

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix - Travail - Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET

PHYSIOLOGIE ANIMALES

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE

ANIMALE



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace - Work - Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF ANIMAL

BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATORY OF ANIMAL

PHYSIOLOGY

Activités antispasmodiques, antidiarrhéiques et antimicrobiennes de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *Pittosporum mannii* Hook. f. (Pittosporaceae)

THESE

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

Par : **NJIAZA Joseph**
D.E.A en Physiologie Animale

Sous la direction de
DIMO Théophile
Professeur, Université de Yaoundé I;
KAMTCHOUING Pierre
Professeur, Université de Yaoundé I;

Année Académique : 2017 - 2018





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

ATTESTATION DE CORRECTION DE THESE DE DOCTORAT/Ph.D

Nous soussignés, membres du jury de la soutenance de thèse de Doctorat/Ph.D de Monsieur **NJIAZA Joseph**, Matricule **90W347**, soutenance autorisée par la correspondance N° 18-197/UYI/VREPDTIC/DAAC/DEPE/SPD/CB-Ebo de Monsieur le Recteur de l'Université Yaoundé I en date du 25 avril 2018, attestons que les corrections exigées au candidat lors de cette évaluation faite le 02 mai 2018 ont été réellement effectuées et que le présent document peut être déposé sous sa forme actuelle.

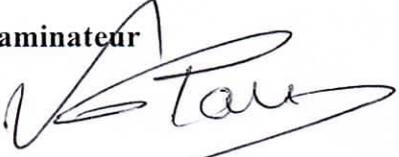
En foi de quoi la présente attestation lui est établie et délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Yaoundé le **12 JUN 2018**

Président du Jury


NJAMEN Dieudonné

Examineur


TAN Paul Vernyuy

Chef de Département



**Charles Felix
BILONG BILONG
PROFESSEUR**

BILONG BILONG Charles Felix

LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DES SCIENCES

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

ANNEE ACADEMIQUE: 2017/2018
 (Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION: 25 Avril 2018

ADMINISTRATION

DOYEN : AWONO ONANA, Professeur

VICE-DOYEN / DPSAA : DONGO Etienne, Professeur

VICE-DOYEN / DSSE : OBEN Julius ENYONG, Professeur

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

Chef Division Affaires Académiques, Scolarité et Recherche : ABOSSOLO Monique,
 Maître de Conférences

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

1- DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (40)			
N°	NOMS ET PRENOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
2	BENG née NINTCHOM PENLAP V.	Professeur	En poste
3	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
4	MBACHAM Wilfried Fon	Professeur	En poste
5	OBEN Julius ENYONG	Professeur	Vice-Doyen (DSSE)
6	ATOGHO Barbara Mma Epse TIEDEU	Maître de Conférences	En poste
7	BELINGA née NDOYE FOE Marie C. Florentine	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
8	BIGOGA DIAGA Jude	Maître de Conférences	En poste
9	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
10	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
11	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste
12	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
13	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
14	NGUEFACK Julienne Epse KENFACK	Maître de Conférences	En poste
15	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste

16	WAKAM née NANA Louise	Maître de Conférences	En poste
17	ACHU Merci BIH Epse LOH	Chargé de Cours	En poste
18	AZANTSA Boris	Chargé de Cours	En poste
19	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie Epse EBOUMBOU	Chargé de Cours	En poste
20	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
21	DEMMANO Gustave	Chargé de Cours	En poste
22	DJOKAM TAMO Rosine Epse DADJEU	Chargé de Cours	En poste
23	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Chargé de Cours	En poste
24	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane épse APOUA MONDI	Chargé de Cours	En poste
25	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargé de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	KOTUE TAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	MBONG ANGIE MOUGANDE Mary Ann	Chargé de Cours	En poste
31	MOFOR née TEUGWA Clautilde	Chargé de Cours	<i>IA4/MINESUP</i>
32	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
33	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargé de Cours	En poste
34	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
35	LUNGA Paul KAILAH	Chargé de Cours	En poste
36	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargé de Cours	En poste
37	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
38	BEBEE FADIMATOU	Assistant	En poste
39	MBOUCHE FANMOE Marcelline Joëlle	Assistant	En poste
40	TIENTCHEU DJOKAM Léopold	Assistant	En poste

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

1	BILONG BILONG Charles Félix	Professeur	Chef de Département
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	DJIETO Lordon Champlain	Professeur	En poste
4	ESSOMBA née NTSAMA MBALLA	Professeur	<i>VDRC/Chef dépt FMSB</i>
5	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
6	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul Vernyuy	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis	Professeur	<i>Coord. Progr. MINSANTE</i>
13	AJEAGAH Gidéon AGHAINDOUM	Maître de Conférences	<i>Chef Serv. /Diplomation FS</i>
14	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
15	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	En poste
16	KAMGANG René	Maître de Conférences	<i>C.E. MINRESI</i>
17	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
18	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
19	MONY NTONE Ruth	Maître de Conférences	En poste
20	TOMBI Jeannette Epse BOLL	Maître de Conférences	En poste
21	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste

22	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. /MINSUP</i>
23	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
24	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
25	BILANDA Danielle Claude	Chargé de Cours	En poste
26	DJIOGUE Séfirin	Chargé de Cours	En poste
27	GOUNOUE KAMKUMO Raceline Epse FOTSING	Chargé de Cours	En poste
28	JATSA MEGAPTCHE Hermine	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
29	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
30	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
31	METCHI DONGFACK Mireille Flore	Chargé de Cours	En poste
32	MOUGANG NGAMENI Luciane	Chargé de Cours	En poste
33	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
34	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargé de Cours	En poste
35	LEKEUFACK FOLEFACK Guy Benoît	Chargé de Cours	En poste
36	NGOuateu KENFACK Omer BEBE	Chargé de Cours	En poste
37	NGUEGUIM TSOFACK Florence	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOCK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse YAFI	Chargé de Cours	En poste
40	TADU Zéphirin	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste
42	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
43	KANDEDA KAVAYE Antoine	Assistant	En poste
44	KOGA MANG'Dobara	Assistant	En poste

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

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

21	ONANA Jean Michel	Chargé de Cours	En poste
22	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste
23	TSOATA Esaïe	Chargé de Cours	En poste
24	DJEUANI Astride Carole	Assistant	En poste
25	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Assistant	En poste
26	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistant	En poste
27	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Assistant	En poste

4-DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (35)

1	NDIFON Peter TEKE	Professeur	Chef de Département
2	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice-Recteur/ Ubda</i>
3	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Directeur Cabinet PM</i>
5	LAMINSI Samuel	Professeur	En poste
6	MELO née CHINJE Uphie F.	Professeur	<i>Recteur/UN</i>
7	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Doyen/ UD</i>
10	BABALE DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	En poste
11	DJOUFAC WOUFMO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEGNE MBOUGUEM Jean Claude	Maître de Conférences	En poste
13	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
14	NDIKONTAR Maurice KOR	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen/Ubda</i>
15	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	<i>Recteur /UB</i>
16	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
17	NJIOMOU Chantale épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
19	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	En poste
20	CHEUMANI YONA Arnaud	Chargé de Cours	En poste
21	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
22	GWET Simon – Pierre	Chargé de Cours	En poste
23	KAMGANG YOUBI Georges	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO Gustave	Chargé de Cours	En poste
25	KOUOTOU DAOUA	Chargé de Cours	En poste
26	MAKON Thomas Beauregar	Chargé de Cours	En poste
27	MBEY Jean Aimé	Chargé de Cours	En poste
28	NDI Julius NSAMI	Chargé de Cours	En poste
29	NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargé de Cours	En poste
30	NJOYA Dayirou	Chargé de Cours	En poste
31	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargé de Cours	En poste
32	PABOUDAM GBAMBIE Awaou	Chargé de Cours	En poste
33	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
34	NCHIMI NONO Katia	Assistant	En poste

5-DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (33)

1	NKENGFACK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département
2	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/ DPSSA

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

6-DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (26)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	Chef de Département <i>Chef Division MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel	Professeur	<i>IGA-MINESUP/Chef Dpt ENS</i>
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	AMINOUE Halilou	Chargé de Cours	En poste
5	CHEDOM FOTSO Donatien	Chargé de Cours	En poste
6	DJAM Xaviera Youth KIMBI	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM Etienne Appolin	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste

10	TAPAMO KENFACK Hyppolite Michel	Chargé de Cours	En poste
11	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
12	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
13	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
14	ABESSOLO ALO'O Gislain	Assistant	En poste
15	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
16	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
17	EBELE Serge Alain	Assistant	En poste
18	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
19	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistant	En poste
20	KAMGUEU Patrick Olivier	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE S. Fritz Oswald	Assistant	En poste
23	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistant	En poste
24	MONTHE DJIADEU Valery Martial	Assistant	En poste
25	NKONDOCK MI BAHANACK Nicolas	Assistant	En poste
26	OLE OLE David Claude	Assistant	En poste

7-DEPARTEMENT DE MATHEMATIQUES (MA) (30)

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

28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
29	NIMPA PEFOUKEU Romain	Assistant	En poste
30	TANG AHANDA Barnabé	Assistant	<i>Chef Serv. MINPLAMAT</i>
8-DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MB) (13)			
1	ETOA François-Xavier	Professeur	Recteur UDO/Chef de Département
2	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Division recherche IMPM</i>
3	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	ENO Anna Arey	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain Gabriel	Chargé de Cours	En poste
11	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargé de Cours	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
9-DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PH) (41)			
1	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
2	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
3	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
4	NJOMO Donatien	Professeur	En poste
5	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen/Ubda</i>
6	WOAFO Paul	Professeur	En poste
7	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
8	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
9	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>Dir.Gén. B. MEKIM</i>
10	BEN- BOLIE Germain Hubert	Maître de Conférences	En poste
11	DJUIDJE KENMOE Gemaine épouse ALOYEM KAZE	Maître de Conférences	En poste
12	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Dépt UN</i>
13	EYEBE FOU DA Jean Sire Armand	Maître de Conférences	En poste
14	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
15	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
16	MBANE BIOUELE Cesar	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
17	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
18	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Maître de Conférences	<i>Chef Serv. MINRESI</i>
19	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
20	OUMAROU BOUBA	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
21	SAIDOU	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
22	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
23	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
24	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
25	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En Poste

26	BODO Bernard	Chargé de Cours	En poste
27	ENYEGUE A NYAM Françoise épouse BELINGA	Chargé de Cours	En poste
28	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
29	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINADER</i>
30	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En Poste
31	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
32	MVOGO Alain	Chargé de Cours	En Poste
33	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	OBOUNOU AKONG Marcel Brice	Chargé de Cours	<i>Dir.acad/Univ.Int.Etat Cam-Congo</i>
35	TABI Conrad Bertrand	Chargé de Cours	En poste
36	TCHOFFO Fidèle	Chargé de Cours	En poste
37	VONDOU DERBETINI Appolinaire	Chargé de Cours	En Poste
38	WAKATA née BEYA Annie Sylvie	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. MINESUP</i>
39	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste
40	CHAMANI Roméo	Assistant	En Poste
41	MEL'I Jorelle Larissa	Assistant	En Poste

10- DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (42)

1	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	Chef de Department
2	MEDJO EKO Robert	Professeur	Conseiller Technique/UYII
3	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
4	BITOM Dieudonné Lucien	Professeur	Doyen FASA/ U D
5	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	Chef DAASR FS/UYI
6	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Maître de Conférences	En poste
7	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>Chef de Dépt IMIP/Maroua</i>
8	KAMGANG Pierre	Maître de Conférences	En poste
9	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINMIDT</i>
10	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
11	NGOS III Simon	Maître de Conférences	<i>D.A.A.C./UM</i>
12	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
13	NKOUMBOU Charles	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
17	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef de Divi/ MINTP</i>
18	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG ART</i>
19	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
20	BISSO Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Dir.Projet Barage Memve'ele</i>
21	EKOMANE Emile	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
22	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
23	EYONG John TAKEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
24	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Serv D'ETAT /MINMIDT</i>
25	GANNO Sylvestre	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
26	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
27	MBIDA YEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>

28	METANG Victor	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
29	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Chef de Dépt IMIP/Maroua</i>
30	MOUAFU Lucas	Chargé de Cours	En poste
31	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
32	NGO BIDJECK Louise Marie Epse BONDJE	Chargé de Cours	En poste
33	NGUEUTCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	CEA MINRESI
34	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
35	NYECK Bruno	Chargé de Cours	En poste
36	SABABA Elisé	Chargé de Cours	En Poste
37	TCHAKOUNTE Jacqueline ép. NUMBEM	Chargé de cours	<i>CEA MINRESI</i>
38	TCHAPTCHET TCHATO De Pesquidoux I	Chargé de Cours	En poste
39	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
41	ANABA ONANA Achille Basile	Assistant	<i>En Poste</i>
42	BINELI BETSI Thierry Olivier	Assistant	<i>En Poste</i>

**Répartition chiffrée des enseignants permanents par Département
(25 Avril 2018)**

Département	Nombre d'enseignants				
	Pr	MC	CC	ASS	Total
BC	05 (1)	11 (4)	20 (10)	03 (2)	39 (17)
BPA	11 (1)	09 (3)	20 (8)	03 (0)	44 (12)
BPV	04 (0)	09 (2)	10 (3)	04 (4)	27 (9)
CI	09 (1)	8 (1)	16 (2)	1 (1)	34 (5)
CO	9 (0)	13 (3)	10 (3)	1 (0)	33 (6)
IN	2 (0)	1 (0)	10 (0)	13 (2)	26 (2)
MA	3 (0)	4 (0)	19 (1)	4 (0)	30 (1)
MB	2 (0)	5 (1)	6 (2)	0 (0)	13 (3)
PH	8 (0)	16 (1)	15 (3)	2 (1)	41 (5)
ST	4 (0)	14 (2)	22 (3)	2 (0)	42 (5)
Total	57 (3)	90 (17)	146 (36)	42 (10)	342 (65)

Soit un total de : 342 (65) dont

- Professeurs 59 (3)
- Maîtres de Conférences 89 (17)
- Chargés de Cours 145 (35)
- Assistants 42 (10)

- () = Nombre de femmes.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

AWONO ONANA

DEDICACE

Je dédie cette thèse à ma maman Tiyong Thérèse, mon épouse Diffouo Anou Solange et mes enfants, pour leur amour inconditionnel et leurs multiples sacrifices.

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail a nécessité la participation et le concours de certaines personnes à qui je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements:

Au Professeur DIMO Théophile, je vous exprime ma reconnaissance pour avoir accepté mon encadrement pour ce projet de recherche. Vos directives, le suivi permanent des travaux et votre grande expertise et rigueur scientifiques ont permis de donner une orientation et de la qualité à ce travail. Le matériel et les produits que vous avez gracieusement mis à notre disposition pour les manipulations, votre ingéniosité et votre entière disponibilité ont été déterminants. Merci enfin pour vos grandes qualités humaines, votre patience et vos encouragements permanents pour l'achèvement de ce travail qui a dû prendre plus de temps.

Au Professeur KAMTCHOUING Pierre, je vous exprime toute ma reconnaissance pour avoir accepté de m'encadrer pour ce projet de recherche. Votre expertise et rigueur scientifiques, votre suivi permanent et vos remarques pertinentes ont été déterminants dans la réalisation de ce travail. Votre engagement personnel pour équiper le Laboratoire de Physiologie Animale en matériels et produits divers nous a doté d'un cadre adéquat de recherche pour mener ces travaux. Merci pour votre entière disponibilité, votre générosité, vos multiples conseils et encouragements qui permis l'achèvement de ce travail.

Au Professeur NGUELEFACK Télesphore Benoît de l'Université de Dschang, je voudrais exprimer toute ma gratitude pour toute l'expertise scientifique apportée dans ce travail. Vos multiples observations et suggestions pertinentes lors de nos différents échanges ont largement contribué à l'amélioration de la qualité de ce travail. Merci également pour tous les produits chimiques gracieusement mis à notre disposition, vos grandes qualités humaines et vos encouragements.

Au Professeur DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré, j'exprime ma reconnaissance pour l'appui matériel et scientifique apporté dans la réalisation de plusieurs aspects de ce travail (études histologiques, amendements des publications, observations des manipulations). Merci pour votre disponibilité, vos encouragements et multiples conseils pour ce travail.

Au Professeur NOLA Moïse, je voudrais exprimer toute ma gratitude pour l'appui matériel que vous avez apporté dans la réalisation de certains aspects de ce travail (balance sensible pour faire les pesées, l'eau distillée pour préparer les solutions et les milieux physiologiques). De plus, l'équipement technique de votre laboratoire a servi à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de notre extrait. Merci pour votre générosité et votre humanisme.

Au Professeur BILONG BILONG Charles Felix, Chef de Département de BPA, je voudrais vous exprimer ma gratitude pour votre disponibilité, votre diligence et votre appui technique au laboratoire de Physiologie Animale dans la réalisation des travaux de recherche.

Au Professeur KENGNE NOUMSI Ives Magloire du Laboratoire de Physiologie Végétale, je voudrais vous exprimer ma gratitude pour l'appui technique (balances simple et micrométrique) que vous avez apporté dans nos manipulations, ainsi que vos encouragements.

Au Professeur NANSEU Charles Péguy du Laboratoire de Chimie Inorganique, je voudrais exprimer toute ma gratitude pour l'appui technique (balance micrométrique, produits chimiques), les encouragements incessants et toute l'attention que vous avez toujours montrée pour l'accomplissement de ce travail.

Au Professeur MOUNDIPA FEWOU Paul, Chef de Département de Biochimie, j'exprime ma gratitude pour l'appui technique (balances, pH mètre, centrifugeuse) apporté par votre laboratoire dans la réalisation de ce travail.

Au Docteur NGO LEMBA TOM Esther, merci de m'avoir suivi dès le début des travaux pour l'initiation à l'utilisation de l'appareillage d'enregistrement de l'activité contractile, la documentation produite pour l'amendement des protocoles de manipulations et les différentes substances de référence que vous avez mises à notre disposition. Recevez ici toute ma gratitude pour votre entière disponibilité, votre diligence dans la correction des documents et vos encouragements tout au long de ce travail, ainsi que vos qualités humaines.

Aux Docteurs NGUEGUIM TSOFAK Florence, JATSA MEGAPTCHE Hermine, GOUNOUE Raceline, DJIOGUE Séfirin, ATSAMO Albert Donatien, NGOUATEU KENFACK Omer Bebe, BILANDA Danielle Claude, je dis merci pour les échanges enrichissants, la franche collaboration et les observations que vous avez portées sur ce travail.

A tous les autres enseignants du Département de BPA sans distinction, merci pour vos multiples contributions à ma formation académique. J'exprime ma reconnaissance pour avoir bénéficié de vos conseils, vos compétences, vos connaissances et votre appui multiforme.

A M. PANGUI Daniel, tradithérapeute à Balessing, je dis merci pour m'avoir proposé cette plante médicinale et les efforts que vous avez toujours consentis pour la récolter chaque fois que le besoin se présentait.

A M. ZOKO Jean Marie, infirmier au CHU, je dis merci pour les encouragements et le secours que vous m'avez toujours portés dans les différents moments. Merci également à votre collègue de service, M. FOFU Samuel, qui nous a permis d'acquérir le naloxone qui a été largement utilisé dans le laboratoire pour explorer des mécanismes physiopathologiques.

A tous les camarades du laboratoire, anciens et cadets, je tiens à les remercier pour leur esprit de solidarité, de fraternité et de partage d'expériences, leur franche collaboration et leurs réflexions scientifiques qui m'ont permis ces dernières années de réaliser finalement et mener à bout ces travaux. Je pense aux Docteurs ABOUBAKAR OUMAROU Bibi-Farouck, DJIMELI LONTSI Chretien, TEMDIE Roméo Joël, BEPPE GARBA Jean, MENGUE NGADENA Sandrine, BELLA NDZANA Martin Thierry, METCHI Mireille, KAMENI Mireille, ATSANG A KIKI Giselle, KADA SANDA Antoine, TSAGUE Marthe, ZINTCHEM Roger, aux doctorants KEUGNI Armand Brice, KANDEDA Antoine, FANKEM Gaetan, OUAFO Carole, OBAMA Pierre, TABI KOULOU Thierry, TOMBE TOMBE Simplicite, TCHOPOU Huguette, FOUA BEKONO Yannick, AMFOUO Yannick, MBOLANG Loic, MENANGA Joseph, WENDJA Monique et tous les cadets des dernières promotions de Master. Recevez ici ma gratitude pour vos contributions multiformes.

A toute ma famille qui m'a toujours soutenu dans mes choix et mes projets, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance. Merci à ma maman pour tout, à mes mamans et papas, mes sœurs et frères pour votre soutien et votre amour inconditionnel. Que chacun de vous trouve en ce travail le fruit de ses efforts et de son attention pour moi. Je dis merci infiniment à Maman Djimi pour tout le soutien véritable qu'elle m'a porté pendant toutes ces années.

A tous mes amis qui ont toujours été présents auprès de moi dans les différentes circonstances, je vous dis merci pour l'amour sincère et le secours que vous m'avez portés.

SOMMAIRE

LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DES SCIENCES.....	i
DEDICACE	x
REMERCIEMENTS	xi
SOMMAIRE	xiv
LISTE DES FIGURES	xvii
LISTE DES TABLEAUX	xx
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xxi
RESUME	xxiii
ABSTRACT.....	xxv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE.....	5
I.1- Système digestif: organisation générale et fonctionnement	5
I.1.1- Organisation générale de l'appareil digestif.....	5
I.1.2- Structure histologique du tube digestif.....	6
I.1.3- Fonctions essentielles de l'appareil digestif	7
I.2- Sécrétions et absorption intestinales	8
I.2.1- Pancréas et sécrétion du suc pancréatique.....	8
I.2.2- Foie et sécrétion de la bile	9
I.2.3- Sécrétion du suc intestinal	9
I.3- Motricité gastro-intestinale.....	14
I.3.1- Fonctions motrices de l'estomac.....	14
I.3.2- Motricité de l'intestin grêle	15
I.3.3- Fonctions motrices du gros intestin	17
I.4- Mécanismes de la régulation de la motricité et des sécrétions gastro-intestinales	17
I.4.1- Rôle du système nerveux intrinsèque dans le contrôle de la motricité digestive et des sécrétions	18
I.4.2- Commande du système nerveux autonome sur la motricité digestive et les sécrétions	20
I.4.3- Rôles des hormones sur la motricité et des sécrétions gastro-intestinales	22
I.5- Activité contractile autonome du muscle lisse gastro-intestinal.....	23

I.5.1- Base électrique de l'activité contractile du muscle lisse gastro-intestinal	23
I.5.2- Origine de l'activité contractile autonome du muscle lisse gastro-intestinal	25
I.6- Contraction/relaxation du muscle lisse gastro-intestinal	27
I.6.1- Caractères morphologiques, structuraux et fonctionnels des cellules musculaires lisses gastro-intestinales	27
I.6.2.-Mécanisme moléculaire de la contraction du muscle lisse gastro-intestinal: couplage excitation-contraction	29
I.7 -Mécanismes de régulation de la contraction/relaxation de la cellule musculaire lisse gastro-intestinale	30
I.7.1- Canaux ioniques participant à l'activation de la contraction et de la relaxation du muscle lisse gastro-intestinal	32
I.7.2-Voies de signalisation intracellulaire participant à l'activation de la contraction et de la relaxation du muscle lisse gastro-intestinal	35
I.7.3- Quelques récepteurs membranaires impliqués dans l'activation de la contraction et de la relaxation du muscle lisse gastro-intestinal	39
I.8- Données sur les diarrhées	42
I.8.1-Définition et classification.....	42
I.8.2- Causes ou étiologie	43
I.8.3-Mécanismes physiopathologiques	45
I.8.4-Approches thérapeutiques des diarrhées	47
I.9- Toxicité.....	52
I.9.1-Définition et intérêt.....	52
I.9.2-Types de toxicité.....	52
I.10- Données sur <i>Pittosporum manni</i>	55
I.10.1-Position systématique	55
I.10.2- Description botanique	55
I.10.3- Distribution géographique et écologie	56
I.10.4-Données ethnopharmacologiques	56
I.10.5.-Données pharmacologiques et phytochimiques.....	57
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES	58
II.1-MATERIEL BIOLOGIQUE	58
II.1.1-Animaux d'expérimentation.....	58
II.1.2. Microorganismes.....	58
II.1.3 -Matériel végétal.....	58
II.2-METHODES	59

II.2.1-Préparation de l'extrait aqueux des écorces du tronc de <i>Pittosporum mannii</i>	59
II.2.2-Préparation des substances pharmacologiques et liquides physiologiques.....	59
II.2.3-Analyse phytochimique de l'extrait aqueux des écorces de <i>Pittosporum mannii</i> ...	62
II.2.4-Evaluation des effets de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> sur l'activité contractile de l'intestin de rat	65
II.2.5-Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité antidiarrhéique de l'extrait	74
II.2.6-Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antimicrobienne de l'extrait	77
II.2.7-Evaluation de la toxicité de l'extrait aqueux des écorces du tronc de <i>Pittosporum mannii</i> chez le rat	80
II.2.8-Dosage des paramètres biochimiques sériques et tissulaires	82
II.2.9-Analyses histologiques.....	91
II.2.10-Analyse statistique de résultats.....	94
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION	95
III.1- RESULTATS	95
III.1.1-Composition phytochimique de l'extrait aqueux de <i>Pittosporum mannii</i>	95
III.1.2-Effets de l'extrait aqueux de <i>Pittosporum mannii</i> sur l'activité contractile spontanée du duodénum de rat.....	95
III.1.3-Effets de l'extrait sur l'activité contractile induite par quelques agents spasmogènes sur le duodénum de rat	111
III.1.4-Activité antidiarrhéique de l'extrait.....	126
III.1.5-Activité antimicrobienne de l'extrait	130
III.1.6 -Toxicité de l'extrait aqueux des écorces de <i>Pittosporum mannii</i> chez le rat.....	131
III.2- DISCUSSION	141
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	159
REFERENCES.....	161
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	190
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Organisation générale de l'appareil digestif de l'homme (Marieb, 1999).....	5
Figure 2: Coupe transversale montrant la structure histologique du tube digestif ().....	6
Figure 3: Relations anatomiques du pancréas (a) et structure d'un acinus pancréatique (b) (Marieb, 1999)	8
Figure 4: Le lobule hépatique (a) et un espace porte hépatique (b) (Marieb, 1999, Frank et Netter, 2003)	9
Figure 5: Structure cellulaire des glandes (a) et des villosités intestinales (b) (Scanlon et Sanders, 2007).....	10
Figure 6: Les différents types de cellules de l'épithélium intestinal (Crosnier <i>et al.</i> , 2006)....	10
Figure 7: Mécanismes de la sécrétion de l'eau et d'électrolytes dans l'intestin grêle (Franck et Netter, 2003)	12
Figure 8: Mécanismes de l'absorption de l'eau, des électrolytes et du glucose dans l'intestin grêle (Guyton et Hall, 2006)	14
Figure 9: Mouvements de segmentation de l'intestin grêle (Sherwood, 2006; Guyton, 2006)	16
Figure 10: Organisation du système nerveux entérique dans le tractus gastro-intestinal (a) et son rôle dans le réflexe péristaltique (b) (Guyton et Hall, 2006; Beaugerie et Sokol, 2014).....	19
Figure 11: Anatomie générale du système nerveux autonome montrant l'innervation des organes digestifs (Beaugerie et Sokol, 2014)	21
Figure 12: Réponses électriques de la cellule musculaire lisse gastro-intestinale (Guyton et Hall, 2006)	24
Figure 13: Localisation et relations anatomiques des ICC (Bernex, 2006).....	26
Figure 14: ICC et régulation de l'activité contractile du muscle lisse intestinal (Mader, 2004)	27
Figure 15: Quelques aspects morphologiques et structuraux des cellules musculaires lisses gastro-intestinales (Fattoum, 1997).....	29
Figure 16: Mécanisme moléculaire de la contraction/relaxation des cellules de muscles lisses (Fattoum, 1997).....	30
Figure 17: Quelques mécanismes de régulation de la contraction/relaxation de la cellule de muscle lisse intestinal (Ohama <i>et al.</i> , 2007)	32
Figure 18: Les cibles moléculaires de la PKA et PKG au cours de la relaxation du muscle lisse (Youbare, 2010).....	38
Figure 19: Mécanismes moléculaires de la relaxation des muscles lisses régulés par le GMP cyclique (Youbare, 2010)	38
Figure 20: Morphologie de <i>Pittosporum mannii</i> (photo de Coates Palgrave).....	55
Figure 21: Protocole de préparation de l'extrait aqueux des écorces du tronc de <i>P. mannii</i>	59

Figure 22: Courbe d'étalonnage pour la détermination de la teneur en polyphénols de l'extrait aqueux des écorces de <i>Pittosporum mannii</i>	65
Figure 23: Dispositif d'enregistrement de l'activité contractile des fragments de l'intestin....	66
Figure 24: Étapes de la préparation de la suspension microbienne à partir d'une culture cellulaire (Djimeli <i>et al.</i> , 2016).....	78
Figure 25: Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines	83
Figure 26: Courbe d'étalonnage pour le dosage des nitrites.....	85
Figure 27: Tracés originaux illustrant les effets de différentes concentrations de l'extrait aqueux des écorces de <i>P. mannii</i> sur les contractions spontanées du duodénum de rat..	96
Figure 28: Effets des concentrations uniques de l'extrait (a), de l'atropine et de la prométhazine (b) sur le tonus des contractions spontanées du duodénum de rat.	98
Figure 29: Effets des concentrations uniques de l'extrait (a), de l'atropine et de la prométhazine (b) sur l'amplitude des contractions spontanées du duodénum de rat.....	98
Figure 30: Effets de concentrations uniques de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> sur la fréquence des contractions spontanées du duodénum de rat.	99
Figure 31: Effets des concentrations cumulatives de l'extrait (a), de l'atropine et de la prométhazine (b) sur le tonus des contractions spontanées du duodénum de rat.	100
Figure 32: Effets des concentrations cumulatives de l'extrait (a) et de la prométhazine (b) sur l'amplitude des contractions spontanées du duodénum de rat.....	100
Figure 33: Effets de l'atropine, de l'indométacine et de la prométhazine sur la relaxation du duodénum de rat induite par l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i>	104
Figure 34: Effets de la phentolamine et du propranolol sur la relaxation induite par l'extrait de <i>P. mannii</i> (a,b), la norépinephrine et salbutamol (c,d) sur le duodénum de rat.....	106
Figure 35: Effets de l'extrait de <i>P. mannii</i> sur l'activité contractile spontanée du duodénum de rat en présence du vérapamil et de l'EDTA.....	107
Figure 36: Effets de l'extrait de <i>P. mannii</i> sur l'activité contractile spontanée du duodénum de rat en présence du TEA, du glibenclamide et de la quinine.	109
Figure 37: Action du L-NAME et du bleu de méthylène sur l'activité relaxante induite par l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> sur le duodénum de rat.....	110
Figure 38: Tracés originaux illustrant l'activité d'une forte concentration de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> sur les contractions du duodénum de rat et en présence de quelques antagonistes sur cette activité.....	111
Figure 39a: Effets de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> sur le tonus de base des contractions du duodénum de rat induites avec le carbachol	112
Figure 39b: Tracés originaux montrant les contractions du duodénum induites avec le carbachol en absence (a) et en présence l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> (b).....	113
Figure 40a: Effets de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> sur les contractions du duodénum induites avec l'histamine.....	114

Figure 40b: Tracés originaux montrant les contractions du duodénum de rat induites avec l'histamine en absence (a) et en présence de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i>	115
Figure 41a: Effets de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> sur l'activité contractile du duodénum de rat induite avec le KCl.	117
Figure 41b: Tracés originaux montrant les effets de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> sur l'activité contractile du duodénum de rat induite avec le KCl en administration unique (b) ou cumulative (c)	119
Figure 42a: Effets de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> sur l'activité contractile du duodénum de rat induite par le BaCl ₂	120
Figure 42b: Tracés originaux montrant les effets de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> sur l'activité contractile du duodénum de rat induite avec le BaCl ₂ en administration unique (b) ou cumulative (c).	121
Figure 43a: Courbes concentration-réponse de l'activité contractile du duodénum de rat induite par le CaCl ₂ et en présence de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i>	124
Figure 43b: Tracés originaux montrant les contractions du duodénum de rat induites par le CaCl ₂ en absence et en présence de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i>	125
Figure 44: Effets de l'extrait aqueux des écorces de <i>P. mannii</i> sur les diarrhées induites avec l'huile de ricin chez le rat	129
Figure 45: Evolution du poids corporel des rats femelles (A) et mâles (B) au cours des 4 semaines (28 jours) de traitement à l'extrait aqueux de <i>Pittosporum mannii</i>	132
Figure 46: Evolution de la consommation hydrique des rats femelles (A) et mâles (B) au cours des 4 semaines (28 jours) de traitement à l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i>	132
Figure 47: Effets de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> sur le poids relatif de quelques organes chez les rats femelles et mâles au terme de 28 jours de traitement.....	133
Figure 48: Quantité de protéines (A, B) et de nitrites (C, D) dans le sérum et les organes des rats au bout de 4 semaines de traitement à l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i>	136
Figure 49a: Photographies du foie (f) et de l'intestin (i) montrant quelques altérations tissulaires observées chez les rats femelles (F) et mâles (M) après traitement subaigü avec différentes doses de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i>	139
Figure 49b: Photographies du rein (r) et de la rate (rt) montrant quelques altérations tissulaires observées chez les rats femelles (F) et mâles (M) après traitement subaigü avec différentes doses de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i>	140

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Exemple de classification de la toxicité - Cas de la toxicité aiguë par voie orale chez le rat	53
Tableau II: Composition et préparation des solutions physiologiques.....	60
Tableau III: Protocole de préparation des solutions d'antagonistes et agonistes.....	60
Tableau IV: Protocole de dosage des protéines sériques et tissulaires par la méthode de Biuret	83
Tableau V: Protocole de dosage des nitrites tissulaires par la méthode de Griess	84
Tableau VI: Protocole de dosage des triglycérides	86
Tableau VII: Protocole de dosage du cholestérol total dans le sérum.....	87
Tableau VIII: Protocole de détermination de l'activité des transaminases (ALAT et ASAT).88	
Tableau IX: Protocole de dosage de la bilirubine totale.....	89
Tableau X: Protocole de dosage de la phosphatase alcaline (PAL).....	90
Tableau XI: Protocole de dosage de la créatinine	91
Tableau XII: Etapes de la déshydratation.....	92
Tableau XIII: Etapes de déparaffinage des coupes	93
Tableau XIV: Composition qualitative de l'extrait aqueux des écorces du tronc de <i>Pittosporum mannii</i>	95
Tableau XV: Paramètres permettant d'apprécier l'affinité et l'efficacité de l'extrait, de l'atropine et de la prométhazine sur le tonus et l'amplitude des contractions spontanées du duodénum de rat.	101
Tableau XVI: Effets de quelques substances pharmacologiques standard sur l'activité contractile spontanée du duodénum de rat.....	102
Tableau XVII: Effets de l'extrait aqueux de <i>Pittosporum mannii</i> sur la défécation normale chez la souris.	126
Tableau XVIII: Effets de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> sur le transit intestinal chez la souris	127
Tableau XIX: Effets de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> sur la croissance des souches de microbes.....	130
Tableau XX: Paramètres hématologiques des rats femelles et mâles au bout de quatre semaines de traitement avec l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i>	134
Tableau XXI: Effets de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> sur les paramètres biochimiques sériques des fonctions hépatique et rénale chez les rats au bout de 4 semaines de traitement.	137
Tableau XXII: Effets de l'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> sur les paramètres sériques du profil lipidique chez les rats après quatre semaines de traitement.....	138

LISTE DES ABREVIATIONS

- [Ca²⁺]_i: Concentration de Ca²⁺ libre intracytoplasmique
- ALAT: Alanine aminotransférase
- AMPc: Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
- ASAT: Aspartate aminotransférase
- ATP: Adénosine triphosphate
- CICR: "Ca-induced Ca released"
- CMB: Concentration minimale bactéricide
- CMI: Concentration minimale inhibitrice
- CTP: Contenu total en polyphénols
- DL₅₀: Dose létale 50
- EAG: Equivalent d'acide gallique
- EC₅₀: Concentration efficace médiane
- EDTA: Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
- E_{max}: Effet relaxant ou contracturant maximal
- EMIA: Ecole militaire interarmées
- EPEC: *Escherichia coli* entéropathogène
- EXAO: Expérimentation assistée par ordinateur
- GMPc: Guanosine 3',5'-monophosphate cyclique
- Gut: "Gastrointestinal tract"
- HDL: "High density lipoproteins"
- ICC: Cellules interstitielles de Cajal
- ICC-IM: Cellules interstitielles de Cajal intramusculaires
- ICC-MY: Cellules interstitielles de Cajal distribuées dans la couche myentérique
- IMPM: Institut de Recherches Médicales et d'Etudes des Plantes Médicinales
- LDL: "Low density lipoproteins"
- L-NAME: N^G-nitro-L-arginine methyl ester
- Minsanté: Ministère de la Santé Publique
- MLCK: "Myosin light chain kinase"
- MLCP: "Myosin light chain phosphatase"
- NCCLS: "National Committee for Clinical Laboratory Standards"
- NED: Naphtyléthylènediamide
- NFS: Numération-formule sanguine

NO: "Nitric oxide"

OCDE: Organisation pour la Coopération et le Développement Economique

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PDE: Phosphodiesterase

PKA: Protéine kinase AMPc-dépendante

PKG: Protéine kinase GMPc-dépendante

ROCKs: "RhoA-dependent coiled serine/threonine kinases"

SAB: Sérum albumine bovine

SCGH: Système de Classification Globalement Harmonisé

SERCAs: "Sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases"

SRO: Solutés ou solutions de réhydratation orale

TEA: Tétréthylammonium

UNICEF: "United Nations Children's Fund"

WHO: "World Health Organization"

RESUME

La diarrhée, une affection gastro-intestinale courante, est l'une des plus importantes causes de la morbidité et de la mortalité particulièrement chez les enfants et les populations de faible niveau socio-économique dans les pays en développement. Dans la prise en charge de la diarrhée, les populations font souvent recours à des pratiques traditionnelles telles que l'utilisation empirique de plantes médicinales. *Pittosporum mannii* Hook. f. (*P. mannii*) est largement utilisé dans la médecine traditionnelle pour le traitement de diverses affections dont la diarrhée. La présente étude avait pour but d'évaluer les activités antispasmodiques, antidiarrhéiques et antimicrobiennes de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *P. mannii*. Des concentrations croissantes uniques (0,01; 0,02; 0,04; 0,08 et 0,16 mg/mL) ou cumulées (0,005-0,08 mg/mL) de l'extrait aqueux de *P. mannii* ont été évaluées *in vitro* sur l'activité contractile spontanée du duodénum isolé de rat, en présence ou non de quelques antagonistes standard, ainsi que sur les contractions induites avec quelques agents spasmogènes (carbachol, histamine, KCl, CaCl₂ et BaCl₂). Différentes concentrations de l'extrait (1,25-20 mg/mL) ont été évaluées *in vitro* sur la croissance de quelques souches de bactéries (*Escherichia coli* entéropathogène, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*) et de champignons (*Candida albicans*) responsables des diarrhées infectieuses chez l'homme. Différentes doses de l'extrait (60, 120, 240, 480 et 720 mg/kg) administrées par voie orale, ont été évaluées *in vivo* sur l'élimination des selles, le transit intestinal et la diarrhée induite avec l'huile de ricin chez la souris ou le rat. Le profil toxicologique de cet extrait de plante a été évalué chez le rat en administration unique puis répétée, et les analyses biochimiques, hématologiques et histologiques ont été effectuées. L'extrait aqueux de *P. mannii* aux faibles concentrations uniques (0,01-0,08 mg/mL) ou cumulatives (0,005 à 0,08 mg/mL), a induit une diminution significative du tonus de base et de l'amplitude des contractions spontanées du duodénum de rat, avec une EC₅₀ de 0,01977 et de 0,01847 mg/mL, respectivement. Les concentrations élevées ($\geq 0,08$ mg/mL) ont induit une action biphasique se traduisant par une relaxation suivie d'une élévation transitoire du tonus de base des contractions. L'atropine (1 μ M), la prométhazine (0,5 ou 1 μ g/mL), la phentolamine (1 μ M) ou la combinaison prazosine/yohimbine (1/1 μ M), le glibenclamide (10 μ M), l'indométacine (3 μ M) ou l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA, 0,5 mM) n'ont pas modifié significativement l'activité de l'extrait sur les contractions spontanées de l'intestin. Le propranolol (1 μ M), la N^G nitro L-arginine méthyl ester (L-NAME 5 \times 10⁻⁴ M), le bleu de méthylène (10⁻⁵ M), le tétraéthylammonium (TEA 1 ou 10 mM), la quinine (20 μ M) et le vérapamil (0,05 ou 0,1 μ M) ont inhibé significativement la baisse du tonus des contractions spontanées provoquée par l'extrait à faibles concentrations. L'extrait aqueux de *P. mannii* a inhibé de manière significative la contraction induite par le carbachol, l'histamine (10⁻⁹-

5×10^{-4} M), le KCl (20 mM, 50 mM ou 1-60 mM) ou le BaCl₂ (10^{-5} - 5×10^{-2} M) en milieu physiologique normal, et la contraction induite par le CaCl₂ (10^{-5} - 2×10^{-2} M) en milieu sans Ca²⁺ additionné ou non de l'EDTA. L'extrait aqueux de *P. mannii* n'a pas affecté significativement l'élimination des fèces et la propulsion intestinale normales chez la souris. Les doses de 240, 480 et 720 mg/kg ont inhibé de manière significative le transit intestinal stimulé avec l'huile de ricin chez les souris et la diarrhée induite avec l'huile de ricin chez le rat; cet effet a été partiellement antagonisé par le naloxone (0,5 mg/kg). Ces résultats suggèrent que l'extrait aqueux des écorces du tronc de *P. mannii* posséderait, à faibles concentrations, des propriétés antispasmodiques et spasmolytiques médiées par divers mécanismes incluant une activation des récepteurs β -adrénergiques, une augmentation de la production du monoxyde d'azote, une activation des canaux K⁺ des myocytes (probablement les canaux K⁺ à large conductance activés par le Ca²⁺ (BK_{Ca})) ou un blocage des canaux Ca²⁺ voltage-dépendants de type L. L'extrait de *P. mannii* pourrait également influencer les flux de Ca²⁺ à partir du compartiment intracellulaire ou les mécanismes de sensibilisation de l'appareil contractile pour provoquer la relaxation. Cet extrait de plante possède également une action anticholinergique et antihistaminique qui pourrait contribuer à la relaxation. La réponse contracturante induite par l'extrait de *P. mannii* pourrait également impliquer des canaux potassiques et des canaux Ca²⁺ voltage-dépendants. Les études *in vivo* ont montré que l'extrait aqueux de *P. mannii* exerce une faible inhibition sur la motilité intestinale normale, et inhibe fortement la motilité augmentée et les sécrétions intestinales, justifiant ainsi son activité antidiarrhéique. Cette activité antidiarrhéique (antispasmodique et/ou antisécrétoire) résulterait, au moins en partie, de l'activation des récepteurs opioïdes dans le tractus gastro-intestinal. Aux concentrations de 1,25 à 20 mg/mL, l'extrait aqueux de *P. mannii* a inhibé *in vitro* la croissance de *Escherichia coli* entéropathogène, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* et *Candida albicans*; cette activité antimicrobienne serait bénéfique pour les effets antidiarrhéiques de cette plante. Les résultats de cette étude montrent que l'extrait aqueux de *P. mannii* possède des propriétés antispasmodiques, antidiarrhéiques et antimicrobiennes, justifiant ainsi l'utilisation empirique de *P. mannii* en médecine traditionnelle pour le traitement de la diarrhée. La dose létale 50 (DL₅₀) supérieure à 5000 mg/kg suggère que l'extrait serait relativement non toxique en administration aiguë. En administration subaiguë, l'extrait serait doté d'une faible toxicité qui s'est traduite entre autre par des légères modifications de quelques paramètres hématologiques et biochimiques, des inflammations et une congestion vasculaire. Cet extrait de plante doit être utilisé en traitement subchronique avec prudence compte tenu des altérations biochimiques et histologiques observées.

Mots clé: *Pittosporum mannii*, duodénum, rat, activité contractile, diarrhée, activité antimicrobienne.

ABSTRACT

Diarrhoea is a common gastro-intestinal affection and one of the main causes of morbidity and mortality particularly in children and populations of low socio-economic conditions both in tropical and subtropical poor countries. A large number of populations often rely on traditional practices such as empirical use of medicinal plants, for the treatment of diarrhoea. *Pittosporum mannii* Hook. f. (Pittosporaceae) is widely used in traditional medicine for the treatment of several affections including diarrhoea. The present study was designed to evaluate the antispasmodic, antidiarrhoeal and antimicrobial activities of the aqueous extract of stem barks of *P. mannii*. Increasing single (0.01; 0.02; 0.04; 0.08 or 0.16 mg/mL) or cumulative (0.005-0.08 mg/mL) concentrations of the aqueous extract of *P. mannii* were tested *in vitro* on the spontaneous contractile activity of isolated rat duodenum strips, in the presence or absence of some standard antagonists, and on spasmogen (carbachol, histamine, KCl, CaCl₂ or BaCl₂)-induced contractions. Various concentrations of the extract (1.25-20 mg/mL) were evaluated *in vitro* on the growth of some pathogenic strains of bacteria (enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*) and fungi (*Candida albicans*) involved in infectious diarrhoea. Several doses of *P. mannii* aqueous extract (60, 120, 240, 480 and 720 mg/kg) orally administered, were tested *in vivo* for their effects on normal defecation, intestinal transit and castor oil-induced diarrhea in the mouse or rat. The toxicological profile of this plant extract was evaluated in the rat in single acute administration and repeated subacute administration, and biochemical, hematological and histological analyses were carried out. The aqueous extract of stem bark of *P. mannii* administered in single concentrations (0.01-0.08 mg/mL) or cumulative concentrations (0.005-0.08 mg/mL), significantly reduced the basal tonus and the amplitude of spontaneous contractions of rat duodenum, with an EC₅₀ value of 0.01977 and 0.01847 mg/mL, respectively. Higher concentrations (≥ 0.08 mg/mL) induced a biphasic effect represented by a relaxation followed by a transient increase of the basal tonus of the contractions. Atropine (1 μ M), promethazine (0.5 or 1 μ g/mL), phentolamine or a combination of prazosine/yohimbine (1 μ M), glibenclamide (10 μ M), indometacine (3 μ M) or ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, 0.5 mM) did not significantly modify the activity of the extract on the spontaneous contractions of rat intestine. Propranolol (1 μ M), NG nitro L-arginine methyl ester (L-NAME 5 \times 10⁻⁴ M), methylene blue (10⁻⁵ M), tetraethylammonium (TEA 1 or 10 mM), quinine (20 μ M) and verapamil (0.05 or 0.1 μ M) significantly inhibited the decrease of the basal tonus of the spontaneous contractions induced by lower concentrations of the extract. The aqueous extract of *P. mannii* also significantly inhibited the contraction induced by carbachol, histamine (10⁻⁹-5 \times 10⁻⁴ M), KCl (20 mM, 50 mM or 1-60

mM) or BaCl₂ (10⁻⁵-5×10⁻² M) in a normal physiological solution, and the contraction induced by CaCl₂ (10⁻⁵-2×10⁻² M) in a Ca²⁺-depleted saline solution added or not with EDTA. The aqueous extract of *P. mannii* did not significantly affect faeces elimination and intestinal propulsion in normal mice. At doses of 240, 480 and 720 mg/kg, the extract significantly inhibited castor oil-stimulated intestinal transit in mice and castor oil-induced diarrhoea in rats; this antidiarrheal effect was partially antagonised by naloxone (0.5 mg/kg). These results suggest that the aqueous extract of *P. mannii* stem barks, at low concentrations, exhibits antispasmodic and spasmolytic activities. These effects might be controlled by various mechanisms including the activation of β-adrenergic receptors, increase in nitric oxide production, activation of K⁺ channels of the myocytes (probably high conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (BKCa)) or blockage of L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels. *P. mannii* extract could also influence the flow of Ca²⁺ from the intracellular stores or the mechanisms that sensitize the contractile apparatus to induce relaxation. This extract possesses an anticholinergic and antihistaminic activity which might also contribute to relaxation of smooth muscles. The contractile response induced by the aqueous extract of *P. mannii* could also involve potassium channels and voltage-dependent Ca²⁺ channels. *In vivo* studies showed that the aqueous extract of *P. mannii* exhibits a slight inhibition on the normal intestinal motility, while it significantly inhibits increased motility and intestinal secretions, thus justifying its antidiarrheal activity. This antidiarrheal activity (antispasmodic and/or antisecretory) might be mediated, at least in part, by activation of opioid receptors within the gastro-intestinal tract. At concentrations ranging from 1.25 to 20 mg/mL, the aqueous extract of *P. mannii* inhibited the growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* and *Candida albicans* in *in vitro* culture. This antimicrobial activity could be beneficial to the antidiarrheal activity of this plant. The results of this study reveal that the aqueous extract of *P. mannii* possesses antispasmodic, antidiarrheal and antimicrobial properties and therefore provide pharmacological basis for the empirical use of *Pittosporum mannii* in traditional medicine for the treatment of diarrhoea. Several bioactive compounds (phenols, flavonoids, tannins, terpenoids, saponins, lipids) were revealed in this plant extract, which might explain these activities. The lethal dose 50 (DL₅₀) higher than 5000 mg/kg suggests that *P. mannii* extract might be relatively non toxic in acute administration. In subacute administration, the extract showed a weak toxicity resulting in slight modifications of some hematological and biochemical parameters, inflammations and vascular congestion. Attention should then be paid when using *P. mannii* extract in subacute treatment since it exhibits a weak toxicity in the rat.

Key words: *Pittosporum mannii*, duodenum, rat, contractile activity, diarrhoea, antimicrobial activity.

INTRODUCTION

La fonction de digestion est essentielle dans la physiologie normale des organismes animaux. Notre bien-être physique tient certes à de très nombreux facteurs, mais repose de manière essentielle sur une alimentation saine et équilibrée ainsi que sur le bon fonctionnement du système digestif (Sandoz, 2008). Le fonctionnement du système digestif est complexe et très souvent, le tractus gastro-intestinal peut «sortir de ses rails» et subir des dysfonctionnements multiples et de nombreuses affections (Sandoz, 2008). Les maladies du tractus gastro-intestinal sont aussi diverses que ses composantes sont multiples. Les troubles les plus fréquents sont la constipation, la diarrhée, les vomissements, les brûlures de l'estomac ou de l'intestin, les infections intestinales, les inflammations de la muqueuse gastro-intestinale, les maladies gastro-intestinales fonctionnelles (dyspepsie fonctionnelle, syndrome de l'intestin irritable), les maladies inflammatoires de l'intestin (la recto-colite hémorragique ou colite ulcéreuse, maladie de Crohn) (Ohama *et al.*, 2007; Sandoz, 2008; Doctissimo, 2014). Aujourd'hui encore, les problèmes gastro-intestinaux comptent parmi les maladies les plus fréquentes chez les populations. Alors qu'elles étaient autrefois dues en grande partie au manque d'hygiène ainsi qu'aux mauvaises conditions de conservation des aliments, elles sont aujourd'hui imputables également au stress, à une mauvaise alimentation ainsi qu'à un mode de vie trop sédentaire, raison pour laquelle elles sont souvent qualifiées de «facteurs de civilisations» (Sandoz, 2008).

L'une des affections les plus importantes du système gastro-intestinal est la diarrhée. Elle peut être une simple affection gastro-intestinale provoquée par certaines infections (bactéries, champignons, virus et parasites intestinaux), une augmentation de la motilité, les intolérances alimentaires (lactose, gluten) ou médicamenteuses (antibiotiques, laxatifs), les facteurs immunologiques (immunodéficience) et psychologiques (stress, anxiété) (Zavala *et al.*, 1998; Hejazian-Y *et al.*, 2009; Desiré *et al.*, 2010; Banji *et al.*, 2010; Al Jarousha *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2013). Elle peut également être une des complications majeures de diverses maladies telles que les troubles fonctionnels intestinaux, l'autisme, le diabète, les maladies inflammatoires de l'intestin, le cancer du côlon (Tijani *et al.*, 2009, Abdelrahim *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2013). La diarrhée est une affection caractérisée par une augmentation de la fréquence, de la fluidité et du volume des selles. Elle se traduit notamment par une émission de selles molles ou liquides très fréquente (plus de 3 fois dans une journée), souvent accompagnée d'une grande fréquence des mouvements péristaltiques qui entraînent des crampes et des douleurs abdominales (Snyder et Merson, 1982; Modigliani, 1989; Farthing, 2002; Ezekwesili *et al.*, 2004; 2010; Ojewole *et al.*, 2008; AL-maamori, 2011). Le risque majeur est une importante perte d'eau et d'électrolytes qui a pour conséquence la déshydratation rapide et la dénutrition de l'individu (Damabi *et al.*, 2010; Abdelrahim *et al.*, 2013).

La diarrhée a été reconnue depuis longtemps comme étant l'une des principales causes de la morbidité et la mortalité dans les pays en développement et la deuxième cause majeure de décès chez les enfants dans le monde, juste après les pneumonies (Snyder et Merson, 1982, Coker *et al.*, 1998; Venkatesan *et al.*, 2005; AL-Maamori, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2013). On a estimé qu'il y aurait jusqu'à 4 milliards de cas de diarrhée aiguë recensés dans le monde entier tous les ans (Farthing, 2000) et environ 2,5 milliards de ces cas se produiraient chez les enfants de moins de 5 ans (UNICEF/WHO, 2009). D'après le rapport de santé de l'OMS (2004), la diarrhée est la cause de 3,3% de décès en général et 17% de décès chez les enfants de moins de 5 ans (UNICEF/WHO, 2009; AL-Maamori, 2011). Globalement on a estimé que la diarrhée tue annuellement environ 2,2 millions de personnes, la majorité (1,5 million) étant les nourrissons et enfants en dessous de l'âge de 5 ans (Venkatesan *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2008; Ojewole *et al.*, 2008; UNICEF/WHO, 2009; AL-Maamori, 2011). Les infections intestinales constituent la plus importante cause de la diarrhée dans le monde et sont responsables du décès de 3-4 millions de personnes tous les ans, dont la majorité sont les enfants avant l'âge scolaire (Farthing, 2000; Xiao *et al.*, 2013). Du fait de la morbidité et la mortalité élevées associées à des hospitalisations plus ou moins coûteuses et prolongées, la diarrhée demeure un sérieux problème de santé publique non seulement dans les pays en développement tropicaux et subtropicaux (Snyder et Merson, 1982; Venkatesan *et al.*, 2005), mais également dans le monde occidental (Damiki et Siva, 2011; Abdelrahim *et al.*, 2013). Toutefois, les implications économiques des maladies diarrhéiques sont particulièrement évidentes dans les régions économiquement défavorisées du monde telles que le Subcontinent indien, l'Afrique et l'Amérique latine, et plus graves encore chez les classes sociales défavorisées qui sont les plus vulnérables (WHO, 1994, Farthing, 2000). La forte prévalence de la diarrhée dans les pays en développement est due, en grande partie, au manque d'eau potable, d'installations sanitaires et d'hygiène, ainsi qu'au pauvre état global de santé et statut nutritionnel (Gutiérrez *et al.*, 2007; UNICEF/WHO, 2009). En Asie du Sud-Est et en Afrique, jusqu'à 8,5% et 7,7% de tous les décès, respectivement, sont dus à la diarrhée, pour plus de 80% des décès chez les enfants dans le monde (OMS, 2013). Dans ces régions, les enfants peuvent éprouver entre trois et dix épisodes de diarrhée chaque année, chacun d'entre eux contribuant au cycle infection-malnutrition et subséquemment à la réduction de la croissance et du développement (WHO, 1994, Farthing, 2000; UNICEF/WHO, 2009). Le profil épidémiologique du Cameroun, comme celui de la plupart des pays en Afrique au Sud du Sahara, est dominé par les maladies parasitaires et infectieuses. Les maladies diarrhéiques constituent avec les infections respiratoires, les principales causes de morbidité après le paludisme dans la population générale. Des foyers de choléra s'activent périodiquement dans le grand Nord, à Douala dans le Littoral et dans les régions du Sud et de l'Ouest, et contribuent à accroître la

mortalité dans ces régions (Minsanté, 2002; Minsanté, 2008). Selon les estimations de l'année 2008, les diarrhées auraient provoqué environ 16% de décès chez les enfants de moins de 5 ans (environ 131 décès pour 1000 naissances vivantes) (UNICEF/WHO, 2009). Ces chiffres ont quelque peu diminué ces dernières années, mais la situation sanitaire des diarrhées reste toujours préoccupante dans le pays (11% de décès chez les enfants de moins de 5 ans en 2013) (Minsanté, 2009; OMS, 2009; WHO, 2015).

La prise en charge des affections gastro-intestinales comme de toute pathologie est beaucoup plus clinique. Les approches de traitement moderne des diarrhées visent entre autre à inhiber les contractions du muscle lisse intestinal, diminuer les sécrétions gastro-intestinales ou améliorer l'absorption des fluides, rétablir l'osmolarité normale du milieu intestinal ou s'attaquer directement aux germes responsables des infections (Tsai *et al.*, 2004; Tangpu et Yadav., 2006 ; Damabi *et al.*, 2010; Borrelli. *et al.*, 2009). En dépit de la disponibilité d'un certain nombre de médicaments, aucun médicament disponible à l'heure actuelle n'a montré une efficacité dans la prise en charge courante de la diarrhée sous ses différentes formes (Farthing, 2002; Ching *et al.*, 2008). De plus, les drogues actuellement utilisées pour le traitement de la diarrhée telles que les opiacés et les antibiotiques, ont des limitations liées au coût élevé et à la haute propension des effets secondaires indésirables de la plupart des médicaments chimiques de synthèse (Farthing, 2000; Heinrich *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2013). D'où l'intérêt de la population pour la médecine traditionnelle qui représente une alternative non négligeable dans la prise en charge moins coûteuse des diarrhées. De plus, ces produits naturels semblent présenter une faible toxicité (Chen *et al.*, 1999; Ching *et al.*, 2008; Fawzi, 2013). Dans de nombreuses communautés à travers le monde, surtout dans les pays en développement, la majorité des populations (Damabi *et al.*, 2010) et en particulier celles des zones rurales ou les couches sociales défavorisées, utilisent couramment et de manière empirique les plantes médicinales ou les préparations à base de plantes pour soigner elles-mêmes différentes affections dont les diarrhées (Lin *et al.*, 2002; Chitme *et al.*, 2004; Atta et Mouneir, 2004; Abdelrahim *et al.*, 2013). L'utilisation des plantes médicinales est une composante fondamentale du système de santé traditionnel africain (Fawzi, 2013).

Malgré la propension des populations pour la médecine traditionnelle à travers le monde, l'utilisation empirique des plantes présente quelques limites et des risques non négligeables, notamment ceux liés à l'efficacité réelle, à la dose et à la toxicité éventuelle de certains extraits de plante (Lee *et al.*, 2009). Ainsi, il y a une nécessité de procéder à des investigations scientifiques pour évaluer les effets thérapeutiques et les effets sécurisants des plantes médicinales ainsi que leurs mécanismes d'action (O'Malley *et al.*, 2004; Hejazian-Y *et al.*, 2009). De plus, les plantes médicinales représentent une source potentielle de nouvelles

molécules médicamenteuses (Gupta, 1994, Damabi *et al.*, 2010; Nwinyi *et al.*, 2004; Ching *et al.*, 2008). Ces dernières années, la focalisation de la recherche sur les plantes a augmenté partout dans le monde et un grand nombre d'évidences ont été rassemblées pour montrer l'immense potentiel des plantes médicinales utilisées dans divers systèmes traditionnels (Dahanukar *et al.*, 2000). Afin de faire face à la menace que représente la diarrhée dans le monde, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a institué un programme de contrôle (traitement et prévention) des maladies diarrhéiques qui intègre l'utilisation de la médecine traditionnelle à base de plantes (Snyder et Merson; 1982; Lin *et al.*, 2002; Atta et Mouneir, 2004, Agunu *et al.*, 2005; Ojewole *et al.*, 2008; Abdelrahim *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2013). Le Laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I est un pôle de recherche en plantes médicinales au Cameroun et dans la sous-région Afrique centrale. Dans sa mission de valoriser la pharmacopée traditionnelle du Cameroun, il s'est assigné un vaste programme de recherche: «Etude des effets thérapeutiques et pharmacologiques des extraits de plantes sur les grandes fonctions de l'organisme en utilisant des modèles de pathologies induites sur des animaux de laboratoire». Un certain nombre de travaux y ont été menés sur des plantes utilisées en médecine traditionnelle camerounaise, pour établir les bases pharmacologiques de leur usage en tant qu'agents antidiarrhéiques (Dimo *et al.*, 2001; Kamgang *et al.*, 2001; Nguelefack *et al.*, 2006). *Pittosporum mannii* Hook f. (Pittosporaceae) qui fait l'objet de cette étude est une plante couramment utilisée en médecine traditionnelle au Cameroun et dans plusieurs régions du monde pour le traitement de diverses affections gastro-intestinales dont la diarrhée (Fawole *et al.*, 2009; Focho *et al.*, 2009; Momeni *et al.*, 2010; Fawzi *et al.*, 2013; Stark *et al.*, 2013). A notre connaissance, aucun travail scientifique dans la littérature n'a révélé l'activité antidiarrhéique ou antispasmodique de cette plante. La présente étude a été entreprise pour évaluer les «activités antispasmodiques, antidiarrhéiques et antimicrobiennes de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *Pittosporum mannii* Hook. f. (Pittosporaceae)». De manière spécifique, il était question:

- d'évaluer *in vitro* les effets de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *Pittosporum mannii* sur l'activité contractile spontanée de l'intestin de rat et les mécanismes d'action probables de cet extrait.
- d'évaluer *in vivo* les effets de l'extrait sur quelques modèles expérimentaux de diarrhées chez la souris et le rat;
- d'évaluer l'activité antimicrobienne *in vitro* de l'extrait sur quelques souches microbiennes à l'origine des diarrhées infectieuses;
- d'étudier la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait chez le rat.

CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE

I.1- Système digestif: organisation générale et fonctionnement

I.1.1- Organisation générale de l'appareil digestif

Le système digestif ou appareil digestif est composé de l'ensemble des organes qui assurent la digestion des aliments et l'absorption des nutriments. Il comprend deux types d'organes: le tube digestif et les organes digestifs annexes ([Figure 1](#)).

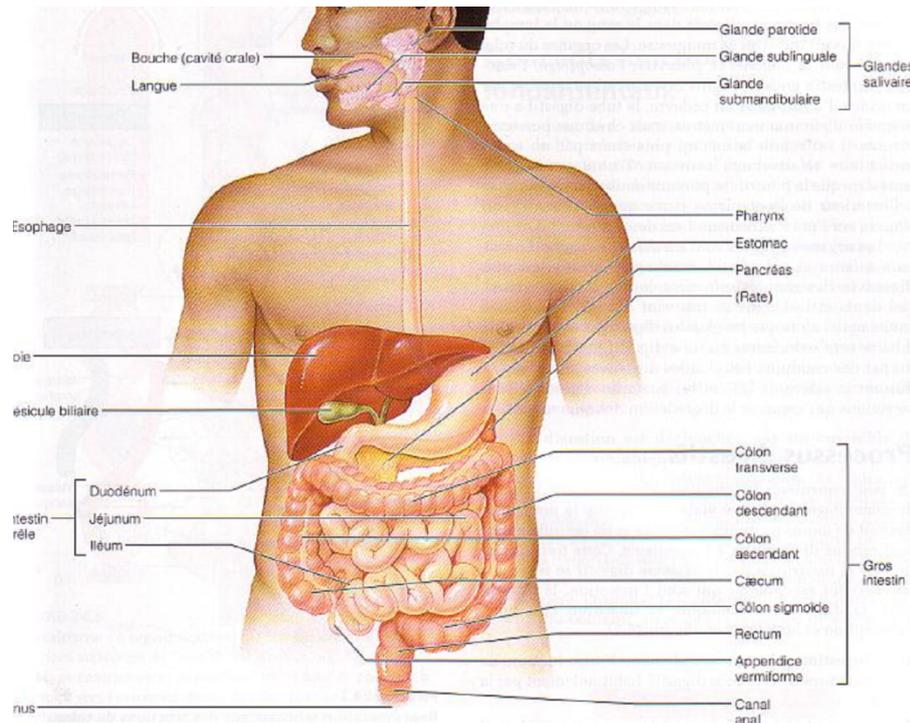


Figure 1: Organisation générale de l'appareil digestif de l'homme ([Marieb, 1999](#))

Le tube digestif ou tractus gastro-intestinal est un long tube musculéux qui parcourt l'organisme de la bouche jusqu'à l'anüs et où circulent les aliments au cours de la digestion. Il présente une différenciation en plusieurs segments spécialisés: la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin ([Sherwood, 2006](#)). La cavité buccale correspond à l'entrée du tube digestif où sont introduits les aliments ingérés; le pharynx est un conduit musculo-membraneux qui est le carrefour des voies respiratoires et digestives; l'œsophage est un tube musculéux qui traverse le thorax à peu près en ligne droite puis entre dans la cavité abdominale où il débouche dans l'estomac. L'estomac est une dilatation locale du tube digestif, qui se trouve dans le quadrant supérieur gauche de la cavité abdominale, presque caché par le foie et le diaphragme ([Marieb, 1999](#)). L'intestin grêle est un long tube (d'environ 2 m chez une personne vivante) aux formes compliquées qui va du muscle sphincter pylorique dans la région épigastrique à la valve iléo-cœcale située dans la région iliaque droite où il rejoint le gros intestin. Il comprend trois segments qui se distinguent par la

structure histologique de leur muqueuse. Le duodénum, qui s'incurve autour de la tête du pancréas, est le segment le plus court de l'intestin grêle (il a une longueur de 25 cm environ chez l'homme). Le jéjunum (environ 2,5 m de long) et l'iléon (environ 3,6 m de long), très pelotonnés, sont accrochés comme des chapelets de saucisses dans la cavité abdominale. Le gros intestin est constitué par le cæcum, l'appendice vermiforme, le côlon, le rectum et le canal anal. Le côlon, qui forme la plus grande partie du gros intestin, est fait de quatre parties relativement rectilignes: le côlon ascendant (droit), le côlon transverse et le côlon descendant (gauche) dont la portion terminale forme le côlon sigmoïde à la forme d'un S allongé (Sherwood, 2006). Dans le bassin, le côlon sigmoïde s'ouvre sur le rectum dirigé vers l'arrière. Le canal anal est muni de deux sphincters: le muscle sphincter interne de l'anus, involontaire et formé de fibres musculaires lisses, et le muscle sphincter externe de l'anus, volontaire et constitué de fibres musculaires squelettiques (Marieb, 1999).

Les organes digestifs annexes sont les dents, la langue et les glandes digestives qui sont de deux types: les glandes macroscopiques associées au tube digestif (glandes salivaires, pancréas, foie et vésicule biliaire) et les minuscules glandes contenues dans la paroi même du tube digestif (glandes de la paroi de la cavité buccale, de l'estomac et de l'intestin grêle).

I.1.2- Structure histologique du tube digestif

La structure générale de la paroi du tube digestif est pratiquement la même sur toute sa longueur, de l'œsophage à l'anus, avec toutefois des particularités locales. Elle comporte quatre couches ou tuniques qui de l'intérieur vers la surface externe sont: la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (Figure 2) (Nutranews, 2003).

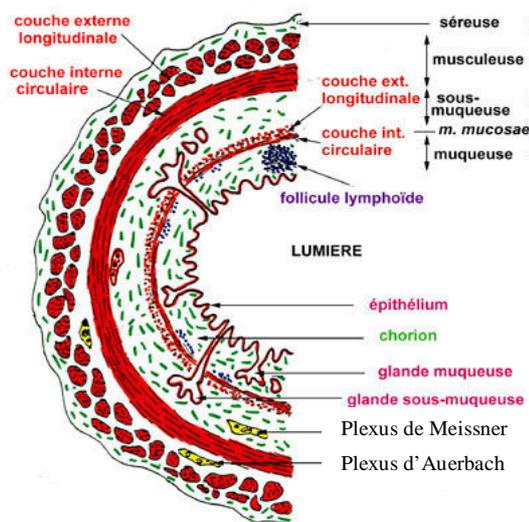


Figure 2: Coupe transversale montrant la structure histologique du tube digestif ()

La muqueuse digestive, la plus complexe des muqueuses, comporte trois sous-couches: l'épithélium de revêtement, la lamina propria et la musculure muqueuse ou muscularis

mucosae. L'épithélium tapisse la surface interne de la paroi digestive de la bouche à l'anus. C'est une couche protectrice mais aussi sécrétrice et absorbante dans certaines régions. La lamina propria ou chorion est formée du tissu conjonctif lâche aréolaire parcouru de vaisseaux sanguins qui nourrissent l'épithélium et absorbent les aliments digérés. Elle contient des follicules lymphoïdes épars qui font partie des formations lymphoïdes associées au tube digestif. La muscularis mucosae est formée de faisceaux épars de muscles lisses qui s'étendent dans les parties profondes de la muqueuse; elle produit des mouvements locaux de la muqueuse.

La sous-muqueuse est une épaisse couche de tissu conjonctif lâche responsable de l'extensibilité et de l'élasticité du tube digestif. Son riche réseau vasculaire alimente les autres tissus de la paroi digestive notamment la muqueuse et la musculature. Elle renferme des follicules lymphoïdes individuels ou agrégés (plaques de Peyer). On y trouve un réseau de neurofibres qui forme le plexus nerveux sous-muqueux, ou plexus de Meissner. La sous-muqueuse de l'œsophage contient les glandes œsophagiennes, celle du duodénum renferme une série de glandes muqueuses complexes, les glandes duodénales ou glandes de Brunner.

La musculature est une épaisse tunique musculaire qui entoure la sous-muqueuse. Elle est faite de deux couches muscles lisses, une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe. Entre les deux couches musculaires se situe un réseau de fibres nerveuses qui forme le plexus nerveux myentérique ou plexus d'Auerbach. Au niveau de l'estomac exclusivement, on trouve en plus, une couche musculaire oblique. A plusieurs endroits du tractus, la couche musculaire circulaire s'épaissit pour former les sphincters.

La séreuse est la couche conjonctive externe recouvrant le tube digestif. Elle se compose du tissu conjonctif lâche aréolaire recouvert par une couche de cellules épithéliales squameuses appelée mésothélium. Dans l'œsophage thoracique et non de la cavité abdomino-pelvienne, la séreuse est remplacée par l'adventice, une enveloppe fibreuse ordinaire entièrement constituée de tissu conjonctif (Marieb, 1999; Sherwood, 2006).

I.1.3- Fonctions essentielles de l'appareil digestif

La principale fonction de l'appareil digestif consiste à décomposer les aliments ingérés et les transformer en substances simples (protides, glucides et lipides simples, eau, sels minéraux, oligo-éléments) utilisables par l'organisme. Il assure également le passage de ces nutriments dans la circulation sanguine afin qu'ils puissent être distribués aux différentes cellules. Ces substances servent à la fois de source d'énergie et de matières premières nécessaires à la fabrication et la réparation des tissus ainsi que le contrôle des différents systèmes de l'organisme (Doctissimo, 2014). L'appareil digestif remplit quatre activités ou

fonctions primordiales coordonnées et contrôlées par des facteurs locaux, nerveux et hormonaux (Guyton et Hall, 2006) et qui ensemble contribuent au processus global de la digestion: la motilité, la sécrétion, la digestion et l'absorption (Sherwood, 2006).

I.2- Sécrétions et absorption intestinales

L'épithélium de surface de la muqueuse digestive est riche en cellules à mucus, ou cellules caliciformes qui sécrètent du mucus épais qui tapisse la surface interne du tractus et assure la lubrification et la protection des parois dans différentes régions. Dans certaines parties du tractus digestif, des glandes exocrines bien structurées produisent différents types de sécrétions et les déversent dans la lumière (Guyton et Hall, 2006). Les glandes salivaires produisent la salive ; l'épithélium de surface de la muqueuse gastrique est parsemé de millions de profondes invaginations appelées cryptes, qui se prolongent jusqu'aux glandes gastriques qui sécrètent le suc gastrique ; le foie produit la bile et le pancréas produit le suc pancréatique. Une fois évacué dans l'intestin grêle, le contenu gastrique est mélangé non seulement aux sécrétions biliaire et pancréatique, mais aussi au suc intestinal sécrété par la muqueuse de l'intestin grêle.

I.2.1- Pancréas et sécrétion du suc pancréatique

Le tissu exocrine du pancréas est constitué des acini, grappes de cellules épithéliales entourant des conduits excréteurs (Marieb, 1999). Les canalicules issus des différents acini confluent pour former un canal commun, le conduit pancréatique qui fusionne avec le conduit cholédoque juste avant le duodénum, à la hauteur de l'ampoule hépato-pancréatique (Figure 3)

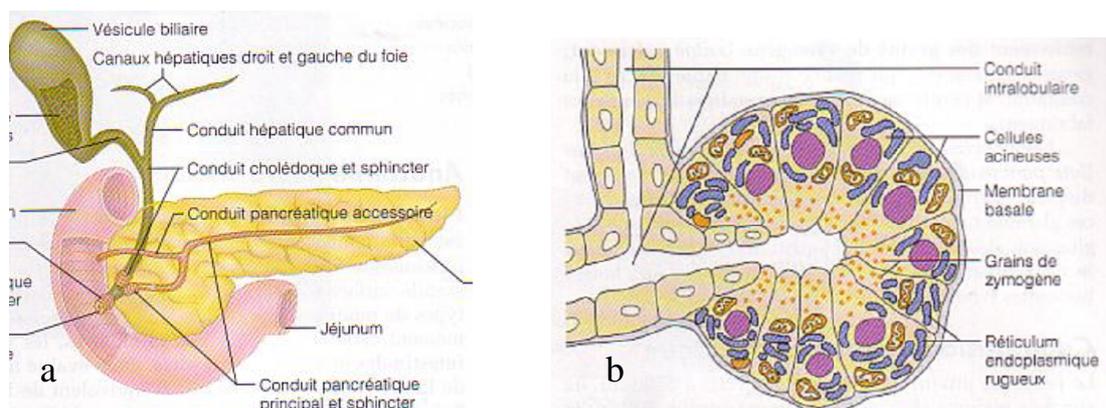


Figure 3: Relations anatomiques du pancréas (a) et structure d'un acinus pancréatique (b) (Marieb, 1999)

Le pancréas produit du suc pancréatique principalement constitué d'eau, des enzymes digestives et des électrolytes (surtout les bicarbonates). Les cellules acineuses, riches en réticulum endoplasmique rugueux, sécrètent la fraction du suc pancréatique riche en enzymes digestives. Les cellules épithéliales tapissant les petits conduits pancréatiques sécrètent la

solution aqueuse riche en bicarbonate de sodium (NaHCO_3) qui rend le suc pancréatique alcalin (pH voisin de 8).

I.2.2- Foie et sécrétion de la bile

Sur le plan histologique, le foie est formé d'unités structurales et fonctionnelles appelées lobules hépatiques (Figure 4a). Le lobule est une structure à peu près hexagonale constituée des travées d'hépatocytes qui sont orientées radialement vers l'extérieur et partent d'une veine centrale du foie qui suit l'axe longitudinal du lobule (Marieb, 1999). A chacun des six coins du lobule se trouve un espace interlobulaire, ou espace porte (Figure 4b), composé de trois structures fondamentales : une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte hépatique et un conduit biliaire interlobulaire. Les sinusoides du foie, qui sont des capillaires sanguins dilatés et peu étanches, passent entre les travées d'hépatocytes.

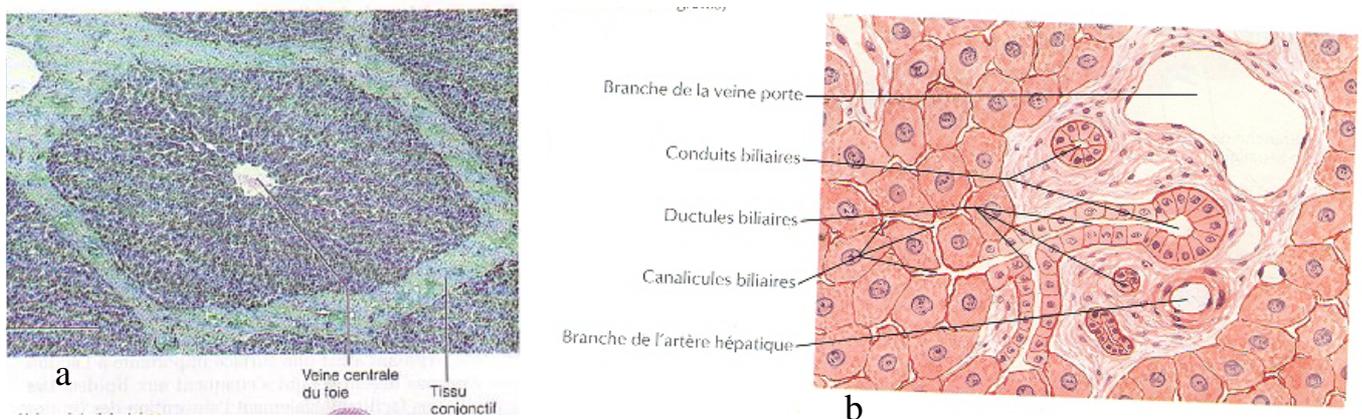


Figure 4: Le lobule hépatique (a) et un espace porte hépatique (b) (Marieb, 1999; Frank et Netter, 2003)

Le foie assure de nombreuses fonctions métaboliques et régulatrices; sa seule fonction digestive est la production de la bile. La bile s'accumule d'abord dans la vésicule biliaire qui la concentre en absorbant une partie de l'eau et des ions. La bile est une solution alcaline vert jaunâtre contenant de l'eau, des sels biliaires, des pigments biliaires (ex. bilirubine), du cholestérol, des graisses neutres, des phospholipides (lécithines, autres) et divers électrolytes.

I.2.3- Sécrétion du suc intestinal

I.2.3.1- Origine et Sécrétion du suc intestinal

Sur toute sa longueur, l'intestin grêle présente de nombreux replis appelés villosités intestinales. Entre les villosités se situent des dépressions qui s'enfoncent dans la lamina propria, formant les glandes intestinales tubulaires, ou glandes de Lieberkühn (Figure 5). Les cellules épithéliales qui garnissent ces glandes sécrètent le suc intestinal. Les cryptes et les villosités sont recouvertes par un épithélium composé de plusieurs types de cellules: un nombre modéré de cellules caliciformes qui sécrètent du mucus et de cellules endocrines

sécrétrices des hormones intestinales, et un grand nombre (90%) d'entérocytes qui, dans les cryptes, sécrètent de grandes quantités d'eau et d'électrolytes et, dans les villosités adjacentes, réabsorbent l'eau et les électrolytes avec les produits finaux de la digestion. Au niveau des villosités, les cellules épithéliales (entérocytes) absorbantes sont liées entre elles par des jonctions serrées et sont pourvues de nombreuses microvillosités (bordure en brosse). Au fond des glandes se trouvent des cellules sécrétrices spécialisées, les cellules de Paneth; elles sécrètent le lysozyme, la phospholipase, le "tumor necrosis facteur- α " (TNF- α) et des cryptidines ou défensines. Ces glandes comportent également des cellules souches totipotentes (cellules épithéliales immatures) qui se divisent continuellement pour donner naissance aux 4 types cellulaires (Figure 6) retrouvés dans l'épithélium intestinal (Saladin, 2003). Les glandes duodénales ou glandes de Brunner se trouvant dans la sous-muqueuse du duodénum, sécrètent un mucus alcalin riche en bicarbonates qui neutralise aussi le chyme acide provenant de l'estomac et protège la paroi du duodénum de la digestion par le chyme.

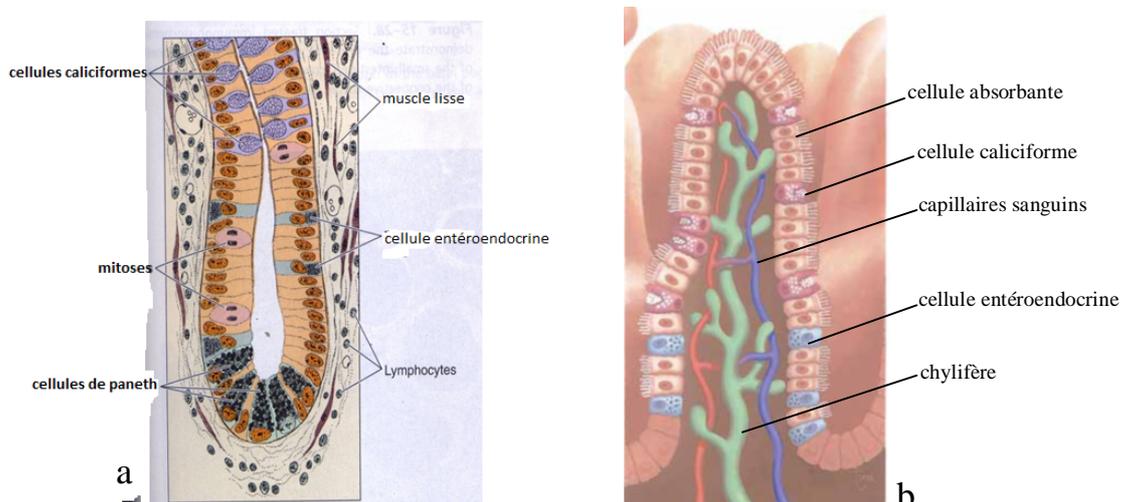


Figure 5: Structure cellulaire des glandes (a) et des villosités intestinales (b) (Scanlon et Sanders, 2007)

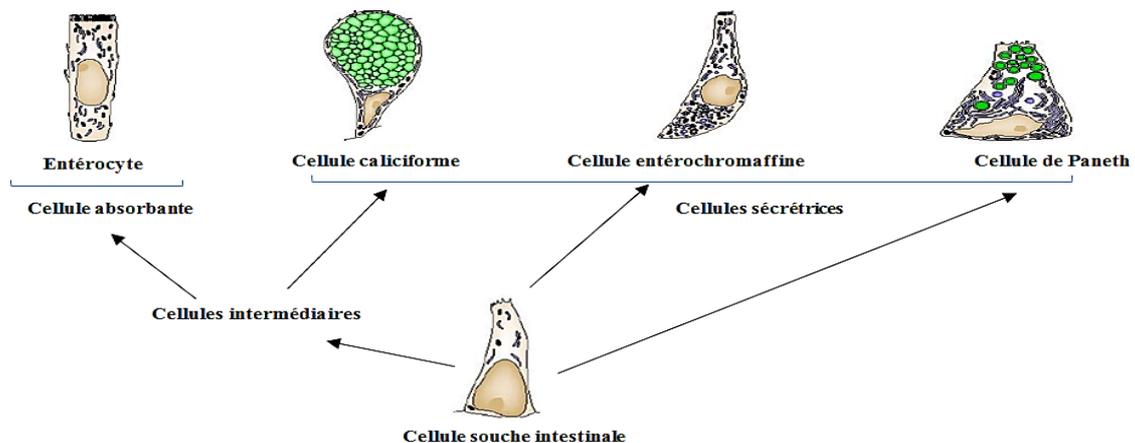


Figure 6: Les différents types de cellules de l'épithélium intestinal (Crosnier *et al.*, 2006)

L'intestin grêle sécrète normalement par jour 1 à 2 L de suc intestinal composé en grande partie de l'eau et des électrolytes mais contenant aussi du mucus sécrété par les

glandes duodénales et les cellules caliciformes. Ce mélange aqueux de mucus sert à homogénéiser les nutriments présents dans le chyle en vue de leur absorption. Le suc intestinal est relativement pauvre en enzymes parce que la majeure partie des enzymes intestinales ne sont pas sécrétées dans la lumière et restent liées aux membranes des microvillosités (bordures en brosse) des cellules épithéliales où elles agissent (Marieb, 1999).

Le gros intestin ne sécrète pas de suc digestif à proprement parlé, mais uniquement du mucus lubrifiant qui facilite la propulsion des résidus d'aliments vers l'anus et assure aussi la protection de ses parois (Marieb, 1999; Guyton et Hall, 2006).

I.2.3.2- Mécanismes de la sécrétion et de l'absorption de l'eau et des électrolytes

Les processus d'absorption et de sécrétion de l'eau et des électrolytes sont étroitement couplés (Schultz et Frizzell, 1976; Holtug et al., 1996, Tsai et al., 2004). Les sécrétions intestinales sont produites par les entérocytes au niveau des cryptes à un rythme d'environ 1800 mL par jour. Les fluides sécrétés sont rapidement réabsorbés avec les produits finaux de la digestion par les villosités. Le flot de fluides des cryptes vers les villosités crée un mouvement d'eau pour l'absorption des substances contenues dans le chyme quand il entre en contact avec les villosités (Guyton et Hall, 2006).

I.2.3.2.1- Mécanismes de la sécrétion de l'eau et des électrolytes.

Les cellules épithéliales qui tapissent les surfaces des glandes intestinales produisent une sécrétion suffisante d'eau et des électrolytes qui vont ensemble avec les substances organiques. Le mécanisme qui contrôle la sécrétion accrue du fluide aqueux par les cryptes de Lieberkühn pourrait impliquer au moins deux processus sécrétoires actifs (Figure 7): sécrétion active d'ions chlorures dans les cryptes et sécrétion active d'ions bicarbonates. La sécrétion de ces deux ions provoque un transport électrique également des ions sodium chargés positivement à travers la membrane vers le fluide sécrété. Finalement tous ces ions ensemble créent un mouvement osmotique d'eau vers la lumière intestinale. Le mécanisme probable par lequel la stimulation nerveuse provoque le passage de l'eau et des ions à grande profusion à travers les cellules glandulaires, lavant en même temps les substances organiques sur les bordures en brosse des cellules sécrétrices, est le suivant (Guyton et Hall, 2006):

- la stimulation nerveuse exerce un effet spécifique sur la région basale de la membrane de la cellule épithéliale pour provoquer le transport actif des ions chlorure (Cl^-) à l'intérieur de la cellule,
- l'augmentation de l'électronégativité induite à l'intérieur de la cellule par l'excès d'ions chlorure (Cl^-) de charges négatives provoque également un mouvement d'ions positifs tels que les ions sodium (Na^+) à travers la membrane pour entrer dans la cellule,

- dès lors, l'excès à la fois d'ions négatifs et positifs à l'intérieur de la cellule crée un gradient osmotique qui cause l'osmose nette de l'eau à l'intérieur de la cellule, augmentant de ce fait le volume de la cellule et la pression hydrostatique à l'intérieur de la cellule,
- la pression élevée à l'intérieur de la cellule provoque alors des ouvertures fines sur la bordure sécrétrice de la cellule glandulaire, entraînant l'écoulement de l'eau, des électrolytes et des substances organiques hors de la cellule par l'extrémité sécrétrice.

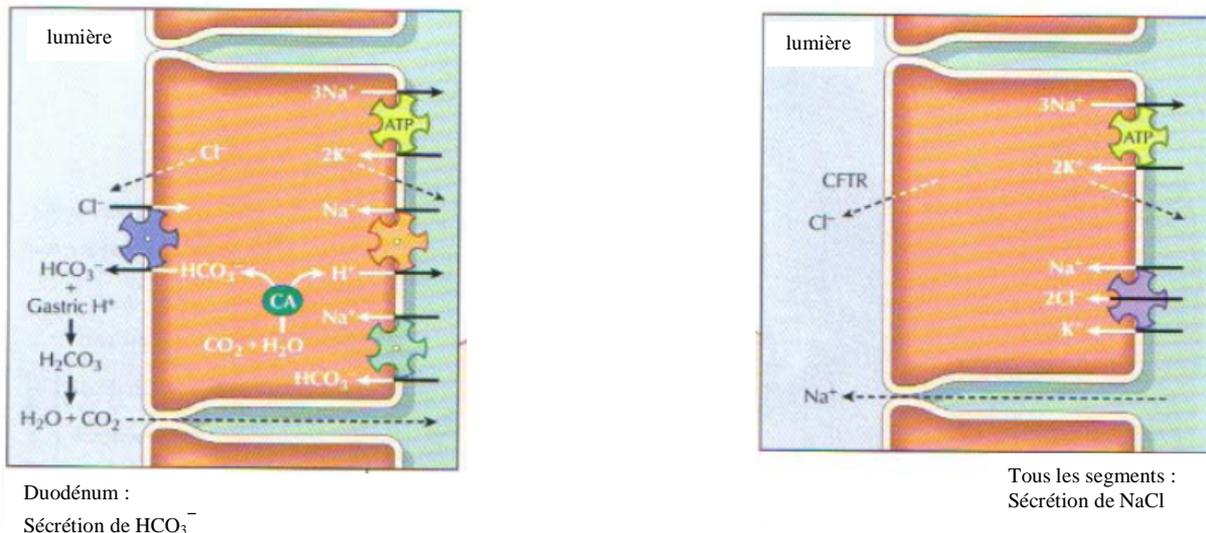


Figure 7: Mécanismes de la sécrétion de l'eau et d'électrolytes dans l'intestin grêle (Franck et Netter, 2003)

Des perturbations des mouvements d'eau et d'électrolytes (ions chlorure, ions sodium) dans l'épithélium intestinal sont observées dans le cas du choléra et d'autres types de diarrhée bactérienne. La toxine cholérique par exemple stimule la protéine G sur la membrane des cellules épithéliales et déclenche le signal de transduction aboutissant à la production excessive de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), qui ouvre un grand nombre de canaux chlorure, permettant aux ions Cl^- de passer rapidement de la cellule vers les cryptes intestinales (Kimberg *et al.*, 1971, Jodal *et al.*, 1993, Tsai, *et al.*, 2004; Guyton et Hall, 2006). Ceci pourrait par la suite activer une pompe à sodium qui pompe dans les cryptes les ions Na^+ qui vont ensemble avec les ions chlorure. Finalement, tout le chlorure de sodium supplémentaire cause une osmose extrême de l'eau à partir du sang, provoquant l'écoulement rapide du fluide avec les ions minéraux. La sécrétion devenant le plus souvent plus importante que celle normalement réabsorbée, cause ainsi une perte de grandes quantités d'eau, de chlorure et de sodium sous forme de diarrhée. Dans la plupart des cas, la vie du malade peut être sauvée par administration de grandes quantités de solution de chlorure de sodium pour compenser les pertes (Guyton et Hall, 2006).

