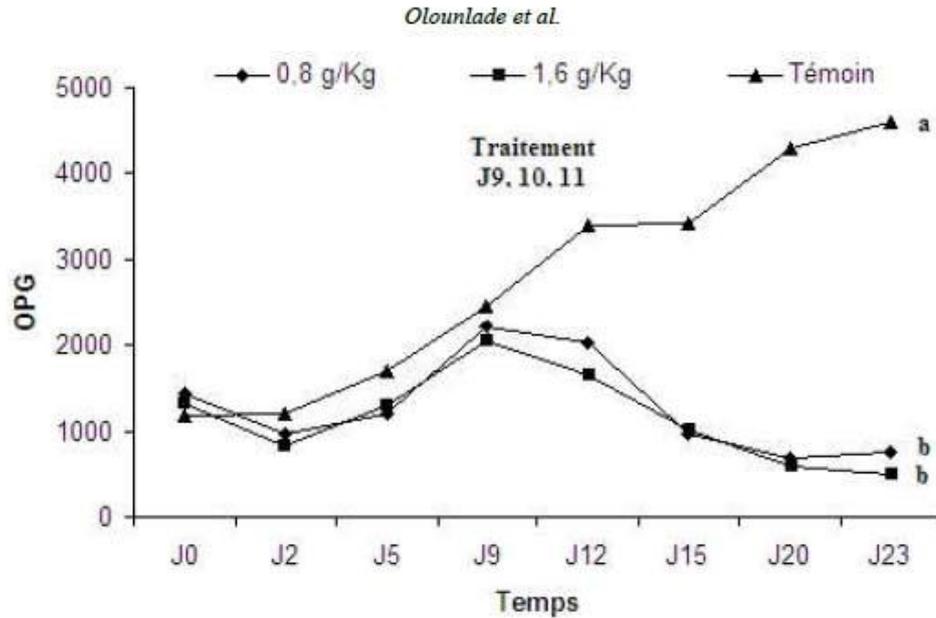


Figure 1. Effet *in vivo* de l'extrait de feuilles de *N. laevis* sur l'excrétion des œufs de strongles

Effet de l'extrait de feuilles de N. laevis sur la viabilité et la fertilité des vers adultes

D'après le bilan parasitaire réalisé après abattage des animaux naturellement infestés, la charge parasitaire de *H. contortus* a diminué significativement ($p < 0,05$) chez les agneaux traités à l'extrait de feuilles de *N. laevis* quelle que soit la dose. Par contre, pour *T. colubriformis*, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée dans les lots d'ovins témoins et traités à l'extrait de feuilles de *N. laevis* en termes de charge parasitaire.

Effet de Newbouldia laevis sur les parasites

Tableau 2. Dénombrement des vers adultes et prolificité des vers femelles de strongles

Type de traitement	Nombre de vers		Prolificité*	
	<i>T. colubriformis</i>	<i>H. contortus</i>	<i>T. colubriformis</i>	<i>H. contortus</i>
Témoins	520,00 ± 142,24 a	1.951,43 ± 3.211,13 b	105,2 ± 8,7 d	747,3 ± 81,6 f
<i>N. laevis</i> 0,8 g/Kg	454,29 ± 421,66 a	364,29 ± 418,76 c	93,6 ± 14,6 e	771,7 ± 85,8 f
<i>N. laevis</i> 1,6 g/Kg	481,43 ± 184,25 a	220,00 ± 183,03 c	-	-

Les valeurs moyennes sur une même colonne pour chacune des 2 espèces de vers parasites suivies de lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$.

*Nombre d'œufs à l'intérieur des vers femelles de strongles

Les vers femelles traités de *H. contortus* ont présenté la même prolificité que les témoins. *N. laevis* n'a donc pas d'effet sur la fertilité des vers femelles de *H. contortus*. Chez les vers femelles de *T. colubriformis* le nombre d'œufs isolés de l'utérus a été réduit de 11 % (Tableau 2).

Evaluation de l'effet de l'extrait de feuilles de N. laevis sur le degré d'anémie

Le volume de globules rouges a varié au cours de l'expérience (Figure 2). Avant le jour du traitement (J₉), le niveau d'hématocrite est semblable dans les trois (3) lots d'animaux (23,5 % environ). Après le traitement ce volume a connu une augmentation (29 %) dans les lots d'agneaux traités contre une diminution (18 %) dans le lot d'agneaux témoins. Une différence significative entre le niveau d'hématocrite des trois (3) lots a été obtenue au jour J₂₃ ($p < 0,05$). Le lot témoin a connu une diminution de 5,5 % de son taux d'hématocrite au jour 23 (J₂₃) alors que le lot traité a connu une augmentation de 5,5 %.

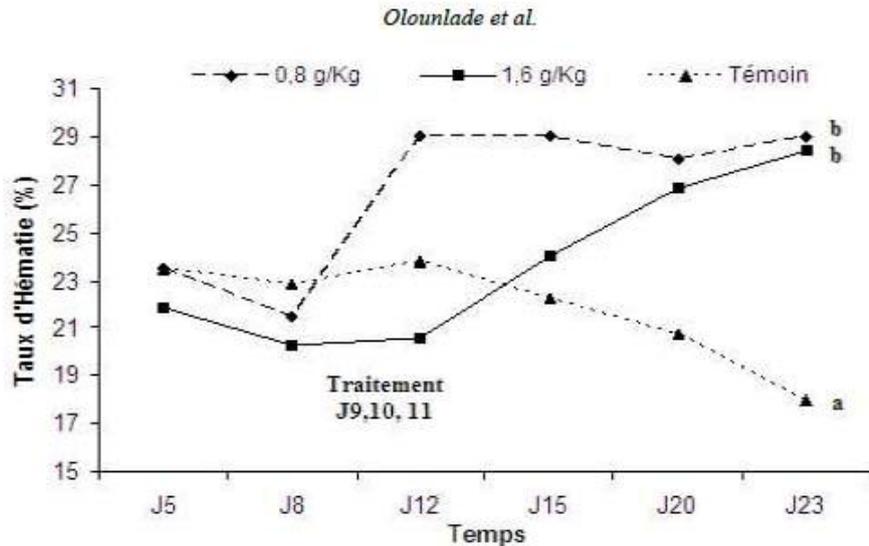


Figure 2. Variation du pourcentage de globules rouges des agneaux en fonction du temps

DISCUSSION

Du point de vue de l'installation des larves, nos résultats confirment ceux de Hounzangbé-Adoté (2004). Cet auteur a indiqué que le taux d'installation des larves de *T. colubriformis* et de *H. contortus* après une infestation artificielle est moyen (environ 25 %). Ce taux est plus élevé pour *H. contortus* que pour *T. colubriformis* (Hounzangbé-Adoté, 2004). L'abattage a révélé que l'extrait de la poudre de la plante de *N. laevis* a limité *in vivo* l'installation des larves de *T. colubriformis* ($p < 0,001$) mais pas celle des larves de *H. contortus*. Cette action serait due à la capacité de la plante à immobiliser ces larves. La différence d'efficacité de l'extrait de feuilles de *N. laevis* sur ces mêmes parasites pourrait aussi s'expliquer par leur implantation différentielle dans le tractus gastro-intestinal, les vers adultes de *Haemonchus* s'installant préférentiellement dans la caillette et ceux de *Trichostrongylus* dans l'intestin grêle, donc probablement plus accessibles aux principes actifs de la plante que les précédents (Azando *et al.*, 2011a). Il a été montré *in vitro* que *N. laevis* inhibe dans l'ordre de 80 % la migration larvaire de *T.*

colubriformis (Hounzangbé-Adoté *et al.*, 2005b) et de 50 % celle de *H. contortus* (Hounzangbé-Adoté *et al.*, 2005a). En effet avant la migration, les larves doivent se débarrasser de leur gaine protectrice avant de s'incruster dans les interstices de l'intestin grêle. Ce phénomène connu sous le nom de dégainement est bloqué par les plantes riches en tannins et contrarie l'installation larvaire (Paolini *et al.*, 2003 ; Brunet *et al.*, 2008). Certains travaux ont rapporté que les extraits acétoniques de la poudre de feuilles de *N. laevis* ont empêché *in vitro*, le dégainement des larves (L₃) de ces nématodes parasites gastro-intestinaux (Hounzangbé-Adoté *et al.*, 2007 ; Azando *et al.*, 2011c) ce qui perturbe leur installation. La présence des tanins dans *N. laevis* pourrait justifier les propriétés anthelminthiques observées. Toutefois, les molécules responsables de son effet anthelminthique sont encore mal connues et restent à identifier.

Du point de vue de l'infestation naturelle, l'extrait de poudre de feuilles de *N. laevis* a limité significativement ($p < 0,05$) l'excrétion des œufs de strongles gastro-intestinaux *in vivo* chez les agneaux Djallonké quelle que soit la dose. La diminution de l'excrétion des œufs peut être due soit à la mortalité des vers adultes, soit à une baisse de prolificité des vers femelles. Les résultats obtenus montrent plutôt une action de la plante sur la viabilité des vers adultes de *H. contortus* que sur leur prolificité. *N. laevis* a eu un effet contraire à *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* qui agit plutôt sur la prolificité des vers adultes de *H. contortus* que sur leur viabilité, sous forme de feuilles fraîches (Hounzangbé-Adoté *et al.*, 2005) et de poudre de feuilles (Azando *et al.*, 2006 ; Azando *et al.*, 2011a) et sous forme d'huile essentielle (Azando *et al.*, 2011b). Sur *T. colubriformis*, *N. laevis* n'exerce pas d'effet significatif sur la population des vers adultes, ni sur leur fertilité.

La feuille de *N. laevis* doit probablement cette propriété anthelminthique à sa composition chimique. En effet il est ressorti des résultats de l'analyse phytochimique que *N. laevis* renferme les

grandes familles de composés tels que : des mucilages, des traces d'huiles essentielles, des dérivés phénoliques (flavonoïdes, tanins, acides phénols), des alcaloïdes, des anthocyanes, des glucides, des dérivés quinoniques (naphtaquinones), des saponosides, des stéroïdes et triterpénoïdes (Olounladé, 2005 ; Tanko *et al.*, 2008). Des travaux antérieurs ont montré la richesse de *N. laevis* en quinones et en alcaloïdes : Newbouldiaquinone (Eyong *et al.*, 2006) ou céramide (Eyong *et al.*, 2005).

Les valeurs de l'hématocrite enregistrées chez les lots traités à l'extrait de feuilles de *N. laevis* sont normales et stables. Cette stabilité observée malgré leur degré de parasitisme laisserait envisager que l'extrait de feuilles de *N. laevis* pourrait avoir un effet sur la résilience (Olounladé *et al.*, 2007) et une activité anthelminthique sélective sur *H. contortus* parasite hématophage très fréquent dans la zone de l'étude (Salifou, 1996). Nos résultats sont également semblables à ceux obtenus par Azando *et al.* (2011a & 2011b) en utilisant une plante tropicale (*Fagara zanthoxyloïdes*) pour traiter les parasites gastro-intestinaux des petits ruminants. En effet, Graber *et al.* (1983) ont remarqué que la présence dans la caillette des *H. contortus* provoque une anémie. Une étude a rapporté que l'analyse de l'hématocrite révèle que les animaux traités à la poudre de feuilles de *N. laevis* à raison de 1,6 g/Kg de poids vif sont moins anémiés que les témoins (Olounladé, 2005) comme le confirment nos résultats.

La présence de certains nématodes hématophages tels que les *H. contortus* pourrait être à l'origine de la diminution du taux de globules rouges observée chez les agneaux témoins.

CONCLUSION

In vivo l'extrait de feuilles de *N. laevis* réduit considérablement l'excrétion des œufs de strongles chez les agneaux Djallonké infestés naturellement dans le milieu contrôlé. *N. laevis* est efficace sur les

vers adultes de *H. contortus* et les larves de *T. colubriformis* mais pas sur les vers adultes de *T. colubriformis* et les larves de *H. contortus*. Compte tenu de l'efficacité de cette plante, elle peut être recommandée pour le traitement de la parasitose gastro-intestinale chez les petits ruminants à la dose de 0,8 g/Kg de poids vif. Il serait donc intéressant de tester à l'avenir des doses plus faibles de même que des extraits avec d'autres solvants et de déterminer le mécanisme d'action de ces extraits actifs. Des études phytochimiques nous permettront également d'isoler des molécules potentiellement anthelminthiques des feuilles de *N. laevis*.

REMERCIEMENT

Les auteurs remercient le gouvernement français à travers les responsables du projet CORUS₂ 6040 (Coopération pour la Recherche Universitaire et Scientifique), de l'AUF (Agence Universitaire de la Francophonie) et du projet ARHES (Appui à la Restructuration et à l'Harmonisation de l'Enseignement Supérieur), de l'INRAB (Institut National des Recherches Agricoles du Bénin) pour leur appui financier.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADJAGBA M., 2004. Contribution à l'étude des propriétés antimicrobiennes d'extraits de *Lantana camara* Linn, *Hyptis suaveolens* Poit et *Ocimum gratissimum* Linn sur cinq germes à tropisme cutané. Mémoire de DEA, Université de Lomé, Togo, 75 p.
- ADJANOHOUN E.J., ADJAKIDJE V., AHYIM R.A. & AKE A. L., 1989. Médecine traditionnelle et pharmacopée: contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin. ACCT : Paris.
- ALAWA C.B.I., ADAMU A.M., GEFU J.O., AJANUSI O.J., ABDU P.A., CHIEZEY N.P., ALAWA J.N. & BOWMAN D.D., 2003. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegaliensis*) for anthelmintic activity, *Veterinary Parasitology*, 113: 73 – 81.
- AZANDO E.V.B., HOUNZANGBE-ADOTE M.S., OLOUNLADE P. A., BRUNET S., FABRE N., VALENTIN A. & HOSTE H., 2011a. Effets anthelminthiques *in vivo* de la poudre de feuilles de *Zanthoxylum zanthoxyloides* et de *Newbouldia laevis* sur les nématodes parasites gastro-intestinaux des chevreaux Djallonké. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5 : 1054-1062
- AZANDO E.V.B., OLOUNLADE P.A., HOUNZANGBE-ADOTE M.S., TAM HA T.B., FABRE N. & VALENTIN A., 2011b. Contrôle des parasitoses gastro-intestinales ovines par l'huile essentielle de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (*Fagara zanthoxyloides*). *Rev. Med. Vet.* (Sous presse, Vd F.11.0202.1)
- AZANDO E.V.B., HOUNZANGBE-ADOTE M.S., OLOUNLADE P. A., BRUNET S., FABRE N., VALENTIN A. & HOSTE H., 2011c. Involvement of tannins and flavonoids in the *in vitro* effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 180 : 292-297
- AZANDO E.V.B., OLOUNLADE P.A., HOUNZANGBE-ADOTE M.S. & HOSTE H., 2006. Traitement des parasitoses gastro-intestinales des petits ruminants par le *Zanthoxylum Zanthoxyloides* sous forme de poudre de feuilles et d'huiles essentielles. III^{ème} Atelier scientifique de l'INRAB, Abomey-Calavi, Bénin.
- BRUNET S., MARTINEZ-ORTIZ DE MONTELLANO C., TORRES-ACOSTA J.F.J., SANDOVAL-CASTRO C.A., AGUILAR-CABALLERO A.J., CAPETILLO-LEAL C. & HOSTE H., 2008. Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*, 157: 81-88.
- ENWEREM N.M., OKOGUN J.I., WAMBEBE C.O., OKORIE D.A. & AKAH P.A., 2001. Anthelmintic activity of the stem bark extracts of *Berlina grandiflora* and one of its active principles, Betulinic acid. *Phytomed.* 8: 112 -114.
- EYONG K. O., FOLEFOC G.N., KUETE V., BENG P.V., KROHN K., HUSSAIN H., NKENGFAK E. A., SAEFTEL M., SARITE S.R. & HOERAUF A., 2006. Newbouldiaquinone A: a naphthoquinone-anthraquinone ether coupled pigment, as a potential antimicrobial and antimalarial agents for *Newbouldia laevis*. *Phytochemistry*, 67(6) : 605-609.
- EYONG K.O., KROHN K., HUSSAIN H., FOLEFOC G.N., NKENGFAK A.E., SCHULZ B. & HU Q., 2005. Newbouldiaquinone and newbouldiamide: a new naphthoquinone-anthraquinone coupled pigments and a new ceramide from *Newbouldia laevis*. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 53 (6): 616-619.
- GRABER M. & PERROTIN C., 1983. Helminthoses et Helminthes des ruminants domestiques d'Afrique Tropicale. Maison Alfort, France. *Le point Vétérinaire*, 378 p.

Effet de Newbouldia laevis sur les parasites

HAMMOND J.A., FIELDING D. & BISHOP S.C., 1997. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Veterinary Research Communication*, 21: 213-228 .

HANSEN J. & PERRY B., 1995. *Epidémiologie, Diagnostic et Prophylaxie des helminthoses des Ruminants Domestiques*, 7^{ème} Edition.

HOPKINS C., 1996. *Découvrir l'aromathérapie*. Editions Marabout, Paris, 157 p.

HOUNZANGBE-ADOTE M.S., BRUNET S. & HOSTE H., 2007. Effet *in vitro* d' extraits de *Newbouldia laevis* et de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes*, deux plantes tropicales sur le dégainement des larves infestantes des principaux nématodes parasites des petits ruminants. Communication au " Premier colloque de l'Université d'Abomey-Calavi des Sciences, Cultures et Technologies". Résumé et Abstract, 91, 364 p.

HOUNZANGBE-ADOTE M.S., PAOLINI V., FOURASTE I., MOUTAIROU K. & HOSTE H. , 2005a. *In vitro* effects of four tropical plants on three stages of the parasitic nematodes, *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science* , 78 : 155 – 160.

HOUNZANGBE-ADOTE M. S., MOUTAIROU K. & HOSTE H., 2005b. *In vitro* effects of four tropical plants on three stages of the parasitic nematodes, *Trichostrongylus colubriformis*. *Journal of Helminthology*, 79 : 29-33.

HOUNZANGBE-ADOTE M. S., ZINSOU F. E., HOUNKPE V., MOUTAIROU K. & HOSTE H., 2005c. *In vivo* effects of *Fagara* leaves on sheep infected with gastrointestinal nematodes. *Tropical Animal Health and Production*, 37: 205 - 214.

HOUNZANGBE-ADOTE M.S., 2004. Propriétés anthelminthiques de 4 plantes tropicales testées *in vitro* et *in vivo* sur les nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants Djallonké. Thèse de doctorat, Université d'Abomey-Calavi, Bénin, 205 p.

KLOOSTERMAN A., ALBERS G.A.A. & VAN DEN BRINK R., 1978. Genetic variations among calves in resistance to nematode parasites. *Vet. Parasitol.*, 4: 353-368.

LAROCHEPIQUET (de) E., 1999. *La nature au service de la vie*. Editions Akademas, Paris, 54 p.

OLOUNLADE A.P., AZANDO E.V.B. , ATTAKPA E.Y., HOUNZANGBE-ADOTE M.S. & HOSTE H. , 2007. Effets Anthelminthiques des feuilles de *Newbouldia laevis* sur des strongles gastro-intestinaux de petits ruminants. Communication au Premier colloque de l'Université d'Abomey-Calavi des Sciences, Cultures et Technologies. Résumé et abstract, 62, 364 p.

OLOUNLADE A.P., 2005. Effets anthelminthiques des feuilles de *Newbouldia laevis* testées *in vivo* sur les nématodes gastro-intestinaux (*Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis*) chez les moutons Djallonké, Mémoire DEA , Université de Lomé, Togo, 65 p.

O.M.S., 1990. *La situation pharmaceutique dans le monde*. Genève, 20 p.

PAOLINI V., BERGEAUD J.P., DURANTON-GRISEZ C., PREVOT F., DORCHIES P. & HOSTE H., 2003. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 113, 253–261.

SALIFOU S., 1996. Nématodes et nématodoses du tube digestif des petits ruminants du Sud Bénin : Taxonomie, Epidémiologie et les facteurs de variation. Thèse de doctorat de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal., 162 p.

Olounlade et al.

TANKO Y., KAMBA B., SALEH M. I. A, MUSA K. Y. & MOHAMMED A., 2008. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic flower extract of *Newbouldia laevis* in mice and rats. *Int. J. Applied Res. Nat. Prod.* 1: 13-19.

TOR-ANYIIN T. A., SHAATO R., OLUMA H.O.A., 2003. Ethnobotanical survey of Antimalarial medicinal plants amongst the Tiv People of Nigeria. *J Herbs Spices Med Plants*, 10 : 61-74.

TRA-BI F. H., 1997. Utilisation des plantes par l'homme, dans les forêts classées du Haut-Sassandra et de Scio, en Côte-d'Ivoire. Thèse de 3ème Cycle, Université de Cocody, Abidjan, 215 p.

WALLER P. J., 2004. Management and control of nematode parasites of small ruminants in the face of total anthelmintic failure. *Tropical Biomedicine*, 21 : 7-13.

PROOF

CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE

5. Discussion générale

Notre travail de thèse avait pour objectif général de contribuer à l'amélioration de la santé animale, humaine et à la détermination par bioguidage des molécules anthelminthiques dans les feuilles ou dans les graines d'une Rutaceae, *Z. zanthoxyloïdes* et d'une Bignoniaceae, *N. laevis*.

5.1. Caractérisation botanique des *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes*

Dans le but de poursuivre l'étude biochimique des plantes de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes*, nous avons procédé d'abord au contrôle de la qualité de la matière première (article 1). Le contrôle de la matière première permet de s'assurer de l'identité de la plante. Ce contrôle, en phytothérapie permet d'éviter la confusion de la plante avec d'autres qui pourraient être inactives ou toxiques et aussi d'affirmer la qualité de la matière première. Dans ce cadre, les résultats obtenus, montrent un anneau complet des faisceaux vasculaires dans les feuilles de *N. laevis* ce qui pourrait être une caractéristique de la famille des Bignoniaceae, puisque en général la section transversale de la feuille montre une nervure en forme d'un arc continu (Ayodele & Olowokudejo, 1997). Les feuilles de *N. laevis* présentent des faisceaux surnuméraires non inversés à l'intérieur de l'anneau vasculaire, ce caractère est en général rare dans les plantes (article 1). La présence d'un hypoderme dans la face supérieure du limbe est assez fréquente dans les plantes tropicales. Les cristaux d'oxalate de calcium en fines aiguilles observés dans l'ensemble du parenchyme des feuilles de *Newbouldia laevis*, sont rarement trouvés dans les plantes. Ces caractères peuvent être un critère d'identification des feuilles de *N. laevis* dans la famille des Bignoniaceae. Des poils spécifiques, soit tecteurs unicellulaires droits à paroi échinulée, situés sur la nervure, soit sécréteurs glandulaires à pied unicellulaire et tête pluricellulaire peltée sont aussi observés. L'épiderme inférieur montre des cellules à paroi sinueuse. Toutes ces caractéristiques constituent de bons critères pour l'identification de *N. laevis* dans la famille des Bignoniaceae (article 1).

La foliole de *Z. zanthoxyloïdes* présente des caractères communs à la famille des Rutaceae, à savoir la présence d'un anneau libéro-ligneux au niveau de la nervure centrale (genres *Citrus*, *Jaborandi*, *Barosma*) (Jackson, 1990), la présence d'un appareil sécréteur interne composé par des poches schizolysigènes, et la présence de cristaux d'oxalate de calcium d'une par. On retrouve aussi des caractères distinctifs tels que l'absence d'un appareil sécréteur externe, pourtant fréquent dans de nombreuses espèces de la même famille, la présence de mucilage

situé dans les cellules hypertrophiées au niveau de l'épiderme supérieur du limbe, une organisation semblable est retrouvée dans le genre *Barosma*, des composés flavonoïdiques qui cristallisent en masses ou fines aiguilles en forme d'éventail (article 1). Ce phénomène a déjà été décrit pour plusieurs espèces. C'est le cas pour les folioles de *Citrus* (Perrot, 1942, 1944) ou dans des espèces n'appartenant pas à la famille des Rutacées, mais connues pour leur haute teneur en flavonoïdes comme la fleur de *Sophora japonica* (Pharmacopée Européenne, 2011). Toutes ces caractéristiques seraient un bon critère pour dresser une véritable "carte d'identité" de *Z. zanthoxyloides*.

5.2. Variabilité liée à des facteurs environnementaux sur la composition chimique de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloides*

L'analyse phytochimique de *N. laevis* et *Z. zanthoxyloides* réalisée dans différentes zones agro écologiques (article 2) a permis de constater la présence constante de grands groupes chimiques quelles que soit la saison et la zone de récolte. Les saponines et les composés cyanogéniques ne semblent pas présents dans les deux espèces de plantes étudiées.

De nombreux travaux de recherche ont révélé la présence de ces groupes chimiques chez les végétaux. Plusieurs alcaloïdes (Couillerot *et al.*, 1994 ; Tringali *et al.*, 2001 ; Diéguez-Hurtado *et al.*, 2003 ; Adesina, 2005), flavonoïdes, terpénoïdes et coumarines (Mara *et al.*, 1992) ont été isolés à partir des différents organes d'espèces du genre *Zanthoxylum*. Selon Kerharo et Adam (1974), les échantillons de *Fagara zanthoxyloides* recueillis en Afrique de l'Ouest (Sénégal, Togo, Côte-d'Ivoire et le Nigeria) ont révélé la présence d'alcaloïdes tertiaires et quaternaires et un glycoside de flavone dans les feuilles. Des traces de tanins dans les organes de *Z. zanthoxyloides* ont été rapportées par Paris et Moyse Mignon (1947). D'autres études ont montré la richesse de *N. laevis* récolté au Cameroun en quinones et en céramide (Eyong *et al.*, 2005, 2006). Des extraits de *N. laevis* cultivé au Nigeria près de l'Etat d'Anambra sont riches en alcaloïdes (Gafner *et al.*, 1996, 1997). Ces résultats confirment la présence de ces différents composés chimiques dans les extraits totaux étudiés.