I.2.3.2.2- Mécanismes de l'absorption de l'eau, des électrolytes et du glucose

Le tractus digestif reçoit chaque jour de grandes quantités de nourriture et de liquides et de sécrétions provenant du tube digestif lui-même. Normalement, presque tout le fluide sécrété ou celui ingéré est absorbé si bien que quelques 100 mL d'eau seulement sont excrétés par jour dans les fèces (les pertes de fluide intestinal peuvent atteindre 20 L/jour au cours de la diarrhée). La plupart des nutriments et des ions sont absorbés à travers la muqueuse des villosités intestinales par des mécanismes de transport actif dont l'énergie provient directement ou indirectement du métabolisme cellulaire. L'absorption des ions sodium est associée à l'absorption active du glucose et des acides aminés. La plupart des anions suivent passivement le gradient électrochimique créé par le transport du sodium. L'eau est absorbée par osmose suivant l'absorption des sels minéraux, essentiellement le sodium (Scanlon et Sandres, 2007; Marieb, 2013).

Absorption des ions Na^+ : La force motrice nécessaire à l'absorption du sodium à travers l'épithélium intestinal est fournie par le transport actif d'ions Na^+ des cellules épithéliales vers les espaces paracellulaires à travers les parois basales et latérales de ces cellules (Figure 7). Après être entré dans les cellules épithéliales par diffusion, le Na^+ est transporté activement vers l'extérieur de celles-ci par la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+$ située sur les parois basolatérales des cellules. Le transport actif du sodium par les membranes basolatérales ramène la concentration de Na^+ à l'intérieur de la cellule à une valeur basse (environ 50 mEq/L). Le sodium descend suivant ce gradient électrochimique du chyme vers le cytoplasme des cellules épithéliales, passant par la bordure en brosse de ces cellules. Ceci fournit davantage d'ions sodium à transporter par les cellules vers les espaces paracellulaires (Guyton et Hall., 2006).

Absorption des ions chlorure: L'absorption des ions Na^+ par l'épithélium intestinal crée l'électronégativité dans le chyme et l'électropositivité dans les espaces paracellulaires entre les cellules. Les ions chlorure se déplacent alors passivement le long de ce gradient électrique en "suivant" les ions sodium. Ainsi une partie du sodium est absorbée avec les ions chlorure; les ions Cl^- de charge négative sont entraînés passivement par les charges positives des ions Na^+ .

Absorption de l'eau. L'étape suivante dans le processus de transport transépithélial est l'osmose de l'eau dans les espaces paracellulaires (Figure 7). La concentration élevée d'ions (Na^+ , Cl^-) dans les espaces paracellulaires crée un fort gradient osmotique. L'eau est absorbée par osmose suivant l'absorption du sodium et du chlorure. La grande partie de cette osmose se produit par les jonctions serrées établies entre les limites apicales des cellules épithéliales, mais également à travers les cellules elles-mêmes. Le mouvement osmotique d'eau crée un flot de fluide dans et à travers les espaces paracellulaires et, finalement dans le sang à l'intérieur des villosités (Guyton et Hall, 2006).

Absorption du glucose: Les hydrates de carbone contenus dans les aliments sont absorbés essentiellement sous forme de monosaccharides dont le plus abondant est le glucose. Le glucose est transporté à travers la bordure en brosse des cellules épithéliales par un mécanisme de co-transport avec le sodium. La protéine de transport possède deux sites de liaison sur sa face extérieure, un site pour le Na^+ et un site pour le glucose. Un ion sodium se combine à une protéine de transport qui lie en même temps une molécule de glucose (ou une autre substance appropriée telle que le galactose, un acide aminé), puis le sodium et le glucose sont transportés simultanément à l'intérieur de la cellule (Guyton et Hall, 2006).

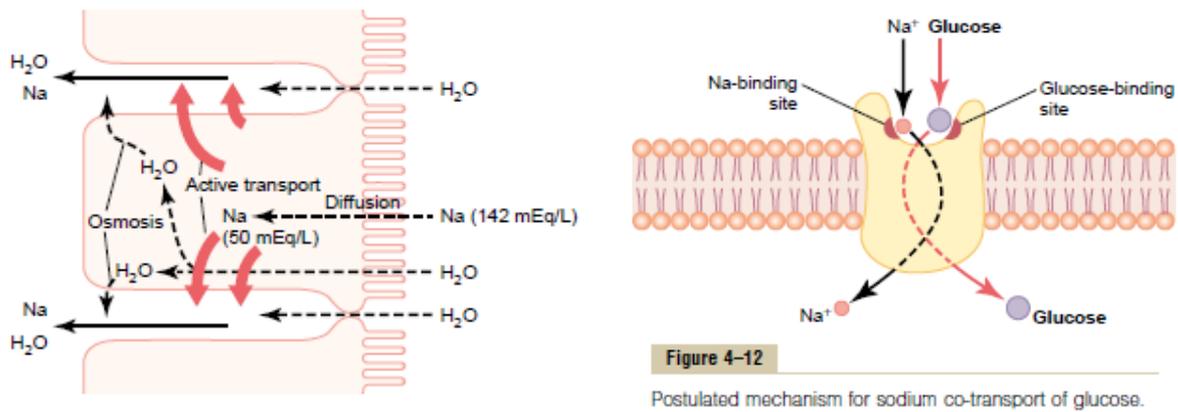


Figure 8: Mécanismes de l'absorption de l'eau, des électrolytes et du glucose dans l'intestin grêle (Guyton et Hall, 2006)

I.3- Motricité gastro-intestinale

Des phénomènes mécaniques importants interviennent dans chaque partie du tube digestif, pour que la nourriture soit transformée de façon optimale. Les mouvements de la paroi du tube digestif, appelés motilité ou activité motrice gastro-intestinale, permettent non seulement la propulsion mais aussi le brassage et le mélange suffisant des aliments avec les sécrétions des glandes digestives.

Dans la cavité buccale, le processus mécanique de la digestion est la mastication. Elle est accomplie par la contraction réflexe des muscles masticateurs et ceux des joues, des lèvres et de la langue, en réponse à la pression exercée par les aliments sur les tissus de la bouche. La motricité du pharynx et de l'œsophage assure la déglutition, ensemble des phénomènes moteurs qui font passer les aliments de la bouche à l'estomac. L'œsophage prend une part active dans la déglutition grâce à son péristaltisme. Une onde de contraction annulaire en amont du bol alimentaire, accompagnée d'une dilatation en aval, se propage tout au long de l'œsophage et pousse ainsi son contenu jusqu'à l'estomac.

I.3.1- Fonctions motrices de l'estomac

La motilité de l'estomac est complexe et comporte quatre processus: remplissage, stockage, brassage et évacuation (Sherwood, 2006). Le remplissage de l'estomac est facilité

par la relaxation réflexe de la musculature gastrique commandée par le pneumogastrique. Quand l'onde péristaltique œsophagienne s'approche de l'estomac, une onde de relaxation transmise par les neurones inhibiteurs myentériques se propage dans l'estomac entier et précède le péristaltisme. Cette relaxation réceptive distend fortement l'estomac permettant son remplissage progressif par les aliments. Il y a un important brassage et broyage des aliments dans l'antrum pylorique dont la musculature est plus épaisse et la motricité plus forte. Une onde de contraction prend naissance dans la partie basse du fundus, parcourt le corps et déclenche une contraction plus vigoureuse dans l'antrum. Chaque contraction péristaltique pousse les aliments jusqu'au muscle sphincter pylorique qui se ferme, bloquant tout passage supplémentaire de chyme dans le duodénum. La plus grande partie des aliments bute sur le pylore fermé et reflue dans l'antrum jusqu'à la contraction péristaltique suivante. Ces allers et retours dans l'antrum brassent vigoureusement les aliments, les brisent et les mélangent avec la sécrétion gastrique acide. L'estomac assure enfin l'évacuation lente du chyme dans l'intestin grêle à une vitesse appropriée pour que la digestion et l'absorption se passent dans les meilleures conditions. L'évacuation est favorisée par les contractions péristaltiques intenses de l'antrum (Guyton et Hall, 2006). En général, chaque onde péristaltique qui atteint la musculature du pylore «éjecte» ou fait glisser au maximum 3 mL de chyme dans l'intestin grêle (Marieb, 1999). L'intensité des ondes péristaltiques de l'estomac peut varier considérablement, mais leur fréquence se situe toujours aux environs de 3 contractions par minute; elle est déterminée par l'activité électrique spontanée des cellules rythmogènes (pacemaker) situées au bord de la couche longitudinale de muscle lisse (Marieb, 1999).

I.3.2- Motricité de l'intestin grêle

L'intestin grêle présente deux types de mouvements: la segmentation et le complexe moteur migrant (ou complexe de la mobilité migrante).

Les mouvements de segmentation consistent en des contractions annulaires et oscillantes du muscle lisse circulaire tout le long de l'intestin grêle. Les anneaux de contraction sont distants de quelques centimètres et donnent à l'intestin grêle l'apparence d'un chapelet de saucisses. Ils ne progressent pas le long de celui-ci comme une onde péristaltique. En quelques secondes, les segments contractés se relâchent et les régions antérieurement relâchées se contractent. De ce fait, le chyme contenu dans les segments initialement au repos est poussé dans les deux sens dans les zones nouvellement au repos (Figure 9).

Après un repas, lorsque la grande partie des nutriments a été absorbée, les mouvements de segmentation diminuent et le véritable péristaltisme apparaît. Des ondes péristaltiques partent du duodénum et parcourent lentement l'intestin grêle à raison de 10 à 70 cm à la fois

avant de disparaître, chaque onde prend naissance en un point de plus en plus distal. Cette activité péristaltique est appelée complexe de la mobilité migrante. Un voyage «complet» du duodénum à l'iléon dure environ deux heures. Le processus se répète ensuite, récupérant les restes du repas précédent ainsi que les bactéries, les cellules de la muqueuse détachées et d'autres débris pour les emporter dans le gros intestin. Au moment du repas suivant, lorsque la nourriture arrive dans l'estomac, la segmentation remplace à nouveau le péristaltisme (Marieb, 1999; Hasler, 2006; Sherwood, 2006).

Le péristaltisme dans l'intestin grêle est normalement faible. Toutefois, une irritation intense de la muqueuse intestinale, comme celle qui se produit dans quelques cas graves de diarrhée infectieuse, peut provoquer un péristaltisme exagéré appelé précipitation péristaltique. Des puissantes contractions péristaltiques parcourent de longues distances dans l'intestin grêle en quelques minutes, balayant son contenu dans le côlon et de ce fait soulageant l'intestin du chyme irritable ou de la distension excessive (Guyton et Hall, 2006).

Les mouvements de segmentation de l'intestin grêle, tout comme les ondes péristaltiques de l'estomac, sont déclenchés par l'activité électrique spontanée des cellules rythmogènes situées au bord de la couche longitudinale de muscle lisse. Ces cellules «pacemaker» produisent un rythme électrique de base analogue à celui qui est l'origine du péristaltisme de l'estomac (Sherwood, 2006). Contrairement aux cellules rythmogènes de l'estomac qui ont toutes le même rythme électrique de base, celles de l'intestin grêle se dépolarisent à une fréquence plus élevée dans le duodénum (14 contractions par minute) que dans l'iléon (8 à 9 contractions par minute). L'intensité de la segmentation est modifiée par des réflexes longs mettant en jeu le système nerveux autonome et aussi par des hormones (Marieb, 1999). On pense qu'une hormone controversée, la motiline sécrétée par les cellules endocrines de l'intestin grêle contrôlerait le complexe moteur migrant (Sherwood, 2006).

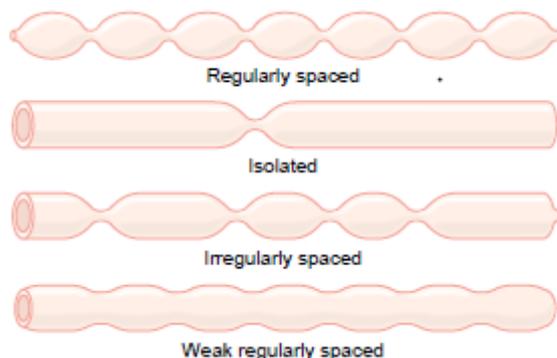


Figure 9: Mouvements de segmentation de l'intestin grêle (Sherwood, 2006; Guyton et Hall, 2006)

I.3.3- Fonctions motrices du gros intestin

La fonction primordiale du gros intestin est de pousser les matières fécales vers l'anus et les évacuer hors de l'organisme (défécation). L'activité motrice comporte aussi deux types de mouvements: les haustrations et les mouvements de masse. Les contractions de haustrations entraînent la formation le long du côlon des poches dilatées analogues aux contractions de segmentation de l'intestin grêle mais beaucoup moins fréquentes. Le siège des haustrations se déplace progressivement; un segment précédemment dilaté se contracte lentement alors qu'un segment contacté se relâche. Ces mouvements lents et non propulsifs, brassent le contenu du côlon et favorisent son contact avec la muqueuse absorbante. Trois à quatre fois par jour, en général après un repas, la motilité du côlon augmente et des mouvements de masse se produisent. De longs segments du côlon ascendant et du côlon transverse se contractent simultanément et propulsent les résidus d'aliments (matières fécales) sur de longues distances vers la partie distale du côlon où ils sont stockés.

Les fèces sont éliminées grâce au réflexe de défécation. L'accumulation du contenu fécal du côlon dans le rectum provoque la distension de celui-ci et la stimulation des récepteurs à l'étirement de sa paroi. Ceci déclenche le réflexe de défécation qui entraîne la contraction vigoureuse du rectum et du côlon sigmoïde et le relâchement du sphincter interne de l'anus. Si le sphincter externe de l'anus est lui aussi relâché, il y a défécation. Si celle-ci n'a pas lieu, la paroi du rectum distendu se relâche progressivement jusqu'à ce qu'un nouveau mouvement de masse propulse plus de fèces dans le rectum, et déclenche à nouveau le réflexe de défécation, et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il y ait défécation volontaire ou que cette action devienne inévitable (Marieb, 1999).

L'activité motrice et les sécrétions gastro-intestinales sont régulées avec précision de façon à permettre un déroulement optimal de la digestion et de l'absorption.

I.4- Mécanismes de la régulation de la motricité et des sécrétions gastro-intestinales

Les fonctions motrices du tractus gastro-intestinal sont réalisées grâce aux différentes couches de muscles lisses (Guyton et Hall, 2006). Les contractions et relaxations coordonnées des couches de muscles lisses longitudinale et circulaire assurent les mouvements de la paroi du tractus gastro-intestinal. L'activité contractile des muscles lisses digestifs se déclenche spontanément; elle est initiée par l'activité électrique spontanée des cellules pacemaker, les cellules interstitielles de Cajal, situées à leur contact ou réparties dans diverses régions dans la paroi (Roman et Mion, 2009). Le rythme et l'intensité des contractions sont toutefois régulés par des mécanismes nerveux extrinsèque et intrinsèque et des facteurs hormonaux (Marieb, 1999). Quatre facteurs principaux sont ainsi impliqués dans la régulation de la motricité du

tube digestif: l'activité autonome des muscles lisses, les cellules interstitielles de Cajal, les plexus nerveux intrinsèques et le système nerveux extrinsèque, et les hormones gastro-intestinales (Sherwood, 2006; Roman et Mion, 2009). Les sécrétions digestives sont aussi régulées presque par les mêmes facteurs que ceux qui contrôlent la motricité.

I.4.1- Rôle du système nerveux intrinsèque dans le contrôle de la motricité digestive et des sécrétions

I.4.1.1-Rôles du système nerveux intrinsèque sur la motricité et les sécrétions

Le tractus gastro-intestinal possède son propre système nerveux appelé système nerveux entérique, localisé entièrement dans la paroi depuis l'œsophage jusqu'au sphincter anal interne. Le système nerveux entérique forme des réseaux de neurones organisés en deux plexus nerveux: le plexus myentérique et le plexus sous-muqueux (Figure 10).

Le plexus myentérique (ou plexus d'Auerbach) contrôle principalement la motricité gastro-intestinale (c'est-à-dire le péristaltisme) en régulant l'activité contractile des deux couches de muscles lisses le long du tractus (Takaki, 2003; Beaugerie et Sokol, 2014). La stimulation de ce plexus provoque des effets excitateurs tels que l'augmentation du tonus contractile du tractus, l'augmentation de l'amplitude et de la fréquence des contractions phasiques et de la vitesse de propagation des ondes excitatrices le long du tractus gastro-intestinal (Guyton et Hall, 2006). Toutefois quelques neurones de ce plexus libèrent des neuromédiateurs inhibiteurs tels que le peptide intestinal vasoactif (VIP) et le monoxyde d'azote (NO) qui ont des effets relaxants bénéfiques notamment sur les sphincters qui règlent le transit des aliments entre des segments successifs du tractus gastro-intestinal, tels que les sphincters pylorique, de la valve ileo-caecale et anal interne (Teramoto et Hirst, 2003; Guyton et Hall, 2006; Kim *et al.*, 2006a).

Le plexus sous-muqueux (ou plexus de Meissner) contrôle les sécrétions glandulaires gastro-intestinales, l'absorption et le débit sanguin local dans chaque segment du tube digestif, ainsi que la contraction locale du muscle sous-muqueux qui détermine le degré de mobilité de la muqueuse gastro-intestinale (Takaki, 2003; Guyton et Hall, 2006). Une excitation locale de l'épithélium (stimulation tactile, irritation chimique, distension) stimule le plexus sous-muqueux qui déclenche des réflexes nerveux qui activent à la fois les cellules muqueuses de surface et les glandes profondes pour augmenter leurs sécrétions. Les mécanismes les plus importants dans la régulation de la sécrétion de l'intestin grêle sont les réflexes entériques locaux déclenchés par le contact du chyme (Guyton et Hall, 2006).

Les terminaisons nerveuses entériques peuvent contenir une douzaine et plus de médiateurs à fonction excitatrice ou inhibitrice sur l'activité motrice et les sécrétions

digestives. Les plus familiers sont l'acétylcholine et la norépinephrine, les autres sont l'oxyde nitrique (NO), l'adénosine triphosphate (ATP), la sérotonine, la dopamine, la cholécystokinine (CCK), la substance P, le polypeptide intestinal vasoactif (VIP), la somatostatine, la leu-enképhaline, la metenképhaline et la bombésine (Porcher, 1999; Farthing, 2000; Guyton et Hall, 2006).

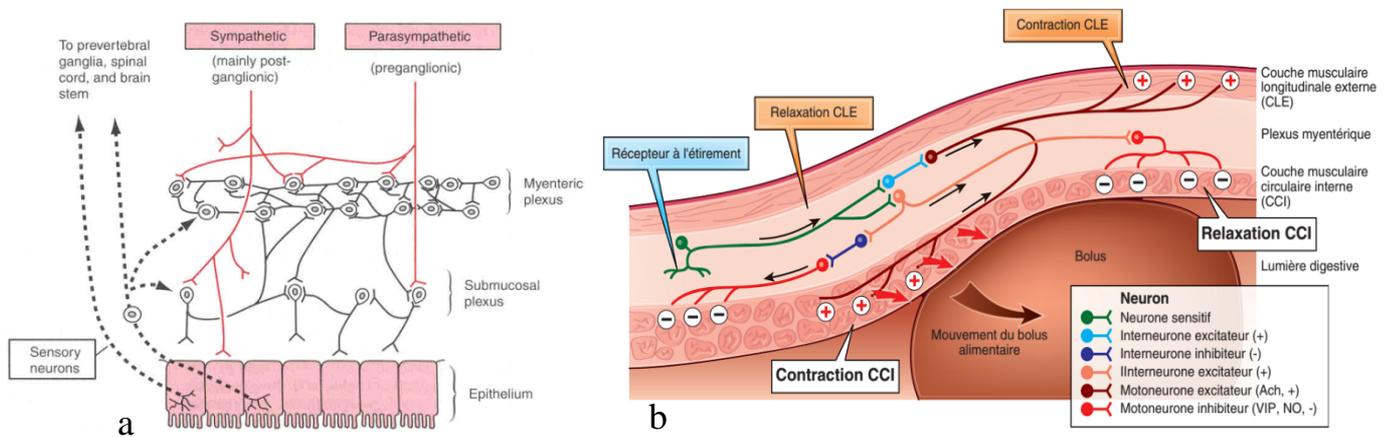


Figure 10: Organisation du système nerveux entérique dans le tractus gastro-intestinal (a) et son rôle dans le réflexe péristaltique (b) (Guyton et Hall, 2006; Beaugerie et Sokol, 2014)

I.4.1.2-Rôle du système nerveux entérique dans le réflexe péristaltique: loi de l'intestin

Le rôle principal du système nerveux entérique est d'assurer la coordination du fonctionnement des deux couches musculaires lisses de la paroi digestive dans le sens oral-aboral lors de la contraction intestinale (Guyton et Hall, 2006; Beaugerie et Sokol, 2014). Le réflexe péristaltique est un exemple type de cette coordination. Lorsqu'un segment d'intestin est soumis localement à une excitation (mécanique, chimique ou électrique, irritation physique), on observe une contraction en amont (contraction ascendante) sur 2-3 cm et une relaxation en aval (relaxation descendante) sur 6-7 cm de la région stimulée (Figure 10b). Cette réaction complexe est appelée réflexe péristaltique. Dans ces conditions, une onde péristaltique débute en amont de la région excitée et progresse le long du tractus dans le sens oral-aboral, propulsant le contenu intestinal sur 5 à 10 cm avant de disparaître. Le réflexe péristaltique et la progression en direction anale du mouvement péristaltique sont connus sous le nom de «loi de l'intestin» (Bayliss et Starling, 1899; Hanani et Freund, 2000, Okishio *et al.*, 2005b; Guyton et Hall, 2006).

Il est connu que les neurones myentériques contiennent les différents circuits neuronaux responsables du péristaltisme de l'intestin. Le péristaltisme ne se produit que faiblement ou presque pas du tout dans toute partie du tractus gastro-intestinal qui présente une absence congénitale du plexus myentérique. C'est-à-dire que la réalisation du réflexe péristaltique exige l'intégrité du plexus myentérique. D'autres études révèlent que pour que pour que la

propagation de l'onde péristaltique puisse se faire, il faut que les rapports anatomiques entre les cellules de muscles lisses et le plexus myentérique soient respectés. Le mécanisme du réflexe péristaltique est clairement établi (Figure 10b): le point de départ est l'étirement (dans le cas d'un étirement local) de l'intestin par l'arrivée des aliments (Guyton et Hall, 2006), ce qui stimule les mécanorécepteurs situés dans la paroi et en relation avec les neurones sensitifs entériques. Les neurones sensitifs font synapses avec des interneurons qui vont assurer (i) en aval la contraction de la couche musculaire longitudinale (qui tire la paroi vers l'arrière) et le relâchement de la couche circulaire sous-jacente, avec comme conséquence un raccourcissement du segment digestif et une diminution de pression (i.e. un élargissement de la lumière), et (ii) en amont une contraction de la couche circulaire (qui pousse le bol alimentaire vers l'aval) et un relâchement de la couche longitudinale, ce qui entraîne un rétrécissement de la lumière et une augmentation de pression. Les interneurons sont cholinergiques. Les motoneurons excitateurs libèrent principalement l'acétylcholine ou la substance P au contact des cellules musculaires, provoquant une dépolarisation membranaire et la survenue de potentiels d'action et par conséquent la contraction musculaire. Les motoneurons inhibiteurs libèrent notamment la norépinephrine, le peptide intestinal vasoactif (VIP), l'adénosine triphosphate (ATP) ou le monoxyde d'azote (NO), qui entraînent une hyperpolarisation membranaire et une relaxation de la fibre musculaire (Aviello *et al.*, 2010).

I.4.2- Commande du système nerveux autonome sur la motricité digestive et les sécrétions

Les plexus nerveux de la paroi digestive reçoivent des afférences du système nerveux autonome. Les fibres nerveuses extrinsèques parasympathiques et sympathiques font synapses à la fois au niveau du plexus myentérique et du plexus sous-muqueux (Figure 10a) aussi bien sur les motoneurons excitateurs que sur les motoneurons inhibiteurs. Bien que le système nerveux entérique soit capable de fonctionner de façon indépendante, les stimulations de fond exercées par les systèmes parasympathique et sympathique peuvent considérablement augmenter ou inhiber les fonctions gastro-intestinales (Guyton et Hall, 2006).

I.4.2.1- Contrôle du système nerveux autonome sur la motricité gastro-intestinale

L'innervation parasympathique du tractus gastro-intestinal est divisée en deux branches: crânienne et sacrée (Figure 11). Les fibres crâniennes sont presque entièrement constituées par les nerfs vagues à l'exception de quelques fibres menant à la région bucco-pharyngienne. Les fibres sacrées empruntent les nerfs pelviens qui vont à la moitié distale du gros intestin jusqu'à l'anus (régions sigmoïde, rectale et anale). L'innervation sympathique provient de la moelle épinière thoraco-lombaire et est constituée par les nerfs splanchniques et

hypogastriques provenant des ganglions coéliquas et mésentériques (Guyton et Hall, 2006; Beaugerie et Sokol, 2014).

Classiquement, le système parasympathique augmente l'activité péristaltique et tend à diminuer l'activité contractile tonique des sphincters (Beaugerie et Sokol, 2014). L'innervation vagale est impliquée aussi bien dans les contractions (renforcement des contractions péristaltiques) que dans les relâchements de la paroi digestive (relaxation réceptive de l'estomac). Le système sympathique par contre inhibe l'activité motrice du tractus gastro-intestinal, entraînant plusieurs effets contraires à ceux du système parasympathique (inhibition du péristaltisme et renforcement du tonus des sphincters) (Guyton et Hall, 2006). La forte stimulation du système sympathique peut considérablement affecter les activités motrices intestinales de manière à bloquer littéralement le déplacement du bol alimentaire. Les actions du parasympathique sur la motricité gastro-intestinale sont exercées via la libération au niveau de toutes les terminaisons nerveuses, de l'acétylcholine dont les effets sont globalement excitateurs. Les terminaisons des nerfs sympathiques sécrètent principalement la noradrénaline mais également un peu d'adrénaline. Le sympathique exerce ses effets de deux manières: à un faible degré par effet direct de la noradrénaline qui inhibe les muscles lisses gastro-intestinaux (excepté la musculaire muqueuse qu'elle excite), et à un degré important par un effet inhibiteur de la noradrénaline sur les neurones du système nerveux entérique (Guyton et Hall, 2006). Dans l'iléon de cobaye, très peu de fibres sympathiques sont présentes dans le muscle longitudinal ou circulaire, impliquant ainsi que l'inhibition du sympathique sur la motilité intestinale se fait par l'entremise du plexus myentérique (Damabi et al., 2010).

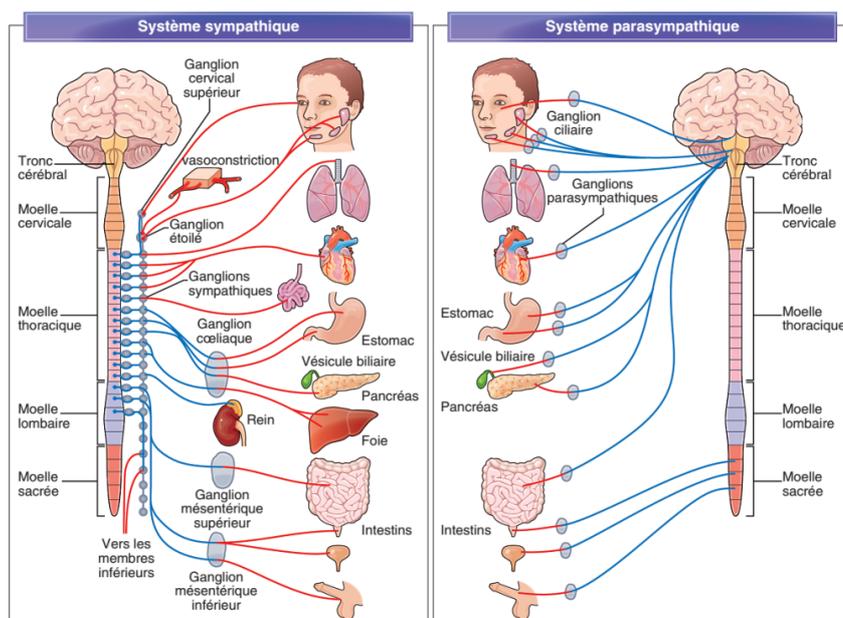


Figure 11: Anatomie générale du système nerveux autonome montrant l'innervation des organes digestifs (Beaugerie et Sokol, 2014)

I.4.2.2-Contrôle du système nerveux autonome sur les sécrétions digestives

La stimulation des nerfs parasympathiques du tractus digestif augmente presque invariablement les sécrétions de la plupart des glandes digestives. La stimulation des nerfs sympathiques provoque aussi une augmentation légère ou modérée des sécrétions de certaines glandes locales. Mais elle a également comme conséquence la constriction des vaisseaux sanguins qui irriguent les glandes. Par conséquent, la stimulation sympathique imposée réduit habituellement les sécrétions parfois de manière sensible, principalement en raison de la vasoconstriction qui réduit le flux de sang dans les glandes (Guyton et Hall, 2006). Le système sympathique augmente l'absorption à la fois de sels et de l'eau (Damabi *et al.*, 2010).

I.4.3- Rôles des hormones sur la motricité et des sécrétions gastro-intestinales

Des cellules endocrines présentes dans la muqueuse de l'estomac et l'intestin grêle sécrètent, en cas de stimulation appropriée, diverses hormones et substances apparentées, qui régulent le volume et le rythme des sécrétions des glandes digestives. Les hormones gastro-intestinales sont entre autres: la gastrine, l'histamine, les endorphines (opiacés naturels), la sérotonine, la somatostatine, la sécrétine, la cholécystokinine (CCK), la gastrine entérique, le peptide inhibiteur gastrique (GIP), le peptide intestinal vasoactif (VIP), la motiline (Marieb, 1999; Guyton et Hall, 2006). La sécrétine et la CCK sont sécrétées par la muqueuse du duodénum en réponse à la présence du chyme acide ou gras dans le duodénum; elles ont un rôle majeur dans le contrôle de la sécrétion pancréatique et biliaire. La sécrétine stimule la production d'une solution aqueuse riche en bicarbonates par les cellules tapissant les canaux pancréatiques et les conduits biliaires du foie. La CCK stimule la sécrétion des enzymes digestives par les cellules acineuses du pancréas.

La plupart de ces hormones exercent également des effets excitateurs ou inhibiteurs sur la motilité de certaines régions du tractus, bien que ces effets soient habituellement moins importants que ceux exercés sur les sécrétions glandulaires (Sherwood, 2006). Le rôle principal de la CCK est de stimuler la contraction de la vésicule biliaire permettant la libération de la bile et détendre le muscle sphincter de l'ampoule hépato-pancréatique pour permettre à la bile et au suc pancréatique d'entrer dans le duodénum (Marieb, 1999). La sécrétine inhibe les contractions de l'antré et par conséquent freine l'évacuation du chyme dans l'intestin grêle (Sherwood, 2006). Le peptide inhibiteur gastrique (GIP) est sécrété par la muqueuse de la partie supérieure de l'intestin principalement en réponse à la présence d'acides gras, d'acides aminés et des carbohydrates; elle inhibe également l'activité motrice de l'estomac, ralentissant la vidange de son contenu dans le duodénum lorsque la partie supérieure de l'intestin grêle est déjà rempli d'aliments. La gastrine par contre stimule la

motricité gastrique et l'évacuation du chyme. La motiline est sécrétée par la partie supérieure du duodénum pendant le jeûne; la seule fonction connue de cette hormone est d'accroître la motilité gastro-intestinale (Guyton et Hall, 2006).

I.5- Activité contractile autonome du muscle lisse gastro-intestinal

Le muscle lisse gastro-intestinal est doué d'une activité contractile autonome d'origine myogène, caractérisée par l'apparition spontanée des contractions phasiques (Nakamura et Suzuki, 2004). Expérimentalement un fragment d'intestin isolé de l'organisme (ou des tissus de muscle lisse isolés de l'intestin) et placé dans un liquide de survie se contracte spontanément en dehors de toute stimulation ou innervation extrinsèque (Shimizu *et al.*, 2000; Hotta *et al.*, 2005).

I.5.1- Base électrique de l'activité contractile du muscle lisse gastro-intestinal

Les muscles lisses de l'intestin, de la vessie urinaire ou du canal déférent (dits de type B) sont capables de générer des potentiels d'action spontanément et produire ainsi des contractions spontanées (Shimizu *et al.*, 2000). Le muscle lisse gastro-intestinal est excité en permanence par une activité électrique intrinsèque presque continue le long des membranes des fibres musculaires. Cette activité se caractérise par la production rythmique de deux types d'ondes électriques (Figure 12): les ondes lentes et les potentiels de pointe rapides, aussi appelés potentiels d'action (Nakamura et Suzuki, 2004; Guyton et Hall, 2006; Kim *et al.*, 2006a; Eshraghian et Eshraghian, 2011).

I.5.1.1- Ondes lentes

L'activité électrique la plus habituelle des cellules du muscle lisse gastro-intestinal consiste en la production des ondes lentes de potentiel dont la régularité détermine le rythme électrique de base. Les ondes lentes sont des variations cycliques (oscillations ondulantes) du potentiel de membrane de repos qui s'éloigne puis se rapproche alternativement du seuil de potentiel (Bernex, 2006).

I.5.1.2- Potentiels de pointe ou potentiels d'action

Dans des conditions normales, le potentiel de membrane de repos des fibres musculaires lisses gastro-intestinales est d'environ -56 millivolts (entre -50 et -60 millivolts). Chaque fois que le potentiel de membrane devient temporairement plus positifs au-delà de -40 millivolts (c'est-à-dire que les pics des ondes lentes de dépolarisation atteignent le seuil de potentiel), une vague de potentiels d'action apparaissent automatiquement (Figure 12), ce qui cause des cycles de contractions du muscle lisse (Bernex, 2006). Plus l'amplitude des ondes lentes est élevée, plus grande est la fréquence des potentiels d'action, habituellement comprise

entre 1 et 10 ondes par seconde (Guyton et Hall, 2006). Le fait que le seuil de potentiel soit atteint dépend des facteurs extrinsèques (mécaniques, chimiques, nerveux et hormonaux) qui s'exercent sur le muscle lisse et influencent le potentiel de repos (Sherwood, 2006).

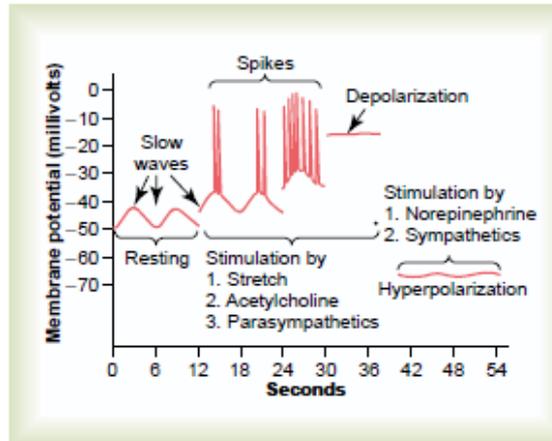


Figure 12: Réponses électriques de la cellule musculaire lisse gastro-intestinale (Guyton et Hall, 2006)

I.5.1.3- Phénomènes ioniques à l'origine de l'activité électrique du muscle lisse gastro-intestinal

L'activité électrique des cellules du muscle lisse gastro-intestinal, comme celle de toute cellule excitable, est due à des flux d'ions à travers la membrane cellulaire. Les ondes lentes sont des dépolarisations et repolarisations successives, causées par des modifications spontanées du transport actif d'ions Na^+ à travers la membrane des fibres musculaires (Sherwood, 2006). Dans les fibres nerveuses et certaines cellules musculaires (ex. fibres striées), les potentiels d'action sont provoqués presque entièrement par l'entrée rapide d'ions sodium dans les cellules à travers les canaux à sodium. Dans les cellules musculaires gastro-intestinales et les muscles lisses en général, les canaux responsables des potentiels d'action sont quelque peu différents; ils permettent particulièrement l'entrée d'un grand nombre d'ions calcium avec un petit nombre d'ions sodium, et sont appelés canaux calcium-sodium (Guyton et Hall, 2006). Ainsi le potentiel d'action de la cellule musculaire lisse est dû essentiellement à l'entrée d'un grand nombre d'ions Ca^{2+} dans la cellule à travers les canaux calciques membranaires, majoritairement les canaux calciques voltage-dépendants de type L sensibles aux dihydropyridines (Golenhofen et Lammer, 1972; Ozaki *et al.*, 1991; Nakamura et Suzuki, 2004). L'afflux de Ca^{2+} qui accompagne les potentiels d'action de la cellule de muscle lisse, entraîne une augmentation brutale de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre, qui déclenche la contraction musculaire (Loirand *et al.*, 1997; Guyton et Hall, 2006).

I.5.2- Origine de l'activité contractile autonome du muscle lisse gastro-intestinal

I.5.2.1- Les cellules interstitielles de Cajal, potentielles cellules auto-excitables du tractus gastro-intestinal

La plupart des contractions spontanées gastro-intestinales se produisent de manière rythmique et ce rythme est déterminé principalement par la fréquence d'apparition des ondes lentes au niveau de la membrane des cellules de muscles lisses (Guyton et Hall, 2006). La cause précise à l'origine des ondes lentes n'est pas complètement comprise. Toutefois elles semblent résulter des interactions complexes établies entre les cellules de muscles lisses et les cellules spécialisées qui agiraient comme des «pacemaker électrique» pour les cellules musculaires lisses (Guyton et Hall, 2006). Récemment il est apparu évident que les cellules interstitielles de Cajal (ICC) largement réparties dans la paroi du tractus gastro-intestinal, entre les couches de muscles lisses ou au sein même du tissu musculaire, sont les cellules pacemaker à l'origine de l'activité électrique spontanée du tractus gastro-intestinal (Thunerberg *et al.*, 1982; Hara *et al.*, 1986; Ward *et al.*, 1994; Huizinga *et al.*, 1995; Sanders, 1996; Edwards *et al.*, 1999; Suzuki, 2000; Hirst et Ward, 2003; Kito et Suzuki, 2003; Takaki, 2003; Nakamura et Suzuki, 2004; Okishio *et al.*, 2005a; Kim *et al.*, 2006a; Kito et Suzuki, 2006; Sanders *et al.*, 2006ab). Dans l'estomac de cobaye, l'excitation des cellules interstitielles de Cajal distribuées dans les régions proches de la couche myentérique (ICC-MY) est suivie de celle des cellules de muscles lisses, indiquant directement que les ICC-MY produisent des potentiels pacemaker pour les ondes lentes (Dickens *et al.*, 1999; Nakamura et Suzuki, 2004).

Les évidences s'accroissent qui justifient le rôle essentiel des cellules interstitielles de Cajal dans la production de l'activité électrique pacemaker dans le tractus gastro-intestinal:

- Les ICC sont des cellules de nature musculaire mais non contractiles; elles ont été mises en évidence dans toutes les parties du gastro-intestinal, de l'œsophage au sphincter anal interne chez l'homme et nombreuses espèces animales (Porcher, 1999; Bernex, 2006). Depuis leur caractérisation par Raymond Y Cajal (Cajal, 1893), quatre populations de ICC ont été identifiées (Figure 13). Les plus nombreuses sont situées dans le plexus myentérique entre les deux couches musculaires lisses (ICC-MY), les autres au sein même des couches musculaires (ICC-IM), au niveau de la sous-muqueuse (ICC-SM) et dans le plexus nerveux de la couche musculaire profonde (ICC-DMP) (Takaki, 2003; Bassotti *et al.*, 2005; Bernex, 2006).

- Les ICC forment un réseau les unes avec les autres par l'intermédiaire de larges zones de contact établies entre les ICC voisines (Thunerberg, 1982, Komuro *et al.*, 1996, 1999; Kito et Suzuki, 2006), et sont connectées aux cellules musculaires lisses et aux structures nerveuses par des contacts étroits de type gap-jonction (Bernex, 2006; Guyton et Hall, 2006). Cette

association structurale suggère des interactions fonctionnelles entre les ICC et les cellules musculaires et les cellules nerveuses (Hirst et Edwards, 2001, Bernex, 2006).

- Les ICC expriment sur leur membrane un récepteur à activité tyrosine-kinase, c-kit, qui permet leur caractérisation par des techniques d'immunohistochimie (Huizinga *et al.*, 1995; Porcher, 1999; Bernex, 2006; Eshraghian et Eshraghian, 2011). Dans l'intestin des souris c-kit mutantes, W/W^V, qui ont perdu sélectivement l'expression de la protéine c-kit, les ondes lentes sont complètement absentes, suggérant ainsi que les cellules exprimant le récepteur c-kit sont essentielles dans la génération des ondes lentes (Maeda *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 1994; Huizinga *et al.*, 1995, 1997, Nakamura et Suzuki, 2004; Bernex, 2006). Chez ces animaux, le réflexe de contraction ascendante et relaxation descendante en réponse à un stimulus localisé est considérablement diminué ou pas du tout induit, suggérant que les ICC-MY jouent un rôle essentiel dans le déclenchement du réflexe péristaltique (Hanani et Freund, 2000; Fujita *et al.*, 2004, Takeuchi *et al.*, 2004, Okishio *et al.*, 2005a; Okishio *et al.*, 2005b).

- Des investigations sur la physiopathologie des altérations fonctionnelles de muscle lisse gastro-intestinal ont révélé dans la plupart des cas, les atteintes des réseaux de ICC s'accompagnent presque invariablement de profondes perturbations de la motricité, telle que rapportée dans diverses affections telles que la constipation de transit lent, les maladies inflammatoires de l'intestin, les maladies gastro-intestinales fonctionnelles (ex. syndrome de l'intestin irritable) et l'autisme (Maeda *et al.*, 1992; Bassotti *et al.*, 2005; Okishio *et al.*, 2005b; Kim *et al.*, 2006a; Kim *et al.*, 2006b; Sama, *et al.*, 2008, Eshraghian et Eshraghian, 2011).

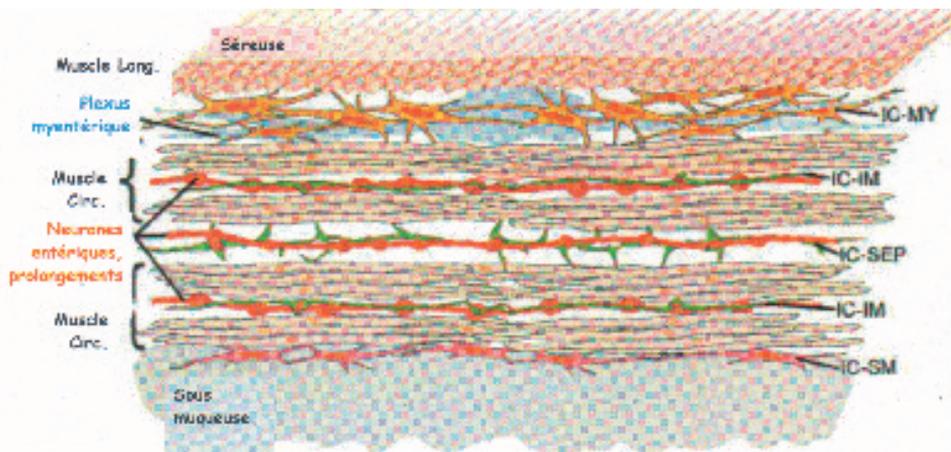


Figure 13: Localisation et relations anatomiques des ICC (Bernex, 2006)

I.5.2.2- Différents rôles des ICC dans le déclenchement et la régulation de l'activité contractile du muscle lisse gastro-intestinal

Les cellules interstitielles de Cajal (ICC) constituent des cellules clé dans la genèse et l'organisation de l'activité auto-rythmique du tractus gastro-intestinal (Koh *et al.*, 1998; Porcher, 1999). Trois fonctions principales ont été proposées pour les ICC (Bernex, 2006):

- déclencher l'activité électrique et réguler la propagation dans le tractus digestif (Hirst et Edwards, 2001, Bernex, 2006). Les ICC sont des cellules auto-excitables; elles subissent des variations périodiques du potentiel de membrane dues à des canaux ioniques qui s'ouvrent périodiquement (Guyton et Hall, 2006) et génèrent des courants actifs (potentiels pacemaker) qui peuvent être enregistrés au niveau de la membrane cellulaire (Kito et Suzuki, 2006). Les potentiels pacemaker se propagent de manière électrotonique à travers les réseaux de ICC et sont conduits via des jonctions étroites aux couches cellulaires de muscles lisses circulaires et longitudinales (Figure 14) où elles déclenchent les ondes lentes et éventuellement des potentiels d'action (Takaki, 2003; Hotta et al., 2005; Kim et al., 2006a; Kim et al., 2006b).

- assurer la neurotransmission des signaux des neurones entériques aux cellules de muscles lisses. Les ICC jouent un rôle essentiel dans le traitement des informations au niveau du système nerveux entérique (Bassotti et al., 2005; Bernex, 2006), notamment dans la transmission des messages nerveux des neurones sensitifs aux neurones moteurs excitateurs ou inhibiteurs du plexus myentérique (Fujita et al., 2004, Okioshio et al., 2005a, b, Ward et al., 2006).

- agir comme des mécanorécepteurs. Certaines ICC répondent directement à l'étirement du muscle lisse gastro-intestinal par une dépolarisation membranaire et une augmentation proportionnelle de la fréquence des ondes lentes (Won et al., 2005, Bernex, 2006).

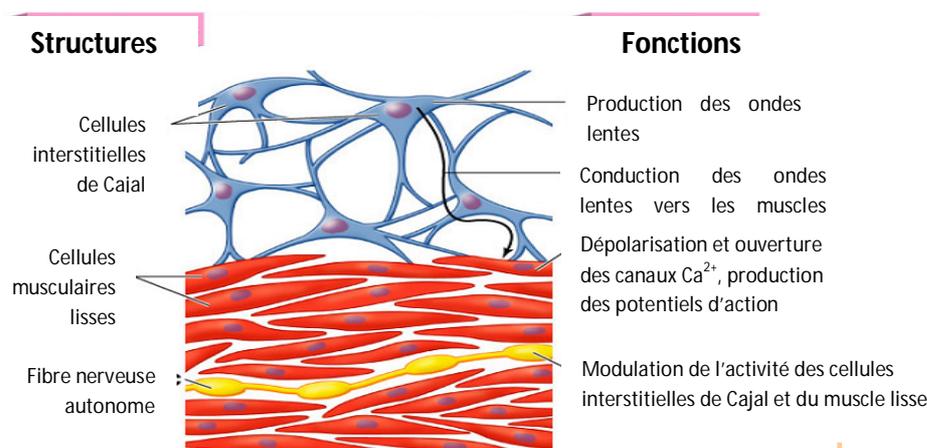


Figure 14: ICC et régulation de l'activité contractile du muscle lisse intestinal (Mader, 2004)

I.6- Contraction/relaxation du muscle lisse gastro-intestinal

I.6.1- Caractères morphologiques, structuraux et fonctionnels des cellules musculaires lisses gastro-intestinales

Les cellules du muscle lisse gastro-intestinal sont généralement fusiformes avec des extrémités pointues et parfois bifides et un noyau central. Dans chaque couche de muscles lisse, les cellules sont réunies en faisceaux de plus de 1000 fibres parallèles (Guyton et Hall, 2006) associées entre elles par une charpente de tissu conjonctif lâche (endomysium)

constitué du collagène et de l'élastine (Fattoum, 1997). En coupe transversale, les cellules ont un contour polygonal et sur les coupes longitudinales, elles apparaissent sous forme de faisceaux linéaires (Figure 15a, b). Chaque cellule est entourée d'une lame basale externe, celle-ci fait défaut au niveau des jonctions communicantes ou "gap junctions" où les membranes plasmiques des cellules adjacentes s'unissent (Marieb, 1999).

Les cellules de muscle lisse contiennent certes des filaments contractiles: les filaments épais de myosine et les filaments fins d'actine. Mais ces filaments ne forment pas de myofibrilles et ne sont pas organisés en sarcomères comme dans le muscle squelettique. L'ensemble des filaments épais et filaments fins forment un réseau orienté légèrement en diagonale dans la cellule (Figure 15c,d). Des filaments de taille intermédiaire propres aux muscles lisses, ainsi que des structures particulières appelées corps denses et bandes denses associées au cytoplasme et au sarcolemme, servent de points d'ancrage des groupes de filaments fins et orientent la traction exercée par les têtes de myosine lors de la contraction (Marieb, 1999). Les filaments de myosine de muscles lisses sont plus longs et portent des têtes de myosine sur toute leur longueur, une caractéristique qui permet à ces muscles d'être aussi puissants que les muscles squelettiques de même taille. Les filaments fins d'actine contiennent de la tropomyosine, mais sont dépourvus de troponine (Fattoum, 1997).

Un autre caractère remarquable de ces cellules est le faible développement du réticulum sarcoplasmique et l'absence de tubules transverses. La membrane plasmique présente de nombreuses petites invaginations appelées caveolae ou vésicules plasmalemmales, qui fonctionnent d'une façon analogue au système de tubules transverses des cellules musculaires striées, en contrôlant l'entrée d'ions Ca^{2+} dans la cellule. Les caveolae contiennent du liquide interstitiel et permettent la concentration du Ca^{2+} tout près de la membrane cellulaire (ce sont des véritables réserves du calcium extracellulaire) (Fattoum, 1997). Lorsque les canaux Ca^{2+} s'ouvrent, l'afflux de Ca^{2+} à partir des caveolae arrive rapidement dans la cellule. Ainsi, même si le réticulum sarcoplasmique libère une partie d'ions Ca^{2+} qui déclenchent la contraction, c'est de l'espace extracellulaire que provient la plus grande partie des ions calcium nécessaire à la contraction du muscle lisse (Marieb, 1999).

Dans les conditions de repos, il y a suffisamment de Ca^{2+} dans le cytosol de nombreux muscles lisses unitaires pour qu'ils produisent une légère contraction en l'absence de potentiel d'action: c'est le tonus de base. L'augmentation soudaine de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire qui accompagne les potentiels d'action d'origine myogène, cause une forte contraction qui se superpose au tonus de base préexistant (Sherwood, 2006).

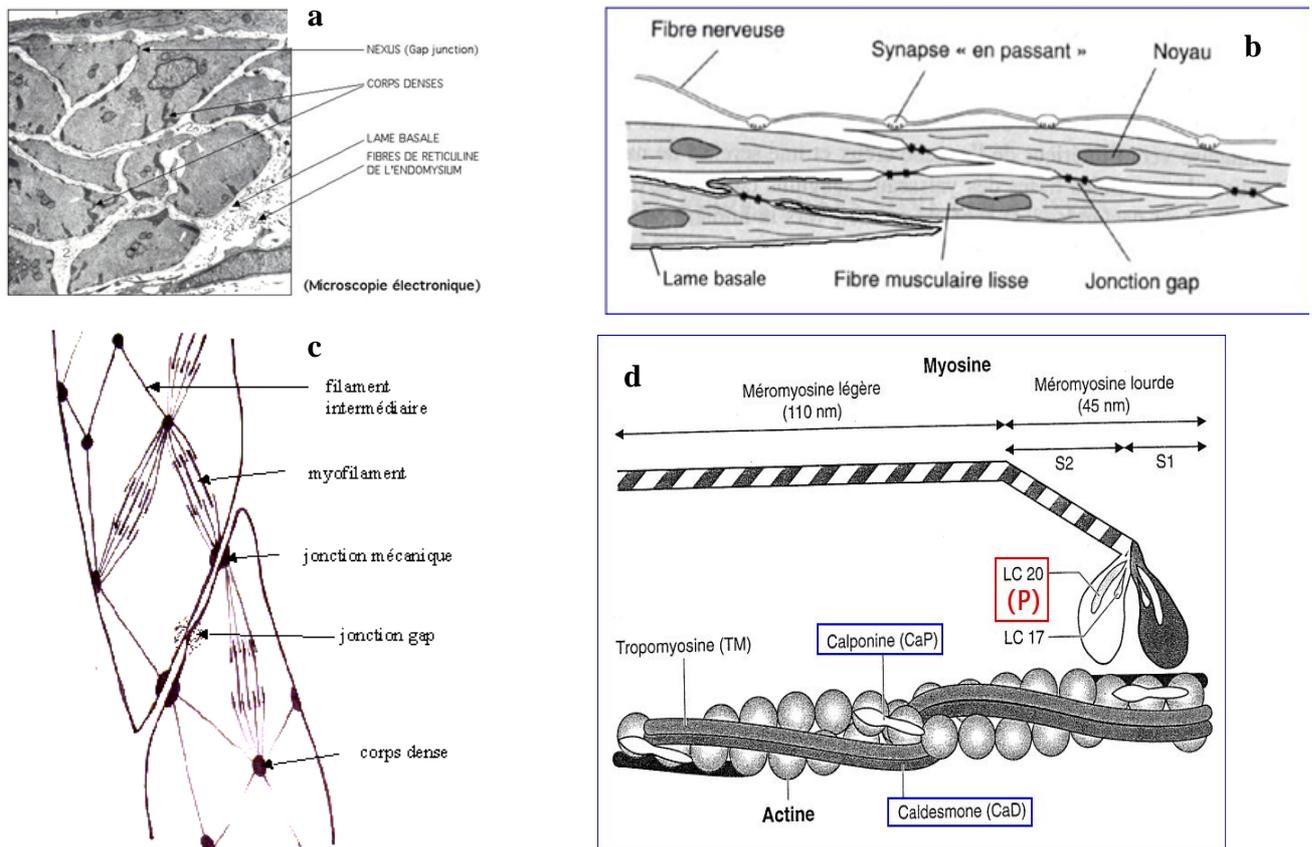


Figure 15: Quelques aspects morphologiques et structuraux des cellules musculaires lisses gastro-intestinales (Fattoum, 1997)

I.6.2.-Mécanisme moléculaire de la contraction du muscle lisse gastro-intestinal: couplage excitation-contraction

La contraction des muscles lisses comme celle du muscle squelettique, est réalisée par glissement des filaments fins d'actine qui coulissent entre les filaments épais de myosine. L'augmentation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} est le stimulus primaire qui déclenche la contraction (Sanders, 2001, Hu *et al.*, 2010). Bien que le Ca^{2+} joue le même rôle primordial de déclencheur de la contraction dans tous les types de muscles, le mécanisme d'activation de la contraction des cellules de muscles lisses est différent. Dans les cellules de muscles lisses, pour activer la myosine, le Ca^{2+} interagit avec des protéines régulatrices qui font partie des filaments épais, en l'occurrence la calmoduline située sur les têtes de myosine et une enzyme appelée kinase des chaînes légères de myosine ("myosin light chain kinase" ou MLCK). La séquence des évènements est la suivante (Figure 16):

(1) lorsque la concentration intracellulaire de Ca^{2+} est élevée (environ 10^{-5} mol/L), le calcium ionique Ca^{2+} se lie à la calmoduline entraînant la formation du complexe Ca^{2+} -calmoduline (4 ions Ca^{2+} se lient à une molécule de calmoduline);

(2) le complexe Ca^{2+} -calmoduline active à son tour en se complexant à elle, la kinase des chaînes légères de la myosine (ou MLCK);

(3) la kinase (MLCK) activée catalyse le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP à la myosine, ce qui conduit à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC 20);

(4) à la suite de cette phosphorylation, la tête de myosine peut interagir avec l'actine des filaments fins, entraînant le glissement des myofilaments d'actine sur les myofilaments de myosine et le raccourcissement de la cellule musculaire (contraction). L'énergie nécessaire au mouvement est produite par l'activité ATPasique intrinsèque de la myosine; elle hydrolyse les molécules d'ATP pour entretenir la formation cyclique des ponts acto-myosine;

(5) comme dans les muscles squelettiques, quand la concentration intracellulaire de Ca^{2+} diminue (inférieure à 10^{-6} mol/L), les muscles lisses se relâchent. Le relâchement est assuré par la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine (et par conséquent la dissociation des ponts acto-myosine); elle est catalysée par une autre enzyme, la phosphatase des chaînes légères de myosine ("myosin light chain phosphatase" ou MLCP) (Somlyo, 1985, Horowitz *et al.*, 1996; Fattoum, 1997; Loirand *et al.*, 1997; Sanders, 1998; Bolton *et al.*, 1999; Makhoulf et Murthy, 2006).

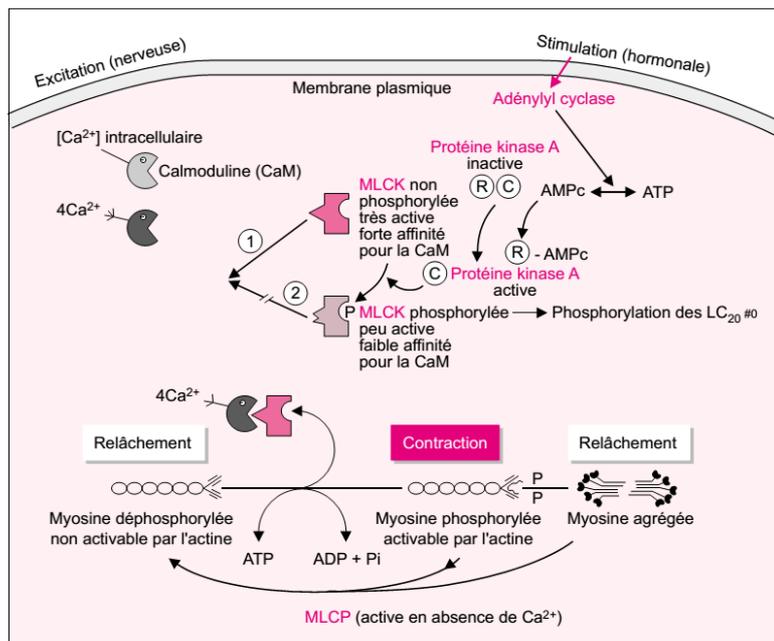


Figure 16: Mécanisme moléculaire de la contraction/relaxation des cellules de muscles lisses (Fattoum, 1997)

MLCK: myosin light chain kinase, MLCP: myosin light chain phosphatase, C: sous-unité catalytique, R: sous-unité régulatrice.

I.7 -Mécanismes de régulation de la contraction/relaxation de la cellule musculaire lisse gastro-intestinale

Deux principaux facteurs conditionnent le degré de contraction et de relaxation des cellules musculaires lisses: la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique ($[Ca^{2+}]_i$) et la

sensibilité au Ca^{2+} de l'appareil contractile (Loirand *et al.*, 1997; Sanders, 2008). Schématiquement, les vasoconstricteurs élèvent la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique et la sensibilité de l'appareil contractile au Ca^{2+} , les vasorelaxants diminuent la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique et désensibilisent l'appareil contractile au Ca^{2+} (Loirand *et al.*, 1997). Dans les muscles lisses phasiques gastro-intestinaux, la modulation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) est assurée principalement par les phénomènes électriques qui régulent l'entrée de Ca^{2+} à travers les canaux Ca^{2+} de type L, mais aussi la libération et la reprise du Ca^{2+} des réserves intracellulaires (Somlyo et Somlyo, 1994, Loirand *et al.*, 1997; Sanders, 1998). La sensibilité de l'appareil contractile au Ca^{2+} dépend du degré de phosphorylation de la sous-unité régulatrice de la chaîne légère de myosine 20 kDa (MLC₂₀). Cette phosphorylation est déterminée par la balance entre l'activité de la "myosin light chain kinase" (MLCK) et l'activité de la "myosin light chain phosphatase" (MLCP) (Fattoum, 1997; Ohama *et al.*, 2007). L'entrée, le relargage et le recaptage de Ca^{2+} ainsi que les mécanismes de régulation de la sensibilité au Ca^{2+} de l'appareil contractile sont contrôlés chacun par des effets sous-jacents à l'activation des récepteurs couplés aux protéines G. Les récepteurs couplés aux protéines G reçoivent la plupart des signaux nerveux, hormonaux et paracrines qui parviennent aux cellules du muscle lisse gastro-intestinal. Les neurotransmetteurs excitateurs sont couplés principalement aux protéines G_{q/11} et G_{i/G0} et exercent leurs actions via la formation de l'inositol triphosphate et du diacylglycerol et l'inhibition de l'adenylyl cyclase. Divers neurotransmetteurs inhibiteurs sont couplés via la protéine G_s et l'activation de adenylyl cyclase. Il existe, toutefois, des exemples intéressants de neurotransmetteurs inhibiteurs qui apparemment utilisent les voies régulées par la protéine G_{q/11} pour induire des réponses par libération localisée du Ca^{2+} et activation des canaux ioniques Ca^{2+} - dépendants (Sanders, 1998). Telle que illustré sur la [figure 17](#), différents mécanismes sont impliqués dans la régulation de la contraction et de la relaxation de la cellule musculaire lisse, parmi lesquels: l'activation des voies de signalisation intracellulaires et la production de seconds messagers, l'activation des canaux ioniques membranaires (1) et des récepteurs membranaires (2), la sensibilisation de l'appareil contractile au calcium (3), etc.

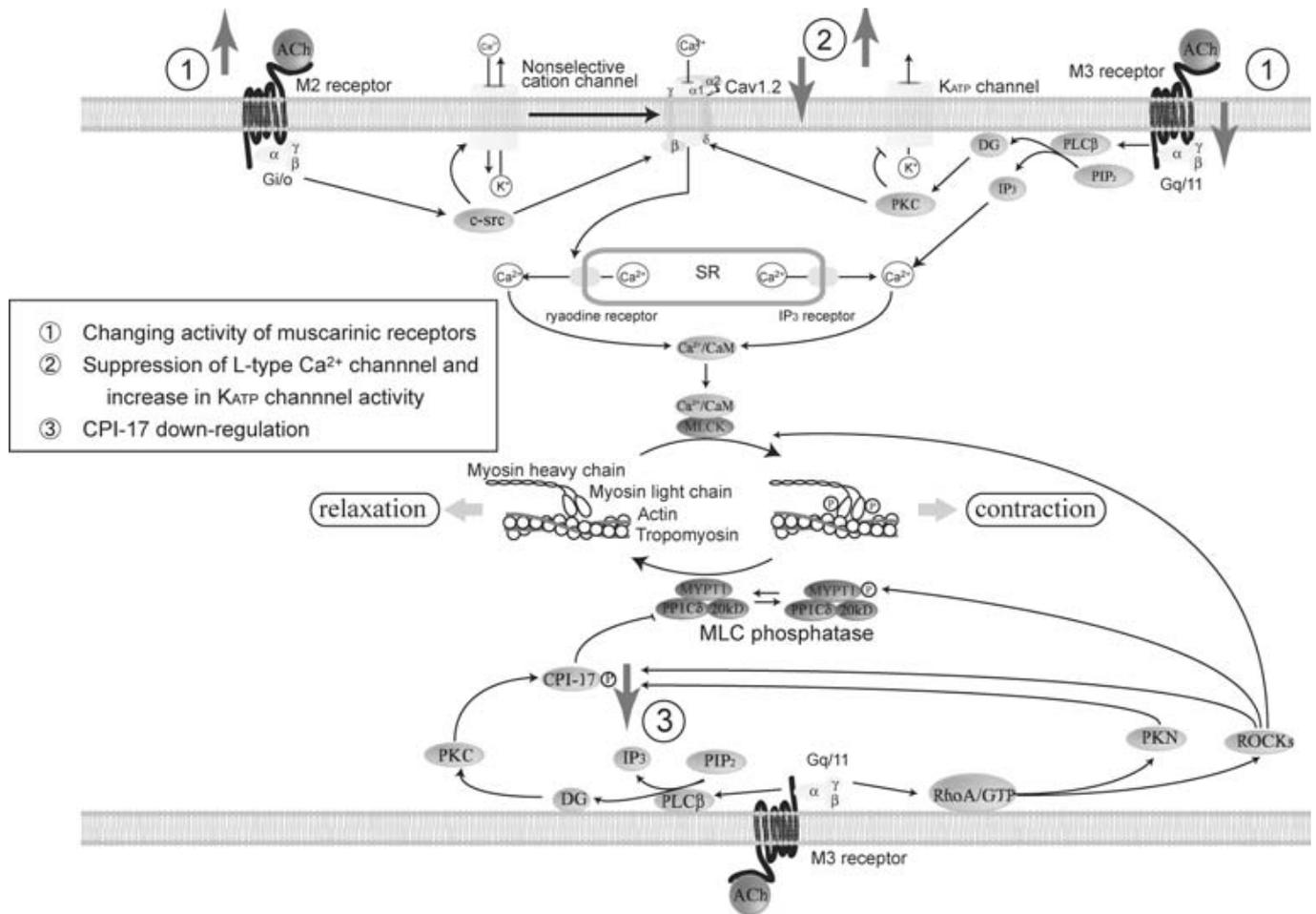


Figure 17: Quelques mécanismes de régulation de la contraction/relaxation de la cellule de muscle lisse intestinal (Ohama *et al.*, 2007)

I.7.1- Canaux ioniques participant à l'activation de la contraction et de la relaxation du muscle lisse gastro-intestinal

Les canaux ioniques majeurs qui modulent la contraction et la relaxation de la cellule musculaire lisse sont les canaux calciques, les canaux potassiques, les canaux à chlorure. La contraction est indépendante des canaux sodiques dont l'inhibition par la tétrodothoxine est sans effet (Kuriyama *et al.*, 1995, Loirand *et al.*, 1997).

I.7.1.1- Les canaux calciques et les pompes calciques

L'augmentation du Ca^{2+} libre cytosolique dans les cellules de muscles lisses a une double origine. La plus grande partie de Ca^{2+} provient du liquide extracellulaire (LEC) sous l'effet de son gradient de concentration. Une autre partie du Ca^{2+} provient de sa libération des sites de stockage intracellulaires essentiellement constitués par le réticulum sarcoplasmique (Makhlouf, 1994, Karaki H *et al.*, 1997, Bolton *et al.*, 1999; Tanovic *et al.*, 2000, Shin *et al.*, 2005; Chiwororo et Ojewole, 2009; Aviello *et al.*, 2010). L'entrée du Ca^{2+} dans la cellule musculaire lisse à partir du LEC ou son relargage dans le cytosol à partir du compartiment

intracellulaire sont contrôlés respectivement par des canaux ioniques perméables au Ca^{2+} de la membrane plasmique ou du réticulum sarcoplasmique. Le Ca^{2+} extracellulaire entre dans la cellule de muscle lisse par deux voies différentes: les canaux calciques récepteur-dépendants (ROCCs) et les canaux calciques voltage-dépendants (VOCCs) (Karaki *et al.*, 1997; Datte *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 2005; Thorneloe et Nelson, 2005; Imtiaz *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2008). Ces dernières années, des mesures combinées des courants transmembranaires et de la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique ont révélé l'existence d'autres voies d'entrée de Ca^{2+} dans les cellules musculaires lisses, telles que l'entrée capacitive de Ca^{2+} et les canaux cationiques non spécifiques perméables au Ca^{2+} (Figure 17) (Berridge, 1995, Loirand *et al.*, 1997; Sanders, 1998). Deux types de canaux calciques contribuent à la libération du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique des muscles lisses: un récepteur-canal activé par l'inositol 1,4,5 trisphosphate (ou récepteur de l'IP3) et un récepteur-canal activé par le Ca^{2+} et défini pharmacologiquement comme étant le site de liaison spécifique d'un alcaloïde, la ryanodine (ou récepteur de la ryanodine) (voir figure 17). Le Ca^{2+} entrant déclenche l'ouverture des canaux Ca^{2+} sensibles à la ryanodine du réticulum sarcoplasmique et la sortie de Ca^{2+} (phénomène de *Ca-induced Ca-released* ou CICR) (Berridge et Irwin, 1989; Berridge, 1991; Desiré *et al.*, 2010). Les entrées de Ca^{2+} extracellulaire sont essentiellement modulées par le potentiel de membrane (couplage électromécanique), les libérations de Ca^{2+} et la sensibilité de l'appareil contractile au Ca^{2+} dépendant de messagers intracellulaires (couplage pharmacomécanique (Somlyo et Somlyo, 1968). Néanmoins, il apparaît que ces deux types de transmission du signal sont étroitement imbriqués (Loirand *et al.*, 1997). La quantité de Ca^{2+} qui entre dans la cellule par les canaux Ca^{2+} de type L est essentiellement déterminée par le potentiel de membrane. Des messagers extracellulaires (acétylcholine, histamine, noradrénaline) qui modulent l'activité contractile agissent directement sur ces canaux (Figure 17) et en augmentent la probabilité d'ouverture à un potentiel donné (Loirand *et al.*, 1997).

La diminution du Ca^{2+} libre dans le cytosol des cellules de muscle lisse déclenche la relaxation. Cette diminution peut être obtenue sous l'effet du transport actif du Ca^{2+} vers les sites de stockage intracellulaires et vers le milieu extracellulaire. Des pompes ioniques utilisant l'énergie produite par le métabolisme cellulaire vont assurer respectivement l'extrusion du Ca^{2+} de la cellule et la séquestration du Ca^{2+} dans les compartiments internes, et induire la relaxation et le retour à l'état basal. Ce sont les pompes calciques (Ca^{2+} -ATPases) de la membrane plasmique et les Ca^{2+} -ATPases du réticulum sarcoplasmique «Sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases» ou (SERCAs) et dans une moindre mesure l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Loirand *et al.*, 1997).

I.7.1.2- Les canaux potassiques

Les canaux potassiques jouent un rôle primordial dans la régulation de la contraction des muscles lisses, en déterminant le potentiel de membrane de repos (Noack *et al.*, 1992; Jenkinson, 2006, Zhao *et al.*, 2009). Parmi les mécanismes dont l'activation provoque la relaxation des muscles lisses, les canaux potassiques représentent l'une des voies de relaxation la plus active (Aziba et Okpako, 2003). Les neurotransmetteurs inhibiteurs agissent principalement pour augmenter le courant sortant des cations *via* l'activation de différents types de canaux K^+ . L'augmentation nette du courant sortant de K^+ tend à hyperpolariser la membrane, réduire la durée des ondes lentes électriques et diminuer la probabilité d'ouverture des canaux Ca^{2+} et d'apparition de potentiel d'action (Sanders et Ozaki, 1994; Sanders, 1998). En revanche l'inhibition des canaux K^+ augmente l'activité contractile (Longo *et al.*, 2003)

Trois types des canaux potassiques ont été identifiés sur les cellules de muscles lisses, tous sont présents au niveau de la membrane plasmique: les canaux K^+ dépendants de l'ATP (K_{ATP}), les canaux K^+ dépendants du potentiel (K_v) et les canaux K^+ sensibles au potentiel et activés par les ions Ca^{2+} (K_{Ca}). Tous les trois types de canaux K^+ sont exprimés et peuvent être activés dans les cellules de muscle lisse gastro-intestinal par des mécanismes AMPc-dépendants (Sanders, 1998). Wade *et al.* (1999) ont démontré que le courant $IK(v)$ joue un rôle prédominant dans la régulation du potentiel de repos du muscle œsophagien tandis que le courant $IK(Ca)$ limite essentiellement la contraction liée à l'excitation (Zhao *et al.*, 2009).

Dans le muscle lisse gastro-intestinal, les canaux K^+ sensibles à l'ATP sont importants pour la régulation de l'excitabilité des cellules (Ohama *et al.*, 2007). L'activation de la conductance unique des canaux K_{ATP} , par augmentation de la probabilité d'ouverture de ces canaux, cause la relaxation (Zhao *et a.*, 2009). Des atteintes dans l'expression et/ou la fonction des canaux K_{ATP} sont décrites dans certaines altérations de l'activité contractile de l'intestin (Jin *et al.*, 2004, Ohama *et al.*, 2007).

L'activation des canaux K^+ dépendants de potentiel est essentiellement déterminée par le niveau du potentiel de membrane. Du fait de leur dépendance du potentiel de membrane, ces canaux peuvent être activés au potentiel de repos (l'activation des autres canaux K^+ se produit dans une gamme de potentiel plus positive) et ainsi jouent un rôle clé dans la détermination du potentiel de membrane de repos de plusieurs types de cellules musculaires lisses (Xu *et al.*, 1999). Une légère augmentation de la probabilité d'ouverture de ces canaux peut sérieusement affecter (hyperpolariser ou stabiliser) le potentiel de repos (Sanders, 1998), ce qui conduit à la fermeture de canaux Ca^{2+} voltage-dépendants et à la diminution de l'influx de Ca^{2+} , et la relaxation s'ensuit (Xu *et al.*, 1999). Deux types principaux de courants sortants K^+ à travers le canal K_v ont été enregistrés dans les cellules de muscle lisse: le courant sortant redresseur

retardé (I_K) et le courant sortant transitoire K^+ (I_A). Dans la gamme physiologique du potentiel de membrane et pour une concentration intracellulaire normale de Ca^{2+} , le courant I_K représente la conductance majeure repolarisant la cellule musculaire lisse et de ce fait déterminant le potentiel de membrane de repos (Xu *et al.*, 1999).

Les canaux K^+ dépendants du Ca^{2+} sont activés par une augmentation de la concentration de Ca^{2+} libre intracellulaire et leur probabilité d'ouverture est augmentée par la dépolarisation membranaire. On les dit dépendants du Ca^{2+} et sensibles au voltage. L'activation des canaux K_{Ca} contribuent à maintenir le potentiel de membrane après une activité de la cellule, c'est-à-dire qu'ils limitent la contraction liée à l'excitation (Laurent *et al.*, 1993; Ko *et al.*, 2008, Zhao *et al.*, 2009). Les canaux K_{Ca} sont inhibés par de faibles concentrations (10 nM) de charybdotoxine ou d'ibérottoxine qui semble plus spécifique (Nelson et Quayle, 1995, Loirand *et al.*, 1997; Sanders, 1998). Les canaux K_{Ca} peuvent être stimulés directement par le monoxyde d'azote (NO) et par des mécanismes de phosphorylation impliquant les protéines kinases A et G activées respectivement par l'AMPc et le GMPc (Loirand *et al.*, 1997). Les cellules de muscle gastro-intestinal expriment les deux isoformes de canaux K_{Ca} : les canaux K^+ Ca^{2+} -dépendants de grande conductance (BK_{Ca}) et les canaux K^+ Ca^{2+} -dépendants de faible conductance sensibles à l'apamine (SK_{Ca}).

I.7.2-Voies de signalisation intracellulaire participant à l'activation de la contraction et de la relaxation du muscle lisse gastro-intestinal

I.7.2.1-Voies d'activation de la contraction du muscle lisse gastro-intestinal

Diverses voies de signalisation intracellulaires participent à l'activation de la contraction des cellules musculaires lisses. Elles comprennent des mécanismes de régulation liés à l'homéostasie du Ca^{2+} (activation des phosphatidyl-inostols) et des mécanismes de sensibilisation de l'appareil contractile (activation de la CPI-17, voie de la RhoA/Rho kinase) (figure 17).

La majorité des agonistes provoquent la contraction en se liant à un récepteur membranaire couplé à une protéine G (ex. $G_{q/11}$ α , β , γ) dont l'effecteur est une enzyme membranaire, la phospholipase C β (PLC β) (Felder, 1995) (Figure 17). La phospholipase C activée va hydrolyser le phosphatidyl-inostol 4,5 bisphosphate (PIP_2) de la bicouche phospholipidique, pour former l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP_3) et le diacylglycérol (DAG). Ces deux molécules agissent en seconds messagers et activent chacune des voies spécifiques qui produisent des signaux excitateurs dans les cellules musculaires lisses. L' IP_3 diffuse dans le cytoplasme et va activer le récepteur-canal à l' IP_3 du réticulum sarcoplasmique. L'ouverture de ce canal calcique entraîne la libération du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique

dans le cytosol (Berridge, 1993). Le Ca^{2+} issu du réticulum sarcoplasmique s'ajoute au Ca^{2+} fourni par des mécanismes d'influx et augmente la force de la contraction. Le diacylglycérol reste près de la membrane cellulaire et active les isoformes classiques de la protéine kinase C (PKC), en présence ou en absence d'ions Ca^{2+} (Nishizuka, 1992, Nakamura et Suzuki, 2004). La fonction remplie par la PKC est complexe et une controverse considérable existe toujours concernant le rôle précis de cette voie dans la régulation de la contractilité des muscles lisses (Horowitz *et al.*, 1996, Sanders, 1998; Matsumoto *et al.*, 2005). Une fois activées, les PKC affectent des canaux ioniques de la membrane cellulaire et peuvent également augmenter la sensibilité de l'appareil contractile au Ca^{2+} (Figure 17), pour favoriser la contraction (Sanders, 1998; Ohama *et al.*, 2007). La phosphorylation des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de type L module davantage l'influx de Ca^{2+} dans la cellule (Schuhmann et Groschner, 1994). La sensibilisation de l'appareil contractile a lieu en phosphorylant la MLCP ou la MLC elle-même ou plus vraisemblablement la protéine CPI-17 (Ozaki, *et al.*, 2003) qui va inhiber l'activité de la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLCP) (Eto *et al.*, 1995; Eto *et al.*, 1997, Somlyo et Somlyo, 1998; Walsh *et al.*, 2006; Ohama *et al.*, 2007). En conséquence de l'inhibition de la MLCP, la phosphorylation de la MLC induite par la MLCK est exaltée et la contraction musculaire plus forte pour une concentration cytosolique de Ca^{2+} donnée. L'activation de la protéine CPI-17 serait un mécanisme très important de contrôle de la contraction du muscle lisse intestinal, car le blocage de l'activité de la CPI-17 supprime totalement la sensibilisation au Ca^{2+} induit par un agoniste muscarinique plus le GTP (Kitazawa *et al.*, 2000; 2003, Ohama *et al.*, 2007).

L'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est le principal stimulus déterminant la contraction du muscle lisse, en activant la kinase de la chaîne légère de la myosine et la formation des ponts actine-myosine. L'augmentation de la force contractile pour une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ donnée, constitue le phénomène de sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile (Loirand *et al.*, 1997). De nombreux travaux démontrent que la sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile implique également la régulation par le système RhoA/ROCKs (Figure 17) de la phosphatase qui déphosphoryle la chaîne légère de la myosine (Hori et Karaki, 1998, Somlyo et Somlyo, 2000; Ohama *et al.*, 2007). La RhoA est une petite protéine cytoplasmique qui lie le GTP, puis migre vers la membrane cellulaire et active des protéine kinases sérine/thréonine RhoA-dépendantes, les ROCKs ou Rho-kinases (Somlyo, et Somlyo, 1998; Murthy, 2006). Celles-ci vont à leur tour phosphoryler la sous-unité non catalytique de la phosphatase de la myosine (MYPT1) et ainsi inactiver cette phosphatase (Tahara *et al.*, 2002; Ohama *et al.*, 2007). La plupart des agonistes qui activent la cascade de phosphatidyl-inositols activent aussi le système RhoA/Rho-kinase pour augmenter la force contractile.

I.7.2.2-Voies d'activation de la relaxation du muscle lisse gastro-intestinal: Voies de signalisation des nucléotides cycliques (AMPc et GMPc)

Les voies de signalisation dépendantes de l'AMPc et du GMPc fournissent les plus importants mécanismes inhibiteurs qui modulent la relaxation des muscles lisses gastro-intestinaux, en régulant la diminution du calcium intracellulaire et la baisse de la sensibilité au Ca^{2+} de l'appareil contractile (Figures 19 et 20). Une variété de neurotransmetteurs (norépinephrine) et hormones (sécrétine) inhibiteurs produisent des réponses relaxantes par augmentation de la production de ces nucléotides cycliques AMPc et GMPc (Sanders, 1998).

La liaison de certains agonistes à un récepteur membranaire couplé à une protéine G_s active l'adénylate cyclase, une enzyme membranaire couplée via des protéines G (G_i ou G_s) aux récepteurs. L'adénylate cyclase activée va hydrolyser l'ATP en présence du Mg^{2+} et produire l'AMPc (adénosine 3',5'-monophosphate cyclique). L'augmentation du taux d'AMPc dans la cellule musculaire active les protéine kinases AMPc-dépendantes (ou PKA) en altérant l'interaction entre la sous unité catalytique C et la sous unité régulatrice R de la PKA. Les PKA phosphorylent de nombreuses cibles cellulaires et sont impliquées dans des nombreux processus cellulaires dont la relaxation du muscle lisse (Birschmann et Walter, 2004). Les PKA modulent la relaxation des muscles lisses en induisant par divers mécanismes (Figure 18) la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine 20 kDa (MLC_{20}) (Mueller et Van Breemen, 1979; Shabalina *et al.*, 2002; Murthy, 2006). Dans les muscles lisses, la phosphatase de la chaîne légère de la myosine est phosphorylée par la PKA, augmentant ainsi l'activité de cette enzyme et produisant une relaxation et des effets de type bronchodilatation ou vasodilatation (Hartshorne *et al.*, 1998). La PKA peut également phosphoryler la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) et empêcher ainsi son activation par le complexe Ca-calmoduline (Fattoum, 1997; StephanL et Michel, 2003, Damabi *et al.*, 2010). Les canaux K^+ dépendants du Ca^{2+} (K_{Ca}) sont activés directement par le monoxyde d'azote et par des mécanismes de phosphorylation impliquant les protéine kinases A (PKA) et G (PKG) activées respectivement par l'AMPc et le GMPc (Loirand *et al.*, 1997; Sanders, 1998). L'activation de ces canaux induit l'hyperpolarisation de la cellule et renforce la relaxation (Taniguchi *et al.*, 1993). Paradoxalement, la probabilité d'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants est augmentée par des mécanismes de phosphorylation impliquant la protéine kinase A. Mais l'activation concomitante des canaux K^+ par la PKA tend à limiter l'excitabilité de la cellule et à diminuer la probabilité d'ouverture des canaux Ca^{2+} (Figure 18). L'AMPc augmente de plus le repompage du calcium dans le réticulum sarcoplasmique, ce qui diminue la durée de la contraction (Koh et Sanders, 1996, Sanders, 1998). Dans les myocytes, la PKA phosphoryle le récepteur de la ryanodine 2 pour diminuer la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et favoriser la relaxation. L'AMPc peut

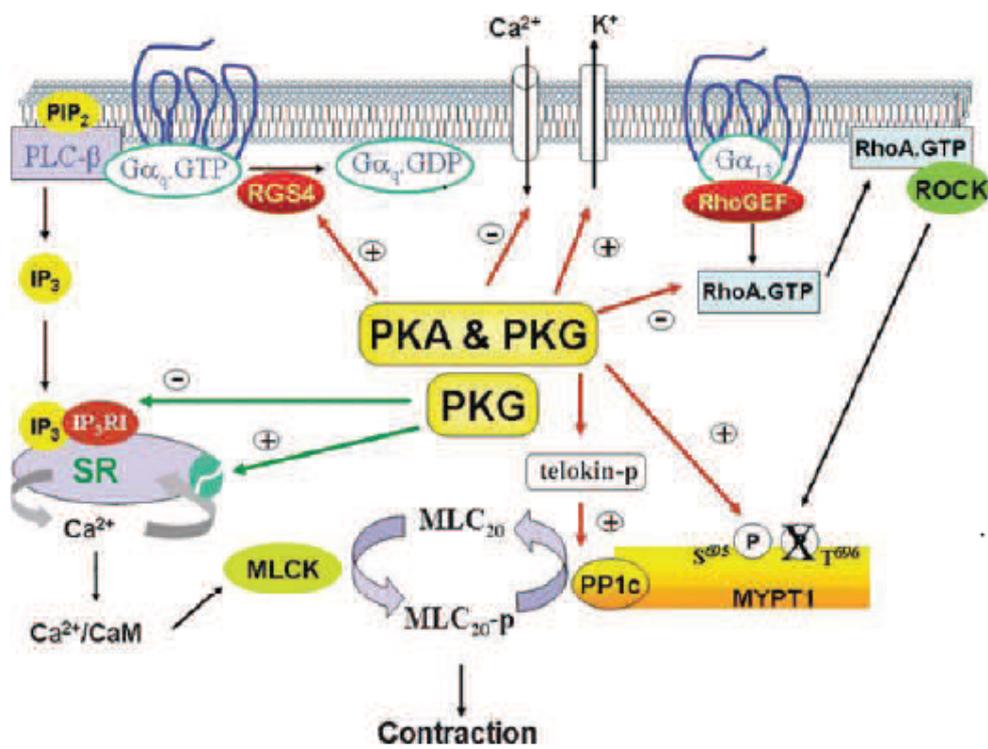


Figure 18: Les cibles moléculaires de la PKA et PKG au cours de la relaxation du muscle lisse (Youbare, 2010)

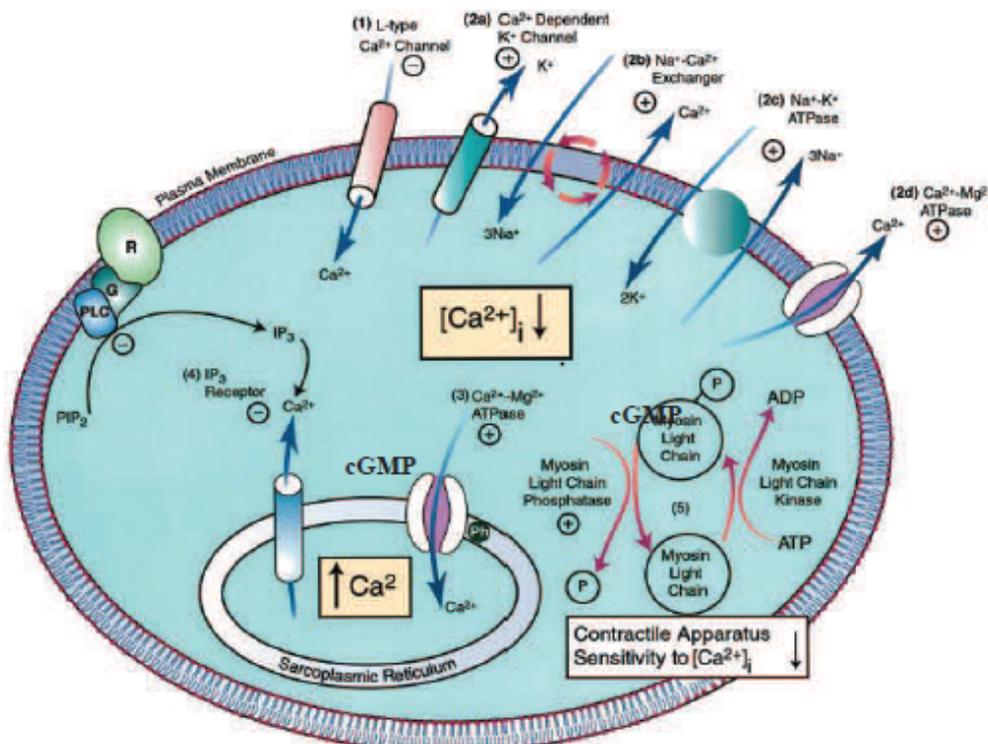


Figure 19: Mécanismes moléculaires de la relaxation des muscles lisses régulés par le GMP cyclique (Youbare, 2010)

activer les canaux ioniques régulés par les nucléotides cycliques (HCN et CNG) pour empêcher l'entrée de Ca^{2+} et favoriser la relaxation (Welch *et al.*, 2010; Yougbare, 2010).

Le GMPc (guanosine 3',5'-monophosphate cyclique) est un second messager intracellulaire synthétisé par la guanylyl cyclase (GC) activée par des peptides hormonaux (ex. peptides natriurétiques) et le monoxyde d'azote (Lucas *et al.*, 2000). La liaison directe d'un agoniste ou l'activation d'un récepteur membranaire couplé à une protéine Gs, active la guanylyl cyclase qui va déphosphoryler le GTP et produire le GMPc. L'augmentation du taux de GMPc intracellulaire régule des réponses cellulaires diverses dont la relaxation du muscle lisse (Birschmann et Walter, 2004). Le GMPc est capable de se lier à trois types d'effecteurs cellulaires dans la transduction du signal intracellulaire: les protéine kinases dépendantes du GMPc (PKG), les canaux ioniques régulés par les nucléotides cycliques et certaines familles de phosphodiesterases (PDE5) (Selemidis *et al.*, 2007). La PKG I est surtout cytosolique, elle induit la relaxation des muscles lisses par divers mécanismes (Figures 18 et 19): l'inactivation des récepteurs de l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP3) et l'inhibition du phospholamban exaltant ainsi l'activité de la Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique, la phosphorylation des canaux calciques de type L ainsi que des canaux K^+ dépendants du Ca^{2+} (K_{Ca}) (Surks, 2007). Comme la PKA, la PKG inhibe sélectivement la PLC β_3 (et non la PLC β_1), bloquant ainsi la production d'IP₃ et de DAG. La PKA et la PKG peuvent aussi diminuer la mobilisation du Ca^{2+} dans le muscle lisse longitudinal en inhibant l'activité de la PLA2 et du récepteur à la ryanodine. La PKG activerait également la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLCP) en phosphorylant le résidu Ser⁶⁹⁵ de sa sous unité catalytique PP1c et inhiberait directement la MLCK (Lucas *et al.*, 2000). Tous ces mécanismes agissent dans le sens de réduire la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et aussi d'inhiber l'activité de la MLCK, la phosphorylation et la contraction initiale de MLC₂₀.

L'activité contractile du muscle lisse est contrôlée à la base par des récepteurs membranaires qui régulent à la fois les canaux ioniques et les voies de signalisation intracellulaires.

I.7.3- Quelques récepteurs membranaires impliqués dans l'activation de la contraction et de la relaxation du muscle lisse gastro-intestinal

Au sein d'un organisme, la communication intercellulaire majeure se fait par échange des molécules particulières dites messages. Les cellules dont l'activité sera modifiée par ces messages possèdent des molécules protéiques, les récepteurs, capables de reconnaître spécifiquement une seule molécule «message» naturelle et d'induire, à la suite de cette interaction, un effet biologique particulier (Lüllmann *et al.*, 2001). Des neurotransmetteurs,

récepteurs et effecteurs neuromusculaires régulent la motilité gastro-intestinale (Sanders, 1998). L'activation de certains récepteurs induit des effets excitateurs sur le muscle lisse intestinal (ex. récepteurs de l'acétylcholine, de l'histamine, de la 5-hydroxytryptamine (5-HT), du glutamate, de prostaglandines $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), de tachynines telles que la substance P et la neurokinine A) (Ohama *et al.*, 2007). D'autres récepteurs modulent des réponses inhibitrices conduisant à la relaxation (ex. récepteurs adrénergiques, opioïdes, purinergiques, nitroergiques, de l'ATP) (Guyton et Hall, 2006). La plupart de neurotransmetteurs entériques induisent les réponses postjonctionnelles sur le muscle lisse en activant des récepteurs couplés via une protéine G à des voies de signalisation. Le NO est la seule exception dans la famille, car ses effets sont régulés par des mécanismes GMPc-dépendants (Sanders, 1998).

I.7.3.1- Récepteurs muscariniques

La stimulation électrique des neurones cholinergiques du tractus gastro-intestinal provoque des réponses excitatrices dans le muscle lisse, telles que la génération des potentiels postsynaptiques excitateurs, une augmentation de la force contractile et une augmentation de la fréquence de l'activité contractile spontanée. Tous ces effets peuvent être mimés par la stimulation des récepteurs muscariniques par application de l'acétylcholine exogène ou d'un agoniste muscarinique apparenté (Bolton, 1979, Hotta *et al.*, 2005). Le muscle lisse gastro-intestinal exprime cinq isoformes de récepteurs muscariniques M_1 à M_5 . Les récepteurs M_2 et M_3 seraient impliqués dans l'activité contractile (Ohama *et al.*, 2007). Il a été suggéré que la contraction directe du muscle gastro-intestinal est modulée par les récepteurs M_3 (Ehlert 2003; Unno, *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2010) et que les récepteurs de types M_2 appuient l'action des récepteurs M_3 et contribuent indirectement à la contraction (Ohama *et al.*, 2007). Des études récentes indiquent que les récepteurs M_2 peuvent directement activer les canaux Ca^{2+} de type L et les canaux cationiques non sélectifs par l'intermédiaire de c-src (Figure 17), de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et de la protéine kinase C, et induire la contraction du muscle lisse intestinal (Wang, *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2002; Ohama *et al.*, 2007).

Les récepteurs muscariniques de type M_3 sont couplés à la phospholipase C β membranaire par l'intermédiaire d'une protéine G pertussis toxine-sensible ($G_{q/11}$) (Felder, 1995, Sanders, 1998). L'activation de la PLC β à la suite de la liaison d'un agoniste aux récepteurs M_3 conduit à la formation de l'IP3 et du DAG qui induisent respectivement la libération du Ca^{2+} à partir du réticulum sarcoplasmique et l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire et la sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile (Sanders, 1998; Unno *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2010). Les récepteurs M_2 sont couplés à la famille des protéines G_i/G_o qui à leurs concentrations biochimiques, inhibent l'adenylyl cyclase et par conséquent la formation de

l'AMPc. La réduction de la production d'AMPc est généralement un signal excitateur dans le muscle gastro-intestinal, puisque la plupart des effets sous-jacents de la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) sont inhibiteurs (Sanders, 1998). La stimulation des récepteurs M_2 provoque par ailleurs l'activation des canaux cationiques non spécifiques (Figure 17) dans les muscles gastro-intestinaux chez plusieurs espèces. L'augmentation du courant entrant de cations (Na^+ surtout) produit la dépolarisation de la membrane, ce qui augmente la probabilité d'ouverture des canaux Ca^{2+} et un afflux plus important de Ca^{2+} (Sanders et Ozaki, 1994; Sanders, 1998).

I.7.3.2-Récepteurs histaminiques

L'Histamine est un médiateur important des réactions allergiques et inflammatoires. Il joue un rôle dans la sécrétion acide gastrique et constitue un neuromédiateur important dans la transmission neuromusculaire. Les effets biologiques de l'histamine résultent de sa liaison à 3 types de récepteurs (H_1 , H_2 et H_3) situés sur la membrane ou à l'intérieur de la cellule. La stimulation des récepteurs H_1 par l'histamine entraîne la contraction du muscle lisse gastro-intestinal et du muscle lisse viscéral en général. Les récepteurs H_1 sont aussi couplés aux protéines $G_{q/11}$ associées à la PLC membranaire dont l'activation conduit à la production de seconds messagers IP_3 et DAG qui activent la contraction musculaire.

I.7.3.3- Récepteurs adrénergiques

La noradrénaline est un neurotransmetteur important dans le tractus gastro-intestinal où elle module essentiellement des effets inhibiteurs sur la motilité et les sécrétions, ainsi que sur le flux sanguin, et exalte plutôt l'absorption (Stebbing *et al.*, 2001; Damabi *et al.*, 2010). Les effets de la noradrénaline seraient produits par stimulation des récepteurs α_2 présynaptiques et postsynaptiques ainsi que des récepteurs β_1 postjonctionnels (Yasmin *et al.*, 2006). Doherty et Hancock (1983) ont suggéré que les effets inhibiteurs des agonistes α_2 -adrénergiques sur la motilité intestinale sont dus à la présence des récepteurs α_2 localisés sur les «neurones» pacemaker au sein du plexus nerveux myentérique, ainsi qu'au niveau présynaptique sur les neurones postganglionnaires innervant les cellules de muscle lisse. La stimulation des récepteurs α_2 présynaptiques inhibe la libération à la fois de la noradrénaline et de l'acétylcholine par les terminaisons nerveuses (Damabi *et al.*, 2010). Trois sous-types des récepteurs β (β_1 , β_2 et β_3) ont été caractérisés par des approches pharmacologiques, biochimiques et de biologie moléculaire (Strosberg, 1997, Akimoto *et al.*, 2002). Des évidences indiquent que les récepteurs β_2 et β_3 sont les principaux récepteurs modulant la réponse relaxante des agonistes β -adrénergiques tels que l'isoprénaline sur le muscle lisse intestinal chez de nombreuses espèces y compris l'homme (Koike *et al.*, 1994, 1995b, 1997)

alors que les récepteurs β_1 ne sont pas impliqués (Koike *et al.*, 2000; Akimoto *et al.*, 2002). Mais une autre étude récente a démontré l'implication des récepteurs β_1 dans la réponse relaxante de l'isoprénaline sur le muscle lisse œsophagien de cobaye, cette action était régulée via l'activation des canaux K^+ Ca^{2+} -dépendants de large conductance (Tanaka *et al.*, 2004a). Les trois sous-types de récepteurs β -adrénergiques moduleraient la relaxation du muscle lisse intestinal de rat (Roberts *et al.*, 1999).

Trois sous-types de récepteurs α_2 -adrénergiques ont été décrits. Ils seraient couplés aux mêmes systèmes de signalisation incluant l'inhibition de l'adénylyl cyclase, l'activation des canaux K^+ récepteurs-dépendants et l'inhibition des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (Saunders et Limbind, 1999, Damabi *et al.*, 2010). La structure et la fonction des récepteurs β_2 -adrénergiques sont clairement élucidées; ils font partie des récepteurs couplés aux protéines G et dont l'activation par un agoniste induit celle de l'enzyme membrane adénylate cyclase (Akimoto *et al.*, 2002).

Les altérations de l'activité motrice et les troubles de sécrétions gastro-intestinales sont souvent à l'origine de nombreuses affections dont l'une des plus importantes est la diarrhée.

I.8- Données sur les diarrhées

I.8.1-Définition et classification

La diarrhée est définie comme l'émission de selles molles ou liquides plus de 3 fois en 24 heures, ou comme l'émission de selles plus fréquente que la normale chez une personne (Hirchhorn, 1980; Snyder et Merson, 1982, Ojewole *et al.*, 2008; UNICEF/WHO, 2009; AL-maamori, 2011). Sur le plan médical, la diarrhée est définie également en fonction de la quantité des selles émises, notamment un poids quotidien des selles supérieur à 300 g (Fouet, 1983; Sandoz, 2008; Allen *et al.*, 2010). De nombreux autres symptômes peuvent résulter d'une diarrhée: crampes et douleurs abdominales, vomissements, maux de tête ou douleurs musculaires, fatigue ou malaise général, conséquences neurologiques, fièvre dans certains cas de diarrhées infectieuses chez l'enfant (OMS, 2013; Doctissimo, 2014).

Les épisodes de diarrhées peuvent être aigus et de courte durée, intermittents ou récurrents, ou chroniques et sévères dans certains cas. Suivant les symptômes et la durée, on distingue trois types cliniques de diarrhées: les diarrhées aiguës liquides, les diarrhées sanguinolentes et les diarrhées persistantes (Farthing, 2000; UNICEF/WHO, 2009).

La diarrhée aiguë liquide dont le type est le choléra, est définie par une émission de selles trop liquides et trop fréquentes, qui dure habituellement quelques heures ou des jours. Il s'agit d'une diarrhée sécrétoire associée à une importante perte d'eau et d'électrolytes qui peut être à l'origine d'une forte déshydratation avec une altération de l'état général et d'un

collapsus vasculaire. Le risque est d'autant plus grand que se surajoutent d'autres causes de perte en eau et électrolytes (vomissements, transpiration excessive). Les microbes pathogènes qui causent cette diarrhée liquide incluent *Rotavirus*, *Adenovirus*, *Vibrio cholerae* et *E. coli* entérotoxigène et certaines souches de Salmonelles, Shigelles et Staphylocoques.

La diarrhée sanguinolente dont le type est la dysenterie, est marquée par la présence visible de sang dans les fèces souvent glaireuses. C'est une diarrhée de type invasif caractérisé par une invasion destructrice de la muqueuse intestinale par les germes, entraînant des lésions intestinales et des pertes de nutriments chez l'individu atteint (Lavigne, 2005; UNICEF/WHO, 2009). La cause la plus commune de la diarrhée sanguinolente est *Shigella ssp*, mais elle est habituellement due à d'autres bactéries entéropathogènes invasives telles que *Salmonella ssp*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* et *E. coli* entérohémorragique. Ces microorganismes infectent principalement l'iléon distal et le côlon et peuvent entraîner des complications du genre syndrome hémolytique urémique.

Les diarrhées persistantes ou chroniques sont des épisodes de diarrhées accompagnées ou non de sang, qui durent depuis au moins 14 jours voire des mois. Les causes peuvent être nombreuses mais les atteintes bénignes du côlon sont fréquentes. Dans certains cas rares, des problèmes thyroïdiens, une inflammation de la paroi intestinale, des parasites ou parfois une tumeur peuvent être en cause. La diarrhée persistante peut être due aux infections persistantes avec plusieurs des microorganismes sus-cités (chez les enfants, *E. coli* entéropathogène et enteroaggrégative sont importants dans la pathogénie de la diarrhée persistante). Les protozoaires intracellulaires (*Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayentanensis*, *Microsporidium* spp.) peuvent également être des causes importantes de la diarrhée persistante associée au HIV (Farthing *et al.*, 1996, Farthing, 2000; UNICEF/WHO, 2009).

I.8.2- Causes ou étiologie

L'étude de la diarrhée chez l'homme et les modèles animaux a révélé que divers facteurs peuvent déclencher la diarrhée, y compris les infections microbiennes ou parasitaires, les intolérances et intoxications alimentaires, les désordres intestinaux ou troubles de la paroi intestinale, les médicaments, les facteurs immunologiques et les facteurs psychologiques (Zavala *et al.*, 1998; Hejazian-Y *et al.*, 2009; Banji *et al.*, 2010; Desire *et al.*, 2010; Al Jarousha *et al.*, 2011, Xiao *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

I.8.2.1-Diarrhées microbiennes et parasitaires

Une large gamme de microorganismes pathogènes peuvent causer des diarrhées infectieuses chez l'homme. Ceux-ci comprennent des bactéries entériques (*Salmonella ssp*, *Shigella ssp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium*

difficile et *Vibrio cholerae*), des protozoaires parasites (*Entamoeba*, *Cryptosporidium*, *Gardia*, *Microsporidium*, *Ankylostoma*, *Necator*), des virus (*Rotavirus*, *Adénovirus*, *Entérovirus*, *Corona virus*) et des champignons (*Candida albicans*, *Saccharomyces*) (Farthing, 2000; Fewtrell *et al.*, 2005, UNICEF/WHO, 2009; Desire *et al.*, 2010; Mukherjee *et al.*, 2013). Cependant une poignée seulement de ces germes sont responsables de la majorité des cas de diarrhées infectieuses chez les enfants (OMS, 1999, UNICEF/WHO, 2009). La diarrhée infectieuse concerne typiquement l'intestin grêle ou le côlon, et la symptomatologie du patient suggère souvent le site de l'infection. Les infections de l'intestin grêle produisent généralement des crampes abdominales généralisées, un large volume de diarrhée sans sang et probablement la déshydratation. Celles du côlon (colites) provoquent souvent peu de douleur abdominale, un besoin improductif de déféquer et des émissions fréquentes de petites quantités de selles avec du sang et du pus (Doctissimo, 2014).

I.8.2.2-Diarrhées non infectieuses

Les diarrhées peuvent être déclenchées par de nombreux autres facteurs parmi lesquels (Farthing, 2000; Banji *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Doctissimo, 2014).

- **Les troubles de la paroi intestinale:** les maladies inflammatoires chroniques, les tumeurs et les malformations de l'intestin peuvent être à l'origine des diarrhées à répétition ou chroniques.

- **L'alimentation:** les intolérances (lactose dans le lait de vache, sorbitol, gluten, etc.) ou intoxications alimentaires peuvent provoquer des diarrhées généralement subites quelques heures après l'ingestion de l'aliment en cause.

- **Les intolérances médicamenteuses:** la diarrhée est relativement fréquente parmi les effets secondaires d'un grand nombre de médicaments. Les antibiotiques (cyclines, spiramycine, ampicillines) et la plupart des antiseptiques peuvent provoquer un dérèglement de la flore intestinale à l'origine d'une diarrhée.

- **Les facteurs psychologiques:** de nombreuses personnes réagissent aux tensions psychiques par une activité intestinale accrue et des selles liquides. Ainsi, le stress, l'anxiété ou la colère peuvent être à l'origine des troubles de la digestion et des diarrhées. Chez certaines personnes anxieuses, les maux de ventre peuvent s'installer dans la durée, la diarrhée peut alors alterner avec la constipation et s'accompagner de douleurs abdominales. On parle dans ce cas du syndrome du côlon irritable.

- **Les troubles immunologiques:** la baisse de l'immunité due à l'infection au VIH par exemple, est un facteur contribuant à l'augmentation de l'incidence de la diarrhée infectieuse aiguë dans les pays du tiers monde et dans le monde industrialisé.

I.8.3-Mécanismes physiopathologiques

Selon le mécanisme physiopathologique mis en jeu, on distingue plusieurs types de diarrhées: les diarrhées motrices, les diarrhées sécrétoires, les diarrhées osmotiques, les diarrhées exsudatives, les diarrhées inflammatoires et les diarrhées avec malabsorption ou maldigestion (AL-Maamori, 2011).

I.8.3.1- Diarrhée motrice

La diarrhée motrice est liée à des altérations de la motilité, notamment une accélération des mouvements intestinaux qui entraîne des crampes et douleurs abdominales (Modigliani., 1989, Farthing, 2002, Ezekwesili *et al.*, 2004, Desire *et al.*, 2010; Abdelrahim *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2013; Doctissimo, 2014). En conséquence de l'accélération du transit, l'absorption d'eau et de nutriments par la muqueuse intestinale est insuffisante et il y a un excès de fluide et d'électrolytes dans les fèces excrétées (Zavala *et al.*, 1998; Hejazian-Y *et al.*, 2009; Damabi *et al.*, 2010; Desire *et al.*, 2010; AL-Maamori, 2011; Zhang *et al.*, 2013). L'accélération de la motilité intestinale peut être consécutive à une pullulation microbienne, à l'action stimulatrice d'une toxine microbienne comme dans le cas du choléra (Farthing, 2000), à une libération accrue de neurotransmetteurs excitateurs dans le système nerveux entérique ou de certaines hormones par la muqueuse digestive, à une neuropathie ou à une irritation ou une inflammation de la paroi digestive sous l'action de divers facteurs (Beaugerie et Sokol, 2014).

I.8.3.2- Diarrhée sécrétoire

La diarrhée sécrétoire est une diarrhée liquide liée à une perturbation des mouvements d'eau et d'électrolytes à travers la paroi de l'intestin grêle, le plus souvent sous l'action d'une entérotoxine (Lavigne, 2005). La diarrhée résulte dans ce cas d'un déséquilibre entre les phénomènes de sécrétion et d'absorption dans l'intestin (Abelrahim *et al.*, 2013), aboutissant à une hypersécrétion d'eau et de sels (sodium, chlorure, potassium et bicarbonate) dans la lumière (Damabi *et al.*, 2010; OMS, 2013). Le rôle central dans ces déficiences est joué par une augmentation de la production de l'AMPc qui a deux effets fondamentaux:

-Inhibition de l'absorption du sodium et du chlore par les entérocytes, entraînant une perte nette d'eau et d'électrolytes (il s'agit du mécanisme entérotoxinique dont le modèle est le choléra);

-Stimulation de la sécrétion active de chlorures, sans altérer les mécanismes de transport. Ces pathogènes n'altèrent pas l'absorption du sodium Na^+ glucodépendant, d'où la possibilité d'utiliser des solutions orales sucrées enrichies en électrolytes pour traiter la déshydratation. De plus ils n'entraînent pas d'anomalie morphologique. Une fois produite dans la lumière intestinale, la toxine déclenche une diarrhée par un mécanisme AMPc dépendant, en passant

par les étapes suivantes: fixation de la toxine sur son récepteur membranaire spécifique, transmission du signal à travers la paroi membranaire et stimulation de la production du second messenger intracellulaire AMPc, enfin perturbation des échanges d'eau et d'électrolytes. Les acides biliaires non résorbables et des acides gras peuvent stimuler la sécrétion des ions dans la muqueuse du gros intestin (Czerucka *et al.*, 1993; Beyer, 2004).

I.8.3.3- Diarrhées avec malabsorption

La diminution de l'absorption intestinale est l'un des mécanismes essentiels des diarrhées dues à des infections entéropathogènes. Contrairement aux diarrhées sécrétoires, les diarrhées avec malabsorption s'accompagnent des lésions tissulaires macroscopiques ou microscopiques qui peuvent siéger soit au niveau du grêle, soit au niveau du côlon et qui modifient les processus de transport épithélial. Les mécanismes expliquant la diarrhée sont multiples: troubles de l'absorption de l'eau et des électrolytes au niveau du grêle, apparition au niveau du côlon des nutriments incomplètement absorbés au niveau du grêle et qui induisent une diarrhée osmotique, lésions au niveau du côlon entravant l'absorption de l'eau. L'accélération du transit intestinal peut aussi contribuer à la malabsorption par diminution du temps de contact des nutriments avec les surfaces absorbantes de l'intestin (Joly *et al.*, 1993).

I.8.3.4- Diarrhées osmotiques

La diarrhée osmotique est provoquée par la présence ou l'accumulation dans l'intestin grêle ou le côlon des substances ingérées peu ou pas absorbées entraînant un appel osmotique d'eau et d'électrolytes vers la lumière. La diarrhée peut apparaître après une ingestion des substances peu absorbables telles que le magnésium, le sorbitol ou les laxatifs type PEG (polyéthylène glycol), de disaccharides non digérés dans l'intestin grêle (lactulose) ou en cas d'une dépréciation spécifique de l'absorption des sucres tels que le lactose et le fructose contenus dans les aliments naturels (Thomson et Shaffer, 2005; Beaugerie et Sokol, 2014). La diarrhée osmotique peut également survenir suite à une malabsorption de certains ions notamment le Na⁺ ou le Cl⁻ (Marieb, 1999; Tsai *et al.*, 2004).

I.8.3.5-Diarrhées exsudatives

La diarrhée exsudative est due à la rupture de la structure de la paroi intestinale par une inflammation, des ulcérations diffuses, des infiltrations et des tumeurs qui font augmenter les débris cellulaires, le mucus, les protéines sériques et le sang dans la lumière intestinale. Les effets sur le volume des selles sont plus prononcés si les lésions touchent le côlon (Adler *et al.*, 2008). Une diarrhée cliniquement hémorragique (sang visible mélangé aux selles à chaque évacuation) témoigne d'une lésion organique intestinale (Beaugerie et Sokol, 2014)

I.8.3.6-Diarrhées inflammatoires

Les entéropathogènes peuvent induire des inflammations de la muqueuse intestinale qui peuvent être aiguës et transitoires comme dans certaines dysenteries bactériennes ou chroniques dans certaines parasitoses telles l'amibiase. Il en résulte la libération aussi bien au niveau du grêle que du côlon, des médiateurs inflammatoires comme l'histamine, les prostaglandines, les leucotriènes, les kinines et les cytokines. A côté de l'augmentation de la perméabilité intestinale liée à la destruction tissulaire, l'inflammation peut stimuler ou inhiber l'absorption de l'eau et des électrolytes, stimuler le péristaltisme intestinal et enfin être responsable d'une maldigestion et d'une malabsorption des nutriments (Pierce *et al.*, 1971; Farthing, 1993; Farthing et Turvill, 1997). L'augmentation des cytokines telles que IL-1, IL-2, IL-8, Tumor necrosing factor (TNF α) est observée quelques minutes après l'infection. Par activation des récepteurs de la muqueuse intestinale, ces médiateurs dérèglent le transport d'eau et d'électrolytes et inhibent l'absorption, provoquant la diarrhée. Les mécanismes inflammatoires jouent ainsi un rôle très important dans les désordres observés au niveau de la muqueuse intestinale au cours des diarrhées infectieuses (Droy-Lefaix *et al.*, 2003) et il est actuellement reconnu que des sévères inflammations de la muqueuse avec augmentation de cytokines induisent des diarrhées persistantes et un risque à long terme de développer un syndrome de l'intestin irritable (Farthing, 1993).

L'huile de ricin induit une diarrhée à la fois motrice et sécrétoire par un mécanisme similaire impliquant le processus inflammatoire. Dans le tractus digestif, l'huile de ricin est hydrolysée en acide ricinoléique qui cause l'irritation et l'inflammation de la muqueuse gastrique et intestinale (Pang *et al.*, 2013). Il en résulte la libération des prostaglandines qui stimulent la motilité et la sécrétion nette d'eau et des électrolytes dans la lumière de l'intestin (Pierce *et al.*, 1971, Beubler et Juan, 1979; Venkatesan *et al.*, 2005; Abdelrahim *et al.*, 2013).

I.8.4-Approches thérapeutiques des diarrhées

Le traitement conventionnel des diarrhées aiguës comporte toujours une réhydratation par voie orale accompagnée d'un antidiarrhéique et d'un antispasmodique en cas de douleurs abdominales (Suleiman *et al.*, 2008, Ojewole *et al.*, 2008). Dans les formes sévères de diarrhées infectieuses, les antibiotiques sont nécessaires (Sandoz, 2008). Il faut également prévoir de restaurer la flore intestinale en utilisant des prébiotiques et probiotiques (Doctissimo, 2014).

I.8.4.1-Solutés de réhydratation orale (SRO)

Une diarrhée aiguë ou persistante est caractérisée par une importante perte d'eau et des électrolytes à travers les selles, qui entraîne une déshydratation sévère et des déséquilibres

d'électrolytes (dénutrition) (Venkatesan *et al.*, 2005; Damabi *et al.*, 2010; AL-Maamori 2011). La majorité des décès de suite de diarrhée infectieuse aiguë sont évitables si les pertes de fluides et d'électrolytes sont remplacées promptement au premier signe de la diarrhée (Farthing, 2000; UNICEF/WHO, 2009).

Les solutés de réhydratation orale (SRO) sont un mélange équilibré des sels minéraux essentiels (Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^{2-} , etc.), additionnés d'un substrat énergétique en l'occurrence du glucose. La prise par voie orale de grands volumes d'une solution de ces sels facilement absorbés par la muqueuse intestinale, permet de compenser rapidement les pertes d'eau et d'électrolytes à travers les selles afin de prévenir la déshydratation et la dénutrition du patient. La réhydratation peut se faire avec des solutés de réhydratation orale commercialisés (SRO-sels de réhydratation orale, UNICEF-oralyte, Galliate, Adiaril, GES 45, etc.) ou tout apport hydrique contenant du glucose, du potassium et du sel, comme de l'eau de bouteille, des jus de fruits, des boissons gazeuses douces, associées à des biscuits salés, du bouillon (Caeiro *et al.*, 1999).

I.8.4.2- Médications antidiarrhéiques

De nombreuses spécialités sont couramment prescrites parmi lesquelles les antispasmodiques ou ralentisseurs du transit, les antisécrétoires, les antiémétiques, les absorbants ou pansements intestinaux, les antiseptiques intestinaux, les anti-infectieux ou antibiotiques, les agents intraluminaux (Olives et Ghisolfi, 2000 ; Fattorusso et Ritter, 2004; Doctissimo, 2014).

I.8.4.2.1-Les ralentisseurs du transit et les antisécrétoires

Les antispasmodiques (ou spasmolytiques) sont des drogues utilisées pour alléger ou prévenir les contractions trop fréquentes (ou spasmes) des muscles lisses. En réduisant l'activité contractile accrue, ces drogues permettent au muscle lisse gastro-intestinal de reprendre une activité normale et allègent les douleurs abdominales (Hasler *et al.*, 2003, Borrelli *et al.*, 2009; AL-Maamori, 2011). Les principaux médicaments antispasmodiques comprennent les opiacées (avec comme stéréotype la loperamide), les antimuscariniques (atropine) ainsi que des bloqueurs de canaux calciques (otilonium, pinaverium, vérapamil, nifédipine) (Joly *et al.*, 1993; Borrelli *et al.*, 2009). L'utilisation de ces substances serait toutefois associée à de nombreux effets secondaires indésirables (effets indésirables sur le système nerveux central, dessèchement de la bouche et rétention urinaire pour les substances antimuscariniques, maux de tête, nausées, vomissement et constipation pour les bloqueurs calciques (Borrelli *et al.*, 2009). Du fait de leurs effets indésirables sur le système nerveux

central, la majorité de ces médicaments sont contre-indiqués chez l'enfant (Joly *et al.*, 1993; Farthing, 2000).

Les antisécrétoires sont des substances qui inhibent de manière prédominante les sécrétions de fluides et d'électrolytes par la muqueuse intestinale. Ils agissent sur la muqueuse de l'intestin grêle généralement par inhibition de la pompe ATPase AMPc-dépendante à l'origine de la sécrétion (Carré *et al.*, 2001). Des médicaments opiacés tels que le loperamide, le diphénoxylate ou le phosphate de codéine sont largement utilisés chez l'adulte dans les cas de diarrhée aiguë, pour leurs effets antisécrétoires considérables dans le tractus digestif, parallèlement à leurs effets antispasmodiques. Ils sont contre-indiqués chez les nourrissons et les enfants en bas âge en raison des effets centraux des agents opiacés, ajouté au fait que l'administration de ces drogues à un enfant pourrait minimiser l'importance de donner le véritable traitement de sauvetage qui préserve la vie, à savoir la thérapie de réhydratation orale (Farthing, 2000). Le loperamide est l'un des antidiarrhéiques les plus utilisés en raison de son rapport efficacité-risque chez l'homme, de l'absence d'effets centraux chez l'adulte, de l'absence d'effets sur les muscles sphincters et de sa fixation préférentielle sur les récepteurs μ et δ du tissu intestinal ayant une action antimotilité et antisécrétoire (Awouters *et al.*, 1993; Meicler *et al.*, 1993; Ericsson et Johnson, 1990, Suzuki *et al.*, 2000; Doctissimo, 2014). Outre les opiacés, un certain nombre de substances ont aussi un effet antisécrétoire associé le plus souvent à un effet antispasmodique: médicaments α -adrénergiques (clonidine, yohimbine), somatostatine, anti-inflammatoires (ANS, corticoïdes), antagoniste calcique (chlorpromazine).

La majorité des substances qui inhibent l'activité contractile du muscle lisse intestinal exercent également une forte inhibition sur les sécrétions hydro-électrolytiques de la muqueuse et des glandes digestives (Guyton et Hall, 2006). La recherche pour une drogue saine qui pourrait réduire sélectivement les pertes d'eau et d'électrolytes au cours des diarrhées infectieuses, sans affecter la motilité gastro-intestinale, reste une option prioritaire (Farthing, 1993). L'utilisation des antagonistes des récepteurs 5-HT₃ et 5-HT₂ dans les modèles expérimentaux et humains de diarrhée sécrétoire indique que ceux-ci pourraient être une approche thérapeutique dans le traitement de la diarrhée sécrétoire (Farthing, 2000). Une autre approche thérapeutique a été focalisée sur le rôle des absorbagogues endogènes telles que l'enképhaline. L'enképhaline est un neurotransmetteur du système nerveux entérique, qui agit spécifiquement sur les récepteurs opioïdes δ présents sur la membrane basolatérale des entérocytes (Turvill et Farthing, 1997). L'activation des récepteurs δ inhibe l'adénylate cyclase et par conséquent le processus sécrétoire. Les effets de l'enképhaline endogène peuvent être renforcés en inhibant l'enképhalinase, enzyme responsable de la dégradation des enképhalines intracellulaires. On a récemment développé un inhibiteur de l'enképhalinase intestinale, le

racécadotril tiorphan (INN). Le racécadotril entraîne une augmentation du taux d'enképhalinases dans la muqueuse intestinale, lesquelles inhibent l'hypersécrétion induite par l'agent infectieux. Ce produit possède une activité antisécrétoire pure sans action sur la motricité (Rogé *et al.*, 1993; Farthing, 2000; Salazar-lindo *et al.*, 2000; Cezard *et al.*, 2001).

I.8.4.2.2-Les agents intraluminaux

On désigne ainsi les agents qui exercent leur action dans la lumière intestinale. Ce sont des médicaments faiblement absorbés par la paroi intestinale et qui agissent par phénomène d'adsorption. Ils comprennent les silicates, la cholestyramine et le bismuth (Burn *et al.*, 1974). Les silicates appartiennent à la famille des argiles et les plus utilisées sont la diosmectite (Smecta) et l'attapulgite de Moirmoron activée (Actapulgite). Les silicates exercent un fort pouvoir couvrant protecteur dans l'intestin; ils recouvrent les membranes des entérocytes et protègent ainsi la muqueuse intestinale. Les silicates ont également un effet hydrophile important; ils absorbent l'eau contenue dans la lumière intestinale entraînant une augmentation de la consistance des selles (Carré *et al.*, 2001). En plus, ils interagissent avec la muqueuse intestinale pour augmenter la filance du mucus et la production des glycoprotéines. Les silicates possèdent expérimentalement, *in vitro* ou *in vivo*, un fort pouvoir adsorbant ou de fixation de diverses molécules telles que les toxines microbiennes (*E. coli*, *V. cholerae*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Rotavirus*). La cholestyramine a les mêmes propriétés adsorbantes vis-à-vis des sels biliaires. Le bismuth atténue la sécrétion intestinale et permet de réduire tant le volume des selles que la durée de la diarrhée. Son utilisation a été interdite en France du fait des cas d'encéphalite rapportés au sous-nitrate de bismuth (Burn *et al.*, 1974).

I.8.4.2.3-Les anti-infectieux ou antibiotiques

Pour les cas graves de diarrhées infectieuses (fièvre, dysenterie ou présence de sang dans les selles, douleurs abdominales, diarrhée très abondante, symptomatologie récidivante), il est nécessaire de recourir aux antibiotiques pour détruire l'agent infectieux (Sandoz, 2008).

Suivant leur mécanisme d'action, les antibiotiques sont classés en différentes familles: bêta-lactamines (pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes), cyclines ou tétracyclines, aminosides ou aminoglycosides, quinolones, phénicolés, sulfamidés ou sulfonamides, nitrofuranes, 5 nitro-imidazolés, rifamycines, groupe des macrolides (ex. érythromycine), lincosamides et Synergistines, autres antibiotiques (métronidazole, triméthoprime, co-trimoxazole (Sulfamethoxazole-triméthoprime), acide fucsidique, fosfomycine, vancomycine, clindamycine, etc) (Leclerc *et al.*, 1995; Soilleux, 2007; Giguère *et al.*, 2013). Les céphalosporines de 3^e génération (C3G) et les macrolides de nouvelle génération (azithromycine et roxithromycine) constituent, pour beaucoup d'entérobactéries, une

alternative intéressante parce qu'ils sont utilisables chez l'enfant et la femme enceinte. Les fluoroquinolones auraient l'avantage d'être actives sur la plupart des bactéries pathogènes intestinales à l'origine des diarrhées (Mégraud et Prouzet-Mauléon, 2004).

Le choix de l'antibiotique est fonction de la nature du germe mis en cause. Pour les formes modérées à sévères de shigelloses, les fluoroquinolones injectables en régime de 3 jours (incluant la ciprofloxacine 500 mg x2/j, la norfloxacine 400 mg x2/j, ou la levofloxacine 500 mg x1/j) peuvent être proposées en première intention dans l'attente de l'identification du pathogène (Guerrant *et al.*, 2001; Scheidler et Giannella, 2001). En cas de diarrhée à salmonelles (mis à part *Salmonella typhi*) notamment les formes sévères comportant des signes évocateurs de dissémination microbienne dans le sang (fièvre élevée, foyer extra-digestif ou ostéite, splénomégalie), le traitement antibiotique de première intention est une bêta-lactamine (ceftriaxone: 50 mg/kg/j en iv ou im, céfotaxime: 100 mg/kg/j en iv ou im, ou amoxiciline: 50-70 mg/kg/j en 3 prises). En cas d'infection à *E. coli*, l'indication d'un traitement antibiotique est exceptionnelle et dépend de la souche mise en cause (Nataro et Kaper, 1998; Farthing, 2000; Wong *et al.*, 2000; Doctissimo, 2014). En cas de diarrhée à *Campylobacter*, l'érythromycine (50 mg/kg/jour p.o en 2 ou 3 prises) est active mais l'évolution est de toute façon spontanément favorable. Certaines pénicillines ont une indication dans les infections à staphylocoques producteurs de pénicillinase. Les diarrhées à levures bénéficient de la nystatine ou d'amphotéricine B.

I.8.4.3-Phytothérapie à visée antidiarrhéique

La médecine alternative est devenue une approche attractive pour une prise en charge douce et moins coûteuse de diverses maladies, chez des patients insensibles ou peu disposés à prendre la médecine standard (Zavala *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999, Lee *et al.*, 2009). Les plantes douées de vertus médicinales sont couramment utilisées de manière empirique par les populations à travers le monde pour soigner diverses affections dont la diarrhée (Fawzi *et al.*, 2013). Au Cameroun, de nombreuses plantes sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de la diarrhée. Des travaux scientifiques ont établi les propriétés antidiarrhéiques de quelques plantes médicinales parmi lesquelles *Bidens pilosa* (Dimo *et al.*, 2001), *Eremomastax speciosa* (Oben *et al.*, 2006), *Mallotus opposifolium* (Kamgang *et al.*, 2006), *Kalanchoe crenata* (Nguelefack *et al.*, 2006), *Euphorbia prostata* (Kamgang *et al.*, 2007), *Stachytarpheta indica* (Otimenyin *et al.*, 2008), *Morinda morindoides* (Meite *et al.*, 2009), *Trilepisium madagascariense* (Ngo Teke *et al.*, 2010), *Hibiscus sabdariffa* (Ali *et al.*, 2011), *Moringa oleifera* (Lakshminarayana *et al.*, 2011). Celles de *Pittosporum mannii* sont bien rapportées dans la littérature mais pas encore établies scientifiquement (Momeni *et al.*, 2010).

Il est important de connaître l'innocuité ou la nocivité des substances médicinales ou des produits chimiques administrés aux organismes pour bien en saisir les effets sur la santé.

I.9- Toxicité

I.9.1-Définition et intérêt

La toxicité d'un composé ou d'une substance est l'ensemble des effets nocifs immédiats et à long terme, causés dans un organisme vivant, que ce soit à une dose relativement élevée, en une ou plusieurs prises pouvant altérer les fonctions de l'organisme, allant jusqu'à leur suppression complète et par suite la mort (WHO, 1993; Beraud, 2000). La toxicité d'une substance médicamenteuse doit être considérée en rapport avec la dose (Cheftel *et al.*, 1989). Autrement dit, il n'y a pas d'une part des substances toxiques et d'autre part des substances non toxiques, mais uniquement des différences dans le degré de toxicité (Serrano, 1990). Les substances médicamenteuses qui s'accumulent dans l'organisme suite à la lenteur de leur élimination ou inactivation, sont susceptibles de provoquer des troubles dont la symptomatologie peut être variée: actions sur la croissance, les besoins alimentaires, la fécondité, le comportement général et l'activité. Des modifications peuvent survenir dans la formule sanguine, la composition chimique des compartiments liquidiens (modification de certains paramètres biochimiques tels que les transaminases, protéines, les lipides, la bilirubine, la créatinine, etc) (Fleurentin et Joyeux, 1990) et la structure histologique des organes tels que le foie, les reins les poumons, etc (Valette, 1972).

Les investigations toxicologiques s'avèrent d'une extrême nécessité dans l'étude des effets des médicaments et des substances médicinales. Elles ont pour but d'évaluer les risques liés à l'exposition à une substance, le degré et les caractères de toxicité de la substance (relation dose-effet, nature et site des lésions toxiques) (Schorderet, 1992). Elles vont permettre l'évaluation du risque toxique des médicaments utilisés en médecine moderne ou traditionnelle en vue du développement des substances plus sûres et d'une meilleure prescription clinique (Serrano, 1990). L'étude de la toxicité d'une substance médicinale ou médicamenteuse devrait précéder tout essai pharmacologique ou clinique (Schorderet, 1992).

I.9.2-Types de toxicité

En fonction de la durée et la fréquence de l'exposition de l'organisme à une substance administrée, on va distinguer trois principaux types de toxicité (WHO, 1992; Diezi, 1992):

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

I.9.2.1-Toxicité aiguë ou à court terme

La toxicité aiguë désigne l'ensemble des effets néfastes se produisant chez un organisme immédiatement ou peu de temps après une administration unique ou répétée sur une période de 24 heures de la substance médicamenteuse ou toxique (Castronovo et Frank, 1977; Walum, 1998). Il y a toxicité orale aiguë si des effets défavorables apparaissent après l'administration par voie orale d'une dose unique de substance ou de plusieurs doses données sur une période de 24 heures (OCDE, 2001). Le test de toxicité aiguë a pour but de déterminer le degré de toxicité d'une substance chimique, c'est-à-dire la relation entre la dose et les effets défavorables, de déterminer les effets toxiques spécifiques et de fournir des informations sur le mode d'action toxique (OCDE,1979). Cette étude permet d'une part de recenser toutes les manifestations toxiques ou troubles survenus très peu de temps après administration du produit (Lechat *et al.*, 1982). On peut ainsi apprécier le comportement général, la mortalité, et les lésions histopathologiques des principaux organes lors de l'autopsie des animaux morts en cours d'expérimentation. Elle permet d'autre part de déterminer la dose létale médiane (DL₅₀), définie comme la dose unique d'une substance d'essai, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50% des animaux soumis à l'administration de la substance (OCDE, 2001). Les rongeurs tels que la souris et le rat sont les espèces préférentiellement utilisées à cause de leur sensibilité et leur courte durée de vie (Cheftel *et al.*, 1989). Normalement, au moins deux voies d'administration doivent être utilisées, l'une identique ou similaire à celle prévue pour l'usage chez l'homme et l'autre garantissant une exposition systémique à la substance (OMS, 2000). La dose létale 50 permet d'identifier les symptômes de l'intoxication et de comparer les substances entre elles quant à leur potentiel toxique. Selon la DL₅₀ par voie orale, les substances peuvent être classées en plusieurs catégories dans le Système de Classification Globalement Harmonisé (SCGH) (Tableau I et annexe 3).

Tableau I: Exemple de classification de la toxicité - Cas de la toxicité aiguë par voie orale chez le rat (Lauwerys *et al.*, 2007)

DL ₅₀ (mg/kg)	<1	<50	<500	<5000	<15000	>15000
Catégories	Extrêmement toxique	Hautement toxique	Modérément toxique	Faiblement toxique	Relativement toxique	Relativement atoxique

I.9.2.2-Toxicité subaiguë ou à moyen terme

Une forme plus commune de l'exposition humaine à de nombreux produits chimiques se fait par la répétition de doses qui ne produisent pas d'effets toxiques immédiats. Des effets tardifs peuvent survenir à cause de l'accumulation du produit dans les tissus ou à cause d'autres mécanismes, et il est important d'identifier toute possibilité de ce genre par des études subchroniques (OCDE, 1979). La toxicité subaiguë «ou subchronique» désigne les

manifestations observées chez des animaux après une exposition répétée à des doses d'une substance durant une période correspondant à 10% de la durée de vie moyenne de l'espèce considérée, soit 90 jours pour le rat et un an pour le chien (WHO, 1990; Diezi, 1992; Aniagu, 2009). Le protocole de l'OCDE prescrit une évaluation de la toxicité subaiguë par voie orale sur des rongeurs sur une période relativement plus courte de 28 jours. La substance d'essai est administrée aux animaux quotidiennement, sept jours sur sept, sur une période de 28 jours, à raison d'une dose unique chaque jour administrée par gavage ou incorporée dans les aliments ou l'eau de boisson (OCDE, 2008). De manière générale, au moins trois doses de la substance d'essai et un groupe témoin doivent être utilisés, en tenant compte des résultats de l'étude de toxicité aiguë initiale. On envisagera d'inclure un groupe supplémentaire d'animaux (satellite) dans le groupe traité à la plus forte dose, afin d'observer la réversibilité, la persistance, ou l'apparition tardive des effets toxiques, au moins 14 jours après le traitement (OCDE, 2008).

Cette étude permet de déceler les troubles dans l'alimentation, la croissance et le comportement des animaux ainsi que les altérations biochimiques et histopathologiques consécutives à l'administration répétée d'une substance, et de reconnaître les principaux sites et mécanismes d'action des toxiques (Diezi, 1992). Elle fournit des informations sur les risques pour la santé que peut entraîner une exposition répétée durant une période de temps relativement limitée, notamment pour le système nerveux, le système immunitaire, les organes reproducteurs et le système endocrinien (OCDE, 2008). Les expérimentations par administrations répétées devront être effectuées sur deux espèces de mammifères dont l'une ne doit pas appartenir à l'ordre des rongeurs. Le choix de la voie d'administration doit tenir compte de celles prévues pour l'emploi thérapeutique et des possibilités de résorption (WHO, 1992).

I.9.2.3-Toxicité chronique ou à long terme

Les expérimentations aiguës ou subaiguës ne donnent que très peu d'informations sur le plan morphologique à l'examen histologique (Potteau, 1966). Une administration plus prolongée à dose plus faible pourrait faire de nouveaux éléments lésionnels (Cheftel, 1989). Ainsi, il faut considérer également la toxicité chronique apparaissant à plus ou moins longue échéance à la suite d'administrations répétées d'une substance pendant un délai allant de 3 mois au moins à plusieurs années (Lechat *et al.*, 1982). L'évaluation de la toxicité chronique est d'une grande importance dans le cas des agents thérapeutiques qui s'emploient de manière répétée prolongée comme les analgésiques, les hypnotiques, les antirhumatismaux, les antibiotiques, etc. (Valette, 1972). Elle a pour but de déterminer entre autre les changements comportementaux, les modifications histologiques, anatomiques, physiologiques et/ou

biochimiques causées par les dommages de certains tissus et organes, ainsi que les effets morphologiques liés à l'exposition (OCDE, 1979; WHO, 1992; FAO/WHO, 2000). Elle permet aussi de rechercher les effets cancérigènes ou tératogènes de la substance testée et de donner une estimation de la concentration sans effet nocif observé (CSENO), qui permet d'établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine (OCDE, 2009).

I.10- Données sur *Pittosporum mannii*

I.10.1-Position systématique

Règne: Plantae

Ordre: Rosales

Sous-règne: Tracheobionta

Famille: Pittosporaceae

Phylum: Magnoliophyta

Genre: *Pittosporum* Banks ex Soland

Sous-phylum:

Espèce: *Pittosporum mannii*

Classe: Magnoliopsida

Nom: *Pittosporum mannii* Hook. f.

Sous-classe: Rosidae

(Cronquist *et al.*, 1996)

I.10.2- Description botanique

Pittosporum mannii Hook. f. (Pittosporaceae) est un arbuste ou arbre très polymorphe (Figure 20).



Figure 20: Morphologie de *Pittosporum mannii* (Photo de Coates Palgrave, 1957)

La plante croît à 5-10 m voire 12 m de hauteur. Le tronc mesure jusqu'à 40 cm de diamètre et son écorce est rugueuse, pâle ou gris-foncé. Les feuilles habituellement rassemblées aux extrémités des branches fleurissantes, sont alternes, simples, parfaitement glabres ou rarement pubescentes sur les parties inférieures dans le jeune âge, avec la lame

habituellement obovale ou grossièrement oblanceolate. Leur couleur est vert-foncé et glacée au-dessus, plus pâle et vert-jaunâtre au-dessous. Les inflorescences plutôt denses ou rarement réduites, forment des panicules ombellifères multiflores avec pédicelles plus ou moins pubescents. Les fleurs sont bisexuées, fortement parfumées et blanches crémeuses, jaunâtres ou verdâtres. Les étamines fertiles sont plus longues avec anthères courtes. Le gynécée fertile ou stérile possède un ovaire parfois légèrement pubescent; les capsules ne mûrissent jamais plus de 4 graines. Les racines habituellement au nombre de 4, sont fixées à la base et quelque peu rouges (Adjanohoun *et al.*, 1996; Momeni *et al.*, 2010; Kennedy *et al.*, 2013).

I.10.3- Distribution géographique et écologie

Le genre *Pittosporum* Banks qui typifie la petite famille des Pittosporaceae, s'est étendu au loin aux îles du Pacifique, à l'Asie orientale et tropicale et à l'Afrique australe et tropicale. *Pittosporum* s'est fragmenté en un grand nombre d'espèces; plus de 200 ont été décrites, mais elles ne sont probablement pas toutes valables. Le continent africain est pauvre en *Pittosporum*. La plupart des espèces de *Pittosporum* vivant en Afrique Occidentale au Sud de 8° lat. S. et Tropicale (*P. Mannii* Hook. f., *P. Dalzielii* Hutch. fide Friis., *P. abyssinicum* Delile var. angolense Oliv., *P. floribundum* Wight and Arn.) se rattachent à *P. viridiflorum* Sims de l'Afrique du sud ou en constituent des formes très voisines (Chevalier, 1946; Momeni *et al.*, 2010). *Pittosporum mannii* Hooker f. est une espèce typifiée par les spécimens récoltés par G. Mann sur le pic de Fernando-Pô et le Mont Cameroun, de 1600 à 2000 m d'altitude. Jacques-Félix et Aubréville la disent assez fréquente à l'intérieur du Cameroun, dans les régions montagneuses au-dessus de 1000 m d'altitude, notamment dans la zone de Fernando-Pô, les hauts plateaux de l'Ouest Cameroun, les montagnes de Bamenda et du Bamboutos, la zone de la savane de l'Adamaoua et les Monts Mandara (Chevalier, 1946; Momeni *et al.*, 2010; Poschner, 2013). *Pittosporum mannii* pousse principalement en régions équatoriales dans les zones de montagnes ou de moyenne altitude (au moins 900 à 1600 m au-dessus du niveau de la mer) et à pluviosité moyenne ou forte (zones sub-humide avec 1400 à 1700 mm de précipitations par an) (Ndenecho, 2010).

I.10.4-Données ethnopharmacologiques

Au Cameroun, *Pittosporum mannii* Hook. f. est connu sous le nom de Bourangal dans la langue Bororo (Nord) (Momeni *et al.*, 2010), Abidong chez les Aguambu-Bamumbu (Sud-Ouest) (Focho *et al.*, 2009), Teto'oh tah en Nguimbo'oh chez les Balessing (Ouest). A l'Ouest-Cameroun, l'écorce sèche de cette plante est consommée pour soigner diverses maladies intestinales (mal de ventre, diarrhée). Chez les Bororo, le broyat de la partie interne de l'écorce sèche est donné aux enfants en bas âge contre les infections dues aux vers

(Momeni *et al.*, 2010). Les populations de Bali Nyonga (Nord-Ouest Cameroun) utilisent cette plante pour traiter la malaria et les fièvres connexes (Kennedy *et al.*, 2013). Chez les Aguambu-Bamumbu, elle est utilisée pour soigner la douleur de poitrine, la toux ou l'aménorrhée. Les infusions des parts égales des écorces de *Pittosporum mannii* et *Bridelia micrantha* Baill. (Euphorbiaceae) additionnées du miel sont alors consommées oralement (Focho *et al.*, 2008; Poschner, 2013). Les écorces sont aussi utilisées pour traiter la syphilis primaire et secondaire (Adjanooun *et al.*, 1996). En Afrique du Sud et au Kenya, cette plante est employée dans la médecine traditionnelle pour le traitement de la fièvre, la malaria, l'inflammation, le mal d'estomac et comme antidote pour les morsures d'insecte et produit répulsif contre *Anophèles arabiensis* (Clarkson *et al.*, 2004; Muthaura *et al.*, 2007; Momeni *et al.*, 2010; Kennedy *et al.*, 2013; Poschner, 2013).

I.10.5.-Données pharmacologiques et phytochimiques

Un certain nombre de travaux ont été effectués sur *Pittosporum mannii*. Les feuilles et les écorces possèdent *in vitro* des effets antimicrobiens et antiparasitaires remarquables (Ramanandraibe *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2002). L'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces de *P. mannii* présente une forte activité antiradicalaire, qui pourrait expliquer l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle pour le traitement des infections et inflammation (Momeni *et al.*, 2010; Kennedy *et al.*, 2013). L'extrait au méthanol et l'extrait à l'eau des écorces de *P. mannii* posséderaient une forte toxicité vis-à-vis des cellules Vero E6 et cellules A2780 responsables des cancers de l'ovaire chez l'homme; ces effets seraient attribuables au pittoviridoside, un dérivé triterpénoïde-saponine cytotoxique qui a été isolé de *P. mannii*. Selon les informations personnelles de Dr. Momeni de l'Université de Ngaoundéré, on a observé un genre de toxicité avec *P. mannii* chez l'homme: des personnes examinées, qui consommaient de grandes quantités ou des infusions concentrées de l'écorce de la tige ont vomi après la prise (Poschner, 2013).

Les études phytochimiques effectuées sur *P.mannii* indiquent que ses feuilles contiennent des monoterpènes volatiles, des sesquiterpènes et des saponines cytotoxiques. Les écorces de la tige renferment des composés polyphénoliques qui pourraient être responsables de son activité antioxydante (Momeni *et al.*, 2010; Kennedy *et al.*, 2013). La présence des huiles essentielles, triterpènes, flavonoïdes et caroténoïdes a été également rapportée dans le genre *Pittosporum* (Kennedy *et al.*, 2013; Stark, 2013). Des investigations ont conduit à l'isolement de dérivés ester triterpénoïde-saponine dans les feuilles (Seo *et al.*, 2002) et les écorces de la tige de *P. mannii* et ces composés ont montré une activité antiparasitaire prononcée contre *Plasmodium falciparum* et *Leishmania donovani* (Kennedy *et al.*, 2013).

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

II.1-MATERIEL BIOLOGIQUE

II.1.1-Animaux d'expérimentation

Dans les expérimentations, suivant l'essai effectué, nous avons utilisé des rats albinos de souche Wistar ou des souris blanches de souche BALB-C des deux sexes. Ces animaux ont été élevés à l'Animalerie du Laboratoire de Physiologie Animale de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I. Leur alimentation était composée (pour 50 kg) d'un mélange de farine de maïs (20 kg), de son de blé (8 kg), de concentré de chair (3 kg), de farine de poissons (3,5 kg) et d'os (3 kg), de soja (3,5 kg), de tourteau de palmiste (5,5 kg) et d'arachide (3,5 kg). L'eau de boisson (eau de robinet) était disponible *ad libitum*. Un complexe vitaminique était ajouté à l'eau de boisson. Les animaux étaient maintenus dans les conditions de température et d'aération du milieu ambiant avec un cycle d'éclairage/obscurité naturel.

Les procédures expérimentales étaient approuvées par le Comité National d'Ethique du Cameroun (Reg. No FWA-IRD 0001954) et conduites suivant les principes internationalement admis pour l'utilisation et le traitement des animaux de laboratoire mentionnés dans la Directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil de l'Union Européenne du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

II.1.2. Microorganismes

Cinq souches de bactéries (*Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*) et une souche de champignon microscopique (*Candida albicans*) ont été utilisées pour les tests de l'activité antimicrobienne. Les souches de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* entéropathogène et autres bactéries ont été obtenues au Centre Pasteur du Cameroun. La souche de *Candida albicans* a été fournie par le Laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital Central de Yaoundé (Cameroun). Les identifications ont été confirmées selon les méthodes biochimiques standard (Holt *et al.*, 2000). L'identification de la souche de *Candida albicans* a été d'abord basée sur ses caractères culturels sur milieu Sabouraud plus chloramphénicol après 48 heures d'incubation à 37°C, ensuite sur leur aspect microscopique et enfin sur leurs propriétés biochimiques en utilisant la galerie ELICHRON FUNGI (Djimeli *et al.*, 2014b).

II.1.3 -Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour l'évaluation des effets pharmacologiques était constitué des écorces du tronc de *Pittosporum mannii*. Pendant les années de manipulations, les écorces ont été récoltées plusieurs fois à partir de mai 2009 à Balessing, dans l'Arrondissement de

Penka Michel, Département de la Menoua, Région de l'Ouest Cameroun. La plante a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun (H.N.C) à partir d'échantillons d'écorces, de branches et de feuilles, en comparaison avec l'échantillon conservé sous le numéro N° 24265 HNC du collecteur Jacques-Felix H 8989 (YA).

II.2-METHODES

II.2.1-Préparation de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *Pittosporum mannii*

Les écorces fraîches du tronc de *Pittosporum mannii* ont été nettoyées, découpées en petits fragments et séchées à l'ombre pendant une semaine. Elles ont été ensuite écrasées au moulin (un broyeur commercial) et la poudre obtenue a été pesée. L'extrait aqueux des écorces a été préparé suivant le protocole présenté dans la [figure 21](#). La poudre (355,88 g) a été introduite dans 3 L d'eau distillée et le mélange a été porté à ébullition sur une plaque chauffante pendant 40 minutes. Après refroidissement, la décoction a été décantée avec un tissu propre et filtrée avec du papier Whatman N° 3. Le filtrat obtenu (1,95 L) a été évaporé à l'étuve à 50°C. Cette préparation a permis d'obtenir 16,56 g de résidu d'extrait aqueux, soit un rendement d'extraction de 4,65%. L'extrait préparé a été conservé dans une boîte fermée à la température ambiante pour une durée maximale d'un an pendant les manipulations.

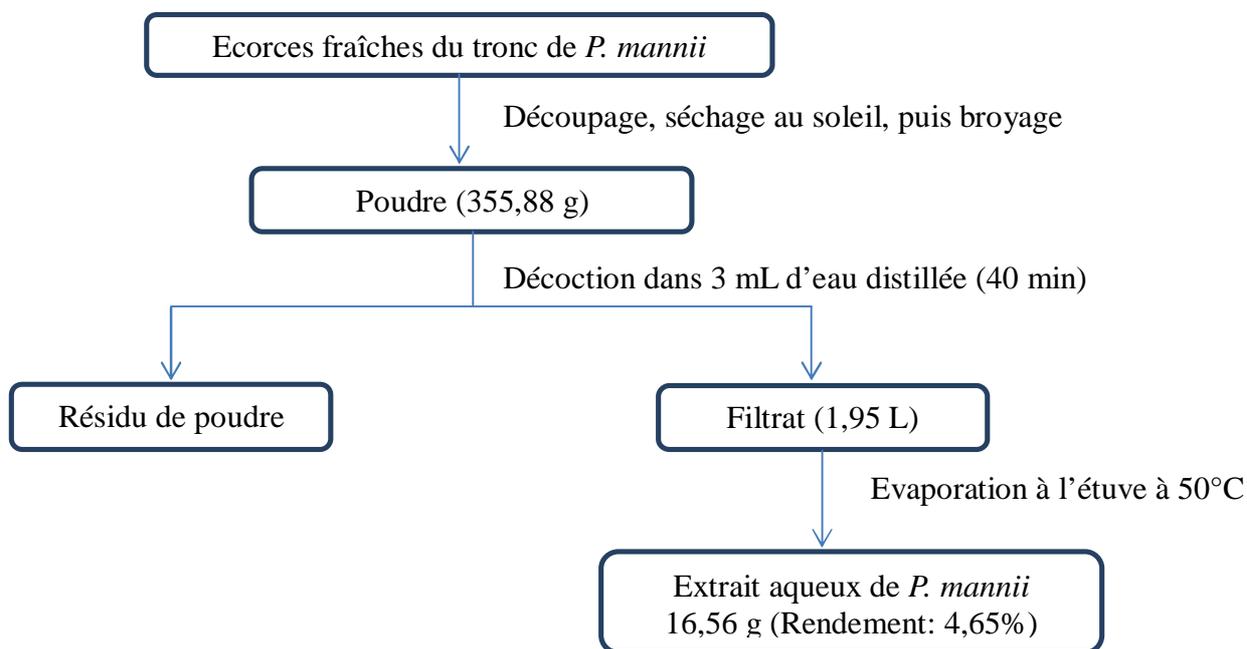


Figure 21: Protocole de préparation de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *P. mannii*

II.2.2-Préparation des substances pharmacologiques et liquides physiologiques

II.2.2.1-Solutions physiologiques

Les solutions salines préparées pour l'incubation des fragments d'organes étaient les solutions de Tyrode et la solution de Krebs-Henseleit dont les compositions sont indiquées dans le [tableau II](#).

Tableau II: Composition et préparation des solutions physiologiques

Liquide physiologique	Composition (en g) pour 1 L de solution
Solution de Tyrode	NaCl 8,01g ; KCl 0,2g ; MgCl ₂ 0,126g ; CaCl ₂ 0,207g; NaHCO ₃ 1,0g; NaH ₂ PO ₄ 0,058 g et glucose 1,1g (Emendörfer <i>et al.</i> , 2005)
Solution de Tyrode sans Ca ²⁺	NaCl 5,83g; KCl 2,98g; MgCl ₂ 0,126; CaCl ₂ –; NaHCO ₃ 1,0g ; NaH ₂ PO ₄ 0,058 g et glucose 1,1g plus/sans EDTA 0,146 mg (Horio <i>et al.</i> , 1998)
Solution de Krebs-Henseleit	NaCl 6,96g ; KCl 0,354g ; MgCl ₂ 0,144g ; CaCl ₂ 0,28g ; NaHCO ₃ 2,1g ; NaH ₂ PO ₄ 0,144g et glucose 2,1g (Capasso <i>et al.</i> , 2008; Matsumoto <i>et al.</i> , 2009)

II.2.2.2-Agents contracturants

Les agents spasmogéniques utilisés pour induire l'activité contracturante étaient la carbamylcholine (carbachol)-chloride, l'histamine hydrochloride, le chlorure de potassium, le chlorure de baryum (BaCl₂) et le chlorure de calcium (CaCl₂). Les solutions mères de ces substances ont été préparées comme suit:

- la solution mère de carbachol (182,6 g.mol⁻¹) à 2×10⁻⁴ M a été préparée en dissolvant 0,363 mg de cristaux dans 10 mL d'eau distillée.
- la solution mère d'histamine (184,07 g.mol⁻¹) à 1×10⁻³ M a été préparée en dissolvant 1,841 mg de cristaux dans 10 mL d'eau distillée.
- la solution mère de KCl (74,6 g.mol⁻¹) à 2000×10⁻³ M a été préparée en dissolvant 746 mg de sel dans 5 mL d'eau distillée
- la solution mère de BaCl₂ (208,34 g.mol⁻¹) à 1000 ×10⁻³ M a été préparée en dissolvant 1042 mg de sel dans 5 mL d'eau distillée
- la solution mère de CaCl₂ (111,10 g.mol⁻¹) à 10×10⁻² M a été préparée en dissolvant 222,2 mg de sel dans 20 mL d'eau distillée

II.2.2.3 -Antagonistes et agonistes

Les solutions d'antagonistes et agonistes standard utilisés pour évaluer les mécanismes d'action éventuels de l'extrait, ont été préparées comme l'indique le [tableau III](#).

Tableau III: Protocole de préparation des solutions d'antagonistes et agonistes

Substance (Masse molaire en g.mol ⁻¹)	Solution mère préparée (Ci en mg/mL ou mM)	Préparation
Atropine sulfate (712,848)	Ci = 1 mg/mL =1,40282×10 ⁻³ M	Solution injectable ampoule de 1 mL (1mg/mL)
Prométhazine chlorhydrate (284,43)	Ci = 625 µg/mL	Comprimé 25 mg dissous dans 40 mL d'eau distillée
Salbutamol (hemi) sulfate (239)	Ci = 0,5 mg/mL =2,09205×10 ⁻³ M	Solution injectable ampoule de 1 mL (0,5 mg/mL)

Propranolol chlorhydrate (295,84)	$C_i = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$	Comprimé 40 mg dissous dans 67,6 ml d'eau distillée ou 5,8168 mg de poudre dissous dans 10 ml d'eau
Noradrénaline (169,18)	$C_i = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$	3,383 mg de poudre dissous dans 10 mL d'eau distillée
Phentolamine hydrochloride (317,8)	$C_i = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$	6,356 mg de poudre dissous dans 10 mL d'eau distillée
Prazosine chlorhydrate (383,401)	$C_i = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$	7,668 mg de poudre dissous dans 10 mL d'eau distillée
Yohimbine hydrochloride (390,904)	$C_i = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$	7,818 mg de poudre dissous dans 10 mL d'eau distillée
Indométacine chlorhydrate (357,8)	$C_i = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	3,578 mg de poudre dissous dans 10 mL d'eau distillée
Vérapamil hydrochloride (491,07)	$C_i = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$	0,49107 mg de poudre dissous dans 10 mL d'eau distillée ou comprimé 40 mg dissous dans 407,274 mL
Acide éthylène–diamine–tétra–acétique (EDTA) (292,2426)	$C_i = 20 \times 10^{-3} \text{ M}$	29,224 mg de poudre dissous dans 5 mL d'eau distillée
Tétraéthylammonium (TEA) (183,72)	$C_i = 250 \times 10^{-3} \text{ M}$	229,65 mg de poudre dissous dans 5 mL d'eau distillée
Glibenclamide (493,5)	$C_i = 1,013 \times 10^{-3} \text{ M}$	Comprimé 5 mg dissous dans 10 mL d'eau distillée
Quinine chlorhydrate (360,091)	$C_i = 0,831232 \text{ M}$	Solution injectable ampoule de 2 ml (600 mg/mL)
N ^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (269,7)	$C_i = 2 \times 10^{-2} \text{ M}$	21,576 mg de poudre dissous dans 4 mL d'eau distillée
Bleu de méthylène (319,85)	$C_i = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$	6,397 mg de poudre dissous dans 10 mL d'eau distillée
Papavérine hydrochloride (375,86)	$C_i = 2 \times 10^{-2} \text{ M}$	15,0344 mg de poudre dissous dans 2 mL d'eau distillée
Lopéramide (477,038)	$C_i = 1 \text{ mg/mL}$	4 mg (2 comprimés) dissous dans 4 mL d'eau distillée
Naloxone (327,3743)	$C_i = 0,4 \text{ mg/mL}$	Solution injectable ampoule de 1 mL (0,4 mg/mL)

II.2.2.4 -Préparation du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4

La solution de tampon Tris-HCl 50 mM a été préparée en mélangeant 1,21 g de Tris et 2,79 g de KCl dans 33,3 mL de HCl 12 N et le volume final a été complété à 250 mL avec de l'eau distillée.

II.2.2.5 -Agents diarrhéiques ou cathartiques

II.2.2.4.1 -Solution de sulfate de magnésium

Une solution mère de sulfate de magnésium à 0,2 g/mL a été préparée en dissolvant 2 g de sel de sulfate de magnésium dans 10 mL d'eau distillée.

II.1.2.4.2 -Suspension de charbon végétal

Une suspension de charbon à 10% dans 8% de gomme arabique a été préparée de la manière suivante: 1,2 g de gomme arabique a été dissous dans 15 mL d'eau distillée, puis 1,5 g de charbon végétal activé a été ajouté à la suspension de gomme arabique. L'ensemble a été bien homogénéisé.

II.2.3-Analyse phytochimique de l'extrait aqueux des écorces de *Pittosporum mannii*

II.2.3.1-Tests phytochimiques qualitatifs

L'analyse phytochimique qualitative de l'extrait aqueux des écorces de *Pittosporum mannii* a été effectuée suivant la méthode décrite par Trease et Evans (1989) (Ayoola *et al.*, 2008). Cette étude avait pour but la mise en évidence de certaines classes de composés bioactifs notamment les tannins, les alcaloïdes, les saponines, les flavonoïdes, les phénols, les polyphénols, les terpenoïdes, les triterpènes, les anthraquinones, les sucres réducteurs, les stérols, les lipides et les glycosides cardiaques.

-Test des tannins

L'extrait (0,1 g) a été dissous dans 2 mL d'eau distillée dans un tube en verre et porté au bain-marie à 100° C pendant 3 minutes. Le mélange a été filtré à l'aide du papier Whatman N°3 puis 4 gouttes de chlorure ferrique (FeCl₃ 0,1 %) ont été ajoutées au filtrat. La présence des tannins dans l'extrait est caractérisée par un précipité vert foncé ou une coloration bleu-noire.

-Test des alcaloïdes

Un dixième de gramme (0,1 g) d'extrait a été dilué dans 2 mL d'acide sulfurique à 2% et le mélange a été chauffé à 100°C pendant 5 minutes et filtré. Dans 1 mL de filtrat, ont été ajoutés successivement 1 mL d'ammoniaque diluée (0,1 N) et 1 mL de chloroforme. Le mélange a été secoué doucement pour extraire la base alcaloïde. La couche de chloroforme a été extraite avec 2 mL d'acide acétique (1 M) et divisée en deux parts égales. Le réactif de Mayer a été ajouté à une part et le réactif de Dragendorff à l'autre. La formation d'une crème (en présence du réactif de Mayer) ou du précipité brun rougeâtre (en présence du réactif de Dragendorff) est caractéristique de la présence des alcaloïdes.

-Test des saponines

La mise en évidence des saponines s'est faite en dissolvant l'extrait (0,1 g) dans 1 mL d'eau distillée. Le mélange a été ensuite vigoureusement agité. La présence des saponines est révélée par la formation d'une mousse persistante au-delà de 10 minutes.

-Test des flavonoïdes

La détermination des flavonoïdes a été réalisée dans cette étude selon deux méthodes différentes. Dans un tube à essai, 0,1 g d'extrait a été dissous dans 1 mL d'eau distillée. A cette solution d'extrait ont été ajoutés successivement 1 mL d'ammoniaque dilué et 1 mL d'acide sulfurique concentré (1M). L'apparition d'une coloration jaune qui disparaît au repos

indique la présence des flavonoïdes. Dans un autre tube à essai, 0,1 g d'extrait a été dissous dans 1 mL d'eau distillée et 1 mL d'acétate éthylique a été ajouté à cette solution. Le mélange a été chauffé dans un bain-marie à 100°C pendant 3 minutes puis filtré. Par la suite, 1 mL de filtrat a été mélangé avec 1 mL de solution diluée d'ammoniaque et secoué. L'apparition d'une coloration jaune indique la présence des flavonoïdes.

–Test des polyphénols et phénols

L'évaluation des polyphénols et des phénols a été effectuée en dissolvant l'extrait (0,1 g) dans 1 mL d'eau distillée. A cette solution a été ajouté 1 mL d'une solution de chlorure ferrique (FeCl_3) 5%. Après homogénéisation de ce mélange, 2 gouttes de ferrocyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 5% ont été ajoutés. La présence des polyphénols est traduite par la formation d'un précipité vert bleu foncé et celle des phénols par l'apparition d'un précipité bleu vert foncé.

–Test des terpenoïdes (test de Salkowski)

Pour la mise en évidence des terpenoïdes, des parts d'extrait (0,1 g chacune) ont été mélangées avec 1 mL de chloroforme. Par la suite, 1 mL d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) a été soigneusement ajouté pour former une couche. L'apparition d'une coloration brune rougeâtre à l'interface indique la présence des terpenoïdes.

–Test des triterpènes

La détermination de triterpènes a été réalisée en dissolvant l'extrait (0,1 g) dans 1 mL d'eau distillée. Un volume (0,5 mL) de cette solution a été dissous dans 0,5 mL de chloroforme. A ce mélange ont été ajoutés successivement l'anhydride acétique (0,5 mL) et l'acide sulfurique concentré (0,5 mL). Après agitation, la présence des triterpènes est révélée par une coloration rouge violacée.

–Test des anthraquinones

Un dixième de gramme (0,1 g) d'extrait a été introduit dans 2 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré (1 M). Le mélange a été porté à ébullition dans un bain-marie à 100°C pendant 5 minutes puis filtré à chaud. Le filtrat a été mélangé avec 1 mL de chloroforme et agité. La couche de chloroforme a été pipetée dans un autre tube à essai et 0,5 mL d'une solution d'ammoniaque diluée a été ajouté. La solution obtenue a été observée pour des changements de coloration.

–Test des sucres réducteurs (test à la liqueur de Fehling)

La mise en évidence des sucres réducteurs a été effectuée en dissolvant l'extrait (0,1 g) dans 1 mL d'eau distillée. A cette solution ont été ajoutées quelques gouttes (4) de liqueur de Fehling A et B. Après chauffage, la présence de sucres réducteurs est révélée par une coloration rouge ou un précipité rouge brique.

–Test des stérols

L'extrait (0,1 g) a été introduit dans tube à essai dans lequel ont été ajoutés successivement 1 mL d'éther et 0,5 mL de potasse 10%. La solution obtenue a été chauffée pendant 5 minutes puis refroidie et lavée successivement trois fois avec 0,5 mL d'éther. Dans cette solution ont été ajoutés successivement un demi-millilitre (0,5 mL) d'acide acétique anhydride et le même volume (0,5 mL) de chloroforme. La présence des stérols est traduite par l'obtention d'une coloration rouge violette.

–Test des lipides

Une solution d'extrait à 0,1 g/mL a été préparée en dissolvant dans 1 mL d'eau distillée. Une goutte de cette solution d'extrait a été déposée sur du papier Whatman et laissé au repos pendant 10 minutes. L'apparition d'une tache translucide qui ne disparaît pas après évaporation indique la présence de lipides.

–Test des glycosides cardiaques (Test de Keller-Killiani)

La détermination des glucosides cardiaques a été effectuée en diluant l'extrait (0,1 g) dans 0,4 mL d'eau distillée. A cette solution a été ajouté 0,5 mL d'acide acétique glacial contenant une goutte de solution de chlorure ferrique, puis 0,5 mL d'acide sulfurique concentré a été ajouté au mélange. La formation d'un anneau brun à l'interface indique la présence d'une desoxysucre caractéristique des glycosides cardiaques. Un anneau violet peut apparaître au-dessous de l'anneau brun, alors que dans la couche d'acide acétique un anneau verdâtre peut se former juste au-dessus de l'anneau brun et s'étendre graduellement dans toute cette couche.

II.2.3.2-Détermination quantitative des polyphénols totaux

Le contenu total en polyphénols (CTP) de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* a été déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu, en utilisant l'acide gallique comme standard (Desire *et al.*, 2010). Brièvement, 0,5 mL de solution d'extrait de concentration 0,1 g/mL (dilution appropriée pour obtenir l'absorbance dans la gamme de la courbe d'étalonnage préparée) a été mélangé à 2,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois. Après 2 minutes d'incubation, 2 mL de solution saturée de Na₂CO₃ (145 g/L) ont été ajoutés. Le mélange a été incubé dans un bain-marie à 50°C pendant 5 minutes. Après refroidissement et stabilisation

pendant 5 minutes, l'absorbance a été lue à 760 nm. Une courbe d'étalonnage de l'acide gallique (de concentrations échelonnées de 0,01 à 0,10 mg/mL) a été établie (Figure 22). Le CTP a été déterminé et exprimé en milligramme d'équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme d'extrait sec. Les analyses ont été effectuées en triplet et les moyennes déterminées.

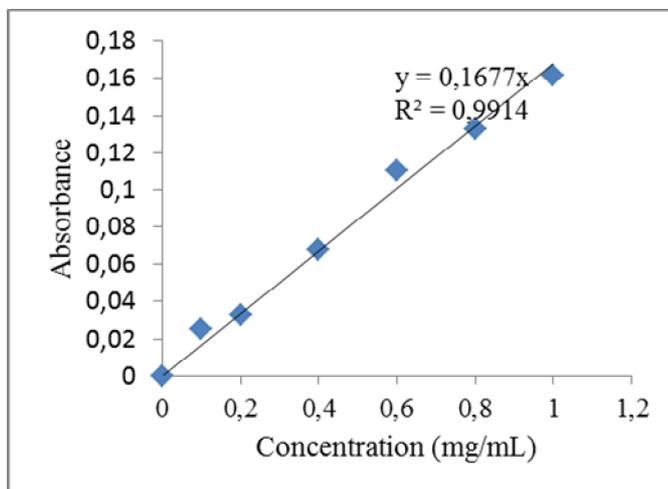


Figure 22: Courbe d'étalonnage pour la détermination de la teneur en polyphénols de l'extrait aqueux des écorces de *Pittosporum mannii*.

II.2.4-Evaluation des effets de l'extrait aqueux de *P. mannii* sur l'activité contractile de l'intestin de rat

Les effets de l'extrait aqueux des écorces de *Pittosporum mannii* ont été évalués *in vitro* sur l'activité contractile des fragments de duodénum de rats albinos des deux sexes, âgés d'environ quatre (4) mois et pesant entre 180-230 g.

II.2.4.1-Dispositif d'enregistrement de l'activité contractile

L'activité contractile du duodénum de rat a été enregistrée *in vitro* à l'aide d'un dispositif d'expérimentation assistée par ordinateur (EXAO) comprenant trois parties essentielles (Figure 23):

–une unité de commande de type Ugo Basile comprenant trois interrupteurs (1) qui servent respectivement à alimenter en énergie, à chauffer et à régler la température de l'enceinte (2) contenant la cuve à organe isolé (3). Cette cuve possède au fond un crochet permettant de fixer la préparation. La cuve a un volume maximal de 30 mL et est munie de trois ouvertures; l'ouverture inférieure sert à la vidange du liquide physiologique, l'ouverture supérieure permet de ravitailler l'organe en solution physiologique fraîche par l'intermédiaire d'une turbine spiralée, et l'ouverture latérale sert à l'oxygénation de la préparation. Une pompe à air (4) reliée à deux bouches de soude caustique (5) qui fixent le CO₂, permet d'oxygéner la préparation.

–un système d'enregistrement constitué par un système d'acquisition (6), le BIOPAC (MP35) muni d'un transducteur isotonique (7). Le transducteur a pour rôle de détecter et de convertir l'activité mécanique du muscle lisse en signaux ou ondes électriques enregistrables. Le système d'acquisition est un enregistreur hémodynamique de type «BIOPAC STUDENT LAB»; il traite et transmet les signaux vers un ordinateur.

–un ordinateur (8) muni du logiciel «Biopac Student Lab» PRO 3.7 et connecté au système d'acquisition (6). Il permet la visualisation et l'enregistrement des ondes électriques. Le logiciel est calibré pour un déroulement de la grille à une vitesse constante.

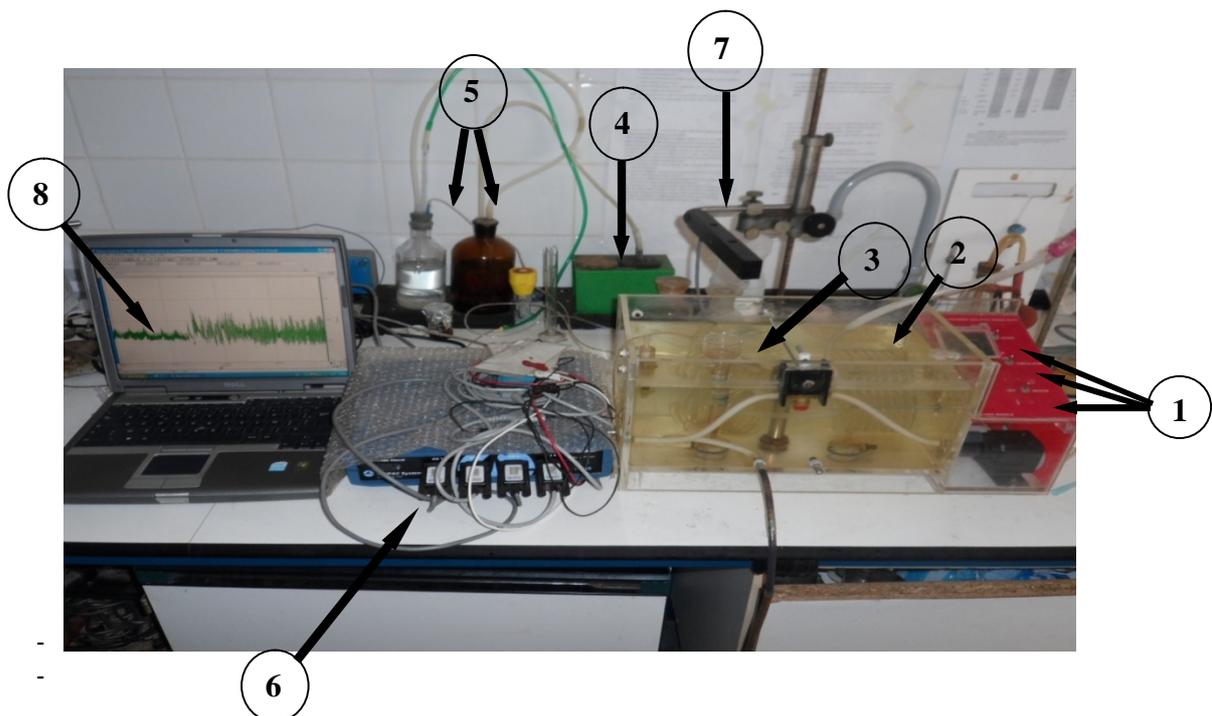


Figure 23: Dispositif d'enregistrement de l'activité contractile des fragments de l'intestin.

1: interrupteurs; 2: bain-marie; 3: cuve à organe; 4: pompe à air; 5: bocaux de soude; 6: système d'acquisition (BIOPAC MP 35); 7: transducteur; 8: ordinateur.

II.2.4.2-Prélèvement et montage des fragments d'intestin

Chaque animal a été sacrifié par dislocation cervicale sans anesthésie préalable (Borgi et Chouchane, 2009) et une laparotomie partielle a été pratiquée pour mettre à nu l'estomac et la portion initiale du grêle. Le duodénum a été sectionné à partir de la jonction pylorique et placé dans une boîte de pétri contenant une solution physiologique (solution de Tyrode ou de Krebs-Henseleit) bien oxygénée. Après dégagement des tissus conjonctif et mésentérique, le duodénum a été découpé en 2 à 3 fragments d'environ 1,5 cm. Ces fragments ont été laissés en attente dans une solution physiologique continuellement oxygénée. Chaque fragment a été ensuite monté longitudinalement dans la cuve à organe isolé à l'aide de deux crochets fins en acier fixés aux deux extrémités du fragment d'organe. L'extrémité inférieure du fragment

d'organe était accrochée sur un support (crochet) fixé au fond de la cuve à organe tandis que le crochet de l'extrémité supérieure était relié au transducteur isotonique connecté au système d'acquisition BIOPAC (MP35). La cuve à organe isolé contenait 20 mL de solution physiologique continuellement oxygénée et maintenue à une température constante 37°C (Borgi et Chouchane, 2009). La préparation a été équilibrée pendant au moins une heure pour permettre une stabilisation de l'activité contractile. Une tension de 1 g était appliquée progressivement à la préparation pendant la période d'équilibration, la solution physiologique était renouvelée toutes les 15 minutes. Les variations de tension consécutives aux variations de la longueur du fragment d'organe étaient captées et converties en signaux électriques, enregistrés par le système d'acquisition BIOPAC (MP35) et visualisés sur l'écran d'un ordinateur. Les fragments de duodénum qui n'étaient pas utilisés à l'immédiat étaient conservés dans une solution physiologique thermostatée à 37°C, continuellement oxygénée.

II.2.4.3-Evaluation des effets de l'extrait sur l'activité contractile spontanée de l'intestin de rat

Les effets de l'extrait sur l'activité contractile spontanée de l'intestin de rat ont été évalués dans cette étude en concentration unique puis en concentrations cumulatives.

II.2.4.3.1-Evaluation des effets des concentrations uniques d'extrait sur l'activité contractile spontanée

Les animaux ont été au préalable maintenus à jeun pendant au moins 18 h avant d'être sacrifiés. L'expérimentation a été conduite suivant un protocole adapté à la méthode décrite par Hu *et al.* (2010), mais avec des légères modifications. Des fragments de duodénum ont été préparés et montés dans la solution de Tyrode normale (de composition en mM: NaCl 136,90; KCl 2,68; MgCl₂ 1,05; CaCl₂ 1,87; NaHCO₃ 11,90; NaH₂PO₄ 0,42 et glucose 5,55 (Emendörfer *et al.*, 2005; Desire *et al.*, 2010)) constamment oxygénée. Après équilibration et stabilisation des contractions spontanées, une concentration unique d'extrait (0,01; 0,02; 0,04 ou 0,08 mg/mL) a été injectée dans la cuve et ses effets sur les contractions ont été enregistrés pendant 20 min. L'organe a été ensuite lavé plusieurs fois (4-5 fois) avec une solution fraîche de Tyrode et laissé 30 à 40 minutes pour une récupération totale, avant introduction d'une nouvelle concentration de l'extrait (même concentration ou concentration supérieure). La papavérine à 10⁻⁴ M a été ajoutée à la fin de chaque enregistrement pour provoquer le relâchement substantiel maximum de l'organe (Borrelli *et al.*, 2009; Aviello *et al.*, 2010). Pour chaque concentration d'extrait testée, au moins 6 essais ont été effectués. Les courbes temps-réponse ont été construites pour les différentes concentrations de l'extrait (Xia *et al.*, 2008). Le temps minimal de l'effet maximal et l'effet maximal de l'extrait ont été déterminés.

Les effets de l'atropine (1 μM) et de la prométhazine (0,5 $\mu\text{g/mL}$), substances antispasmodiques de référence (Ghayur *et al.*, 2005; Gilani *et al.*, 2008; Dubravka *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010), ont été évalués sur le duodénum de rat. Les effets du solvant de dilution de l'extrait (eau distillée), à un volume équivalent au volume maximal d'extrait administré dans la cuve à organe, ont été également évalués pendant la même durée d'enregistrement (20 min). Des volumes faibles (maximum 1% du volume total de la cuve) ont été administrés dans la cuve afin de minimiser les effets artefacts dus aux variations de volume (Xia *et al.*, 2008).

Dans la série des expérimentations sur l'activité contractile spontanée, le volume de solution d'extrait ou de toute autre drogue injecté dans la cuve à organe a été calculé suivant la formule:

$$va = \frac{C_f V_o}{C_i - C_f}, \text{ en administration unique, ou } va = \frac{\Delta C_f V_o}{C_i - \Delta C_f}, \text{ en administration cumulative}$$

Avec C_i = concentration initiale de la solution mère;

C_f = concentration finale de la solution dans la cuve;

ΔC_f = variation de la concentration finale ($C_{f_{n+1}} - C_{f_n}$);

V_o = volume initial du liquide physiologique dans la cuve;

V_a = volume de solution mère à ajouter dans la cuve pour obtenir la concentration finale.

Les effets de l'extrait ont été examinés sur les paramètres caractéristiques de la contraction à savoir, le tonus, l'amplitude et la fréquence de contraction.

- Les variations de tonus ont été exprimées en pourcentage (%) de baisse du tonus de base (valeur initiale) et évaluées par rapport au relâchement maximal induit par la papavérine 10^{-4} M (Borrelli *et al.*, 2009; Aviello *et al.*, 2010), suivant la formule:

$$\text{Variation du tonus (\%)} = \frac{\text{tension de base} - \text{tension après drogue}}{\text{tension de base} - \text{tension après papavérine}} \times 100$$

- L'amplitude des contractions spontanées en présence d'une concentration donnée de l'extrait ou d'une substance pharmacologique a été exprimée en pourcentage (%) par rapport à l'amplitude de base (amplitude initiale) suivant la formule:

$$\text{Variation de l'amplitude (\%)} = \frac{\text{amplitude de base} - \text{amplitude après drogue}}{\text{amplitude de base}} \times 100$$

II.2.4.3.2-Evaluation des effets des concentrations cumulatives d'extrait sur l'activité contractile spontanée

Les effets des concentrations cumulées de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* ont été évalués sur l'activité contractile spontanée du duodénum de rat. Après équilibration et stabilisation des contractions, des concentrations croissantes de l'extrait (0,005; 0,01; 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL) ont été administrées de manière cumulative toutes les 10 minutes dans la cuve à organe isolé. Les courbes concentrations-réponses ont été construites. La concentration efficace médiane (EC₅₀) et l'effet relaxant maximal (E_{max}) de l'extrait ont été déterminés (Borrelli *et al.*, 2009; Desire. *et al.*, 2010). Les effets de l'extrait ont été comparés à ceux de l'atropine (0,125-2 µM) et de la prométhazine (0,125-2 µg/mL). Dans cette série d'expérimentation, les effets de différentes substances ont été examinés sur le tonus et l'amplitude des contractions spontanées.

II.2.4.4 -Evaluation des mécanismes d'action de l'extrait sur l'activité contractile spontanée de l'intestin de rat

Cette série d'expérimentations avait pour objectif de déterminer les effets de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* en présence de quelques antagonistes pharmacologiques.

II.2.4.4.1-Evaluation des effets relaxants de l'extrait en présence de quelques substances pharmacologiques de référence

Pour étudier les mécanismes d'action probable de la relaxation provoquée par l'extrait aqueux de *P. mannii* à faibles concentrations sur le duodénum de rat, les effets relaxants de l'extrait ont été évalués en présence de l'atropine (1 µM), de la prométhazine (0,5 ou 1 µg/mL), de l'indométacine (3 µM), de la phentolamine (1 µM) ou la combinaison prazosine+yohimbine (1/1 µM), du propranolol (1 µM), du vérapamil (0,05 ou 0,1 µM), de l'EDTA (1 mM), du TEA (1 ou 10 mM), de la quinine (20 µM), du glibenclamide (10 µM), du L-NAME (5×10⁻⁴ M) et du bleu de méthylène (10⁻⁵ M) (Naseri *et al.* 2007; Xia *et al.*, 2008; Borrelli *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009; Desire *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010). Les fragments de duodénum ont été préalablement incubés avec chacune de ces substances pharmacologiques de référence pendant 20 minutes avant l'administration de l'extrait à une concentration unique (0,04 mg/mL) ou en concentrations cumulées (0,005-0,08 mg/mL). Dans un premier temps, après équilibration et stabilisation des contractions spontanées, la concentration submaximale d'extrait qui provoque un relâchement optimal (0,04 mg/mL) ou des concentrations croissantes cumulées (0,005-0,08 mg/mL) ont été administrées et les effets sur les contractions enregistrés. Dans un second temps, l'organe a été lavé plusieurs fois et stabilisé (30–50 min) et la préparation a été prétraitée avec un antagoniste pharmacologique

pendant 20 minutes avant introduction d'une concentration unique (0,04 mg/mL) ou de concentrations croissantes cumulées d'extrait (0,005-0,08 mg/mL) dans le milieu d'incubation (Zhao *et al.*, 2009; Borrelli *et al.*, 2009; Desire. *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010). Les courbes temps-réponse ou concentrations-réponses de l'extrait ont été construites dans les deux cas et comparées pour déterminer l'action de l'antagoniste sur l'effet de l'extrait de plante (Xia *et al.*, 2008; Borrelli *et al.*, 2009; Desire. *et al.*, 2010). Chaque antagoniste a été testé seul sur plusieurs fragments de duodénum (Naseri *et al.* 2007). Pour vérifier l'intégrité des récepteurs chez nos animaux d'expérience, les effets du propranolol (1µM) ont été évalués en présence du salbutamol administré en concentrations unique (5×10^{-6} M) ou cumulatives (10^{-7} - 5×10^{-5} M). Il a également été évalué les effets de la phentolamine ou la combinaison prazosine plus yohimbine en présence de la noradrénaline administrée en concentrations unique (5×10^{-6} M) ou cumulatives (10^{-7} - 5×10^{-5} M) dans cette étude.