Baba-Moussa *et al.* (1999) ont montré par une analyse phytochimique de sept Combretaceae utilisées en médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest la présence majeur des tanins et des saponines. Le travail de Ngonon Ngane (1999) a prouvé par une étude phytochimique de cinq plantes médicinales et condimentaires du Cameroun la présence de nombreux composés chimiques tels que : des alcaloïdes, des anthraquinones, des coumarines, des flavonoïdes, des phénols, des polyoses, des saponines, des sucres réducteurs, des tanins et des triterpènes. En

Tanzanie, l'analyse phytochimique de 50 extraits de 45 plantes appartenant à 24 familles collectées dans cinq régions du pays a permis de montrer que 34% contiennent des alcaloïdes, 56% des flavonoïdes, 46% des saponines et 78% des tanins (Chhabra et Uiso, 1990). La quantité et la nature des tanins ainsi que d'autres métabolites secondaires, dépendent non seulement de l'espèce végétale, de la variété récoltée, du stade de développement mais aussi des conditions environnementales (sol, saison, climat, mode de culture) et du mode de conservation (Marais *et al.*, 2000; Mueller-Harvey, 2006; Heckendorn *et al.*, 2006; Haring, 2007). En général, les concentrations les plus élevées sont mesurées dans les fruits, les fleurs et les feuilles, et dans les tiges. Par exemple, des mesures ont montré que les feuilles, les fleurs et les tiges de sainfoin contiennent respectivement 0,31%, 0,30% et 0,07% de tanins (Borreani *et al.*, 2003). Les huiles essentielles ont été extraites des plantes médicinales (Pathak, 2000). La présence d'huiles essentielles avait été signalée dans les feuilles et des fruits de *Z. zanthoxyloïdes* par Ngassoum *et al.* (2003) et Setzer *et al.* (2005). Certains travaux ont rapporté la présence des constituants volatiles dans la famille des Bignoniaceae par exemple : *Tabebuia impetiginosa* (Park *et al.*, 2003), *Mansoa* spp (Zoghbi *et al.*, 2009).

En conclusion les espèces *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes* rencontrées au Bénin renferment les quatre grands groupes chimiques (alcaloïdes, tanins, flavonoïde et huiles essentielles) dans des proportions variées selon les organes et les facteurs environnementaux (article 2). Elles constituent donc un réservoir de composés actifs potentiels dans la recherche de substances naturelles ayant des propriétés biologiques. L'étude phytochimique des feuilles de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes* nous a permis de concentrer, de doser, d'isoler et d'identifier 4 grandes familles de molécules dont les tanins, les huiles essentielles, les alcaloïdes et les flavonoïdes.

5.3. Caractérisation de la fraction volatile des deux plantes tropicales étudiées

La plupart des Rutaceae possèdent des poches sécrétrices d'un type particulier appelées poches schizolysigènes dans lesquelles sont élaborées les huiles essentielles. Ces composantes sont assez abondantes dans les fruits, mais aussi dans d'autres organes de la plante tels que: feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes et graines. Avec le développement des techniques analytiques comme la GC/MS, plusieurs espèces du genre *Zanthoxylum* ont été étudiées pour déterminer la composition de leur huile essentielle. Ces huiles essentielles sont souvent de composition complexe et peuvent contenir des monoterpènes, des hydrocarbures monocycliques, bicycliques, des alcools acycliques et monocycliques et leurs esters ainsi que des sesquiterpènes bicycliques. En effet, l'hydrodistillation fournit 0,65% d'huile essentielle à

partir de graines de *Z. zanthoxyloïdes* (article 3). Les composés chimiques de l'huile essentielle de graines de *Z. zanthoxyloïdes* sont caractérisées (article 3). Les travaux de Ngassoum *et al.* [2003], ont permis de mettre en évidence dans les fruits secs de *Z. zanthoxyloïdes* d'origine Camerounaise, de nombreux composés volatils tels que : l'*α*-pinène, un composé majoritaire de cette huile essentielle, le *trans-α*-ocimène, le citronellol, l'acétate de citronellyl, le *α*-terpinolène, le *α*-phellandrène, le géraniol, le limonène et le *α*-myrcène. Les travaux de Setzer *et al.* [2005] ont prouvé que les principaux constituants chimiques de l'huile essentielle des feuilles de *Z. zanthoxyloïdes* récoltées à Monteverde au Costa Rica sont ce qui suit : le cis-3-hexenol (5,7%) ; le citronellal (11,5%) ; le citronellol (26,1%) ; le géraniol (15,3%) ; le géraniol (11,6%) ; l'oxyde caryophyllène (0,5%) ; le Néral (9,6%) ; l'*α*-pinène (2%). Cette différence peut être expliquée par l'existence de plusieurs chimiotypes dans la nature. Pour une même plante, la composition est différente pour chaque organe et pour la même espèce [Bruneton, 1999]. Une variation dans la composition de l'huile essentielle est aussi possible pour la même espèce selon la saison, les conditions de croissance pour la même espèce végétale (ensoleillement, humidité, longueur du jour, fertilité des sols) en tant que races chimiques (chimiotypes) pour une espèce comme le thym (*Thymus vulgaris*) avec 7 races chimiques (El Kalamouni, 2010). L'origine géographique de la plante et les facteurs environnementaux influent aussi la composition des huiles, comme c'est le cas pour certaines espèces du genre *Pilocarpus* (Taveira *et al.*, 2003). La plus part des composés majoritaires identifiés ont été observés en comparant la composition de l'huile essentielle des graines de *Z. zanthoxyloïdes* d'origine béninoise avec d'autres huiles issues d'autres Rutaceae de différentes origines comme les feuilles de *Zanthoxylum rhoifolium* et *Zanthoxylum setulosum* de Monteverde (Costa-Rica), des feuilles de *Zanthoxylum hyemale*, *Zanthoxylum rhoifolium* et *Zanthoxylum rugosum* récoltées en Amérique du Sud, les feuilles de mandarine (*Citrus reticulata* Blanco) cultivées au Burundi, des feuilles de *Zanthoxylum rhoifolium* d'origine Brésilienne, des feuilles de *Zanthoxylum ekmanii* (Urb.) Alain, originaire de la forêt amazonienne du Sud du Brésil (Facundo, *et al.*, 2003 ; Moura *et al.*, 2006 ; Njoroge *et al.*, 2006 ; Boehme *et al.*, 2008 ; Detoni, 2009).

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation des feuilles de *N. laevis* récoltées au Bénin est jaune pâle avec un rendement de 0,05%. C'est un mélange complexe de composés organiques dont décrits dans l'article 3. La plupart des molécules présentent dans cette huile essentielle l'ont aussi été dans certaines espèces de Bignoniaceae comme *Mansoa spp* et *Tabebuia impetiginosa* d'origine Brésilienne, d'Argentine et du sud-est du Mexique (Rao *et al.*, 1999 ; Park *et al.*, 2003). Les huiles essentielles sont extraites des matériaux secs, le rendement en

huile essentielle varie beaucoup avec la plante utilisée, le matériel employé pour l'extraction, la méthode d'extraction et l'origine de la plante (Mohammedi, 2006). Pour d'autres plantes par exemple *Lavandula stoechas* de la région de Oum el Alou, le rendement est de l'ordre de 2% non seulement en comparaison avec les autres plantes de genre différent mais aussi avec la même espèce d'une autre région comme celle de Ain fezza qui a présenté un taux inférieur à 1% ; ce qui confirme que la région d'origine influence beaucoup la sécrétion d'huile essentielle d'une plante aromatique. *L. stoechas* provenant de la région d'Ouchba et Zarifet ont comme teneurs en huiles essentielles 0,94% et 0,70% respectivement (Sidi Boulenouar et Ziane, 2003). En revanche, *Cistus ladaniferus* et *Smyrniolum olusatrum* ont présenté respectivement un rendement faible de 0,1% et très faible de 0,04%. Kaïd Slimane (2004) a obtenu une teneur en huile essentielle de *Cistus ladaniferus* de 0,36% pour la station de Hafir et 0,13% pour la station de Zarifet et en notant que l'huile a été extraite par entraînement à la vapeur. Dans la même espèce, le contenu biochimique de l'huile essentielle trouvé dans les fleurs, la tige ou les feuilles diffère de manière significative selon le lieu et les conditions dans lesquelles la plante a fait sa croissance. La présence et la concentration de certains constituants chimiques fluctuent également selon la saison et la maturation de la plante (Chu et Kemper, 2011). Une grande variabilité est observée en comparant la composition chimique de l'huile essentielle des graines de *Z. zanthoxyloïdes* et des feuilles de *N. laevis* provenant du Bénin avec d'autres huiles issues de différentes origines géographiques (article 3).

5.4. Critique de la méthodologie employée pour les analyses biochimiques des tanins

Les études phytochimiques antérieures réalisées sur les espèces *Z. zanthoxyloïdes* et *N. laevis* montrent une composition riche et variée, caractérisée essentiellement par les différentes classes de composés que nous avons identifiées mais les tanins ne sont pas dosés dans les deux espèces.

Dans le chapitre 4 de notre thèse, pour doser les tanins dont les résultats sont publiés dans les articles 4 et 5, nous avons choisi d'utiliser la méthode de Folin-Ciocalteu (réactif spécifique des phénols), une méthode chimique se décomposant en deux dosages colorimétriques successifs : le dosage des phénols totaux puis le dosage des phénols non-taniques d'un extrait acétonique (Bruneton, 1999; Makkar, 2000). Ce second dosage est réalisé après la déplétion des tanins de l'extrait par le polyvinyl pyrrolidone (PVPP) (Makkar, 2000; Schofield *et al.*, 2001). Le PVPP est une molécule capable de se lier aux tanins présents dans l'extrait et les

complexes ‘‘tanin/PVPP’’ sont retirés de l’extrait par centrifugation (Makkar *et al.*, 1995). Indirectement, la teneur en tanins totaux (TTs) de notre échantillon est déterminée par la différence entre les teneurs en phénols totaux et en phénols non-tanniques. De même, nous avons utilisé les méthodes biologiques telles que la méthode traditionnelle, utilisant de la poudre de peau, est appliquée dans le cas des drogues officinales (Bruneton, 1999; Ph. Eu., 2011) et la méthode de la diffusion radiale (avec de l’albumine bovine ou du rubesco inclus dans un gel d’agarose), une méthode simple permettant le dosage simultané de nombreux échantillons (Makkar, 2000; Hagerman, 2002; Mueller-Harvey, 2006). Ces différentes méthodes de dosage des TTs sont fondées sur la propriété des tanins à se fixer aux protéines. En raison de leurs structures complexes et variées, l’analyse des tannins est délicate et leur dosage est difficile. Lors d’études en parasitologie, l’analyse des échantillons est généralement réalisée par le dosage des TTs et des tanins condensés (TCs), en associant des méthodes chimiques (Butanol-HCl et Folin-Ciocalteu par exemple) et des méthodes biologiques (diffusion radiale et celle de la Pharmacopée Européenne).

Pour le dosage spécifique et l’analyse des tanins condensés (TCs) dans les plantes étudiées, la méthode colorimétrique du Butanol-HCl, développée par Porter *et al.* (1986), basée sur la réaction de dépolymérisation des TCs en milieu acide est réalisée. Cette réaction a conduit à la libération des anthocyanidines (molécules colorées) correspondant aux monomères clivés (Jean-Blain, 1998; Makkar, 2000; Schofield *et al.*, 2001). Cette méthode permet un dosage semi-quantitatif des TCs car les monomères terminaux libérés ne donnent pas les anthocyanidines correspondants et par conséquent, ils ne sont pas dosés (Schofield *et al.*, 2001). Cependant, la méthode au Butanol-HCl reste la méthode la plus utilisée (Makkar, 2000; Schofield *et al.*, 2001; Hagerman, 2002). Dans les plantes, les TCs sont présents sous différentes formes telles quelibres ou liées, c’est-à-dire ceux fixés aux protéines ou aux fibres de la plante (Schofield *et al.*, 2001). L’existence de ces deux formes (libres ou liées) a rendu le dosage des TCs plus délicat. En général, les TCs sont majoritairement présents sous forme libre (Terrill *et al.*, 1992). Les conditions de stockage, de séchage et d’extraction de nos échantillons peuvent influencer la proportion de TCs liés/libres obtenus [Schofield *et al.*, 2001]. Afin de rendre la stratégie de dosage des TCs liés facile, un traitement par des agents chimiques, tel que le sodium dodécyl sulfate de sodium, doit être réalisé ultérieurement à l’étape d’extraction, afin de rompre les liaisons protéines-TCs et fibres-TCs et de libérer ainsi les TCs liés (Makkar, 2000).

5.5. Activités anthelminthiques de *Z. zanthoxyloïdes* et de *N. laevis*

Dans les chapitres 1, 3 et 4 de notre thèse, pour évaluer l'activité anthelminthique de nos produits, nous avons choisi d'utiliser la méthode d'inhibition de la migration larvaire (LMI), la méthode d'inhibition de l'éclosion des œufs et la méthode d'inhibition du dégainement larvaire (LDI). Le principe de la méthode d'inhibition de la migration larvaire est fondé sur la capacité des différents composés actifs à paralyser les larves infestantes et à inhiber en conséquence leur migration à travers un tamis dont la taille des pores suppose un processus actif de la part des L₃. Le principe de la méthode d'inhibition de l'éclosion des œufs est fondé sur la capacité des substances actives à paralyser les larves dans les œufs et à inhiber en conséquence leur éclosion dans une plaque de 96 puits. La méthode d'inhibition du dégainement larvaire est une méthode développée et standardisée initialement dans le laboratoire de l'UMR 1225 (Bahuaud *et al.*, 2006 ; Brunet et Hoste, 2006) qui présente plusieurs intérêts par rapport à l'inhibition de la migration larvaire. Elle est plus simple à mettre en œuvre, moins consommatrice de larves, plus reproductible d'un laboratoire à l'autre. Elle a enfin deux avantages fondamentaux suivants : elle est plus sensible que la LMI ce qui, pour des gammes identiques de concentrations testées, facilite en général l'évaluation des DL₅₀ (ou DI₅₀) ; elle fournit des informations utiles pour le calcul de doses minimales nécessaires pour anticiper les effets anthelminthiques *in vivo*. Par ailleurs, sans que le mécanisme d'action ait été clairement identifié, une étude a indiqué que l'inhibition du dégainement des L₃s existe aussi en conditions *in vivo* et selon une relation dose-dépendante comme généralement décrit *in vitro* (Brunet *et al.*, 2007). Les raisons de ce choix initial sont la facilité d'application des deux méthodes, leur emploi en routine non seulement dans le laboratoire d'accueil mais aussi, plus largement, chez d'autres groupes travaillant sur des thématiques proches par exemple

(Coles *et al.*, 1992 ; Rabel *et al.*, 1994 ; Molan *et al.*, 2000 a, b ; Assi *et al.*, 2003) ; ce qui facilite la comparaison directe de nos résultats avec ceux publiés précédemment.