II.2.4.4.2- Evaluation des effets contracturants de l'extrait en présence de quelques substances pharmacologiques de référence

L'objectif de cette étude était de déterminer les mécanismes d'action probables de l'effet contracturant de l'extrait aqueux de *P. mannii* observé avec les fortes concentrations sur le duodénum de rat. L'expérimentation a été menée suivant un protocole adapté à la méthode décrite par Hu *et al.* (2010) et Zhao *et al.*, (2009). Les fragments d'organe ont été traités après équilibration avec une concentration unique de l'extrait (0,16 mg/mL) pendant 20 minutes. Dans une autre série expérimentale, les fragments de duodénum ont été prétraités pendant 20 minutes avec un antagoniste et les effets de l'extrait (0,16 mg/mL) ont été évalués en présence continue de cet antagoniste (Zhao *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2010). Les tracés temps-réponse de l'extrait ont été enregistrés dans les deux cas et comparés pour déterminer l'action de l'antagoniste sur l'effet de l'extrait (Xia *et al.*, 2008). Dans cette seconde expérimentale, les effets d'une forte concentration de l'extrait (0,16 mg/mL) ont été évalués en présence de l'atropine (1 µM), de la prométhazine (1 µg/mL), de l'indométacine (3 µM), de la phentolamine (1µM) ou de la combinaison prazosine/yohimbine (1 µM/1µM), du propranolol (1µM), du vérapamil (0,05 µM ou 0,1 µM), de l'EDTA (1 mM), du tétraéthylammonium (TEA, 1 mM ou 10 mM), de la quinine (20 µM), du glibenclamide (10 µM), du L-NAME (5×10^{-4} M) ou du bleu de méthylène (10^{-5} M). Chaque préparation était incubée en présence d'un seul antagoniste (Naseri *et al.* 2007).

II.2.4.5-Evaluation des effets de l'extrait sur l'activité contractile de l'intestin induite par quelques agents spasmogènes

Dans cette série expérimentale, les effets de l'extrait ont été évalués sur la contraction du duodénum induite par quelques agents contracturants à savoir, le carbamylcholine (ou carbachol), l'histamine, le chlorure de potassium (KCl), le chlorure de baryum (BaCl₂) et le chlorure de calcium (CaCl₂).

II.2.4.5.1-Effets de l'extrait sur la contraction du muscle lisse induite par le carbachol

Les fragments de duodénum ont été montés et équilibrés dans la solution de Tyrode pendant au moins 60 minutes. Dans la première série d'essais, après équilibration, des concentrations croissantes de carbachol (10^{-9} ; 5×10^{-8} ; 10^{-7} ; 5×10^{-7} ; 10^{-6} ; 5×10^{-6} ; 10^{-5} ; 5×10^{-5} ; 10^{-4} et 5×10^{-4} M) ont été administrées cumulativement toutes les 2 minutes dans la cuve à organe isolé jusqu'à l'obtention de la tension maximale de l'organe. Dans la seconde série d'essais, après plusieurs lavages et équilibration, l'organe a été incubé en présence d'une concentration unique de l'extrait (0,02; 0,04 ou 0,08 mg/mL) pendant 10 minutes, puis le carbachol a été administré dans le milieu d'incubation dans les mêmes conditions de manière cumulative en présence continue de l'extrait (Horio *et al.*, 1998; Ouedraogo *et al.*, 2005; Gilani *et al.*, 2008; Desire *et al.*, 2010). Les courbes concentrations-réponses du carbachol ont été construites dans les deux conditions expérimentales (en absence et en présence de l'extrait) et comparées pour déterminer l'effet de l'extrait. La concentration efficace médiane (EC₅₀) et l'effet contracturant maximal (E_{max}) du carbachol ont été déterminés. Pour vérifier l'intégrité des récepteurs dans cette étude, les effets du carbachol ont été évalués en présence de l'atropine (1 μM).

II.2.4.5.2-Effets de l'extrait sur la contraction induite par l'histamine

Les effets de l'extrait ont été évalués sur la contraction induite avec l'histamine suivant un protocole similaire à celui décrit pour le carbachol. Les fragments de duodénum ont été incubés et équilibrés pendant au moins 60 minutes dans la solution de Krebs-Henseleit de composition (en mM): NaCl 119; KCl 4,75; MgCl₂ 1,2; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25; NaH₂PO₄ 1,2 et glucose 11,7 (Capasso *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009). Dans un premier temps, après équilibration, l'histamine a été introduite de manière cumulative (10^{-9} - 5×10^{-4} M) à une minute d'intervalle dans le milieu d'incubation et la courbe concentration-réponse a été établie. Dans un second temps, après plusieurs lavages et équilibration, l'organe a été incubé préalablement en présence d'une concentration unique de l'extrait (0,02, 0,04 ou 0,08 mg/mL) pendant 10 minutes, puis l'histamine a été injectée de manière cumulative dans le milieu d'incubation. Les courbes concentrations-réponses de l'histamine ont été établies dans les

deux conditions expérimentales et comparées pour évaluer l'effet de l'extrait (Matsumoto *et al.*, 2009; Desire *et al.*, 2010). La EC_{50} et la E_{max} de l'histamine ont été déterminées. Pour vérifier l'intégrité des récepteurs, les effets de l'histamine ont été évalués en présence de la prométhazine (1 μ g/mL), substance antihistaminique de référence.

II.2.4.5.3-Effets de l'extrait sur la contraction induite par le chlorure de potassium

Cette étude a consisté à évaluer les effets de l'extrait aqueux de *P. mannii* sur le duodénum de rat contracté par le chlorure de potassium (KCl). Dans la première série d'expérimentations, les effets de l'extrait ont été évalués sur des fragments de duodénum précontractés par une concentration unique de KCl, conformément à la méthode décrite par Naseri *et al.* (2007). Après équilibration, une solution hyperosmotique de KCl (20 mM ou 50 mM) a été injectée dans la cuve pour induire une contraction tonique soutenue. Une fois la tension de la contraction stable, l'extrait a été ajouté dans le milieu d'incubation de façon cumulative (0,005-0,08 mg/mL) et les effets sur le tonus ont été déterminés (Naseri *et al.* 2007; Gilani *et al.*, 2008; Borgi et Chouchane, 2009). Les effets de l'extrait ont été également évalués sur la contraction induite par le KCl (20 mM), en présence du propranolol (1 μ M) ou de la combinaison prazosine plus yohimbine (1/1 μ M). Pour ce faire, après équilibration et induction de la contraction par le KCl (20 mM), l'organe a été incubé avec l'antagoniste pendant 20 minutes et l'extrait a été administré en concentrations croissantes et de manière cumulative (0,005-0,08 mg/mL) toutes les 10 minutes dans le milieu d'incubation (Naseri *et al.* 2007).

Dans une autre série d'expérimentations, les effets de l'extrait ont été évalués sur la contraction phasique induite par le chlorure de potassium. Après équilibration du fragment de duodénum, des concentrations croissantes de KCl (10^{-3} - 6×10^{-2} M) ont été ajoutées de manière cumulative dans le milieu d'incubation. L'organe a été ensuite lavé plusieurs fois, équilibré sous une tension de 1 g.f et incubé en présence d'une concentration unique de l'extrait (0,02, 0,04 ou 0,08 mg/mL) pendant 10 minutes, avant l'administration cumulative de KCl (Rodriguez *et al.*, 2006; Chiwororo et Ojewole, 2009). Les courbes concentrations-réponses de KCl ont été construites dans les deux conditions et comparées pour évaluer l'effet de l'extrait. La EC_{50} et la E_{max} du KCl ont été déterminées. Suivant le même protocole, les effets du vérapamil (1 μ M) ont été évalués sur la contraction induite par le KCl (10^{-3} - 6×10^{-2} M).

II.2.4.5.4-Effets de l'extrait sur la contraction induite par le chlorure de baryum

Dans cette étude, les effets de l'extrait ont été évalués sur la contraction phasique induite par le chlorure de baryum ($BaCl_2$), suivant un protocole similaire à celui décrit précédemment pour la contraction induite par le KCl. Les fragments de duodénum ont été

montés et équilibrés dans la solution de Tyrode pendant au moins 60 minutes. Dans un premier temps, après équilibration, une concentration de BaCl_2 (5×10^{-3} M) a été administrée dans le milieu d'incubation pour induire une contraction maximale qui sert de référence (Matsumoto *et al.*, 2009). L'organe a été ensuite lavé plusieurs fois (4-5 fois) et équilibré. Des concentrations croissantes de BaCl_2 (10^{-5} - 5×10^{-2} M) ont été introduites de manière cumulative toutes les deux minutes dans le milieu d'incubation jusqu'à l'obtention de la tension maximale de l'organe. Dans une autre série d'essais, après induction de la contraction maximale, l'organe a été traité préalablement avec une concentration unique de l'extrait (0,02, 0,04 ou 0,08 mg/mL) pendant 10 minutes, puis le BaCl_2 a été administré de manière cumulative dans le milieu en présence continue de l'extrait. Les courbes concentrations-réponses de BaCl_2 ont été construites dans les deux conditions et comparées. La EC_{50} et la E_{max} du BaCl_2 ont été déterminées.

II.2.4.5.5-Effets de l'extrait sur la contraction induite par le chlorure de calcium

Les effets de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* ont été évalués sur la contraction induite par le chlorure de calcium (CaCl_2) en milieu sans Ca^{2+} . Les fragments de duodénum ont été incubés dans un milieu physiologique (solution de Tyrode) dépourvu de calcium, puis le calcium a été injecté dans le milieu en concentrations cumulatives (10^{-5} à 2×10^{-2} M). La solution de Tyrode dépourvue de Ca^{2+} et enrichie en K^+ (de composition en mM: NaCl 99,60; KCl 40; MgCl_2 1,05; CaCl_2 -; NaHCO_3 11,90, NaH_2PO_4 0,42 et glucose 5,55 (Horio *et al.*, 1998)) a été préparée par substitution équimolaire de NaCl par le KCl dans la solution normale avec omission du CaCl_2 et addition ou non de l'EDTA 0,5 M (Guan *et al.* 1984; Ouedraogo *et al.*, 2005).

Dans la première série d'expérimentations, les effets de l'extrait ont été évalués dans un milieu physiologique sans calcium et sans EDTA (acide éthylène-diamine-tétra-acétique). Pour ce faire, les fragments de duodénum ont été préalablement montés et équilibrés dans la solution de Tyrode normale pendant au moins 60 minutes. Ils ont été ensuite rincés plusieurs fois (4 à 5 fois) et incubés pendant 10 minutes dans la solution de Tyrode dépourvue de Ca^{2+} et enrichie en K^+ (Ghayur *et al.*, 2005). Les concentrations croissantes de CaCl_2 (10^{-5} - 2×10^{-2} M) ont été injectées cumulativement dans le milieu d'incubation. Une fois la contraction maximale atteinte, l'organe a été lavé plusieurs fois (3-4 fois) et incubé en présence d'une concentration unique de l'extrait (0,02; 0,04 ou 0,08 mg/mL) pendant 10 minutes. Les concentrations cumulatives de CaCl_2 ont été ajoutées dans milieu en présence continue de l'extrait (Park *et al.*, 2003; Ouedraogo *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2007; Musha *et al.*, 2007). Les courbes concentration-réponse de CaCl_2 en absence d'extrait (courbe témoin

ou CaCl₂ seul) et en présence de l'extrait (courbes extrait) ont été construites et comparées; la EC₅₀ et la E_{max} du CaCl₂ ont été déterminées. Suivant le même protocole expérimental, les effets du vérapamil (0,1 et 1 µM) ont été évalués sur la contraction induite par le chlorure de calcium (CaCl₂). La réponse contractile pour chaque concentration de CaCl₂ a été exprimée en % de la tension maximale initialement atteinte lors de la première administration de CaCl₂ (Yuzurihara *et al.*, 2002).

Dans la deuxième série d'expérimentations, les effets de l'extrait ont été évalués dans un milieu physiologique sans calcium et additionné de l'EDTA (0,5 mM). Comme décrit précédemment, les fragments de duodénum ont été préalablement montés et équilibrés dans la solution de Tyrode normale pendant au moins 60 minutes. Ils ont été ensuite rincés plusieurs fois (4 à 5 fois) et incubés pendant 10 minutes avec la solution de Tyrode dépourvue de Ca²⁺ et contenant 0,5 mM d'EDTA. Les concentrations cumulatives de CaCl₂ (10⁻⁵ à 2×10⁻² M) ont été introduites dans le milieu d'incubation en absence de l'extrait et après traitement préalable avec une concentration unique de l'extrait (0,02; 0,04 ou 0,08 mg/mL) pendant 10 minutes (Chan *et al.*, 2006; Musha *et al.*, 2007). Les courbes concentration-réponse de CaCl₂ ont été réalisées dans chaque cas et la EC₅₀ et la E_{max} du CaCl₂ ont été déterminées.

Dans une autre série d'expérimentations, les effets de l'extrait ont été évalués sur la contraction due au CaCl₂ sur des fragments de duodénum incubés pendant quelques minutes (10 min) dans une solution de Tyrode sans calcium et contenant de l'EDTA à 0,5 mM. Après équilibration dans du Tyrode normal, la préparation a été lavée plusieurs fois (3-4 fois) et incubée pendant 10 minutes dans la solution du Tyrode sans Ca²⁺ contenant de l'EDTA à 0,5 mM. La préparation a été ensuite lavée deux fois et équilibrée dans du Tyrode sans Ca²⁺ et sans EDTA avant l'ajout du CaCl₂ de manière cumulative dans le milieu. La courbe concentration-réponse de CaCl₂ a été établie d'une part en absence d'extrait et d'autre part après incubation de la préparation en présence d'une concentration unique de l'extrait (0,02; 0,04 ou 0,08 mg/mL) pendant 10 minutes.

II.2.5-Evaluation *in vivo* de l'activité antidiarrhéique de l'extrait

L'activité antidiarrhéique de l'extrait aqueux de *P. mannii* a été évaluée *in vivo* en utilisant quelques modèles expérimentaux de diarrhées chez les animaux de laboratoire (tests d'élimination des fèces, du transit intestinal et de diarrhée induite avec l'huile de ricin).

II.2.5.1-Evaluation des effets de l'extrait sur l'élimination des fèces chez la souris

Cette étude a été menée sur des souris blanches adultes des deux sexes, âgées de 3 à 4 mois et pesant entre 22-32 g. Les souris ont été convenablement alimentées et ravitaillées en eau à volonté jusqu'au moment de l'essai. Elles ont été réparties en 7 lots de 15 animaux

chacun. Les souris du premier lot (contrôle) ont reçu par gavage de l'eau distillée (10 mL/kg), celles des lots 2, 3, 4, 5 et 6 ont été traitées avec l'extrait aqueux de *P. mannii* aux doses respectives de 60, 120, 240, 480 et 720 mg/kg. Le dernier lot (témoin positif) a reçu le loperamide (5 mg/kg). Après le traitement, les animaux du même lot ont été placés individuellement dans des cages en plastique transparentes. Du papier non absorbant propre a été placé au fond de la cage, pour recueillir les fèces; il était renouvelé toutes les heures, lors de la collecte des fèces. Les fèces ont été collectées toutes les heures pendant quatre heures (Besra *et al.*, 2002). A la fin de l'expérimentation, les fèces (solides ou molles) émises par chaque animal ont été dénombrées et pesées. Pour chaque lot, le nombre et la masse des fèces excrétées ont été déterminés par période d'une heure et pendant la durée d'observation.

II.2.5.2-Evaluation des effets de l'extrait sur le transit intestinal chez la souris

Les effets de l'extrait aqueux de *P. mannii* ont été évalués sur le transit intestinal des aliments chez la souris blanche, en utilisant le charbon comme marqueur (Vischer et Casals-Stanzel, 1983). Dans cette étude, des souris adultes de deux sexes, âgées de 3 à 4 mois et pesant entre 22 et 32 g, ont été utilisées. Ces animaux ont été soumis à un jeûne de 18 heures avant le début de l'expérimentation, mais avec provision en eau à volonté. Dans la première série d'études, les effets de l'extrait ont été évalués sur le transit intestinal normal. Pour ce faire, soixante-dix (70) souris ont été réparties en 7 lots de 10 animaux chacun. Les souris du premier lot (contrôle) ont reçu de l'eau distillée (10 mL/kg), celles des lots 2 à 6 ont été traitées avec l'extrait aqueux de *P. mannii* aux doses respectives de 60, 120, 240, 480 et 720 mg/kg. Les animaux du lot 7 (témoin positif) ont reçu le loperamide (5 mg/kg). Les différents traitements ont été administrés en dose orale unique à l'aide d'une sonde œsophagienne. Soixante (60) minutes après le traitement, les animaux des différents lots ont reçu toujours par voie orale 0,3 mL d'une suspension de charbon (suspension de charbon activé 10% dans 8% de gomme arabique). Trente (30) minutes après administration du charbon, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale et disséqués. L'intestin grêle (du pylore au cæcum) a été rapidement sectionné puis étalé délicatement. La distance traversée par le charbon à partir du pylore ainsi que la longueur totale de l'intestin ont été mesurées (Besra *et al.*, 2002).

Dans une autre série d'études, le transit intestinal a été stimulé avec l'huile de ricin (Besra *et al.*, 2002). Soixante (60) souris ont été réparties en 6 lots de 10 animaux chacun. Après 18 heures de jeûne, les souris ont été pesées et traitées comme précédemment avec de l'eau distillée (10 mL/kg) (contrôle), l'extrait aqueux de *P. mannii* aux doses respectives de 120, 240, 480 et 720 mg/kg ou le loperamide (5 mg/kg) (témoin positif). Trente (30) minutes après l'administration des drogues, chaque animal a reçu par voie orale 0,3 mL d'huile de

ricin avant l'administration orale de la suspension de charbon 30 minutes plus tard (Besra *et al.*, 2002). Après trente (30) minutes d'observation, les animaux ont été sacrifiés, disséqués et la distance parcourue par le charbon dans l'intestin grêle a été mesurée et exprimée en pourcentage de sa longueur totale.

Pour chaque souris, l'index péristaltique a été calculé et exprimé en pourcentage de la distance parcourue par le charbon par rapport à la longueur totale de l'intestin grêle (Zhou *et al.*, 2006; Ojewole *et al.*, 2008):

$$\text{Index péristaltique (\%)} = \frac{\text{longueur totale de l'intestin} - \text{longueur parcourue par le charbon}}{\text{longueur totale de l'intestin}} \times 100$$

II.2.5.3-Evaluation des effets de l'extrait sur la diarrhée induite par l'huile de ricin chez le rat

L'expérimentation a été menée sur des rats adultes des deux sexes, âgés de 3 à 4 mois et pesant entre 180 et 220 g. Pour mener cette étude, soixante-douze (72) rats ont été répartis en 8 groupes de 9 animaux chacun et soumis à un jeûne non hydrique pendant 18 heures avant le début du traitement. Les animaux du premier groupe (témoin négatif) ont reçu par gavage de l'eau distillée (10 mL/kg). Ceux des lots 2 à 5 ont été traités avec l'extrait aqueux de *P. mannii* aux doses respectives de 120, 240, 480 et 720 mg/kg. Le sixième lot a reçu le lopéramide (5 mg/kg, p.o). En vue d'investiguer le mécanisme d'action possible de l'extrait, deux lots supplémentaires de rats ont été constitués: un lot qui a reçu par injection intrapéritoniale le naloxone (0,5 mg/kg) et 30 min plus tard une administration orale de l'extrait à la dose de 480 mg/kg, et un autre lot traité avec le naloxone (0,5 mg/kg, i.p) plus le lopéramide (5 mg/kg) (Awouters *et al.*, 1978; Shook *et al.*, 1989, Yu *et al.*, 2000; Otshudi *et al.*, 2000; Besra *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2002; Venkatesan *et al.*, 2005). Soixante (60) minutes après le traitement (administration des drogues), les animaux des différents lots ont reçu par gavage l'huile de ricin (0,6 mL/rat). Les animaux ont été ensuite placés individuellement dans des cages en plastique avec du papier (papier non absorbant) au fond, servant à la collecte des selles. Les rats ont été laissés en observation pendant 4 heures pour l'appréciation de la consistance des selles, du nombre de selles, de la fréquence et de la sévérité (ou gravité) des fèces diarrhéiques. Après chaque heure, les fèces étaient collectées et pesées (Kumar *et al.*, 2001; Nwafor et Okwuasaba, 2001; Besra *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2002). A la fin de l'essai, les paramètres suivants ont été déterminés pour chaque lot de rats: temps de déclenchement de la diarrhée, nombre total des fèces solides et diarrhéiques excrétées, fréquence d'émission des fèces, masse des matières fécales excrétées, pourcentage d'incidence des diarrhées (nombre de rats ayant fait la diarrhée/nombre total de rats soumis à l'essai) et le pourcentage d'inhibition des diarrhées (Yu *et al.*, 2000; Nsaka *et al.*, 2012, Abdelrahim *et al.*, 2013; Xiao

et al., 2013; Zhang *et al.*, 2013). Chez les animaux essais, le pourcentage d'inhibition des diarrhées a été calculé par rapport aux témoins.

II.2.6-Evaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne de l'extrait

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de *P. manni* a été faite en collaboration avec le Laboratoire de Biologie générale, Hydrobiologie et Recherche environnementale de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I et le Laboratoire d'Endocrinologie et de Radioéléments de l'Institut de Recherches Médicales et d'Etudes des Plantes Médicinales (IMPM). Dans cette étude, les effets de l'extrait aqueux de *P. manni* ont été évalués *in vitro* sur différentes souches de microorganismes pathogènes responsables des diarrhées infectieuses, en utilisant la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé (Ronald, 1990, Salie *et al.*, 1996, Zavala *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2002; Ngo Teke *et al.*, 2007).

L'activité antimicrobienne de l'extrait a été testée sur cinq souches bactériennes (*Salmonella typhi*, *Escherichia coli* entéro-pathogène (EPEC), *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*) et une souche de champignon microscopique (*Candida albicans*). Ces souches microbiennes ont été conservées au congélateur dans du glycérol à – 70°C avant leur utilisation.

II.2.6.1-Repiquage et conservation des souches microbiennes

Les souches bactériennes ont été repiquées sur la gélose ordinaire coulée en pente dans des boîtes de Pétri. Les souches microbiennes préalablement conservées au congélateur dans la la glace ou du glycérol ont été dégivrées à température ambiante au laboratoire et repiquées (Figure 24). Un volume de 100 µL de chaque culture a été transféré dans des tubes à essai contenant 10 mL de bouillon nutritif (Oxford) et incubés à 37°C pendant 24 et 48 heures respectivement pour les souches bactériennes et la souche fongique. Cette suspension a été centrifugée à 8000 tours/min pendant 10 min à 10°C. Le culot a été lavé deux fois dans une solution physiologique (NaCl 8,5 g/L) stérile, puis remis en suspension dans 10 mL d'eau physiologique stérile (NaCl 8,5 g/L). Après une série de dilutions, un volume de 100 µL de la suspension a été étalé sur un milieu spécifique coulé en boîte de pétri sur la gélose (Djimeli *et al.*, 2014 a et b). Les milieux de culture spécifiques (Annexe 2) sont représentés par le Chapman au mannitol (*S. aureus*), Endo (*E. coli*), Gélose SS (*S. typhi*, *S. dysenteriae A₁*, *S. flexneri*) pour les souches bactériennes et le Sabouraud plus chloramphénicol pour *Candida albicans*. Les milieux de culture, l'eau physiologique et l'eau distillée ont été stérilisés à 121°C pendant 15 minutes dans un autoclave (Ngo Teke *et al.*, 2007). Après ensemencement, les boîtes de Pétri ont été incubées à l'étuve à 44°C pendant 24 h pour *E. coli*, 37°C pendant 24 h pour les autres bactéries, 37°C pendant 48 heures pour *Candida albicans* (Ronald, 1990,

Zavala *et al.*, 1998; Holt *et al.*, 2000; Ngo Teke *et al.*, 2007). Ce repiquage a permis d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées pour la préparation des inocula et pour la conservation.

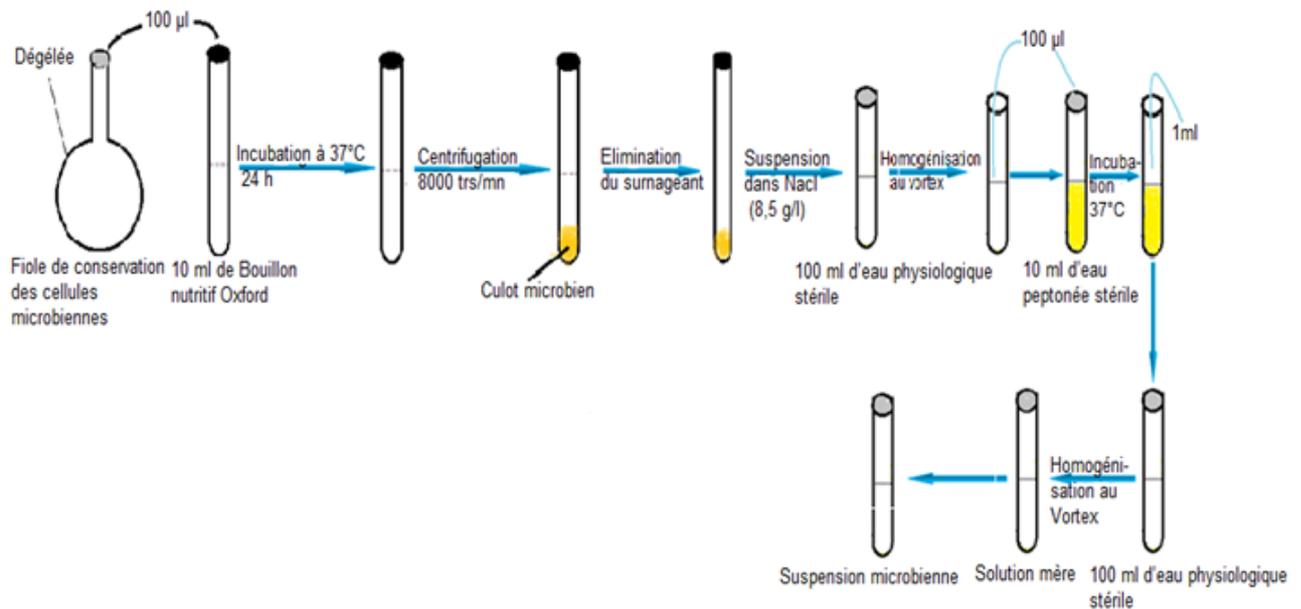


Figure 24: Étapes de la préparation de la suspension microbienne à partir d'une culture cellulaire (Djimeli *et al.*, 2016).

II.2.6.2-Préparation des inocula bactériens et fongique

Les inocula des microorganismes ont été préparés séparément à partir des cultures jeunes de 24 h ou 48 h sur des milieux spécifiques. Pour préparer les inocula standard bactériens, des jeunes colonies bactériennes de 24 h, bien isolées issues de la culture précédente, ont été prélevées de la surface de la gélose à l'aide d'une anse de platine et introduites dans un tube à essai contenant 10 mL d'eau physiologique. A partir de cette solution mère, des dilutions successives ont été réalisées pour obtenir une charge bactérienne correspondant approximativement à 0,5 sur l'échelle standard de turbidité de Mc Farland (soit $1,5 \cdot 10^8$ Unités formant colonies (UFC)/mL) par lecture de la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Ngo Teke *et al.*, 2007; Ewoti *et al.*, 2011; Djimeli *et al.*, 2014). Pour préparer l'inoculum standard fongique, des colonies de *Candida albicans* de 48 h ont été prélevées de la culture précédente et introduites dans un tube à essai stérile contenant 10 mL d'eau physiologique. L'opacité de la suspension a été ajustée à 0,5 sur l'échelle Mc Farland, correspondant approximativement à 10^3 spores par mL ou $1,5 \times 10^5$ UFC/mL, par lecture de la densité optique à 450 nm (Ngo Teke *et al.*, 2007). Chaque inoculum a été ainsi préparé à une turbidité correspondant au tube N° 4 sur l'échelle de Mc Farland (Ronald, 1990, Zavala *et al.*, 1998). Une solution étalon de 0,5 sur l'échelle de Mc Farland a été obtenue par mélange de BaCl_2 (1%) et de H_2SO_4 (1%): 1v/200v. L'étalon a été préparé en s'assurant que son

absorbance à 600 nm était comprise entre 0,09 et 0,1 (NCCLS, 1999). La turbidité de l'étalon a ensuite été lue à 450 nm.

II.2.6.3-Test de sensibilité des souches microbiennes à l'extrait de plante

La méthode de diffusion de disques en milieu gélosé (Lin *et al.*, 2002) a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait aqueux de *P. manni*.

II.2.6.3.1-Préparation des milieux et ensemencement

Les milieux de culture spécifiques ont été préparés suivant les instructions du fabricant (Annexe 1), puis stérilisés à l'autoclave. Les milieux maintenus à 40°C ont été ensemencés chacun d'une suspension de microorganismes de manière à avoir 0,1 mL d'inoculum pour 10 mL de milieu de culture. Après homogénéisation, ils ont été coulés dans des boîtes de Pétri sur la gélose. Les boîtes de Pétri ont été laissées sur la paillasse pour permettre la solidification du milieu au bout de 30 minutes (Ngo Teke *et al.*, 2007).

II.2.6.3.2-Préparation et imprégnation des disques

Des disques blancs de 6 mm de diamètre ont été obtenus à partir du papier Whatman, puis stérilisés à l'autoclave pendant 15 mn à 121°C. Ces disques ont été imprégnés chacun de 10 µL d'une solution d'extrait aqueux de *P. manni* de concentration 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 15 ou 20 mg/mL, puis ils ont été séchés à côté du Bec Bensen. Des disques d'antibiotiques standard: ciprofloxacine (5 µg/mL) et gentamycine (10 µg/mL) pour les bactéries, et nystatine (50 µg/mL) pour la souche fongique, ont également été utilisés (Lin *et al.*, 2002; Ngo Teke *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2013). Après l'imprégnation des disques, ils ont immédiatement été placés dans les boîtes de Pétri contenant les milieux de culture appropriés sur lesquels on a inondé les suspensions microbiennes (Ronald, 1990, Zavala *et al.*, 1998; Ngo Teke *et al.*, 2007). Les boîtes de pétri ont été laissés à la température ambiante pendant 30 minutes pour permettre la diffusion de l'extrait aqueux dans les milieux de culture (Mukherjee *et al.*, 2013). Les boîtes de pétri ont été retournées et pré-incubées sous la hotte pendant 1 heure, avant d'être incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h et à 25°C pendant 48 h respectivement pour les bactéries et le champignon. Les essais ont été réalisés en triplicate (Lin *et al.*, 2002). Les activités antimicrobiennes de l'extrait aqueux et des antibiotiques ont été déterminées en mesurant le diamètre (en millimètre) de la zone d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque (y compris le disque), à l'aide d'une règle graduée. L'extrait est supposé avoir des effets inhibiteurs sur la croissance bactérienne lorsque le diamètre d'inhibition est supérieur ou égal à 7 mm (Mukherjee *et al.*, 2013).

II.2.7-Evaluation de la toxicité de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *Pittosporum mannii* chez le rat

Le profil toxicologique de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *Pittosporum mannii* a été évalué *in vivo* en administration unique et en administrations répétées, en utilisant des jeunes rats femelles et mâles âgés de 8 à 10 semaines et pesant entre 100 et 160 g au début de l'essai. Les différentes manipulations de toxicité ont été réalisées conformément aux instructions de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique) portant sur les tests de toxicité des substances administrées aux animaux de laboratoire.

II.2.7.1- Toxicité aiguë

L'essai de toxicité aiguë a été effectué suivant la méthode par classe de toxicité aiguë de la Ligne Directrice 423 du protocole de l'OCDE (2001), consistant en une étude de toxicité orale à dose unique de 14 jours.

- Principe de la méthode

La méthode par classe de toxicité aiguë décrite dans la présente Ligne Directrice est un processus séquentiel utilisant trois animaux d'un seul sexe par étape. Suivant la mortalité et/ou l'état moribond des animaux, deux à quatre étapes en moyenne sont nécessaires pour évaluer la toxicité aiguë de la substance d'essai. La méthode utilise des doses prédéterminées et donne des résultats qui permettent de classer la substance dans le Système de Classification Globalement Harmonisé (SCGH) des substances entraînant une toxicité aiguë (Annexe 3). La méthode ne vise pas le calcul d'une valeur de la DL₅₀, mais permet de déterminer dans quelle gamme de doses la substance doit être considérée létale (OCDE, 2001; Jonsson *et al.*, 2013).

- Expérimentation

Dans cette étude, trois lots essais de trois rats femelles nullipares et non gravides chacun ont été constitués. Le premier lot de rats a reçu par gavage une dose unique de l'extrait (2000 mg/kg) et a été laissé en observation. Au bout de 24 heures d'observation, le deuxième lot de rats essais a été traité avec la même dose unique d'extrait (2000 mg/kg) et laissé en observation dans les mêmes conditions. A la fin de la période d'observation (24 h), le troisième lot de rats essais a reçu l'extrait à la dose unique de 5000 mg/kg et a été placé en observation dans les mêmes conditions. Trois animaux supplémentaires servant de témoins ont reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg et ont été laissés en observation dans les mêmes conditions que les animaux essais. Les animaux étaient regroupés par lot dans la même cage en plastique et ont été maintenus à jeun pendant 12 heures (toute la nuit) avant l'administration de la substance, mais ravitaillés en eau de boisson à satiété (Jonsson *et al.*, 2013). Ils ont été traités par gavage à l'aide d'une sonde œsophagienne. Après administration

de l'extrait ou de l'eau distillée, le ravitaillement en eau a été également suspendu pour quatre heures. Les animaux ont été observés pendant 4 heures pour l'appréciation du comportement général et des signes de toxicité. Les observations ont porté essentiellement sur l'aspect physique (modifications du pelage, larmolement), le comportement général (mobilité, léthargie, interactions, posture, sensibilité, réflexes, agressivité), l'aspect des fèces, ainsi que sur diverses autres manifestations toxiques telles que le tremblement, la convulsion, la salivation, le sommeil et le coma (OCDE, 2001; Jonsson *et al.*, 2013). Durant les premières 24 heures suivant le traitement, les animaux morts ont été dénombrés et disséqués pour un examen macroscopique des organes (tube digestif, foie, reins, poumons et voies respiratoires, vessie, organes génitaux, etc.). Les survivants ont été gardés en observation pendant 14 jours avant d'être sacrifiés par inhalation de l'éther suivie de la dislocation cervicale, puis autopsiés pour un examen macroscopique des organes.

II.2.7.2-Toxicité subaiguë

–Protocole expérimental

La toxicité subaiguë de l'extrait aqueux des écorces de *Pittosporum mannii* a été évaluée chez le rat conformément à la Ligne Directrice 407 du protocole de l'OCDE (2008), consistant en une étude de la toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours chez les rongeurs.

Cinquante rats des deux sexes ont été répartis en cinq groupes de 10 animaux chacun (5 mâles et 5 femelles) dont un groupe témoin recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), 3 groupes essais traités avec l'extrait aqueux de *P. mannii* aux doses respectives de 120, 240, 480 mg/kg et un dernier groupe satellite recevant également l'extrait à la dose de 480 mg/kg de poids corporel (OCDE, 2008). Les animaux des différents groupes ont reçu quotidiennement par gavage une dose unique de l'extrait ou de l'eau pendant quatre semaines (28 jours). Ils ont été nourris convenablement et ravitaillés en eau de boisson à volonté. Pendant toute la période expérimentale, le poids corporel des animaux ainsi que la consommation hydrique ont été notés chaque jour, avant l'administration des produits. Une attention particulière était portée sur les modifications du comportement (notamment la mobilité, la réactivité), l'état physique (modifications du pelage, larmolement) et autres états de santé des animaux. A la fin de la période expérimentale, les animaux des différents groupes (à l'exception du lot satellite) ont été sacrifiés par décapitation après anesthésie sous éther. Les animaux du lot satellite ont été laissés sans traitement pendant 2 semaines (14 jours) supplémentaires avant d'être sacrifiés, ceci dans le but d'étudier la persistance ou la disparition (réversibilité) des éventuels effets néfastes provoqués par le traitement avec l'extrait de plante. Après le sacrifice, les animaux ont été autopsiés et les organes (foie, reins, rate, intestin) ont été examinés et prélevés pour les

analyses biochimiques et les études histologiques. Le foie, les reins et la rate des animaux sacrifiés ont été pesés et leur poids relatif par rapport au poids corporel a été déterminé.

–Prélèvement du sang et préparation des échantillons pour les analyses hématologiques et biochimiques

Lors du sacrifice, les échantillons de sang artérioveineux ont été recueillis dans deux types de tubes: les tubes contenant un anticoagulant, l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) et les tubes secs sans anticoagulant. Le sang recueilli dans les tubes contenant l'EDTA a été utilisé directement pour les analyses hématologiques, notamment la numération de la formule sanguine (NFS). Le sang recueilli dans les tubes secs a été laissé au repos pour sédimentation à la température ambiante pendant 15 minutes, puis centrifugé à 3000 tours par minute pendant 15 minutes à l'aide d'une centrifugeuse de type «Medifriger P Selecta». Le sérum a été recueilli dans les tubes eppendorf puis conservé à -20°C pour l'analyse des paramètres biochimiques sériques: créatinine, bilirubine, cholestérol total, HDL-cholestérol, LDL-cholestérol, triglycérides, transaminases ALAT et ASAT, phosphatase alcaline et protéines.

–Préparation des homogénats d'organes

Les organes (foie, reins, rate et intestin) prélevés après le sacrifice des animaux ont été pesés et 0,40 g de chaque organe a été transféré dans un mortier sur un bac de glace et broyé avec 2 mL de Tris-HCl 50 mM. Les homogénats à 20% ainsi obtenus ont été centrifugés à 3000 tours par minute pendant 25 minutes. Le surnageant a été recueilli et conservé à -20°C pour le dosage de certains paramètres biochimiques tissulaires (protéines et nitrites).

–Analyse hématologique

La numération de la formule sanguine (NFS) a consisté à déterminer la formule leucocytaire, la numération des érythrocytes, la concentration d'hémoglobine, l'hématocrite, la numération des plaquettes, le volume corpusculaire moyen, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, etc. La détermination des différents paramètres hématologiques a été effectuée au laboratoire d'hématologie de l'hôpital central de Yaoundé à l'aide du compteur «Ham screen 18 Haematology Analyser».

II.2.8-Dosage des paramètres biochimiques sériques et tissulaires

II.2.8.1 -Dosage des protéines totales

Les quantités de protéines dans le sérum et les homogénats d'organes (foie, reins et rate) ont été déterminées par la méthode de Biuret ([Gornall *et al.*, 1949](#)).

- Principe

En milieu basique, le tartrate de sodium et de potassium forme avec les ions cuivriques (Cu^{3+}) un complexe soluble. En présence de protéines, le cuivre du complexe est déplacé et forme avec les protéines un complexe cuivro-protéique de couleur variant du rose violacée au bleu violet qui présente un maximum d'absorption à 540 nm. La variation de la longueur d'onde à 540 nm est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans le milieu (Gornall *et al.*, 1949).

- Mode opératoire

Dans des tubes étalons et échantillons, les réactifs ont été répartis comme le montre le [tableau IV](#). La préparation des réactifs est indiquée à [l'annexe 1](#).

Tableau IV: Protocole de dosage des protéines sériques et tissulaires par la méthode de Biuret

Tubes	Blanc	Tubes étalons						Tubes échantillons		
N° tubes	0	1	2	3	4	5	6	X ₁	...	X _n
SAB (3 mg/mL) (mL)	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,50	–	...	–
Homogénat ou sérum (μL)	0	0	0	0	0	0	0	100	...	100
Eau distillée (mL)	3	2,75	2,5	2,25	2	1,75	1,50	2,90	...	2,90
Réactif de Biuret (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	...	2
Quantité de protéines (mg)	0	0,75	1,50	2,25	3	3,75	4,50	?	...	?
Densités optiques lues	0,00	0,015	0,045	0,072	0,098	0,132	0,16			

SAB: sérum albumine bovine

Après l'introduction des réactifs dans les différents tubes, ils ont été agités et incubés pendant 20 minutes à la température ambiante. La lecture des densités optiques contre le blanc a été faite à 540 nm au spectrophotomètre (Gynesys 20). La concentration de protéines dans chaque tube échantillon a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage ([Figure 25](#)).

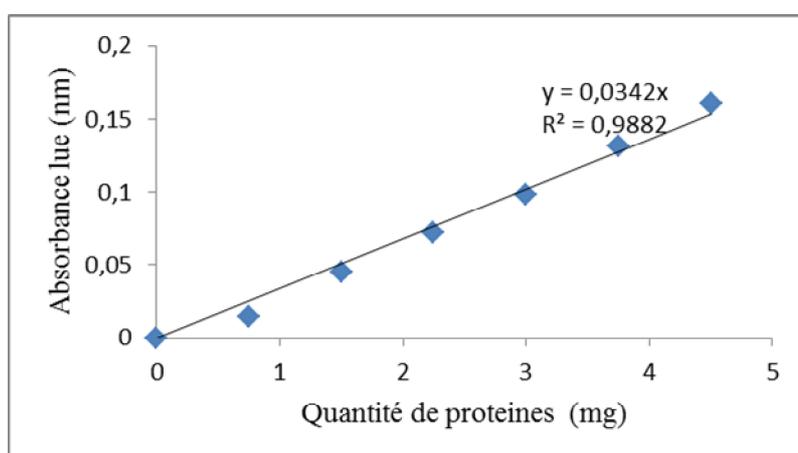


Figure 25: Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines

II.2.8.2-Dosage des nitrites tissulaires

Le dosage du monoxyde d'azote (NO) dans les homogénats d'organes (intestin, foie, reins et rate) a été réalisé à l'aide des réactifs de Griess dont la préparation a été faite à l'abri de la lumière. Le sulfanilamide (1%) et le N-1-naphtyléthylènediamide (0,1%) ont été dilués (v/v) respectivement dans l'acide phosphorique (2,5%) et l'eau distillée. La solution standard utilisée était une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) de concentration 1 mM.

- Principe

Le dosage des nitrites par la méthode de Griess est basé sur 2 réactions de diazotation. Les nitrites acidifiés produisent un agent nitrosant qui réagit avec l'acide sulfanilique pour produire l'ion diazonium. Ce dernier est couplé au naphtyléthylènediamide pour former un dérivé azoté chromophorique qui absorbe à 570 nm (Fermor *et al.*, 2001).

- Protocole

La préparation des tubes et le protocole de dosage sont présentés dans le [tableau V](#).

Tableau V: Protocole de dosage des nitrites tissulaires par la méthode de Griess

Tubes	Blanc	Tubes étalons						Tubes échantillons		
N° tubes	0	1	2	3	4	5	6	X ₁	...	X _n
NaNO ₂ (μL)	100	100	100	100	100	100	100	–	...	–
Homogénat (μL)	–	–	–	–	–	–	–	100	...	100
Eau distillée (μL)	400	400	400	400	400	400	400	400	...	400
Sulfanilamide 1% (μL)	400	400	400	400	400	400	400	400	...	400
Les tubes ont été incubés à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 5 minutes										
Solution NED 0,1% (μL)	400	400	400	400	400	400	400	400	...	400
Les tubes ont été incubés à la température ambiante à l'abri de la lumière pendant 5 minutes, puis l'absorbance a été lue contre le blanc à 546 nm dans les 30 minutes qui suivent l'incubation										
NaNO ₂ (μM)	0	0,03125	0,0625	0,125	0,250	0,50	1	–	...	–
DO des tubes étalons	0	0,036	0,045	0,16	0,32	0,50	1,05	–	...	–

NED: Naphtyléthylènediamide

Une dilution sériee de la solution de nitrite de sodium (NaNO_2 , 1 mM) a été faite dans 6 tubes à essais. La plus grande concentration étant de 1 μM. Les dilutions ont été réalisées au demi. Pour le dosage de la quantité de nitrites dans nos échantillons, 100 μL d'homogénat ont été introduits dans chaque tube puis ont été ajoutés successivement 400 μL d'eau distillée et 400 μL de sulfanilamide. Le mélange a été incubé à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 5 minutes. Au mélange ont été ajoutés 400 μL de naphtyléthylènediamide (NED) ([Annexe 1](#)). Après homogénéisation et incubation des tubes à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 5 minutes, la densité optique a été lue à 546 nm contre le

blanc, pendant les 30 minutes qui ont suivi la dernière incubation. La concentration en nitrites dans chaque échantillon a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 26) en se servant de la droite de régression $y=1,0532x$, où y représente l'absorbance de l'échantillon et x la concentration en nitrites de l'échantillon correspondant à déterminer.

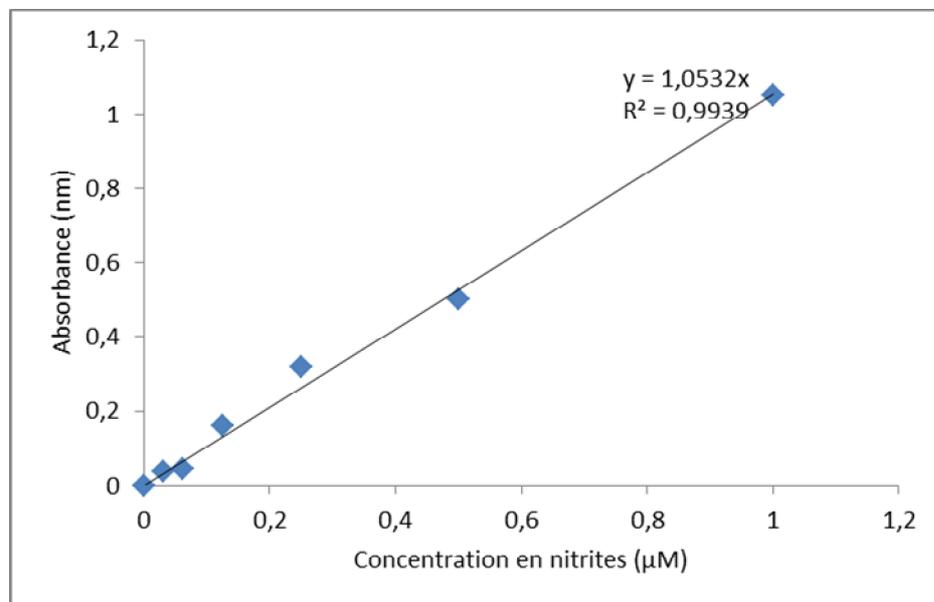


Figure 26: Courbe d'étalonnage pour le dosage des nitrites

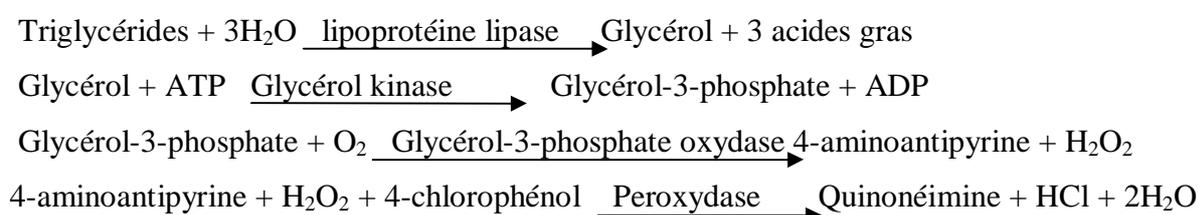
II.2.8.3-Dosage de quelques paramètres du profil lipidique

Le sérum a été utilisé pour le dosage de quelques paramètres du profil lipidique, conformément aux protocoles fournis avec les kits commerciaux Fortress (FORTRESS DIAGNOSTICS LIMITED, United Kingdom).

II.2.8.3.1-Dosage des triglycérides

- Principe

Les triglycérides sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase pour donner le glycérol et des acides gras. Le glycérol sera ensuite transformé en peroxyde d'hydrogène sous l'action successive de la glycérol kinase et de la glycérol-3-phosphate oxydase. Le peroxyde d'hydrogène à son tour réagit avec le 4-chlorophénol et le 4-aminoantipyrine en présence de la peroxydase pour produire le 4-(p-benzoquinone-monoimino)-phenazone ou quinonéimine jaune, qui sert d'indicateur. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de triglycérides dans l'échantillon.



- Mode opératoire

Le dosage des triglycérides a été réalisé à l'aide du kit Fortress. Les substances ont été mélangées dans les différents tubes comme l'indique le [tableau VI](#).

Tableau VI: Protocole de dosage des triglycérides

Tubes	Réactif blanc	Standard	Echantillon
Eau distillée	10 µL	-	-
Standard	-	10 µL	-
Echantillon (Sérum)	-	-	10 µL
Réactif	1 mL	1 mL	1 mL

Les tubes ont été homogénéisés puis incubés pendant 10 minutes à la température ambiante et l'absorbance du standard et des tubes échantillons a été lue au spectrophotomètre (de type Gynesys 20) contre celle du blanc réactif à 546 nm pendant les 60 minutes qui suivent l'incubation.

La concentration de triglycérides dans chaque échantillon a été déterminée suivant la formule:

$$[\text{Triglycérides}]_e (\text{mg/dL}) = \frac{\text{Abs échantillon}}{\text{Abs standard}} \times [\text{Triglycérides}]_s$$

$[\text{Triglycérides}]_e$: concentration de triglycérides dans l'échantillon

$[\text{Triglycérides}]_s$: concentration de triglycérides dans le standard (200 mg/dL)

Abs : absorbance (ou densité optique) lue

II.2.8.3.2-Dosage du cholestérol total

- Principe

Les esters de cholestérol sont hydrolysés par la cholestérol-estérase et transformés en cholestérol et acides gras. Le cholestérol est quantifié en l'oxydant avec le cholestérol-oxydase pour produire le 4-cholestérol-3-one et du peroxyde d'hydrogène qui, à son tour réagit avec le phénol et le 4-aminoantipyrine sous l'action catalytique de la peroxydase pour produire la quinonéimine de couleur rouge, qui sert d'indicateur. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de cholestérol dans l'échantillon.



- Mode opératoire

Les différentes substances ont été introduites dans les tubes comme le montre le [tableau VII](#).

Tableau VII: Protocole de dosage du cholestérol total dans le sérum.

Tubes	Réactif blanc	Standard	Echantillons
Eau distillée	10 µL	–	–
Standard cholestérol(R4)	–	10 µL	–
Sérum	–	–	10 µL
Réactif cholestérol(R1)	1 mL	1 mL	1 mL

Les différents tubes ont été homogénéisés puis incubés pendant 5 minutes à la température ambiante. Les absorbances du standard et des tubes échantillons ont été lues contre le blanc réactif au spectrophotomètre à 500 nm dans un intervalle d'une heure après addition du réactif.

La concentration du cholestérol total dans les différents tubes échantillons a été déterminée par la formule suivante:

$$[\text{cholestérol}]_e (\text{mg/dL}) = \frac{\text{Abs échantillon}}{\text{Abs standard}} \times [\text{cholestérol}]_s$$

$[\text{cholestérol}]_e$: concentration en cholestérol de l'échantillon

$[\text{cholestérol}]_s$: concentration en cholestérol du standard (200 mg/dL)

Abs : absorbance (ou densité optique) lue

II.2.8.3.3-Dosage de HDL-cholestérol

- Principe

Les lipoprotéines de faible densité (LDL) sont précipitées par addition de l'acide phosphotungstique en présence d'ions magnésium. Elles peuvent ainsi être séparées par centrifugation. La fraction lipoprotéines de forte densité (HDL) restant dans le surnageant est déterminée par dosage.

- Mode opératoire

Le dosage du cholestérol-HDL s'est déroulé en deux étapes: une phase de précipitation et une phase de dosage. Pour la phase de précipitation, 200 µL de sérum ont été additionnés à 500 µL de précipitant HDL (R1) prédilué dans de l'eau distillée (4v/1v). Le mélange a été agité et incubé pendant 10 minutes à la température ambiante, puis centrifugé à 3500 tours/minute pendant 15 minutes. Le surnageant obtenu après centrifugation a été prélevé et le contenu en cholestérol-HDL a été déterminé dans les 2 heures, par la même méthode décrite pour le dosage du cholestérol total.

II.2.8.3.4-Détermination de la concentration de LDL-cholestérol

La teneur en cholestérol-LDL a été déterminée par calcul d'après la formule de [Friedewald et al. \(1972\)](#).

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

L'index athérogène a été déterminé par calcul d'après la formule de Takasaki *et al.* (2005).

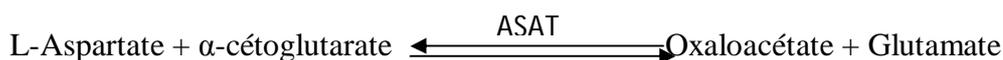
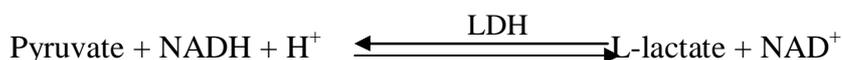
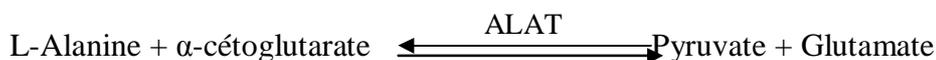
$$\text{Index athérogène} = \frac{[\text{cholestérol total}] - [\text{HDL} - \text{cholestérol}]}{[\text{HDL} - \text{cholestérol}]}$$

II.2.8.4-Evaluation des paramètres des fonctions hépatique et rénale

II.2.8.4.1-Dosage des transaminases sériques

- Principe

Les transaminases alanine aminotransférase (ALAT) et aspartate aminotransférase (ASAT) catalysent respectivement les réactions suivantes:



L'ALAT ou l'ASAT catalysent le transfert du groupement amine respectivement de l'alanine sur l' α -cétoglutarate pour former le pyruvate et le glutamate, et de l'aspartate vers l' α -cétoglutarate pour former l'oxaloacétate et le glutamate. Le pyruvate et l'oxaloacétate formés, réagissent avec le NADH,H⁺ en présence respectivement de la lactate deshydrogénase (LDH) et de la maleate deshydrogénase (MDH), pour donner le L-lactate ou le L-malate et le NAD⁺. La variation de l'absorbance mesurée à 340 nm est proportionnelle à la quantité de pyruvate ou de l'oxaloacétate dans le milieu, c'est-à-dire reliée à l'activité de l'ALAT et de l'ASAT.

- Mode opératoire

L'activité des transaminases a été déterminée en utilisant les kits INMESCO (INMESCO GmbH, Germany). Les différents produits ont été introduits dans les tubes comme l'indique le [tableau VIII](#).

Tableau VIII: Protocole de détermination de l'activité des transaminases (ALAT et ASAT)

	Tube blanc	Tubes échantillons
Echantillon		50 μ L
Tampon ALAT ou ASAT (R1)	500 μ L	500 μ L
Eau distillée	50 μ L	

Les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant exactement 1 minute à 37°C dans un bain-marie.

Réactif coloré (R2) 100 µL 100 µL
Après ajout de R2, les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant exactement 1 minute à 37°C dans un bain marie, et l'absorbance a été lue contre le tube blanc à 490 nm toutes les minutes et pendant 3 minutes

Les activités de l'ALAT et de l'ASAT correspondant à la densité optique lue ont été calculées par la formule suivante donnée dans le kit:

$$\text{Activité ALAT ou ASAT (U/L)} = \frac{(\text{Abs1} + \text{Abs2} + \text{Abs3 échantillon})}{3} \times \text{Facteur de calcul}$$

Abs: absorbance à intervalle de 1 minute durant 3 minutes

Facteur de calcul : 2064

II.2.8.4.2-Dosage de la bilirubine

- Principe

La bilirubine réagit avec le 2,4-dichloroaniline (ou acide sulfanilique) pour former l'azobilirubine instable avec le réactif d'Erlich et intensément coloré qui absorbe une lumière de longueur d'onde 540 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon.

- Mode opératoire

Le dosage de la bilirubine totale dans le sérum de rat a été réalisé suivant les indications du protocole du kit Fortress. Les différentes substances ont été introduites dans les tubes comme l'indique le [tableau IX](#).

Tableau IX: Protocole de dosage de la bilirubine totale

Tubes	Réactif blanc	Standard	Echantillons
Eau distillée	10 µL	–	–
Standard	–	10 µL	–
Sérum	–	–	10 µL
Acide sulfanilique (R1)	500 µL	500 µL	500 µL
Réactif d'Erlich (R2)	100 µL	100 µL	100 µL

Après ajout de R2, les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 5 minutes à la température ambiante. Les absorbances des échantillons et du standard ont été lues contre le tube blanc à 546 nm. La concentration de bilirubine totale dans le sérum a été déterminée par la formule suivante:

$$[\text{Bilirubine}]_e \text{ (mg/dL)} = \frac{\text{Abs. échantillon} - \text{Abs. blanc}}{\text{Abs. standard} - \text{Abs. blanc}} \times [\text{Standard}]$$

[bilirubine]_e: concentration de bilirubine dans l'échantillon

[Standard]: concentration du standard (20 mg/dL)

Abs: absorbance (ou densité optique) lue

II.2.8.4.3-Dosage de la phosphatase alcaline

- Principe

La phosphatase alcaline (PAL) agit sur le sodium thymolphthaleine monophosphate tamponné par le 2-amino-2-méthyl-propanol (AMP). L'addition d'un réactif alcalin (NaOH et Na₂(CO₃)) arrête la réaction et simultanément permet la formation d'un composé coloré en bleu qui absorbe à 590 nm.

- Mode opératoire

Le dosage de la phosphatase alcaline (PAL) sérique a été réalisé suivant les indications du protocole du kit Fortress. Les différentes substances ont été introduites dans les tubes comme l'indique le [tableau X](#).

Tableau X: Protocole de dosage de la phosphatase alcaline (PAL)

Tubes	Réactif blanc	Standard	Echantillons
Substrat PAL (R1)	100 µL	100 µL	100 µL
Les tubes ont été incubés au bain marie à 37 °C pendant 3 minutes			
Eau distillée	10 µL	–	–
Standard (R4)	–	10 µL	–
Echantillon (Sérum)	–	–	10 µL
Les tubes ont été incubés pendant exactement 10 minutes au bain marie à 37 °C			
Réactif de coloration (R2)	500 µL	500 µL	500 µL

Après addition de R2, les préparations ont été bien homogénéisées et les absorbances du standard et des échantillons ont été lues contre le blanc à 590 nm.

L'activité de la phosphatase alcaline dans le sérum a été déterminée par la formule suivante:

$$[\text{phosphatase alcaline}]_e \text{ (UI/L)} = \frac{\text{Abs. échantillon}}{\text{Abs. standard}} \times [\text{Standard}], \text{ avec } [\text{Standard}] = 50 \text{ UI/L}$$

II.2.8.4.4-Dosage de la créatinine

- Principe

En milieu alcalin, la créatinine réagit avec l'acide picrique pour former un complexe jaune foncé qui absorbe à 492 nm. La quantité de complexe formé est directement proportionnelle à la concentration de créatinine dans le milieu réactionnel.

- Mode opératoire

Le dosage de la créatinine sérique a été réalisé suivant les indications du protocole du kit Fortress. Le réactif de travail a été préparé au préalable en mélangeant la solution de NaOH (0,32 M) et la solution d'acide picrique (35 mM) à volume égal (50/50 mL), le mélange a été bien homogénéisé. Les différentes substances ont été introduites dans les tubes comme l'indique le [tableau XI](#).

Tableau XI: Protocole de dosage de la créatinine

Tubes	Réactif Blanc	Standard	Echantillons
Eau distillée	100 µL	–	–
Standard	–	100 µL	–
Echantillon (Sérum)	–	–	100 µL
Réactif de travail	1000 µL	1000 µL	1000 µL

Les préparations ont été homogénéisées et l'absorbance du standard et des échantillons a été lue à 492 nm contre le blanc exactement après 30 secondes et après 120 secondes.

La concentration de la créatinine dans le sérum a été déterminée par la formule suivante :

$$[\text{créatinine}]_e \text{ (mg/dL)} = \frac{\Delta\text{Abs. échantillon}}{\Delta\text{Abs. standard}} \times 2$$

$\Delta\text{Abs.}$ = différence d'absorbance = Abs. 120_s–Abs. 30_s, 2 = facteur de calcul.

II.2.9-Analyses histologiques

II.2.9.1-Macroscopie

Dans des flacons de 5 mL, un fragment de 1 cm³ environ de chaque organe (foie, rein, rate, intestin) a été immergé dans du formol (10 %). Les flacons ont été ensuite étiquetés et conservés à la température ambiante.

Chaque organe a été ensuite coupé à faibles épaisseurs et introduit dans des cassettes pour subir le processus de déshydratation et d'inclusion.

II.2.9.2-Déshydratation

La déshydratation, parfois appelée «circulation» comporte trois étapes: la déshydratation proprement dite, l'éclaircissement et l'imprégnation.

- Déshydratation

Le formol utilisé pour la fixation est un milieu aqueux. La paraffine n'étant pas miscible avec l'eau, les tissus fixés doivent être débarrassés de toute trace d'eau avant de pouvoir être inclus dans la paraffine. La déshydratation proprement dite consiste à laisser les tissus dans

des bains d'alcool de concentrations croissantes respectives de 50%, 70%, 95%, 95%, 100%, 100%, 100% en fonction du temps comme l'indique le [tableau XII](#).

-Éclaircissement

L'éclaircissement consiste à remplacer la solution de déshydratation (alcool) par un solvant miscible dans le milieu d'inclusion. Les organes ont séjourné successivement dans deux bains de xylène respectivement pendant 1 heure puis 1 heure et 30 minutes ([Tableau XII](#)).

- Imprégnation

Une fois déshydratés et éclaircis, les organes sont infiltrés par la paraffine. Pour ce faire, les organes ont séjourné dans trois bains de paraffine en fusion (60°C) pendant respectivement 1 heure, 1 heure et 30 minutes et 2 heures ([Tableau XII](#)).

Tableau XII: Etapes de la déshydratation

N° de bain	solution	Temps de séjour
1	Ethanol à 50 %	1 heure
2	Ethanol à 70 %	1 heure
3	Ethanol à 95 %	1 heure
4	Ethanol à 95 %	1½ heure
5	Ethanol à 100 %	1 heure
6	Ethanol à 100 %	1½ heure
7	Ethanol à 100 %	2 heures
8	Xylène	1 heure
9	Xylène	1½ heure
10	Paraffine à 60°C sous vide	1 heure
11	Paraffine à 60°C sous vide	1½ heure
12	Paraffine à 60°C sous vide	2 heures

II.2.9.3-Inclusion

Après le passage des tissus dans des moules de paraffine en fusion, la paraffine a été refroidie sur une plaque réfrigérante après orientation appropriée du tissu dans le bloc.

II.2.9.4-Coupes

Les blocs refroidis ont été fixés un microtome de type Reichert-jung 2030 et coupés à une épaisseur de 5 µm. Les sections de coupes obtenues ont été dépliées dans un bain-marie à 40°C. Les meilleures coupes ont été collées sur les lames porte-objets et conservées à l'étuve à 45°C pendant 12 heures environ.

II.2.9.5-Coloration

La coloration a pour but de mettre en évidence les différents éléments tissulaires et de les différencier entre eux afin de permettre l'étude de leur structure, de leur morphologie et des éventuelles modifications pathologiques.

La coloration utilisée dans le présent travail est la coloration à l'hématoxyline Eosine (H&E). Les coupes ont d'abord été déparaffinées comme l'indique le [tableau XIII](#).

Tableau XIII: Etapes de déparaffinage des coupes

N° de bain	Solution	Temps de séjour
1	Xylène	5 min
2	Xylène	5 min
3	Xylène	5 min
4	Ethanol à 100 %	5 min
5	Ethanol à 100 %	5 min
6	Ethanol à 100 %	5 min
7	Ethanol à 95 %	5 min
8	Ethanol à 70 %	5 min
9	Eau distillée	5 min

Une fois déparaffinées et réhydratées, les coupes ont été colorées suivant le schéma suivant:

Hématoxyline de MAYER10 min;
Eau du robinet courante 10 min;
Éthanol à 70 %.....5 min;
Éthanol à 95 %5 min;
Éosine alcoolique à 0,5 % + 40 µL d'acide acétique par 100 mL de solution ...5 min;
Déshydratation: Ethanol à 100 %3 × 5min;
Éclaircissement: Xylène.....3× 5min;
Montage sous résine.

II.2.9.6-Montage

Les coupes colorées ont été recouvertes par une fine lamelle de verre qui emprisonne le milieu de montage. Le milieu de montage utilisé était la résine.

II.2.9.7-Lecture des coupes

Les coupes colorées ont été examinées au microscope photonique de marque STM-50 (Scientico) connecté à un ordinateur. Ce microscope est muni d'une caméra de marque DCM35 (350k pixels, USB2.0) qui permet de réaliser des microphotographies.

II.2.10-Analyse statistique de résultats

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne (ESM). Les différences statistiques ont été établies avec l'analyse de la variance (ANOVA) One-way suivi du post test de Newman-Keuls, ou Two-way suivi du post test de Benfforonni, en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 5.01. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives pour une valeur de $P < 0,05$.

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

III.1- RESULTATS

III.1.1-Composition phytochimique de l'extrait aqueux de *Pittosporum mannii*

III.1.1.1 -Phytochimie qualitative

Le screening phytochimique qualitatif de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *Pittosporum mannii* a révélé la présence de diverses classes de composés bioactifs notamment les sucres réducteurs, les anthraquinones, les terpenoïdes, les phénols, les flavonoïdes, les saponines, les tannins, les alcaloïdes, les stéroïdes et les lipides. Cette étude a montré que l'extrait ne contient pas les triterpènes et les glycosides cardiaques (Tableau XIV).

Tableau XIV: Composition qualitative de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *Pittosporum mannii*

Composés	Résultat de l'analyse
Sucres réducteurs	+
Anthraquinones	+
Terpenoïdes	+
Triterpènes	-
Phénols	+
Flavonoïdes	+
Saponines	+
Tannins	+
Alcaloïdes	+
Glycosides cardiaques	-
Stéroïdes	+
Lipides	+

+ Présence du composé recherché; - Absence du composé recherché

III.1.1.2 -Phytochimie quantitative

La détermination quantitative des polyphénols a révélé que le contenu en polyphénols totaux (CTP) de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* était de 343,3±28,8 mg/g EAG.

III.1.2-Effets de l'extrait aqueux de *Pittosporum mannii* sur l'activité contractile spontanée du duodénum de rat

Le duodénum de rat suspendu dans une solution de Tyrode a développé une activité contractile spontanée avec des contractions phasiques régulières d'amplitudes variables (0,3-1 grams/force) et une fréquence relativement stable (environ 30 cycles/min). L'administration de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *Pittosporum mannii* aux concentrations uniques de 0,01; 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL a provoqué une diminution du tonus de base et de l'amplitude des contractions spontanées de manière concentration-dépendante. Aux concentrations

supérieures ou égales à 0,08 mg/mL, la diminution du tonus observée à faibles concentrations était suivie d'une élévation progressive du tonus qui revient au niveau initial ou le dépasse légèrement. La **figure 27** présente des tracés originaux illustrant les effets des différentes concentrations de l'extrait de *P. mannii* sur les contractions spontanées du duodénum de rat.

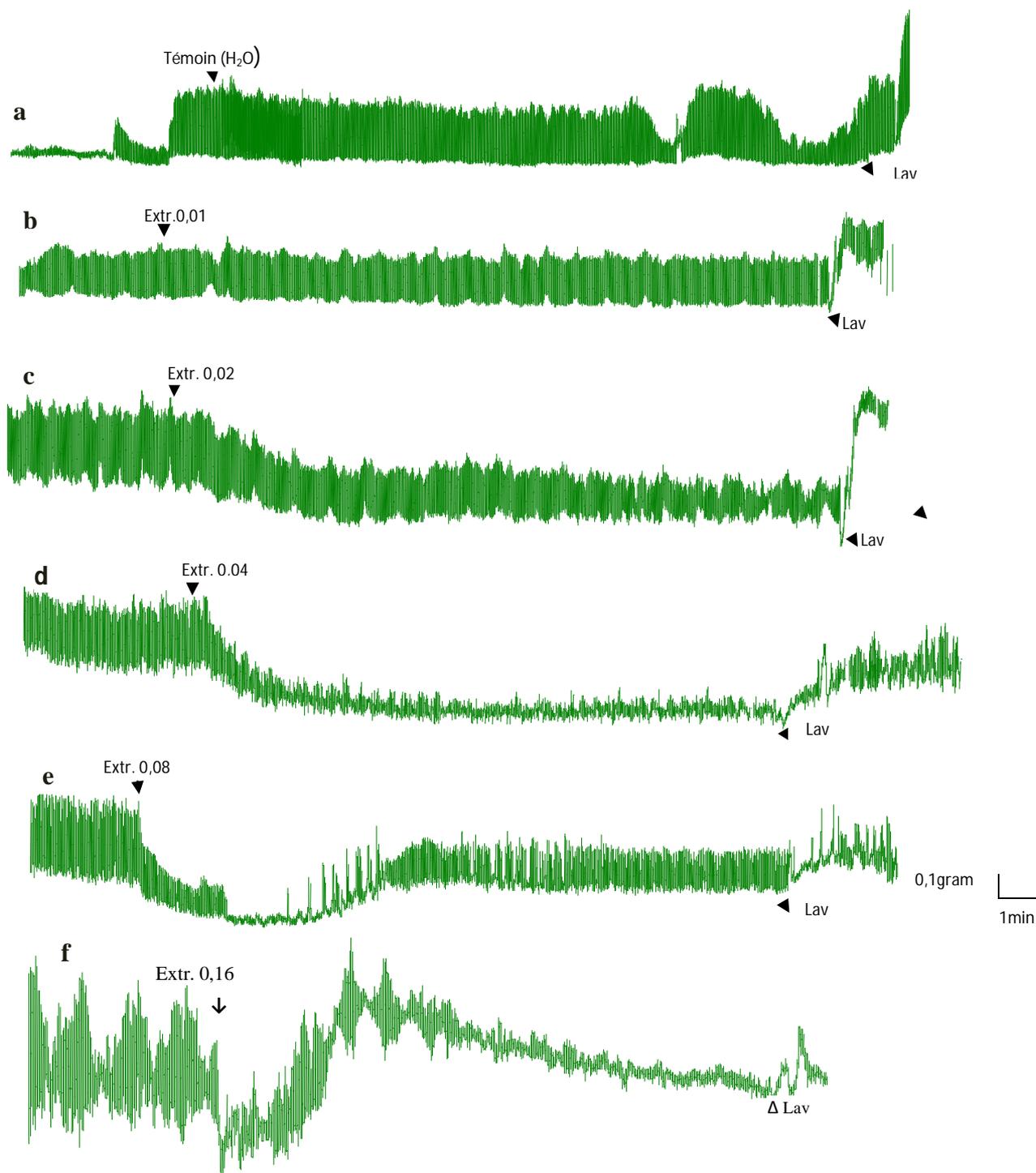


Figure 27: Tracés originaux illustrant les effets de différentes concentrations de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* sur les contractions spontanées du duodénum de rat.

Des concentrations uniques croissantes de l'extrait (0,01; 0,02; 0,04 ; 0,08 et 0,16 mg/mL) ont été administrées séparément. Les effets de chaque concentration d'extrait ont été observés pendant 20 min sur les contractions spontanées. Extr : extrait, Lav : lavage

III.1.2.1-Effets des concentrations uniques de l'extrait aqueux de *P. mannii* sur le tonus, l'amplitude et la fréquence des contractions spontanées

Les effets des concentrations uniques de l'extrait aqueux de *P. mannii* sur le tonus des contractions spontanées, déterminés à partir de l'analyse des tracés originaux, sont représentés dans la [figure 28](#). Il en ressort que l'extrait aux concentrations uniques de 0,01 à 0,08 mg/mL a provoqué une baisse significative ($P < 0,01$) et de manière concentration-dépendante du tonus de base des contractions spontanées de duodénum ([Figure 28a](#)). La diminution maximale du tonus observée après administration de l'extrait était de 33,19; 36,85; 48,26 et 46,15%, respectivement aux concentrations de 0,01; 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL d'extrait. La concentration 0,04 mg/mL a montré le meilleur effet sur la baisse du tonus par rapport aux autres concentrations. Par comparaison à la baisse du tonus (15,34%) observée chez le témoin (eau distillée), l'effet réel de l'extrait de plante à la concentration de 0,04 mg/mL est d'environ 32,92%. Aux fortes concentrations ($\geq 0,08$ mg/mL), l'extrait a montré une action biphasique; une baisse immédiate du tonus suivie d'un retour vers le tonus de base. A la concentration de 0,16 mg/mL, il a été observé au bout de 8 minutes environ une augmentation significative du tonus de base par rapport au tonus initial accompagnée d'une baisse de l'amplitude des contractions. L'atropine (1 μ M) et la prométhazine (0,5 μ g/mL) ont provoqué également une diminution du tonus de base du duodénum de rat ([Figure 28b](#)). Après environ douze minutes d'action, la baisse du tonus de base induite par l'extrait de plante à la concentration de 0,04 mg/mL (48,26%) était comparable à celle de l'atropine (48,95 %), mais significativement ($P < 0,05$) plus faible par rapport à celle induite par la prométhazine (61,27 %).

L'extrait (0,01-0,08 mg/mL) a provoqué une diminution de l'amplitude des contractions spontanées de manière concentration-dépendante ([Figure 29](#)). La diminution de l'amplitude des contractions spontanées a été significative à partir de la concentration 0,02 mg/mL. Par rapport à l'amplitude de contraction initiale, la diminution maximale de la force de contraction était de 6,19; 32,18; 42,99 et 50,83% respectivement aux concentrations de 0,01; 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL. La diminution maximale de l'amplitude de contraction du duodénum isolé de rat par rapport à la force de contraction initiale en présence du solvant (eau distillée) était non significative et de l'ordre de 3,19%. La prométhazine (0,5 μ g/mL) a provoqué par rapport à la contraction initiale une diminution maximale de l'amplitude des contractions de 51,96%, alors que l'atropine (1 μ M) n'a pas entraîné de variation significative de l'amplitude des contractions ([Figure 29b](#)).

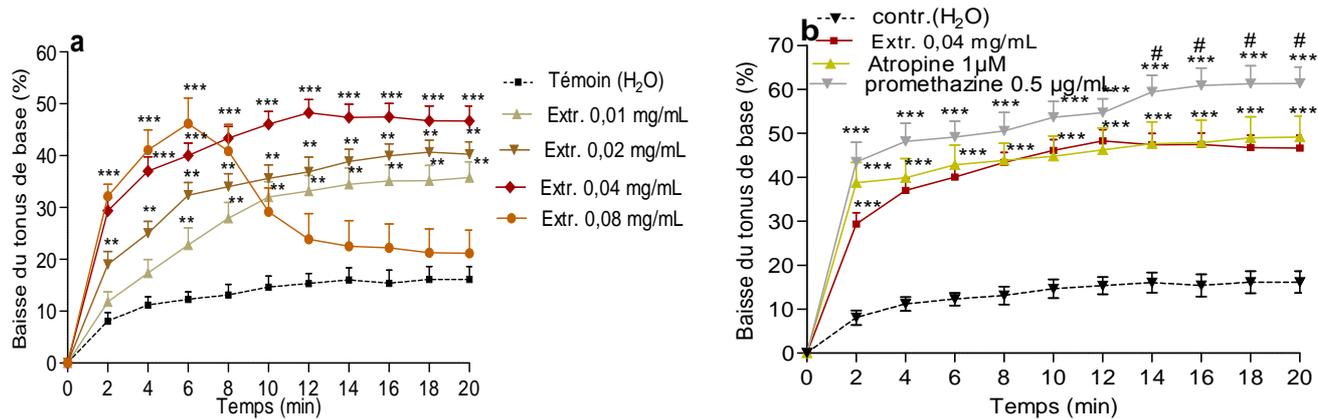


Figure 28: Effets des concentrations uniques de l'extrait (a), de l'atropine et de la prométhazine (b) sur le tonus des contractions spontanées du duodénum de rat.

Le tonus moyen des contractions spontanées a été mesuré toutes les 2 min pendant 6 min avant l'administration de l'extrait puis pendant 20 min après l'administration. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne (ESM). Les valeurs représentent le pourcentage (%) de baisse du tonus de base, exprimés par rapport à la baisse maximale au tonus induite par la papavérine 10^{-4} M, $7 \leq n \leq 12$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA One-Way suivi du post test de Newman-Keuls. ** P < 0,01; *** P < 0,001, différence significative comparée au témoin. ## P < 0,01, ### P < 0,001, différence significative par rapport à l'extrait (0,04 mg/mL).

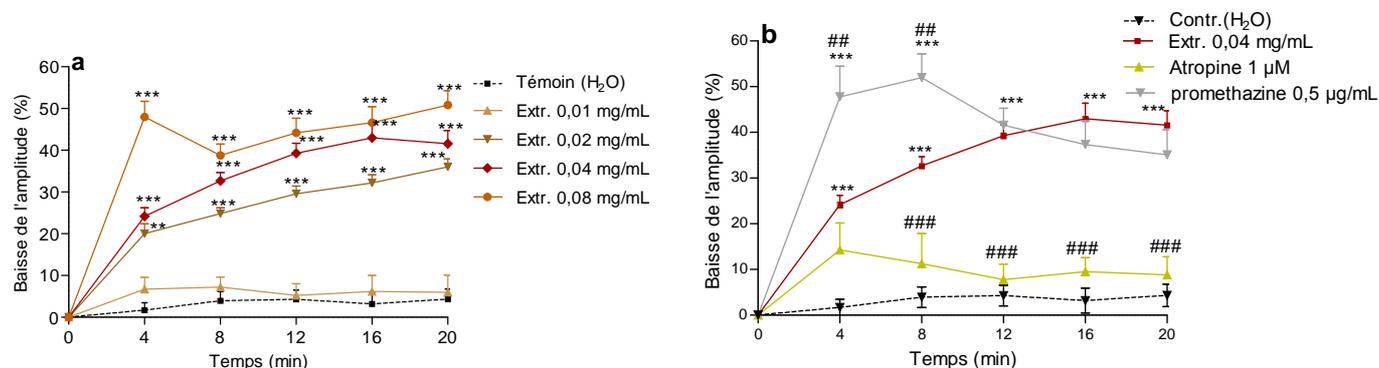


Figure 29: Effets des concentrations uniques de l'extrait (a), de l'atropine et de la prométhazine (b) sur l'amplitude des contractions spontanées du duodénum de rat.

L'amplitude moyenne des contractions spontanées a été mesurée pendant les 6 min précédant l'administration de l'extrait, puis toutes les 4 min et pendant 20 min après l'administration. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne (ESM). Les valeurs représentent les pourcentages (%) de baisse de l'amplitude des contractions par rapport à l'amplitude de base, $7 \leq n \leq 12$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA One-way suivi du post test de Newman-Keuls. ** P < 0,01; *** P < 0,001, différence significative comparée au témoin. ## P < 0,01; ### P < 0,001, différence significative par rapport à l'extrait (0,04 mg/mL).

L'administration de l'extrait en concentrations uniques (0,01; 0,02; 0,04 ou 0,08 mg/mL) n'a pas entraîné de modification de la fréquence des contractions spontanées (Figure 30).

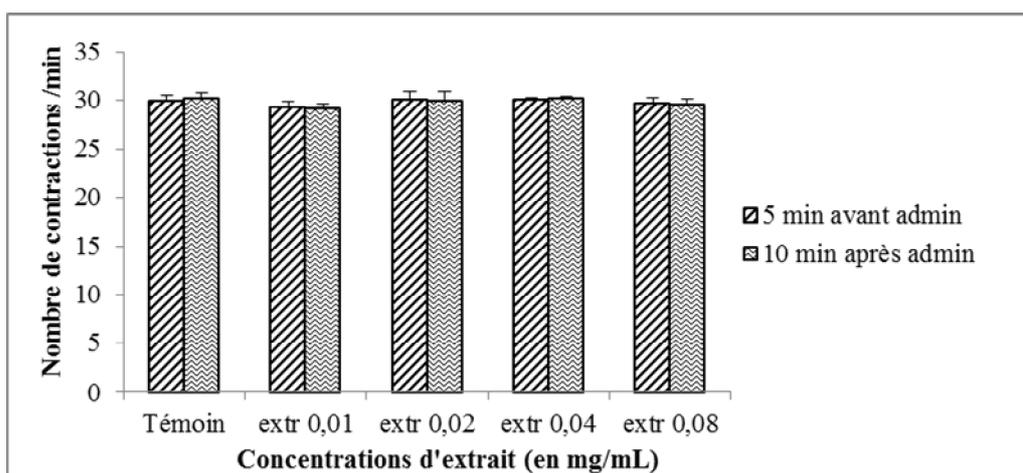


Figure 30: Effets de concentrations uniques de l'extrait aqueux de *P. mannii* sur la fréquence des contractions spontanées du duodénum de rat.

La fréquence moyenne des contractions spontanées a été déterminée pendant les 5 min précédant l'administration de l'extrait, puis toutes les 5 min et pendant 20 min après l'administration. Les valeurs de fréquence exprimées en nombre de contractions par minute, représentent des moyennes \pm ESM, $5 \leq n \leq 6$.

III.1.2.2-Effets des concentrations cumulatives de l'extrait sur le tonus et l'amplitude des contractions spontanées

L'administration de l'extrait aqueux de *P. mannii* aux concentrations cumulatives de 0,005; 0,01; 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL a provoqué par rapport aux témoins une baisse significative ($p < 0,001$) et concentration-dépendante du tonus des contractions spontanées du duodénum. A la concentration maximale (0,08 mg/mL), la baisse du tonus induite par l'extrait était suivie d'une élévation transitoire du tonus. Dans cette étude, l'atropine (0,125-2 μ M) et la prométhazine (0,125-2 μ g/mL) ont également provoqué une diminution du tonus des contractions du duodénum ($p < 0,001$) (Figure 31). La concentration de l'extrait qui induit 50% de l'effet maximal (EC_{50}), déterminée à partir de l'analyse des courbes concentration-réponse, était de $0,01977 \pm 0,00114$ mg/mL. La réduction maximale du tonus de base par rapport au tonus initial (E_{max}) était de $55,76 \pm 4,04\%$. En tenant compte de l'effet du solvant sur la variation du tonus de base (E_{max} : $19,92 \pm 3,15\%$), il apparaît que l'activité maximale de l'extrait est d'environ 35,84%. Le pourcentage (%) de diminution maximale du tonus par rapport au tonus de base induit par l'extrait était proche de celui de l'atropine (E_{max} : $57,06 \pm 4,65\%$) et significativement ($p < 0,01$) inférieur à celui de la prométhazine (E_{max} : $99,74 \pm 24,02\%$) (Tableau XV).

En administration cumulative (0,005 à 0,08 mg/mL), l'extrait a également entraîné une baisse significative ($p < 0,001$) et concentration-dépendante de l'amplitude des contractions spontanées (Figure 32). La EC_{50} de l'extrait sur l'amplitude de contraction était de

0,01847±0,00130 mg/mL et la E_{max} de 63,70±11,85% par rapport à l'amplitude initiale. La prométhazine (0,125-2 µg/mL) a également induit une baisse significative ($p < 0,001$) de l'amplitude des contractions avec une EC_{50} de 0,7232±0,0153 µg/mL et une E_{max} de 63,99±15,90%. L'atropine administrée dans les mêmes conditions (0,125 à 1 µM) a provoqué une légère baisse de l'amplitude des contractions aux faibles concentrations (0,125 à 1 µM) alors qu'aux fortes concentrations (1 à 2 µM), elle n'a pas modifié l'amplitude des contractions. Il n'a pas été possible d'établir une courbe concentration-réponse de l'atropine sur l'amplitude des contractions et déterminer la EC_{50} et la E_{max} (Figure 32 et tableau XV).

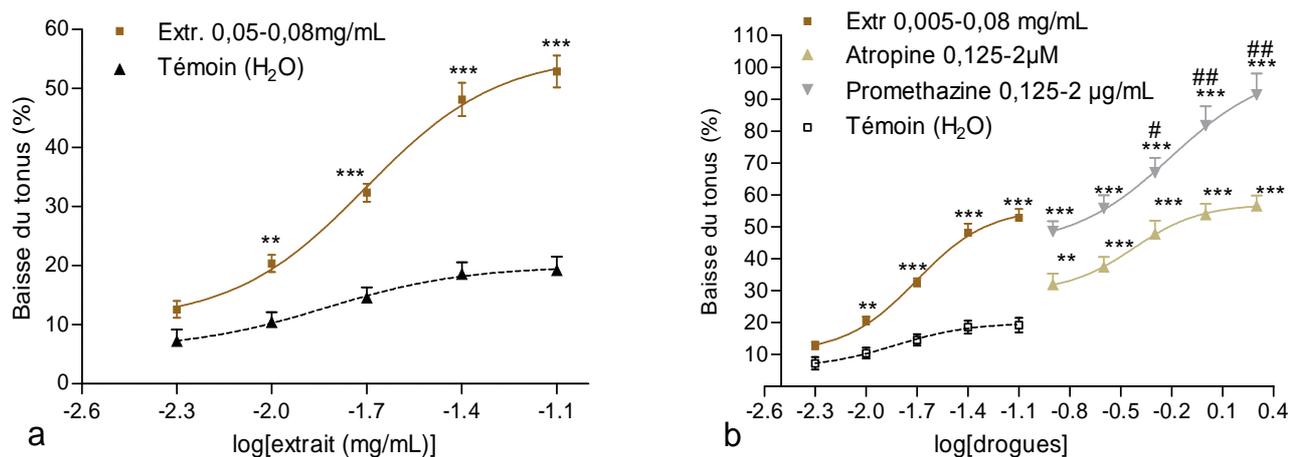


Figure 31: Effets des concentrations cumulatives de l'extrait (a), de l'atropine et de la prométhazine (b) sur le tonus des contractions spontanées du duodénum de rat.

Les courbes concentrations- réponses de l'extrait sur le tonus ont été traduites en courbe semi-logarithmiques à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.03 et analysées en vue de la détermination de l'efficacité de l'extrait (E_{max}) et de son affinité pour des récepteurs (EC_{50} et pD_2). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± erreur standard à la moyenne (ESM), $n=8-16$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforroni. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, différence significative par comparaison au témoin. # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; différence significative par rapport à l'extrait (0,005 à 0,08 mg/mL).

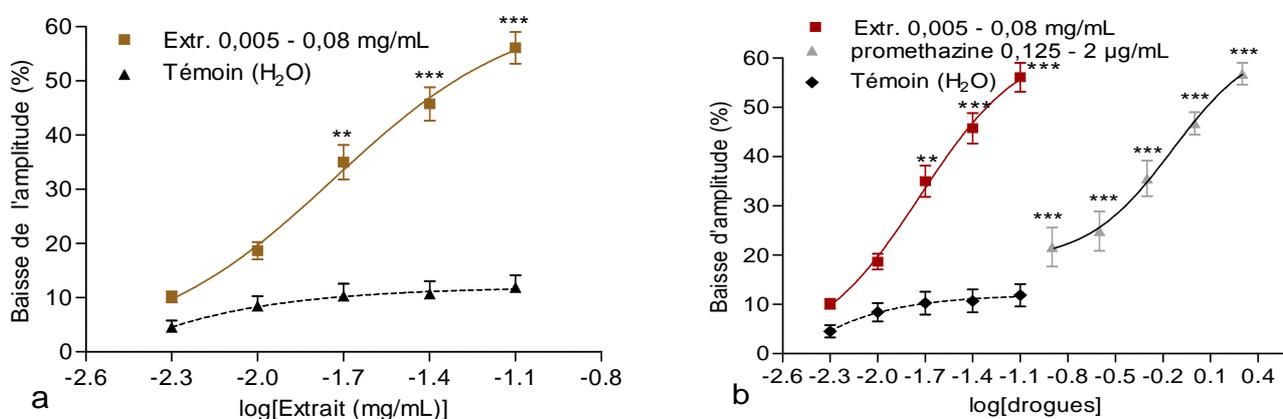


Figure 32: Effets des concentrations cumulatives de l'extrait (a) et de la prométhazine (b) sur l'amplitude des contractions spontanées du duodénum de rat.

Les pourcentages de baisse de l'amplitude ont été traduits en courbe semi-logarithmique à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.03 et analysés en vue de la détermination de l'efficacité de l'extrait (E_{max}) et de son affinité pour des récepteurs (EC_{50} et pD_2). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne (ESM), $n=9-13$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforroni. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, différence significative entre essais et témoin.

Tableau XV: Paramètres permettant d'apprécier l'affinité et l'efficacité de l'extrait, de l'atropine et de la prométhazine sur le tonus et l'amplitude des contractions spontanées du duodénum.

	Tonus			Amplitude		
	EC_{50}	pD_2 ($-\log EC_{50}$)	E_{max} (en %)	EC_{50}	pD_2 ($-\log EC_{50}$)	E_{max} (en %)
Extrait 0,005-0,08mg/mL	0,01977 \pm 0,00114	1,704 \pm 0,058	55,76 \pm 4,04	0,01847 \pm 0,0013	1,734 \pm 0,114	63,70 \pm 11,85
Atropine 0,125-2 μ M	0,3766 \pm 0,0144	0,424 \pm 0,159	57,06 \pm 4,65	–	–	–
Prométhazine 0,125-2 μ g/mL	0,6242 \pm 0,0169	0,205 \pm 0,227	99,74 \pm 15,47	0,7232 \pm 0,0153	0,141 \pm 0,186	63,99 \pm 15,90

III.1.2.3- Activité de l'extrait sur les contractions spontanées du duodénum en présence de quelques substances pharmacologiques

III.1.2.3.1- Effets de quelques substances pharmacologiques sur les contractions spontanées du duodénum de rat

Le [tableau XVI](#) présente les effets de quelques substances pharmacologiques connues sur l'activité contractile spontanée du duodénum de rat. Les résultats montrent que l'atropine, l'indométacine, la phentolamine (ou la combinaison prazosine plus yohimbine), le propranolol et le L-NAME ont provoqué une baisse significative du tonus des contractions spontanées. Ces substances pharmacologiques n'ont pas affecté significativement l'amplitude des contractions. La prométhazine, la quinine et le vérapamil ont réduit à la fois le tonus et l'amplitude des contractions de manière significative. Le bleu de méthylène a entraîné une baisse significative du tonus (64,35%) accompagnée d'une légère augmentation de l'amplitude de 19,28%. Le TEA aux concentrations de 1 mM et 10 mM a induit par rapport au tonus de base une diminution du tonus et par rapport à l'amplitude initiale une augmentation de l'amplitude des contractions spontanées du duodénum. L'administration du TEA a entraîné une augmentation significative de l'amplitude de 26,72% à la concentration de 1 mM et de 67,28% à la concentration de 10 mM. La diminution maximale du tonus de base de l'organe était respectivement de 45,45% et 49,29% aux concentrations de 1 mM et 10 mM. Le glibenclamide a également potentialisé les contractions spontanées du duodénum en entraînant une augmentation significative de l'amplitude des contractions de 17,20%. Cette action était accompagnée d'une baisse du tonus de 22,63%. L'EDTA (1 mM) n'a pas modifié significativement l'amplitude et le tonus des contractions spontanées du duodénum de rat.

Tableau XVI: Effets de quelques substances pharmacologiques standard sur l'activité contractile spontanée du duodénum de rat

Antagonistes	Concentrations	Variation du tonus	Variation de l'amplitude
Témoin (H ₂ O)	(200 µL)	16,04±2,32% (7)	4,29±2,26% (12)
Atropine	1 µM	44,43±4,85% (7) ***	10,83±9,40% (6)
Prométhazine	0,5 µg/mL	38,23±5,04% (4) ***	47,97±3,60% (4) ***
	1 µg/mL	63,49±8,67% (5) ***	56,81±4,34% (4) ***
Indométacine	3 µM	41,55±4,54% (6) ***	9,96±4,70% (5)
Phentolamine	1 µM	43,44±4,49% (8) ***	9,40±5,07% (8)
Propranolol	1 µM	36,90±3,12% (12) ***	7,50±7,57% (12)
Vérapamil	0,05 µM	56,09±5,67% (5) ***	27,22±6,04% (5) **
	0,1 µM	65,41±7,11% (7) ***	59,76±4,58% (8) ***
EDTA	1 mM	26,45±2,27% (9)	19,10±7,81% (9)
TEA	1 mM	45,45±7,35% (6) ***	-26,72±4,84% (6) ***
	10 mM	49,29±8,05% (8) ***	-67,28±17,74% (7) ***
Glibenclamide	10 µM	22,63±4,02% (5)	-17,20±2,83% (5) **
Quinine sulfate	20 µM	45,78±5,36% (7) **	36,39±13,06% (7) **
L-NAME	5×10 ⁻⁴ M	39,20±5,95% (12) **	-4,51±5,41% (12)
Bleu de méthylène	10 ⁻⁵ M	64,35±9,13% (4) **	-19,28±8,20% (4)

Les données positives indiquent une diminution du tonus ou de l'amplitude des contractions spontanées, les valeurs négatives indiquent une augmentation de l'amplitude des contractions. La valeur de n dans chaque essai est indiquée entre parenthèses. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± erreur standard à la moyenne (ESM), n=4-12. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA One-way suivi du post test de Newman-Keuls. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, différences significatives comparées aux préparations traitées avec l'eau distillée (témoin).

III.1.2.3.2- Effets de l'extrait en présence de l'atropine, de l'indométacine et de la prométhazine

La figure 33 montre les effets d'une concentration unique (0,04 mg/mL) et des concentrations cumulées (0,005-0,08 mg/mL) de l'extrait aqueux de *P. manni* sur l'activité contractile du duodénum en présence de l'atropine, de l'indométacine et de la prométhazine. Il en ressort que le prétraitement de l'organe avec l'atropine (1 µM) n'a pas modifié l'effet relaxant de l'extrait administré aussi bien en concentration unique (0,04 mg/mL) (Figure 33a) qu'en concentrations cumulatives (0,005-0,08 mg/mL) (Figure 33b). En présence de l'atropine (1 µM), la baisse du tonus (39,52%) et de l'amplitude (47,25%) des contractions induite par l'extrait à 0,04 mg/mL n'a été réduite que très faiblement et de manière non significative par rapport à celle obtenue avec l'extrait seul (48,91% et 42,99%

respectivement) (Figure 33a). En présence de cette concentration de l'atropine, il n'a pas été observé de variation significative de la baisse du tonus et de l'amplitude des contractions provoquée par l'administration cumulative de l'extrait (0,005-0,08 mg/mL), comparativement à l'action de l'extrait administré en milieu physiologique sans atropine (Figure 33b).

L'indométacine (3 μ M) n'a pas modifié l'effet de l'extrait sur le duodénum de rat. Après traitement à l'indométacine, l'administration d'une concentration unique de l'extrait (0,04 mg/mL) a provoqué une baisse significative du tonus (48,84%) et de l'amplitude (40,23%) des contractions spontanées de même degré par rapport à celle obtenue avec l'extrait seul (48,91% et vs. 42,99%, respectivement) (Figure 33a). L'indométacine n'a également pas modifié significativement la baisse du tonus de base des contractions induite par l'administration cumulative de l'extrait (0,005-0,08 mg/mL). En présence de cette concentration de l'indométacine, la baisse maximale du tonus (E_{max}) induite par l'extrait (0,005-0,08 mg/mL) était de 64,39% contre 62,02% lorsque l'extrait était administré seul en absence de cette substance pharmacologique (Figure 33b).

La prométhazine à la concentration de 0,5 ou 1 μ g/mL a inhibé de manière significative ($p < 0,01$) la diminution du tonus de base des contractions induite par l'extrait aqueux de *P. manni* sur le duodénum de rat. Après prétraitement avec la prométhazine, la baisse maximale du tonus des contractions provoquée par l'extrait à la concentration unique de 0,04 mg/mL était de 35,43% et de 51,53% respectivement en présence de la prométhazine 0,5 et 1 μ g/mL, comparativement à la réponse obtenue avec l'extrait seul (Figure 33a). En présence de la prométhazine 1 μ g/mL, la baisse maximale (E_{max}) du tonus de base des contractions induite par des concentrations cumulées de l'extrait (0,005-0,08 mg/mL) était de 38,11% et significativement ($P < 0,01$) faible comparativement à l'action de l'extrait administré en milieu physiologique sans prométhazine (62,02%) (Figure 33b). La prométhazine n'a pas modifié significativement la baisse de l'amplitude des contractions provoquée par l'extrait.

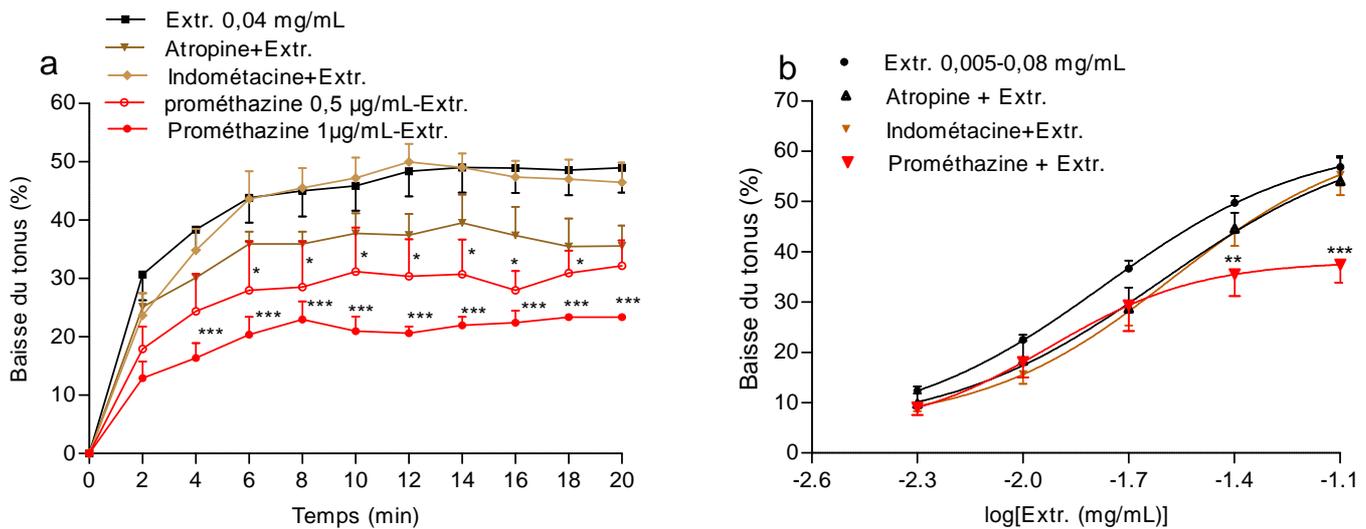


Figure 33: Effets de l'atropine, de l'indométacine et de la prométhazine sur la relaxation du duodénum de rat induite par l'extrait aqueux de *P. manni*.

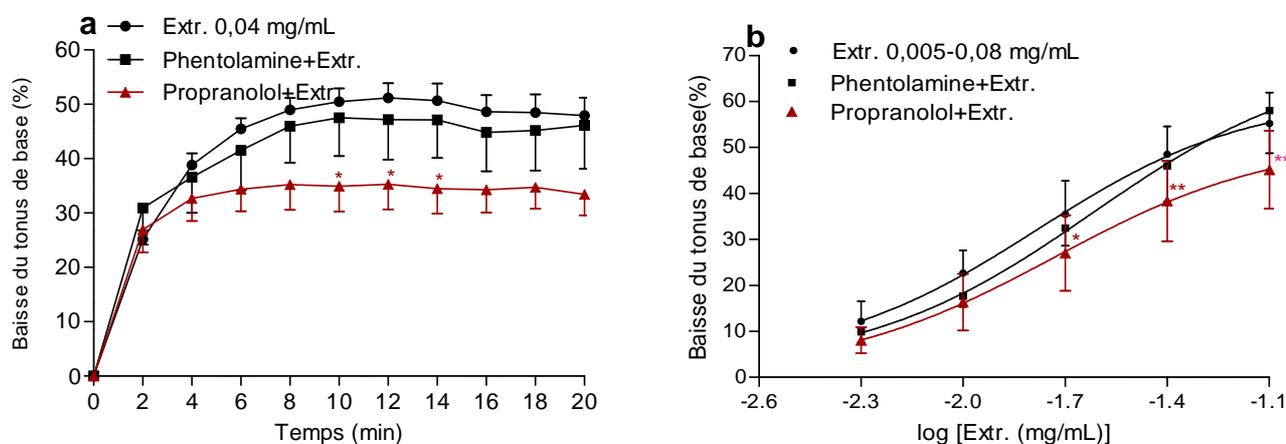
L'extrait a été administré en concentration unique (a) ou en concentrations cumulatives (b) après prétraitement de la préparation pendant 20 min avec l'atropine, la prométhazine ou l'indométacine. Les valeurs représentent la moyenne \pm erreur standard à la moyenne (ESM), $n=4-10$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA One-way suivi du post test de Newman-Keuls (pour les essais en administration unique) et ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforonni (pour les essais en administrations cumulées). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, différences significatives en comparaison à l'extrait seul.

III.1.2.3.3- Effets de l'extrait en présence de quelques antagonistes adrénergiques

La [Figure 34](#) montre les effets d'une concentration unique (0,04 mg/mL) et des concentrations cumulées (0,005-0,08 mg/mL) de l'extrait aqueux de *P. manni* sur l'activité contractile du duodénum en présence de quelques antagonistes α et β adrénergiques. Les effets de la norépinéphrine et du salbutamol sur l'activité contractile du duodénum sont également représentés sur cette figure. Le salbutamol administré en concentrations unique (5 μ M) ou cumulatives (0,1-50 μ M) a provoqué une diminution significative du tonus de base du duodénum de rat ([Figure 34c, d](#)). En présence du propranolol 1 μ M, l'activité maximale du salbutamol (5 μ M ou 0,1-50 μ M) sur le tonus de base a été inhibée de 61,09% ($p < 0,001$) dans les études en concentration unique et de 56,63% lors de l'administration en concentrations cumulées. La [figure 34 \(a, b\)](#) montre qu'en présence du propranolol (1 μ M), l'activité de l'extrait sur le tonus de base des contractions administré en concentration unique (0,04 mg/mL) ou en concentrations cumulatives (0,005 à 0,08 mg/mL), a diminué de manière significative. Le prétraitement de la préparation avec le propranolol avant l'administration d'une concentration unique de l'extrait (0,04 mg/mL) a entraîné par rapport à l'action de l'extrait seul une inhibition de la diminution du tonus de base de 31,17% ($P < 0,05$). En

présence de concentrations cumulées de l'extrait (0,005-0,08 mg/mL), le propranolol a induit par rapport l'action maximale des concentrations cumulées de l'extrait une inhibition de la diminution du tonus de base de 15,56% ($P < 0,01$). Le propranolol n'a pas provoqué de modification significative sur la baisse de l'amplitude des contractions induite par l'extrait aqueux de *P. manni* sur le duodénum de rat.

L'administration de la norépinephrine en concentrations unique (5 μ M) ou cumulatives (0,1-50 μ M) a induit une baisse significative du tonus de base des contractions spontanées du duodénum de rat (Figure 34c,d). La phentolamine (1 μ M) ou la combinaison prazosine/yohimbine (1/1 μ M) a inhibé partiellement et de manière significative ($P < 0,001$) la diminution du tonus de base induite par la norépinephrine sur le duodénum de rat. Après prétraitement à la phentolamine (1 μ M), l'administration de la norépinephrine en concentrations unique (5 μ M) ou cumulatives (0,1-50 μ M) a induit par rapport à l'action maximale de la norépinephrine, respectivement une inhibition du tonus de base de 42,98% et de 30,15%. La phentolamine (1 μ M) ou la combinaison prazosine/yohimbine (1/1 μ M) n'a pas inhibé significativement l'activité de l'extrait sur le duodénum de rat (Figure 34a, b). Il n'a pas été observé de modifications significatives de la baisse du tonus de base et de l'amplitude des contractions induite par l'extrait (0,04 mg/mL) en présence de la phentolamine comparativement à l'action de l'extrait seul. En présence des concentrations cumulées de l'extrait (0,005 à 0,08 mg/mL), la phentolamine n'a pas provoqué de variation significative de la baisse du tonus de base et de l'amplitude des contractions, par rapport à l'action de l'extrait seul administré en concentrations cumulées.



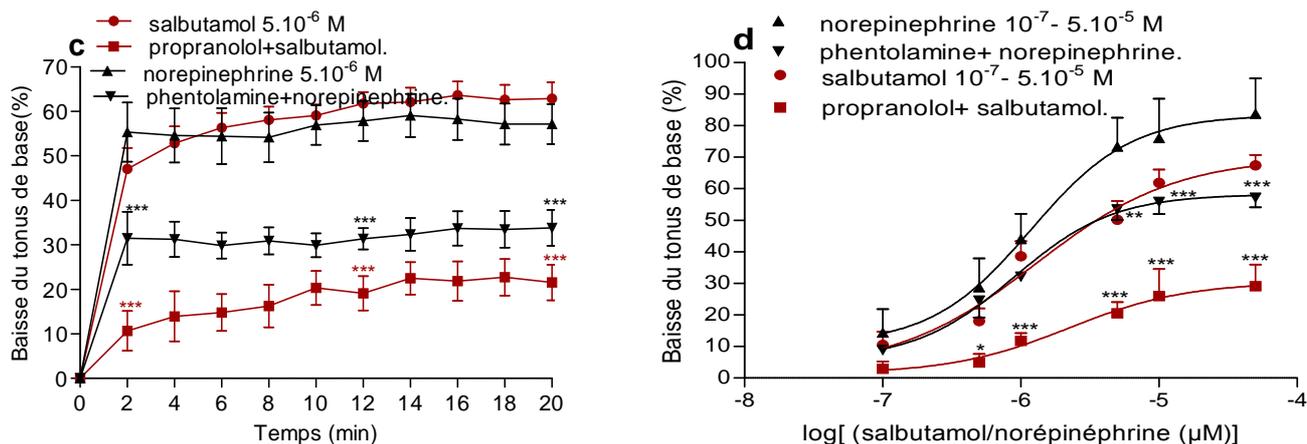


Figure 34: Effets de la phentolamine et du propranolol sur la relaxation induite par l'extrait de *P. manni* (a,b), la norépinephrine et salbutamol (c,d) sur le duodénum de rat.

L'extrait, la norépinephrine et le salbutamol ont été administrés en concentration unique (courbes à gauche) ou en concentrations cumulatives (courbes à droite) après prétraitement de la préparation pendant 20 min avec la phentolamine ou le propranolol ou l'eau distillée. Les valeurs représentent la moyenne \pm erreur standard à la moyenne (ESM), $n=6-20$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA One-way suivi du post test de Newman-Keuls (pour les essais en administration unique) et ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforronni (pour les essais en administrations cumulées). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, différences significatives en comparaison à l'extrait seul ou l'agoniste seul.

III.1.2.3.4- Effets de l'extrait en présence de quelques inhibiteurs de l'influx calcique

Le vérapamil à la concentration de 0,05 ou 0,1 μM a provoqué une inhibition significative des contractions spontanées du duodénum de rat. Le vérapamil administré seul (0,05 ou 0,1 μM) a induit une diminution significative ($P < 0,001$) du tonus de base ($56,09 \pm 5,67$ et $65,41 \pm 7,11\%$, respectivement) et de l'amplitude de contractions ($27,22 \pm 6,04\%$ et $59,76 \pm 4,58\%$, respectivement). Un lavage suffisant restaure partiellement les contractions. Il a été observé dans cette étude qu'à une concentration élevée (1 μM), le vérapamil semble inhiber totalement l'activité contractile spontanée du duodénum de rat; les contractions phasiques s'annulent et le tonus chute considérablement entraînant le relâchement total de l'organe. Même un lavage prolongé ne restaure pas les contractions spontanées après prétraitement au vérapamil à 1 μM . L'administration du vérapamil à la concentration de 0,05 ou 0,1 μM a bloqué partiellement et de manière significative ($P < 0,001$) et concentration dépendante la relaxation du duodénum induite par l'extrait, aussi bien en administration unique (0,04 mg/mL) qu'en administration cumulative (0,005-0,08 mg/mL) (Figure 35). Après prétraitement au vérapamil (0,05 ou 0,1 μM), la diminution maximale du tonus de base provoquée par l'extrait à la concentration de 0,04 mg/mL a été inhibée significativement de 32,82% et 46,64% respectivement (Figure 35a). Le vérapamil (0,05 ou 0,1 μM) a également

inhibé significativement la baisse de l'amplitude des contractions provoquée par l'extrait (0,04 mg/mL) de 34,01% et 66,74% respectivement (résultats non illustrés). La baisse maximale (E_{max}) du tonus des contractions induite par des concentrations cumulées de l'extrait (0,005-0,08 mg/mL) a été significativement réduite de 17,30% et 25,71% en présence de vérapamil (0,05 ou 0,1 μ M) comparativement à celle provoquée par l'extrait seul (Figure 35b).

Contrairement au vérapamil, l'EDTA à la concentration de 1 mM n'a pas affecté la relaxation induite par l'extrait aqueux de *P. manni* sur le duodénum (Figure 35). En présence de l'EDTA (1 mM), la baisse du tonus des contractions induite par l'extrait à 0,04 mg/mL a été semblable à celle obtenue avec l'extrait seul (relaxation max.: $49,45 \pm 5,11\%$ vs. $49,94 \pm 2,57\%$). Il n'a pas été observé de variations significatives de la baisse de l'amplitude des contractions induite par l'extrait (0,04 mg/mL) en présence et en absence de l'EDTA (relaxation max.: $40,69 \pm 4,71$ vs. $42,99 \pm 3,40\%$). L'EDTA (1 mM) n'a également pas entraîné de modification significative de la baisse du tonus des contractions provoquée par des concentrations cumulées de l'extrait (0,005-0,08 mg/mL).

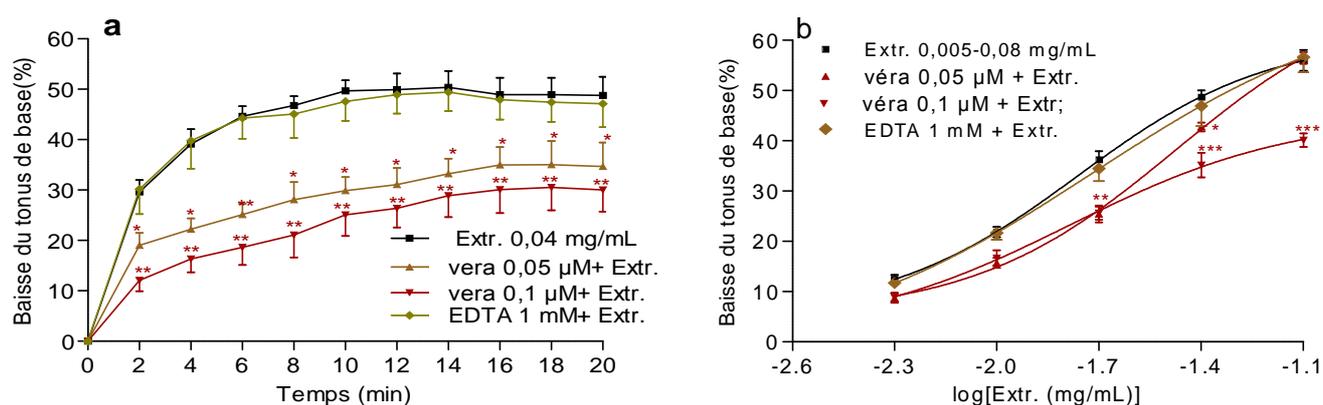


Figure 35: Effets de l'extrait de *P. manni* sur l'activité contractile spontanée du duodénum de rat en présence du vérapamil et de l'EDTA.

L'extrait a été administré en concentration unique (a) ou en concentrations cumulatives (b) après prétraitement de la préparation pendant 20 min avec le vérapamil ou l'EDTA ou l'eau distillée. Chaque point représente la moyenne \pm erreur standard à la moyenne (ESM), $n=5-8$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA One-way suivi du post test de Newman-Keuls (pour les essais en administration unique) et ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforonni (pour les essais en administrations cumulées). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, différences significatives en comparaison à l'activité l'effet de l'extrait seul.

III.1.2.3.5- Effets de l'extrait sur l'activité contractile du duodénum en présence des bloqueurs de canaux potassiques

La figure 36 illustre les effets de l'extrait aqueux de *P. manni* sur le duodénum de rat en présence de quelques bloqueurs de canaux potassiques. Il en ressort que le TEA à forte

concentration (10 mM) a provoqué une inhibition significative ($P < 0,001$) de la relaxation maximale du tonus des contractions provoquée par l'extrait à 0,04 mg/mL de 48,20% (Figure 36a). En présence de TEA 10 mM, la diminution maximale de l'amplitude des contractions induite par l'extrait (0,04 mg/mL) de $42,99 \pm 3,40\%$ est passée à $58,25 \pm 7,37\%$, soit une potentialisation de 35,50%. A une faible concentration (1 mM), le TEA a entraîné une inhibition non significative de la relaxation provoquée par l'administration d'une concentration unique de l'extrait (0,04 mg/mL) (Figure 36a). A cette concentration (1 mM), le TEA a inhibé de manière significative ($P < 0,05$) la baisse maximale du tonus des contractions induite par des concentrations cumulées de l'extrait (0,005-0,08 mg/mL) de 18,28% (Figure 36b). La courbe concentration-réponse de l'extrait a été décalée en bas et à droite en présence du TEA (1 mM). La EC_{50} de l'extrait de plante de $0,01838 \pm 0,00115$ mg/mL en présence de l'extrait seul est passée à $0,02121 \pm 0,00122$ mg/mL lorsque l'extrait est administré en présence de TEA (1 mM). L'action du TEA sur la baisse de l'amplitude des contractions était non significative en administration unique ou cumulative de l'extrait.

Le glibenclamide (10 μ M) n'a pas modifié significativement la diminution du tonus de base des contractions induite par l'extrait aqueux de *P. manni* sur le duodénum. La diminution maximale du tonus induite par une concentration unique d'extrait (0,04 mg/mL) était respectivement de $47,79 \pm 6,51\%$ et de $50,37 \pm 2,57\%$ en présence du glibenclamide et avec l'extrait seul (Figure 36a). Le glibenclamide n'a également pas modifié l'activité des contractions des concentrations cumulées de l'extrait (0,005-0,08 mg/mL) (Figure 36b). La diminution maximale de l'amplitude des contractions induite par l'extrait (0,04 mg/mL) n'a pas été modifiée de façon significative en présence du glibenclamide (résultats non illustrés).

La quinine à la concentration de 20 μ M a provoqué une inhibition significative la diminution du tonus des contractions induite par l'extrait aqueux de *P. manni*. En présence de la quinine (20 μ M), la diminution maximale du tonus de base induite par une concentration unique de l'extrait (0,04 mg/mL) était de $35,08 \pm 4,75\%$ contre $50,37 \pm 2,57\%$ en milieu physiologique sans quinine, soit une inhibition de 30,36% (Figure 36a). La quinine a également inhibé de manière significative la diminution de l'amplitude des contractions induite par l'extrait (0,04 mg/mL). La diminution maximale de l'amplitude de $42,99 \pm 3,40\%$ en présence de l'extrait seul est passée à $31,79 \pm 9,96\%$ en présence de la quinine (20 μ M), soit une inhibition de 26,05% (résultats non illustrés). Par contre, la diminution du tonus de base des contractions induite par des concentrations cumulées de l'extrait (0,005-0,08 mg/mL) n'était pas modifiée significativement en présence de la quinine (Figure 36b).

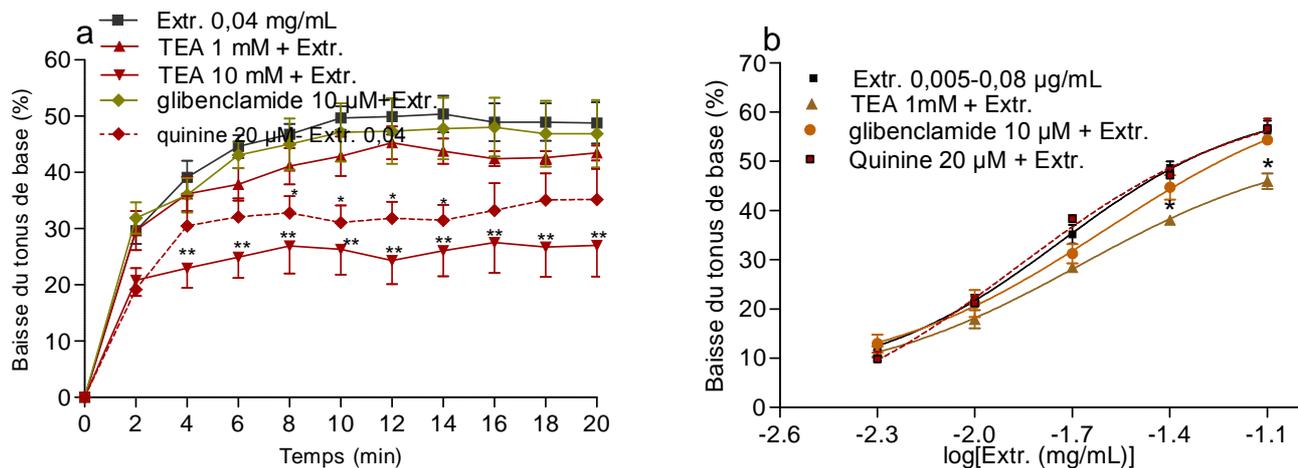


Figure 36: Effets de l'extrait de *P. mannii* sur l'activité contractile spontanée du duodénum de rat en présence du TEA, du glibenclamide et de la quinine.

L'extrait a été administré en concentration unique (a) ou en concentrations cumulatives (b) après prétraitement de la préparation pendant 20 min avec le TEA, le glibenclamide ou la quinine ou l'eau distillée. Les valeurs représentent la moyenne \pm erreur standard à la moyenne (ESM), $n=4-7$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA One-way suivi du post test de Newman-Keuls (pour les essais en administration unique) et ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforonni (pour les essais en administrations cumulées). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, différences significatives en comparaison à l'extrait seul.

III.1.2.3.6- Action de l'extrait sur l'activité contractile du duodénum en présence du L-NAME et du bleu de méthylène

Les effets du L-NAME et du bleu de méthylène sur la relaxation du duodénum induite par l'extrait aqueux de *P. mannii* sont illustrés par la figure 37. Elle montre que le L-NAME à la concentration de 5×10^{-4} M a provoqué une inhibition partielle et significative ($P < 0,01$) de la relaxation maximale du tonus des contractions induite par l'extrait administré en concentration unique (0,04 mg/mL) (Figure 37a) ou en concentrations cumulées (0,005-0,08 mg/mL) (Figure 37b). La diminution maximale du tonus de base de $49,04 \pm 2,57\%$ en présence de l'extrait à 0,04 mg/mL seul est passée à $31,60 \pm 3,49\%$ après prétraitement au L-NAME 5×10^{-4} M, soit une inhibition 35,56%. En administration cumulative, la EC_{50} de l'extrait de $0,01676 \pm 0,00118$ mg/mL est passée à $0,03451 \pm 0,00174$ mg/mL en présence du L-NAME. La E_{max} n'a pas été modifiée significativement en présence de cet antagoniste ($63,79 \pm 6,23\%$ vs. $67,23 \pm 23,92\%$). Le L-NAME n'a pas affecté significativement la variation de l'amplitude des contractions induite par l'extrait à 0,04 mg/mL.

Le bleu de méthylène à la concentration de 10^{-5} M a inhibé de manière significative l'activité relaxante induite par l'extrait. En présence du bleu de méthylène, l'activité de l'extrait (0,04 mg/mL) sur le tonus de base des contractions a été inhibée de 33,15% (Figure 37a). En administration cumulative, la courbe concentration-réponse de l'extrait sur le tonus a été décalée vers la droite en présence du bleu de méthylène. La EC_{50} de l'extrait (0,005-0,08

mg/mL) de $0,01676 \pm 0,00118$ mg/mL est passée à $0,01346 \pm 0,00120$ mg/mL après prétraitement avec le bleu de méthylène (Figure 37b). Il n'a pas été observé de modification significative de la variation de l'amplitude de contractions induite par l'extrait de plante à 0,04 mg/mL en présence du bleu de méthylène.

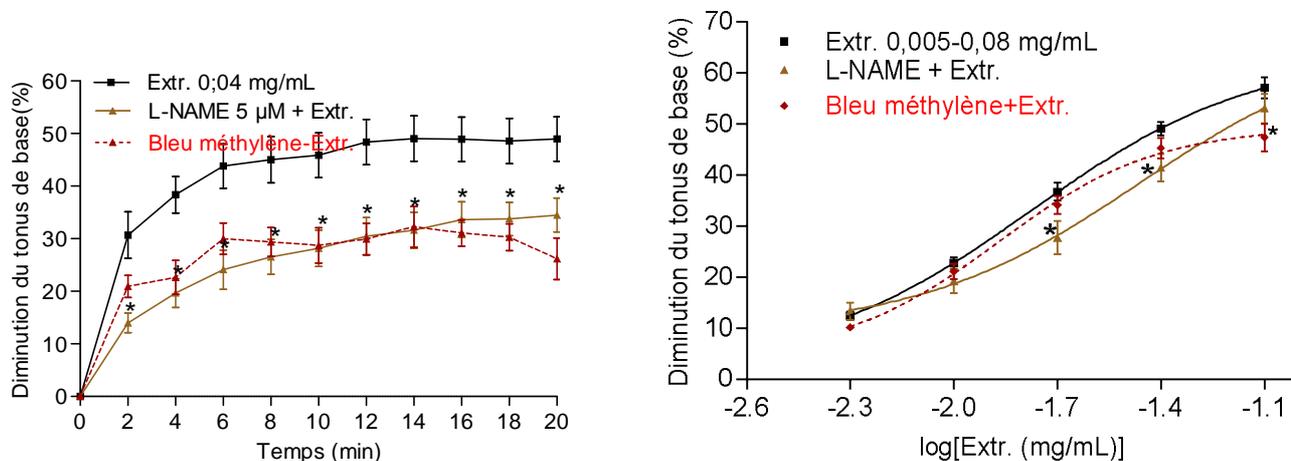


Figure 37: Action du L-NAME et du bleu de méthylène sur l'activité relaxante induite par l'extrait aqueux de *P. mannii* sur le duodénum de rat.

L'extrait a été administré en concentration unique (a) ou en concentrations cumulatives (b) après prétraitement de la préparation pendant 20 min avec le L-NAME ou le bleu de méthylène ou l'eau distillée. Les valeurs représentent la moyenne \pm erreur standard à la moyenne (ESM), $n=4-11$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA One-way suivi du post test de Newman-Keuls (pour les essais en administration unique) et ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforonni (pour les essais en administrations cumulées). * $P < 0,05$, différences significatives en comparaison à l'extrait seul.

III.1.2.4-Mécanismes d'action de l'effet contracturant induit par l'extrait sur le duodénum de rat

Les tracés originaux de la figure 38 montrent l'activité d'une forte concentration de l'extrait aqueux de *P. mannii* (0,16 mg/mL) sur les contractions spontanées du duodénum et les effets de quelques substances pharmacologiques sur cette activité. L'administration dans le milieu d'incubation d'une dose unique de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* à la concentration de 0,16 mg/mL a provoqué initialement une baisse immédiate du tonus de base suivie d'une élévation transitoire du tonus. Le prétraitement des préparations de duodénum avec l'atropine (1 μ M), la prométhazine (1 μ g/mL), l'indométacine (3 μ M), la phentolamine (ou la combinaison prazosine plus yohimbine) (1 μ M), le propranolol (1 μ M), l'EDTA (1 mM), le glibenclamide (10 μ M), la quinine (20 μ M), le bleu de méthylène (10^{-5} M) et le L-NAME (5×10^{-4}) n'a pas modifié de façon significative l'augmentation du tonus des contractions induite par l'extrait à forte à concentration. Le TEA à la concentration de 1 mM a non seulement inhibé partiellement la relaxation du tonus mais aussi a retardé et atténué la

phase contracturante induite par l'extrait à forte concentration. Le TEA (10 mM) a bloqué complètement l'élévation du tonus des contractions provoqué par l'extrait à 0,16 mg/mL. Le vérapamil (0,1 μ M) a également inhibé l'effet contracturant induite par une forte concentration d'extrait, en atténuant considérablement l'augmentation du tonus de base des contractions. En milieu sans Ca^{2+} additionné de l'EDTA, l'élévation du tonus induite par l'extrait à 0,16 mg/mL a été réduite.

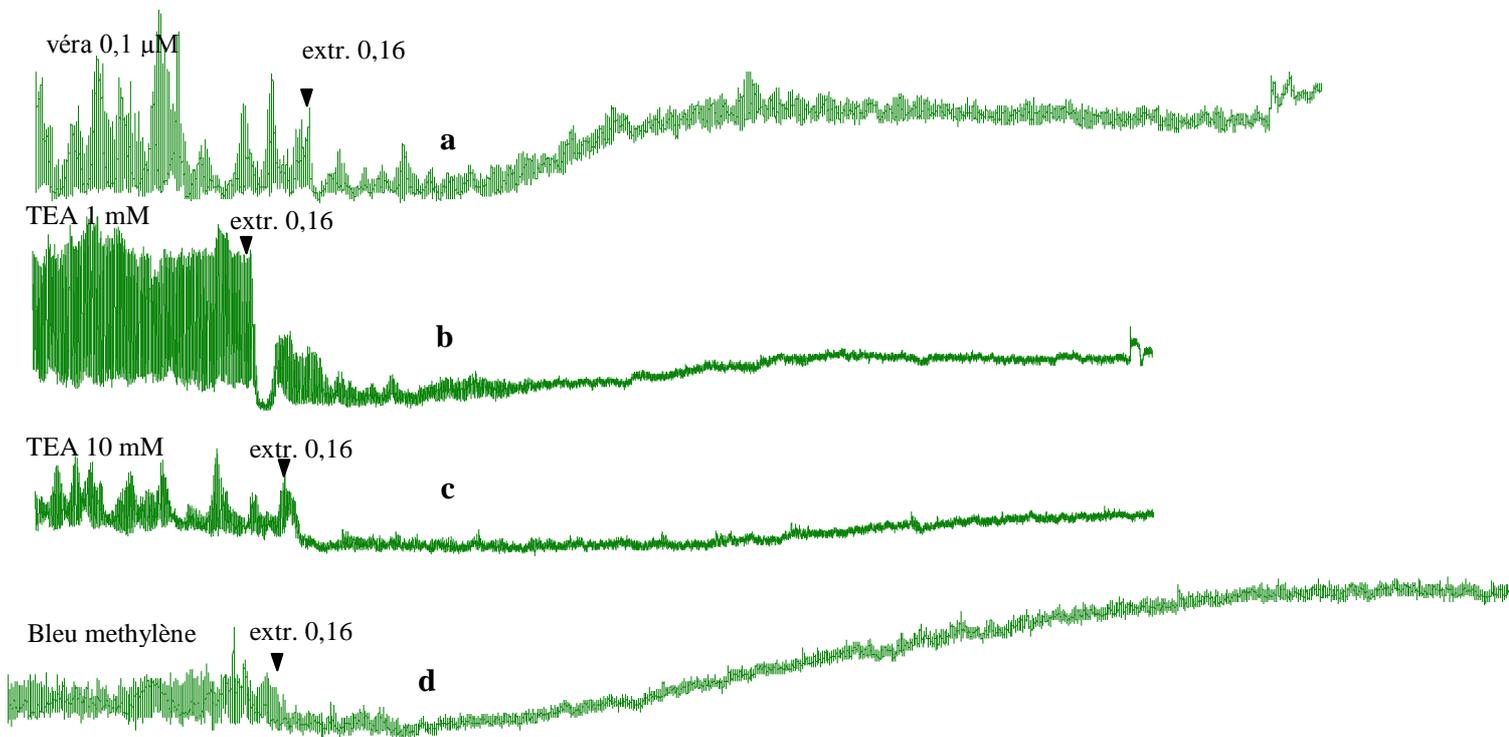


Figure 38: Tracés originaux illustrant l'activité d'une forte concentration de l'extrait aqueux de *P. manni* sur les contractions du duodénum de rat en présence de quelques antagonistes sur cette activité (a,b,c,d).

III.1.3-Effets de l'extrait sur l'activité contractile induite par quelques agents spasmogènes sur le duodénum de rat

III.1.3.1-Effets de l'extrait sur la contraction induite par le carbachol

Les effets des concentrations cumulatives de carbachol (10^{-9} - 5×10^{-4}) ont été initialement évalués sur l'activité contractile du duodénum de rat. Le [Graphe 42a](#) montre qu'aux faibles concentrations de carbachol (10^{-9} - 10^{-7} M), il a été observé une augmentation de l'amplitude des contractions spontanées sans modification significative du tonus de base. Aux concentrations élevées (10^{-7} - 5×10^{-5} M), les contractions spontanées phasiques diminuent et le tonus de base augmente de manière concentration dépendante atteignant une tension maximale (91,63%) à la concentration de 5×10^{-6} M. Au-delà de cette concentration, on a observé plutôt une diminution du tonus de manière concentration-dépendante ([Graphe 42a](#)). En présence de l'atropine (1 μ M), l'activité du carbachol sur le tonus de base des contractions a été significativement ($P < 0,001$) inhibée à partir de la concentration de 10^{-7} M ([Figure 39a](#)).

En présence de l'atropine, la tension maximale de l'organe (E_{max}) était de $14,36 \pm 2,02\%$ contre $95,05 \pm 6,99\%$ en présence du carbachol seul. La valeur du pD_2 du carbachol était respectivement de 7,148 et de 6,252 avec le carbachol seul et en présence de l'atropine.

Dans une autre série d'expérimentations, les effets du carbachol (10^{-9} - 5×10^{-4}) en concentrations cumulatives ont été évalués après incubation de l'organe en présence d'une concentration unique de l'extrait pendant 10 minutes. L'administration préalable de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* à la concentration de 0,02 mg/mL n'a pas modifié significativement l'activité contractile induite par le carbachol sur le duodénum de rat. Aux concentrations uniques de 0,04 et 0,08 mg/mL, l'extrait a provoqué une inhibition significative ($p < 0,01$) et concentration-dépendante de la contraction induite par des concentrations cumulatives de carbachol (Figure 39a). En présence de l'extrait, l'analyse des courbes concentration-contraction du carbachol montre que l'affinité du carbachol (pD_2) de 7,148 est passée respectivement à 6,970, 6,495 et 6,584 en présence de l'extrait à 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL. La tension maximale atteinte par l'organe (E_{max}) de 95,03% en présence du carbachol seul est passée respectivement à 97,81; 81,26 et 47,17 % en présence de l'extrait à 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL.

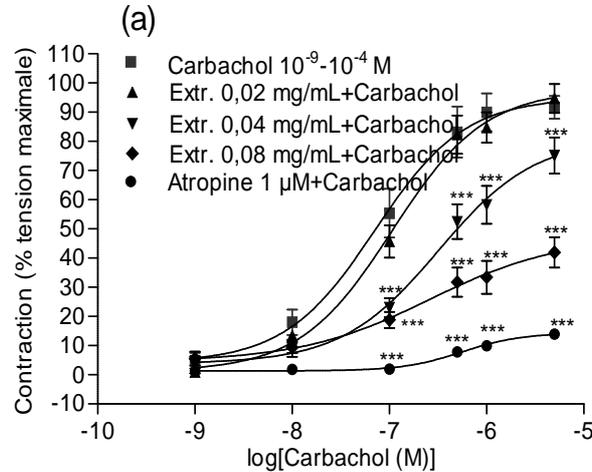


Figure 39a: Effets de l'extrait aqueux de *P. mannii* sur le tonus de base des contractions du duodénum de rat induites avec le carbachol

Le carbachol (10^{-9} - 5×10^{-4}) a été injecté cumulativement la cuve à intervalles de 2 min, après prétraitement de la préparation pendant 10 minutes avec l'extrait ou l'atropine. La réponse contractile à une concentration de carbachol a été exprimée en pourcentage de la tension maximale initialement atteinte lors de la première série d'administrations. Les valeurs représentent les pourcentages de tension \pm SEM, $6 < n < 8$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforroni. *** $P < 0,001$, différences significatives par rapport au carbachol seul.

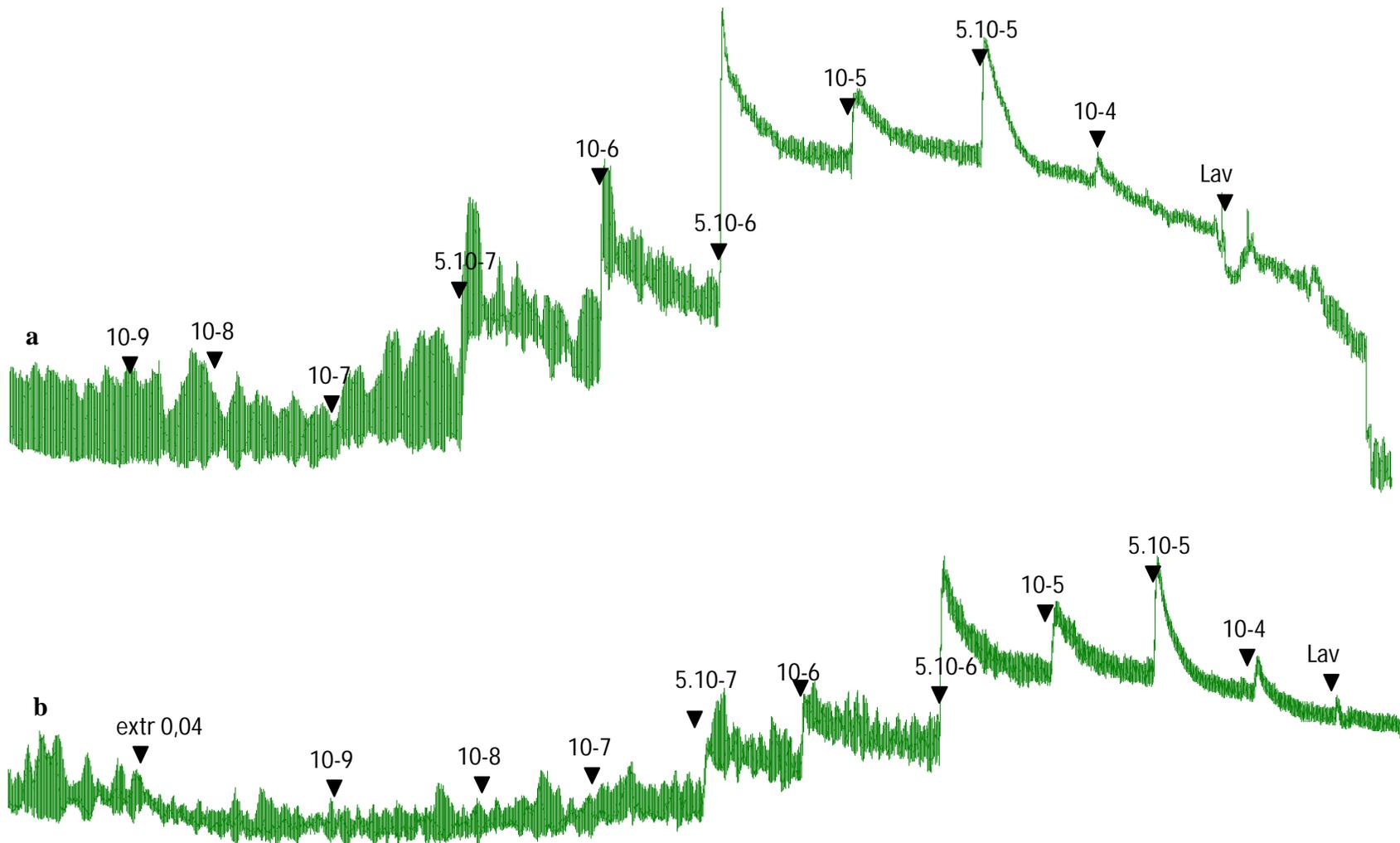


Figure 39b: Tracés originaux montrant les contractions du duodénum induites avec le carbachol en absence (a) et en présence l'extrait aqueux de *P. manni* (b) Le carbachol (10^{-9} - 5.10^{-4}) a été injecté cumulativement la cuve à intervalles de 2 min, après prétraitement de la préparation pendant 10 minutes avec l'extrait.

III.1.3.2-Effets de l'extrait sur la contraction induite avec l'histamine

L'histamine administré aux concentrations cumulatives (10^{-9} - 5×10^{-4} M) a provoqué une augmentation concentration-dépendante de la tension de base du duodénum. Aux faibles concentrations de l'histamine (10^{-9} - 5×10^{-8} M), il a été observé une augmentation de l'amplitude des contractions spontanées sans modification du tonus de base. Aux concentrations élevées (5×10^{-7} - 5×10^{-5} M), le tonus a augmenté de manière concentration dépendante jusqu'à un maximum d'environ 84,72% à la concentration de 6×10^{-5} M, alors que l'amplitude des contractions spontanées a diminué progressivement jusqu'à s'annuler. Au-delà de cette concentration maximale (6×10^{-5} M), le tonus décroît progressivement de manière concentration-dépendante tendant à revenir au tonus de base (graphe 40b). La prométhazine à la concentration de 0,5 μ g/mL a provoqué une inhibition significative ($p < 0,001$) de l'activité contractile induite par l'histamine. La E_{max} de l'histamine de 82,77% est passée à 17,30% et le pD_2 de 5,471 est passée à 5,512, en présence de la prométhazine (Figure 40a).

Le prétraitement des fragments du duodénum avec l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* aux concentrations de 0,04 ou 0,08 mg/mL a provoqué une inhibition partielle et significative ($p < 0,001$) de l'activité contractile induite par des concentrations croissantes cumulatives d'histamine à partir de la concentration de 6×10^{-6} M (Figure 40a). Par rapport au témoin (histamine seul), l'efficacité de l'histamine a diminué significativement en présence de l'extrait. La E_{max} de l'histamine de 82,77% est passée respectivement à 57,87% et 50,35% en présence de l'extrait à 0,04 et 0,08 mg/mL. L'affinité (pD_2) de l'histamine de 5,471 est passée respectivement à 5,602 et 5,550, en présence de l'extrait à 0,04 et 0,08 mg/mL.

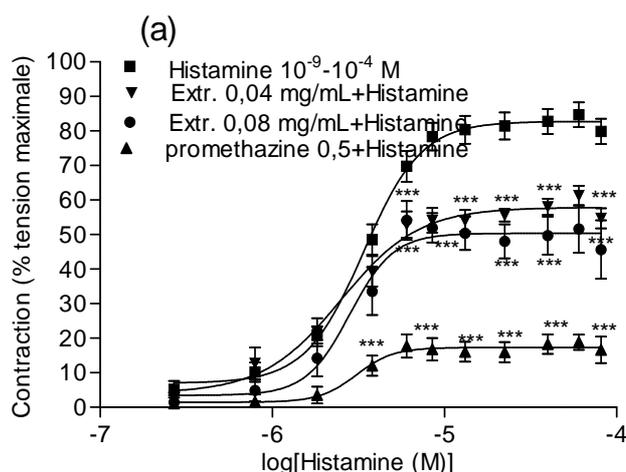


Figure 40a: Effets de l'extrait aqueux de *P. mannii* sur les contractions du duodénum induites avec l'histamine. Les valeurs représentent les pourcentages de tension \pm SEM, $7 < n < 12$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforroni. *** $P < 0,001$, différences significatives par rapport à l'histamine seul.

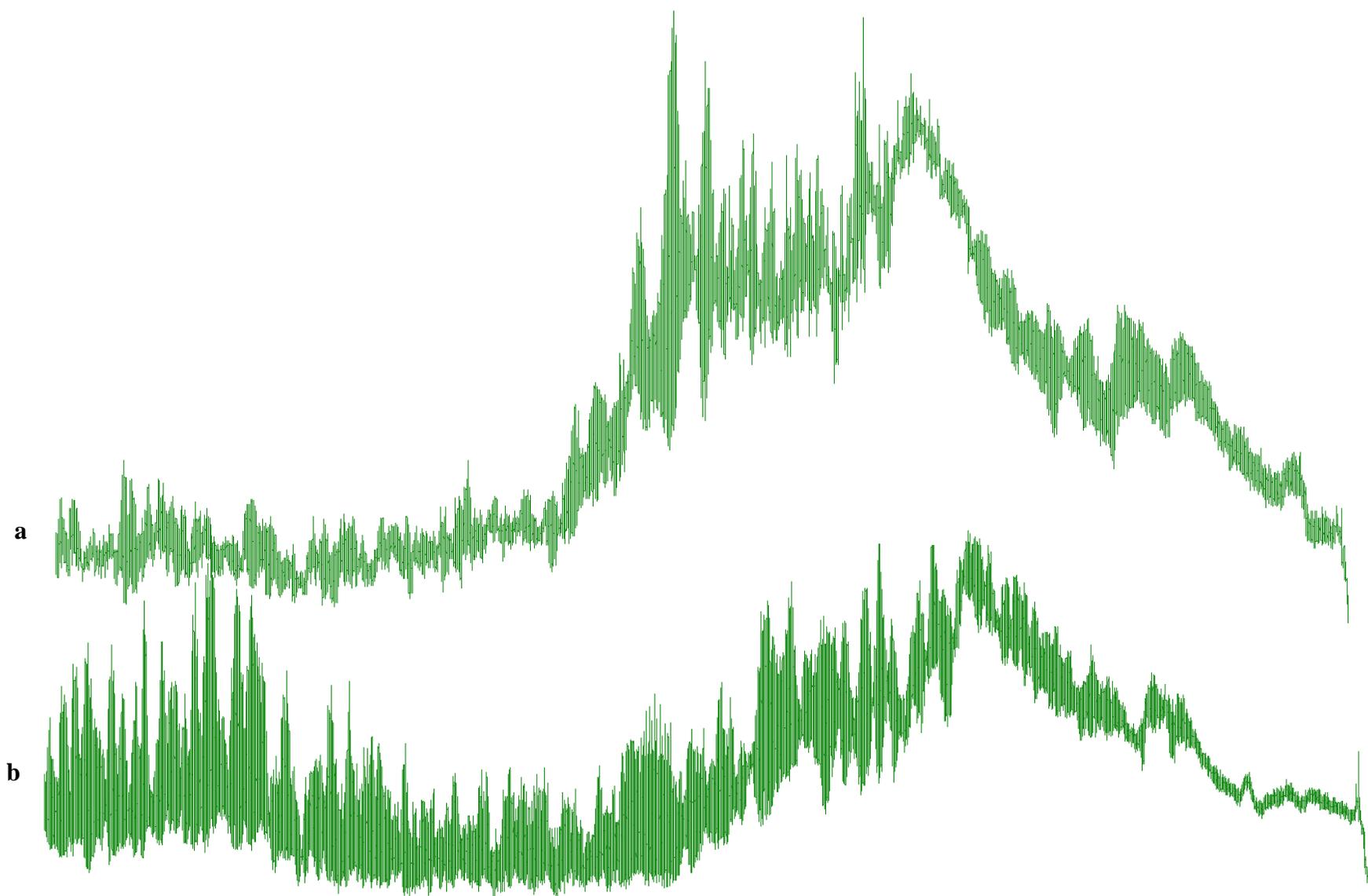


Figure 40b: Tracés originaux montrant les contractions du duodénum de rat induites avec l’histamine en absence (a) et en présence (b) de l’extrait aqueux de *P. manni*

III.1.3.3-Effets de l'extrait sur la contraction induite par le chlorure de potassium

La [figure 41](#) et les [tracés](#) originaux associés illustrent les effets de l'extrait aqueux de *P. manni* sur la contraction tonique induite par le chlorure de potassium (KCl) sur le duodénum de rat. L'administration d'une concentration hyperosmotique unique de KCl (20 mM ou 50 mM) sur le duodénum de rat a induit une contraction phasique rapide suivie d'une contraction tonique lente à s'établir et qui se maintient à une tension élevée. L'administration de l'extrait aqueux de *P. manni* aux concentrations cumulatives de 0,005-0,08 mg/mL a provoqué une inhibition significative de la contraction tonique induite par le KCl à 2×10^{-2} M ou 5×10^{-2} M ([graphe 41b](#)). Par rapport à la contraction tonique maximale induite par KCl, il a été observé une baisse significative ($p < 0,001$) et concentration-dépendante de la contraction en présence des concentrations croissantes d'extrait ([Figure 41a](#)). L'effet relaxant maximal (E_{\max}) de l'extrait était de $100,10 \pm 10,02\%$ et $82,20 \pm 13,50\%$, et le pD_2 de $1,755 \pm 0,075$ et $1,685 \pm 0,106$, respectivement pour les concentrations de KCl de 20 mM et 50 mM.

L'administration cumulative du KCl (10^{-3} - 6×10^{-2} M) a également provoqué une contraction régulièrement croissante sur les fragments de duodénum ([graphe 41b](#)). On a observé d'abord une augmentation de l'amplitude des contractions spontanées, puis celle du tonus de l'organe de manière concentration-dépendante jusqu'à un maximum d'environ 82,69% correspondant à la concentration de 4×10^{-2} M ([Figure 41b](#)). Au-delà de cette concentration de 4×10^{-2} M, le tonus décroît progressivement et tend à revenir à la valeur de base. Le vérapamil (0,1 μ M) a inhibé significativement ($p < 0,001$) la contraction induite par le KCl (E_{\max} : $28,48\% \pm 10,40\%$ et pD_2 : $1,28 \pm 0,76$). L'administration de l'extrait aqueux de *P. manni* aux concentrations uniques de 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL a provoqué une inhibition partielle mais significative ($p < 0,001$) de la contraction induite par des concentrations croissantes cumulatives de KCl de manière concentration-dépendante ([graphe 41b](#) et [Figure 41b](#)). La tension maximale de l'organe (E_{\max}) induite par le KCl (10^{-3} - 6×10^{-2} M) de 84,77% n'était plus respectivement que de 79,58, 56,21 et 45,58 % en présence de l'extrait à 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL. Dans cette étude expérimentale, le pD_2 du KCl était relativement de même ordre en absence ou en présence de l'extrait ($2,06 \pm 0,06$ vs. $1,95 \pm 0,06$, $2,01 \pm 0,04$ et $1,91 \pm 0,07$ respectivement avec le KCL seul et en présence de l'extrait à 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL).

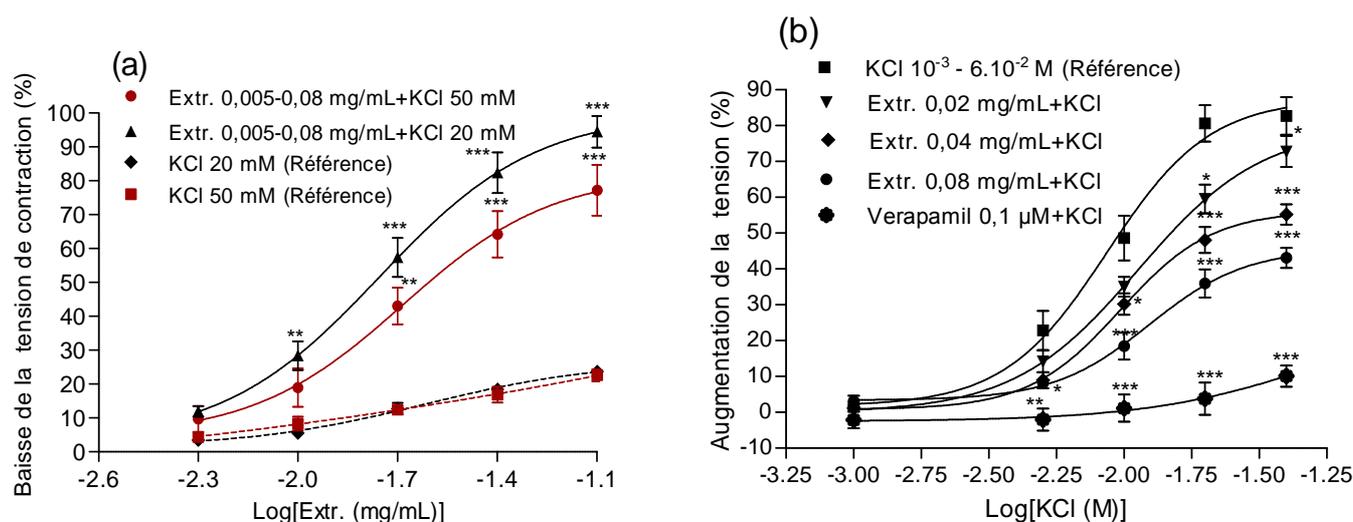
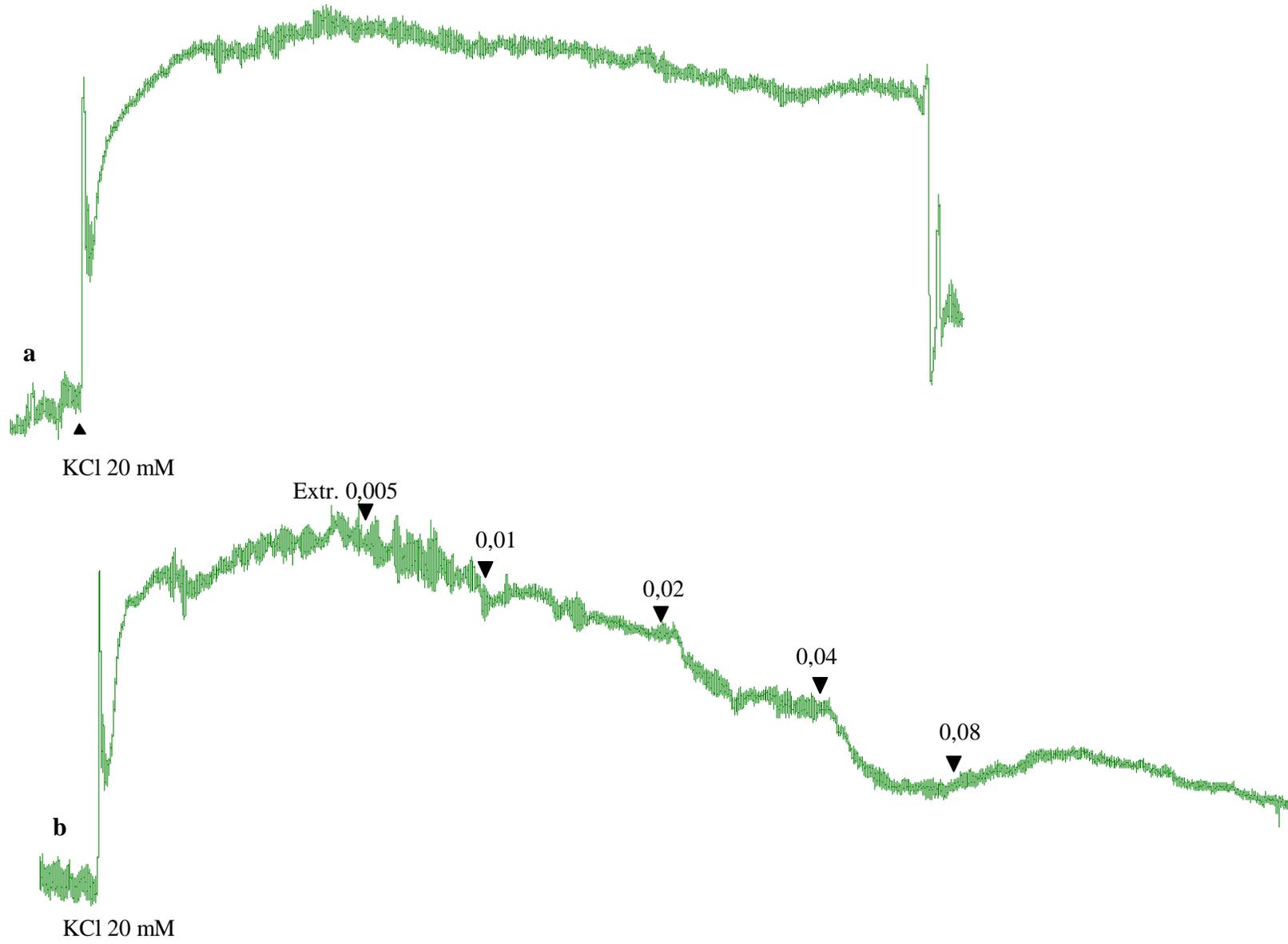


Figure 41a: Effets de l'extrait aqueux de *P. mannii* sur l'activité contractile du duodénum de rat induite avec le KCl.

Le KCl a été appliqué en concentration unique (20 mM ou 50 mM) dans la solution d'incubation pour induire une contraction tonique soutenue puis l'extrait a été administré cumulativement (0,005-0,08 mg/mL) à 10 minutes d'intervalles (a). La réponse relaxante de chaque concentration d'extrait a été estimée en pourcentage de diminution de la tcontraction tonique maximale induite par le KCl (20 mM ou 50 mM). Le KCl (10^{-3} - 6.10^{-2} M) a été également injecté cumulativement dans la cuve à intervalles de 2 minutes, après prétraitement de la préparation pendant 10 min avec l'extrait ou le verapamil (b). La réponse contractile à une concentration donnée de KCl a été exprimée en pourcentage de la contraction maximale (tension maximale) initialement atteinte lors du premier cumul de KCl. Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm ESM, $6 < n < 12$. Les résultats ont été analysés à l'aide du test ANOVA One-way suivi du post test de Newman-Keuls (pour les essais en administration unique) et ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforonni (pour les essais en administrations cumulées). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, différences significatives en comparaison au KCl seul.



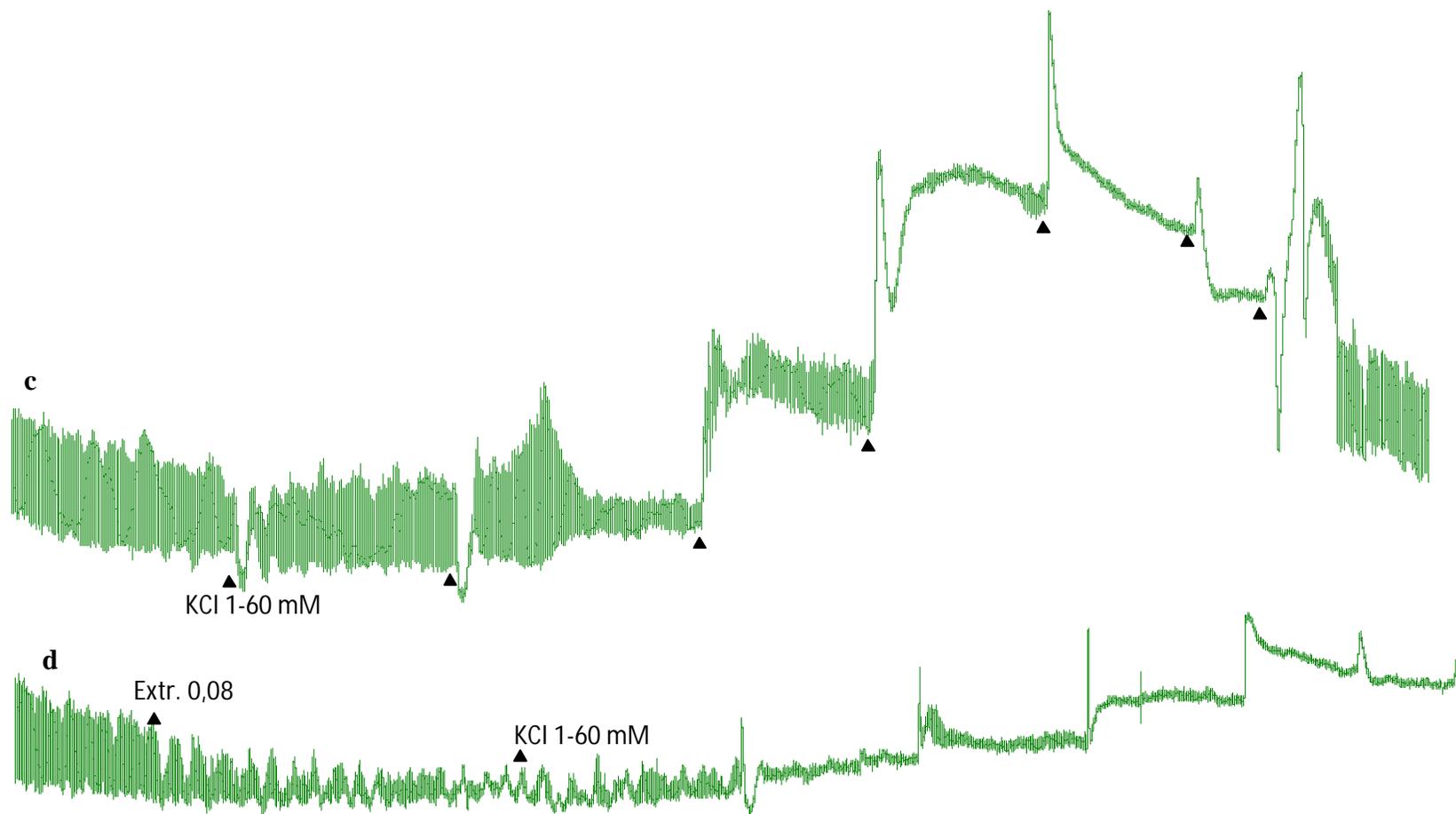


Figure 41b: Tracés originaux montrant les effets de l'extrait aqueux de *P. mannii* sur l'activité contractile du duodénum de rat induite avec le KCl en administration unique (a, b) ou cumulative (c, d)

III.1.3.4-Effets de l'extrait sur la contraction induite avec le chlorure de baryum

Les effets de l'extrait aqueux de *P. manni* sur la contraction du duodénum induite par le chlorure de baryum (BaCl_2) sont illustrés par la figure 42. *In vitro*, le BaCl_2 administré en concentrations cumulatives (10^{-5} - 5×10^{-2} M) a provoqué une augmentation croissante et concentration-dépendante de la contraction du duodénum de rat. Aux faibles concentrations (BaCl_2 10^{-5} - 10^{-4} M), il a été observé une augmentation de l'amplitude des contractions spontanées. Aux fortes concentrations ($\geq 10^{-4}$ M), le tonus a augmenté de manière concentration-dépendante jusqu'à une tension maximale de 85,02% à la concentration de 5×10^{-2} M. Au-delà de cette forte concentration (5×10^{-2} M), le tonus décroît de manière concentration-dépendante tendant à revenir à la valeur de base (figure 42b). L'incubation de l'organe en présence de l'extrait aqueux de *P. manni* à la concentration de 0,02 mg/mL a réduit de manière non significative l'effet contracturant du BaCl_2 sur le duodénum. En présence des fortes concentrations de l'extrait 0,04 et 0,08 mg/mL, il a été observé une baisse significative ($p < 0,001$) et concentration-dépendante de la tension de contraction induite par le BaCl_2 (Figure 42a). L'effet contracturant maximal de BaCl_2 (E_{max}) de 89,42% en présence de concentrations cumulées de BaCl_2 seul était respectivement de 56,87% et 20,10% lorsque le BaCl_2 était administré en présence de l'extrait à la concentration de 0,04 ou 0,08 mg/mL. La valeur de EC_{50} de $2,2 \times 10^{-4}$ M en présence du BaCl_2 est passée respectivement à $1,8 \times 10^{-4}$; $5,7 \times 10^{-4}$ et $9,3 \times 10^{-3}$ M lorsque le BaCl_2 était administré en présence de l'extrait à 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL.

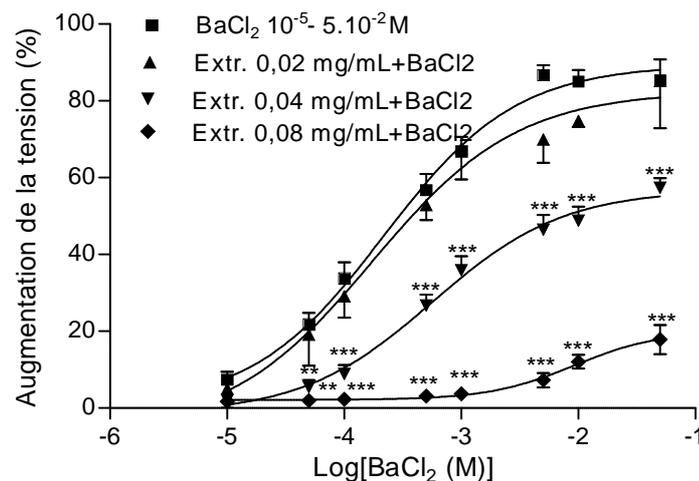


Figure 42a: Effets de l'extrait aqueux de *P. manni* sur l'activité contractile du duodénum de rat induite par le BaCl_2 .

Le BaCl_2 a été administré de manière cumulative (10^{-5} ; 5×10^{-5} ; 10^{-4} ; 5×10^{-4} ; 10^{-3} ; 5×10^{-3} ; 10^{-2} ; 5×10^{-2} M) dans la solution d'incubation. Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm ESM, $5 < n < 9$. Les résultats ont été analysés à l'aide du test ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforonni. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, différences significatives par rapport au BaCl_2 seul.

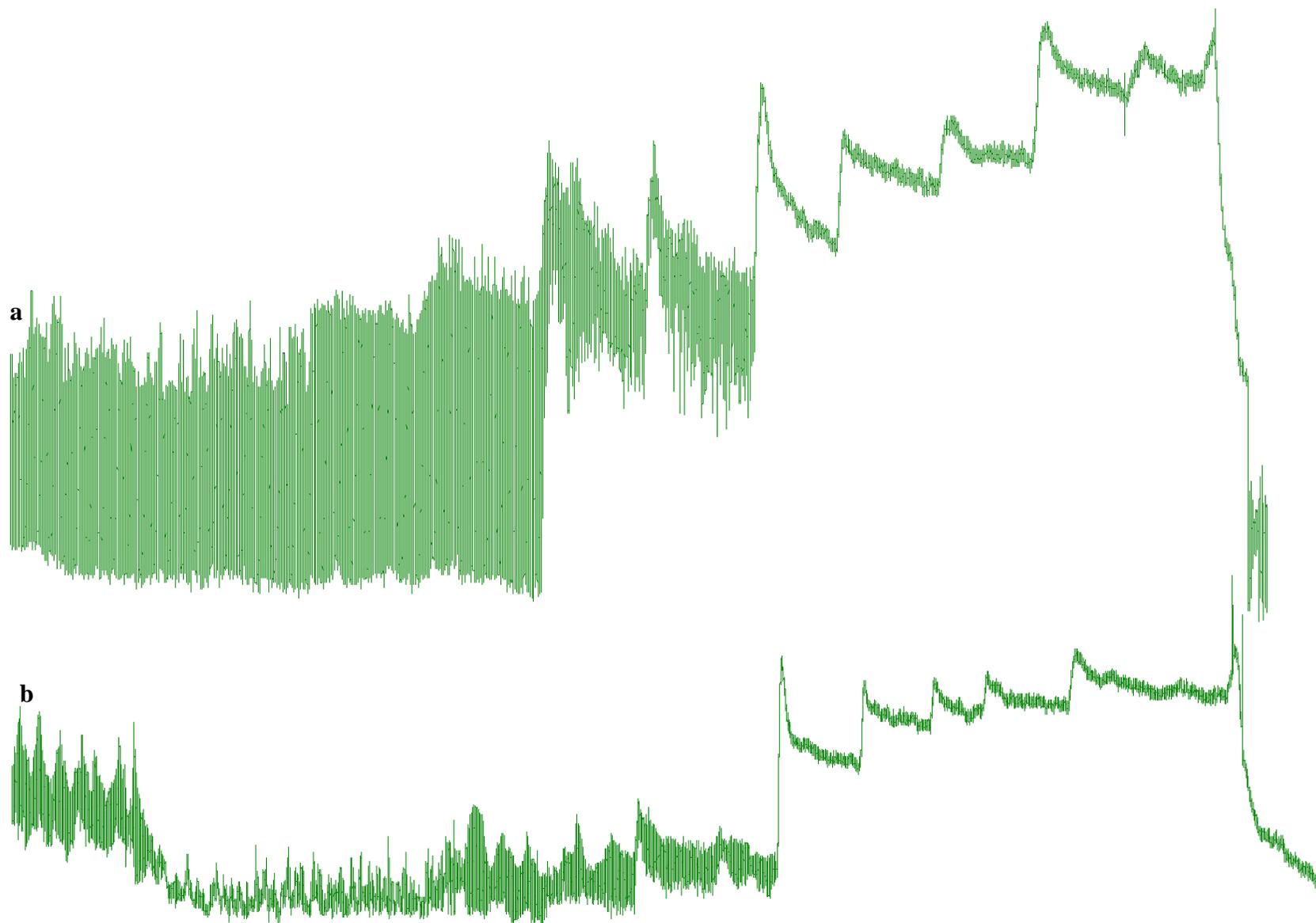


Figure 42b: Tracés originaux montrant les effets de l'extrait aqueux de *P. manni* sur l'activité contractile du duodénum de rat induite avec le $BaCl_2$ en absence (a) et en présence (b) de l'extrait aqueux de *P. manni*.

III.1.3.5-Effets de l'extrait sur la contraction induite avec le chlorure de calcium

La figure 43 et le tracé original associé illustrent les effets de l'extrait aqueux de *P. manni* sur l'activité contractile induite par le chlorure de calcium (CaCl_2) sur le duodénum de rat. Dans cette étude, les effets des concentrations cumulées de CaCl_2 (10^{-5} - 2×10^{-2} M) ajoutées en milieu 0 Ca^{2+} ont été évalués sur contractile du duodénum de rat. *In vitro*, dans la solution de Tyrode sans calcium additionnée ou non d'EDTA, l'activité contractile spontanée phasique du duodénum cesse et l'organe se relâche totalement. L'administration des concentrations croissantes cumulées de CaCl_2 (10^{-5} - 2×10^{-2} M) dans un tel milieu a provoqué une contraction tonique régulièrement croissante. Le tonus de base des contractions a augmenté de manière concentration dépendante et a atteint une tension maximale de 94,41% à la concentration de 2×10^{-2} M. Aux concentrations plus élevées de CaCl_2 (2×10^{-2} - 5×10^{-2} M), on a observé plutôt une diminution progressive du tonus de manière concentration-dépendante (graphe 43b). L'incubation de l'organe en présence de l'extrait aqueux de *P. manni* aux concentrations uniques de 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL a inhibé de façon significative la contraction due au CaCl_2 sur le duodénum de rat, aussi bien en milieu 0 Ca^{2+} sans EDTA que dans une solution dépourvue de Ca^{2+} et additionnée de l'EDTA (Figure 43). En milieu sans Ca^{2+} et sans EDTA, il a été observé une diminution significative ($p < 0,001$) de la tension de contraction avec les fragments traités au préalable avec l'extrait, par rapport aux préparations témoins (CaCl_2 seul) (Figure 43a et graphe 43b). La courbe concentration-réponse du CaCl_2 était de plus en plus décalée vers la droite et vers le bas en présence de concentrations croissantes d'extrait, traduisant une inhibition des contractions de manière concentration-dépendante. La tension maximale de l'organe (E_{\max}) après ajout de concentrations cumulées de CaCl_2 (10^{-5} - 2×10^{-2} M) en milieu sans Ca^{2+} de 98,40 % est passée à 55,54; 39,56 et 46,28% en présence de l'extrait respectivement à 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL, soit une inhibition de 43,55%; 59,80% et 52,97%. Dans ces conditions expérimentales, le pD_2 de CaCl_2 a augmenté en présence de l'extrait (2,570 vs. 2,688, 2,917 et 2,862 respectivement). Le vérapamil à faible concentration (0,1 μM) a provoqué une inhibition partielle ($p < 0,01$) de la contraction seulement aux faibles concentrations de CaCl_2 ($\leq 5 \times 10^{-3}$ M). Aux fortes concentrations de CaCl_2 ($> 5 \times 10^{-3}$ M), l'organe a échappé et présenté des contractions égalant ou dépassant celle obtenue chez les témoins (E_{\max} très élevée). A une concentration plus élevée, le vérapamil (1 μM) a inhibé presque totalement ($p < 0,001$) la contraction due au CaCl_2 ; la tension de l'organe ne s'est élevée très faiblement qu'à des fortes concentrations de CaCl_2 .

Sur les fragments de duodénum incubés dans la solution de Tyrode sans calcium et additionnée d'EDTA 0,5 mM, l'adjonction cumulative de CaCl_2 (10^{-5} - 2×10^{-2} M) a également provoqué une contraction tonique concentration-dépendante. L'incubation préalable des fragments d'organe pendant 10 minutes en présence de l'extrait aqueux de *P. manni* aux concentrations uniques de 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL a également inhibé la contraction par l'ajout du CaCl_2 de façon significative ($p < 0,001$) et concentration dépendante (Figure 43b). Les valeurs de E_{\max} étaient de 124,00; 120,90; 67,40 et 85,40% respectivement pour le témoin et en présence de l'extrait à 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL, soit une inhibition de 2,50%; 45,65% et 31,13%. La courbe concentration-contraction du CaCl_2 était de plus en plus décalée vers la droite et le pD_2 de CaCl_2 était relativement plus élevé en présence de l'extrait par rapport à celui obtenu en absence d'extrait (2,191 vs. 1,931; 2,514; 2,350 respectivement pour le témoin et en présence de l'extrait à 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL. Dans les mêmes conditions expérimentales, le vérapamil (0,1 μM) a également provoqué une inhibition de la contraction due aux faibles concentrations de CaCl_2 (E_{\max} : 177,20; pD_2 : 1,552).

Sur les fragments de duodénum incubés pendant quelques minutes (10 min) dans une solution de Tyrode sans Ca^{2+} additionnée d'EDTA 0,5 mM, puis replacés dans la solution de Tyrode sans Ca^{2+} , l'extrait a également provoqué une inhibition significative de la contraction induite par l'administration cumulative du CaCl_2 . La courbe concentration-réponse du CaCl_2 était régulièrement décalée vers le bas en présence de différentes concentrations croissantes d'extrait (Figure 43c). Par rapport aux témoins, les valeurs de E_{\max} du CaCl_2 étaient plus basses en présence de l'extrait (98,09% vs. 71,71; 56,18 et 26,81%, respectivement pour le témoin et en présence de l'extrait à 0,02; 0,04 0,08 mg/mL, soit une inhibition de 26,89%; 42,73% et 72,67%). Les valeurs du pD_2 étaient sensiblement proches dans cette étude (2,606 vs. 2,798; 2,824; 2,880 respectivement pour le contrôle et l'extrait à 0,02; 0,04 et 0,08 mg/mL). Le vérapamil (0,1 μM) a également inhibé l'activité contractile induite par le CaCl_2 notamment pour des faibles concentrations de CaCl_2 (E_{\max} : 110,70%; pD_2 : 1,675).

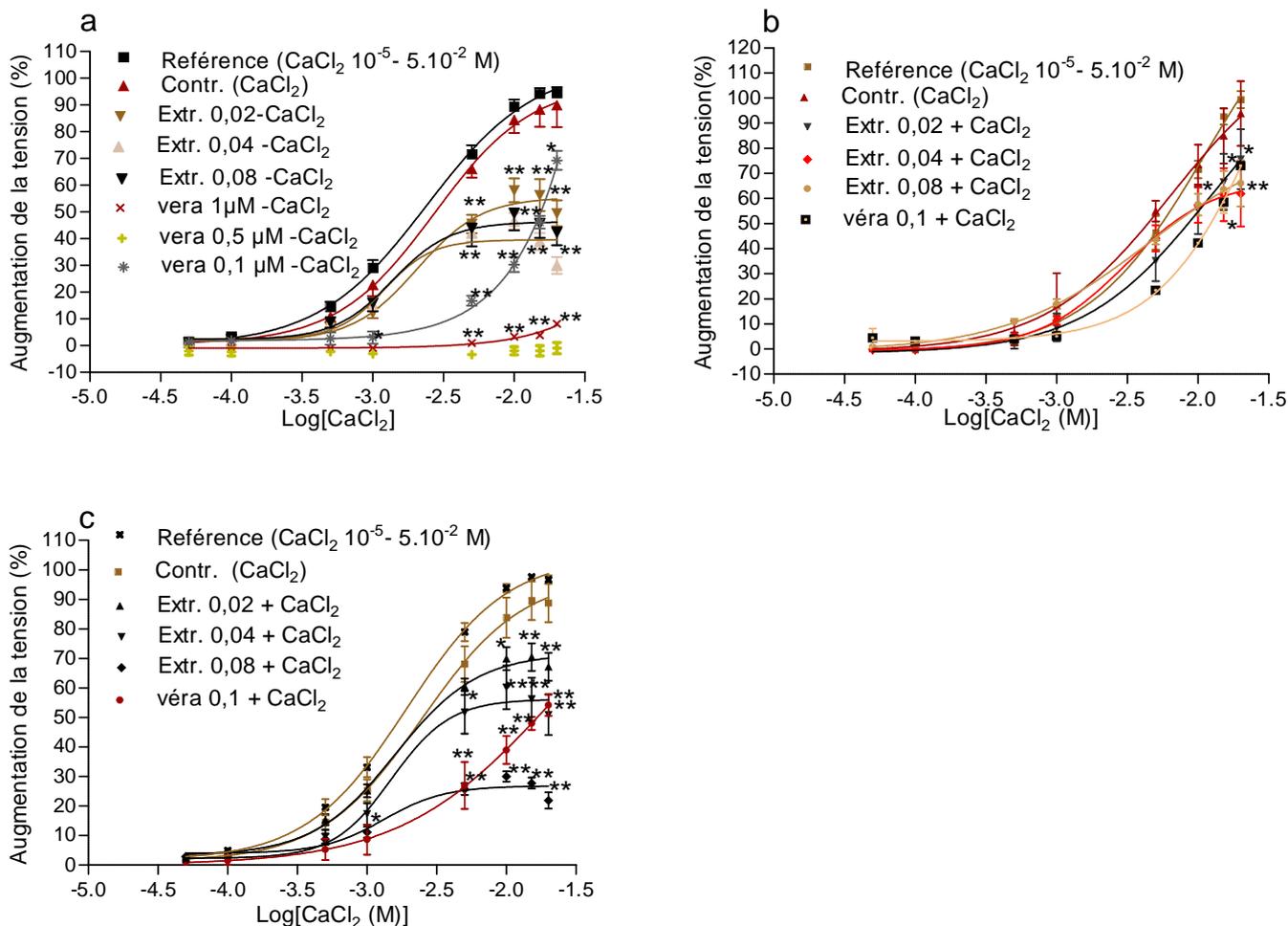


Figure 43a: Courbes concentration-réponse de l'activité contractile du duodénum de rat induite par le CaCl_2 et en présence de l'extrait aqueux de *P. mannii*.

Le CaCl_2 a été ajouté en concentrations cumulées (10^{-5} - 5×10^{-2} M) dans le milieu d'incubation contenant la solution de Tyrode 0 Ca^{2+} sans EDTA (a) ou la solution de Tyrode 0 Ca^{2+} additionnée de l'EDTA (b, c). La courbe concentration-réponse du CaCl_2 a été établie en absence de l'extrait (courbe référence) et après incubation de l'organe pendant 10 minutes avec une concentration unique de l'extrait (0,02; 0,04 ou 0,08 mg/mL) ou du vérapamil. La tension maximale à chaque concentration de CaCl_2 a été exprimée en % de la tension maximale atteinte lors de la première administration de CaCl_2 (tension de référence). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm ESM, $5 < n < 20$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforonni. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, différence significative par rapport au témoin (CaCl_2 seul).

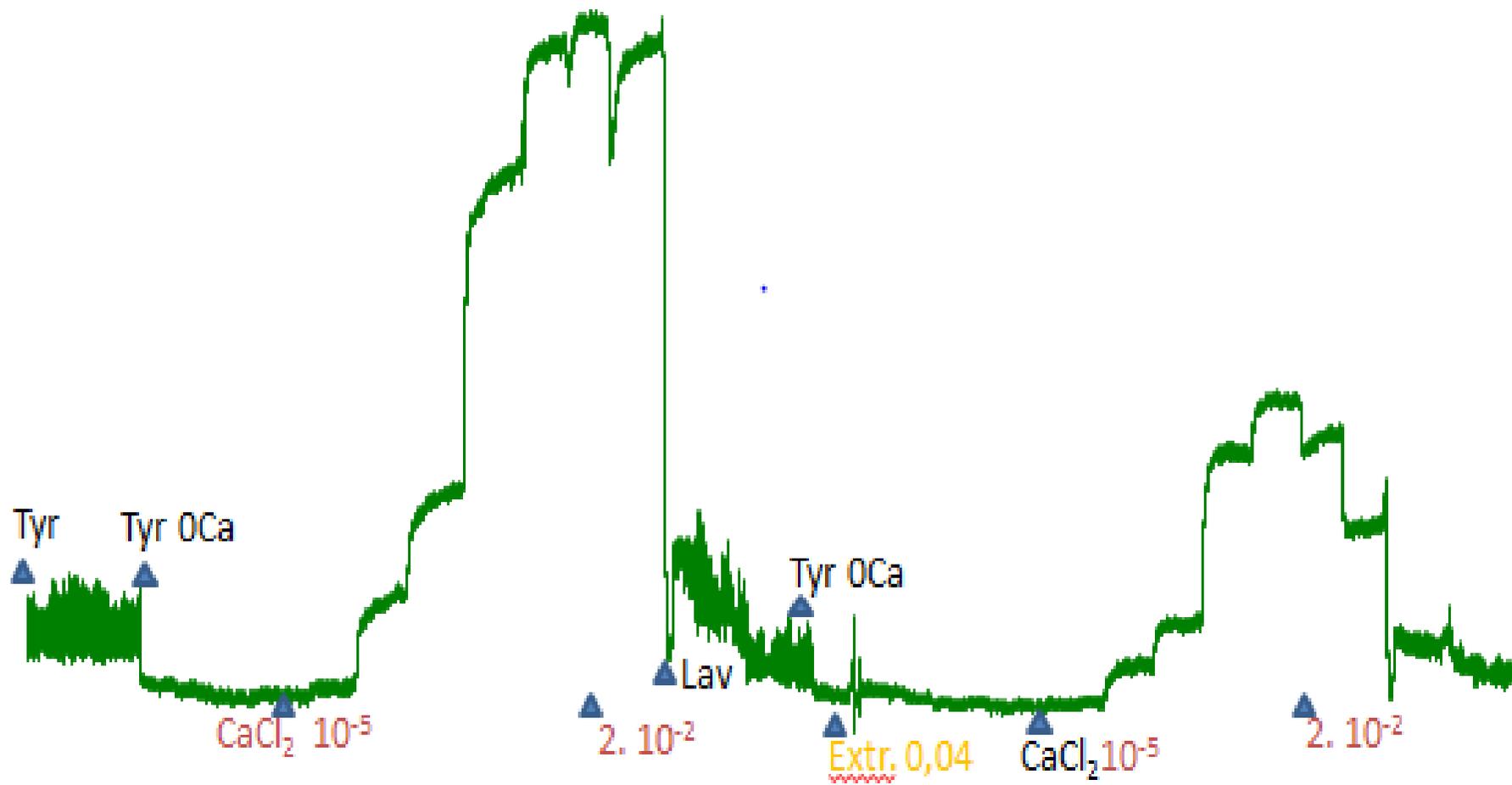


Figure 43b: Tracés originaux montrant les contractions du duodénum de rat induites par le CaCl_2 en absence et en présence de l'extrait aqueux de *P. manni*.