Pour les études biologiques du chapitre 5, les tests *in vivo* sont retenus. Les études *in vivo* permettent de vérifier la validité des résultats obtenus *in vitro*. Les deux techniques sont indispensables et complémentaires.

Sur l'ensemble des résultats obtenus, lors des tests biologiques sur les quatre nématodes parasites gastro-intestinaux, *H. contortus* et *T. colubriformis* sont plus sensible vis-à-vis des tanins (article 4, 5 et 6) tandis que *S. ratti* un modèle d'étude des *S. stercoralis*, un agent

pathogène de l'anguillulose humaine est plus sensible vis-à-vis des huiles essentielles (article 3) et des alcaloïdes testés (chapitre 4). Les effets anthelminthiques de la poudre de feuilles de *Z. zanthoxyloïdes* et de *N. laevis* sont évalués *in vivo* sur *H. contortus*, *T. colubriformis* chez les chevreaux avec un résultat encourageant (Azando *et al.*, 2011a). Les propriétés anthelminthiques de certaines plantes médicinales résultent de leur composition chimique. Les tanins, les alcaloïdes, les flavonoïdes et les huiles essentielles jouent un rôle essentiel dans l'activité anthelminthique des plantes (Paolini *et al.*, 2003 ; Barrau *et al.*, 2005, Azando *et al.*, 2011b). En effet, l'usage de plantes riches en tanins est proposé comme une stratégie alternative pour le contrôle des nématodes gastro-intestinales chez les petits ruminants dans le but de réduire la dépendance vis-à-vis des traitements anthelminthiques chimiques et de différer la sélection et la transmission des résistances aux anthelminthiques dans les populations de vers (Hoste *et al.*, 2006; Ketzis *et al.*, 2006). Plusieurs études chez les ovins et caprins ont montré qu'une alimentation riche en tanins est associée à une modulation de la biologie des populations de vers adultes, en affectant l'excrétion de l'œuf en particulier (Paolini *et al.*, 2005). Chez les ovins infestés naturellement, il est observé que la consommation des plantes riches en tanins condensés, favorise à la fois la résilience et la résistance des sujets parasités (Athanasidou *et al.*, 2001a ; Niezen *et al.*, 2002). Ces données ont ensuite été confirmées lors d'infestations expérimentales, en utilisant différentes sources de tanins, chez les moutons (Athanasidou *et al.*, 2001b) puis chez la chèvre (Paolini *et al.*, 2003). L'hypothèse d'un mode d'action direct des tanins condensés sur les nématodes gastro-intestinaux est évoquée par de nombreux auteurs (Athanasidou *et al.*, 2001b; Hoste *et al.*, 2006). Cette hypothèse est soutenue d'une part, par le fait que des effets anthelminthiques soient mesurés *in vitro*, conditions où l'influence de l'hôte est absent (Paolini *et al.*, 2004; Bahuaud *et al.*, 2006), et d'autre part par les résultats obtenus lors des expériences *in vivo* sur de courte durée, peu favorables à l'expression d'une réponse immunitaire de l'hôte (Athanasidou *et al.*, 2001b; Paolini *et al.*, 2003). Les tanins sont principalement responsables des propriétés anthelminthiques des feuilles de la plante comme l'ont prouvé des essais précédents avec d'autres plantes riches en tanins [Brunet, 2008b ; Paolini, 2003]. Toutefois, les molécules responsables de l'effet anthelminthique de l'huile essentielle de *Z. zanthoxyloïdes* et *N. laevis* sont encore mal connues et restent à isoler. Plusieurs alcaloïdes (Dieguez-Hurtado *et al.*, 2003 ; Tringali *et al.*, 2001), flavonoïdes (Barrau *et al.*, 2005], terpénoïdes et coumarines [Mara *et al.*, 1992] ont été isolés des différents organes des plantes appartenant au genre *Zanthoxylum* et peuvent également être en partie responsables des propriétés anthelminthiques. Des tanins ont été extraits de *Zanthoxylum gilletti* par Akandé *et*

al. (1999). Mieux Ngassoum *et al.* (2003) ont mis en évidence dans les fruits secs de *Z. zanthoxyloides*, de nombreux composés volatils, doués d'activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Escherichia faecalis*, parmi lesquels le α -pinène, composé majoritaire de cette huile essentielle. L'activité ovicide de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* Linn. (Labideae) et l'eugénol son composé majoritaire sur *H. contortus*, parasites gastro-intestinaux des petits ruminants a été mise en évidence (Pessoa *et al.*, 2002). De même Hussien *et al.* (2011) ont rapporté que les huiles essentielles de *Coriandrum sativum* Linn., *Ocimum lamifolium* ont un effet anthelminthique sur *H. contortus*. De plus, l'activité antiparasitaire de l'atarine (3-diméthylallyl-4-méthoxy-2-quinolone), alcaloïde isolé de *Z. zanthoxyloides* a été démontrée sur les larves de *Schistosoma mansoni* et *Ostertagia circumcincta*, des parasites qui infectent l'Homme, ainsi que sur les formes adulte et larvaire de *Caenorhabditis elegans*, un nématode libre (Perrett et Whitfield, 1995). Les tanins extraits par Edeoga et Eriata (2001) de *N. laevis* justifient également les propriétés anthelminthiques observées. D'autres recherches ont également montré que certaines plantes bioactives plus ou moins riches en tanins et en huile essentielle peuvent inhiber partiellement ou complètement le dégagement *in vitro* des larves L₃ (Bahuaud *et al.*, 2006). La perturbation de l'installation des larves L₃ (article 7) réside également dans la capacité de la plante à inhiber la migration larvaire. Les extraits de *Z. zanthoxyloides* et de *N. laevis* immobilisent *in vitro* les larves L₃ de *T. colubriformis* d'*H. contortus*, de *S. ratti* et *S. stercoralis* (articles 1, 3, 4, 5 et 6). Facilement, Robinson *et al.* (1990) ont prouvé l'inactivation des nématodes parasites gastro-intestinaux humains (*S. stercoralis*) par des extraits des feuilles vertes de *Mimosa pudica*, de *Cuscuta americana*, de *Stachytarpheta jamaicensis*, de *Salvia serotina* et d'*Artocarpus altilis*.

Par ailleurs, des lésions structurelles sont également observées sur les larves L₃ ayant été en contact avec des extraits de plante riche en tanins (*Sainfoin*) (Brunet, 2008 a). De telles altérations rendent difficile l'installation et le développement des larves infestantes et perturbent énormément leur cycle de vie. La forte pression d'utilisation qui pèse sur *Z. zanthoxyloides* fait d'elle une plante menacée et un programme de sauvegarde doit être envisagé pour son exploitation durable (Hounzangbé-Adoté, 2004).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

L'ensemble des travaux de recherche réalisé au cours de notre thèse de doctorat permet de valoriser *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes*, deux des essences médicinales de la flore du Bénin. L'étude phytochimique bio-dirigée ainsi réalisée, permet de mettre en évidence l'activité anthelminthique des extraits et fractions de plantes, confirmant les effets rendiqués par les éleveurs et les tradipraticiens. La caractérisation botanique des plantes réalisée nous permet de trouver la taxonomie fiable des données de la fiole des espèces de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes*. La maîtrise de la technique de caractérisation botanique des plantes nous permet désormais de dresser une véritable "Carte d'identité" à chacune des matières premières qui sont mises à notre disposition et d'en assurer la reproductibilité et la traçabilité et leur sécurisation. L'étude phytochimique a abouti parfois à la concentration, l'isolement et l'identification des molécules qui peuvent en partie ou totalement selon le cas être responsables des effets observés. Les résultats de nos travaux permettront la mise place d'une unité de production de Médicaments Traditionnels Améliorés (MTA) à moindre coût et surtout accessible à la population locale. Les travaux ultérieurs nous permettent d'élucider le mode d'action des extraits de plantes et des molécules concentrées ou identifiées et même de standardiser ces extraits, ce qui permet de mieux rentabiliser leur utilisation en médecine traditionnelle.

Perspectives

Pour les années à venir et fort des résultats obtenus à ce jour, nous comptons orienter nos activités de recherche sur les quatre axes principaux suivants :

-Caractérisation botanique

Ayant apporté une contribution à la botanique de ces familles des Bignoniaceae et des Rutaceae, nous comptons le faire également sur d'autres familles de plantes médicinales. Le

laboratoire d'Ethnopharmacologie de la Faculté des Sciences Agronomiques (FSA) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC) auquel nous sommes affiliés travaille actuellement sur les plantes suivantes : *Parkia biglobosa* (Jacq.) R.Br. ex G.Don (Mimosoideae) ; *Terminalia avicennoides* Guill. Et Perr (Combretaceae), *Sclerocarya birrea* (A.Rich.) Hochst. (Anacardiaceae). Ce travail doit être poursuivi sur des plantes appartenant au même genre.

-Etude pharmacologique.

De part mon cursus et les compétences acquises, nous souhaitons poursuivre nos activités de recherche en collaboration avec d'autres laboratoires de recherche qui nous permettent une approche tout à fait originale de la valorisation des médecines traditionnelles sur des bases scientifiques à l'interface de la chimie et de la biologie. Nos travaux rentrent dans le cadre de la recherche des substances naturelles d'intérêt thérapeutique à partir du matériel végétal provenant d'espèces médicinales. Grâce à l'acquisition de techniques modernes de pharmacologie nous avons pu mettre en évidence les propriétés thérapeutiques de certains extraits de plantes clamées par les éleveurs et les tradipraticiens. Ces propriétés portent sur l'activité anthelminthique, dont les premiers résultats connus sont très encourageants.

Une bonne maîtrise des techniques d'extraction, de fractionnement, de concentration, de purification et d'identification des substances issues des plantes doit nous permettre d'isoler des métabolites secondaires qui peuvent être considérés comme des principes actifs. Afin de contribuer de manière efficace au développement de la phytothérapie, il s'avère important de poursuivre l'identification des groupes de composés et des composés responsables des effets anthelminthiques observés ce qui pourra contribuer efficacement à la standardisation des extraits de plantes. Une part non moins importante doit être accordée à la poursuite de l'étude de la toxicité des extraits de plante afin de rationaliser l'usage des plantes médicinales pour la population locale.

Les mécanismes d'action des extraits, fractions, molécules concentrées, identifiées et isolées doivent être également envisagés pour mieux comprendre l'activité biologique.

-Etude phytochimique

Phytochimique et propriétés anthelminthiques de *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seeman Ex Bureau et de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* (Lam.) Zepernick et Timler sur des Nématodes gastro-intestinaux animaux et humains

Ayant apporté notre contribution à la chimiotaxonomie de ces familles de plantes, nous comptons le faire également sur d'autres familles de plantes. De nouvelles substances actives des plantes étudiées et à étudier qui doivent servir de base de travail à une étude de type « Relation structure-Fonction » dans le cadre de la théorie anthelminthique sont à isoler et à identifier.

-Synthèse des molécules

Pour des métabolites secondaires isolés, présentant une ou des propriétés biologiques intéressantes, nous allons les aborder en collaboration avec les chimistes pour une synthèse totale. Des modifications structurales (hémi synthèses) doivent être également réalisées sur des molécules à activités faibles ou modérées dans le but d'augmenter leurs fonctions et d'établir des relations structure- fonction pour ces molécules.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Phytochimique et propriétés anthelminthiques de *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seeman Ex Bureau et de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* (Lam.) Zepernick et Timler sur des Nématodes gastro-intestinaux animaux et humains

REFERENCES

Abadome, F., Geerts, S., 1993-*Ambroisia maritima*. Connaissances actuelles et perspectives. In : Kasonia K. & Ansey, M. ; 1994.-Métissage en santé animale de Madagascar à Haïti. Edition Botanique Presse Universitaire de Namur, CTA, ACCT, pp. 296-303.

Abbiw, D.K., 1990. Useful plants of Ghana: West African uses of wild and cultivated plants. Intermediate Technology Publications, Royal Botanic Gardens, Kew Ed. London, pp. 154-157.

Adam, J.G., 1971. Flore descriptive des monts Nimba (Côte d'Ivoire, Liberia, Guinée). 6 Tomes, CNRS, Paris. Mémoires du Muséum (Série B, Botanique), 25, 204 p.

Adam, G., 1974. Lapharmacopée sénégalaise traditionnelle: Plantes médicinales et toxiques. Paris Edition Vigot Frères, 1012p.

Adams, R.P. 2001 "Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy." *Allured Publishing Corp., Carol Stream (III, USA.)*

Adesanya, S.A., Sofowora, A., 1983. Biological standardisation of *Zanthoxylum* roots for antisickling activity. *Planta Med.* 48, 27–33.

Adesanya, S. A., Nia, R., Fontaine, C. and Païs, M., *Phytochemistry*, 1994, 35, 1035.

Adesina, S.K., 1986. Further novel constituents of *Zanthoxylum zanthoxyloides* root and pericarp. *J. Nat. Prod.* 49, 715–716.