III.1.4-Activité antidiarrhéique de l'extrait

III.1.4.1 -Effets de l'extrait sur l'élimination des fèces chez la souris

Le [tableau XVII](#) résume les effets de l'extrait aqueux des écorces de *Pittosporum mannii* sur l'élimination normale des fèces chez la souris. Il en ressort que pendant la période d'observation, les souris témoins ont régulièrement rejeté les fèces à une fréquence décroissante avec le temps (3,83±0,72 selles à la première heure et 1,11±0,31 selle à la 4^e heure). L'administration préalable de l'extrait aqueux de *P. mannii* aux doses de 60, 120, 240, 480 et 720 mg/kg aux animaux, a inhibé de manière non significative l'élimination normale des fèces. Par rapport aux souris contrôles ayant reçu de l'eau distillée, il a été observé une diminution non significative du nombre de fèces excrétées chez les animaux traités à l'extrait, pendant la première heure. L'extrait a provoqué une diminution significative ($p < 0,01$) de la masse des fèces excrétées aux doses de 60, 480 et 720 mg/kg. De 149,13±25,79 g chez les témoins, la masse des fèces excrétées pendant la durée d'observation était de 78,05±17,96; 96,00±13,00 et 75,20±13,59 g en présence de l'extrait aux doses respectives de 60, 480 et 720 mg/kg, soit une inhibition respective de 47,66, 35,63 et 49,57 %. Le lopéramide à la dose de 10 mg/kg, a réduit de manière significative ($p < 0,001$) à la fois le nombre et la masse des fèces excrétées pendant la durée d'observation, avec une inhibition respective de 85,96% à la 3^e heure et de 73,90% à la 4^e heure.

Tableau XVII: Effets de l'extrait aqueux de *Pittosporum mannii* sur la défécation normale chez la souris.

	Nombre de fèces				Masse de fèces (g)	Masse/masse corporelle
	1 h	2 h	3 h	4 h	4 h	4 h
Témoins (H ₂ O)	3,83±0,72	2,44±0,64	1,78±0,41	1,11±0,31	149,13±25,79	5,37±0,84
Extr. 60 mg/kg	2,07±0,60	2,60±0,63	2,33±0,61	1,87±0,60	78,05±17,96**	2,88±0,71**
Extr. 120 mg/kg	2,87±0,83	2,20±0,46	2,75±0,69	1,31±0,45	120,49±14,17	4,99±0,72
Extr. 240 mg/kg	2,56±0,55	2,76±0,48	2,29±0,51	1,71±0,60	119,89±22,29	4,46±0,75
Extr. 480 mg/kg	2,29±0,56	1,88±0,62	1,06±0,45	1,35±0,37	96,00±13,00**	3,69±0,52**
Extr. 720 mg/kg	2,27±0,64	1,88±0,55	1,59±0,52	0,82±0,31	75,20±13,59**	2,98±0,52**
Lop. 10 mg/kg	1,40±0,29**	0,40±0,20**	0,25±0,20**	0,55±0,25	38,93±15,84***	1,41±0,51***

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM du nombre ou de la masse de fèces, $5 < n < 20$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforronni. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, différence significative par rapport au témoin.

III.1.4.2-Effets de l'extrait sur le transit intestinal chez la souris

Les tests du transit intestinal effectués chez la souris ont donné les résultats consignés dans le [tableau XVIII](#). Ces résultats montrent que chez les souris normales préalablement

soumises à un jeûne de 18 heures, la propulsion intestinale de la suspension de charbon est d'environ 76,21% en 30 minutes. Cette propulsion est passée à environ 84,95% après stimulation avec de l'huile de ricin. Le traitement préalable des souris avec l'extrait aqueux de *P. mannii* aux doses de 60, 120, 240, 480 ou 720 mg/kg, n'a pas modifié de manière significative la propulsion intestinale de la suspension de charbon chez ces animaux normaux. L'extrait aux doses de 480 et 720 mg/kg a freiné de manière significative ($p < 0,01$) et dose-dépendante la propulsion intestinale stimulée avec l'huile de ricin chez les souris. La propulsion de $84,95 \pm 4,93\%$ chez les témoins est passée à $61,60 \pm 2,45\%$ et $60,96 \pm 4,46\%$ chez les souris traitées avec l'extrait aux doses respectives de 480 et 720 mg/kg, soit une inhibition de 27,49% et de 28,24%, respectivement. Le lopéramide à la dose de 10 mg/kg, a provoqué une diminution significative ($p < 0,001$) de la vitesse de transit chez la souris contrôles (45,66%) et après stimulation avec l'huile de ricin (39,15%).

Tableau XVIII: Effets de l'extrait aqueux de *P. mannii* sur le transit intestinal chez la souris

	Normal			Huile de ricin		
	Longueur totale	Propulsion (%)	Inhibition (%)	Longueur totale	Propulsion (%)	Inhibition (%)
Témoins (H ₂ O)	33,61±0,60	76,21±3,47		27,50±0,87	84,95±4,93	
Extr. 60 mg/kg	29,86±1,02	70,58±3,58	7,39	–	–	–
Extr. 120 mg/kg	31,44±1,15	76,26±4,19	-0,07	27,86±1,60	68,78±4,37	19,03
Extr. 240 mg/kg	31,29±1,20	69,27±2,68	9,10	28,56±2,06	68,81±3,92	19,01
Extr. 480 mg/kg	31,91±1,15	63,98±3,84	16,05	29,31±1,67	61,60±2,45**	27,49
Extr. 720 mg/kg	34,08±1,94	68,61±1,49	9,98	33,50±1,04	60,96±4,46**	28,25
Lop. 10 mg/kg	31,65±1,31	41,42±2,40***	45,66	32,83±1,01	51,69±5,08***	39,15

Les valeurs représentent la moyenne ± ESM, 12<n<18. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA One-way suivi du post test de Newman-Keuls. ** P < 0.01, *** P < 0.001, différence significative par rapport au témoin.

III.1.4.3-Effets de l'extrait sur les diarrhées induites avec l'huile de ricin chez le rat

La [figure 44](#) illustre les effets de l'extrait aqueux des écorces de *Pittosporum mannii* sur la diarrhée induite avec l'huile de ricin chez le rat. L'huile de ricin administrée à un volume de 0,6 mL/rat a provoqué une diarrhée aiguë caractérisée par l'émission fréquente des selles pâteuses ou liquides d'aspect jaunâtre. L'émission des selles diarrhéiques survient environ $52,00 \pm 4,24$ min après le gavage avec l'huile de ricin ([Figure 44a](#)). Les animaux atteints de diarrhée montraient des signes de fatigue et reprenaient leur activité normale au bout d'environ 3,00 heures après l'arrêt de la diarrhée.

L'administration de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* aux rats une heure avant administration de l'huile de ricin a inhibé significativement ($p < 0,001$) la diarrhée de manière

dose-dépendante. L'extrait aux doses de 120, 240, 480 et 720 mg/kg, non seulement a retardé le temps de déclenchement de la diarrhée (Figure 44a), mais a aussi réduit le nombre et la masse des fèces diarrhéiques excrétées par les animaux (Figure 44b et c). Aux doses de 480 et 720 mg/kg, l'extrait a presque protégé les animaux contre la diarrhée induite par l'huile de ricin. Par rapport aux animaux témoins, les fèces diarrhéiques sont apparues tardivement chez les animaux traités avec des doses d'extrait de 120, 240, 480 et 720 mg/kg. À la troisième heure, le nombre cumulé de défécations diarrhéiques excrétées par les animaux était de $5,71 \pm 0,44$ chez les témoins, contre $1,71 \pm 0,64$; $1,40 \pm 0,78$; $0,11 \pm 0,11$ et $1,00 \pm 0,63$ chez les animaux traités avec l'extrait aux doses respectives de 120, 240, 480 et 720 mg/kg. La masse des fèces a également diminué et est passée de $2,84 \pm 0,30$ g chez le témoin à $1,18 \pm 0,43$; $0,96 \pm 0,57$; $0,22 \pm 0,22$ et $0,47 \pm 0,31$ g chez les rats traités à l'extrait respectivement aux doses de 120, 240, 480 et 720 mg/kg.

Le loperamide à la dose de 5 mg/kg a complètement bloqué l'apparition de la diarrhée pendant la période d'observation (pas de fèces diarrhéiques au bout des 4 heures (240 min)). L'administration concomitante du naloxone (0,5 mg/kg) et de l'extrait à 480 mg/kg aux animaux a bloqué partiellement et de manière significative l'activité antidiarrhéique de l'extrait (Figure 44a et d). Par rapport aux animaux traités avec l'extrait seul, le temps de déclenchement de la diarrhée a significativement ($p < 0,01$) diminué chez ceux ayant reçu le naloxone plus l'extrait (229,78 vs. 86,00 min). De même le nombre et la masse des fèces excrétées étaient significativement plus élevés chez ces animaux (respectivement $0,11 \pm 0,11$ vs. $4,40 \pm 0,70$ et $0,22 \pm 0,22$ g vs. $1,96 \pm 0,82$ g, à 3 heures respectivement avec l'extrait à 480 mg/kg seul et en présence de naloxone). A cette dose, le naloxone (0,5 mg/kg) a également levé faiblement l'activité antidiarrhéique du loperamide ($0,00 \pm 0,00$ vs. $1,40 \pm 0,87$ et $0,00 \pm 0,00$ g vs. $0,67 \pm 0,42$ g, respectivement le nombre et la masse des fèces après 3 heures).

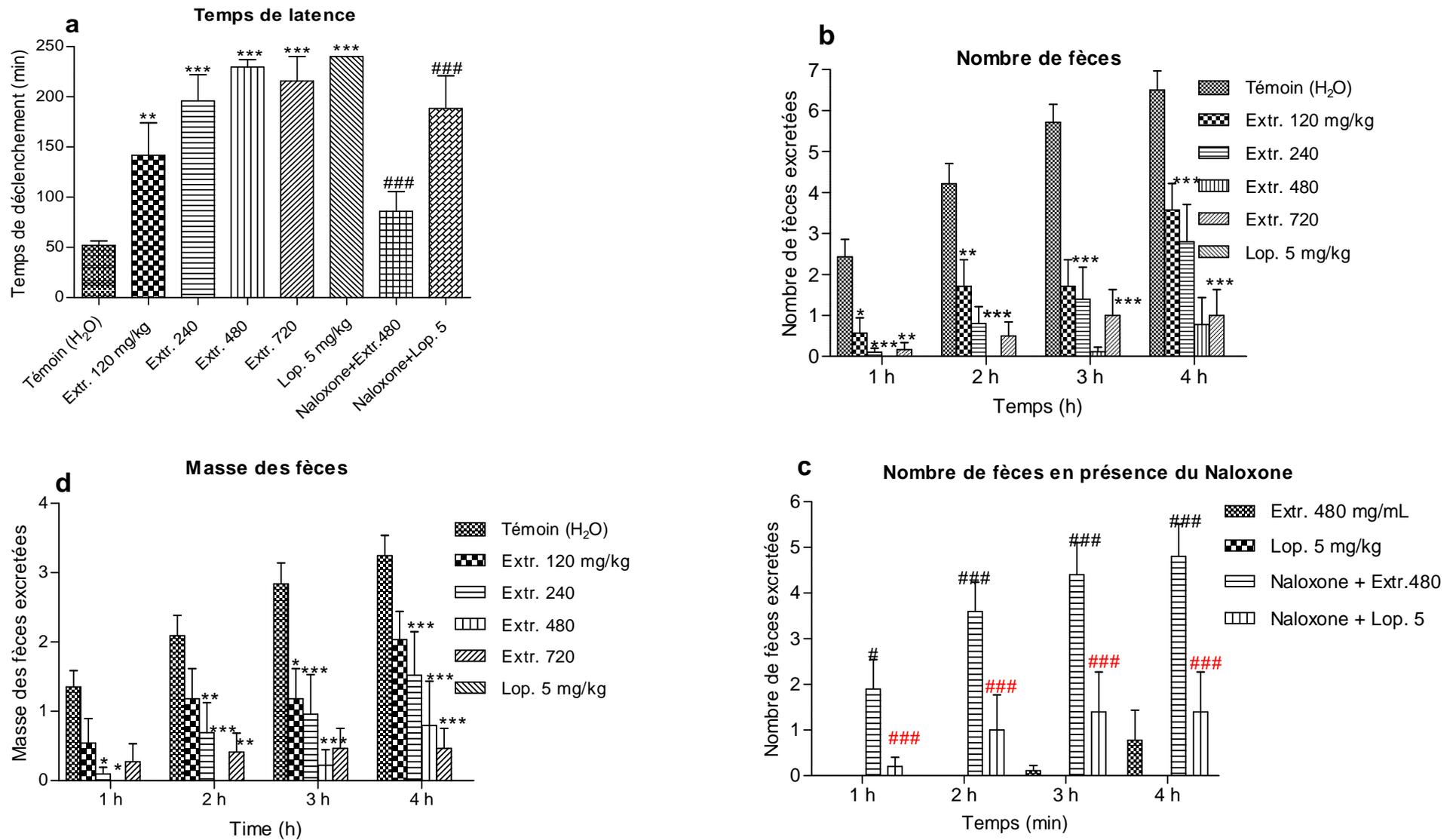


Figure 44: Effets de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* sur les diarrhées induites avec l'huile de ricin chez le rat

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM du temps de latence (a), du nombre de fèces (b, c) ou de la masse de fèces (d), $5 < n < 20$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA One-way suivi du post test de Newman-Keuls (pour le temps de déclenchement) et ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforronni (pour le nombre et la masse des fèces). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, différence significative par rapport au témoin. # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, différence significative en comparaison des lots traités au naloxone aux lots Extr. 480 mg/mL ou Lop. 5 mg/kg.

III.1.5-Activité antimicrobienne de l'extrait

Le test d'activité antimicrobienne *in vitro* a donné les résultats consignés dans le [tableau XIX](#). Les souches bactériennes et fongiques ont montré chacune une croissance normale sur leur milieu de culture spécifique. L'adjonction de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* aux concentrations échelonnées de 1,25 à 20 mg/mL dans le milieu de culture a inhibé de manière sensible la croissance de *Escherichia coli* entéropathogène, *Salmonella typhi* et *Shigella dysenteriae* et *Candida albicans*. Sur *E. coli*, le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne de 8,17±0,44 mm à la concentration de 1,25 mg/mL, est passé à 15,60±0,68 mm à la concentration d'extrait de 20 mg/mL. La gentamicine (10 µg/disque) et la ciprofloxacine (5 µg/disque) ont induit respectivement un diamètre d'inhibition de 19,67±0,33 mm et de 28,67±0,88 mm. Sur *Salmonella typhi*, l'extrait aux concentrations de 1,25 et 2,5 mg/mL a induit un diamètre d'inhibition de la croissance de 13,33±0,33 mm et de 11,67±0,33 respectivement. Les concentrations élevées (5-20 mg/mL) n'ont pas montré une activité sur cette souche bactérienne. La gentamicine et la ciprofloxacine ont induit respectivement un diamètre d'inhibition de 17,67±0,33 mm et de 31,33±0,67 mm. Sur *S. dysenteriae*, le diamètre d'inhibition de la croissance était de 9,65±0,74 mm à la concentration de 15 mg/mL. A toutes les concentrations testées (1,25-15 mg/mL), l'extrait a induit une inhibition de la croissance de *Candida albicans*. Le diamètre d'inhibition de la croissance fongique de 12,17±0,17 mm à la concentration de 1,25 mg/mL est passé 17,33±0,33 mg/mL à la concentration d'extrait de 15 mg/mL. La nystatine (50 µg/mLdisque), médicament antifongique de première intention, a induit un diamètre d'inhibition de la croissance de 14,17±0,44 mm.

Tableau XIX: Effets de l'extrait aqueux de *P. mannii* sur la croissance des souches de microbes

	Concentration	EPEC*	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Candida albicans</i>
Extrait	1,25 mg/mL	8,17±0,44	13,33±0,33	00,00±0,00	00,00±0,00	12,17±0,17
	2,5 mg/mL	11,67±0,33	11,67±0,33	00,00±0,00	00,00±0,00	12,33±0,67
	5 mg/mL	11,75±0,92	6,33±0,33	00,00±0,00	6,85±0,66	10,33±0,33
	10 mg/mL	10,00±0,37	6,33±0,33	00,00±0,00	8,78±0,44	17,33±0,33
	15 mg/mL	15,00±0,37	6,67±0,33	00,00±0,00	9,65±0,74	17,33±0,33
	20 mg/mL	15,60±0,68	–	00,00±0,00	9,96±0,97	12,17±0,17
Ciprofloxacine	5 µg/disc	28,67±0,88	31,33±0,67	–	–	–
Gentamicine	10 µg/disc	19,67±0,33	17,67±0,33	–	–	–
Nystatine	50 µg/mL	–	–	–	–	14,17±0,44

* *Escherichia coli* entéropathogène

Les valeurs représentent les moyennes ± ESM des diamètres d'inhibition (en mm) de la croissance des souches microbiennes (bactéries ou champignon) par l'extrait ou les médicaments de référence (ciprofloxacine, gentamicine ou nystatine), n=3.

III.1.6 -Toxicité de l'extrait aqueux des écorces de *Pittosporum mannii* chez le rat

III.1.6.1-Toxicité aiguë

L'administration de l'extrait aqueux des écorces de *Pittosporum mannii* à une dose unique de 2000 mg/kg ou 5000 mg/kg de poids corporel n'a pas provoqué de mortalité chez les rats femelles pendant les deux semaines d'observation. Aucun signe externe visible de toxicité n'a été observé au niveau du comportement des animaux pendant la période d'observation. Immédiatement après le gavage, la mobilité des animaux était quelque peu réduite et ils avaient tendance à s'isoler, leur sensibilité était aussi réduite et la respiration légèrement accélérée. Une heure après administration d'une dose unique de l'extrait, les animaux ont retrouvé une activité et une sensibilité normales. Les résultats de la toxicité aiguë ont montré que la dose létale 50 (DL₅₀) de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* en administration orale unique était supérieure à 5000 mg/kg.

III.1.6.2-Toxicité subaiguë

III.1.6.2.1-Effets de l'extrait de *P. mannii* sur l'évolution pondérale et la consommation hydrique des rats

La [figure 45](#) illustre l'évolution du poids corporel des rats femelles (A) et mâles (B) au cours des 4 semaines (28 jours) de traitement à l'extrait aqueux de *P. mannii* à différentes doses. Il en ressort que l'administration quotidienne de l'extrait aqueux de *P. mannii* aux doses uniques de 120, 240 et 480 mg/kg pendant 4 semaines (28 jours) n'a pas affecté de manière significative la croissance des rats mâles et des rats femelles par rapport aux animaux contrôles. Chez les femelles, on a observé une légère perte de poids corporel pendant les 2 premiers jours du traitement à toutes les doses d'extrait, puis une augmentation régulière du poids corporel jusqu'à la fin du traitement. Chez les mâles, le poids corporel a augmenté régulièrement du début à la fin du traitement dans les différents lots traités à l'extrait et les contrôles. A la fin des 4 semaines de traitement, les animaux satellites gardés en observation pendant deux semaines supplémentaires pour l'appréciation de la réversibilité des signes de toxicité, ont montré une évolution normale du poids corporel pendant la période d'observation.

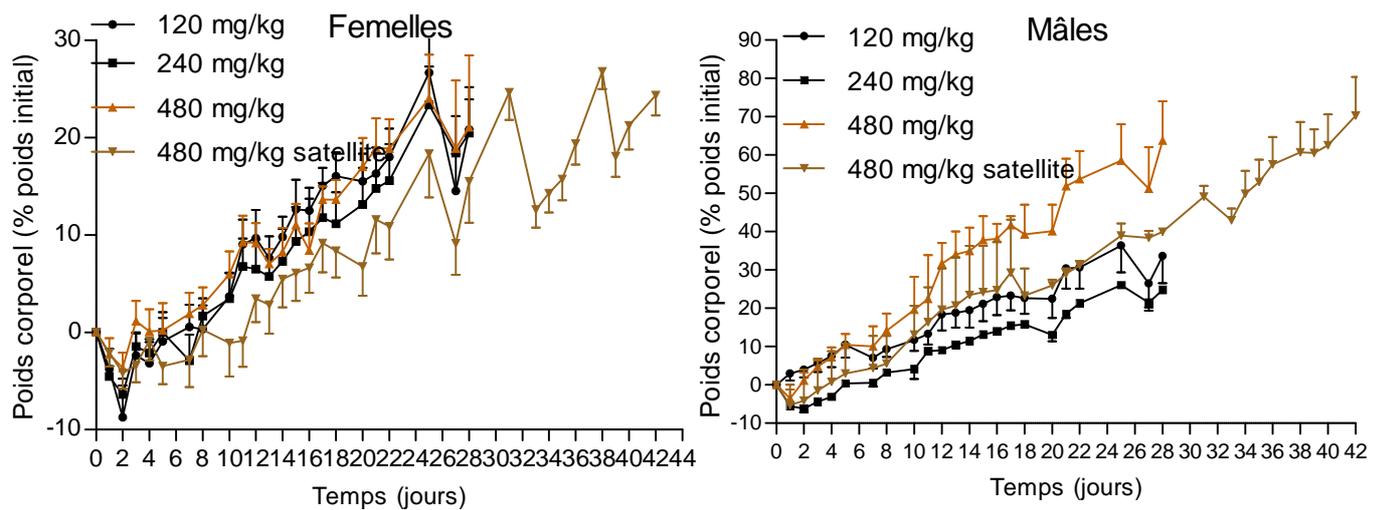


Figure 45: Evolution du poids corporel des rats femelles (A) et mâles (B) au cours des 4 semaines (28 jours) de traitement à l'extrait aqueux de *Pittosporum mannii*.

Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM, $4 < n < 5$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforonni. Pas de différence significative par rapport aux contrôles.

La [figure 46](#) illustre l'évolution de la consommation d'eau par les rats femelles (A) et mâles (B) au cours des 4 semaines (28 jours) de traitement à l'extrait aqueux de *P. mannii*. Il en ressort que comparativement aux animaux contrôles, l'administration en dose unique quotidienne de l'extrait aqueux de *P. mannii* aux doses respectives de 120, 240 et 480 mg/kg pendant 28 jours n'a pas affecté de manière significative la consommation d'eau par les rats.

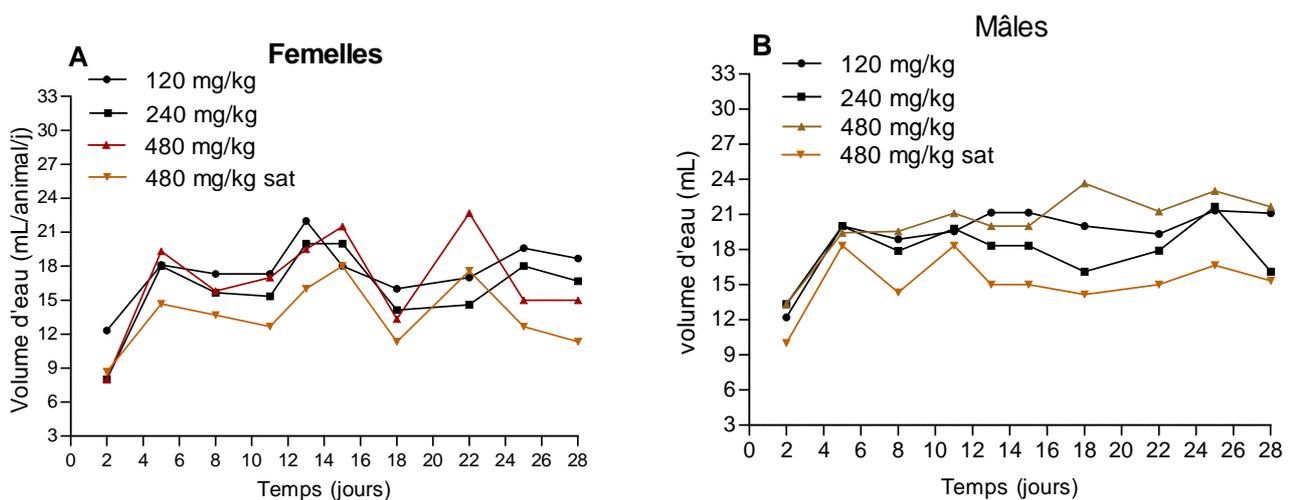


Figure 46: Evolution de la consommation hydrique des rats femelles (A) et mâles (B) au cours des 4 semaines (28 jours) de traitement à l'extrait aqueux de *P. mannii*.

Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM, $4 < n < 5$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforonni. Pas de différence significative par rapport au contrôle.

III.1.6.2.2-Effets de l'extrait aqueux de *P. mannii* sur le poids relatif de quelques organes

La figure 47 présente le poids de certains organes (foie, reins et rate) rapporté au poids corporel des rats au terme de 28 jours de traitement avec l'extrait aqueux de *P. mannii*. L'administration quotidienne pendant 28 jours de l'extrait aux doses uniques de 120, 240 et 480 mg/kg n'a pas entraîné de variation significative du poids relatif des reins et de la rate chez les animaux. Par rapport aux animaux témoins traités avec l'eau distillée, on a noté une augmentation significative du poids relatif du foie chez les femelles à toutes les doses de l'extrait aqueux de *P. mannii* et chez les mâles uniquement à la dose de 480 mg/kg.

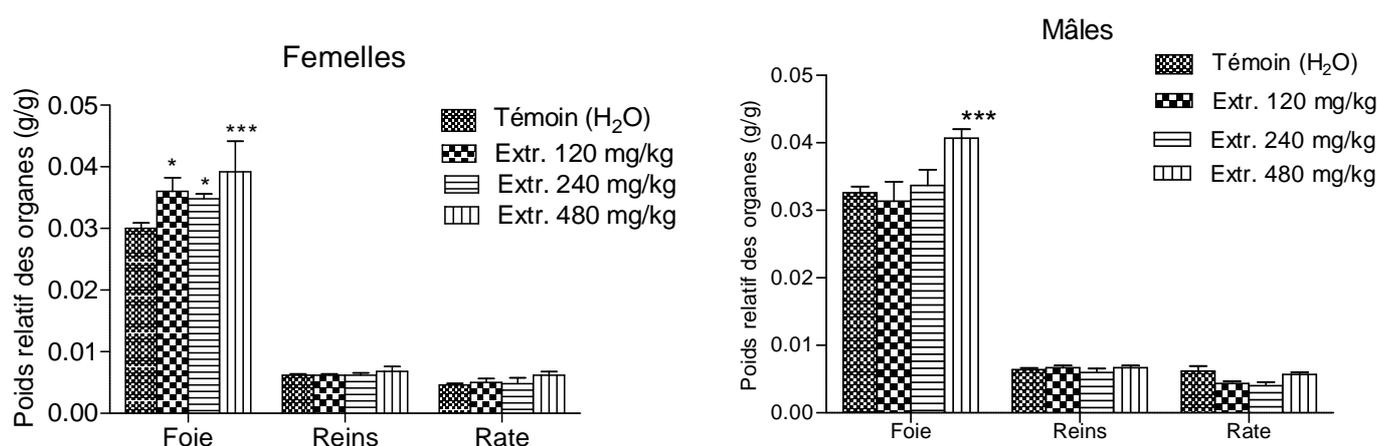


Figure 47: Effets de l'extrait aqueux de *P. mannii* sur le poids relatif de quelques organes chez les rats femelles et mâles au terme de 28 jours de traitement

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM du poids relatif des organes, $4 < n < 5$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforonni. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, différence significative par rapport au témoin.

III.1.6.2.3-Effets de l'extrait sur les paramètres hématologiques

Les valeurs des paramètres hématologiques des rats femelles et mâles traités pendant 4 semaines avec l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* sont consignées dans le tableau XX. Les résultats montrent que par rapport aux témoins, l'administration quotidienne pendant 28 jours de l'extrait aqueux de *P. mannii* a entraîné une diminution significative du taux de l'hématocrite (HCT), du volume corpusculaire moyen (MCV) et de la teneur en hémoglobine (HGB) chez les rats femelles et les mâles à toutes les doses de l'extrait. Chez les femelles, le taux d'hématocrite de $35,8 \pm 0,1\%$ chez les témoins était plutôt de $29,0 \pm 1,4\%$, $27,3 \pm 0,1\%$ et $28,4 \pm 2,0\%$ en présence de l'extrait aux doses respectives de 120, 240 et 480 mg/kg. Chez les mâles, il est passé de $41,3 \pm 0,6\%$ chez les témoins à $29,05 \pm 0,6$, $32,9 \pm 1,4$ et $31,0 \pm 2,2\%$ chez les animaux traités aux mêmes doses de l'extrait. Le volume corpusculaire moyen (MCV) de $56 \pm 0,0$ fL chez les témoins est passé à $44 \pm 1,0$ fL chez les femelles traitées avec l'extrait à la dose de 120 mg/kg. Chez les mâles, il est passé de $54,5 \pm 5$ fL chez les témoins à $45,0 \pm 2,0$ fL chez les animaux traités à l'extrait à la dose de 480

mg/kg. Le taux d'hémoglobine a diminué chez les femelles de 13,25±0,25 g/dL chez les témoins à 10,85±0,2 g/dL chez les animaux traités à l'extrait à la dose de 480 mg/kg. L'extrait a entraîné plutôt une augmentation significative ($p < 0,01$) de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (MCHC) chez les mâles à toutes les doses de l'extrait. De 33,75±0,6 g/dL chez les témoins, la MCHC est passée à 42,25±0,6; 39,1±1,0 et 41,1±0,8 g/dL respectivement en présence de l'extrait à 120, 240 et 480 mg/kg.

Tableau XX: Paramètres hématologiques des rats femelles et mâles au bout de quatre semaines de traitement avec l'extrait aqueux de *P. manni*.

	WBC (10 ³ /μL)	LYMP (10 ³ /μL)	MID (10 ³ /μL)	GRA (10 ³ /μL)	RBC (10 ⁶ /μL)	HCT* (%)	MCV** (fL)	RDW (%)	MCHT (pg)	MCHC* (g/dL)	HGB* (g/dL)	RDW-SD (fL)**	PLT (10 ³ /μL)	MPV (fL)	PCT (%)	PDW (%)
Femelles																
Témoins	11,5±0,1	8,09±0,01	2,09±0,01	1,66±0,01	6,45±0,05	35,8±0,1	55,5±0,5	19,6±0,1	21,15±0,05	37,85±0,05	13,25±0,25	27,5±0,5	281,5±0,5	7,15±0,05	0,200±0,00	49,5±0,5
120 mg/ml	11,3±0,2	8,16±0,01	1,88±0,06	1,26±0,12	6,61±0,49	29,0±1,4*	44±1,0***	20,1±1,1	18,85±1,2	42,9±1,5	12,45±0,1*	24±0,0**	406,5±79	7,1±0,2	0,292±0,0	46,7±3,3
240 mg/ml	12,0±3,3	9,17±2,61	1,80±0,44	1,04±0,24	5,88±0,13	27,3±0,1*	46±1,0***	20,45±1,1	19,45±1,1	41,95±1,2	11,45±0,4**	25±0,0**	427,5±24	6,65±0,2	0,286±0,0	45,7±3,5
480 mg/ml	14,1±6,6	11,00±5,39	2,07±0,80	1,07±0,43	6,31±0,43	28,4±2,0*	45±0,0***	19,55±0,4	17,15±1,0	38,2±2,1	10,85±0,2**	24,5±0,5**	484,5±5,5	6,95±0,0	0,337±0,0	49,3±1,0
Mâles																
Témoins	11,0±1,3	7,75±0,28	2,23±0,60	1,02±0,4	7,51±0,21	41,3±0,6	54,5±0,5	19,4±0,7	18,4±0,5	33,75±0,6	13,9±0,1	27±1,0	458±92	7,55±0,00	0,346±0,0	46,2±2,1
120 mg/ml	14,3±6,3	9,25±3,75	2,77±1,40	2,30±1,2	6,46±0,10	29,05±0,6*	45,0±0,0*	21,0±0,6	19,0±0,2	42,25±0,6**	12,25±0,1	25±0,0	398,5±15,5	6,95±0,0	0,278±0,0	51,15±0,4
240 mg/ml	15,9±3,1	11,54±2,08	2,64±0,50	1,71±0,5	7,30±0,09	32,9±1,4*	45,5±1,5**	20,3±0,9	17,7±1,1	39,1±1,0**	12,9±0,9	25,5±0,5	381±11,0	7,15±0,3	0,273±0,0	47,35±3,2
480 mg/ml	9,3±0,7	5,91±0,45	1,71±0,28	1,51±0,1	6,87±0,17	31,0±2,2*	45,0±2,0*	21,7±0,1	18,5±1,2	41,1±0,8**	12,75±1,2	26±0,0	365,5±15,5	7,4±0,5	0,272±0,0	49,6±0,6

Les valeurs sont les moyennes ± ESM des paramètres hématologiques des rats, n=3. WBC: globules blancs totaux, LYMP: lymphocytes, MID: monocytes, GRA: granulocytes, RBC: globules rouges, HCT: hématocrite, MCV: volume corpusculaire moyen, RDW: indice de répartition des globules rouges, MCHT: teneur moyenne d'un globule rouge en hémoglobine, MCHC: concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, HGB: hémoglobine, RDW-SD: déviation standard de l'indice de répartition des globules rouges, PLT: plaquettes, MPV: volume plaquettaire moyen, PCT: procalcitonine, PDW: indice de répartition plaquettaire. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA One-way suivi du post test de Newman-Keuls. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.01, différence significative par rapport au témoin.

III.1.6.2.4-Effets de l'extrait sur quelques paramètres biochimiques

III.1.6.2.4.1 -Effets sur les taux des protéines et de nitrites tissulaires et sériques

La figure 48 représente les effets de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* sur les taux de protéines et de nitrites des rats femelles et mâles à la fin du traitement subaigu. Il ressort de l'analyse de la figure que chez les rats des deux sexes traités à l'extrait, la teneur en protéines dans le sérum a diminué de manière significative ($p < 0,05$) aux doses de 240 et 480 mg/kg. Chez les femelles, la quantité de protéines sériques était de $5,11 \pm 0,18$ mg/mL chez les témoins contre $3,73 \pm 0,18$ et $3,67 \pm 0,60$ mg/mL respectivement en présence de l'extrait à 240 et 480 mg/kg; soit une baisse respective de 27% et 28%. Chez les mâles, elle est passée de $5,11 \pm 0,18$ mg/mL chez les témoins à $3,73 \pm 0,36$ et $3,65 \pm 0,80$ mg/mL respectivement en présence des mêmes doses de l'extrait; soit une baisse respective de 27% et 29%. Au niveau tissulaire, il n'a pas été observé de modification significative entre les taux de protéines des animaux témoins et ceux des animaux essais traités avec différentes doses de l'extrait, dans les différents organes examinés (foie, reins et rate).

Dans chaque sexe, par rapport aux témoins, cette étude ne montre pas de modifications significatives de la teneur en nitrites chez les animaux essais traités avec différentes doses d'extrait, dans les différents organes examinés. La teneur en nitrites était de même ordre chez les animaux témoins et les essais dans chaque organe examiné (intestin, foie, reins et rate).

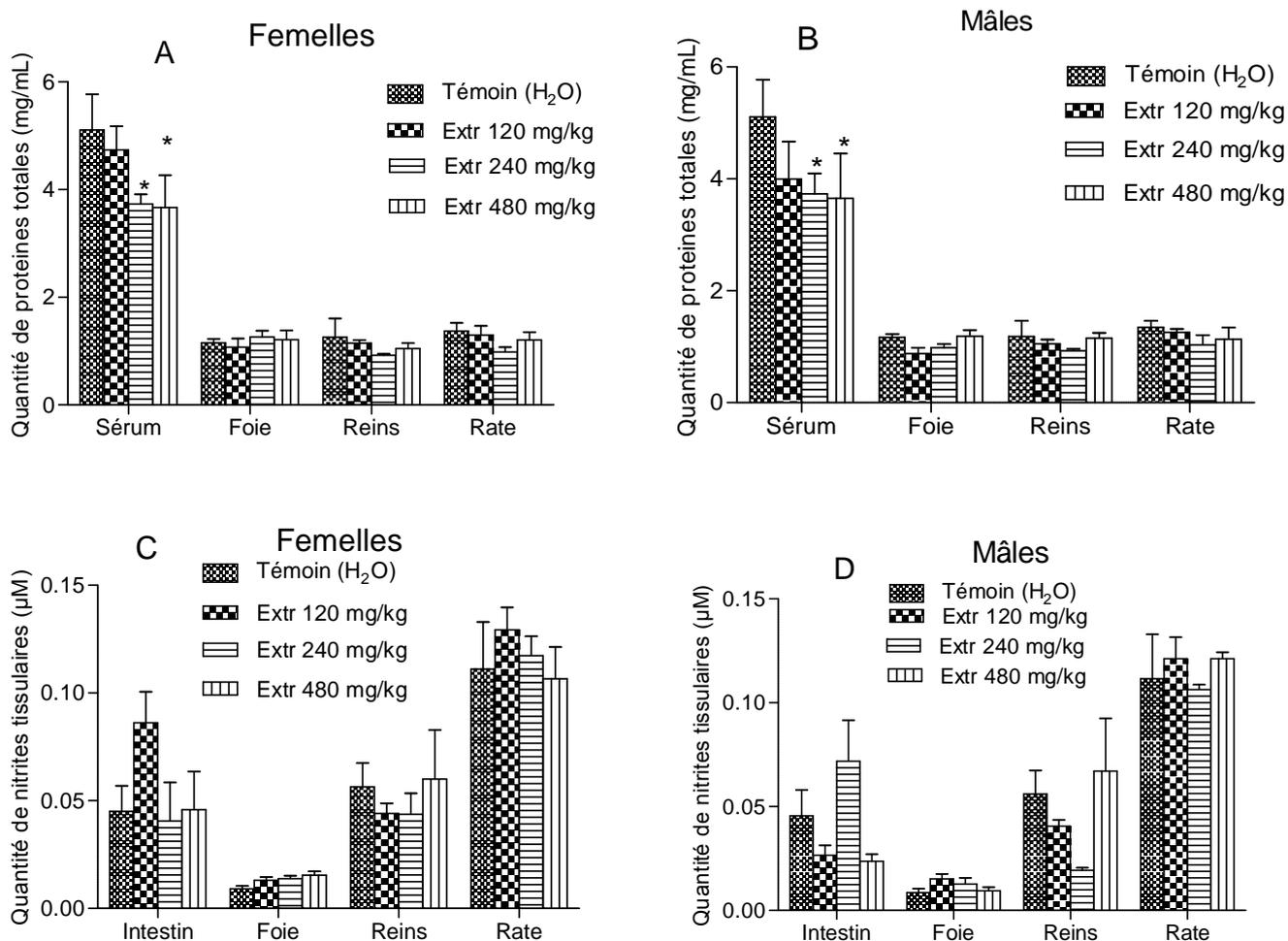


Figure 48: Quantité de protéines (A, B) et de nitrites (C, D) dans le sérum et les organes des rats au bout de 4 semaines de traitement à l'extrait aqueux de *P. mannii*.

Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM de la quantité de protéines ou de nitrites dans le sérum, le foie, les reins, la rate et l'intestin des rats, $4 < n < 5$. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforroni. * $P < 0.05$, différence significative par rapport au témoin.

III.1.6.2.4.2 -Effets sur les paramètres biochimiques sériques des fonctions hépatique et rénale

Les effets de l'extrait aqueux de *P. mannii* après une administration subaiguë sur les marqueurs biochimiques sériques des fonctions hépatique et rénale chez les rats sont récapitulés dans le [tableau XXI](#). Il en ressort que l'activité des transaminases (ALAT et ASAT) a diminué chez les animaux traités avec l'extrait aux doses de 120, 240 et 480 mg/kg, aussi bien chez les femelles que les mâles. L'activité de l'ASAT aux doses d'extrait de 120, 240 et 480 mg/kg a diminué significativement ($p < 0,05$) chez les mâles, respectivement de 42,52%, 47,93% et 43,20% par rapport aux témoins. L'activité de la phosphatase alcaline (PAL) a augmenté significativement ($p < 0,05$) chez les femelles traitées avec l'extrait aux doses de 120, 240 et 480 mg/kg, respectivement de 34,01%, 39,59% et 39,78% par rapport

aux témoins. Les taux sériques de créatinine et de bilirubine n'ont pas varié de façon significative chez les animaux traités avec différentes doses de l'extrait, par rapport aux témoins recevant de l'eau distillée.

Tableau XXI: Effets de l'extrait aqueux de *P. mannii* sur les paramètres biochimiques sériques des fonctions hépatique et rénale chez les rats au bout de 4 semaines de traitement.

	Témoins (H ₂ O)	Dose d'extrait aqueux de <i>P. mannii</i> administrée (mg/kg)		
	10 mL/kg	120	240	480
Femelles				
ALAT (U/L)	70,86±19,20	59,86±14,89	38,99±4,60	44,20±8,12
ASAT (U/L)	68,46±13,78	61,23±14,57	49,54±10,03	37,67±5,68
Phosphatase alcaline (U/L)	21,14±1,60	28,33±1,25*	29,51±0,87*	29,55±1,34*
Créatinine (mg/dL)	0,188±0,005	0,196±0,010	0,160±0,012	0,180±0,012
Bilirubine (mg/dL)	10,39±0,20	10,82±1,06	11,96±2,46	15,44±2,23
Mâles				
ALAT (U/L)	73,27±8,51	55,73±11,21	47,70±8,27	55,73±10,11
ASAT (U/L)	85,59±18,30	58,48±12,73*	52,98±4,18*	57,79±9,63*
Phosphatase alcaline (U/L)	20,87±2,30	25,31±1,57	26,43±3,25	25,62±1,89
Créatinine (mg/dL)	0,168±0,015	0,167±0,013	0,153±0,007	0,173±0,007
Bilirubine (mg/dL)	9,88±0,86	13,53±0,34	13,73±3,63	14,71±1,80

Les valeurs sont les moyennes ± ESM, 4<n<5. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforonni. * P < 0.05, différence significative par rapport au témoin.

III.1.6.2.4.3-Effets sur les marqueurs sériques du profil lipidique

Le [tableau XXII](#) résume les taux sériques des paramètres du profil lipidique chez les rats au bout de 4 semaines de traitement avec différentes doses de l'extrait aqueux de *Pittosporum mannii*. Le traitement des rats avec l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* aux doses uniques quotidiennes de 120, 240 et 480 mg/kg pendant 4 semaines n'a pas affecté significativement les taux sériques de cholestérol total, de HDL-cholestérol et de LDL-cholestérol. Par rapport aux rats témoins, on n'a noté aucune différence notable dans les taux sériques de cholestérol total, de HDL-cholestérol et de LDL-cholestérol chez les animaux traités à l'extrait, aussi bien chez les femelles que les mâles. Le taux de triglycérides a diminué chez les animaux traités avec l'extrait de plante, et de manière significative à la dose de 480 mg/kg chez les femelles et de 480 mg/kg chez les mâles. Cette réduction était de 53,46% et de 65,64% respectivement chez les femelles et les mâles traités à l'extrait à la dose de 480 mg/kg, par rapport aux témoins.

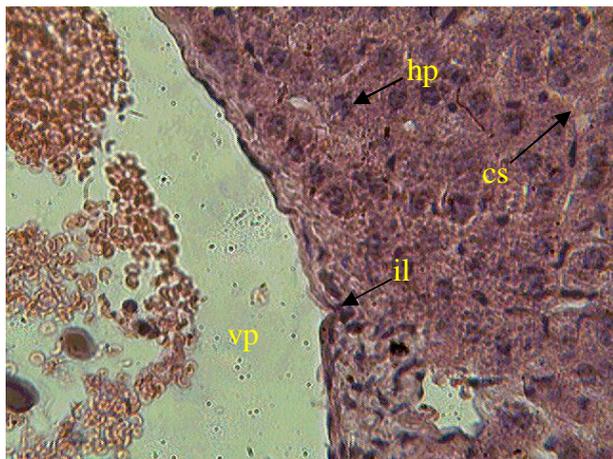
Tableau XXII: Effets de l'extrait aqueux de *P. manni* sur les paramètres sériques du profil lipidique chez les rats après quatre semaines de traitement.

	Témoins (H ₂ O)	Dose d'extrait aqueux de <i>P. manni</i> administrée (mg/kg)		
	10 mL/kg	120	240	480
Femelles				
Cholestérol total (mg/dL)	51,32±3,46	42,15±2,25	64,00±3,08	49,85±4,34
Cholestérol HDL (mg/dL)	7,23±0,77	9,86±0,87	9,09±2,13	7,81±1,07
Triglycérides (mg/dL)	51,40±3,35	40,00±7,15	45,44±10,65	23,95±5,53*
Cholestérol-LDL (mg/dL)	33,81±3,41	27,18±1,10	45,82±2,97	40,61±5,23
Index athérogène	6,36±0,76	3,27±0,36	6,67±1,34	5,68±0,95
Mâles				
Cholestérol total (mg/dL)	59,94±2,73	55,18±8,77	64,62±6,52	52,26±5,49
Cholestérol HDL (mg/dL)	8,89±1,86	10,05±1,15	9,36±1,59	7,63±0,63
Triglycérides (mg/dL)	54,19±1,24	40,97±11,94	39,85±5,85	18,62±3,55*
Cholestérol-LDL (mg/dL)	41,99±4,73	36,94±5,77	47,27±7,89	40,90±5,50
Index athérogène	6,84±2,03	4,50±0,89	6,59±2,01	5,82±0,15

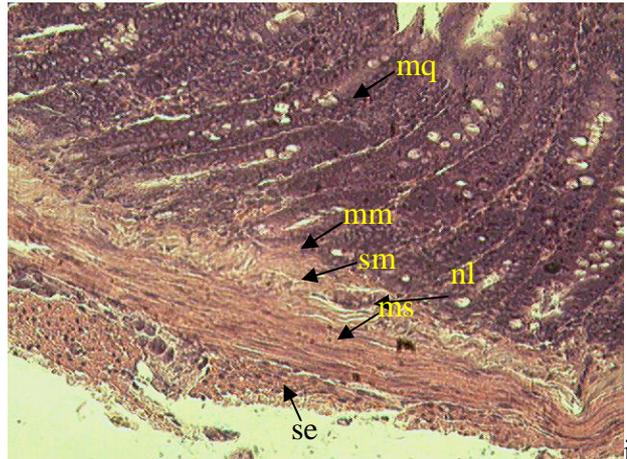
Les valeurs sont les moyennes ± ESM, 4<n<5. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA Two-way suivi du post test de Benfforonni. * P < 0.05, ** P < 0.01, différence significative par rapport au témoin.

III.1.6.2.5-Effets de l'extrait sur la structure de quelques organes de rats

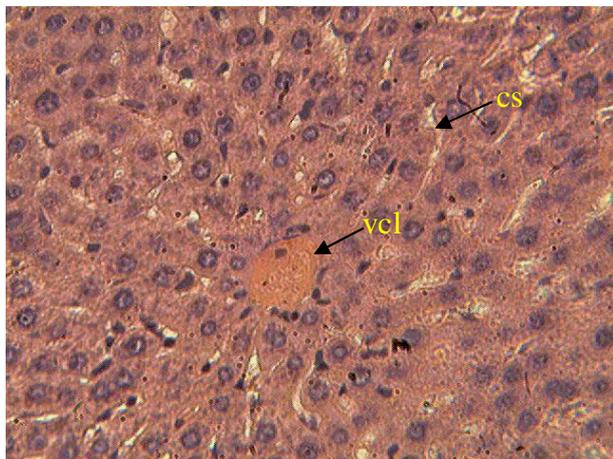
La [figure 49](#) présente les photographies des coupes histologiques des organes prélevés chez les rats après 4 semaines de traitement avec l'extrait aqueux de *P. manni*. L'analyse de ces coupes a révélé que chez la plupart des animaux témoins qui ont reçu de l'eau distillée pendant la durée du traitement, le foie, l'intestin, le rein et la rate avaient une structure quelque peu normale. On a noté néanmoins des légères infiltrations leucocytaires dans le foie chez quelques animaux témoins. L'administration de l'extrait aqueux de *P. manni* pendant 4 semaines aux animaux a entraîné quelques altérations tissulaires mineures. Chez quelques animaux traités avec l'extrait aux doses de 240 et 480 mg/kg, des infiltrations leucocytaires, une dilatation des capillaires et la congestion vasculaire ont été observées dans le foie, et un élargissement de la sous-muqueuse dans l'intestin ([Figure 49a](#)). Aux mêmes doses de l'extrait, on a également observé une infiltration leucocytaire et une expansion mésangiale dans les reins, et une dilatation de l'artère du nodule lymphatique et même l'hémorragie (ischémie tissulaire) dans la rate ([Figure 49b](#)).



f120F



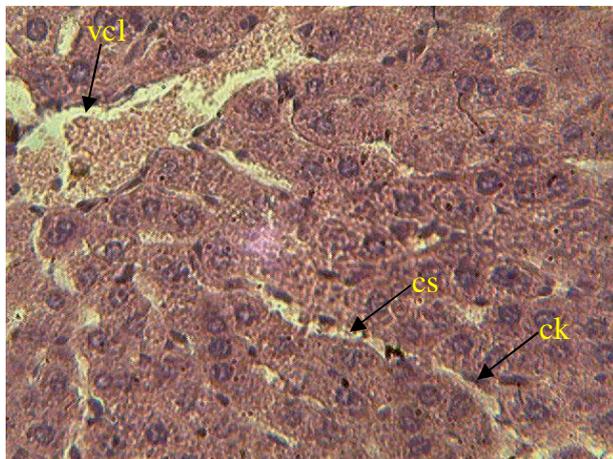
i120F



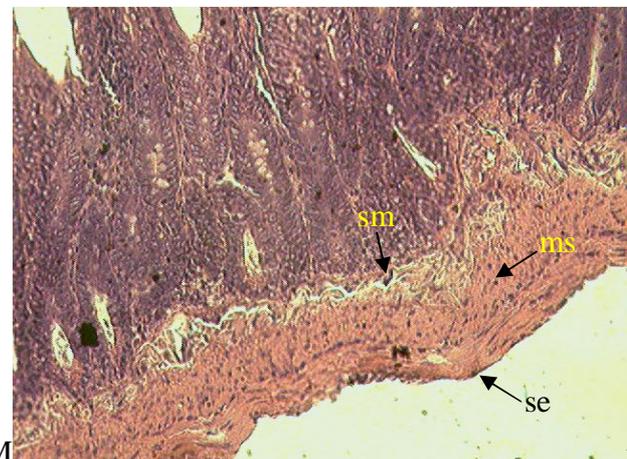
f120M



i480F



f480M

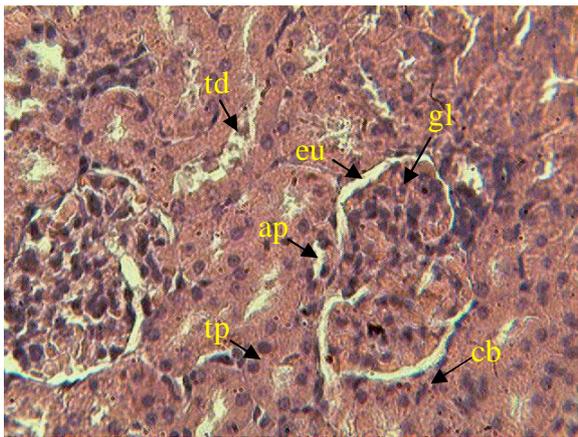


i480M

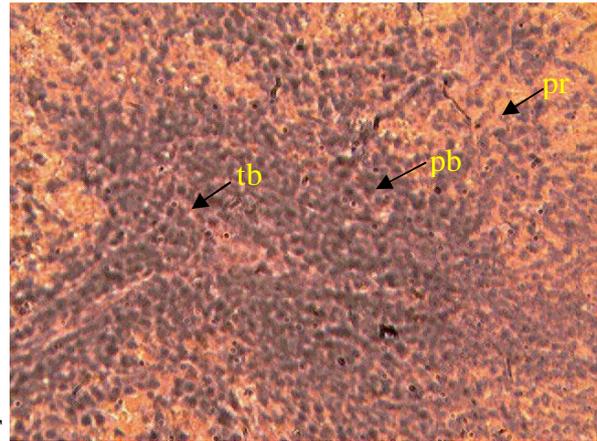
G : x 200

Figure 49a: Photographies du foie (f) et de l'intestin (i) montrant quelques altérations tissulaires observées chez les rats femelles (F) et mâles (M) après traitement subaiguë avec différentes doses de l'extrait aqueux de *P. mannii* (Coloration à l'hématoxyline-éosine).

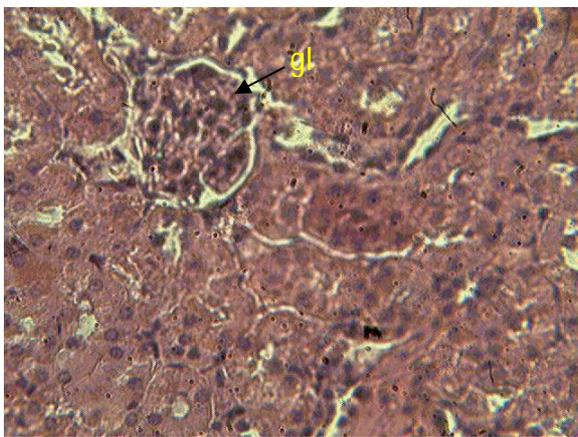
Ck: cellule de Küpfer, cs: capillaires sinusoides, hp: hépatocyte, il: infiltration leucocytaire, vcl: veine centro-lobulaire, vp: veine porte, vi: villosité, sm: sous-muqueuse, ms: musculuse, mq: muqueuse, mm: musculaire muqueuse, nl: nodule lymphoïde, se: séreuse.



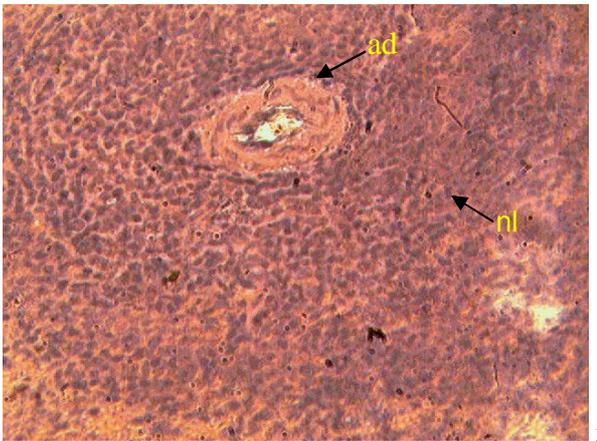
r120F



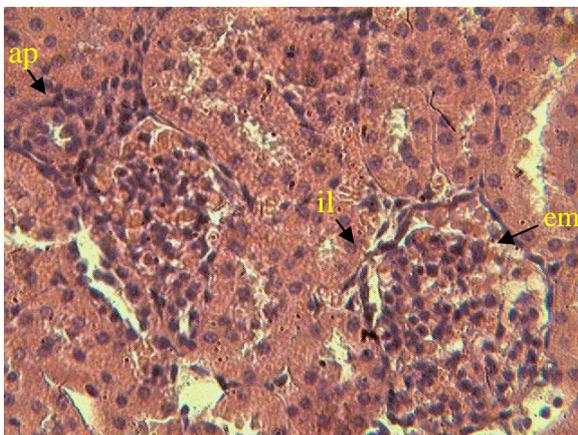
rt120F



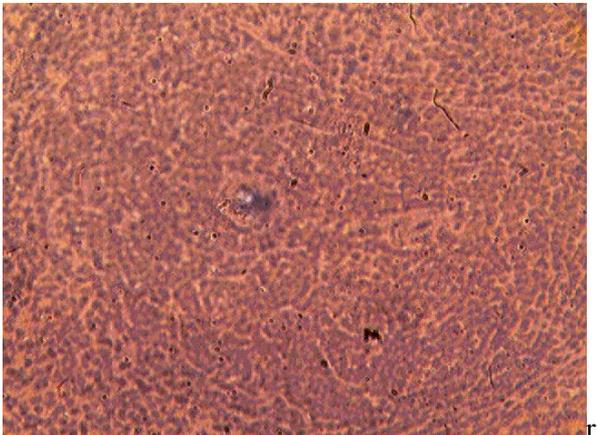
r240F



rt240F



r480F



rt480F

G : x 200

Figure 49b: Photographies du rein (r) et de la rate (rt) montrant quelques altérations tissulaires observées chez les rats femelles (F) et mâles (M) après traitement subaiguë avec différentes doses de l'extrait aqueux de *P. mannii* (Coloration à l'hématoxyline-éosine).

ad: artère du nodule lymphatique, ap: appareil juxtaglomerulaire, cb : capsule de Bowman, em: expansion mesangiale, eu: espace urinaire, gl: glomérule, il: infiltration leucocytaire, nl: nodule lymphatique, pb: pulpe blanche, pr: pulpe rouge, tb: travées trabéculaires, td: tube contourné distal, tp: tube contourné proximal.

III.2- DISCUSSION

La diarrhée est une affection gastro-intestinale courante, endémique dans beaucoup de régions du monde et avec des implications potentiellement mortelles (Damiki et Siva, 2011; Page *et al.*, 2011; Abdelrahim *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). La prise en charge de cette pathologie intègre très souvent des pratiques traditionnelles telles que l'utilisation empirique des préparations à base de plantes médicinales, mais sans aucune base scientifique pour expliquer les actions de telles plantes (Zavala *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2002; Ojewole *et al.*, 2008; OMS, 2011; Abdelrahim *et al.*, 2013). De nombreux mécanismes ou causes sont couramment impliqués dans la physiopathologie des diarrhées ou accompagnent cette pathologie. Les plus importants sont les altérations de la motricité gastro-intestinale (notamment les spasmes intestinaux dus à une accélération de la motricité), les troubles de sécrétions ou de l'osmolarité intestinales, les infections par de germes pathogènes, les troubles de la paroi intestinale, etc (Zavala *et al.*, 1998; Hejazian-Y *et al.*, 2009; Banji *et al.*, 2010; Desire *et al.*, 2010; Al Jarousha *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). La présente étude avait pour objectif d'évaluer les effets de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *Pittosporum mannii* sur l'activité contractile du duodénum de rat, sur des modèles expérimentaux de diarrhée induite chez le rat ou la souris et sur la croissance de quelques souches microbiennes diarrhéogéniques.

Dans la première partie de cette étude, les effets de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *Pittosporum mannii* ont été évalués *in vitro* sur l'activité contractile du duodénum de rat, ainsi que leurs mécanismes d'action éventuels. L'administration unique ou cumulative de l'extrait aqueux de *P. mannii* à faibles concentrations (0,01-0,08 mg/mL) a provoqué une relaxation du duodénum de rat, en diminuant à la fois le tonus et l'amplitude des contractions spontanées. À forte concentration ($\geq 0,08$ mg/mL), l'extrait a montré une action biphasique; une relaxation immédiate suivie d'une élévation transitoire du tonus (effet contracturant). Ces résultats suggèrent que l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* à faibles concentrations ($< 0,08$ mg/mL), posséderait des propriétés antispasmodiques alors qu'à forte concentration ($\geq 0,08$ mg/mL), il pourrait provoquer des effets spasmogéniques. La concentration efficace médiane (EC₅₀) de l'extrait était de $0,01977 \pm 0,00114$ ou de $0,01847 \pm 0,00130$ mg/mL, respectivement sur le tonus et l'amplitude de contractions. Une valeur de EC₅₀ de l'ordre de microgramme est généralement considérée comme d'un grand intérêt pharmacologique compte tenu du fait que nous évaluons un extrait total de plante qui est un mélange de plusieurs composés chimiques et non une substance pure (Borrelli *et al.*, 2009). Dans la présente étude, il est apparu que l'extrait aqueux de *P. mannii* produit un effet relaxant

seulement dans une très faible gamme de concentrations (0,01-0,08 mg/mL) tandis que des concentrations élevées ($\geq 0,08$ mg/mL) induisent secondairement un effet contracturant. Cette action biphasique démontrerait que l'extrait aurait sur l'activité contractile du muscle lisse intestinal, pas une simple action inhibitrice ou stimulatrice, mais un effet modulateur unique dépendant de la concentration de l'extrait (Hu *et al.*, 2010). La constatation que les concentrations élevées de l'extrait induisent secondairement un effet contracturant suggère que même à faibles concentrations, l'effet antispasmodique serait accompagné d'un effet spasmogénique, ce dernier ne permettant pas à l'effet antispasmodique de s'exprimer au-delà d'une certaine limite (Gilani *et al.*, 2005a, Hu *et al.*, 2010). Une explication plus plausible de cet effet biphasique est qu'il y aurait dans l'extrait aqueux de *P. mannii*, au moins deux composés chimiques distincts produisant des effets contraires relaxant et contractant, ou alors il est possible que le(s) composé(s) actif(s) présent(s) dans l'extrait pourraient agir via deux ou plusieurs mécanismes différents (Rojas-Vera *et al.*, 2002). Le screening phytochimique de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii*, réalisé dans le but de comprendre les bases pharmacologiques des effets exercés par cet extrait, a révélé la présence de diverses classes de composés bioactifs notamment les sucres réducteurs, les anthraquinones, les terpenoïdes, les phénols, les flavonoïdes, les saponines, les tannins, les alcaloïdes, les stéroïdes et les lipides. L'analyse quantitative a révélé que l'extrait aqueux de *P. mannii* contenait jusqu'à $343,3 \pm 28,8$ mg/g de polyphénols totaux. Des études phytochimiques précédentes effectuées sur *Pittosporum mannii* avaient révélé la présence de monoterpènes volatiles, de sesquiterpènes et de saponines cytotoxiques dans les feuilles (Ramanandraibe *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2002), et de fortes teneurs en composés polyphénoliques dans les écorces, qui pourraient expliquer l'importante activité antioxydante (Momeni *et al.*, 2010). Ces études ont conduit à l'isolement de dérivés triterpénoïde-saponine dans les feuilles (Seo *et al.*, 2002) et les écorces de la tige (Kennedy *et al.*, 2013) de cette plante. Les actions pharmacologiques de plusieurs de ces composés sont largement rapportées sur le muscle lisse gastro-intestinal. Les composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les tannins, métabolites secondaires largement produits dans les végétaux, sont réputés posséder des effets relaxants sur le muscle lisse intestinal et des propriétés antidiarrhéiques (Nguelefack *et al.*, 2006; Aviello *et al.*, 2010; Damabi *et al.*, 2010; Kishore et Rahman, 2012; Yunita *et al.*, 2012). Les terpenoïdes et les saponines présents dans d'autres extraits de plantes auraient des effets antispasmodiques et vasorelaxantes sur les préparations de muscle lisse (Ghayur *et al.*, 2005; Chiwororo et Ojewole, 2009; Dubravka *et al.*, 2010). Il est également bien documenté que des lipides, en particulier les huiles essentielles extraites des plantes, possèdent des propriétés relaxantes sur les muscles lisses en inhibant l'activité hypercontractile ou en réduisant la réponse

inflammatoire de l'intestin (Tangpu et Yadav, 2006, Damabi *et al.*, 2010). La présence de ces différentes classes de composés dans l'extrait aqueux de *P. mannii* pourrait contribuer, au moins en partie, aux effets relaxant et contracturant observés sur le duodénum de rat. Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Il est bien connu que le muscle lisse gastro-intestinal est doué d'une activité contractile spontanée provoquée par des variations périodiques du potentiel de membrane, nommées les ondes lentes et/ou les potentiels d'action (Tomita, 1981, Nakamura et Suzuki, 2004; Kim *et al.*, 2006a). L'activité rythmique spontanée des cellules de muscles lisses, avec les ondes lentes ou les potentiels d'action associés, est déclenchée par l'activité électrique spontanée des cellules interstitielles de Cajal (ICC) réparties dans la région myentérique (ICC-MY), au sein même du tissu musculaire et d'autres régions du tractus (Sanders, 1996; Huizinga, *et al.* 1997; Sanders *et al.*, 1999; Suzuki, 2000; Hirst et Ward, 2003; Takaki, 2003; Hotta *et al.*, 2005; Okishio *et al.*, 2005a; 2005b; Kim *et al.*, 2006b). Les ondes électriques ou potentiels pacemaker générées dans les ICC se propagent à l'intérieur des réseaux de ICC et sont conduites, via des jonctions étroites, aux couches de cellules de muscles lisses où elles déclenchent les ondes lentes de potentiel et éventuellement les potentiels d'action (Dickens *et al.*, 1999; Dickens *et al.*, 2001; Cousins *et al.*, 2003; Hirst et Ward, 2003). Ces derniers déclenchent alors les contractions phasiques par activation de l'entrée du Ca^{2+} dans la cellule musculaire majoritairement par les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de type L (Golenhofen et Lammer, 1972; Ishikawa *et al.*, 1985; Ozaki *et al.*, 1991, Nakamura et Suzuki, 2004; Kim *et al.*, 2006a). La motilité gastro-intestinale est donc un processus intégré contrôlé par les cellules interstitielles de Cajal, des hormones circulantes et des neurones entériques et extrinsèques qui libèrent une diversité de médiateurs (Hanani et Freund, 2000, Okishio *et al.*, 2005b; Okishio *et al.*, 2005a; Hejazian-Y *et al.*, 2009). Ainsi, la baisse du tonus et de l'amplitude de contractions spontanées induite par l'extrait de *P. mannii* dans cette étude pourrait être due à une réduction de la libération de médiateurs ou à une diminution de la capacité du muscle lisse à produire la force en réponse aux neurotransmetteurs libérés par les neurones entériques (Rodriguez *et al.*, 2006) ou enfin à un blocage de l'afflux de calcium dans la cellule musculaire lisse à travers les canaux Ca^{2+} potentiel-dépendants (Grassa *et al.*, 2004; 2005; Gilani *et al.*, 2005b; Damabi *et al.*, 2010; Borrelli *et al.*, 2009; Kishore et Rahman, 2012).

Au niveau du muscle lisse, l'activité antispasmodique de l'extrait pourrait être produite en réponse à une action non spécifique sur la membrane (ex. des anesthésiques locaux) ou à une action plus spécifique sur un récepteur membranaire (Rojas-Vera *et al.*, 2002). Divers médiateurs endogènes induisent habituellement la contraction du muscle intestinal, parmi lesquels l'acétylcholine, la 5-hydroxytryptamine (5-HT), l'histamine, la substance P, la

motiline et la prostaglandine F2 α (PGF2 α). L'acétylcholine est considéré comme le plus important neurotransmetteur excitateur contrôlant l'activité contractile spontanée du muscle lisse gastro-intestinal (Sanders, 1998; Pocher, 1999; Ohama *et al.*, 2007; Borrelli *et al.*, 2009; Beaugerie et Sokol, 2014). L'activation des récepteurs muscariniques sur les cellules du muscle lisse gastro-intestinal suite à la libération de l'acétylcholine par les neurones moteurs excitateurs entériques ou extrinsèques, joue un rôle physiologique important dans la stimulation des contractions spontanées du muscle. L'histamine est un autre médiateur important libéré par les terminaisons nerveuses entériques ou les cellules immunitaires; elle provoque la contraction du muscle gastro-intestinal également par activation des récepteurs membranaires des cellules musculaires (Dubravka *et al.*, 2010). Ainsi, l'activité antispasmodique de l'extrait sur le muscle lisse gastro-intestinal peut être modulée par inhibition des récepteurs muscariniques et/ou histaminiques sur la membrane de cellules (Gilani *et al.*, 2008; Dubravka *et al.*, 2010). Dans la présente étude, l'implication de ces récepteurs spécifiques dans l'effet relaxant de l'extrait sur l'intestin de rat a été évaluée en utilisant plusieurs approches. Premièrement, il a été observé que l'effet relaxant de l'atropine ou de la prométhazine, spécialement sur le tonus des contractions spontanées, était significativement plus élevé par rapport à la relaxation induite par l'extrait, comme l'indiquent les valeurs de pD₂ (pD₂: 1,704 vs. 0,424 et 0,205 respectivement pour l'extrait, l'atropine et la prométhazine). Deuxièmement, il est apparu que le prétraitement du duodénum avec de l'atropine, qui bloque sélectivement tous les sites récepteurs muscariniques (Arunlakhshana et Schild, 1959; Gilani et Cobbin, 1986; Hansen, 2003a, b, Uchiyama et Chess-Williams, 2004; Ghayur *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2010) ou la prométhazine, inhibiteur non sélectif des récepteurs histaminiques H₁ et des sites récepteurs muscariniques à des concentrations physiologiques, n'a pas modifié de manière significative la relaxation induite par l'extrait. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que l'extrait aqueux des écorces du tronc de *P. mannii* pourrait exercer ses effets inhibiteurs sur le duodénum via un mécanisme qui n'est pas spécifiquement anticholinergique ou antihistaminique. De plus, l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* a inhibé partiellement mais de manière significative la réponse contractile induite par le carbachol (analogue synthétique de l'acétylcholine) ou l'histamine sur le duodénum de rat. La contraction des muscles lisses en réponse à l'acétylcholine ou l'histamine est déclenchée par l'augmentation de la concentration de Ca²⁺ libre cytoplasmique (Karaki et Weiss, 1988; Desire *et al.*, 2010). Ces agonistes activent directement leurs récepteurs spécifiques sur les cellules musculaires lisses gastro-intestinales (Rodriguez *et al.*, 2006; Gilani *et al.*, 2008), ce qui conduit à l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires et à la production de seconds messagers (phospholipase C, inositol

triphosphate, diacylglycérol, protéine kinase C) qui stimulent d'une part le relargage du Ca^{2+} interne des réserves du réticulum sarcoplasmique et d'autre part l'afflux de Ca^{2+} extracellulaire à travers les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (Hashimoto *et al.*, 1985; Berridge et Irwin, 1989; Berridge, 1991, Désire *et al.*, 2010; Gerhoffer, 2005, Rodriguez *et al.*, 2006; Chiwororo et Ojewole, 2009; Dubravka *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010). Les effets inhibiteurs exercés par l'extrait sur la contraction induite par le carbachol ou l'histamine pourraient résulter d'un blocage des récepteurs muscariniques ou histaminiques sur la membrane des cellules, ou de l'altération d'un processus au niveau des voies de signalisation intracellulaires liées à l'activation de ces récepteurs, ou encore à un blocage des flux calciques membranaires ou intracellulaires. Nos résultats ont également montré que l'effet inhibiteur de l'extrait sur les contractions dues à l'acétylcholine et à l'histamine était inférieur à ceux de l'atropine et de la prométhazine respectivement, et l'allure des courbes concentration-réponse de ces contractions en présence de l'extrait montre une inhibition non compétitive (Désire *et al.*, 2010). Ceci conforte davantage l'hypothèse que l'action inhibitrice de l'extrait sur le muscle lisse duodénal de rat n'impliquerait pas une inhibition directe des récepteurs muscariniques ou histaminiques sur la membrane de cellules musculaires (Naseri et Yahyavi, 2008).

Un autre mécanisme important de contrôle de la relaxation du muscle lisse intestinal, couplé aux récepteurs membranaires, implique l'activation des récepteurs adrénergiques (Roberts *et al.*, 1999, Hejazian-Y *et al.*, 2009). Les muscles lisses du tractus gastro-intestinal se relâchent en réponse à la stimulation des récepteurs α et β adrénergiques (Tanaka *et al.*, 2004a; Nguelefack *et al.*, 2006; Viramontes *et al.*, 2001; Damabi *et al.*, 2010). Le rôle des récepteurs α - et β - adrénergiques dans la réponse relaxante induite par l'extrait, a été étudié. L'administration de la phentolamine (ou la combinaison prazosine plus yohimbine) ou du propranolol à des concentrations physiologiques a provoqué une diminution du tonus contractile de l'organe, suggérant d'emblée que dans les conditions physiologiques, la stimulation α - et β -adrénergique joue un rôle important dans la régulation du tonus contractile de l'intestin de rat. En outre, il a été observé que la phentolamine (ou la combinaison prazosine plus yohimbine), antagoniste non sélectif des sites récepteurs α -adrénergiques (Koike *et al.*, 2000), a entraîné une inhibition partielle de la réponse relaxante de la noradrénaline (agoniste non sélectif des récepteurs α_2 présynaptiques ainsi que des récepteurs β_2 postjonctionnels (Damabi *et al.*, 2010)), mais n'a pas provoqué de modification significative sur la relaxation induite par l'extrait. Par contre, le propranolol, antagoniste non sélectif qui bloque tous les trois sous-types de récepteurs β -adrénergiques (Koike *et al.*, 2000), a inhibé de manière significative la diminution du tonus des contractions induite par l'extrait aqueux de *P. mannii* ou par le salbutamol (agoniste synthétique sélectif des récepteurs β_2 -adrénergiques).

Ces résultats suggèrent que l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* pourrait induire la relaxation du duodénum en activant la voie des récepteurs β -adrénergiques (Fattoum, 1997; Shin *et al.*, 2005) alors que la participation des récepteurs α -adrénergiques est peu probable (Damabi *et al.*, 2010). Bien que les trois sous-types, β_1 -, β_2 - et β_3 de récepteurs β -adrénergiques jouent un rôle dans la régulation de la relaxation du muscle lisse intestinal (Roberts *et al.*, 1999; Koike *et al.*, 1994, 1995a, 1995b, 1997; Akimoto *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2004b), les principaux récepteurs β -adrénergiques qui modulent la réponse relaxante de l'isoprénaline (une catécholamine de synthèse qui active de manière non-sélective les trois sous-types de récepteurs β -adrénergiques (Johnson *et al.*, 1993) et du salbutamol sur le muscle lisse gastro-intestinal sont les récepteurs β_2 - et β_3 - adrénergiques (Koike *et al.*, 1997, StephanL et Michel, 2003; Akimoto *et al.*, 2002). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour la relaxation du muscle lisse en réponse à la stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques. Toutes les théories suggèrent l'implication de l'AMPc comme second messenger (Tanaka *et al.*, 2003, 2004b et 2005; Damabi *et al.*, 2010). La liaison d'un agoniste au récepteur β_2 membranaire active l'adénylate cyclase qui va ainsi produire l'AMPc à partir de l'ATP (Wray, 1980). L'augmentation du taux d'AMPc intracellulaire conduit à l'activation des protéines kinase AMPc-dépendantes (PKA) qui modulent la relaxation du muscle lisse (Shabalina *et al.*, 2002; Mueller et Van Breemen, 1979) en induisant par divers mécanismes la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine (Murthy, 2006). Ainsi L'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* pourrait induire la relaxation via l'activation directe des récepteurs β_2 -adrénergiques sur la membrane des cellules musculaires lisses ou en interférant à un niveau avec la voie de signalisation de ces récepteurs (Fattoum, 1997; Shin *et al.*, 2005). L'augmentation du taux d'AMPc intracellulaire aurait probablement contribué à la relaxation induite par l'extrait sur le duodénum, puisque la stimulation β_2 -adrénergique implique une production de ce second messenger intracellulaire (Chiwororo et Ojewole, 2009). Une mesure directe du taux d'AMPc dans la cellule permettrait de confirmer cette hypothèse.

Un autre mécanisme essentiel qui participe à la relaxation des cellules de muscles lisses implique la production et la libération du monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO). Le monoxyde d'azote, comme la noradrénaline, le VIP et l'ATP, est l'un des principaux neuromédiateurs inhibiteurs libérés par les neurones entériques et qui contrôlent la relaxation active du muscle lisse gastro-intestinal (Marieb, 1999; Guyton et Hall, 2006; Aviello *et al.*, 2010) via des mécanismes nonadrenergiques noncholinergiques (Akiko *et al.*, 2005; Moazedi *et al.*, 2010). Plutôt que de s'attacher à des récepteurs membranaires, le NO traverse la membrane plasmique des cellules adjacentes et se lie dans les cellules musculaires postynaptiques à un récepteur intracellulaire singulier, le fer de la guanylyl cyclase soluble

qui active alors la production du second messenger GMPc à partir du GTP (Moncada *et al.*, 1992; Marieb, 1999; Aziba et Okpako, 2003). L'augmentation du taux de GMPc intracellulaire conduit à l'activation des protéines kinases GMPc-dépendantes (PKG) qui à leur tour activent divers mécanismes aboutissant à la diminution de l'activité contractile (i.e. la relaxation) de la cellule musculaire lisse (Karaki *et al.*, 1997; Aziba et Okpako, 2003; Yougbare, 2010). Ainsi le monoxyde d'azote relâche le muscle lisse intestinal et respiratoire via une augmentation de la synthèse du GMPc (Moazedi *et al.*, 2010). Le NO serait également capable d'activer directement les canaux K^+ Ca^{2+} -dépendants pour induire la relaxation des muscles lisses vasculaires (Bolotina *et al.*, 1994; Loirand *et al.*, 1997). Nous avons investigué le rôle du monoxyde d'azote dans la réponse relaxante induite par l'extrait aqueux de *P. mannii* sur le duodénum de rat. Le prétraitement avec la N^G nitro L-arginine méthyl ester (L-NAME), un inhibiteur de la NO synthétase et de la production du NO (Park *et al.*, 2003; Moazedi *et al.*, 2010), a inhibé partiellement mais de manière significative la baisse du tonus des contractions spontanées provoquée par l'extrait. De plus, en présence du bleu de méthylène, un inhibiteur usuel de la guanylyl cyclase soluble (Mayer *et al.*, 1993; kawada *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2003), la réponse relaxante induite par l'extrait sur le duodénum de rat était réduite de façon significative. Ces observations suggèrent que l'effet antispasmodique de l'extrait aqueux de *P. mannii* impliquerait un mécanisme GMPc-dépendant lié au NO (Moazedi *et al.*, 2010). L'extrait aqueux de *P. mannii* pourrait stimuler la production du NO et augmenter la biodisponibilité de ce neurotransmetteur inhibiteur pour induire la relaxation de la cellule musculaire lisse intestinale (Park *et al.*, 2003) comme il pourrait également activer directement la production du second messenger GMPc (Moncada *et al.*, 1992, Aziba et Okpako, 2003). Habituellement, le tonus contractile des muscles lisses peut être relâché en réponse à l'élévation des taux intracellulaires de nucléotides cycliques (adénosine 3',5'-monophosphate cyclique ou guanosine 3', 5'- monophosphate cyclique (Berridge, 1975; Kazic et Milosavljevic, 1976; Matusak *et al.*, 1991; Borgi et chouchane, 2009; Aviello *et al.*, 2010). Les nucléotides cycliques libérés suite à une stimulation hormonale ou nerveuse (par activation des récepteurs spécifiques couplés à une protéine kinase A ou une protéine kinase G) diminuent la contraction en inhibant directement la MLCK ou en stimulant le retour du calcium vers le réticulum sarcoplasmique ou son extrusion hors de la cellule par les pompes calciques ou encore en inhibant l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule à travers les canaux Ca^{2+} -voltage dépendants de type L (Nakamura *et al.*, 1995; Kaneda *et al.*, 1997, Aviello *et al.*, 2010). Les drogues qui augmentent les taux de nucléotides cycliques causent la relaxation de la contraction induite par des agonistes, telle qu'observée pour la papavérine, un inhibiteur de phosphodiesterase AMPc-dépendante (Pösch et Kukovetz, 1971, Borgi et Chouchane, 2009).

La stimulation β_2 -adrénergique ou l'activation de la voie de production du NO induisent invariablement l'augmentation des taux de nucléotides cycliques qui causent la relaxation de la cellule musculaire lisse. Les résultats de la présente étude ont montré que l'extrait aqueux de *P. mannii* activerait la voie β -adrénergique et la production du NO, suggérant ainsi que l'élévation du taux de nucléotides cycliques (AMPC, GMPc) pourrait jouer un rôle dans la réponse relaxante induite par l'extrait sur le muscle intestinal de rat. Une mesure directe des taux d'AMPC et de GMPc intracellulaire est toutefois nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

La relaxation du muscle lisse est également induite par un groupe de substances chimiques provoquant l'ouverture des canaux à potassium (Cook *et al.*, 1988, Aziba et Okpako, 2003). Les canaux potassiques contrôlent la contraction du muscle lisse gastro-intestinal en déterminant le potentiel de repos et en influençant la configuration des ondes lentes et du potentiel d'action (Du *et al.*, 1994; Huizinga *et al.*, 1985; Sanders, 1992, Zhao *et al.*, 2009). Dans la présente étude, nous avons vérifié si les canaux potassiques pouvaient avoir un rôle dans la médiation de l'effet relaxant de l'extrait sur le duodénum de rat. L'administration préalable du tétraéthylammonium à forte concentration (TEA, 10 mM) ou de la quinine (20 μ M), des antagonistes non-sélectifs des canaux potassiques (Quast et Cook, 1989, Laurent *et al.*, 1993, Park *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009), a diminué considérablement la tension de base des fragments de duodénum. De plus, ces substances ont inhibé de manière significative la relaxation induite par l'extrait. Ces résultats fournissent une évidence persuasive que l'activation des canaux K^+ pourrait contribuer dans la relaxation induite par l'extrait aqueux de *P. mannii* sur le duodénum de rat. Du coup, l'implication de trois canaux potassiques majeurs qui jouent un rôle dans de la régulation de la contraction de muscle lisse a été étudiée, notamment le canal K^+ sensible à l'adénosine triphosphate (canal K_{ATP}), le canal K^+ régulé par le potentiel ou canal K^+ voltage-dépendant retardé (canal K_V) et le canal K^+ activé par le taux de Ca^{2+} intracellulaire (canal K_{Ca}) (Noack *et al.*, 1992; Jenkinson, 2006, Zhao *et al.*, 2009). Le glibenclamide (un inhibiteur spécifique des canaux K_{ATP}) à une concentration physiologique (10 mM) connue pour bloquer la réponse au levromakalim (activateur spécifique des canaux K_{ATP}) chez les mammifères (Quast et Cook, 1989; Laurent *et al.*, 1993; Teague *et al.*, 2002, Zhao *et al.*, 2009), n'a pas modifié l'effet relaxant de l'extrait aqueux de *P. mannii* sur le duodénum de rat; ce qui permet d'exclure l'implication du canal K_{ATP} dans réponse relaxante de l'extrait (Teague *et al.*, 2002, Zhao *et al.*, 2009). Par contre, le TEA à faible concentration (1 mM) a bloqué partiellement et de manière significative la diminution du tonus des contractions spontanées induite par l'extrait. Le TEA à faible concentration (1 mM), est un bloqueur non-sélectif des canaux K^+ mais avec

une forte affinité pour les canaux K^+ à large conductance activés par le Ca^{2+} (BK_{Ca}) (Laurent *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 2009). Il bloque l'ouverture des canaux BK_{Ca} (Ko *et al.*, 2008) mais a peu d'effet sur les canaux K^+ régulés par le potentiel (Kv). Ainsi, le prétraitement avec une faible concentration de TEA (1 mM) permet de discriminer entre les effets sur les canaux Kv et les canaux K_{Ca} (Zhao *et al.*, 2009). L'inhibition significative par le TEA 1 mM de la relaxation induite par l'extrait observée dans la présente étude, suggère *a fortiori* que l'extrait pourrait induire la relaxation du muscle lisse duodéal via l'activation des canaux K^+ à large conductance activés par le Ca^{2+} (BK_{Ca}).

Dans les cellules de muscle lisse, le Ca^{2+} est le facteur primordial qui joue le rôle clé dans le couplage excitation-contraction (Wellman et Nelson, 2003, Xia *et al.*, 2008; Borrelli *et al.*, 2009; Borgi et Chouchane, 2009). L'augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} est le stimulus primaire qui déclenche la contraction (Sanders, 2001, Hu *et al.*, 2010); elle est généralement le résultat de la libération du Ca^{2+} des réserves intracellulaires et de l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire à l'intérieur de la cellule majoritairement à travers les canaux Ca^{2+} de type L. Inversement, la relaxation du muscle lisse est déclenchée par une réduction du Ca^{2+} intracellulaire. Cette diminution peut être due à une prévention de l'entrée de calcium dans les cellules à partir du fluide extracellulaire (Aviello *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010) ou à une inhibition de la libération de calcium à partir du compartiment intracellulaire de stockage de calcium (Borgi et Chouchane, 2009; Borrelli *et al.*, 2009). Elle peut également être produite par activation des mécanismes qui assurent la séquestration ou l'extrusion de Ca^{2+} , réalisées grâce à l'activité des pompes calciques spécifiques présentes sur la membrane cellulaire et celle du réticulum sarcoplasmique (Loirand *et al.*, 1997). Dans la présente étude, l'implication d'un mécanisme anticalcique dans l'effet relaxant de l'extrait a été évaluée, en utilisant différents protocoles impliquant le Ca^{2+} extracellulaire. Premièrement, le prétraitement des préparations avec l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA), un agent chélateur de calcium, n'a pas affecté la diminution du tonus des contractions spontanées induite par l'extrait aqueux de *P. manni* sur le duodénum de rat, suggérant d'emblée que la réponse relaxante de l'extrait ne serait pas due à la chélation des ions Ca^{2+} . Deuxièmement, nous avons vérifié si l'effet relaxant de l'extrait était régulé par le blocage des canaux à calcium. La principale voie d'entrée du Ca^{2+} dans les cellules de muscle lisse est représentée par les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de type L (Ca1.2) sensibles aux dihydropyridines (Makhlouf, 1994, Sanders, 2001, Aviello *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010). La contraction du muscle lisse est essentiellement dépendante du Ca^{2+} extracellulaire, qui pénètre dans la cellule majoritairement à travers les canaux voltage-dépendants et en partie via les canaux récepteurs-dépendants (Aviello *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010). La perturbation de l'activité des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de

type L est l'une des causes de la diminution de la motilité intestinale (Kishore et Rahman, 2012). Dans cette étude, l'effet relaxant de l'extrait a été évalué en présence du vérapamil, inhibiteur sélectif des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de type L (Gregory et Gianrico, 2003, Hu *et al.*, 2010). Il est apparu que le vérapamil, à forte concentration (1 μM) a inhibé totalement l'activité contractile spontanée du duodénum de rat et même un lavage prolongé ne restaure pas les contractions spontanées. Ce résultat suggère que cette forte concentration de vérapamil serait toxique pour l'organe (tachyphylaxie). A la concentration physiologique (0,05 ou 0,1 μM), le vérapamil a bloqué significativement et de manière concentration-dépendante, la baisse du tonus des contractions spontanées induite par l'extrait, aussi bien en administration unique qu'en administration cumulative. L'affinité de l'extrait a diminué; la EC_{50} passant de $0,0173 \pm 0,0011$ mg/mL à $0,0336 \pm 0,0011$ mg/mL en présence du vérapamil (0,05 μM). Ces résultats suggèrent que l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* pourrait induire la relaxation du duodénum de rat via un blocage de l'afflux de Ca^{2+} dans la cellule de muscle lisse à travers les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de type L (Xia *et al.*, 2008). Afin de vérifier cette hypothèse, l'effet de l'extrait a été évalué sur la composante tonique et la composante phasique de la contraction induite respectivement avec des concentrations uniques et cumulatives de KCl sur le duodénum de rat. L'administration de l'extrait aqueux de *P. mannii* a induit une diminution significative de la contraction tonique induite par une faible concentration du KCl (20 mM), suggérant ainsi que l'extrait possède un effet spasmodique sur l'intestin de rat (Aviello *et al.*, 2010). L'extrait a également inhibé de manière significative la contraction induite par une forte concentration (50 mM) ou des concentrations cumulatives (1-60 mM) de KCl, de la même façon que le vérapamil. Le KCl est souvent utilisé comme un moyen pour contourner les voies d'activation des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et activer la contraction du muscle lisse en changeant le potentiel d'équilibre du potassium et clamber le potentiel de membrane à une valeur supérieure au potentiel de repos (Moazedi *et al.*, 2010). La stimulation par une forte concentration de K^+ (> 30 mM), qui provoque la dépolarisation de la membrane cellulaire entraînant l'ouverture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de type L, est la méthode la plus commune pour introduire le Ca^{2+} dans la cellule sans stimulation de récepteur membranaire (Bolton, 1979, Karaki *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 2006; Dubravka *et al.*, 2010). Toute substance qui inhibe la contraction induite par une forte concentration de K^+ est considérée comme un bloqueur des canaux Ca^{2+} et donc de l'afflux de calcium (Gilani *et al.*, 2008; Lizuka *et al.*, 2008; Borgi et Chouchane, 2009; Chiwororo et Ojewole, 2009; Dubravka *et al.*, 2010; Moazedi *et al.*, 2010). Ainsi nos résultats confortent davantage l'idée que l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* pourrait inhiber l'entrée de Ca^{2+} par les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de type L pour

induire un effet spasmolytique non-spécifique sur le muscle lisse intestinal de rat. Cet effet spasmolytique peut être attribué à la présence de certains composés bioactifs tels que les flavonoïdes, qui sont réputés pour leur capacité de relâcher les muscles lisses par inhibition de l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire (Xia *et al.*, 2008; Borgi et Chouchane, 2009; Chen *et al.*, 2009; Desire *et al.*, 2010; Dubravka *et al.*, 2010).