Adesina, S.K., 2005. The Nigerian *Zanthoxylum*; chemical and biological values. *Afr J. Traditional. CAM.* 2, 282-301.

Adjanouhoun, E., Alyi, A.M., Aké Assi, L., Baniakina, J., Chibon, P., Cusset, G., Doulou, V., Enzanza, A., Eymé, J., Gondoté, E., Kéita, A., Mbemba, C., Mollet, J., *et coll.*, 1985 Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali. ACCT éd., Paris, p. 206.

Adjanouhoun, E., Alyi, A.M., Aké Assi, L., Baniakina, J., Chibon, P., Cusset, G., Doulou, V., Enzanza, A., Eymé, J., Gondoté, E., Kéita, A., Mbemba, C., Mollet, J., *et coll.*, 1986. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo. ACCT éd., Paris, p. 134.

Adjanonhoun, E.J., Adjakidje, V., Ahyim, R.A., Ake, A.L., 1989. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République du Bénin. Médecine traditionnelle et pharmacopée, Agence de coopération culturelle et technique (ACCT) : Paris.

Adjanahoun, E., Ahyi, M.R.A., Ake-Assi, L., Elewude, J.A., Fadoju, S.O., Gbile, Z.O., Goudole, E., Johnson, C.L.A., Keita, A., Morakinyo, O., Ojewole, J.A.O., Olatunji, A.O., Sofowora, E.A., 1991. Traditional medicine and pharmacopoeia. Contribution to ethnobotanical floristic studies in Western Nigeria, Pub. Organization of African Unity, Scientific Technical and Research Commission Lagos, Nigeria, p. 420.

Akande, J.A., Hayashi, Y., Yamamoto, K., 1999. Extractive components of tropical chewing stick species. *Trop. Sci.* 38: 87-90.

Akoègninou, A., Van der Burg, W.J., Van der Maesen, L.J.G., Adjakidjè, V., Essou, J.P., Sinsin, B., Yédomonhan, H., 2006. Flore analytique du Bénin. Cotonou et Wageningen Bakhuis Publishers 1034pp.

Aladesanmi, A.J, Nia, R., Nahrstedt, A., 1998. New pyrazole alkaloids from the root bark of *Newbouldia laevis*. *Planta Med.* 64, 90-1.

Alawa, C.B.I., Adamu, A.M., Gefu, J.O., AJanusi, O.J., Abdu, P.A., Chiezey, N.P., Alawa, J.N., Bowman, D.D., 2003. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegaiensis*) for anthelmintic activity. *Vet. Parasitol.* 113, 73 – 81.

Ali, N.; 2002. Dermatophilose bovine en République du Bénin ; Chimiothérapie et phytothérapie comparée. Thèse de doctorat es Sciences de la Faculté des Sciences de l'Université d'Abomey-Calavi, Bénin p.189

Anderson, K.I., Wang, Y.L., Small, J.V., 1996. Coordination of Protrusion and Translocation of the Keratocyte Involves Rolling of the Cell Body. *The Journal of Cell Biology.* 134, 1209-1218

Arbonnier, M., 2000. Arbres Arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. La librairie du Cirad. Montpellier et Museum national d'histoire naturelle, Paris.

Arbonnier, M., 2004. Tree, Shrubs and Liana of West Africa dry zones. CTA, Postbus 380 6700AJ Wageningen. The Netherlands

Assi, L.M., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Viera, L.S, Costa, C.T.C., Souza, J.A.L., 2003. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 117: 43-49.

Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L. 2001a. The effects of condensed tannins supplementation of foods with different protein content on parasitism, food intake and performance of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Br. J. Nutr.*, 86, 697-706.

Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001b. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Vet. Parasitol.* 99, 205-219.

Aubréville, A., Mult., C., 1963. Flore du Cameroun. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.

Aubry P., Klotz, F., Ngemby-Mbina, C., 1987. Anguillulose ou strongyloïdose. *In* Encycl. Méd. Chir. (Paris), Maladies infectieuses. A-10, 8116-8118.

Ayensu, E.S., 1978. Medicinal Plants of West Africa. USA: Reference Publications Inc, pp. 36-39.

Ayodele, A.E., Olowokudejo, J.D., 1997. Systematic Importance of Leaf and Epidermal Characters in West African Species of Family Myrtaceae. *Bot. Soc. Brot. Ser. 2*, 35-72.

Azando, E.V.B., Hounzangbé-Adote, M.S., Olounladé, P.A., Brunet, S., Fabre, N., Valentin A., Hoste, H., 2011a. Effets anthelminthiques *in vivo* de la poudre de feuilles de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* et de *Newbouldia laevis* sur les nématodes parasites gastro-intestinaux des chevreaux Djallonké. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5,1054-1062

Azando, E.V.B., Hounzangbé-Adoté, M.S., Olounladé, A.P., Brunet, S., Fabre, N., Valentin A, Hoste, H., 2011b. Involvement of tannins and flavonoids in the *in vitro* effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 180, 292-297

Azando, E.V.B., Olounladé, A.P., Hounzangbé-Adoté, M.S., Tam-Ha, T.B., Fabre N., Valentin A., 2011c. Contrôle des parasitoses gastro-intestinales ovines par l'huile essentielle de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* (*Fagara zanthoxyloïdes*). *Rev. Med. Vet.* (Sous presse, Vd F.11.0202.1)

Baba-Moussa, F., Akpagana, K., Bouchet, P., 1999. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 66, 335-338.

Bafor, E., Sanni, U., 2009. Uterine contractile effects of the aqueous and ethanol leaf extracts of *Newbouldia laevis* (Bignoniaceae) *in vitro*. *Indian J Pharm Sci.* 71, 124-7.

Baker, R.L., Lalloo, K.A., Rege, J., Reynolds, L., Bekele, T., Mukassa-Mugerwa, E., Rey, B.; 1992. A review of genetic resistance to endoparasites in small ruminants and an outline of ILCA's research programme in the area. *Proceedings of the 10th Scientific Workshop of the Small Ruminant Collaborative Research Support Programme, Nairobi, Kenya*, p. 79 - 104.

Bahuaud, D., Martinez-Ortiz de Montellano, C., Chaveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 132, 545-554

Banso, A., Ngbede, J.E., 2006. Phytochemical screening and *in vitro* antifungal properties of *Fagara zanthoxyloides*. *Int. J. Food Env.* 4, 8-9.

Barnabas et al., 2011

Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., Hoste, H., 2005. Effect of bioactive compounds from *Sainfoin* (*Onobrychis viciifolia Scop.*) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology* 131, 531-538.

Barth, D., Visser, M., 1991. Magen-Darmnematoden des Rindes. Stuttgart : Enke, 104 p

Bate-Smith, E.C., 1973. Haemanalysis of tannins. The concept of relative astrigency *Phytochemistry*. 12, 907-912.

Bavay, 1876. *Strongyloides stercoralis*

Baytop, 1956

Beille, L., 1935. Précis de botanique pharmaceutique. Tome II, 2 parties. Ed. 2, médicinales N. Maloine, 1232p

Berhaut, J., 1971. Flore illustrée du Sénégal.

Berhaut, J. 1971. Flore illustrée du Sénégal. Tome I : Acanthacées à Avicenniacees. Dakar (Sénégal) : Ministère du développement rural et de l'hydraulique, direction des eaux et forêts, 1628pp.

Berrag, B., 2008. La résistance aux anthelminthiques chez les ruminants: Situation actuelle et mesures de contrôle. Transfert de technologie en agriculture. Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA. 168,1-4

Besier, B., 2007. New anthelmintics for livestock: the time is right. *Trends in Parasitology*. 23, 21-24.

Bethony, J, Brooker, S, Albonico, M, Geiger, S.M, Loukas, A., Diemert, D., Hotez, P.J., 2006. Soil-transmitted helminth infections: Ascariasis, Trichuriasis, and hookworm. *Lancet*. 367, 1521-1532.

Bhatt, P.N., Johnson, E.A., Smith, A.L., Jacoby, R.O., 1981. L Genetic resistance to lethal flavivirus encephalitis. III Replication of Banzivirus *in vitro* and *in vivo* in delessen (P)

- Boehme, A.K., Noletto, J.A., Haber, W.A., Setzer, W.N., 2008. Bioactivity and chemical composition of the leaf essential oils of *Zanthoxylum rhoifolium* and *Zanthoxylum setulosum* from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Research*. 22, 31-36
- Borreani, G., Peiretti, P.G., Tabacco, E., 2003. Evolution of yield and quality of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) in the spring growth cycle. *Agronomy for Sustainable Development* 23, 193-201.
- Bowen, J.M., Cole, R.J., Bedell, D., Schabdach, D., 1996. Neuromuscular effects of toxins isolated from Southern Prickly Ash (*Zanthoxylum clava-herculis*) Bark. *American Journal of Veterinary Research* 57, 1239-1244.
- Brunel, J.F., Scholz, H., Hiepko, P., 1984. Flore analytique du Togo. Phanérogames. Eschborn, Alle-magne, Gtz, p. 571.
- Brunet, S., Hoste, H., 2006. Les monomères des tannins condensés affectent le dégagement des larves des nématodes parasites des ruminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 7481-7487.
- Brunet, S., Aufrere, J., Elbabili, F., Fourasté, I., Hoste, H., 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin rich plant extract (*sainfoin*) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology*. 135, 1-10.
- Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., 2008a. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasale nematode larvae with fundic explants. *Int. J. Parasitol.* 38, 783-790.
- Brunet, S., Martinez-Ortiz de Montellano, C., Torres-acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Capetillo Leal, C., Hoste, H., 2008b. Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Vet. Parasitol.* 157, 81-88.
- Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Lavoisier Technique & Documentation, Paris, France, pp. 369-404.
- Bruneton, J., 2009. Pharmacognosie-Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, p. 1288.
- Burkill, H.M., 1985. The Useful Plants of West Tropical Africa. 2nd Edition Volume 1, Famillies A-D Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, United Kingdom, pp. 252-269.

Burkill, H.M., 1997. The Useful Plants of West Tropical Africa. Royal Botanic Gardens Kew, pp 658-661

Burkill, H.M., 2004. The useful plants of west tropical Africa, ed.2.

Cabaret, J., 2000. Anthelmintic resistance in goats: from fiction to facts. In Proceeding of the 7th international conference on goats, Tours- Poitiers, (France), pp. 793–794.

Cabaret, 2002

Campa, C., 2005. Dossier de Candidature au Diplôme d’habilitation à diriger des recherches, Université Montpellier II, France, p. 120.

Castello, 1999

Chaaib, F., Queiroz, E.F., Ndjoko, K., Diallo, D., Hostettmann, K., 2003. Antifungal and antioxidant compounds from the root bark of *Fagara zanthoxyloides*. *Planta Medica* **69**, 316-320.

Chaaïb, K.F., 2004. Investigation phytochimique d’une brosse à dents africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) (Rutaceae). Thèse de doctorat de la Faculté des Sciences de l’Université de Lausanne, Genève 211p.

Chartier, C., Etter, E., Hoste, H., Pors, I., Koch, C., Dellac, B., 2000a. Efficacy of copper oxide needles for the control of nematode parasites in dairy goats. *Vet. Res. Commun.* **24**, 389-399.

Chartier, C., Etter, E., Hoste, H., Pors, I., Mallereau, M.P., Broqua, C., Mallet, S., Koch, C. et Masse, A., 2000b. Effects of the initial level of milk production and of the dietary protein intake on the course of natural nematode infection in dairy goats. *Vet. Parasitol.* **92**, 1-13.

Chartier, C., Itard, J., Morel, P., Troncy, P., 2000c. Précis de parasitologie vétérinaire tropicale, Paris.

Chevalier de Lamarck, 1788

Chhabra et Uiso, 1990

Chu et Kemper, 2011

Coles, G.C., Borgsteede, F., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M. A., Waller, P.J., 1992. World Association for Advancement in veterinary parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* **44**, 35-43

Correia, Da Silva, A., Costa, A., Quiteria, P. M., 1966. Alguns aspectos da actividade farmacodinâmica dos alcaloïdes *Newbouldia laevis* Seem. *Garcia de orta.* **14**, 91-96.

Couillerot, E., Caron, L., Audran, J.C., Molinatti, P., Le Men Olivier, L., Jardillet, J.C., Chenieux, J.C., 1994. Benzophenanthridine and furoquinoline accumulation in cell suspension culture of *Fagara zanthoxyloides*. *Phytochemistry*, **37**, 425-428.

Coulaud, J.P., 1990a. L'anguillulose en Afrique. Problèmes épidémiologiques et chimiques. *Médecine d'Afrique Noire*. 37, 468 :470.

Coop, R.L., Kyriazakis, I., 1999. Nutrition-parasite interaction. *Vet. Parasitol.* 84 (3-4), 187-204.

Coulaud, J.P., 1990b. Le traitement de l'anguillulose. *Médecine d'Afrique Noire*, 37, 600-604.

Craplet, C., Thibier, M., 1984. Pathologie de la gestation. *In: Le mouton*. 4è ed. Vigot, Paris.

Daddona, P.E., Wright, J.L., Hutchinson, C.R., 1976. Alkaloid catabolism and mobilization in *Catharanthus roseus*. *Phytochem* 15 , 941-945

Dalziel, J.M. 1937. The useful Plants of West Africa. The Crown Agent for the Colonies London 1, 443-446.

Datry, 1994

Deka, K. E., 1998. Effet anthelminthique de quelques plantes sur les *Strongyloides spp* du porc au Bénin. Master of Sciences. (M. Sc) Institut de médecine Tropicale Prince Léopold. Département de production et Santé Animale Tropicale. Antwerpen, Belgique.66, p. 46.