L'effet anticalcique de cet extrait de plante a également été évalué sur la contraction directe de l'intestin induite par addition cumulative du Ca^{2+} extracellulaire sur des préparations incubées dans une solution saline sans Ca^{2+} contenant ou non de l'EDTA. En milieu sans Ca^{2+} et sans EDTA, l'extrait aqueux de *P. mannii* a inhibé de façon significative et concentration-dépendante la contraction due au CaCl_2 sur le duodénum de rat. Ce résultat conforte davantage l'hypothèse précédente selon laquelle l'extrait pourrait provoquer la relaxation en inhibant directement l'entrée du Ca^{2+} dans la cellule à travers les canaux calciques membranaires (Naseri et Yahyavi, 2008; Xia *et al.*, 2008). En milieu sans Ca^{2+} additionné d'EDTA (pour extraire ou bloquer le Ca^{2+} dans la cellule (Ghayur *et al.*, 2005), l'extrait aqueux de *P. mannii* a également provoqué une inhibition significative et de manière concentration dépendante de la contraction du duodénum induite avec le CaCl_2 . Globalement, l'allure des courbes concentration-contraction du CaCl_2 en présence de l'extrait dans le milieu avec EDTA et en milieu sans EDTA était quelque peu différente. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que l'extrait n'inhiberait pas seulement l'entrée du Ca^{2+} à partir du compartiment extracellulaire, mais pourrait également influencer les flux de Ca^{2+} à partir du compartiment intracellulaire notamment les réserves du réticulum sarcoplasmique. Dans le but de vérifier cette seconde hypothèse et d'étudier les effets calciques intracellulaires, les effets de l'extrait ont été évalués sur la contraction induite avec le chlorure de baryum (BaCl_2). Le BaCl_2 est un agent contracturant actif sur les mécanismes intracellulaires; il traverse la membrane et pénètre à l'intérieur de la cellule pour stimuler directement l'appareil contractile (Hansen *et al.*, 1984; Rodriguez *et al.*, 2006) ou induire la libération du Ca^{2+} à partir réserves intracellulaires (Naseri et Heidari, 2007). Le prétraitement des fragments de duodénum avec des concentrations uniques croissantes de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* a inhibé de manière significative et concentration-dépendante, la contraction induite par le BaCl_2 . Nos résultats suggèrent donc qu'en plus de l'inhibition des flux de Ca^{2+} à partir du compartiment intracellulaire, l'extrait pourrait également influencer les mécanismes impliquant la sensibilisation de l'appareil contractile pour induire la relaxation du muscle lisse intestinal. Par ailleurs, il est bien connu que l'injection de BaCl_2 entraîne la "tétanie" du muscle lisse par son action inhibitrice sur les canaux potassiques membranaires responsables de la relaxation (Ouedraogo *et al.*, 2005; Naseri et Heidari, 2007). Il s'en suit une dépolarisation continue de la

cellule, entraînant une contraction prolongée du muscle lisse (Corompt, *et al.*, 1998). Ainsi, l'inhibition de la contraction due au Ba^{2+} par l'extrait conforte l'hypothèse que l'extrait pourrait activer les canaux potassiques membranaires pour produire son effet relaxant sur le muscle lisse intestinal de rat.

Dans cette étude, il a été observé que l'administration de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* à forte concentration ($\geq 0,08$ mg/mL) induit une relaxation puis une élévation importante du tonus des contractions spontanées. Les mécanismes d'action de cet effet contracturant ont été étudiés, en réévaluant l'effet d'une forte concentration d'extrait (0,16 mg/mL) en présence de quelques antagonistes. Le prétraitement des fragments de duodénum avec l'atropine, la prométhazine, l'indométacine, la phentolamine (ou la combinaison prazosine plus yohimbine), le propranolol, l'EDTA, le glibenclamide, le bleu de méthylène et la L-NAME à des concentrations physiologiques, n'a pas modifié de façon significative l'augmentation du tonus induite par une forte concentration d'extrait sur les contractions spontanées du duodénum de rat. Par contre, le TEA, la quinine et le vérapamil ont considérablement retardé et atténué cet effet contracturant de l'extrait. Ces résultats suggèrent que des mécanismes essentiels tels que la stimulation des récepteurs muscariniques et histaminiques, l'inhibition des récepteurs α - et β -adrénergiques, l'activation des cyclooxygénases et la production des prostaglandines endogènes, le blocage des canaux potassiques ATP-dépendants, l'inhibition de la production du monoxyde d'azote et la chélation du Ca^{2+} , ne seraient pas impliqués dans la réponse contracturante induite par l'extrait sur le duodénum de rat. Cette réponse pourrait impliquer l'inhibition de certains canaux potassiques et/ou l'activation des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (Ghayur *et al.*, 2005; Chiwororo et Ojewole, 2009; Hu *et al.*, 2010).

Les altérations de la motilité gastro-intestinale, notamment les spasmes intestinaux dus à une augmentation de l'activité contractile sont très souvent à l'origine des diarrhées ou accompagnent cette pathologie (Tangpu et Yadav, 2006; Hejazian-Y *et al.*, 2009; Banji *et al.*, 2010; Damabi *et al.*, 2010; AL-Maamori, 2011; Al Jarousha *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2013). Les myorelaxants ou antispasmodiques sont couramment utilisés comme agents antidiarrhéiques (Modigliani, 1989; Zavala *et al.*, 1998; Desire *et al.*, 2010). *In vivo*, les effets antidiarrhéiques de l'extrait aqueux des écorces de *Pittosporum mannii* ont été évalués chez le rat et la souris en utilisant quelques modèles expérimentaux. Nos essais préliminaires ont montré que l'administration par voie orale de l'extrait aux doses de 60, 120, 240, 480 et 720 mg/kg, a diminué faiblement l'élimination normale des fèces chez la souris. Le nombre de fèces excrétées a diminué de manière non significative mais la diminution de la masse des fèces était significative chez les souris traitées à l'extrait aux doses de 480 et 720

mg/kg. De façon similaire, l'extrait aux mêmes doses n'a pas modifié significativement la propulsion intestinale normale de la suspension de charbon chez la souris. L'extrait aux doses de 480 et 720 mg/kg a par contre freiné de manière significative ($p < 0,05$) et dose-dépendante, le transit intestinal stimulé avec l'huile de ricin chez les souris. Ces résultats montrent clairement que l'extrait aqueux de *P. mannii* exerce une légère inhibition sur la motilité intestinale normale chez les souris (défécation normale et transit intestinal normal), alors qu'il induit un effet inhibiteur important sur une motilité augmentée (transit intestinal stimulé avec l'huile de ricin). L'accélération de la motilité intestinale provoque une progression trop rapide de la nourriture le long du tractus digestif qui ne laisse pas le temps suffisant pour une meilleure absorption de l'eau et des nutriments, avec pour conséquence un excès de fluides dans les fèces (AL-Maamori, 2011). Ainsi, la réduction de la motilité intestinale obtenue en présence de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* suggère fortement que cet extrait posséderait des propriétés antidiarrhéiques. En effet, la réduction de la motricité gastro-intestinale est l'un des mécanismes par lesquels de nombreux agents antidiarrhéiques agissent (Hasler *et al.*, 2003; Tangpu et Yadav, 2006; Borrelli *et al.*, 2009; Damabi *et al.*, 2010).

Les troubles d'absorption ou de sécrétion dans l'intestin constituent un autre mécanisme important impliqué dans la physiopathologie des diarrhées. Dans de nombreux cas, la diarrhée résulte d'un déséquilibre entre les phénomènes d'absorption et de sécrétion dans l'intestin accompagné d'une accélération de la motilité avec comme conséquence l'excès de liquides dans les fèces entraînant une sécrétion nette d'eau et d'électrolytes dans la lumière (Chitme *et al.*, 2004; Tijani *et al.*, 2009; Damabi *et al.*, 2010; Abdelrahim *et al.*, 2013). Ce mécanisme essentiel a été exploré en évaluant les effets de l'extrait sur un modèle de diarrhée sécrétoire: la diarrhée induite avec l'huile de ricin. L'administration par voie orale de l'huile de ricin (0,6 mL/rat) a provoqué une diarrhée sévère chez les rats. Le traitement préalable des animaux avec l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* aux doses de 120, 240, 480 et 720 mg/kg a inhibé la diarrhée induite avec l'huile de ricin. L'extrait a non seulement retardé le temps de déclenchement de la diarrhée, mais aussi a réduit le nombre et la masse des fèces diarrhéiques excrétées, de manière significative et dose-dépendante. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'action diarrhéique de l'huile de ricin: inhibition de l'activité de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ intestinale entraînant une diminution de l'absorption de fluide (Pierce *et al.*, 1971; Nell et Rummel, 1984; Abdelrahim *et al.*, 2013), activation de l'adénylate cyclase et production active de l'AMPC par la muqueuse intestinale (Capasso *et al.*, 1994), qui non seulement inhibe l'absorption de Na^+ et de Cl^- mais aussi stimule la sécrétion de Cl^- par les cellules épithéliales intestinales (Czerucka *et al.*, 1993; Beyers, 2004), stimulation de la

production des prostaglandines (Galvez *et al.*, 1993), implication du monoxyde d'azote, etc. (Mascolo *et al.*, 1996, Izzo *et al.*, 1998; Zahan *et al.*, 2012). Il est documenté que l'huile de ricin induit la diarrhée par différents mécanismes (Zahan *et al.*, 2012) grâce à son métabolite essentiel, l'acide ricinoléique formé par hydrolyse d'un triglycéride de cette huile dans le duodénum par la lipase pancréatique (Pang *et al.*, 2013). Dans le tractus gastro-intestinal, l'huile de ricin libère l'acide ricinoléique qui cause l'irritation et l'inflammation de la muqueuse gastrique et intestinale (Chitme *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2013), induisant la libération des prostaglandines par les cellules de la muqueuse intestinale (Capasso *et al.*, 1986; Mascolo *et al.*, 1994; Ching *et al.*, 2008). Il en résulte une augmentation de la motilité et des perturbations de la sécrétion du fluide et du transport des électrolytes par la muqueuse intestinale, avec pour conséquence une activité sécrétoire accrue et un flot de contenu liquide dans la lumière, qui coule rapidement à travers l'intestin grêle et le gros intestin (Ammon *et al.*, 1975; Gaginella *et al.*, 1975; Roberts *et al.*, 1976; Chitme *et al.*, 2004; Venkatesan *et al.*, 2005; Ching *et al.*, 2008; Mbagwu et Adeyemi; 2008; Gutiérrez *et al.*, 2013; Pang *et al.*, 2013). L'inhibition significative induite sur la diarrhée due à l'huile de ricin suggère que l'extrait aqueux de *P. mannii* exercerait *in vivo* une activité antisécrétoire et/ou antispasmodique pour contrarier la diarrhée (Zahan *et al.*, 2012). Il est également probable que l'extrait induit son activité antidiarrhéique via une inhibition de la synthèse ou de la libération des prostaglandines (Awouters *et al.*, 1978; Venkatesan *et al.*, 2005). Dans le but de déterminer les mécanismes d'action probables de l'effet antidiarrhéique de l'extrait, le rôle des récepteurs opioïdes, une voie importante de contrôle de la relaxation du muscle lisse intestinal, a été étudié. L'administration préalable aux rats du naloxone (0,5 mg/kg s.c), antagoniste non sélectif des récepteurs opioïdes (Naseri et Heidari, 2007), a bloqué partiellement mais significativement l'effet antidiarrhéique de l'extrait et à un degré plus important celui du loperamide. Sur la base de ces observations, il semble raisonnable de suggérer que l'extrait aqueux de *P. mannii* pourrait exercer son activité antidiarrhéique en partie en activant les récepteurs opioïdes dans le tractus gastro-intestinal. Le loperamide, agoniste opiacée de synthèse, est une drogue antidiarrhéique de référence, qui exerce une puissante action inhibitrice sur la motilité gastro-intestinale et affecte le mouvement d'eau et des électrolytes à travers la paroi de l'intestin. Le loperamide augmente en outre le tonus du sphincter anal, réduisant de ce fait l'incontinence et l'urgence (Heel *et al.*, 1978; Sundhu *et al.*, 1981; Al-Maamori, 2011). De façon similaire, l'extrait aqueux de *P. mannii* pourrait activer un ou plusieurs de ces mécanismes pour produire les effets inhibiteurs observés sur la motilité et les sécrétions gastro-intestinales. Les propriétés antidiarrhéiques observées chez le rat et la souris avec l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* peuvent être attribuées à certaines

classes des composés trouvées dans cet extrait, à l'instar des composés phénoliques (flavonoïdes, tannins), des lipides, des terpénoïdes, des triterpènes, des saponines, des sucres réducteurs et des alcaloïdes, qui possèderaient une action inhibitrice sur les diarrhées (Chitme *et al.*, 2004; Venkatesan, 2005, AL-Maamori, 2011; Zhang *et al.*, 2013). L'activité antidiarrhéique des flavonoïdes est liée à leur capacité d'inhiber la motilité intestinale et les sécrétions hydro-électrolytiques, qui sont altérées dans les conditions de diarrhée (Di Carlo *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1997, Al-Maamori, 2011; Desire *et al.*, 2010; Abdelrahim *et al.*, 2013). Les expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré que les flavonoïdes peuvent inhiber la réponse sécrétoire de l'intestin induite par la prostaglandine E₂ (Di Carlo *et al.*, 1993; Sanchez *et al.*, 1997, Al-Maamori, 2011; Abdelrahim *et al.*, 2013), modifier la perméabilité de la muqueuse à certaines substances (eau et électrolytes) et inhiber le péristaltisme intestinal (Ghazouli et Holzer, 2004), des effets bénéfiques dans le contrôle de la diarrhée. Les huiles volatiles ont un effet relaxant sur le muscle lisse du tractus digestif. Les tannins (glycosides phénoliques) peuvent précipiter les protéines des entérocytes et réduire ainsi les mouvements péristaltiques et les sécrétions intestinales (Okudo *et al.*, 1989, Abdelrahim *et al.*, 2013).

Les diarrhées sont avant tout des maladies du péril fécal de première ligne portées par l'eau sale ou les aliments contaminés (Fathing, 2000; Damiki et Siva, 2011, Abdelrahim *et al.*, 2013). Les infections intestinales microbiennes ou parasitaires consécutives à des intoxications alimentaires ou au non-respect des règles d'hygiène alimentaire ou hydrique, constituent la cause la plus courante des diarrhées dans la population générale. Les enfants en bas âge, les personnes âgées et les individus atteints d'une immunodéficiences congénitale ou acquise, étant les plus vulnérables (WHO, 1996, WHO, 1994; Farthing, 2000; Mukherjee *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2013). Un certain nombre de microorganismes peuvent causer les diarrhées infectieuses chez l'homme, parmi lesquels des bactéries entériques, des virus, des champignons et des protozoaires (Farthing, 2000; Fewtrell *et al.*, 2005; UNICEF/WHO, 2009; Desire *et al.*, 2010; Mukherjee *et al.*, 2013). Dans le présent travail, pour investiguer davantage son potentiel antidiarrhéique, les effets antimicrobiens de l'extrait aqueux de *P. mannii* ont été évalués *in vitro* sur quelques-unes de ces souches bactériennes (*Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*) et fongiques (*Candida albicans*) qui sont responsables des diarrhées infectieuses chez l'homme. Aux concentrations échelonnées de 1,25 à 20 mg/mL, l'extrait aqueux de *P. mannii* a inhibé de manière sensible la croissance de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* et *Candida albicans*. Les souches de *Shigella flexneri* et *Staphylococcus aureus* se sont montrées peu sensibles à l'extrait, le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance étant inférieure à 7 mm (Mukherjee *et al.*, 2013). La meilleure zone d'inhibition de la croissance sur *E. coli* (Ø:

15,00±0,67 mm) et *Shigella dysenteriae* (9,65±0,74 mm) a été obtenue avec une concentration moyenne d'extrait (15 mg/mL), alors que c'est plutôt à faible concentration (1,25 et 2,5 mg/mL) que l'extrait a montré une meilleure inhibition de la croissance de *Salmonella typhi* (Ø: 13,33±0,33 mm). L'effet antibactérien de l'extrait notamment sur *E. coli* et *S. typhi* était proche ou faible comparé à celui de la gentamicine (Ø: 19,67±0,33 mm et 17,67±0,33 mm) ou de la ciprofloxacine (Ø: 28,67±0,88 mm et 31,33±0,67 mm), des antibiotiques utilisés en première intention contre ces souches de pathogènes (Giguère *et al.*, 2013). L'extrait a montré une activité antifongique considérable, inhibant la croissance de *Candida albicans* (Ø: 17,33±0,33 mm) de manière plus importante que la nystatine (Ø: 14,17±0,44 mm) à la dose thérapeutique (5 µM), médicament antifongique de choix. Ces résultats indiquent que l'extrait pourrait inhiber la multiplication de ces souches pathogènes de bactéries et de champignons dans l'organisme pour alléger les diarrhées. Des études *in vivo* en utilisant ces souches microbiennes sont toutefois nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Des études faites sur les bactéries pathogènes intestinales avec les polyphénols, en particulier les flavonoïdes (Cowan, 1999, Bylka *et al.*, 2004, Mukherjee *et al.*, 2013), une large classe de composés polyphénoliques apparaissant naturellement dans les plantes, ont montré une activité antibactérienne de ces composés. Les polyphénols qui peuvent former des complexes solubles lourds avec des protéines, sont susceptibles de se lier à des récepteurs membranaires des bactéries empêchant de ce fait la disponibilité des récepteurs à la surface des cellules (Shabalina *et al.*, 2002, Damabi *et al.*, 2010). Ces classes de composés bioactifs mises en évidence dans l'extrait aqueux de *P. mannii* pourraient être responsables des propriétés antimicrobiennes rapportées dans la présente étude. Les effets antiparasitaires des dérivés terpenoïdes et saponines isolés des extraits de *P. mannii* ont été également rapportés par d'autres travaux (Kennedy *et al.*, 2013).

L'intérêt pharmacologique d'une substance médicinale ou médicamenteuse réside en la balance entre les effets biologiques bénéfiques et les effets indésirables ou toxiques éventuels. Le profil toxicologique de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* a été évalué en administration unique (toxicité aiguë) et en administration répétée (toxicité subaiguë), pour évaluer le degré d'innocuité de cet extrait de plante. L'administration de l'extrait à une dose unique de 2000 mg/kg ou 5000 mg/kg de poids corporel n'a pas provoqué de mortalité chez les rats femelles et aucun signe majeur de toxicité n'a été observé au niveau du comportement des animaux pendant la période d'observation. Les résultats de la toxicité aiguë ont montré que la dose létale 50 (DL₅₀) de l'extrait aqueux des écorces de *P. mannii* en administration orale unique était supérieure à 5000 mg/kg. Une DL₅₀ supérieure à 5000 mg/kg permet de classer l'extrait comme une substance de la catégorie classe 5 dont la toxicité est relativement

faible, selon le SCGH de l'OCDE (OCDE, 2001; Lauwerys *et al.*, 2007). L'administration unique quotidienne et répétée pendant quatre semaines (28 jours) de l'extrait aux doses de 120, 240 et 480 mg/kg n'a pas affecté de manière sensible la croissance pondérale des rats mâles et femelles, ainsi que leur consommation hydrique. L'extrait a entraîné, par rapport aux témoins traités à l'eau distillée, une augmentation significative du poids relatif du foie chez les femelles traitées à toutes les doses de l'extrait et chez les mâles uniquement à la dose de 480 mg/kg. L'extrait a également modifié de manière significative quelques paramètres hématologiques des rats. L'hématocrite, le volume corpusculaire moyen et le taux d'hémoglobine ont diminué chez les femelles ou dans les deux sexes à différentes doses de l'extrait, alors que la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine a augmenté chez les mâles. Au niveau sérique, on a noté une diminution significative de la quantité de protéines chez les animaux traités à l'extrait aussi bien les femelles que les mâles. L'activité de l'ASAT a également diminué significativement chez les mâles à la dose d'extrait de 240 mg/kg, alors que celle de la phosphatase alcaline a augmenté chez les femelles à la même dose. Le taux de triglycérides a également diminué de manière significative chez les animaux des deux sexes à la dose de 480 mg/kg. Les transaminases sont des enzymes présentes dans de nombreux tissus. Leur activité est élevée dans certains tissus, en particulier le foie (ALAT, ou ASAT à un degré moindre), le cœur, les reins et les muscles (principalement ASAT). En cas de nécrose de ces tissus, ces enzymes sont libérées dans la circulation et leur taux sérique augmente (MERCK, 2007). La baisse des transaminases par contre n'a pas de signification pathologique en soit, sinon un effet cytoprotecteur. Les phosphatases alcalines sont des enzymes localisées dans les membranes des cellules situées dans le foie, les os, l'intestin, le placenta, les reins et les globules blancs circulant dans le sang. La majeure partie (90%) des phosphatases alcalines sont d'origine hépatique et osseuse. Une augmentation des phosphatases alcalines peut être liée à des pathologies osseuses comportant une régénération ostéoblastique, de maladies hépato-biliaires cholestatiques (cholestases extra-hépatique par obstruction des voies biliaires, hépatites virales, cholestases médicamenteuses ou autres causes de cholestase comme les processus tumoraux et la cirrhose) (MERCK, 2007). Le dosage des triglycérides est utile dans le cadre d'un bilan lipidique pour évaluer le risque athérotrombotique ou de développer une maladie cardiaque, mais aussi, en cas de forte augmentation, le risque de pancréatite aiguë. Une hypertriglycéridémie favorise la formation de plaques d'athérome qui augmentent les risques cardiovasculaires et thrombotiques (formation de caillots) ((MERCK, 2007; Doctissimo, 2014). A contrario, une baisse de triglycérides comme celle observée dans cette étude n'a pas de signification pathologique en soit; elle pourrait constituer un effet bénéfique pour la régulation de certaines dyslipidémies.

La diminution du taux des protéines sériques ou hypoprotidémie peut avoir plusieurs causes: la malnutrition protéino-calorique, une malabsorption intestinale, un trouble du métabolisme hépatique (diminution de la synthèse des protéines) ou une insuffisance hépatique (insuffisance hépato-cellulaire), ou plus rarement une insuffisance rénale (syndrome néphrotique), des glomérulonéphrites et des inflammations sévères diverses (Doctissimo, 2014). La numération-formule sanguine (NFS) ou hémogramme permet de mesurer le nombre d'éléments de chacune des trois catégories de cellules sanguines que sont les hématies, les leucocytes et les plaquettes. Elle fournit d'autres indications sur les paramètres liés aux globules rouges, nécessaires pour diagnostiquer une anémie, tels que le volume globulaire moyen (VCM), l'hématocrite (rapport entre volume occupé par les globules rouges et volume sanguin total), le taux d'hémoglobine, la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (MCH), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (MCHC). La diminution significative de l'hématocrite, du volume corpusculaire moyen et du taux d'hémoglobine observée chez les animaux traités avec différentes doses de l'extrait, bien qu'elle ne soit pas associée à une diminution du nombre des globules rouges, est un signe de l'anémie. Elle peut être d'origine centrale (insuffisance médullaire, altération de l'érythropoïèse) ou périphérique (hémolyse, hémorragie, carence en fer, anémie inflammatoire) (MERCK, 2007; Doctissimo, 2014). L'augmentation de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine observée chez les mâles ne conforte également pas l'hypothèse d'un effet inhibiteur de l'extrait sur la production des globules rouges. Les analyses histologiques ont révélé que l'administration quotidienne de l'extrait pendant quatre semaines consécutives a entraîné quelques altérations tissulaires mineures chez quelques animaux traités avec les fortes doses de l'extrait. Aux doses d'extrait de 240 et 480 mg/kg, des infiltrations leucocytaires, une dilatation des capillaires, la congestion vasculaire et/ou une expansion mésangiale ont été observées dans le foie et les reins, une dilatation de l'artère du nodule lymphatique et même l'hémorragie (ischémie tissulaire) dans la rate et un élargissement de la sous-muqueuse dans l'intestin. Ces différentes altérations suggèrent que l'extrait aqueux de *P. manni* serait doté d'une faible toxicité en administration prolongée chez le rat.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au terme de cette étude où il était question d'évaluer l'activité de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *Pittosporum mannii* sur l'activité contractile du muscle lisse intestinal et ses propriétés antidiarrhéiques et antimicrobiennes, il ressort que l'extrait à faibles concentrations (0,01-0,08 mg/mL), possède des propriétés antispasmodiques et spasmolytiques sur le duodénum de rat. Les concentrations élevées (> 0,08 mg/mL) produisent un effet relaxant suivi d'un effet spasmogénique. L'effet relaxant de l'extrait impliquerait au moins en partie, l'activation des récepteurs β -adrénergiques, l'augmentation de la production du monoxyde d'azote et probablement des taux intracellulaires de nucléotides cycliques (AMPc, GMPc), l'activation des canaux K^+ membranaires probablement les canaux K^+ à large conductance activés par le Ca^{2+} (BK_{Ca}) ou le blocage des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de type L. L'extrait pourrait également influencer les flux de Ca^{2+} à partir du compartiment intracellulaire ainsi que les mécanismes de sensibilisation de l'appareil contractile pour induire la relaxation de l'intestin de rat. L'effet contracturant provoqué par une forte concentration de l'extrait pourrait impliquer certains canaux potassiques et les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants. L'extrait aqueux de *P. mannii* a également induit une inhibition significative de la contraction du muscle lisse intestinal induite par divers agents spasmogènes (carbachol, histamine, KCl, $CaCl_2$ et $BaCl_2$). Les résultats de cette étude suggèrent que la relaxation induite par l'extrait sur le duodénum de rat n'implique pas un mécanisme cellulaire spécifique mais relève plutôt d'une action plus générale moins spécifique probablement due à l'action des différents métabolites secondaires (phénols, flavonoïdes, tannins, terpenoïdes, saponines, lipides, etc.) présents dans cet extrait. L'extrait a exercé une faible inhibition sur la motilité intestinale normale (élimination des fèces et la propulsion intestinale normale) et une inhibition importante sur la motilité et/ou la sécrétion intestinales augmentées (transit intestinal stimulé et diarrhée induite avec l'huile de ricin). L'activité antispasmodique et/ou antisécrétoire serait modulée par activation des récepteurs opioïdes dans le tractus gastro-intestinal. Cette activité pourrait contribuer dans les propriétés antidiarrhéiques de cet extrait de plante. L'extrait aqueux de *P. mannii* a exercé également une inhibition sur la croissance de certaines souches microbiennes à l'origine des diarrhées infectieuses. Les effets inhibiteurs sur les contractions du duodénum, la motilité et les sécrétions intestinales de rat pourraient justifier l'utilisation des écorces de *P. mannii* dans la médecine folklorique pour le traitement de la diarrhée. L'activité antimicrobienne observée pourrait accroître le pouvoir antidiarrhéique de cet extrait de plante. Cette étude montre également que les préparations à base des écorces de *Pittosporum mannii* devraient être utilisées à des doses modérées et l'attention devrait être faite tout en utilisant des doses

élevées qui pourraient plutôt produire un effet spasmogénique. En administration subaiguë, l'extrait a montré une toxicité relativement faible. Il serait aussi important pendant le traitement de contrôler régulièrement ses paramètres hématologiques (hématocrite, volume corpusculaire moyen, taux d'hémoglobine) et biochimiques (transaminases, protéines, triglycérides) afin de minimiser les risques de toxicité liés à la prise prolongée de cette plante.

En se référant aux résultats de cette étude, de nombreuses perspectives sont envisageables afin de mieux appréhender les bases pharmacologiques des effets antidiarrhéiques de *Pittosporum mannii* et leurs mécanismes d'action éventuels. Il serait intéressant dans les études ultérieures:

- de fractionner l'extrait et isoler le(s) composé(s) responsable(s) des activités antispasmodique et/ou spasmogénique, antidiarrhéique et antimicrobienne;
- de mesurer les taux intracellulaires de nucléotides cycliques (AMPc, GMPc) dans les cellules de muscles lisses après leur exposition à l'extrait;
- de déterminer la nature des effets antibactériens et antifongiques de l'extrait (CMB, CMI) et d'évaluer les effets de l'extrait sur d'autres souches microbiennes diarrhéigéniques;
- d'évaluer *in vivo* l'activité de l'extrait sur quelques modèles de diarrhées infectieuses induites expérimentalement chez l'animal de laboratoire;
- d'évaluer la toxicité chronique de l'extrait aqueux des écorces de *Pittosporum mannii*.

REFERENCES

Abdelrahim, M.Y., Elamin, B.M.A., Khalil, D.J., El Badwi, S.M.A., 2013. Antidiarrhoeal activity of ethanolic extract of *Adansonia digitata* fruit pulp in rats. *J. Phys. Pharm. Adv.* 3:172-178.

Adjanohoun, J.E., Aboubakar, N., Dramane, K., Ebot, M.E., Ekpere, J.A., Enow-Orock, E.G., Focho, D., Gbile, Z.O., Kamanyi, A., Kamsu, K.J., Keita, A., Mbenkum, T., Mbi, C.N., Mbiele, A.C., Mbome, J.C., Muberu, N.K., Nancy, W.L., Kongmeneck, B., Satabie, B., Sowora, A., Tamze, V., Wirmum, C.K., 1996. Traditional medicine and pharmacopoeia: contribution to ethnobotanical and floristic studies in Cameroon, 1^{ère} ed. *Organization of African Unity; Scientific, Technical and Research Commission (OAU/STRC)*, Porto-Novo, 641 p.

Adler, M., Carpentier, Y., Salmon, I., Hoube, N.J.J., 2008. Gastro-entérologie médico-chirurgicale. Librairie-Cours-42 avenue Paul Héger-1000 Bruxelles, 1-12.

Agunu, A., Yusuf, S., Andrew, G.O., Zezi, A.U., Abdurahman, E.M., 2005. Evaluation of five medicinal plants used in diarrhea treatment in Nigeria. *J. Ethnopharmacol.* 10:27-30.

Akiko, T., Kobayashi, D., Mashimo, H., 2005. Distinct roles of nitric oxide synthases and interstitial cells of Cajal in rectoanal relaxation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 1:35-35

Akimoto, Y., Horinouchi, T., Tanaka, Y., Koike, K., 2002. The β_2 - and β_3 -adrenoceptor mediated relaxation induced by Fenoterol in guinea pig taenia cæcum. *J. Smooth muscle Res.* 38:145-151

Al Jarousha, A.M., El Jarou, M.A., El Qouqa, I.A., 2011. Bacterial enteropathogens and risk factors associated with childhood diarrhea. *Indian J. Pediatr.* 78:165-70.

Ali, M.K., Ashraf, A., Biswas, N.N., Karmakar, U.K., Afroz, S., 2011. Antinociceptive, ant-inflammatory and antidiarrheal activities of ethanolic calyx extract of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Malvaceae) in mice. *J. Chinese Integrative Med.* 9:626-631.

Allen, S.J., Martinez, E.G., Gregorio, G.V., Dans, L.F., 2010. Probiotics for treating acute infectious diarrhea. *Cochrane Database Syst. Rev.* 11:1-124.

AL-Maamori, J.A.I., 2011. Evaluation of the anti-motility-related diarrhoeal activity of the Sage Tea *Salvia officinalis* L. in laboratory mice. *Int. J. Biol.* 3:36-40.

Ammon, H.V., Thomas, P.J., Bass, P., 1975. Effect of oleic acid and ricinoleic on net jejunum water and electrolyte movement. *J. Clin. Invest.* 53:374-379.

Aniagu, S.O., 2009. Toxicological evaluation of herbal medicines: approaches and perspectives. In: Evaluation of herbal medicinal products perspectives on quality, safety and efficacy (eds P.K. Mukherjee and P.J. Houghton), *Pharmaceutical Press*, London, 444-456.

Atta, A.H., Mouneir, S.M., 2004. Evaluation of some medicinal plant extracts for antidiarrhoeal. *Active Phytother. Res.* 19:481-485.

Aviello, G., Scalisi, C., Fileccia, R., Capasso, R., Romano, B., Izzo, A. A., Borrelli, F., 2010. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester, a plant-derived polyphenolic compound, on rat intestinal contractility. *Eur. J. Pharmacol.* 640:163-167.

Awouters, F., Megens, A., Verlinden, M., Schuurkes, J., Niemegeers, C., Janssen, P.A., 1993. Loperamide. Survey of studies on mechanism of its antidiarrheal activity. *Dig. Dis. Sci.* 38: 977-995.

Awouters, F., Niemegeers, C.J.E., Lenaerts, F.M., Janseen, P.A.J., 1978. Delay of castor oil diarrhea in rats: a new way to evaluate inhibitors of prostaglandins biosynthesis. *J. Pharm. Pharmacol.* 30:41-45.

Ayoola, G.A., Coker, H.A.B., Adesegun, S.A., Adepoju-Bello, A.A., Obaweya, K., Ezennia¹, E.C., Atangbayila, T.O., 2008. Phytochemical Screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Trop. J. Pharm. Res.* 7:1019-1024

Aziba, P.I., Okpako, D.T., 2003. Effects of chloroquine on smooth muscle contracted with noradrenaline or high-potassium solutions in the rat thoracic aorta. *J. Smooth Muscle Res.* 39:31-37.

Banji, D., Banji, O., Shanthmurthy, M., Singh, M., 2010. Antidiarrhoeal activity of the alcoholic extract of the leaves of *Butea frondosa* Koen Ex Roxb. *Ind. J. Pharm. Sci.* 72:238-240.

Bassotti, G., Bataglia, E., Dughera, L., Fisogni, S., Zambelli, C., Morelli, A., 2005. Interstitiel cells of Cajal, enteric nerves, and glial cells in colonic diverticular disease. *J. Clin. Pathol.* 58:973-977.

Bayliss, W.M., Starling, E.H., 1899. The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol.* 24:100-143.

Beaugerie, L., Sokol, H., 2014. Les fondamentaux de la pathologie digestive: Enseignement intégré appareil digestif. *CDU-HGE Elsevier Masson*, 288 p.

Beraud, J., 2001. Manuel: le technicien d'analyses biologiques. Guide théorique et pratique. *Edition tec. Et Doc. Paris F.* 75008:1509-1513.

Bernex, F., 2006. Les cellules interstitielles de Cajal: études histologique et physiopathologique. Ou l'histoire d'une cellule encore bien mystérieuse au 21^e siècle. *Bull. Acad. Vét. France*, 159:247-254

Berridge, M.J., Irwin, R.F., 1989. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341:197-204.

- Berridge, M.J., 1975. The interaction of cyclic nucleotides and calcium in control of cellular activity. *Adv. Cycl. Nucl. Res.* 6:1-98.
- Berridge, M.J., 1991. Cytoplasmic calcium oscillation: a two pool model. *Cell Calcium* 12:63-72.
- Berridge, M.J., 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315-25.
- Berridge, M.J., 1995. Capacitative calcium entry. *Biochem. J.* 312:1-11.
- Besra, S.E., Gomes, A., Chaudhury, L., Vedasiromoni, J.R., Ganguly, D.K., 2002. Antidiarrheal activity of seed extract of *Albizia lebbbeck* Benth. *Phytother. Res.* 16:529-533.
- Beubler, E., Juan, H., 1979. Effect of ricinoleic acid and other laxatives on net water flux and prostaglandin E release by the rat colon. *J. Pharm. Pharmacol.* 31:681-685.
- Beyer, P.L., 2004. Medical Nutrition Therapy for Lower Gastrointestinal Tract Disorders. *Krause's Food Nutrition and Diet Therapy* 30:709-711.
- Birschmann, I., Walter, U., 2004. Physiology and pathophysiology of vascular signalling controlled by guanosine 3'5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Acta Biochimica Polonica* 51:397-404.
- Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagamo, P.J., Cohen, R.A., 1994. Nitric oxide directly activates potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368:850-853.
- Bolton, T.B., 1979. Mechanism of action of transmitter and other substances on smooth muscles. *Physiol. Rev.* 59:606-718.
- Bolton, T.B., Prestwich, S.A., Zholos, A.V., Gordienko, D.V., 1999. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Ann. Rev. Physiol.* 61:85-115.
- Borgi, W., Chouchane, N., 2009. Antispasmodic effects of *Zizyphus lotus* (L.) Desf. extracts on isolated rat duodenum. *J. Ethnopharmacol.* 126:571-573.
- Borrelli, F., Borbone, N., Capasso, R., Montesano, D., De Marino, S., Aviello, G., Aprea, G., Masone, S., Izzo, A.A., 2009. Potent relaxant effect of a *Celastrus paniculatus* extract in the rat and human ileum. *J. Ethnopharmacol.* 122:434-438.
- Bylka, W., Matlawska, I., Pilewski, N.A., 2004: Natural flavonoids as antimicrobial agents. *JANA* 17:24-31.
- Caeiro, J.P., DuPont, H.L., Albrecht, H., Ericsson, C.D., 1999. Oral rehydration therapy plus loperamide versus loperamide alone in the treatment of traveler's diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* 28:1286-1289.
- Cajal, R.V., 1893. Sur les ganglions et plexus nerveux d'intestin. *CR SOC Biol* 5:17-23.
- Capasso, F., Mascolo, N., Autore, G., Romano, V., 1986. Laxatives and the production of autacoids by rat colon. *J. Pharm. Pharmacol.* 38:627-629.

Capasso, F., Mascolo, N., Izzo, A.A., Gaginella, T.S., 1994. Dissociation of castor oil-induced diarrhoea and intestinal mucosal injury in rat: effect of N^G-nitro-L-arginine methyl ester. *Br. J. Pharmacol.* 113:1127-1130.

Capasso, R., Borrelli, F., Aviello, G., Romano, B., Scalisi, C., Capasso, F., Izzo, A.A., 2008. Cannabidiol, extracted from *Cannabis sativa*, selectively inhibits inflammatory hypermotility in mice. *Br. J. Pharmacol.* 154:1001-1008.

Carré, D., Coton, T., Delpy, R., Guisset, M., Debonne, J.M., 2001. Diarrhées aiguës infectieuses: traitement actuel et perspectives. *Médecine Tropical* 61:521-528.

Castronovo, J.M., Frank, O., 1977. Principles properties and quality control of nuclear medicine agents, in "Nuclear Medicine Physics, instrumentation and agents", *Mosby company*, Saint-Louis, USA, 572-574, 658-659.

Cezard, J.P., Chouraqui, J.P., Gottrand, J.P. et le Groupe Francophone d'Hépatologie, Gastro-entérologie et Nutrition Pédiatrique, 2002. Traitement médicamenteux des diarrhées aiguës infectieuses du nourrisson et de l'enfant. *Arch. Pédiatr.* 9:620-628.

Chan, S.S-K., Choi, A.O-K., Jones, R.L., Lin, G., 2006. Mechanisms underlying the vasorelaxing effects of butylidenephthalide, an active constituent of *Ligusticum chuanxiong*, in rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 537:111-117.

Cheftel, J.C., Cheftel, H., Besanson, R., 1989. Aspect toxicologique: introduction à la biochimie et à la technique des aliments. *Lavoisier*, Paris, pp 137-161.

Chen, G., Zhu, L., Liu, Y., Zhou, Q., Chen, H., Yang, J., 2009. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, plays a dual role in regulating gastrointestinal motility *in vitro* and *in vivo*. *Phytother. Res.* 23:498-506.

Chen, L.C., Lee, M.H., Chou, M.H., Lin, M.F., Yang, L.L., 1999. Pharmacokinetic study paeoniflorin in mice after oral administration of Paeoniae extract. *J. Chromato. Bull.* 753:33-40.

Chevalier, A., 1946. Sur la répartition géographique des *Pittosporum* et les affinités des espèces de l'Ouest africain et des Canaries. *Bull. Soc. Bot. France* 93:7-8, 204-209.

Ching, F.P., Omogbai, E. K. I., Ozolua, R. I., Okpo, S. O., 2008. Antidiarrhoeal activities of aqueous extract of *Stereospermum kunthianum* (Cham, Sandrine Petit) stem bark in rodents. *Afr. J. Biotechnol.* 7:1220-1225

Chitme, H.R., Chandra, R., Kaushik, S., 2004. Studies on anti-diarrheal activity of *Calotropis gigantea* R. BR. in experimental animals. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 7:70-75.

Chiwororo, W.D.H., Ojewole, J.A.O., 2009. Spasmolytic effect of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract on rat isolated uterine horns. *J. Smooth Muscle Res.* 45:31-38.

Clarkson, C., Maharaj, V.J., Crouch, N.R., Grace, O.M., Pillay, P., Matsabisa, M.G., Bhagwandin, N., Smith, P.J., Folb, P.I., 2004. *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *J. Ethnopharmacol.* 92:177-191.

Coker, M.F., Berky, S., Pandou, C., 1998. New development in acute diarrhoea current problem. *Paediatrics* 24:15-17.

Cook, N.S., Quast, U., Hof, R.P., Baumun, Y., Pally, C., 1988. Similarity in the mechanism of action of two new vasodilator drugs: pinacidil and BRL-34915. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 11:90-91.

Corompt, E., Bessard, G., Lantuejoul, S., Naline, E., Advenier, C., Devillier, P., 1998. Inhibitory effects of large Ca^{2+} activated K^+ channel blockers on beta-adrenergic and NO-donor mediated relaxations of human and guinea-pig airway smooth muscles. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 357:77-86.

Cousins, H.M., Edwards, F.R., Hickey, H., Hill, C.E. and Hirst, G.D.S., 2003. Electrical coupling between the myenteric interstitial cells of Cajal and adjacent muscle layers in the guinea-pig gastric antrum. *J. Physiol.* 550:829-844.

Cowan, M.M., 1996. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:564-582.

Coates Palgrave painting: The Trees of Central Africa“, page 345, 1957, requested from <http://plants.jstor.org/visual/kpal00000088> (Jan 20, 2013).

Cronquist, A., 1981. An integrated system of classification of flowering plants. *Columbia University Press*, New York, 1262 p.

Crosnier, C., Stamatakis, D., Lewis, J., 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Review of Genetics* 7:349-359.

Czerucka, D., Roux, I., Rampal, P. 1994. *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3',5'-cyclic monophosphate induction in intestinal cells. *Gastroenterology* 106:65-72

Dahanukar, S.A., Kulkarni, R.A., Rege, N.N., 2000. Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Ind. J. Pharmacol.* 32:S81-S118.

Dahiru, D., Sini, J.M., John-Africa, 2006. Antidiarrhoeal activity of *Ziziphus mauritiana* root extract in rodents. *Afr. J. Biotechnol.* 5:941-945.

Damabi, M. N., Moazedi, A.A., Seyyednejad. S. M., 2010. The role of α - and β -adrenergic receptors in the spasmolytic effects on rat ileum of *Petroselinum crispum* Latifolium (parsley). *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2010:866-870.

Damiki, L., Siva H., 2011. Ethnomedicinal plants used for diarrhea by tribals of Meghalaya, Northeast India. *Phcog. Rev.* 5:147-154.

Desire, O., Rivière, C., Razafindrazaka, R., Goossens, L., Moreau, S., Guillon, J., Uverg-Ratsimamanga, S., Andriamadio, P., Moore, N., Randriantsoa, A., Raharisololalao, A., 2010. Antispasmodic and antioxidant activities of fractions and bioactive constituent davidigenin isolated from *Mascarenhasia arborescens*. *J. Ethnopharmacol.* 130: 320-328.

Di Carlo, G., Autore, G., Izzo, A. A., Maibline, P., Mascolo, N., Viola, P., Diurno M. V., Capasso, F. (1993). Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure activity relationships. *J. Pharm. Pharm.* 45:1054-1059.

Dickens, E.J., Edwards, F.R., Hirst, G.D.S., 2001. Selective knockout of intramuscular interstitial cells reveals their role in the generation of slow waves in mouse stomach. *J. Physiol.* 531:827-833.

Dickens, E.J., Hirst, G.D.S., Tomita, T., 1999. Identification of rhythmically active cells in guinea-pig stomach. *J. Physiol.* 51:515-531.

Diezi, J., 1992. Principes de base et repercussions cliniques. In: Pharmacologie: Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, Shorderet, M., *ed privat-docet, Frison-roche, paris*, pp 33-43.

Dimo, T., Rakotonirina, A., Kamgang, R., Tankwa, T.R., K. Wanda, G. J. M., 2001. Effets de l'extrait au cyclohexane de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) sur la motricité intestinale de rat. *Afr. J. Sci. Technol. (AJST)* 2:32-35

Djimeli, C. L., Arfao, A.T., Ewoti, O.V.N., Bricheux, G., Nola, M., Sime-Ngando, T., 2014b. Adhesion of *Candida albicans* to polythene in sodium hypochlorite disinfected aquatic microcosm and potential impact of cell surface properties. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* 2:479-489

Djimeli, C. L., Arfao, A.T., Ewoti, O.V.N., Nougang, M.E., Mougang, M.L., Bricheux, G., Nola, M., Sime-Ngando, T., 2014a. Mixture of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide on adhered *Aeromonas hydrophila* to solid substrate in water: Impact of concentration and assessment of the synergistic effect. *Int. J. Bacteriol.* 2014:1-13.

Djimeli, C. L., Arfao, A.T., Rossi, V., Nsulem, N., Raspal, V., Bricheux, G., Nola, M., Sime-Ngando, T., 2016. Impact of two disinfectants on detachment of *Enterococcus faecalis* from polythene microcosm. *Res. Biotechnol.* 7:28-42.

Doctissimo santé, 2014. Le rôle de l'appareil digestif. [http.www...](http://www...) consulté le 28 18 14

Doherty, N.S., Hancock, A.A., 1883. Role of α -adrenergic receptors in the control of diarrhea and intestinal motility. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 225:269-274.

Du, C., Carl, A., Smith, T.K., Sanders, K.M., Keef, K.D., 1994. Mechanism of cyclic AMP-induced hyperpolarization in canine colon. *JPET* 268:208-215.

Dubravka, B., Suzana, B., Dusanka, K., Mirjana, R., Teodora, J., Katarina, S., Slavoljub, Z., 2010. Relaxant effect of the ethanol extract of *Helichrysum plicatum* (Asteraceae) on isolated rat ileum contractions. *Molecules* 15:3391-3401.

Edwards, F.R., Hirst, G.D.S., Suzuki, H., 1999. Unitary nature of regenerative potentials recorded from circular smooth muscle of guinea-pig antrum. *J. Physiol.* 9: 235-250.

Ehlert, F.J., 2003. Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal, airway and urinary bladder smooth muscle. *Life Sciences* 74:355-366.

Emendörfer, F., Bellato, F., Noldin, V.F., Niero, R., Cechinelfilho, V., Cardozo, A.M., 2005. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. *J. Pharmacol. Sci.* 8:63-68.

Ericsson, C.D., Johnson, P.C., 1990. Safety and efficacy of loperamide. *Am. J. Med.* 88:S10-S14.

Eshraghian, A., Eshraghian, H., 2011. Interstitial cells of Cajal: A novel hypothesis for pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Can. J. Gastroenterol.* 25:277-279.

Eto, M., Furuya, K., Morita, F., Ohmori, T., Suzuki, M., 1995. A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J. Biochem.* 118:1104-1107.

Eto, M., Morita, F., Senba, S., Yazawa, M., 1997. Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle. *FEBS Lett.* 410:356-360.

Ezekwesili, C.N., Obiara, K.A., Ugwu, O.P., 2004. Evaluation of anti-diarrhoeal properties of crude aqueous extract of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) in rats. *Biochemistry* 16:122-131.

Ezekwesili, J.O., Nkemdilim, U.U., Okeke, C.U., 2010. Mechanism of antidiarrhoeal effect of ethanolic extract of *Psidium guajava* leaves. *Biokemistri* 22:85-90.

Farthing, M.J.G., 1993. Pathophysiology of infective diarrhoea. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 5:796-807.

Farthing, M.J.G., 2000. Diarrhoea: a significant worldwide problem. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14:65-69.

Farthing, M.J.G., 2002. Novel targets for the control of secretory diarrhea. *Gut* 50:15-18.

Farthing, M.J.G., Kelly, M.P., Veitch, A.M., 1996. Recently recognized microbial enteropathies and HIV infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 37:61-70.

Farthing, M.J.G., Turvill, J.L., 1997. Intestinal absorption and secretion: role of the enteric nervous system. In: Galmiche, J.P., Gournay, J. E.D. Recent advance in the pathophysiology of gastro-intestinal and liver diseases. *John Libbey Eurotext, Paris*, pp 173-183.

Fattorusso, V., Ritter, O., 2004. *Vadémécum Clinique: Du diagnostic au traitement*. 17^e Ed. *Masson*, pp 1053-1058.

Fattoum, A., 1997. Régulation de la contraction du muscle lisse. *Médecine/Sciences* 13:777-789.

Fawole, O.A., Finnie J. F., Van Staden, J., 2009. Antimicrobial activity of twelve medicinal plants used for treating of gastroenteritis in South Africa. *S. Afr. J. Bot.* 75:356-362.

Fawzi, M., 2013. Traditional medicines in Africa: An appraisal of ten potent African medicinal plants. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2013:1-14

Felder, C.C., 1995. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J.* 9: 619-625.

Fermor, B., Weinberg, J.B., Pisetsky, D.S., Misukonis, M.A., Banes, A.J. & Guilak, F. (2001) The effects of static and intermittent compression on nitric oxide production in articular cartilage explants. *J. Orthopaedic Res.* 19:729-737.

Fewtrell, L., Kaufmann, R.B., Kay, D., Enanoria, W., Haller, L., Colford, J.M., 2005. Water, Sanitation, and Hygiene Interventions to Reduce Diarrhoea in Less developed Countries: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infect. Dis.* 5:42-52.

Fleurentin, J., Joyeux, M., 1990. Les tests *in vitro* et *in vivo* dans l'évaluation des substances d'origine naturelle. In *Ethnopharmacologie: Source, méthodes, objectifs*. Ed. *ORSTOM*, pp 248-257.

Focho, D. A., Ndam, W. T., Fonge, B. A., 2009. Medicinal plants of Aguambu - Bamumbu in the Lebialem highlands, South west province of Cameroon. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 3:001-013

Frank, H., Netter, M.D., 2003. *Atlas d'Anatomie Humaine, 3^e édition, MASSON*, 553 p.

Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredickson, D.S., 1972. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18:499-502.

Fujita, A., Okishio, Y., Fujinami, K., Nakagawa, M., Takeuchi, T., Takewaki, T., Hata, F., 2004. Role of the interstitial cells distributed in the myenteric plexus in neural reflexes in the mouse ileum. *J. Pharmacol. Sci.* 96:483-492.

Gaginella, T.S., Stewart, J.J., Olson, W.A., Bass, P., 1975. Actions of ricinoleic acid and structurally related fatty acid on the gastro-intestinal tract II. Effects on water and electrolyte absorption *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 195:355-361.

Galvez, J., Zarzuelo, A., Crespo, M.E., Lorente, M.D., Ocete, M.A., Jimenez, J., 1993. Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Medica.* 59:333-336.

Ghayur, M.N., Gilani, A.H., Afridi, M.B., Peter, J., Houghton, P.J., 2005. Cardiovascular effects of ginger aqueous extract and its phenolic constituents are mediated through multiple pathways. *Vasc. Pharmacol.* 43:234-241.

Ghazouli, K., Holzer, P. 2004. Inhibition of Guinea Pig intestinal peristalsis by the flavonoids Quercetin, Naringenin, Apigenin and Genistein. *Int. J. Exp. Clin. Pharm.* 70:5-14.

Giguère, S., 2013. Antimicrobial drug action and interaction: An introduction. In: Giguère, S., Prescott, J.F., Baggot, J.D., Walker, R.D. and Dowling, P.M., Eds., *Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine* (4th ed.), Blackwell Publishing, Ames Iowa.

Gilani, A., Khan, A., Raof, M., Ghayur, M., Siddiqui, B., Vohra, W., Begum, S., 2008. Gastrointestinal, selective airways and urinary bladder relaxant effect of *Hyoscyamus niger* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and Ca²⁺ channels. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 22:87-99.

Gilani, A.H., Bashir, A., Janbaz, K.H., Khan, A., 2005a. Pharmacological basis for the use of *Fumaria indica* in constipation and diarrhea. *J. Ethnopharmacol.* 96:585-589.

Gilani, A.H., Bashir, S., Janbaz, K.H., Shah, A.J., 2005b. Presence of cholinergic and calcium channel blocking activities explains the traditional use of *Hibiscus rosasinensis* in constipation and diarrhoea. *J. Ethnopharmacol.* 102:289-294.

Gilani, A.H., Khan, A.U., Ali, T., Ajmal, S., 2008. Mechanisms underlying the antispasmodic and bronchodilatory properties of *Terminalia bellerica* fruit. *J. Ethnopharmacol.* 116:528-538.

Golenhofen, K., Lammel, E., 1972. Selective suppression of some components of spontaneous activity in various types of smooth muscle by iproveratril (verapamil). *Pflügers Arch.* 331:233-243.

Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177:751-766.

Grassa, L., Rebollar, E., Arruebo, M. p., Plaza, M. A., Murillo, M. D., 2004. The role of Ca²⁺ in the contractility of rabbit small intestine *in vitro*. *J. Physio. Pharmacol.* 55:639-650.

Grassa, L., Rebollar, E., Arruebo, M.P., Plaza, M.A., Murillo, M.D., 2005. The role of NO in the contractility of rabbit small intestine *in vitro*: effect of K⁺ channels. *J. Physiol. Pharmacol.* 56: 407-419.

Gregory, L.L., Gianrico, F., 2003. Ion channels in gastrointestinal smooth muscle and interstitial cells of cajal. *Current Opinion in Pharmacology* 3:583-587.

Guan, Y. Y., Kwan, C. Y., Daniel, E. E., 1984. The effects of EGTA on vascular smooth muscle contractility in calcium-free medium. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 66:1053-1056.

Guerrant, R.L., Van Gilder, T., Steiner, T.S., *et al.*, 2001. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* 32:331-351 335.

Gupta, S.S., 1994. Prospect and perspectives of Natural Plants Products in medicine. *Indian J. Pharmacol.* 26:1-12.

Gutierrez, R.M.P., Mitchell, S., Solis, R.V., 2008. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 117:1-27.

Gutiérrez, S.P., Mendoza, D.Z., Munive, A.H., Martínez, A.M., González, P., Mendoza, E.S., 2013. Antidiarrheal Activity of 19-Deoxycetexone Isolated from *Salvia ballotiflora* Benth in Mice and Rats. *Molecules* 18:8895-8905

Guyton, A.C., Hall, J.E., 2006. Textbook of Medical Physiology. 11th ed. *Elsevier Saunders*, Philadelphia, pp 781-790.

Hanani, M., Freund, H.R., 2000. Interstitial cells of Cajal - their role in pacing and signal transmission in the digestive system. *Acta Physiol. Scand.* 170:177-190.

Hansen, M.B., 2003a. Neurohormonal control of gastrointestinal motility. *J. Physio Res.* 52:1-30

Hansen, M.B., 2003b. The enteric nervous system II: Gastrointestinal functions. *Pharmacol. Toxicol.* 92:249-257.

Hansen, T.R., Dineen, D.X., Petrak, R., 1984. Mechanism of action of barium ion on aortic smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 246:C235-C241.

Hara, Y., Kubota, M., Szurszewski, J.H., 1986. Electrophysiology of smooth muscle of the small intestine of some mammals. *J. Physiol. (Lond.)* 372:501-520.

Hartshorne, D.J., Ito, M., Erdodi, F., 1998. Myosin light chain phosphatase: subunit, composition, interactions and regulation. *J. Smooth Muscle Res. Cell. Motil.* 19:325-341.

Hashimoto, R., Hirata, M., Ito, Y., 1985. A role of inositol 1,4,5-triphosphate in the initiation of agonist-induced contractions of dog tracheal muscle. *Br. J. Pharmacol.* 86:191-199.

Hasler, W.L., 2003. Pharmacotherapy for intestinal motor and sensory disorders. *Gastroenterology Clinics of North America* 32:707-732.

Hasler, W.L., 2006. Small intestine motility. In: Physiology of the gastrointestinal tract, edited by Johnson LR. *Elsevier Academic Press*, Oxford p. 935-964.

Hawker, P.C., Mashiter, K.E., Turnberg, L.A., 1978. Mechanisms of transport of Na, Cl, and K in the human colon. *Gastroenterology* 74:1241-1247.

Heel, R. C., Brogden, R. N., Speight, T. M. & Avery, G. S. (1978). Loperamide: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in diarrhea. *Drug* 15:33-52.

Heinrich, M., Heneka, B., Ankli, A., Rimpler, H., Sticher, O., Kostiza, T., 2005. Spasmolytic and antidiarrhoeal properties of the Yucatec Mayan medicinal plant *Casimiroa tetrameria*. *J. Pharm. Pharmacol.* 57:1081-1085.

Hejazian-Y, S.H., Dashti-R, M.H., Mahdavi, S.M., Qureshi, M.A., 2009. The effect of *Carum copticum* extract on acetylcholine induced contraction in isolated rat's ileum. *J. Acupunct. Meridian Stud.* 2:75-78.

Hirchhorn, N., 1980. The treatment of acute diarrhoea in children: an historical and physiological perspective. *Am. J. Clinic. Nutrit.* 33:637-663.

Hirst, G.D.S., Edwards, F.R., 2001. Generation of slow waves in the antral region of guinea-pig stomach - a stochastic process. *J. Physiol.* 535:165-180.

Hirst, G.D.S., Ward, S.M., 2003. Interstitial cells: involvement in rhythmicity and neural control of gut smooth muscle. *J. Physiol. (Lond)* 550: 337-346.

Holt, G., Krieg, N.R., Sneath, P. H. A.J., Staley, T., Williams, S.T., 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. *Lipponcott Williams and Wilkins*, Philadelphia, Pa, USA, 9th edition. 359 p.

Holtug, K., Hansen, M.B., Skadhauge, E., 1996. Experimental studies of intestinal ion and water transport. *Scand J Gastroenterol.* 31 Suppl 216:95-110.

Hori, M., Karaki, H., 1998. Regulatory mechanisms of calcium sensitization of contractile elements in smooth muscle. *Life Sci.* 62:1629-1633.

Horio, S., Nagare, T., Ishida, Y., Moritoki, H., 1998. Effects of local anesthetics on acetylcholine-induced desensitization of Guinea-pig longitudinal ileal muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286:221-227.

Horowitz, A., Menice, C.B., Laporte, R., Morgan, K.G., 1996. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.* 76: 967-1003

Hotta, A., Kim Y.C., Nakamura, E., Kito, Y., Yamamoto, Y., Suzuki, H., 2005. Effects of inhibitors of nonselective cation channels on the acetylcholine-induced depolarization of

circular smooth muscle from the guinea-pig stomach antrum. *J. Smooth Muscle Res.* 41:313-327

Hu, J., Gao, W.Y., Gao, Y., Ling, N.S., Huang, L.Q., Liu, C.X., 2010. M3 muscarinic receptor- and Ca²⁺ influx-mediated muscle contractions induced by croton oil in isolated rabbit jejunum. *J. Ethnopharmacol.* 129:377-380.

Huizinga, J.D., Stern, H., Chow, E., Eiamant, N.E., El-Sharkawy, T.Y., 1985. Electrophysiological control of motility in the human colon. *Gastroenterol.* 88:500-511.

Huizinga, J.D., Thuneberg, L., Kluppel, M., Malysz, J., Mikkelsen, H.B., Bernstein, A., 1995. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 373:347-349.

Huizinga, J.D., Thuneberg, L., Vanderwinden, J.-M., Rumessen, J., 1997. Interstitial cells of Cajal as targets for pharmacological intervention in gastrointestinal motor disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 18:393-403.

Imtiaz, M.S., Katnik, C.P., Smith, D.W., Van Helden, D.F., 2006. Role of voltage-dependent modulation of store Ca²⁺ release in synchronization of Ca²⁺ oscillations. *Biophysical Journal* 90:1-23

Ishikawa, S., Komori, K., Nagao, T., Suzuki, H., 1985. Effects of diltiazem on electrical responses evoked spontaneously or by electrical stimulation in the smooth muscle cells of the guinea-pig stomach. *Br. J. Pharmacol.* 86:789-797.

Izzo, A.A., Mascolo, N., Capasso, F., 1998. Nitric oxide as modulator of intestinal water and electrolyte transport. *Digestive Diseases and Sciences* 43:1605-1620.

Jenkinson, D.H., 2006. Potassium channels - multiplicity and challenges. *Br. J. Pharmacol.* 147:s63-s71.

Jin, X., Malykhina, A.P., Lupu, F., Akbarali, H.I., 2004. Altered gene expression and increased bursting activity of colonic smooth muscle ATP-sensitive K⁺ channels in experimental colitis. *Am. J. Physiol.* 287:G274-G285.

Jin, X., Morsy, N., Shoeb, F., Zavzavadjian, J., Akbarali, H.I., 2002. Coupling of M₂ muscarinic receptor to L-type Ca channel via c-src kinase in rabbit colonic circular smooth muscle. *Gastroenterology* 123:827-834.

Jodal, M., Holmgren, S., Lundgren, O., Sjoqvist, A., 1993. Involvement of the myenteric plexus in the cholera toxin induced net fluid secretion in the rat small intestine. *Gastroenterol.* 105:1286-1293.

Jonsson, M., Jestoi, M., Nathanail, A.V., Kokkonen, U.-M., Anttila, M., Koivisto, P., Karhunen, P., Peltonen, K., 2013. Application of OECD Guideline 423 in assessing the acute oral toxicity of moniliformin. *Food Chem. Toxicol.* 53:27-32.

Kamgang, R., Gonsu, K.H., Wafo, P., Mbungni, N.J.A., Pouokam, E.V., Fokam, T.M.A., Fonkoua, M.C. 2007. Activity of aqueous ethanol extract of *Euphorbia prostata* on *Shigella dysenteriae* type 1- induced diarrhea in rats. *Ind. J. Pharmacol.* 240-244.

Kamgang, R., Pouokam, E.V., Fonkoua, M.C., Penlap, N.B.V., Biwolé, S.M., 2006. Activities of aqueous extracts of *Mallotus opposifolium* on *Shigella dysenteriae* A₁-induced diarrhea in rats. *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.* 33:89-94.

Kamgang, R., Zintchem, R., T. Dimo, T., Yewah, P., 2001. Effets des extraits totaux aqueux de *Mallotus oppositifolium* et de *Euphorbia hirta* (Euphorbiaceae) sur l'activité contractile intestinale de rat. *Afr. J. Sci. Technol. (AJST)* 2:8-11

Kaneda, T., Shimizu, K., Nakajyo, S., Urakawa, N., 1997. Effects of various selective phosphodiesterase inhibitors on muscle contractility in guinea pig ileal longitudinal smooth muscle. *Jpn. J. Pharmacol.* 75:77-85.

Karaki, H., Ozaki, H., Hori, M., 1997. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 49:157-230.

Karaki, H., Weiss, G., 1988. Mini-review: calcium release in smooth muscles. *Life Sci.* 42:111-122.

Kawada, T., Ishibashi, T., Sasage, H., Kato, K., Imai, S., 1994. Modification by LY83583 and methylene blue of relaxation induced by nitric oxide, glyceryl trinitrate, sodium nitroprusside and atriopeptin in aortae of the rat, guinea-pig and rabbit. *Gen. Pharmacol.* 25:1361-1371.

Kazic, T., Milosavljevic, D., 1976. Influence of adenosine, cAMP and db-cAMP on responses of the isolated terminal guinea-pig ileum to electrical stimulation. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 223:187-195.

Kennedy, D., Nyongbela, A. M., Lannang, Godfred A, Ayimele, Moses N, Ngemenya, Quentin Bickle, Simon Efang. 2013. Isolation and identification of an antiparasitic triterpenoid estersaponin from the stem bark of *Pittosporum mannii* (Pittosporaceae). *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 3:389-392

Kim, B.J., So, I., Kim, K.W., 2006b. The relationship of TRP channels to the pacemaker activity of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *J. Smooth Muscle Res.* 42:1-7.

Kim, Y.C., Hayase, M., Nakamura, E., Kito, Y., Suzuki, H., 2006 a. Effects of 5-hydroxytryptamine on electrical responses of circular smooth muscle isolated from the guinea-pig gastric antrum. *J. Smooth Muscle Res.* 42:203-216

Kimberg, D.V., Field, M., Johnson, J., Henderson, A., Gershon, E., 1971. Stimulation of intestinal mucosal adenylyl cyclase by cholera enterotoxin and prostaglandins. *J. Clin. Invest.* 50:1218-1230.

Kishore, D.V., Rahman, R., 2012. Spasmolytic activity of *Casuarina equisetifolia* barks extract. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 3:1452-1456.

Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T.P., Brautigan, D.L., 2000. Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J. Biol. Chem.* 275: 9897-9900.

Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T.P., Khalequzzaman, M., 2003. Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca^{2+} sensitization in rabbit smooth muscle. *J. Physiol.* 546:879-889.

Kito, Y., Suzuki, H., 2003a. Properties of pacemaker potentials recorded from myenteric interstitial cells of Cajal distributed in the mouse small intestine. *J. Physiol.* 553:803-818.

Kito, Y., Suzuki, H., 2003b. Electrophysiological properties of gastric pacemaker potentials. *J. Smooth Muscle Res.* 39:163-173.

Kito, Y., Suzuki, H., 2006. Effects of Dai-kenchu-to on spontaneous activity in the mouse small intestine. *J. Smooth Muscle Res.* 42:189-201

Ko, E.A., Han, J., Jung, I.D., Park, W.S., 2008. Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth muscle cells. *J. Smooth Muscle Res.* 44:65-81.

Koh, S.D., Sanders, K.M., 1996. Modulation of Ca^{2+} current in canine colonic myocytes by cyclic nucleotide-dependent mechanisms. *Am. J. Physiol.* 271 (*Cell Physiology* 40):C794-C803.

Koh, S.D., Sanders, K.M., Ward, S.M., 1998. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. *J. Physiol.* 513:203-213.

Koike, K., Horinouchi, T., Takayanagi, I., 1995a. Signal transduction pathway involved in β_3 -adrenoceptor-mediated relaxation in guinea pig taenia caecum. *Jpn. J. Pharmacol.* 68:41-46.

Koike, K., Horinouchi, T., Takayanagi, I., 1995b. Possible mechanisms of β -adrenoceptor-mediated relaxation induced by noradrenaline in guinea pig taenia caecum. *Eur. J. Pharmacol.* 279:159-163.

Koike, K., Horinouchi, T., Yamamoto, Y., 2000. The β_3 -Adrenoceptor-mediated relaxation induced by epinephrine in guinea-pig taenia caecum. *J. Smooth Muscle Res.* 36: 93-99

Koike, K., Ichino, T., Horinouchi, T., Takayanagi, I., 1997. The β_2 - and β_3 -adrenoceptor-mediated relaxation induced by isoprenaline and salbutamol in guinea pig taenia cæcum. *J. Smooth Muscle Res.* 33:99-106.

Koike, K., Takayanagi, I., Muramatsu, M., Ohki, S., Horinouchi, T., 1994. Involvement of β_3 -adrenoceptor in the relaxation response in guinea pig taenia cæcum. *Jpn. J. Pharmacol.* 66:213-220.

Komuro, T., Seki, K., Horiguchi, K., 1999. Ultrastructural characterization of the interstitial cells of Cajal. *Arch. Histol. Cytol.* 62:295-316.

Komuro, T., Tokui, K., Zhou, D.S., 1996. Identification of the interstitial cells of Cajal. *Histol. Histopathol.* 11: 769-786.

Kumar, S., Dewan, S., Sangraula, H., Kumar, V.L., 2001. Antidiarrheal activity of the latex of *Calotropis procera*. *J. Ethnopharmacol.* 76:115-118.

Kuriyama, H., Kitamura, K., Nabata, H., 1995. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacol. Rev.* 47:387-573.

Lakshminarayana, M., Shivkumar, H., Rimaben, P., Bhargava, V.K., 2011. Antidiarrhoeal activity of leaf extract of *Moringa Oleifera* in experimentally induced diarrhoea in rats. *Int. J. Phytomed.* 3:68-74.

Lam, F.F.Y., Yeung, J.H.K., Chan, K.M., Yu Or, P.M., 2007. Relaxant effects of danshen aqueous extract and its constituent danshensu on rat coronary artery are mediated by inhibition of calcium channels. *Vasc. Pharmacol.* 46:271-277.

Laurent, F., Michel, A., Bonnet, P.A., Chapat, J.P., Boucard, M., 1993. Evaluation of the relaxant effects of SCA40, a novel charybdotoxin-sensitive potassium channel opener, in guinea-pig isolated trachealis. *Br. J. Pharmacol.* 108:622-626.

Lauwerys, R., Haufroid, V., Houet, P., Lison, D., 2007. Exposition admissible aux substances chimiques en milieu professionnel. Chap. V. In Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles, 5^{ème} édition. *Issy-Les-Moulineaux:Masson.* p 89.

Lechat, P., Lagier, G., Rouveix, D., Vincens, P., Weber, S., 1982. Pharmacologie médicale. *Masson, Paris* 764 p.

Leclerc, H., Gaillard, J.L., Simonet, M., 1995. Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien. *Doin Ed.Paris*:119-134.

Lee, J.Y., Kang, H.S., Park, B.E., Moon, H.J., Sim, S.S., Kim, C.J., 2009. Inhibitory effects of Geijigajakyak-Tang on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J. Ethnopharmacol.* 79:53-56.

Lin, J., Puckree, T., Mvelase, T.P., 2002. Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. *J. Ethnopharmacol.* 79:53-56.

Lizuka, T., Sakai, H., Moriyama, H., Suto, N., Nagai, M., Bagchi, D., 2009. Vasorelaxant effects of forsythide isolated from the leaves of *Forsythia viridissima* on NE-induced aortal contraction. *Phytomedicine* 16:386-390

Loirand, G., Lompré, A.M., Savineau, J-P., Pacaud, P., 1997. Tonus des muscles lisses vasculaires: transmissions du signal dépendantes et indépendantes du Ca^{2+} . *Méd. Sci.* 13:766-776.

Longo, M., Jain, V., Vedernikov, Y.P., Hankins, G.D., Garfield, R.E., Saade, G.R., 2003. Ca^{2+} -channel blockade, K^+ (ATP)-channel opening and nitric oxide on human uterine contractility in relation to gestational age and labour. *Molecular human reproduction* 9:159-164.

Lucas, K.A., Pitari, G.M., Kazerounian, S., Ruiz- Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K.P., Waldman, S.A., 2000. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* 52:375-414.

Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A., 2001. Atlas de poche de pharmacologie. *Flammarrion, Med. Sci.*, 2^e ed. 376 p.

Mader, S.S., 2004. Understanding human anatomy and physiology. *The McGraw–Hill Companies*, 5th edition, 444 p.

Maeda, H., Yamagata, A., Nishikawa, S., Yoshinaga, K., Kobayashi S, Nishi K, Nishikawa, S.I., 1992. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 116:369-375.

Makhlouf, G.M., Murthy, K.S., 2006. Cellular physiology of gastrointestinal smooth muscle. In Johnson, L.R editor. Physiology of gastrointestinal tract. *Elsevier*, Paris, pp 523-532.

Makhlouf, M.G., 1994. Neuromuscular function of the small intestine, In: Johnson, L.R. (Ed.), Physiology of the Gastrointestinal Tract, *Third ed. Raven Press*, New York, pp 977-990.

Marieb, E.N., 1999. Anatomie et physiologie humaines, 4^{ème} ed. *De Boeck University*, Québec. pp 853-906.

Mascolo, N. Izzo, A.A., Avtore, G., Barboto, F., Capasso, F., 1994. Nitric oxide and castor oil-induced diarrhea. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268:291-295.

Matsumoto, T., Horiuchi, M., Kamata, K., Seyama, Y., 2009. Effects of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Scherff treated with enzyme on histamine-induced contraction of guinea-pig ileum and on histamine release from mast cells. *J. Smooth Muscle Res.* 45:43-54.

Matsumoto, T., Nishiyama, M., Kobayashi, T., Kasuya, Y., Kamata, K., 2005. Effect of phorbol 12,13-dibutyrate on smooth muscle tone in rat stomach fundus. *J. Smooth Muscle Res.* 41:107-116.

Matusak, O., Kuchel, O., Hamet, P., 1991. Effect of atrial natriuretic factor and 8-bromo cyclic guanosine 3':5'-monophosphate on [3H]acetylcholine outflow from myenteric plexus longitudinal muscle of the guinea pig. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257:107-113.

Mayer, B., Brunner, F., Schmidt, K., 1993. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem. Pharmacol.* 45:367-374.

Mbagwu, H.O.C., Adeyemi, O.O., 2008. Anti-diarrhoeal activity of the aqueous extract of *Mezoneuron benthamianum* Baill (Caesalpinaceae). *J. Ethnopharmacol.* 116:16-20.

Meite, S., N'guessan, J.D., Bahi, C., Yapi, H.F., Djaman, A.J., Guede, G.F., 2009. Antidiarrheal activity of the ethyl acetate extract of *Morinda morindoides* in rats. *Trop. J. Pharm. Res.* 8:201-207.

MERCK, 2007. Le guide des examens biologiques. *Laboratoires Merck Génériques*, Mylan, Italie. 68 p

Minsanté, 2002. Stratégie sectorielle de santé 25-27 juillet 2002. Chapitre 1: analyse situationnelle du secteur santé au Cameroun. 53 p.

Minsanté, 2008. Plan Pluriannuel Complet 2007-2011 du Programme Élargi de Vaccination (PEV)-Cameroun. 125 p.

Minsanté, 2009. Stratégie sectorielle de santé actualisée 2001-2015. Ed 2009, 00 p

Moazedi, A.A., Dabir, N., Naseri, M.K.G., Zadkarami, M.R., 2010. The role of NO and cGMP in antispasmodic activity of *Ruta chalepensis* leaf extract on rat ileum. *Pak. J. Biol. Sci.* 13:83-87.

Modigliani, R., 1989. Physiopathology of diarrhea. *Revue du Praticien* 39:2577-2581.

Momeni, J., Djialeu Ntchatchoua, W.P., Fadimatou, Akam, M.T., Ngassoum, M.B., 2010. Antioxidant activities of some cameroonian plants extracts used in the treatment of intestinal and infectious diseases. *Indian J. Pharm. Sci.* 72:140-144.

Moncada, S., Palmer, R.M. and Higgs, E.A., 1992. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-142.

Mueller, E., Van Breemen, C., 1979. Role of intracellular Ca^{2+} sequestration in beta-adrenergic relaxation of smooth muscle. *Nature* 281:682-683.

Mukherjee, S., Koley, H., Barman, S., Mitra, S., Datta, S., Ghosh, S., Paul, D., Dhar, P., 2013. *Oxalis corniculata* (Oxalidaceae) leaf extract exerts in vitro antimicrobial and in vivo anticolonizing activities against *Shigella dysenteriae* 1 (NT4907) and *Shigella flexneri* 2a (2457T) in induced diarrhea in suckling mice. *J. Med. Food* 16:801-809

Murthy, K.S., 2006. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu. Rev. Physiolol.* 68:345-374.

Musha, S., Watanabe, M., Tomoda, A., Konishi, M., 2007. Mechanisms of the inhibitory effects of a phenoxazine compound, 2-amino-4,4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine- 3-one, on the contraction of the smooth muscle of the guinea pig taenia cecum. *J. Smooth Muscle Res.* 43:15-24

Muthaura, C.N., Rukunga, G.M., Chhabra, S.C., Omar, S.A., Guantai, A.N., Gathirwa, J.W., Tolo, F.M., Mwitari, P.G., Keter, L.K., Kirira, P.G., Kimani, C.W., Mungai, G.M., Njagi, E.N.M., 2007. Antimalarial activity of some plants traditionally used in Meru district of Kenya. *Phytother. Res.* 21:860-867.

Nakamura, E., Suzuki, H., 2004. Dual concentration-dependent effects of phorbol 12, 13-dibutyrate on spontaneous and acetylcholine-induced electrical responses recorded from isolated circular smooth muscle of the guinea-pig stomach antrum. *J. Smooth Muscle Res.* 40:259-270.

Nakamura, K., Rimura, M., Aviv, A., 1995. Role of cyclic nucleotides in store-mediated external Ca²⁺ entry in human platelets. *Biochem. J.* 310:263-269.

Naseri, M.K., Moghaddam, A.M., Bahadoram, S., 2007. Antispasmodic effect of *Tecoma stans* (L.) Juss leaf extract on rat ileum. *DARU* 15:123-128.

Naseri, M.K.G., Heidari, A., 2007. Antispasmodic effect of *Anethum graveolens* fruit extract on rat ileum. *Int. J. Pharmacol.* 3:260-264.

Naseri, M.K.G., Yahyavi, H., 2008. Antispasmodic effect of *Piper nigrum* fruit hot water extract on rat ileum. *Pak. J. Biol. Sci.* 11:1492-1496.

Nataro, J.P., kaper, J.P., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11:142-201. In *Escherichia coli: pathotypes and principles of pathogenesis*. Michael Donnenberg, *Academic Press*, 2013, USA, 612 p.

Nataro, J.P., Steiner, T., Guerranr, R.L., 1998. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 4:251-261

NCCLS, 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement, *Document*, M100-S9.

Ndenecho E.N., 2010. Indigenous trees and shrubs in silvopastoral systems of the Bamenda highlands of Cameroon. *Global J. Human Social Sci.* 10, 56-64.

Nell, G., Rummel, W., 1984. Action mechanisms of secretagogue drugs. In: Csaki T.Z (Ed.). *Pharmacology of intestinal permeation II*. 2nd ed. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, Berlin, pp 461-462.

Nelson, M.T., Quayle, J.M., 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 268:C799-C822.

Ngo Teke, G., Kuate, J.R., Ngouateu, O.B., Gatsing, D., 2007. Antidiarrhoeal and antimicrobial activities of *Emilia coccinea* (Sims) G. Don extracts. *J. Ethnopharmacol.* 112:278-283.

Ngo Teke, G., Kuate, J.R., Kueté, V., Teponno, R.B., Tapondjou, A.L., Vilarem, G., 2010. Antidiarrheal activity of extracts and compound from *Trilepisium madagascariense* stem bark. *Ind. J. Pharmacol.* 42:157-163.

Nguelefack, T. B., Sontia, B., Dongmo, A. B., Dimo, T., Kamanyi, A., Vierling, W., 2006. Spasmolytic effects of extracts from *Kalanchoe crenata* Andrews (Crassulaceae) leaves. *J. Pharmacolonline* 1:190-198.

Nishizuka, Y., 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614.

Noack, T., Deitmer, T., Lammel, E., 1992. Characterization of membrane currents in single smooth muscle cells from the guinea-pig gastric antrum. *J. Physiol.* 451:387-417.

Noah Ewoti, O.V., Nola, M., MOUNGANG, L.M., Nougang, M.E., Krier, F., Chihib, N.E., 2011. Adhesion of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* on rock surface in aquatic microcosm: assessment of the influence of dissolved magnesium sulfate and monosodium phosphate. *Res. J. Environmental Earth. Sci.* 3:364-374.

Nsaka Lumpu S, Tona Lutete G, Kambu Kabangu O, Cimanga Kanyanga R, Apers S, Pieters L, *et al.*, 2012. Assessment of the antidiarrhoeal properties of the aqueous extract, the 80% methanol extract and its soluble fractions of the leaves of *Alstonia congensis* Engl. (Apocynaceae) in Wistar rats. *J. Ethnopharmacol.* 142:620-626.

Nutranews: Science, Nutrition, Prévention et Santé, 2003. Comment la nutrition prévient et traite les problèmes de santé les plus courants. *Ed.Fondation pour le Libre Choix.* 25 p.

Nwafor, P.A., Okwuasaba, F.K., 2001. Effect of methanolic extract of *cassia nigricans* leaves on gastrointestinal tract. *Fitoterapia* 72:206-214.

Nwinyi, F.C., Binda, L., G.A., Ajoku, G.A., Aniagu, S.O., Enwerem, N.M., Orisadipe, A., Kubarawa, D., Gamaniel, K.S., 2004. Evaluation of the aqueous extract of *Boswellia dalzielii* stem bark for antimicrobial activities and gastrointestinal effects. *Afr. J. Biotechnol.* 3:284-288.

O'Malley, P., Trimble, N., Browning, M., 2004. Are herbal therapies worth the risks? *Nurse Practice* 29:71-75.

Oben, J.E., Sheila, A., Agbor, A.G., Musoro, D.F., 2006. Effect of *Eremomastax speciosa* on experimental diarrhea. *Afr. J. Trad. Complement. Altern. Med.* 3:95-100.

Ohama, T., Hori, M., Ozaki, H., 2007. Mechanism of abnormal intestinal motility in inflammatory bowel disease: how smooth muscle contraction is reduced? *J. Smooth Muscle Res.* 43:43-54.

Ojewole, J.A.O., Awe, E.O., Chiwororo, W.D.H., 2008. Antidiarrhoeal activity of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rodents. *J. Smooth Muscle Res.* 44:195-207.

Okishio, Y., Takeuchi, T., Fujita, A., Suenaga, K., Fujinami, K., Munakata, S., Hata, F., 2005a. Examination of the role of cholinergic myenteric neurons with the impairment of neural reflexes in the ileum of *c-kit* mutant mice. *J. Smooth Muscle Res.* 41:49-60

Okishio, Y., Takeuchi, T., Fujita, A., Suenaga, K., Fujinami, K., Munakata, S., Takewaki, T., Hata, F., 2005b. Ascending contraction and descending relaxation in the distal colon of mice lacking interstitial cells of Cajal. *J. Smooth Muscle Res.* 41:163-174

Okudo, T., Yoshoda, T., Hatano, T., 1989. New methods of analyzing tannins. *J. Nat. Prod.* 52:1-31.

Olives, J.P., Ghisolfi, J., 2000. Diarrhées aiguës. In : Navarro. J., Schmitz, J., Gastro-entérologie Pédiatrique. 2^eEd. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, pp 273-285.

Organisation de coopération et de développement économique (OCDE), 1979. Résumé des considérations du rapport des groupes d'experts de l'OCDE sur la toxicologie à court et à long terme. In Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Paris, pp 1-15.

Organisation de coopération et de développement économique (OCDE), 2001. Toxicité orale aiguë-méthode par classe de toxicité aiguë. In Ligne directrice 423 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Paris, pp 1-14.

Organisation de coopération et de développement économique (OCDE), 2008. Etude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs. In Lignes directrices 407 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Paris, pp 1-14.

Organisation de coopération et de développement économique (OCDE), 2009. Etudes de la toxicité chronique. In Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Paris, pp 1-16.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2000a. Evaluation mondiale des conditions d'alimentation en eau et d'assainissement. OMS, Genève, Suisse. 99 p

Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2000b. Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. OMS, Genève, Suisse, 87 p.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2009. Stratégie de Coopération de l'OMS avec les pays, 2010-2015, Cameroun. 58 p. ISBN: 978 929 031 1416 (NLM Classification: WA 540 HC3)

Organisation mondiale de la santé (OMS), 2011. Statistiques sanitaires mondiales 2011. ISBN 978 92 4 256419 8. (NLM classification: WA 900.1). 170 p.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2013. Maladies diarrhéiques. Aide-mémoire n°330. 7 p.

Otimenyin, O.S., Uguru, O.M., Akanbi, B.E., 2008. Anti-diarrhea effect of aqueous extracts of *Momordica balsamina* and *Stachytarpheta indica* in rats. *J. Nat. Prod.* 1:36-45.

Otshudi, A.L., Vercruyse, A. and Foriers, A., 2000. Contribution to the ethanobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhoea in Lomela area (DRC). *J. Ethnopharmacol.* 71:411-423.

Ouedraogo, M., Ouedraogo, S., Ouedraogo, L., T.A., Belemtougri, G.R., Sawadogo, L. L., Guissou, I.P., 2005. Pharmacological evaluations for the relaxant effect of the hydroalcoholic extract of *tapinanthus dodoneifolius* on rat trachea. *Afr. J. Trad. Complement. Altern. Med.* 2:166-176.

Ozaki, H., Blondfield, D.P., Stevens, R.J., Publicover, N.G., Sanders, K.M., 1991. Simultaneous measurement of membrane potential, cytosolic calcium and muscle tension in smooth muscle tissue. *Am. J. Physiol.* 260:C917-C925.

Page, A.L., Hustache, S., Luquero, F.J., Djibo, A., Manzo, M.L., Grais, R.F., 2011. Health care seeking behavior for diarrhea in children under 5 in rural Niger: results of a cross-sectional survey. *BMC Public Health* 11:389.

Pang, Y.L., Han, X.F., Bamikole, M.A., Gong, Z.H., Tang, S.X., Tan, Z.L., Xiao, W.J., Zhou, C.S., Wang, M., Deng, Y.L., 2013. Anti-diarrhea and anti-oxidant properties of Magnolol. *Trop. J. Pharm. Res.* 12:85-91.

Park, Y-S., Yoo, S-E., Shin, H-S., Jin, Y-R., Yun, Y-P., 2003. Pharmacological characterization of vasorelaxant effects of BMS-180448, a novel cardioselective ATP-sensitive potassium channel opener, in rat aorta. *J. Pharmacol. Sci.* 92:218 - 227.

Pierce, N.F., Carpenter, C.C.J., Elliott, H.Z. and Greenough, W.B., 1971. Effects of prostaglandins, theophylline and cholera exotoxin upon transmucosal water and electrolyte movement in canine jejunum. *Gastroenterology* 60:22-32.

Pöch, G., Kukovetz, W.R., 1971. Papaverine-induced inhibition of phosphodiesterase activity in various mammalian tissues. *Life Sciences* 10:133-144.

Porcher, C., 1999. Caractérisation morpho-fonctionnelle des cellules interstitielles de Cajal dans le tractus gastro-intestinal chez l'homme. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques et Fondamentales Appliquées. Université de Aix-Marseille 3. 267 p

Poschner, S., 2013. Anti-cancer effects, cytotoxicity and metabolism of purified Cameroonian plant extracts. Diploma pharmacie, Université de Vienne, Autriche, 71 p.

Potteau, B., Clusan, P., 1966. Incidences nutritionnelles et toxicologiques de l'ingestion d'huile de lin chauffée. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 6:47-64.

Quast, U., Cook, N.S., 1989. *Moving together: K⁺-channel openers and ATP-sensitive K⁺-channels.* *Trends Pharmacologie Science* 10:431-435.

Ramanandraibe, V., Rakotovao, M., Andriamaharavo, R.N., 2000. Composition and antimicrobial activity of the leaf and fruit essential oil of *Pittosporum viridiflorum* Culofondis var. *viridiflorum*. *J. Essent. Oil Res.* 12:650-652.

Rao, V.S.N., Santos, F.A., Sobreika, T.T., Souza, M.F., Melo, L.L., Silveira, E.R., 1997. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxy flavone from *Egletes viscosa*. *Planta Medica* 63:146-149.

Roberts, A., Nezamis, J.E., Lancaster, C., Hanchar, A.J., Klepper, M.S., 1976. Enteropooling assay; a test for diarrhea produced by prostaglandins. *Prostaglandins* 11:809-828.

Roberts, S.J., Papaioannou, B., Evans, A., Summers, R.J., 1999. Characterization of β -adrenoceptor mediated smooth muscle relaxation and the detection of mRNA for β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenoceptors in rat ileum. *Br. J. Pharmacol.* 127:949-961.

Rodriguez, R., Martinez, R.V., Santiago-Mejia, J., Maria R. Avila-Costa, M.R., Fortoul, T.I., 2006. Altered responsiveness of the guinea-pig isolated ileum to smooth muscle stimulants and to electrical stimulation after in situ ischemia. *Br. J. Pharmacol.* 147:371-378.

Rogé, J., Baumer, Ph., Berard H, Schwartz, J.C., Lecomte, J.M., 1993. The enkephalinase inhibitor, acetorphan, in acute diarrhea: a double-blind controlled trial versus loperamide. *Scand. J. Gastroenterol.* 28:352-354.

Rojas-Vera, J., Fatel, A.V., Dacke, C.G., 2002. Relaxant activity of Raspberry (*Rubus idaeus*) leaf extract in Guinea-Pig Ileum in vitro. *Phytother. Res.* 16:665-668.

Roman, S., Mion, F., 2009. Données fondamentales sur la physiologie de la motricité digestive. EMC (*Elsevier Masson SAS*, Paris), *Gastroenterologie*, 9-000-A-10: 8 p.

Ronald, M.A., 1990. Microbiologia. *Compania Editorial continental S.A. de C.V., Mexico D.F.*, 505 pp.