Detoni, C.B., Cabral-Albuquerque, E.C., Hohlemweger, S.V., Sampaio, C., Barros, T.F., Velozo, E.S. 2009. Essential oil from *Zanthoxylum tingoassuiba* loaded into multilamellar liposomes useful as antimicrobial agents. *J Microencapsul.* 26, 684-691.

Diafouka, A., Lejoly, J., 1993. Plantes hypotensives utilisées en médecine traditionnelle à Brazzaville (Congo). Acte du 2^e Colloque européen d'ethnopharmacologie et de la 11^e Conférence Internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg, 24-27.

Dieguez-Hurtado, R., Garrido, G., Prieto Gonzalez, S., Iznaga, Y., Gonzalz, L., Molina Tores, J., Curini, M., Epifano, F., Marcotullio, M.C. 2003. Antifungal activity of some Cuban *Zanthoxylum* species. *Fitoterapia*.74, 384-386.

Dorchies, Ph., 2000. L'immunité au cours des strongyloses chez les ruminants. *Cahier du Vetomecum*, pp. 15-24.

Edeoga, H.O., Eriata, D.O., 2001. - Alkaloids, tannin and saponin contents of some Nigeria medicinal plants. *J. Med. Arom. Plant Sci.*, 23: 344 - 349.

Essien, E.M, Okogun, J.I , 1976. Effect of the root extract of *Fagara zanthoxyloides* on blood coagulation. *Thromb Haemost.* 36:525-31.

EL Kalamouni, C., 2010. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse III, Toulouse. p 501

Enderlein, C., 2002. L'immunité au cours des strongyloses gastro-intestinales des ruminants : étude bibliographique. Thèse de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse, p 102

Endo, T., Goodbody, A., Misawa, M., 1987. Alkaloid production in root and shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Medica* 27, 2147-2149

Engler, A., 1931. Rutaceae In: Die natürlichen Pflanzenfamilien, 2nd ed. Engelmann, Leipzig, 19a, pp.187-359, pp. 458-459.

Enwerem, N.M., Okogun, J.I., Wambebe, C.O., Okorie, D.A., Akah, P.A., 2001. Anthelmintic activity of the stem bark extracts of *Berlina grandiflora* and one of its active principles, Betulinic acid. *Phytomed.* 8,112 -114.

Etter, E., Chartier, C., Hoste, H., Pors, I., Lefrileux, Y., Broqua, C., Vallade, S., Goudeau, C. 2000. Parasitisme par les nématodes du tube digestif et utilisation du pâturage: Epidémiologie de l'infestation dans les troupeaux caprins laitiers en France. *Epidémio. Santé Anim.* 37, 75-86.

Euzéby, J., 1963. Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leur incidence sur la pathologie humaine, Paris.

Eyong, K.O., Krohn, K., Hussain, H., Folefoc, G.N., Nkengfack, A.E., Schulz, B., Hu, Q., 2005. Newbouldiaquinone and newbouldiamide: a new naphthoquinone-anthraquinone coupled pigment and a new ceramide from *Newbouldia laevis*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 53, 616-619.

Eyong, K.O., Folefoe, G.N., Kuete, V., Beng, V.P., Krohn, K., Hussain, H., Nkengfack, A.E., Saefel, M., Sarite, S.R., Hoerauf, A., 2006. Newbouldiaquinone A: a naphthoquinone-anthraquinone ether coupled pigments, as a potential antimicrobial and antimalarial agents for *Newbouldia laevis*. *Phytochemistry.* 67, 605-609.

Facundo, V., Rezende, C.M., Pinto, A.C., Morais, S.M., 2003. Essential oil of *Zanthoxylum ekmanii* (Urb.) Alain. Leaves. J. Essent. Oil Res. 15,202-207.

Fatondé, M.A., Togbé R.E., 2009. Prévalence des parasitoses intestinales dans le sud du Bénin de 2004-2008, apport des méthodes de WILLIS et de BAILENGER. Mémoire de de fin de cycle d'Ingénieur des travaux ABM / TBH/ EPAC/ Université d'Abomey-Calavi 51p

Ferrari, J., 2002. Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat de la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, p 202.

Feucht, W., Treutter, D., 1999. The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defense. In: Principles and practices in chemical ecology, Press et Boca raton (Eds.), pp. 307-338.

Fish, F., Waterman, P.G., 1973. Chemosystematics in the Rutaceae II. The Chemosystematics of the *Zanthoxylum / Fagara* complex. Taxon. 22, 177-203.

Frank, R., Stermitz, M.A.C., Jacquelyn, A.S., 1980. Alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum williamsii*, *Z. monophyllum* and *Z. Fagara*. Phytochem. 19,1469- 1472.

Gafner, S., Wolfender, J.L., Nianga, M., Stoeckli, E.H., Hostettmann, K., 1996. Antifongique et antibactérienne de naphthoquinones *Newbouldia laevis* racines, Phytochimie. 42, 1315-1320.

Gafner, S., Wolfender, J.L., Nianga, M., Hostettmann, K., 1997. Phenylpropanoid glycosides from *Newbouldia laevis* roots. Phytochemistry 44, 687-690.

Gafner, S., Wolfender, J.L., Nianga, M., Hostettmann, K., 1998. A naphthoquinone from *Newbouldia laevis* roots. Phytochemistry. 48, 215-216.

Gardini, S., Cloninger, C.R., Venneri, A., 2009. Individual differences in personality traits reflect structural variance in specific brain regions. Brain Res Bull. 79, 265-270.

Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L.J.D., Singla, A.K., 2001. Chemistry and pharmacology of the *Citrus* biflavonoid hesperidin. Phytotherapy Research. 15, 655-669.

Gbaguidi, A.F., 2005. Identification, purification, isolement et quantification de principes actifs de *Mitracarpus scaber* et évaluation de leurs activités antimicrobiennes sur

Dermatophilus congolensis. Thèse de doctorat de la Faculté des Sciences et Technique de l'Université d'Abomey-Calavi, Bénin, p 176.

Gbeassor, M., Kedjagni, A.Y., Koumagbo, K., De Souza, C., Agbo, K., Aklikokou, K., Amegbo, K.A., 2006. *In vitro* antimalarial activity of six medicinal plants. *Phytotherapy Research* 4, 115-117.

George, K., Ainooson, E., Woode, D.D.O., George, A.K., 2009. Antinociceptive Effects of *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Stem Bark Extract in a Rat Model. *Pharmacognosy Magazine*, 17, 49-54.

Gilani, A.H., Bukhari, I.A., Khan, R.A., Rafeeq, R.A., Ullah, A.F., Ahmad, V.U., 2005. Cholinomimetic and calcium channel blocking activities of *Carthamus oxycantha*. *Phytotherapy Research*. 19, 679–683.

Gopal S., Woodcock C. and A. Stahler, 1999, Fuzzy neural network classification of global land cover from 1o AVHRR data set, *Remote Sensing of Environment*, 67, 230-243.

Griffin, C.T., Chaerani, R., Fallon, D., Reid, A.P., Downes, M.J., 2000. Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp., and *Heterorhadtis indica* in Indonesia. *J. Helminthol*, 74,143-150.

Guillard, 2004

Guisso, I.P. 1990. Etudes de l'efficacité antidrépanocytaire des gélules de Faca chez les enfants en milieu hospitalier d'Ouaga (CHN-Yo). *Rev. Cames*,7, 15.

Hagerman, A.E., 1992. Tannin protein interactions. In: *Phenolic compounds in food and their effects on health : Analysis, occurrence and chemistry*, HO, LEE et HUANG (Eds.), American chemical society, Washington DC, pp. 236-247.

Hagerman, A.E., 2002. Tannin Chemistry (www.users.muohio.edu/hagermae).

Hammond, J.A., Fielding, D., Bishop, S.C., 1997. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Anim. Health Res. Rev.* 21, 213-228.

Harborne, J.B.,1973. *Phytochemical methods*, London. Chapman and Hall, Ltd, pp. 49-188.

Harborne, J.B. 1983. Phytochemical methods; A guide to modern Techniques of plant analysis. 3rd edition Chapman and Hall. New York.

Haring, A., 2007. Determinants of tannin concentrations in forage plants. Agronomic potential of tanniferous plants. PhD thesis submitted to the Swiss Federal Institute of Technology, Zurich p. 226.

Hartley, T.G. (1966). A Revision of The Malesian Species of *Zanthoxylum* (Rutaceae). Journal of the Arnold Arboretum 47: 171–221.

Haslam, E., 1989. Plant polyphenols-Vegetal tannins revisited, U.K.

Hassan, S.W., Salawu, K., Ladan, M.J., Hassan, L.G., Umar, R.A., Fatihu, M.Y., 2010. Hepatoprotective, Antioxidant and Phytochemical Properties of Leaf Extracts of *Newbouldia laevis*. International Journal of PharmTechResearch 2, 573-584.

Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H., 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. Veterinary Parasitology 142, 293-300.

Hegnauer, R., 1973. Chemotaxonomie der Pflanzen-Band VI. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 174-239.

Hegnauer, R., 1983. Chemical characters and the classification of the rutales. In: Waterman, P.G., Grundon, M.F. (Eds.), Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales. Academic Press, London, UK, pp. 401-439.

Herbert et al., 2002

Hertzberg, H., Huwyler, U., Kohler, L., Rehbein, S., Wanner M., 2002. Kinetics of exsheathment of infective ovine and bovine strongylid larvae in vivo and in vitro. Parasitology, 125, 65-70.

Hesse, M., 2002. Alkaloids : Nature's Curse or Blessing. Wiley-VCH, New York.

Hoste, H., Chartier, C., 1997. Perspectives de lutte contre les strongyloses gastro-intestinales des ruminants domestiques. Le point Vétérinaire, Vol. 28, numéro spécial «Parasitologie des ruminants» : 181 - 187.

Hoste, H., Huby, F., Mallet, S., 1997. Strongyloses gastro- intestinales des ruminants : conséquences physiopathologiques et mécanismes pathogéniques. Point Vét. 28, 1835-1841.

Hoste, H., Le Frileux, Y., Pommaret, A., Gruner, L., Van Quackebecke, E. et Koch, C., 1999. Importance du parasitisme par des strongles gastro-intestinaux chez les chèvres laitières dans le Sud-Est de la France. INRA Prod. Anim. 12, 377-389.

Hoste et Chartier, 2000

Hoste et Chartier, 2002

Hoste et Dorchies 2000

Hoste, H., Leveque, H., Dorchies, P., 2001. Comparison of nematode infections of the gastrointestinal tract in Angora and dairy goats in a rangeland environment: relations with the feeding behaviour. Vet. Parasitol. 101 (2), 127-135.

Hoste, H., Chartier, C., Le Frileux, Y., Goudeau, C., Broqua, C., Pors, I., Bergeaud, J.P., Dorchies, P., 2002a. Targeted application of anthelmintics to control trichostrongylosis in dairy goats: result from a 2-year survey in farms. Vet. Parasitol. 110, 101-108.

Hoste, H., Le Frileux, Y., Goudeau, C., Chartier, C., Pors, I., Broqua, C. et Bergeaud, J.P. 2002b. Distribution and repeatability of nematode faecal egg counts in dairy goats: a farm survey and implications for worm control. Res. Vet. Sci. 72, 211-215.

Hoste, H., Le Frileux, Y., Pommaret, A., 2002c. Comparison of selective and systematic treatments to control nematode infection of the digestive tract in dairy goats. Vet. Parasitol. 106, 345-355.

Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. Trends Parasitol., 22, 253-261.

Hostettmann, K., 1997. Tout Savoir sur le Pouvoir des Plantes, Sources de Médicaments. Editions

Houghton, P.J., Pandey, R., Hawkes, J.E., 1994. Naphthoquinones and an alkaloid from roots of *Newbouldia laevis*. Phytochemistry 35, 1602-1603.

Hounzangbé-Adoté, M.S., 2000. La pharmacopée en médecine vétérinaire au sud Bénin (cas des ovins et caprins). Colloque Européen d'Ethnopharmacologie. Société Française d'ethnopharmacologie. Metz du 11 au 13 mai 2000.

Hounzangbé-Adoté, M.S., 2004. Propriétés anthelminthiques de 4 plantes tropicales testées *in vitro* et *in vivo* sur les nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants Djallonké. Thèse de doctorat de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Benin.

Hounzangbé-Adoté, S.M., Paolini, V., Fouraste, I., Moutairou, K., Hoste, H., 2005a. *In vitro* effects of four tropical plants on the intestinal parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. Res. Vet. Sci. 78, 155-160.

Hounzangbé-Adoté, S., Paolini, V., Fouraste, I., Moutairou, K., Hoste, H., 2005b. *In vitro* effects of four tropical plants on the intestinal parasitic nematode, *T. colubriformis*. J. Helminthol. 79, 29–33.

Hounzangbé-Adoté, S.M., Zinsou, F.E., Hounkpè, V., Moutairou, K., Hoste, H., 2005c. *In vivo* effects of *fagara* leaves on sheep infected with gastrointestinal nematodes. Trop. Anim. Health Product 37, 205-214.

Igoli, J.O., Tor-Anyiin, T.A., Usman, S.S., Oluma, H.O.A., Igoli, N.P., 2002. Folk medicines of the lower Benue valley of Nigeria. Recent Progress in Medicinal Plants 7, 327-338.

Igoli, J.O., Igwue, I.C., Igoli, N.P., 2003. Traditional Medicinal Practices amongst the Igede people of Nigeria. J Herbs Spices Med Plants 10, 1-10.

Isaacs-Sodeye, W.A., Sofowara, E.A., Williaws, A.O., Marquis, V.O., Adekunle, A, Anderson, C.O., 1975. Extract of *Fagara zanthoxyloïdes* root in sickle cell anemia. Toxicology and preliminary clinical trials. Acta haematol, 33, 3, 158p.

Jackson, F., Coop, R.L., 2000. The development of Anthelmintic resistance in sheep nematodes. Parasitology.,120, 95-107.

Jackson F., Hoste H. 2010. *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In “*In vitro* screening of plant resources for extra nutritional attributes in ruminants nuclear and related methodologies” P Vercoe, H.P.S. Makkar, A.C., Schlink Eds, Springer/International Atomic Energy Agency Edition Dordrecht pp 25-45.

Jackson, B.P, Snowdon, D.W., 1990. Atlas of microscopy of medicinal plants, culinary herbs and spices, 18-19.

Jacquet, P., Cabaret, J., Cheikh, D., Thiam, E., 1997, Identification of *Haemonchus* species in domestic ruminants based on morphometrics of spicules. Parasitol Res 83, 82-86.

Jacquet, P., 2000. Adaptations des Nématodes parasites de Ruminants à la survie en région subdésertique. pour le cours "Évolution des Parasites et des Relations Hôtes-Parasites", MNHN, pp. 3-5

Jardin botanique national de Belgique, 1967. Flore du Congo, du Rwanda et du Burundi (flore d’Afrique centrale).

Jean-Blain, C., 1998. Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 149, 911-920.

Joppa, K.M., Vovor, A., Eklu-Gadegbeku, K., Agbonon, A., Aklikokou, K., Gbeassor, M., 2008. Effect of *Morinda lucida* Benth. (Rubiaceae) and *Newbouldia leavis* P. Beauv. (Bignoniaceae) on sickling of red blood cells. *Med Trop.* 68, 251-256

John (St) , H., 1973. List and summary of the flowering plants in the Hawaiian Islands. (L Hawaii).

Juhé-Baulaton, D., Roussel, B., 2002. Les sites religieux *vodun* : des patrimoines en permanente évolution. In *Patrimonialiser la nature tropicale. Dynamiques locales, enjeux internationaux.* Cormier-Salem M.-C., D. Juhé-Beaulaton, J. Boutrais, B.Roussel (Eds), Paris, IRD, collection "Colloques et séminaires" pp. 415-438.

Juhé-Beaulaton, D., 2010. Forêts sacrées et sanctuaires boisés. Des créations culturelles et biologiques, Paris, Karthala, 280 p.

Kaïd Slimane, 2004

Kaplan, R.M., 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.*, 20, 477-481.

Kassim, O.O., Loyevsky, M., Elliott, B. , Geall, A., Amonoo, H., Gordeuk, V.R., 2005. Effects of root extracts of *Fagara zanthoxyloides* on the *in vitro* growth and stage distribution of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49, 264-268.

Kerharo, J., Adam, J.G., 1974. La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. *In: Plantes médicinales et toxiques.* Vigot frères, Paris, pp. 713-715.

Ketzis JK, Vercruysse J, Stromberg BE, Larsen M, Athanasiadou S, Houdijk JG (2006). Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. *Vet. Parasitol.* 139: 321-335.

Kloosterman, A., Albers, G.A., Van den Brink, R., 1978. Counting eggs *in utero* of individual female worms. *Vet Parasitol* 4, 353-368.

Koudandé, O.D., 1991. Utilisation des produits pharmaceutiques et traditionnels dans les traitements des maladies des petits ruminants . Résultats d'une enquête menée sur trois sites du projet RAMR dans le département du Mono MDRAC/ DRA/ PRAMR. 26p.

Krane, B.D., Fagbule, M., Shamma, M., Gozler, B., 1984. The Benzophenanthridine Alkaloids, J. of Nat. Prod. 47, 1-43.

Kreis, 1932

Kuete, V., Eyong, K.O., Folefoc, G.N., Beng, V.P., Hussain, H., Krohn, K., Nkengfack, A.E., 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extract and of the chemical constituents isolated from *Newbouldia laevis*. Pharmazie.62, 552-556.

Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. Vet Parasitol. 49, 123-158.

Levy, A., Milo, J., Ashri, A., Palevitch, D., 1984. Heterosis and correlation analysis of the vegetative components and ajmalicine content in the roots of the medicinal plant *Catharanthus roseus* L.G. Don. Euphytica, 32, 557-564

Linné , 1757

Louis Normand, 1876

Mahmoud AA. 1996. Strongyloidiasis. Clin Infect Dis. 23, 949-952.

Makkar, H.P.S., Blummel, H.P., Becker, K., 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. British Journal of Nutrition 73, 897-913.

Makkar, H.P.S., 2000. In Quantification of tannins in tree foliage : Working document, FAO/IAEA, Vienna.

Makkar, H.P.S., 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. Small Rum.Res. 49, 241- 256.

Makkar, H.P.S., 2006. Chemical and biological assays for quantification of major plant secondary metabolites. In Herbivores, Assessment of Intake, Digestibility and the Roles of Secondary Compounds. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 235-249

Malgras, D., 1992. Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes. Edits. Karthala, Paris, pp. 315-316.

Manolaraki, F., 2011. Propriétés anthelminthiques du sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) : Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués. Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse III, Toulouse.

Mara, S.P., Arruda, Jao, B., Fernandes Paulo, C., Viera, M., Fatima, Das, G.F., Da Silva Jose, R.P. 1992. Chemistry of *Zanthoxylum rhoifolium*. A new secofuraquinoline alkaloids. Biochem. System Ecol. 20, 173-178.

Marais, J.P.J., Mueller-Harvey, I., Brandt, E.V., Ferreira, D., 2000. Polyphenols, condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 3440-3447.

Marston, A., Kissling, J., Hostettmann, K., 2002. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butylcholinesterase inhibitors in plants. Phytochemical Analysis 13, 51- 54.

Martínez-Ortíz-de-Montellano, C., Vargas-Magaña, J.J., Canul-Ku, H.L., Miranda-Soberanis, R., Capetillo-Leal, C., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2010. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. Veterinary Parasitology.172, 283-290.

Martinez-Ortiz de Montellano, C., 2010. Mécanismes d'action de plantes riches en tanins sur les nématodes gastrointestinaux adultes de petits ruminants. Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse III, p.145.

Mazzougbodji, A., Yessoufou, S., Sadeler, B.C, 1988. Etude comparative de la prévalence de l'Anguillulose en zones urbaine et rurale dans la région méridionale du Bénin. Med. d'Afrique Noire, 35 : 733-737.

Mclafferty, F.W., 2005 "Wiley Registry of Mass Spectral Data 7th edition with NIST 2005 Spectral Data." Wiley.

Messmer, W.M., Tin-Wa, M., Fong, H.H., Bevelle, C., Farnsworth, N.R., Abraham D.J., Trojáněk, J., 1972. Fagaronine, a new tumor inhibitor isolated from *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae). J Pharm Sci. 61, 1858-1859.

Mirande, R., 1920. Sur le Carmin aluné et son emploi, combiné avec celui du vert d'iode, en histologie végétale. C R Acad Sci,170, 197-199.

Mohammedi, 2006

Molan D., 2009. Religion traditionnelle et gestion durable des ressources floristiques en Côte d'Ivoire : Le cas des Ehotilé, riverains du Parc National des Îles Ehotilé. Revue électronique en Sciences de l'environnement. Vertigo. 9(2)

Molan, A.L., Alexander, R.A., Brookes, I.M., McNabb, W.C., 2000a. Effect of an extract from sulla (*Hedysarum coronarium*) containing condensed tannins on the migration of three sheep gastrointestinal nematodes *in vitro*. Proceedings of New Zealand Society of Animal Production. 60, 21-25.

Molan, A.L., Hoskin, S.O., Barry, T.N., McNabb, W.C., 2000b. Effect of condensed tannins extracted from four forages on the viability of the larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes. Veterinary Record. 147, 44-48.

Molan, A.L., Waghorn, G.C., Min, B.R., McNabb, W.C., 2000c. The effect of condensed tannins from seven herbages on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. Folia Parasitologica. 47, 39-44.

Moura, N.F., Strapazzon, J.O., Loro, F., Morel, A.F.; Flach, A., 2006. Composition of the leaf oils of rutaceae: *Zanthoxylum hyemale* A. St. Hill, *Z. rhoifolium* Lam. and *Z. rugosum* A. St. Hill et. Tul.. J. Essent. Oil Res. 18:4-5

Mueller-Harvey, I., Mark Allan, A.B., 1992. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology. 1, 151-217.

Mueller-Harvey, I., 2001. Analysis of hydrolysable tannins. Anim. Feed Sci. Technol. 91, 3-20.

Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. J. Sci. Food Agric. 86, 2010-2037.

Muhammad, S., Amusa, N.A., 2005. The important food crops and medicinal plants of North-Western Nigeria. Res. J. Agric. Biol. Sci. 1, 254-260.

Munn, E.A., 1993. Development of a vaccine against *Haemonchus contortus*. Parasitol Today, 9: 338-339

Munn, E.A., 1997. Rational design of nematode vaccines: hidden antigens. Int J Parasitol. 27: 359-366.

Neuwinger, H.D., 1996. African Ethnobotany. Poisons and Drugs: Chemistry, Pharmacology, Toxicology. Chapman & Hall, London.

Ngassoum, M. B., Essia-Ngang, J.J, Tatsadjieu, L.N., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Adjoudji, O., 2003. Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon in Fitoterapia, 74, 284-287.

Ngono Ngane, R.A., 1999. Contribution à l'étude des propriétés antifongiques et analyse phytochimique de cinq plantes médicinales camerounaises. Thèse Doctorat de. Pharmacie, Université de. Reims (France), 196-212

Nguédia, A.J.C., Beng, P.V., Etoa, F-X., Kuete, V., Manfouo, R., Lontsi, D., Somo Moyou, R., 2005. Etudes pharmacocinétiques de *Gladiolus gregasius* Baker et *Newbouldia laevis* Seem, plantes médicinales à propriétés antimicrobiennes. Journal of academy of Sciences. 5, 79-84.

Nicolas, X., Chevalier, B., Klotz, F., 2004. Encyclopédie Médico-Chirurgicale **8-514-A-60k, 11p**

Nicolas et al., 2005

Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Hodgson, J., Mackay, A.D., Leathwick, D.M., 1996. Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics : approaches, experiences and prospects. Int. J. Parasitol. 26, 983-992.

Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Robertson, H.A., Shelton, I.D., Waghorn, G., Green, R. 2002. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. Vet. Parasitol. 105, 229-245

National Institute of Standards and Technology, 2008. The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, PC Version 08, Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT.

Njoroge, S.M. Mungai, H.N., Koaze, H., Thi Lan Phi, N., Sawamura, M., 2006. Volatile Constituents of Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) Peel Oil from Burundi. J. Essent. Oil Res. ., 11, 33-34

Nozais J.P., 1998. Maladies parasitaires et péril fécal : les maladies dues aux helminthes. *Bull Soc Path Ex* 91: 416-422

O'connor, L.J., Walkden-Brown, S.W., Kahn, L.P. 2006. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. Vet. Parasitol. 142, 1-15.

Odebiyi, O.O., Sofowora, E.A., 1973. Antimicrobial alkaloids from a Nigerian chewing stick (*Fagara zanthoxyloides*). *Planta Med.* 36, 204-207.

Odebiyi, O.O., Sofowara, E.A., 1979. Antimicrobial alkaloids from a Nigerian chewing stick (*Fagara zanthoxyloides*). *Planta med.* 36, 9, 204.

Ogunlana O.E., Ogunlana, O.O., 2008. *In vitro* assessment of antioxidant activity of *Newbouldia laevis*. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2, 176-179,

Ogunlana, E.O., Ramstard, E., 1975. Investigations into the antibacterial activities of local plants *Planta Medica.* 72, 347-354

Ogwal-Okeng, J.W., Obua, C., Anokbonggo, W.W. 2003. Acute Toxicity. Effects of Methanolic Extract of *Fagara chalybeum* Root Bark. *African Health Sciences* 3, 124-126.

Olajide, O.A., Makinde, J.M., Okpako, D.T, Awe, S.O., 2000. Studies on the anti-inflammatory and related pharmacological properties of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark. *Journal of ethnopharmacology* 2000;71(1-2):153-60.

Olayemi, F.O., Azeez, I.O., Ogunyemi, A., Ighagbon, F.O. , 2009. Study on erythrocyte values of the Nigerian indigenous dog. *Folia Vet.*, 53: 65-67.

Olounladé, A.P., 2005. Effets anthelminthiques des feuilles de *Newbouldia laevis* testées *in vivo* sur les nématodes gastro-intestinaux (*Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis*) chez les moutons Djallonké. DEA , Université de Lomé, Lomé, Togo.

OMS, 1988. Importance des parasitoses intestinales en santé publique. Comité d'Experts. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la santé.* 66 :23-34

OMS, 1990. La situation pharmaceutique dans le monde. Genève, 20p

Organisation Mondiale de la Santé., 2002. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. WHO/EDM/TRM/2002, Genève, p.65.

Orav et al., 2001

Programme d'Action national d'Adaptation aux changements climatiques du Bénin (PANA-Bénin), 2008. Convention-cadre des nations unies sur les changements climatiques. Ministère de l'Environnement et de la Protection de la Nature (MEPN), 81p

Paolini, V., Dorchies, Ph., Athanasiadou, S., Hoste, H., 2002. Effets des tannins condensés et des plantes à tannins sur le parasitisme gastro-intestinal par les nematodes chez la chèvre. Renc. Ruminants. 9, 411-414.

Paolini, V., Dorchies, P., Hoste, H., 2003.: Effects of sainfoin hay on gastrointestinal 452 nematode infections in goats. Vet. Rec.152, 600-601

Paolini, V., Bergeaud, J.P., Griez, C., Prevot, F., Dorchies, Ph., Hoste, H., 2003. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. Veterinary Parasitol. 113, 253-261.

Paolini, V., Fouraste, I., Hoste, H., 2004. *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin on third-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. Parasitology 129, 69-77.

Paolini, V., De La Farge, F., Prevot, F., Dorchies, Ph., Hoste, H., 2005. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. Vet.Parasitol., **127**, 277-283.

Paris, R., Moyse Mignon, H., 1947 . Etude préliminaire du *Fagara Xanthoxyloïdes* Lam. Ann Pharma fr, 5, 410-420

Park, P.S., Lee, K.G., Shibamoto, T. 2003. Antioxidant activity and characterization of volatile constituents of Taheebo(*Tabebuia impetiginosa*).J Agric Food Chem. 51, 295-300

Pathak, N., Mittal, P.K., Singh, O.P., Sagar, V., Vasudevan, P., 2000. Larvicidal action of essential oils from plants against vector mosquitoes *Anopheles stephensi* (Liston); *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (Linnaeus). *Intnatl Pest Contr* 2000; 42(2): 53-5.

Penicaud, J.M., 2007. Comparaison de la réponse anticorps systémique des ovins barbados black belly et INRA 401 lors d'infestations expérimentales par *haemonchus contortus* (nématoda : trichostrongylidae). Thèse d'Etat de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse. 101p

Perrett, S., Whitfield, P.J., 1995. Atanine (3-dimethylallyl-4-methoxy-2-quinolone), an alkaloid with anthelmintic activity from the Chinese medicinal plant, *Evodia rutaecarpa*. Planta Med. 61, 276-278.

Perrot E, 1942-1944. Matières premières usuelles du règne vegetal. Edition Masson (Paris). Tome II, pp. 1138-1139

Pessoa, L.M., Morais, S.M., Bevilaque, C.M.L., Luciano, J.S.H., 2002. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn and eugenol against *Haemonchus contours*. Vet. Parasitol. 109, 59-63.

Pharmacopée européenne, 2011. 7.0-Tom1 (2.8.23) EDQM. Conseil de l'Europe Strasbourg, France.

Pharmacopée européenne. 2011. 7.0-Tom1 (2.8.14) EDQM. Conseil de l'Europe Strasbourg, France.

Plumlee, K.H., Johnson, B., Galey, F.D., 1998. Comparison of disease in calves dosed orally with oak or commercial tannic acid. J. Vet. Diagn. Invest. 10, 263-267.

Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G., 1986. The conversion of procyanidins and prodelfinidins to cyanidins and delphinidin. Phytochemistry. 25, 223-230.

Potterat, O., 1997. Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. Current Organic Chemistry 1, 415-440.

Pousset, J.L., 2002. Nouveaux médicaments: Savoir discerner le véritable progrès thérapeutique. Réseau Médicaments et Développement 26, pp. 11-13.

Rabel, B., McGregor, R., Dough, P.G.C., 1994. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintic on nematode larval migration. Int. J. Parasitol. 24, 671-676.

Rao, L.J.M., Srinivas, P., Gurudutt, K.N. 1999. Chemical composition of the volatile oil from garlic creeper (*Adenocalymma alliaceum*). J Med Aromat Plant Sci. 21: 987-989.

Reda, F., 1978. Distribution and accumulation of alkaloids in *Catharanthus roseus* G. Don during development. Pharmazie, 33, 233-234

Robert, N., 2006. Evaluation de l'infestation par les parasites gastro-intestinaux dans un élevage ovin. Mémoire de bachelier en Agronomie de la Haute Ecole de la Province de Namur-Catégorie agronomique

Roberts, M.F., Wink, M., 1998. Alkaloïds: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications. Plenum Press, New York.

Robinson, L.A.D., Williams, J.F., Lindo, S.I., Terry, F.R.C.P., Mansingh, A., 1990. Inactivation of *Strongyloides stercoralis* filariform larvae *in vitro* by six Jamaican plants extracts and tree commercial anthelmintic. West. Ind. Med. J., 39: 213 - 217.

Rotimi, V.O., Laughon, B.E., Bartlett, J.G., Mosadomi, H.A., 1988. Activities of Nigerian chewing stick extracts against *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides melaninogenicus*. *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy* 32, 598-600.

Roumy, V., 2007. Etude phytochimique de plantes amazoniennes d'activité antiplasmodiale, dont *Pseudoxandra cuspidata* Maas et *Tapirira guianensis* Aubl. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse III, Toulouse, France.

Salifou, S., 1996. Nématodes et nématodose du tube digestif des petits ruminants du Sud Bénin : Taxonomie, Epidémiologie et les facteurs de variation. Thèse de doctorat de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal, p.162.

Schaufelberger, D., Hostettmann, K., 1982. On the molluscicidal activity of tannin containing plants. *Planta Medica* 48, 105-107.

Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91, 21-40.

Setzer, W.N., Noletto, J.A., Lawton, R.O., Haber, W.A., 2005. Leaf essential oil composition of five *Zanthoxylum* species from Monteverde, Costa Rica. *Mol Divers.* 9, 3-13.

Sidi Boulenouar et Ziane, 2003

Silvestre, A., Leignel, V., Berrag, B., Gasnier, N., Humbert, J.F., Chartier, C., Cabaret, J., 2002. Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. *Veterinary Research* 33, 465-480.

Smith, M.C., Sherman, D.M., 1994. *Goat Medecine*. Lea & Febiger, Baltimore, USA , p 825.

Sofowara, A., 1993. *Medicinal plants and Traditional medicine in Africa*. Spectrum Books Ltd, Ibadan, Nigeria, p. 289.

Sofowara, E.A., Isaacs, W.A., 1971. Reversal of sickling and crenation in erythrocytes by the root extract of *Fagara zanthoxyloides*. *Lloydia*, 34, 383.

Sofowara, E.A., Isaacs-Sodeye, W.A., Ogunkoya, L.O., 1975. Isolation and characterization of an antisickling agent from *Fagara xanthoxyloides* root. *Lloydia* 38, 169.

Souza (de), S., 1988. Flore du Bénin (Tome 3). Noms des plantes dans les langues nationales béninoises. Revue réalisée sous les Presse de l'imprimerie. Notre Dame - Cotonou 424 p.

Spear, R.K., 1989. Military Physical and Psychological Conditioning: Comparisons of Four Physical Training Systems. Journal of the International Council for Health, Physical Education and Recreation. 25: 30-32.

Stace, 1965. Cuticular Studies as an aid to Plant Taxonomy. Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.) Bot. 4, 1-78.

Steenis, C.G.G.J., 1948. Flora malesiana.

Taiwo, O., Xu, H.X., Lee, S.F. 1999. Antibacterial activities of extracts from Nigerian chewing sticks. Phytother Res. 13, 675-679.

Tanko, Y., Kamba, B., Saleh, M.I.A., Musa, K.Y., Mohammed, A., 2008. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic flower extract of *Newbouldia laevis* in mice and rats. International Journal of Applied Research in Natural Products. 1, 13-19.

Taveira, F.S.N., Andrade, E. H. A., Lima, W.N., Maia, J.G.S., 2003. Seasonal variation in the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. Annals of the Brazilian Academy of Sciences 75, 27-31.

Terrill, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.B., Barry, T.N., 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein meals and cereal grains. Journal of the Science of Food and Agriculture. 58, 321-329.

Todorova, A., Vonderheid-Guth Dimpfel, B., W., 2001. Effects of tolterodine, trospium chloride, and oxybutynin on the central nervous system J Clin Pharmacol. 41 : 636-644

Tor-Anyiin, T.A., Shaato, R., Oluma, H.O.A., 2003. Ethnobotanical survey of Antimalarial medicinal plants amongst the Tiv People of Nigeria. J Herbs Spices Med Plants. 10, 61-74.

Tra-Bi, F.H., 1997. Utilisation des plantes par l'homme, dans les forêts classées du Haut-Sassandra et de Scio, en Côte-d'Ivoire. Thèse de 3^{ème} Cycle, Université de Cocody, Abidjan, p. 215.

Trajman, A., MacDonald T.T., Elia, C.C., 1997. Intestinal immune cells in *Strongyloides stercoralis* infection. J Clin Pathol. 50: 991-995

Trease, G.E., Evans, W.C., 2002. Pharmacognosy, 15th Ed. Saunders Publishers. Ltd., London. pp. 42-393.

Tringali, C., Carmela, C., Valeria, C.V., Simmonds M.S.J., 2001. Antifeedant constituents from *Fagara macrophylla*. Fitoterapia. 72 : 538-543.

Turrill, W.B. et al., 1952. Flora of tropical East Africa. In fascicles. Crown Agents, London, 377p

Udonsi, J.K., Behnke, J.M., Gilbert, F.S., 1996. Analysis of the prevalence of infection and associatious between human gastrointestinal nematodes among différent age classes living in the urban and suburban communities of part Harcourt, Nigeria. J Helminthol. 70 : 75-84.

Ulrichova, J., Walterova, D., Preininger, V., Slavik, J., Lenfeld, J., Cushman, M., Simanek, V., 1983. Isoaltion, chemistry and biology of alkaloids from plants of the Papaveraceae. Inhibition of acetylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. Planta Med. 48: 111-115.

Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W. 1996. Veterinary Parasitology, Blackwell, 2nd ed., Oxford, pp. 10-26.

Usman, H., Yaro, A.H., Garba, M.M., 2008. Phytochemical and anticonvulsant screening of the Ethanolic flower extracts of *Newbouldia laevis* (Bignoniaceae) in Mice. Journal of Pharmacology and Toxicology. 3, 127-133.

Utsunomiya, 2003

Viney, M.E., Ashford, R.W., 1990. The use of isoenzyme electrophoresis in the taxonomy of strongyloidiasis. Ann Trop Med Parasitol. 84: 35-47

Wagner, H., Bladt, S., 1996. Plant Drug Analysis . A Thin layer chromatography Atlas. 2nd edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg London, New York, pp.349-354

Waller, P.J., 2006. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. An. Feed Sci. Technol. 126, 277-289.

Weins, C., Jork, H., 1996. Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography. Journal of Chromatography A. 750, 403-407.

Willcox, M., Bodeker, G., Rasoanaivo, Ph., 2004. Traditional Medicinal Plants and Malaria. CRC Press, Boca Raton, pp. 261-262.

Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R.K., Von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N.C., 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol.* 20, 469-476.

Zaha, O., Hirata, T., Kinjo, F., Saito, A., 2000. Strongyloidiasis: progress in diagnosis and treatment. *Intern Med*; 39: 695-700

Zepemick, B., Timler, F.K., 1981. *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepemick & Timler comb. nova (Rutaceae). *Willdenowia.* 11, 361-362.

Zhu, J., Filippich, L.J., Al Salam, M., 1992. Tannic acid intoxication in sheep and mice. *Res. Vet. Sci.* 53, 280-292.

ANNEXES

ANNEXE 1: Certification des la plante de *N. laevis*

Abomey - Calavi le, 11 Septembre 2007

CERTIFICAT D'IDENTIFICATION

Le Responsable de l'Herbier National du Bénin, soussigné, certifie que la plante récoltée par Messieurs OLOUNLADE A. Pascal et AZANDO V. Eric, des Laboratoires de Zootechnie/FSA/UAC et de Pharmacognosie et Huiles essentielles/FAST/UAC, dans le cadre de leurs travaux de recherche est identifiée sous :

Numéro : AA 6302 / HNB
Nom scientifique : *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seemann ex Bureau
Famille : Bignoniaceae

En foi de quoi, le présent certificat leur est délivré pour servir et valoir ce que de droit.

Le Responsable,

Professeur Akpovi AKOEGNINO.-



Université d'Abomey-Calavi, Faculté des Sciences et Techniques
Département de Biologie Végétale 01 B.P. 4521 Cotonou (Rép. du Bénin)
Tél. (229) 36 00 74 / 36 01 26 poste 333 • Fax (229) 30 - 55 - 50

ANNEXE 2: Certification de la plante de *Z. zanthoxyloides*

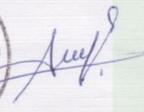
Abomey - Calavi le, 11 Septembre 2007

CERTIFICAT D'IDENTIFICATION

Le Responsable de l'Herbier National du Bénin, soussigné, certifie que la plante récoltée par Messieurs OLOUNLADE A. Pascal et AZANDO V. Eric, des Laboratoires de Zootechnie/FSA/UAC et de Pharmacognosie et Huiles essentielles/FAST/UAC, dans le cadre de leurs travaux de recherche est identifiée sous :

Numéro : AA 6301 / HNB
Nom scientifique : *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick & Timler
Famille : Rutaceae

En foi de quoi, le présent certificat leur est délivré pour servir et valoir ce que de droit.

Le Responsable,


Professeur Akpovi AKOEGNINOU.-

Université d'Abomey-Calavi, Faculté des Sciences et Techniques
Département de Biologie Végétale 01 B.P. 4521 Cotonou (Rép. du Bénin)
Tél. (229) 36 00 74 / 36 01 26 poste 333 • Fax (229) 30 - 55 - 50