- Saladin, K., 2003. Anatomy and physiology: The unity of form and function. 3rdEd. *McGraw-Hill*, Georgia, pp 964-975.
- Salazar-lindo, E., SantistebanPonce, J., CheaWood, E., Gutierrez, M., 2000. Racecadotril in the treatment of acute diarrhea in children. *N. Engl. J. Med.* 343: 463-467.
- Salie, F., Eagles, P.F.K., Leng, H.M.J., 1996. Preliminary antimicrobial screening of four Sud African Asteraceae species. *J. Ethnopharmacol.* 52:27-33.
- Sama, S.K., 2008. Are interstitial cells of Cajal plurifunction cells in the Gut? *Gastroentest. Liver Physiol.* 294:372-390.
- Sanchez, F., Galvez ,J., Gonzalez, M., Zarzuelo, A., Barrett, K.E., 1997. Effects of quercetin on epithelial chloride secretion. *Life. Sci.* 61:2049-2055.
- Sanders, K.M., 1992. Ionic mechanisms of electrical rhythmicity in gastrointestinal smooth muscles. *Annu. Rev. Physiol.* 54:439-453.
- Sanders, K.M., 1996. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterol.* 111:492-515.
- Sanders, K.M., 1998. G Protein-Coupled Receptors in Gastrointestinal Physiology IV. Neural regulation of gastrointestinal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 275 (*Gastrointest.Liver Physiol.* 38):G1-G7.
- Sanders, K.M., 2001. Invited review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J. Applied Physiol.* 91:1438-1449.
- Sanders, K.M., 2008. Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterol. Motil.* 20:39-53.
- Sanders, K.M., Koh, S.D., Ward, S.M., 2006a. Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu.Rev. Physiol.* 68:307-343.
- Sanders, K.M., Koh, S.D., Ward, S.M., 2006b. Organization and electrophysiology of interstitial cells of Cajal and smooth muscle cells in the gastrointestinal tract. In Johnson LR Editor. Physiology of the gastrointestinal tract: *Elsevier*, Paris, pp 533-576.
- Sanders, K.M., Ördög, T., Koh, S.D., Torihashi, S., Ward, S.M., 1999. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol. Motil.* 11:311-338.
- Sanders, K.M., Ozaki, H., 1994. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal smooth muscles. In: *Handbook of Experimental Pharmacology. Pharmacology of Smooth Muscle*, edited by L. Szekeres and J. G. Papp. Berlin: *Springer-Verlag*. 111:331-404.
- Sandoz, 2008. Ce qu'il faut savoir sur les affections gastro-intestinales. Sandoz Pharmaceuticals SA Hinterbergstrasse 24./ Novartis company, 50001344/juin 2008
- Saunders, C., Limbind, L.F., 1999. Localization and trafficking of α_2 -adrenergic receptor subtypes in cells and tissues. *J. Pharmacol. Ther.* 84:193-205.

Scanlon, V.C; Sanders, T., 2007. Essentials of anatomy and physiology, fifth edition. *F.A DAVIS COMPANY*, Philadelphia. 622 p.

Scheidler, M.D., Giannella, R.A., 2001. Practical management of acute diarrhea . *Hosp Pract (Minneap)*. 36:49-56.

Schorderet, M., 1992. Principe de base et répercussion clinique. In: Pharmacologie : des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. 2^e Ed. *Frison-Roche*, Paris, pp 33-35.

Schultz, S.G., Frizzell, R.A., 1976. An overview of intestinal absorptive and secretory processes. *Gastroenterology* 63:161-170.

Selemidis, S., Dusting, G.J., Peshavariya, H., Kemp-Harper, B.K., Drummond, G.R., 2007. Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. *Cardiovascular Research* 75:349-358.

Seo, Y., Berger, J.M., Hoch, J., Neddermann, K.M., Bursuker, I., Mamber, S.W., Kingston, D.G.I., 2002. A new triterpene saponin from *Pittosporum viridiflorum* from Madagascar rainforest. *J. Nat. Prod.* 65:65-68.

Serrano, J.J., 1990. Toxicopharmacologie expérimentale des plantes médicinales. *Ethnopharmacologie: sources-méthodes-objectifs*, pp 210-223.

Shabalina, I., Wiklund, C., Bengtsson, T., Jacobsson, A., Cannon, B., Nedergaard, J., 2002. Uncoupling protein-1 involvement in a novel pathway for β -adrenergic cAMP-mediated intestinal relaxation. *Am. J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283:1107-1116.

Sherwood, L., 2006. Physiologie humaine. *De Boeck University*, 2^e édition: 629 p.

Shimizu, K., Yoshihara, E., Takahashi, M., Gotoh, K., Orita, S., Urakawa, N., Nakajyo, S., 2000. Mechanism of relaxant response to papaverine on the smooth muscle of non-pregnant rat uterus. *J. Smooth Muscle Res.* 36:83-91.

Shin, II-W., Sohn, J-T., Kim, H-J., Kim, C., Lee, H-K., Chang, K.C., Chung, Y-K., 2005. Etomidate attenuates phenylephrine-induced contraction in isolated rat aorta. *Can. J. Anesth.* 52:927-934.

ShooK, J.E., Lemcke, P.K., Gehrig, C.A., Hruby, V.J., Burks, T.F., 1989. Antidiarrheal properties of supraspinal mu and delta and peripheral mu, delta and kappa opioid receptors: inhibition of diarrhea without constipation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249:83-90.

Snyder, J.D., Merson, M.H., 1982. The magnitude of the global problem of acute diarrhoea disease: A review of active surveillance of data. *Bull WHO* 60:605-613.

Soilleux, M., 2007. Antibiotiques poly DCEM 1 [En ligne]. Disponible sur le site <http://andre.ar.free.fr/antibiotiques>, 12 p.

Somlyo, A.P., 1985. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. *Circ. Res.* 57:497-507.

Somlyo, A.P., Somlyo, A.V., 1968. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 159:129-59.

Somlyo, A.P., Somlyo, A.V., 1994. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372:231-6.

Somlyo, A.P., Somlyo, A.V., 1998. Form pharmaco mechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta. Physiol. Scand.* 164:437-448.

Somlyo, A.P., Somlyo, A.V., 2000. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J. Physiol. (Lond.)* 522: 177-185.

Stark, T.S., Mtui, D.J., Balemba, O.B., 2013. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of gastrointestinal pain, inflammation and diarrhea in Africa: Future Perspectives for Integration into Modern Medicine. *Animals* 3:158-227.

Stebbing, M.J., Johnson, P.J., Vremec, M.A., Bornstein, J.C., 2001. The role of α_2 -adrenoceptors in the sympathetic inhibition of gastrointestinal motility reflexes in guinea-pig ileum. *J. Physiol.* 34:465-478.

StephanL, M.P., Michel, M.C., 2003.cAMP-independent relaxation of smooth muscle cells. *Naunyn Schmeidebergs Arch. Pharmacol.* 368:329-330.

Strosberg, A.D. (1997). Structure and function of the β_3 -adrenergic receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37:421-450.

Suleiman, M.M., Dzenda, T., Sani, C.A., 2008. Antidiarrhoeal activity of the methanol stem-bark extract of *Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *J. Ethnopharmacol.* 116:125-130.

Sundhu, B.K., Tripp, J.H., Candy, D.C.A., Harries, J.T., 1981. Loperamide: Studies on its mechanism of action. *Gut* 22:658- 662.

Surks, H.K., 2007. cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms. *Circ. Res.* 101:1078-1080.

Suzuki, H., 2000. Cellular mechanisms of myogenic activity in gastric smooth muscle. *Jpn. J. Physiol.* 50: 289-301.

Suzuki, T., Sakai, H., Ikari, A., Takeguchi, N., 2000. Inhibition of thromboxane A₂-induced CF secretion by antidiarrhea drug loperamide in isolated rat colon. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295:233-238.

Tahara, M., Morishige, K., Sawada, K., Ikebuchi, Y., Kawagishi, R., Tasaka, K., Murata, Y., 2002. RhoA/Rho kinase cascade is involved in oxytocin-induced rat uterine contraction. *Endocrinol.* 143:920-929.

Takaki, M., 2003. Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). *J. Smooth Muscle Res.* 39:137-161.

Takasaka, Y., 2005. Serum lipid levels and factors affecting atherogenic index in Japanese children. *J. Physiol. Anthropol. Applied Human Science* 24:511-515.

Takeuchi, T., Fujinami, K., Fujita, A., Okishio, Y., Takewaki, T., Hata, F., 2004. Essential role of the interstitial cells of Cajal in nitric oxide-mediated relaxation of longitudinal muscle of the mouse ileum. *J. Pharmacol. Sci.* 95:71-80.

Takhtajan A., 1996. Diversity and classification of flowering plants. *Columbia University Press, New York*, 643 p.

Tanaka, Y., Shinoda, K., Sekiya, S., Yamaki, F., Shibano, M., Yamashita, Y., Horinouchi, T., Koike, K., 2004a. β_1 -Adrenoceptor-mediated relaxation with isoprenaline and the role of MaxiK channels in guinea-pig esophageal smooth muscle. *J. Smooth Muscle Res.* 40:43-52

Tanaka, Y., Yamashita, Y., Horinouchi, T., Koike, K., 2005. Adrenaline produces the relaxation of guinea-pig airway smooth muscle primarily through the mediation of β_2 -adrenoceptors. *J. Smooth Muscle Res.* 41:153-161.ta

Tanaka, Y., Yamashita, Y., Horinouchi, T., Yamaki, F., Koike, K., 2004b. Evidence showing that β -adrenoceptor subtype responsible for the relaxation induced by isoprenaline is principally β_2 but not β_1 in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Auton. Autacoid Pharmacol.* 24:37-43.

Tanaka, Y., Yamashita, Y., Yamaki, F., Horinouchi, T., Shigenobu, K., Koike, K., 2003. MaxiK channel mediates β_2 -adrenoceptor-activated relaxation to isoprenaline through cAMP- dependent and -independent mechanisms in guinea-pig tracheal smooth muscle. *J. Smooth Muscle Res.* 39:205-219.

Tangpu, V., Yadav, A. K., 2006. Antidiarrhoeal activity of *cymbopogon citratus* and its main constituent, citral. *J. Pharmacolonline* 1:30-39.

Taniguchi, H., Furukawa, K.I, Shigekawa, M., 1993. Maxi K⁺ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* 463:167-72.

Tanovic, A., Jimenez, M., Fernandez, E., 2000. Lack of effect of nitric oxide on KCl, acetylcholine and substance P induced contractions in ileal longitudinal muscle of rat. *Life Sci.* 67:531-541.

Teague, B., Asiedu, S., Moore, P.K., 2002. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br. J. Pharmacol.* 137:139-145.

Teramoto, N., Hirst, G.D.S., 2003. Interaction between excitatory and inhibitory metabotropic pathways in the guinea-pig antrum. *J. Physiol. (Lond.)* 550:181-189.

Thomson, A.B.R., Shaffer, Paré, Ménard, D.B., Bovin, M., 2005. Principes fondamentaux de gastro-entérologie états pathologiques et démarches thérapeutiques. 5^e Ed. *Canadian Association of Gastroenterology*, Edmonton Alberta,;pp 21-27.

Thorneloe, K.S., Nelson, M.T., 2005. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 83:215-242.

Thuneberg, L., 1982. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 71:1-130.

Tijani, A.Y. , Okhale, S.E., Salawu, T.A., Onigbanjo, H.O., Obianodo, L.A, Akingbasote, J., Aalawu, O. A., Okogun, S.J.I., Kunle, F.O., Emeje, M., 2009. Antidiarrhoeal and antibacterial properties of crude aqueous stem bark extract and fractions of *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex G. Don. *Afr. J. Pharm.* 3:347-353.

Tomita, T., 1981. Electrical activity (spikes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscles. In: *Smooth Muscle: an Assessment of Current Knowledge*, ed. by E. Bülbbring, A.F. Brading, A.W. Jones and T. Tomita. *Edward Arnold*, London, pp 127-156.

Trease, G.E., Evans, W.C., 1989. Pharmacognosy. 13th Ed. *Bailliere Tindall*, London, pp 176-180.

Tsai, J.C., Tsai, S., Chang, W.C., 2004. Effects of extracts from the three Chinese medicinal plants with anti-diarrheal properties on ion transport of the rat intestinal epithelia. *J. Pharmacol. Sci.* 94:60-66.

Turvill, J.L., Farthing M.J.G., 1997. Enkephalins and enkephalinase inhibitors in intestinal fluid and electrolyte absorption. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 9:877-880.

Uchiyama, T., Chess-Williams, R., 2004. Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *J. smooth muscle res.* 40:237-247.

Udia, P.M., Braide, V.B., Owu, D.U., 2009. Antispasmodic and spasmolytic effects of methanolic extract from seeds of *Garcinia kola* on isolated rat small intestine. *Niger. J. Physiol.Sci.*24:111-116.

United Nations Children's Fund (UNICEF)/World Health Organization (WHO), 2009. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done? ISBN: 978-92-806-4462-3 (UNICEF) ISBN: 978-92-4-159841-5 (NLM classification: WS 312) (WHO). 68 p.

Unno, T., Matsuyama, H., Izumi, Y., Yamada, M., Wess, J., Komori, S., 2006. Roles of M2 and M3 muscarinic receptors in cholinergic nerve-induced contractions in mouse ileum studied with receptor knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* 149:1022-1030.

Unno, T., Matsuyama, H., Sakamoto, T., Uchiyama, M., Izumi, Y., Okamoto, H., Yamada, M., Wess, J., Komori, S., 2005. M2 and M3 muscarinic receptor-mediated contractions in longitudinal smooth muscle of the ileum studied with receptor knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* 146:98-108.

Valette, G., 1972. Essais biologiques des médicaments. Evaluation de la toxicité et de l'activité ; interprétations mathématiques des résultats. Dans: Précis de pharmacodynamie, 3^e Ed., *Masson et Cie*, Paris, pp 74-105.

Venkatesan, N., Thiyagarajan, V., Narayanan, S., Arul, A., Raja, S., Kumar, S.G.V., Rajarajan, T., Perianayagam J.B., 2005. Anti-diarrhoeal potential of *Asparagus racemosus* wild root extracts in laboratory animals. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 8:39-46.

Viramontes, B.E., Malcolm, A., Camilleri, M., Szarka, L.A., Mckinzie, S., Burton, D.D., 2001. Effects of an α_2 -adrenergic agonist on gastrointestinal transit, colonic motility and sensation in humans. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281:1468-1476.

Vischer, P., Casals-Stanzel, J., 1983. Influence of prostacyclin and indomethacin on castor oil-induced gastro-intestinal effect in rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 35:152-156.

Wade, G.R., Laurier, L.G., Preiksaitis, H.G., Sims, S.M., 1999. Delayed rectifier and Ca^{2+} -dependent K^+ currents in human esophagus: roles in regulating muscle contraction. *Am. J. Physiol.* 277:G885-895.

Walsh, M.P., susnjar M., Deng, J., Sutherland, C., Kiss, E., Ulilson, D.P., 2006. Phosphorylation of the protein phosphatase type 1 inhibitor protein CPJ-17 by protein kinase C. *Methods Mol. Biol.* 365:209-224.

Walum, E., 1998. Acute oral toxicity. *Env. Health Persp.* 106:302-311.

Wang, Y.X., Dhulipala, P.D., Li, L., Benovic, J.L. and Kotlikoff, M.I., 1999. Coupling of M2 muscarinic receptors to membrane ion channels via phosphoinositide 3-kinase gamma and atypical protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 274:13859-13864.

Ward, S.M., Burns, A.J., Torihashi, S., Sanders, K.M., 1994. Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J. Physiol.* 480:91-97.

Ward, S.M., McLaren, G.J., Sanders, K.M., 2006. Interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus mediate enteric motor neurotransmission in the mouse small intestine. *J. Physiol.*, 573: 147-159.

Welch, E.J., Jones, B.W., Scott, J.D., 2010. Networking with AKAPs: context-dependent regulation of anchored enzymes. *Molecular interventions* 10:86-97.

Wellman, G.C., Nelson, M.T., 2003. Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca²⁺-sensitive ion channels. *Cell Calcium* 34:211-229.

Won, K.J., Sanders, K.M., Ward, S.M., 2005. Interstitial cells of Cajal mediate mechanosensitive responses in the stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 14913-14918.

Wong, C.S., Jelacic, S., Habeeb, R.L., 2000. The risk of hemolytic uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* 015:H7 infections. *New Engl. J. Med.* 323:1930-1936. In *E. coli: Genomics, evolution and pathogenesis*. Edited by Michael Donnenberg, Academic press 2002, 417 p.

World Health Organisation (WHO), 1993. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Regional office for western pacific, Manila, Philippines, 94 p.

World Health Organisation (WHO), 1994. Programme for control of diarrhoeal diseases: ninth programme report 1992-1993. N° 245-11-94PR-12197. WHO, Geneva, Switzerland. 113 p.

World Health Organisation, 1996. Water and sanitation: fact sheet 112. WHO, Geneva, Switzerland. 64 p.

World Health Organization (WHO), 1992. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. RS/92/GE/15 (PHL), Manila, Philippines, 38 p.

World Health Organization (WHO), 1999. The Evolution of Diarrhoeal and Acute Respiratory Disease Control at WHO. Achievements 1980-1995 in Research, Development, and Implementation. WHO, Geneva, Switzerland. 81 p.

World Health Organization (WHO), 2004. World Health Statistics: Annual Report. Geneva, Switzerland. 70 p. The global burden of disease 2004. Geneva. ISBN9789241563710

World Health Organization (WHO), 2015. World health statistics 2015. ISBN 978 92 4 156488 5. (NLM classification: WA 900.1). 164 p.

Wray, S., 1980. Physiologie appliquée à la médecine. *Medicine-sciences Flammarion*, Paris, 2^e Ed. 620-646.

Xia, M., Qian, L., Zhou, X., Gao, Q., Bruce, I.C., Xia, Q., 2008. Endothelium-independent relaxation and contraction of rat aorta induced by ethyl acetate extract from leaves of *Morus alba* L. *J. Ethnopharmacol.* 120:442-446.

Xiao, H.T., Tsang, S.W., Qin, H.Y., Choi, F.F., Yang, Z.J., Han, Q.B., Chen, H.B., Hong-XiXu, Shen, H., Lu, A.P., Bian, Z.X., 2013. A bioactivity-guided study on the anti-diarrheal activity of *Polygonum chinense* Linn. *J. Ethnopharmacol.* 149:499-505.

Xu, C., Lu, Y., Tang, G., Wang, R., 1999. Expression of voltage-dependent K⁺ channel genes in mesenteric artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 277 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 40): G1055-G1063.

Yasmin, N., Winnie, H.O., Sharkey, K.A., 2006. Distribution of adrenergic receptor in the enteric nervous system of guinea-pig, mouse and rat. *J. Comp. Neurol.* 495:529-553.

Yougbare, I., 2010. Rôle de la phosphodiesterase spécifique de l'AMPC (PDE4) dans deux modeles d'inflammation chronique : le lupus érytemateux disséminé et l'asthme. These de doctorat en physiologie, Université de Sherbrooke, strasbourg, 221 p.

Yu, L-L., liao, J-F., Chen, C-F., 2000. Antidiarrheal effect of water extract of *Evodiae fructus* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 73:39-45.

Yunita, E.P., Aniek, M.H., Eddy, S., 2012. The potency of *Rhizophora mucronata* leaf extract as antidiarrhea. *J. Appl. Sci. Res.* 8:1180-1185.

Yuzurihara, M., Ikarashi, Y., Goto, K., Sakakibara, I., Hayakawa, T., Sasaki, H., 2002. Geissoschizine methyl ether, an indole alkaloid extracted from *Uncariae Ramulus et Uncus*, is a potent vasorelaxant of isolated rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 444:183-189.

Zahan, R., Nahar, L., Haque, A., Mossaddik, A., Fazal, A., Alam, Z., Haque, M.E., 2012. Antidiarrhoeal and hypoglycemic effects of *Synedrella nodiflora*. *Phytopharmacol.* 2: 257-264.

Zavala, M.A., Perez, S., Perez, C., Vargas, R., Perez, R.M., 1998. Antidiarrheal activity of *walterria americana*, *commelina coelestis* and *alternanthera repens*. *J. Ethnopharmacol.* 61:41-47.

Zhang, J., Wang, S., Li, Y., Xu, P., Chen, F., Tan, Y., Duan, J., 2013. Anti-diarrheal constituents of *Alpinia oxyphylla*. *Fitoterapia* 89:149-156.

Zhao, P., Huang, X., Wang, Z.Y., Qiu, Z.X., Han, Y.F., Lu, H.L., Kim, Y.C., Xu, W.X., 2009. Dual effect of exogenous hydrogen sulfide on the spontaneous contraction of gastric smooth muscle in guinea-pig. *Eur. J. Pharmacol.* 616:223-228.

Zhou, G.N., Hu, Z.H., Wang, Y.X., Zhang, X.K., 1994. An inquiry into preparing diarrhea model of mice and application of diarrhea index. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* 25:195-199.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publication

Njiaza, J., Ngo Lemba, T.E., Nguelefack, T.B., Dzeufiet, D.P.D., Aboubakar, O.B.F., Dimo, T., Kamtchouing, P., **2015**. Effects of the aqueous extract of *Pittosporum mannii* Hook.f. (Pittosporaceae) stem barks on spontaneous and spasmogen-induced contractile activity of isolated rat duodenum. *J. Ethnopharmacol.* 172:1-9.

Communications

Njiaza Joseph, Ngo Lemba Esther, Dzeufiet Djomeni Paul, Dimo Théophile, Kamtchouing Pierre. Effect of *Pittosporum mannii* barks aqueous extract on spontaneous and calcium-induced contractions on rat duodenum and possible action mechanism. CAMEROON BIOSCIENCES SOCIETY (CBS): 17th annual Conference. *Université des montagnes, Banganté*, **02-04 December 2010**: Poster section

Njiaza Joseph, NGO Lemba Esther, Dzeufiet Djomeni Paul, Dimo Théophile, Kamtchouing Pierre. Effect of *Pittosporum mannii* barks aqueous extract on spontaneous and calcium-induced contractions on rat duodenum and possible action mechanism. African network for drugs and diagnostics innovation (ANDI): 4thANDI stakeholders' meeting and donor conference, Addis Abeba, Ethiopia, **24-27 October 2011**. Poster presentation.

Njiaza Joseph, Lontsi Djimeli Chrétien, Ngo Lemba Esther, Dzeufiet Djomeni Paul, Dimo Théophile, Kamtchouing Pierre. Evaluation of antimicrobial and antidiarrheal activities of the aqueous extract of *Pittosporum mannii* stem barks on experimental models of diarrhea in mice and rat. Cameroon Forum for Biological Sciences (Cafobios). *Fourth Life Sciences Conference. Université de Dschang*, **07-08 August 2014**. Oral presentation.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

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

Effects of the aqueous extract of *Pittosporum mannii* Hook. f. (Pittosporaceae) stem barks on spontaneous and spasmogen-induced contractile activity of isolated rat duodenum

Njiaza Joseph^a, Ngo Lemba Tom Esther^b, Nguelefack Télesphore Benoît^c,
Dzeufiet Djomeni Paul Désiré^a, Aboubakar Oumarou Bibi-Farouck^a,
Dimo Théophile^{a,*}, Kamtchouing Pierre^a

^a Laboratory of Animal Physiology, Department of Animal Biology, Faculty of Science, University of Yaounde I, PO Box 812, Yaounde, Cameroon

^b Laboratory of Animal Physiology, Department of Biological Sciences, High Teachers' Training College, University of Yaounde I, PO Box 47, Yaounde, Cameroon

^c Laboratory of Animal Physiology and Phytopharmacology, Department of Animal Biology, Faculty of Science, University of Dschang, PO Box 67, Dschang, Cameroon

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2014

Received in revised form

15 May 2015

Accepted 28 May 2015

Available online 9 June 2015

Keywords:

Rat duodenum

Spontaneous contractions

Spasmogen-induced contractions

Pittosporum mannii

Relaxant effect

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Pittosporum mannii* Hook. f. (Pittosporaceae) is a plant widely used in traditional medicine in Cameroon for the treatment of many gastrointestinal disorders including diarrhea. To date, no pharmacological study on the anti-diarrheal and the antispasmodic properties of this plant has been reported. The aim of the present study was to evaluate *in vitro* the relaxant activity of the aqueous extract of stem barks of *P. mannii* (PMAE) on rat duodenum.

Materials and methods: Different concentrations of PMAE were tested separately (10–80 µg/mL) or cumulatively (5–80 µg/mL) on spontaneous and spasmogen (carbachol, histamine and KCl)-induced contractions of isolated rat duodenum strips.

Results: At concentrations ranging from 10 to 80 µg/mL, PMAE significantly decreased the tonus and the amplitude of spontaneous contractions. However, at high concentration (80 µg/mL), the extract elicited a transient relaxation followed by a slight increase of tonus, while the amplitude remained lower compared to the normal spontaneous activity. The relaxant effect of the extract was not significantly affected in the presence of atropine (0.713 µg/mL) and promethazine (0.5 µg/mL). In addition, PMAE (20, 40, and 80 µg/mL) partially but significantly inhibited in a concentration related manner the contractions induced by carbachol (10^{-9} – 10^{-4} M) and histamine (10^{-9} – 10^{-4} M) on rat duodenum. PMAE (10–80 µg/mL) also significantly induced a concentration-dependent relaxation on KCl (20 mM, 50 mM, 10^{-3} – 6.10^{-3} M)-induced contraction of rat duodenum.

Conclusions: These results show that the aqueous extract of *P. mannii* stem barks possesses antispasmodic and spasmolytic effects at lower concentrations; therefore, supporting the use of the stem barks of this plant in the folk medicine for the treatment of diarrhea. However, caution should be paid while using higher concentrations that instead might produce spasmogenic effect and might worsen the diarrheal condition. The relaxant effect of PMAE appears to be non-specific of muscarinic or histaminic receptors, but may involve at least in part a mechanism of inhibition of the Ca^{2+} influx into the smooth muscle cells through voltage-operated Ca^{2+} channels.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Smooth muscle tissues isolated from the small intestine generate phasic contractions spontaneously (Shimizu et al., 2000; Nakamura

and Suzuki, 2004; Hotta et al., 2005). These mechanical activities are evoked by rhythmical membrane potential changes, termed slow waves and action potentials (Tomita, 1981; Kim et al., 2006). Gastrointestinal motility is an integrated process that includes myoelectrical activity, contractile activity, tone, compliance and transit. Alterations of gastrointestinal motility (increased or decreased smooth muscle contractility) occur in several circumstances and are associated to various gastrointestinal affections, such as constipation,

* Corresponding author. Tel.: +237 677657442.

E-mail address: dimo59@yahoo.com (D. Théophile).

intestinal occlusion, intestinal spasms with related diarrhea and intestinal inflammation (Ohama et al., 2007). One of the most important affections in gastrointestinal tract is diarrhea, which may be produced by some infections or increase in motility (Hejazian-Y et al., 2009). This pathology is often accompanied by intestinal spasms that cause abdominal cramps and pain (Desire et al., 2010). Diarrhea continues to be one of the leading causes of mortality and morbidity especially in children in developing countries (Lin et al., 2002). Treatment of spastic motility disorders and diarrhea in particular continues to be challenging. Current therapy of these disturbances consists to inhibit smooth muscle contractions. Thus, reduction of gastrointestinal motility is one of the mechanisms by which many antidiarrheal agents act (Damabi et al., 2010). Despite the emergence of a number of drugs, none has found a place in the routine management of diarrhea (Farthing, 2002; Ching et al., 2008). Therefore, there is a need for continuous search for drugs that might inhibit the process of diarrhea development. Medicinal plants are one of the useful areas of this research since they constitute an important source of new chemical substances with potential therapeutic effects (Nwinyi et al., 2004). The use of medicinal plants is a fundamental component of the African traditional healthcare system as they are the most easily accessible and affordable health resource for the local community (Fawzi, 2013). Although the propensity towards the traditional medications is growing throughout the world, there is a need for scientific investigations to evaluate the safety and the therapeutic effects of medicinal plants and their mechanisms of action (O'Malley et al., 2004; Hejazian-Y et al., 2009). A number of plants used in Cameroonian traditional medicine have been studied to provide pharmacological evidence for their use as antidiarrheal agents (Dimo et al., 2001; Kamgang et al., 2001; Nguielefack et al., 2006). *P. mannii* Hook f. (Pittosporaceae) is a shrub widely spread in the savannah zone of Adamawa, in the highlands of West Cameroon and Mount Mandara (Momeni et al., 2010; Ndenecho, 2010). The ground internal part of dried barks is given to children against stomach worm diseases. *P. mannii* is also used in traditional medicine to treat fever, malaria, inflammation and stomach ache and as antidote for insect bites, chest pain and cough, amenorrhoea, gastrointestinal pains and diarrhea (Fawole et al., 2009; Focho et al., 2009; Momeni et al., 2010; Stark et al., 2013). However, there is no report on the antidiarrheal, antispasmodic or spasmogenic activity of this plant. The present study was undertaken to evaluate the effects of the aqueous extract of *P. mannii* stem barks on spontaneous contractile activity and contractions induced by carbachol, histamine and potassium chloride (KCl) on rat duodenum.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and extraction

Fresh pieces (samples of barks, leaves and branches) of *P. mannii* (Pittosporaceae) were collected from Balessing (West Region, Cameroon) in May 2009 and authenticated at the National Herbarium, Yaounde-Cameroon, where a voucher specimen is deposited (number 24765 HNC). The stem barks were cleaned, sliced, sun-dried and crushed into fine powder using a commercial grinder. The powder (355.88 g) was boiled in distilled water (3 L) for 40 min. The extractive solution was filtered with Whatman N° 3 filter paper. The filtrate was evaporated at 50 °C using a drying oven, to obtain 16.56 g of crude residue of aqueous extract of *P. mannii* stem barks (yield of extraction, 4.65%). The aqueous extract of *P. mannii* was dissolved in distilled water.

2.2. Phytochemical analysis

The aqueous extract of *P. mannii* stem barks was screened for the presence of some bioactive compounds. Qualitative phytochemical

analyses were performed for phenols, flavonoids, terpenoids, triterpens, saponins, tannins, anthraquinones, steroids, lipids, reducing sugars, cardiac glycosides and alkaloids, using standard procedures (Ayoola et al., 2008). 0.5 g of crude extract was used for the analysis of each tested compound in order to compare their relative abundance in this plant material.

Total polyphenol content (TPC) in the extract was determined by the Folin–Ciocalteu method as previously described by Desire et al. (2010). Briefly, 0.5 mL of sample extract solution (with appropriate dilution to obtain absorbance in the range of the prepared calibration curve) was mixed with 2.5 mL of 10 times diluted Folin–Ciocalteu reagent. After 2 min, 2.0 mL of saturated Na₂CO₃ solution (145 g/L) was added. The mixture was allowed to react at 50 °C for 5 min, then to cool and stand 5 min before the reading of absorbance at 760 nm. A calibration curve of gallic acid (ranging from 0.01 to 0.10 mg/mL) was prepared, and the TPC was standardized against gallic acid and expressed as mg gallic acid equivalent per gram of sample on a dry weight basis. All analyses were run in three replicates and averaged.

2.3. Animals and chemicals

Adult male and female Wistar rats, weighing 200–230 g, were used. All the animals were obtained from the Animal House of the Laboratory of Animal Physiology of Faculty of Science, University of Yaounde I, Cameroon. The animals were housed in well aerated cages at room temperature under a 12/12 light/dark cycle, with free access to tap water and a standard rodent diet, except when starvation was needed. The experimental procedures used in the study were approved by the Cameroon National Ethical Committee (Reg. N° FWA-IRD 0001954) and conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animals use and care mentioned by the European Community Council Directive (86/609/EEC of 24 November 1986).

The following drugs and reagents were used: atropine sulfate (Gland Pharma Limited, Hyderabad, India), promethazine chlorhydrate (Frilab Laboratories, Geneva, Switzerland), papaverine chlorhydrate (Aguettant Laboratory, Lyon, France), verapamil hydrochloride, histamine and carbamyl-choline (carbachol) chloride were purchased from Sigma (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA). D-glucose and all the salts (NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄, NaH₂PO₄, and NaHCO₃) used to prepare physiological solution or to induce intestinal contractility (KCl) were of the analytical grade available. Solutions of all the drugs were dissolved in distilled water. The volume of all chemicals added to the organ bath solution did not exceed to more than 5% of organ bath volume.

2.4. Tissue preparation and mechanical responses recording

The aqueous extract of *P. mannii* stem barks (PMAE) was tested *in vitro* for antispasmodic activity using strips of rat duodenum. Rats were starved for food for 18 h but allowed free access to water. They were then sacrificed by cervical dislocation without anesthesia to prevent influence on contractile responses of the tissue (Borgi and Chouchane, 2009). After a laparotomy incision, 2–3 small segments of duodenum (1.5–2 cm long) were excised from close to the gastro-intestinal junction, placed in a cold oxygenated Tyrode's solution with the following composition in mM: NaCl 136.90, KCl 2.68, MgCl₂ 1.05, CaCl₂ 1.87, NaHCO₃ 11.90, NaH₂PO₄ 0.42, and glucose 5.55 (Emendörfer et al., 2005; Desire et al., 2010) and gently cleaned of fat and adherent connective tissues. The strips were subsequently suspended in a 20 mL organ bath containing Tyrode's solution maintained at 37 °C and continuously bubbled with carbogen (5% CO₂ and 95% O₂) to maintain the pH at 7.4 (Rodriguez et al., 2006). The lower end of the strip was fastened to a fixed hook at the bottom of the organ bath, and

the upper end was connected with a steel hook to an isotonic transducer combined with a multichannel recorder, Biopac Lab Systems (Type BIOPAC Systems, Inc. 42 Aero Camino, Santa Barbara, CA 93117) for continuous recording of mechanical activity, monitored with a computer. Prior to drugs administration, each strip was allowed to equilibrate in the Tyrode's solution for at least 60 min at a baseline tension of 1 g. During the equilibration period, the bathing solution was renewed every 15 min.

2.5. Assessment of the effects of the extract on spontaneous contractions

In the first set of experiments, different concentrations of PMAE (10, 20, 40 or 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were tested separately on rat duodenum spontaneous contractions according to the method described by Hu et al. (2010). Each concentration was added to the bath solution and its effects were recorded for 20 min. Time–response curve of each concentration of the extract was then constructed (Xia et al., 2008). Similarly, the effects of atropine (0.713 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and promethazine (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), standard antispasmodic drugs were examined and served as positive controls. The negative control preparations were treated with distilled water (solvent of the extract) in an equivalent volume to that of the maximal concentration of extract.

In the second set of experiments, in order to determine the median effective concentration (EC_{50}) of the extract, increasing concentrations of PMAE (5, 10, 20, 40 and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were cumulatively added in the organ bath every 10 min. Concentration–response curves were constructed, and the EC_{50} and E_{max} were then determined (Borrelli et al., 2009; Desire et al., 2010). Following the same procedure, the effects of atropine (0.089–1.426 $\mu\text{g}/\text{mL}$), promethazine (0.125–2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and distilled water were examined on the duodenum.

In addition, we re-examined the effects of the extract on rat duodenum spontaneous contractions in the presence of atropine and promethazine according to the method described by Aviello et al. (2010). The preparation was pretreated with atropine (0.713 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or promethazine (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 20 min before administration of cumulative concentrations of extract (5, 10, 20, 40 and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

After the assessment of the effects of a concentration or a series of concentrations of extract or reference drug, the tissue was washed three to four times with fresh Tyrode's solution and allowed to fully recover (40–50 min) before any further administration. Papaverine 10^{-4} M was added at the end to obtain the substantial maximum relaxant response (Aviello et al., 2010). The relaxant effect of the extract on the tonus of spontaneous contractions was expressed as percentages of decrease related to the maximal relaxation induced by papaverine. The concentrations of extract used in this study were chosen following a trial where they appeared to be effective.

2.6. Assessment of the effects of the extract on carbachol- and histamine-induced contractions

After equilibration, increasing concentrations of carbachol (10^{-9} – 10^{-4} M) were cumulatively applied to the bath solution at 2 min interval and a reference concentration–response trace was recorded. Then, the preparation was pretreated with a single concentration of PMAE (20, 40 or 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or control drug (atropine, 0.713 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 10 min and the concentration–response curve to carbachol was re-examined in the continuous presence of the drug (Horio et al., 1998; Gilani et al., 2008; Desire et al., 2010). Following a similar protocol (Matsumoto et al., 2009; Desire et al., 2010), the effect of PMAE was examined on rat duodenum contraction induced contractions induced by histamine

(10^{-9} – 10^{-4} M) administered cumulatively every 1 min. Promethazine (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as a positive control. Concentration–response curves to carbachol or histamine in the absence and presence of extract were constructed and the EC_{50} and E_{max} were determined. Contractile responses at a given concentration of carbachol or histamine were expressed as percentage of the maximal contraction (maximal tension) previously achieved in the first challenge of the agonist.

2.7. Assessment of the effects of the extract on KCl-induced contractions

KCl (20 mM or 50 mM) was applied to the bath solution to induce a sustained contraction. Once the contraction was relatively stable, cumulative concentrations of PMAE (5, 10, 20, 40 and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were sequentially added every 10 min. Concentration–response curves for the extract were constructed and the EC_{50} and E_{max} were determined (Naseri et al., 2007; Gilani et al., 2008; Borgi and Chouchane, 2009). In another set of experiments, contraction was induced by increasing concentrations of KCl (10^{-3} – 6.10^{-2} M) cumulatively administered to the bath solution at 2 min interval and a reference concentration–response trace was recorded. Then, the preparation was pretreated with the extract (20, 40 or 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 10 min and the concentration–response curve to KCl was re-examined in the continuous presence of the extract (Rodriguez et al., 2006; Chiwororo and Ojewole, 2009). Verapamil (0.1 μM) was used as antagonistic positive control.

2.8. Data analysis

The results were expressed as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M). Statistical differences between groups were evaluated with One-Way ANOVA followed by Newman–Keuls post hoc test for single administrations assays, and Two-Way ANOVA followed by Benforroni multiple comparison post hoc test for concentration–response assays. Analysis was performed using GraphPad Prism package version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

The maximal inhibitory effect (E_{max}) of a tested drug was used to characterize its relaxation efficacy. Relaxation potency was expressed as the negative logarithm of the effective concentration of the tested drug that induced 50% of its maximal response (pD_2 , $-\log\text{EC}_{50}$) (Van Rossum, 1963). The EC_{50} and E_{max} values were calculated by non-linear regression analysis by fitting the concentration–response relation for extract (or other drug) to a sigmoid curve using GraphPad Prism package.

3. Results

3.1. Phytochemical analysis

The phytochemical screening of *P. mannii* stem barks aqueous extract revealed the presence of several bioactive components such as phenols, flavonoids, terpenoids, saponins, tannins, anthraquinones, steroids, lipids, reducing sugars and alkaloids. Triterpens and cardiac glycosides were not detected in the extract. This plant extract exhibited a total polyphenol content of 343.3 ± 28.8 mg/g GAEs.

3.2. Time-dependent effects of the extract on spontaneous contractions

In vitro, rat duodenum suspended in Tyrode's solution displayed spontaneous phasic contractions with a relatively stable frequ-

ency (average 29–30 time/min) and variable amplitude (0.3–1 g depending of the strip). The spontaneous tonus of contractions gradually increased when the tension was mechanically adjusted. This contractile activity was less attenuated by changing of the bath fluid.

The aqueous extract of *P. mannii* stem barks (PMAE 10, 20, 40 or 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) elicited an inhibitory effect on spontaneous contractions of rat duodenum, by reducing both the tonus and the amplitude of contractions in a concentration-dependent manner. However at high concentration (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$), relaxation was followed by a slight increase of tonus, while the amplitude remained lower compared to the normal spontaneous activity (baseline value). The inhibitory effect of a submaximal concentration of PMAE (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was stable for at least 3–4 consecutive administrations (i.e. no tachyphylaxis was observed). The drug vehicle (distilled water) did not modify the spontaneous contractile activity of the tissue. The representative traces illustrating the effects of single concentrations of the aqueous extract of *P. mannii* stem barks on spontaneous contractions of rat duodenum are shown in Fig. 1.

In single administration, PMAE (10, 20, 40 or 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significantly ($P < 0.001$) decreased the tonus of spontaneous contractions in a concentration-dependent manner. The maximal relaxation of the tonus was slowly achieved (10–12 min) after extract injection and the concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ appeared to be the most effective concentration with a high stable relaxant effect (maximal relaxation 48.26%). However, a high concentration (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induced an immediate decrease of the tonus (maximal level 46.15%) followed by a slight increase (maximal level 12.24%) (Fig. 2a). Atropine (0.713 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and promethazine (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) also significantly ($P < 0.001$) reduced the tonus of spontaneous contractions. The relaxant effect of PMAE at 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (48.26%) was similar to that of atropine (48.95%), but significantly ($P < 0.05$) lower than that of promethazine (61.27%) (Fig. 2b).

As shown in Fig. 2c, PMAE at concentrations ranging from 20 to 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, significantly ($P < 0.001$) inhibited the amplitude of spontaneous contractions in a concentration-dependent manner. The maximal relaxant effect of the extract (50.83%) was achieved at 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Promethazine (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induced a strong (51.96%) but not sustained decrease of the amplitude of contractions while atropine (0.713 $\mu\text{g}/\text{mL}$) had only a slight inhibition (14.26%) (Fig. 2d).

PMAE did not modify the frequency of spontaneous contractions of rat duodenum. The mean frequency of contractions was stable (29–30 time/min) before and after administration of the extract whatever the concentration tested (data not shown).

3.3. Concentration-dependent effects of the extract on spontaneous contractions

Administered cumulatively, PMAE (10–80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significantly decreased ($P < 0.001$) the tonus of spontaneous contractions of rat duodenum in a concentration-dependent manner (Fig. 3a). However, a high concentration (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induced relaxation followed by a slight increase of the tonus. Atropine (0.089–1.426 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and promethazine (0.125–2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) also significantly decreased ($P < 0.001$) the tonus of contractions in a concentration-dependent manner (Fig. 3b). The concentration of PMAE which induced 50% of the maximal relaxation (EC_{50}) was $19.77 \pm 1.14 \mu\text{g}/\text{mL}$. The potency of the extract was far different to that of atropine and promethazine, as indicating the pD_2 (-1.30 ± 0.06 vs. 0.57 ± 0.16 vs. 0.21 ± 0.23 , respectively). Its efficacy (E_{max} : $55.76 \pm 4.04\%$) was nearer to that of atropine ($57.06 \pm 4.65\%$) but significantly lower ($P < 0.01$) than that of promethazine ($99.74 \pm 14.02\%$) (Table 1). Pretreatment of duodenum preparations with atropine (0.713 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or promethazine (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) did not significantly attenuate relaxation of the tonus induced by the extract, as the concentration–response curves of the extract in the absence and

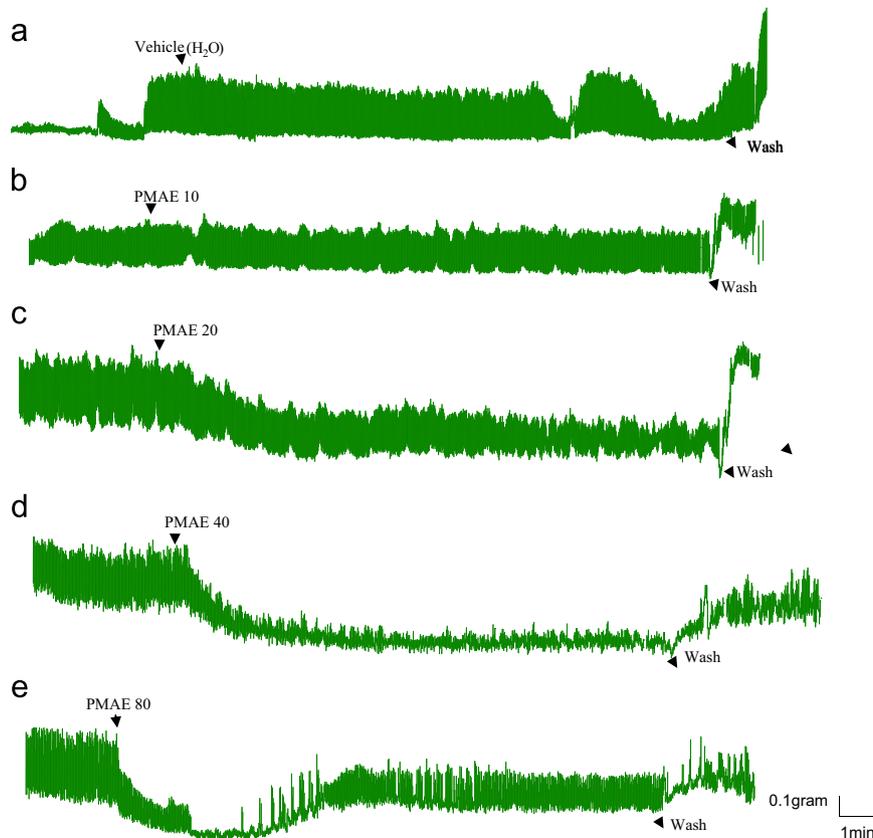


Fig. 1. Original tracings showing the spontaneous contracting activity of isolated rat duodenum (a) and the effects of different concentrations of PMAE on this activity (b, c, d, e). A single concentration of PMAE (10, 20, 40 or 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was administered in the bath solution and its effects were observed for 20 min on the spontaneous contractions.

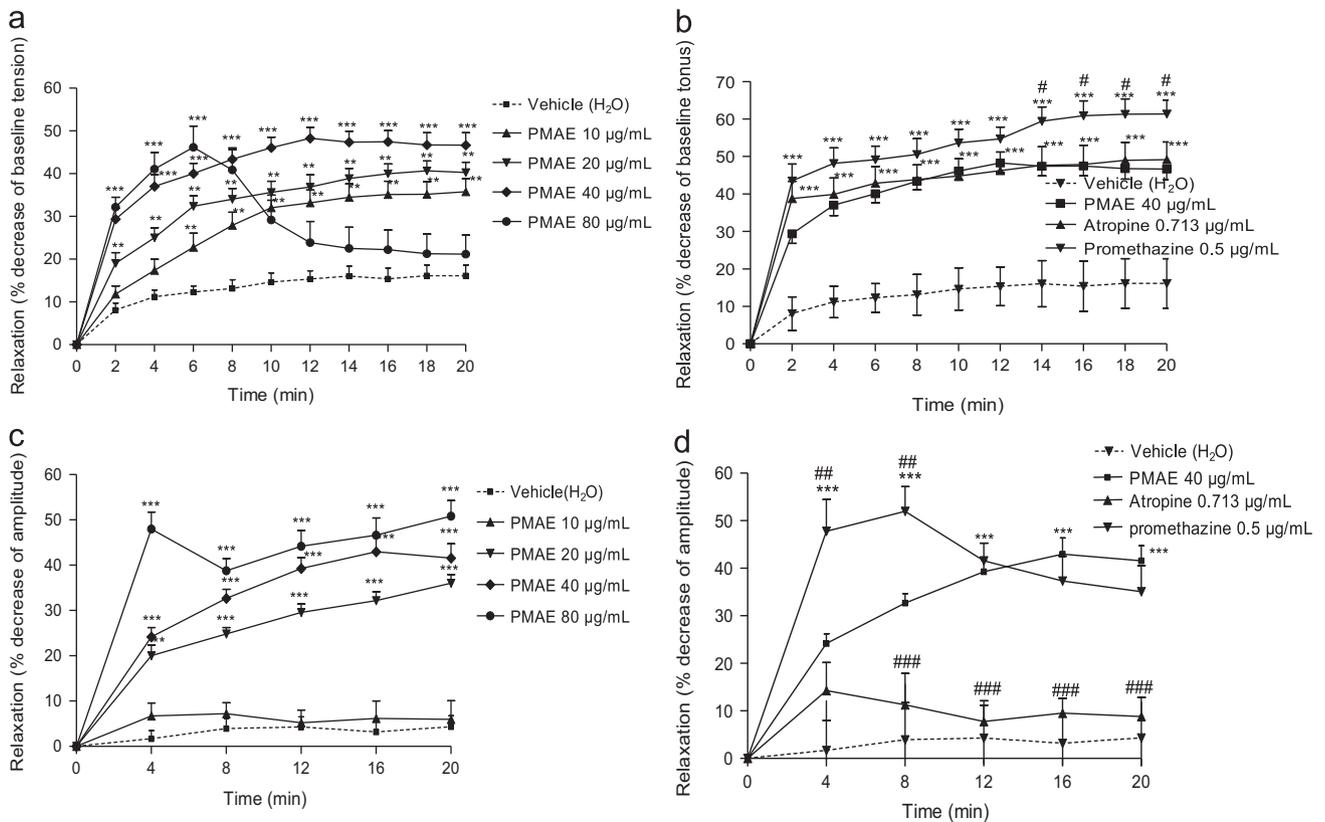


Fig. 2. Time–response curves of the relaxant effect of PMAE and reference drugs on the tonus (a, b) and the amplitude (c, d) of spontaneous contractions in isolated rat duodenum. PMAE (10, 20, 40, 80 and 160 $\mu\text{g/mL}$) was separately administered to the bath solution and the effect observed on spontaneous contractions for 20 min. The vehicle was administered at equivalent volume to that of the maximal concentration of extract. The decrease of the tonus at each time point (time interval) after drug administration was expressed as percentages of the maximal relaxant level (after administration of papaverine 10^{-4} M), and the values of amplitude were expressed as percentages of decrease related to the baseline values (maximal level). The percentages of decrease of the tonus and the amplitude of spontaneous contractions were calculated considering the baseline values (before drug administration) as not changes (0%). Data were expressed as mean \pm S.E.M in vehicle (distilled water, $n=7-12$) or in PMAE ($n=8-12$) treated preparations. Atropine 0.713 $\mu\text{g/mL}$ ($n=6-7$) and promethazine 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ($n=6-7$) were used as positive controls. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ treated preparations vs. negative controls. # $P < 0.01$, ## $P < 0.01$ extract vs. reference drugs.

presence of these antagonists were not significantly different (see Fig. 3a, data not shown for promethazine).

PMAE (20–80 $\mu\text{g/mL}$) significantly attenuated the amplitude ($P < 0.001$) of spontaneous contractions in a concentration-dependent manner. This relaxant effect was relatively similar to that induced by promethazine (0.125–2 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 3c, d). The EC_{50} of PMAE on the amplitude of contractions was 18.47 ± 1.30 $\mu\text{g/mL}$. The activity of the extract was lower than that of promethazine, as indicated the pD_2 and E_{max} values (pD_2 : -1.27 ± 0.11 vs. 0.14 ± 0.19), but the efficacy of the two drugs was nearer (E_{max} : $63.70 \pm 11.85\%$ vs. $63.99 \pm 15.90\%$). Cumulative administration of atropine (0.089–1.426 $\mu\text{g/mL}$) induced a complex activity on rat duodenum; a slight decrease of amplitude at low concentrations whereas high concentrations did not affect the amplitude. Thus, it was not possible to establish the concentration–response curve to atropine on the amplitude and subsequently to determine the EC_{50} and E_{max} of this drug since import changes in the curves slope occurred (Table 1).

3.4. Effects of the extract on carbachol- and histamine-induced contractions

Carbachol (10^{-9} – 10^{-4} M) or histamine (10^{-9} – 10^{-4} M) administered cumulatively induced a concentration-dependent contraction on rat duodenum. The basal tension of spontaneous activity gradually increased and reached a maximal level (E_{max} 100%) approximately at 5.10^{-6} M of carbachol and 8.10^{-5} M of histamine. Pretreatment of the preparations with PMAE (20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$) partially but significantly ($P < 0.001$) inhibited carbachol-

histamine-induced contractions in a concentration-related manner, as shown in Fig. 4. At concentrations of 40 and 80 $\mu\text{g/mL}$, the extract shifted the carbachol and histamine concentration–response curve to the right and down. The E_{max} values were consistently reduced in the extract treated preparations compared to negative control preparation, but the efficacy remained lower compared to that of positive drug (atropine or promethazine) which strongly attenuated the concentration–response curve to the agonist.

3.5. Effects of the extract on KCl-induced contractions

Hyperosmotic K^+ solution (20 mM or 50 mM) applied to duodenum preparation induced a highly transient phasic contraction followed by a sustained tonic contraction which stated at a maximum tension. Cumulative concentrations of PMAE (10–80 $\mu\text{g/mL}$) significantly ($P < 0.001$) decreased the resting tension of KCl-induced contraction in a concentration-dependent manner (Fig. 5a). The E_{max} of PMAE was $100.10 \pm 10.02\%$ and $82.20 \pm 13.50\%$, and the pD_2 -1.25 ± 0.08 and -1.32 ± 0.11 , respectively for 20 mM and 50 mM KCl-induced contractions. KCl (10^{-3} – 6.10^{-2} M) administered cumulatively induced a concentration-dependent contraction on rat duodenum strips; the basal tension of spontaneous activity gradually increased and reached a maximal level (E_{max} 100%) approximately at 4.10^{-2} M of KCl. The plant extract (20, 40, and 80 $\mu\text{g/mL}$) also induced a significant ($P < 0.001$) depression of the cumulative concentration response curve for KCl (10^{-3} – 6.10^{-2} M) in a concentration-related manner (Fig. 5b). The maximal tension of KCl-induced contraction was attenuated in concentration-related manner in extract treated

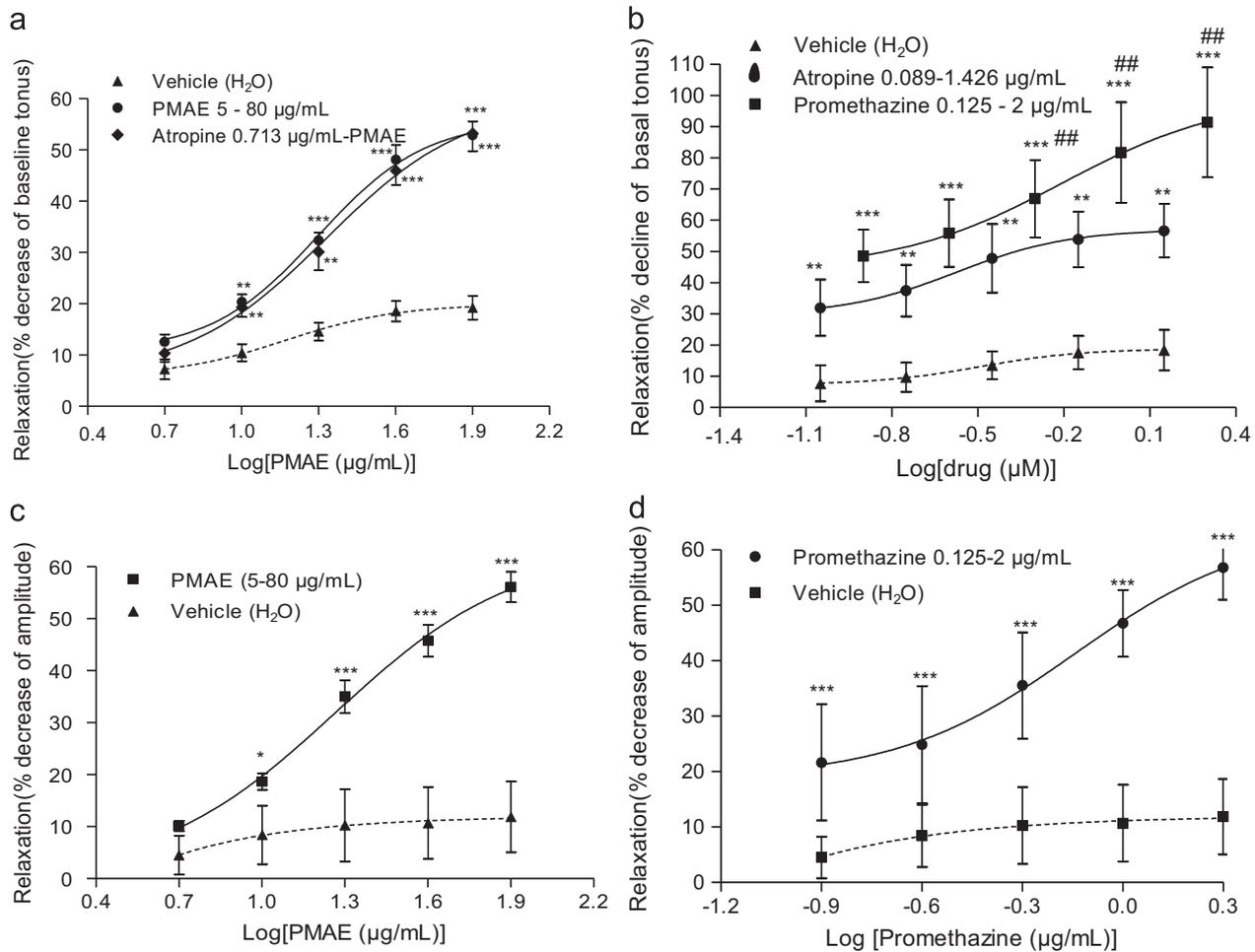


Fig. 3. Concentration–response curves of the relaxant effect of PMAE and reference drugs on the tonus (a, b) and the amplitude (c, d) of spontaneous contractions in isolated rat duodenum. PMAE (5, 10, 20, 40 and 80 $\mu\text{g/mL}$) was cumulatively administered to the bath solution at 10 min intervals. The vehicle was administered at equivalent volume to that of each concentration of extract. The baseline values (before drug administration) of tonus and amplitude of contractions were considered as no changes (0%). Data are expressed as mean \pm S.E.M of percentages of decrease of the tonus and the amplitude in PMAE 5–80 $\mu\text{g/mL}$ ($n=14-16$) treated preparations. Atropine 0.089–1.426 $\mu\text{g/mL}$ ($n=7$) and promethazine 0.125–2 $\mu\text{g/mL}$ ($n=7$) were used as positive controls. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ treated preparations vs. negative control. # # $P < 0.01$ extract vs. reference drugs.

Table 1

Relaxation potency and efficacy of PMAE, atropine and promethazine on the tonus and the amplitude of spontaneous contractions in rat duodenum.

	Tonus			Amplitude		
	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	pD_2 ($-\log EC_{50}$)	E_{max} (%)	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	pD_2 ($-\log EC_{50}$)	E_{max} (%)
PMAE 5–80 $\mu\text{g/ml}$	19.77 ± 1.14	-1.30 ± 0.06	55.76 ± 4.04	18.47 ± 1.30	1.266 ± 0.114	63.70 ± 11.86
Atropine 0.089–1.426 $\mu\text{g/mL}$	0.27 ± 0.69	0.57 ± 0.16	57.06 ± 4.65	–	–	–
Promethazine 0.125–2 $\mu\text{g/mL}$	0.62 ± 0.593	0.21 ± 0.23	99.74 ± 15.47	0.72 ± 0.65	0.14 ± 0.186	63.99 ± 15.90

Data are mean \pm SEM of EC_{50} , pD_2 and E_{max} in PMAE 5–80 $\mu\text{g/mL}$ ($n=14-16$) treated preparations. Atropine 0.089–1.426 $\mu\text{g/mL}$ ($n=7$) and promethazine 0.125–2 $\mu\text{g/mL}$ ($n=7$) were used as positive controls.

preparations compared the negative control as indicating the E_{max} values of KCl (control: $87.57 \pm 6.75\%$ vs. $79.58 \pm 7.32\%$, $56.21 \pm 3.47\%$, $45.58 \pm 5.01\%$, respectively for 20, 40, and 80 $\mu\text{g/mL}$ of extract), while verapamil, a standard positive was more potent against the KCl-induced contractions (E_{max} : $28.48 \pm 4.25\%$).

4. Discussion

The aqueous extract of stem barks of *P. mannii* (PMAE) at concentrations of 10–80 $\mu\text{g/mL}$ elicited a relaxant effect on rat duodenum by reducing significantly and in concentration-dependent manner the tonus and amplitude of spontaneous

contractions. However, a high concentration (80 $\mu\text{g/mL}$) induced a transient relaxant effect followed by an increase of the tonus, while the amplitude remained lower compared to the normal spontaneous activity. The most important finding in the present study was that PMAE elicited its relaxant effect only within a very short range of concentrations (10–40 $\mu\text{g/mL}$) whereas high concentrations (80 $\mu\text{g/mL}$ and above) further induced a slight or a potent transient increase of the tonus (biphasic effect). A similar biphasic effect was observed in several studies with other plant extracts which exhibited a biphasic action on contractility of intestinal smooth muscle cells (Udia et al., 2009; Hu et al., 2010). Taken together, these findings suggest that the effect of PMAE on gastrointestinal motility is not a simply inhibitory or stimulatory

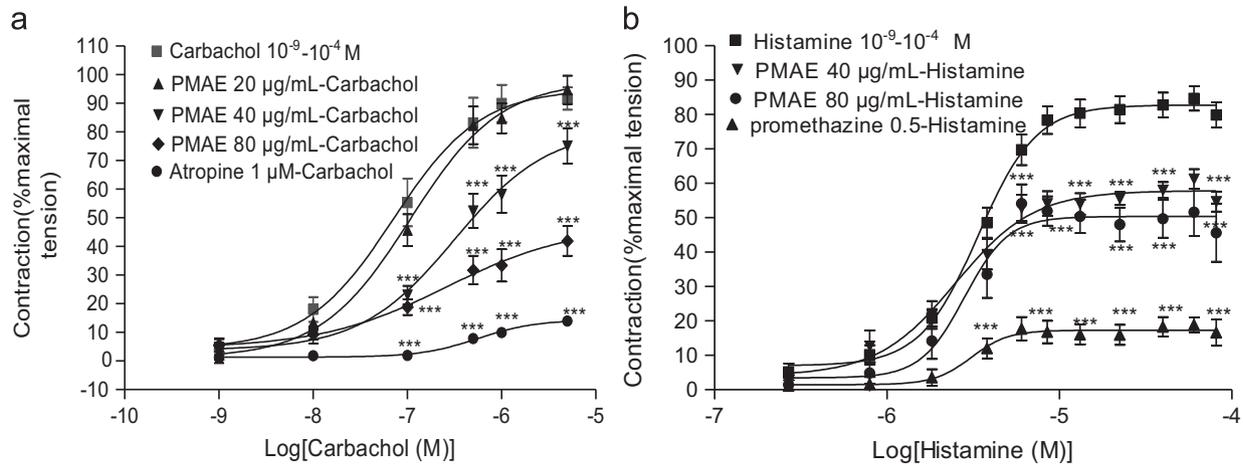


Fig. 4. Carbachol (a) and histamine (b) concentration–response curves on the isolated rat duodenum in the absence or in the presence of PMAE (20, 40 or 80 μg/mL), atropine (0.713 μg/mL) or promethazine (0.5 μg/mL). Carbachol (10⁻⁹–10⁻⁴ M) or histamine (10⁻⁹–10⁻⁴ M) was cumulatively applied to the bath solution and concentration–response curves were recorded in absence or in presence of extract or reference drugs. Contractile response at a given concentration of carbachol or histamine was expressed as a percentage of the maximal contraction (maximal tension) previously achieved in the first challenge of the agonist. Data are expressed as mean ± SEM of percentages of increase of the basal tension (related to the maximal contraction) in presence of PMAE 20–80 μg/mL ($n=6-9$) or reference positive drugs ($n=7-8$). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. reference negative control ($n=6-12$) preparations.

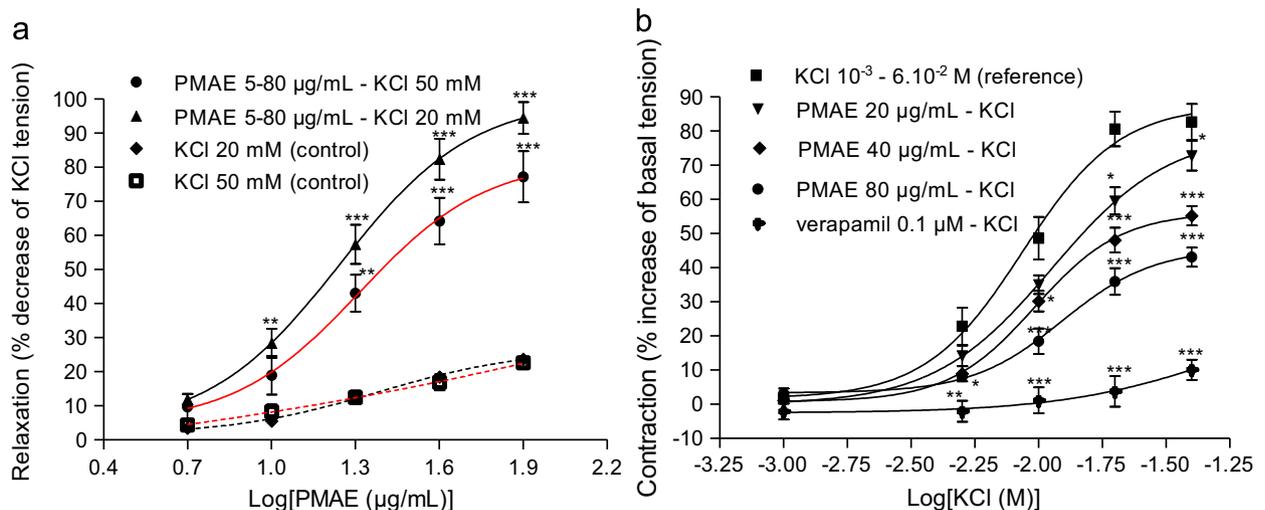


Fig. 5. Concentration–response curve of the relaxant effect of PMAE on KCl-induced contractions in isolated rat duodenum. KCl (20 mM or 50 mM) was applied to the bath solution to induce a sustained contraction and PMAE (5–80 μg/mL) was cumulatively administered at 10 min intervals (a). The vehicle was administered at equivalent volume to that of each concentration of extract. The relaxant response to extract at each concentration point was estimated as percentage of abolition of the maximal resting tension initially induced by KCl (20 mM or 50 mM). KCl (10⁻³–6.10⁻² M) was cumulatively applied to the bath solution at 2 min intervals and concentration–response curves were recorded in the absence (reference) or in presence of the extract or positive drug (b). Contractile response at a given concentration of KCl was expressed as a percentage of the maximal contraction (maximal tension) previously achieved in the first challenge of KCl. Data expressed as mean ± SEM are percentages of decrease or increase of the tension of contractions in presence of PMAE ($n=6-9$) or verapamil ($n=4$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. distilled water negative control ($n=8-12$) preparations.

action, but a unique modulatory process depending on the concentration of the extract (Hu et al., 2010). Another hypothesis to explain this biphasic effect is that either there may be at least two chemically distinctive components displaying relaxant and contracting activities in *P. mannii* stem barks aqueous extract, or it is possible that the active compounds of PMAE could be acting through two or more different mechanisms (Rojas-Vera et al., 2002).

Our results revealed the presence of secondary metabolites in the aqueous extract of stem barks of *P. mannii* such as phenols, flavonoids, terpenoids, saponins and tannins. Previous investigations lead to isolation of triterpenoid saponin derived compounds from leaves (Seo et al., 2002) and stem barks (Kennedy et al., 2013) of *P. mannii*. In this study, phytochemical analysis also shown that our plant extract contained more than 343.3 ± 28.8 mg/g of total polyphenolic content and it has been reported previously that phenolic compounds such as flavonoids and tannins have inhibitory

effects on intestinal smooth muscle (Nguelefack et al., 2006; Aviello et al., 2010; Damabi et al., 2010; Kishore and Rahman, 2012; Yunita et al., 2012). Terpenoids and saponins have also been reported in other plant extracts to exhibit antispasmodic and vasodilatory effects on smooth muscle preparations (Ghayur et al., 2005; Chiwororo and Ojewole., 2009; Dubravka et al., 2010). The presence of these bioactive compounds in the aqueous extract of *P. mannii* might explain at least in part the observed effects on rat duodenum.

It is well known that gastrointestinal smooth muscles are spontaneously active with periodic generation of slow waves and/or spike potentials (Nakamura and Suzuki, 2004; Kim et al., 2006). The spontaneously generated rhythmic activity of gastrointestinal smooth muscle, with associated slow waves or spike potentials, is initiated by interstitial cells of Cajal distributed in the myenteric region (ICC-MY) (Hotta et al., 2005; Okishio et al., 2005; Kim et al., 2006). Slow waves propagate within ICC networks, conduct into smooth muscle cells via gap junctions, and

initiate phasic contractions by activating Ca^{2+} entry through L-type Ca^{2+} channels (Golenhofen and Lammel, 1972; Ozaki et al., 1991; Nakamura and Suzuki, 2004; Kim et al., 2006). Gastrointestinal motility is an integrated process controlled by circulating hormones, intrinsic and extrinsic nerves that release a variety of transmitters (Hejazian-Y et al., 2009; Damabi et al., 2010). In the present study, the decline of the tonus and amplitude of spontaneous contractions induced by PMAE might be due either to a reduced transmitter release or to a reduction in the ability of the smooth muscle to generate force in response to release neurotransmitters (Rodriguez et al., 2006) or lastly to a blockage of calcium influx into the muscle cell through voltage-gated Ca^{2+} channels (Grassa et al., 2004; Gilani et al., 2005; Borrelli et al., 2009; Kishore and Rahman, 2012).

Moreover, the antispasmodic activity of PMAE could be either produced as a result of a non-specific membrane mediated effect or a more specific receptor mediated effect (Rojas-Vera et al., 2002). Activation of muscarinic and histaminic receptors on gastrointestinal smooth muscle cells by release of acetylcholine or histamine from excitatory neurons or other sources plays an important physiological role in the stimulation of spontaneous muscle contractions (Rodriguez et al., 2006; Hu et al., 2010). Thus, an antispasmodic activity on gastrointestinal smooth muscle could be mediated through inhibition of muscarinic and/or histaminic receptors on the cells membrane (Gilani et al., 2008; Dubravka et al., 2010). In the present study, we investigated the possible involvement of these specific receptors in the relaxant effect of the extract on rat intestine. First, we found that the inhibitory activity of PMAE, especially on the tonus of spontaneous contractions was lower than that of atropine and promethazine, as indicated the pD_2 values (pD_2 : – 1.30 vs. 0.57 vs. 0.20 respectively). Second, it appeared that pretreatment of preparations with atropine and promethazine did not significantly modify the relaxation induced by the extract on rat duodenum. Taken together, these results suggest that PMAE might exert its inhibitory effects through a mechanism which is not specifically anticholinergic or antihistaminic. Moreover, we evaluated the effect of PMAE on carbachol- and histamine-induced contractions of rat duodenum. Our results showed that PMAE partially but significantly inhibited in a concentration-dependent manner the contractile response elicited by carbachol or histamine on rat duodenum. Smooth muscles contraction, in response to histamine or carbachol is initiated by the increase of the cytoplasmic-free Ca^{2+} concentration. These agonists directly activate their specific receptors on the membrane of gastrointestinal smooth muscle cells (Rodriguez et al., 2006; Gilani et al., 2008), which results in activation of several intracellular pathways and production of second messengers (phospholipase C, inositol triphosphate, diacylglycerol, protein kinase C) which in turn stimulate the release of internal Ca^{2+} from sarcoplasmic reticulum stores and the Ca^{2+} influx through voltage-gated Ca^{2+} channels (Chiwororo and Ojewole, 2009; Desire et al., 2010; Dubravka et al., 2010; Hu et al., 2010). Therefore, the inhibitory effects of PMAE on carbachol- or histamine-induced contractions could be produced as a result of a blockage of muscarinic or histaminic receptors on the cell membrane, or a calcium channel blocking activity. Our results demonstrated that the inhibitory effect of PMAE on acetylcholine and histamine contractions was lower than that of atropine and promethazine (standard antimuscarinic and antihistaminic drugs), and the shape of the concentration–response curves shows a non-competitive inhibition (Desire et al., 2010), thus further supporting the hypothesis that the inhibitory effects of PMAE may not involve direct stimulation of muscarinic or histaminic on the cell membrane.

In smooth muscle cells, it is well known that Ca^{2+} is a critical factor in excitation–contraction coupling (Xia et al., 2008; Borrelli et al., 2009). A reduction in intracellular calcium leads to

relaxation of intestinal smooth muscle. This relaxation can be due to a prevention of calcium entry into smooth muscle cells from extracellular fluid (mostly through L-type Ca^{2+} channels sensitive to verapamil) or a reduction of calcium release from the intracellular calcium store (Borgi and Chouchane, 2009; Borrelli et al., 2009). It had also been reported that the disturbance of L-type Ca^{2+} channels activity was one of the causes of intestinal motility decrease (Kishore and Rahman, 2012). To verify whether the inhibitory effect of PMAE was mediated through calcium channel blocking activity, we evaluated the effect of this extract both on the tonic component and on the phasic component of the contractile response induced respectively by single and cumulative concentrations of KCl in rat duodenum. Our results showed that the aqueous extract of *P. mannii* stem bark (PMAE) relaxed the tonic contraction induced by low concentration of KCl (20 mM), thus suggesting that PMAE possesses spasmolytic effect in the rat small intestine (Aviello et al., 2010). The results also showed that PMAE significantly inhibited high K^+ contractions induced by single (50 mM) or cumulative (1–60 mM) concentrations of KCl, as did verapamil, a standard Ca^{2+} channel antagonist. High K^+ (> 30 mM) stimulation, which provokes membrane depolarization, is the most common method for the introduction of Ca^{2+} into cell without receptor stimulation (Rodriguez et al., 2006; Dubravka et al., 2010). It causes smooth muscle contractions through opening voltage-dependent Ca^{2+} channels, thus allowing an influx of extracellular Ca^{2+} causing a contractile effect. A substance causing inhibition of high K^+ -induced contractions is considered as a blocker of calcium influx (Gilani et al., 2008; Borgi and Chouchane, 2009; Chiwororo and Ojewole, 2009; Dubravka et al., 2010). Therefore, our results (the inhibitory effect exhibited by PMAE against high K^+ contractions) suggest that PMAE might inhibit the Ca^{2+} influx through voltage-operated Ca^{2+} channels (Xia et al., 2008; Borgi and Chouchane, 2009; Chiwororo and Ojewole, 2009; Dubravka et al., 2010) to produce non-selective spasmolytic effects. The spasmolytic effect may be attributed to the presence of some biochemical substances such as flavonoids which are reported to relax smooth muscles through inhibition of the entry of extracellular Ca^{2+} (Xia et al., 2008; Chen et al., 2009; Dubravka et al., 2010).

5. Conclusion

The aqueous extract of *P. mannii* stem barks (PMAE) induces at lower concentrations a potent relaxation by reducing the tonus and the amplitude of spontaneous contractions of rat duodenum. PMAE inhibits contractions induced by carbachol and histamine on rat duodenum, and relaxes the resting or the maximal tension of the duodenum contraction due to depolarization (KCl). These results suggest that PMAE possess antispasmodic and spasmolytic effects; therefore supporting the use of the stem barks of this plant in the folk medicine for the treatment of diarrhea and other gastrointestinal disorders. However, caution should be paid while using higher concentrations that instead might produce spasmogenic effect and might worsen the diarrheal condition. The relaxant effect of PMAE appears to be non-specific of muscarinic or histaminic receptors, but may involve at least in part a Ca^{2+} channels blocking activity. This plant has therefore been identified as a potential source for the discovery of new antidiarrheal lead compounds. Further studies are needed to assess the possible mechanisms underlying the relaxant and biphasic effects of this plant extract on intestinal contractility and on the motility *in vivo*, to evaluate the safety of the extract and to isolate the active compounds that are responsible for the observed pharmacological effects.

References

- Aviello, G., Scalis, C., Fileccia, R., Capasso, R., Romano, B., Izzo, A.A., Borrelli, F., 2010. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester, a plant-derived polyphenolic compound, on rat intestinal contractility. *Eur. J. Pharmacol.* 640, 163–167.
- Ayoola, G.A., Coker, H.A.B., Adesegun, S.A., Adepoju-Bello, A.A., Obaweya, K., Ezennia, E.C., Atangbayila, T.O., T.O., 2008. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Trop. J. Pharm. Res.* 7, 1019–1024.
- Borgi, W., Chouchane, N., 2009. Anti-spasmodic effects of *Zizyphus lotus* (L.) Desf. extracts on isolated rat duodenum. *J. Ethnopharmacol.* 126, 571–573.
- Borrelli, F., Borbone, N., Capasso, R., Montesano, D., De Marino, S., Aviello, G., Aprea, G., Masone, S., Izzo, A.A., 2009. Potent relaxant effect of a *Celastrus paniculatus* extract in the rat and human ileum. *J. Ethnopharmacol.* 122, 434–438.
- Chen, G., Zhu, L., Liu, Y., Zhou, Q., Chen, H., Yang, J., 2009. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, plays a dual role in regulating gastrointestinal motility in vitro and in vivo. *Phytother. Res.* 23, 498–506.
- Ching, F.P., Omogbai, E.K.I., Ozolua, R.I., Okpo, S.O., 2008. Antidiarrhoeal activities of aqueous extract of *Stereospermum kunthianum* (Cham, Sandrine Petit) stem bark in rodents. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 1220–1225.
- Chiwororo, W.D.H., Ojewole, J.A.O., 2009. Spasmolytic effect of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract on rat isolated uterine horns. *J. Smooth Muscle Res.* 45, 31–38.
- Damabi, M.N., Moazedi, A.A., Seyyednejad, S.M., 2010. The role of α - and β -adrenergic receptors in the spasmolytic effects on rat ileum of *Petroselinum crispum* Latifolium (parsley). *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2010, 866–870.
- Desire, O., Rivière, C., Razafindrazaka, R., Goossens, L., Moreau, S., Guillon, J., Uverg-Ratsimamanga, S., Andriamadio, P., Moore, N., Randrianisoa, A., Raharisololalao, A., 2010. Antispasmodic and antioxidant activities of fractions and bioactive constituent davidigenin isolated from *Mascarenhasia arborescens*. *J. Ethnopharmacol.* 130, 320–328.
- Dimo, T., Rakotonirina, A., Kamgang, R., Tankwa, T.R., Wanda, K., G.J.M., 2001. Effets de l'extrait au cyclohexane de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) sur la motricité intestinale de rat. *Afr. J. Sci. Technol. (AJST)* 2, 32–35.
- Dubravka, B., Suzana, B., Dusanka, K., Mirjana, R., Teodora, J., Katarina, S., Slavoljub, Z., 2010. Relaxant effect of the ethanol extract of *Helichrysum plicatum* (Asteraceae) on isolated rat ileum contractions. *Molecules* 15, 3391–3401.
- Emendörfer, F., Bellato, F., Noldin, V.F., Niero, R., Cechinel Filho, V., Cardozo, A.M., 2005. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. *J. Pharmacol. Sci.* 8, 63–68.
- Farthing, M.J.G., 2002. Novel targets for the control of secretory diarrhoea. *Gut* 50, 15–18.
- Fawole, O.A., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2009. Antimicrobial activity and mutagenic effects of twelve traditional medicinal plants used to treat ailments related to gastro-intestinal tract in South Africa. *S. Afr. J. Bot.* 75, 356–362.
- Fawzi, M., 2013. Traditional medicines in Africa: an appraisal of ten potent African medicinal plants. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2013, 1–14.
- Focho, D.A., Ndam, W.T., Fonge, B.A., 2009. Medicinal plants of Aguambu–Bamumbu in the Lebalele highlands, South west province of Cameroon. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 3, 001–013.
- Ghayur, M.N., Gilani, A.H., Afridi, M.B., Peter, J., Houghton, P.J., 2005. Cardiovascular effects of ginger aqueous extract and its phenolic constituents are mediated through multiple pathways. *Vasc. Pharmacol.* 43, 234–241.
- Gilani, A.H., Bashir, S., Janbaz, K.H., Shah, A.J., 2005. Presence of cholinergic and calcium channel blocking activities explains the traditional use of *Hibiscus rosasinensis* in constipation and diarrhoea. *J. Ethnopharmacol.* 102, 289–294.
- Gilani, A.H., Khan, A.U., Ali, T., Ajmal, S., 2008. Mechanisms underlying the antispasmodic and bronchodilator properties of *Terminalia bellerica* fruit. *J. Ethnopharmacol.* 116, 528–538.
- Golenhofen, K., Lammel, E., 1972. Selective suppression of some components of spontaneous activity in various types of smooth muscle by iproveratril (verapamil). *Pflüg. Arch.* 331, 233–243.
- Grassa, L., Rebollar, E., Arruebo, M.P., Plaza, M.A., Murillo, M.D., 2004. The role of Ca^{2+} in the contractility of rabbit small intestine in vitro. *J. Physiol. Pharmacol.* 55, 639–650.
- Hejazian-Y, S.H., Dashti-R, M.H., Mahdavi, S.M., Qureshi, M.A., 2009. The effect of *Carum copticum* extract on acetylcholine induced contraction in isolated rat's ileum. *J. Acupunct. Meridian Stud.* 2, 75–78.
- Horio, S., Nagare, T., Ishida, Y., Moritoki, H., 1998. Effects of local anesthetics on acetylcholine-induced desensitization of guinea pig ileal longitudinal muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286, 221–227.
- Hotta, A., Kito, Y., Suzuki, H., 2005. The effects of flufenamic acid on spontaneous activity of smooth muscle tissue isolated from the guinea-pig stomach antrum. *J. Smooth Muscle Res.* 41, 207–220.
- Hu, J., Gao, W.-Y., Gao, Y., Ling, N.S., Huang, L.Q., Liu, C.-X., 2010. M3 muscarinic receptor- and Ca^{2+} influx-mediated muscle contractions induced by croton oil in isolated rabbit jejunum. *J. Ethnopharmacol.* 129, 377–380.
- Kamgang, R., Zintchem, R., Dimo, T., Yewah, P., 2001. Effets des extraits totaux aqueux de *Mallotus oppositifolium* et de *Euphorbia hirta* (Euphorbiaceae) sur l'activité contractile intestinale de rat. *Afr. J. Sci. Technol. (AJST)* 2, 8–11.
- Kennedy, D.N., Alain, M.L., Godfred, A.A., Moses, N.N., Quentin, B., Simon, E., 2013. Isolation and identification of an antiparasitic triterpenoid estersaponin from the stem bark of *Pittosporum mannii* (Pittosporaceae). *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 3, 389–392.
- Kim, Y.C., Hayase, M., Nakamura, E., Kito, Y., Suzuki, H., 2006. Effects of 5-hydroxytryptamine on electrical responses of circular smooth muscle isolated from the guinea-pig gastric antrum. *J. Smooth Muscle Res.* 42, 203–216.
- Kishore, D.V., Rahman, R., 2012. Spasmolytic activity of *Casuarina equisetifolia* bark extract. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 3, 1452–1456.
- Lin, J., Puckree, T., Mvelase, T.P., 2002. Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. *J. Ethnopharmacol.* 79, 53–56.
- Matsumoto, T., Horiuchi, M., Kamata, K., Seyama, Y., 2009. Effects of *Bidens pilosa* L. var. radiata Scherrf treated with enzyme on histamine-induced contraction of guinea-pig ileum and on histamine release from mast cells. *J. Smooth Muscle Res.* 45, 43–54.
- Momeni, J., Djialeu, W.P., Fadimatou, M.T., Ngassoum, M.B., 2010. Antioxidant activities of some Cameroonian plants extracts used in the treatment of intestinal and infectious diseases. *Indian J. Pharm. Sci.* 72, 140–144.
- Nakamura, E., Suzuki, H., 2004. Dual concentration-dependent effects of phorbol 12, 13-dibutyrate on spontaneous and acetylcholine-induced electrical responses recorded from isolated circular smooth muscle of the guinea-pig stomach antrum. *J. Smooth Muscle Res.* 40, 259–270.
- Naseri, M.K., Moghaddam, A.M., Bahadoram, S., 2007. Antispasmodic effect of *Tecoma stans* (L.) Juss leaf extract on rat ileum. *DARU* 15, 123–128.
- Ndenecho, E.N., 2010. Indigenous trees and shrubs in silvopastoral systems of the Bamenda highlands of Cameroon. *Glob. J. Hum. Soc. Sci.* 10, 56–64.
- Nguelefack, T.B., Sontia, B., Dongmo, A.B., Dimo, T., Kamanyi, A., Vierling, W., 2006. Spasmolytic effects of extracts from *Kalanchoe crenata* Andrews (Crassulaceae) leaves. *J. Pharmacol.* 1, 190–198.
- Nwinyi, F.C., Binda, L., Ajoku, G.A., Aniagu, S.O., Enwerem, N.M., Orisadipe, A., Kubarawa, D., Gamaniel, K.S., 2004. Evaluation of the aqueous extract of *Boswellia dalzielii* stem bark for antimicrobial activities and gastrointestinal effects. *Afr. J. Biotechnol.* 3, 284–288.
- O'Malley, P., Trimble, N., Browning, M., 2004. Are herbal therapies worth the risks? *Nurse Pract.* 29, 71–75.
- Ohama, T., Hori, M., Ozaki, H., 2007. Mechanism of abnormal intestinal motility in inflammatory bowel disease: how smooth muscle contraction is reduced? *J. Smooth Muscle Res.* 43, 43–54.
- Okishio, Y., Takeuchi, T., Fujita, A., Suenaga, K., Fujinami, K., Munakata, S., Hata, F., 2005. Examination of the role of cholinergic myenteric neurons with the impairment of neural reflexes in the ileum of *c-kit* mutant mice. *J. Smooth Muscle Res.* 41, 49–60.
- Ozaki, H., Blondfield, D.P., Stevens, R.J., Publicover, N.G., Sanders, K.M., 1991. Simultaneous measurement of membrane potential, cytosolic calcium and muscle tension in smooth muscle tissue. *Am. J. Physiol.* 260, 917–925.
- Rodriguez, R., Ventura-Martinez, R., Santiago-Mejia, J., Avila-Costa, M.R., Fortoul, T.I., 2006. Altered responsiveness of the guinea-pig isolated ileum to smooth muscle stimulants and to electrical stimulation after in situ ischemia. *Br. J. Pharmacol.* 147, 371–378.
- Rojas-Vera, J., Fatel, A.V., Dacke, C.G., 2002. Relaxant activity of raspberry (*Rubus idaeus*) leaf extract in guinea-pig ileum in vitro. *Phytother. Res.* 16, 665–668.
- Seo, Y., Berger, J.M., Hoch, J., Neddermann, K.M., Bursucker, I., Mamber, S.W., 2002. A new triterpene saponin from *Pittosporum viridiflorum* from Madagascar rain-forest. *J. Nat. Prod.* 65, 65–68.
- Shimizu, K., Eiru, Y., Mami, T., Keiichiro, G., Seigo, O., Norimoto, U., Shingiro, N., 2000. Mechanism of relaxant response to papaverine on the smooth muscle of non-pregnant rat uterus. *J. Smooth Muscle Res.* 36, 83–91.
- Stark, T.S., Mtui, D.J., Balemba, O.B., 2013. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of gastrointestinal pain, inflammation and diarrhoea in Africa: future perspectives for integration into modern medicine. *Animals* 3, 158–227.
- Tomita, T., 1981. Electrical activity (spikes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscles. In: Bülbbring, E., Brading, A.F., Jones, A.W., Tomita, T. (Eds.), *Smooth Muscle: An Assessment of Current Knowledge*. Edward Arnold, London, pp. 127–156.
- Udia, P.M., Braide, V.B., Owu, D.U., 2009. Antispasmodic and spasmolytic effects of methanolic extract from seeds of *Garcinia kola* on isolated rat small intestine. *Niger. J. Physiol. Sci.* 24, 111–116.
- Van Rossum, J.M., 1963. Cumulative dose–response curves II. Technique for the making of dose–response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch. Int. Pharmacodyn. Théor.* 143, 299–330.
- Xia, M., Qian, L., Zhou, X., Gao, Q., Bruce, I.C., Xia, Q., 2008. Endothelium-independent relaxation and contraction of rat aorta induced by ethyl acetate extract from leaves of *Morus alba* L. *J. Ethnopharmacol.* 120, 442–446.
- Yunita, E.P., Aniek, M.H., Eddy, S., 2012. The potency of *Rhizophora mucronata* leaf extract as antidiarrhea. *J. Appl. Sci. Res.* 8, 1180–1185.

ANNEXES

Annexe 1: Préparation de quelques réactifs pour les dosages

1. Réactifs pour le dosage des nitrites

Le réactif de Griess a été préparée en dissolvant séparément dans de l'eau distillée et à l'abri de la lumière, 480 mg de sulfanilamide et 48 mg de naphthyléthylènediamide. Les deux solutions ont été mélangées à 1,263 mL d'acide orthophosphorique 95%. Le mélange a été homogénéisé et le volume complété à 48 mL avec de l'eau distillée.

Une solution standard de nitrite de sodium (NaNO_2) a été préparée à la concentration de 1 mM, en dissolvant 0,69 mg de NaNO_2 dans de l'eau distillée en quantité suffisante pour avoir 10 mL de solution finale.

2. Réactifs pour le dosage des protéines totales

Une solution de sérum albumine bovin (SAB) de concentration de 3 mg/mL a été obtenue en dissolvant 1,50 mg de SAB dans 0,50 mL d'eau distillée.

Le réactif de biuret a été préparé en deux étapes. Premièrement, 0,75 g de sulfate de cuivre hydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) et 3 g de tartrate de sodium et de potassium ont été dissous dans 100 mL d'eau distillée (Solution A). 15 g de soude ont été dissous dans 100 mL d'eau distillée (Solution B). Deuxièmement, les solutions A et B ont été mélangées et le volume final ajusté à 500 mL avec de l'eau distillée.

La solution de chlorure de sodium (NaCl 0,9%) a été préparée en dissolvant 0,9 g de sel dans 100 mL d'eau distillée.

Annexe 2: Préparation des solutions et des milieux de culture

Solution A	Solution B	Composition de la solution de Mc Farland
$\text{BaCl}_2 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$ à 1% (10 g/L).	H_2SO_4 à 1% (10 mL/L)	0,5 mL de la solution A +99,5 mL de la solution B.

■ Préparation de l'Etalon 0,5 Mc Farland

Introduction de 0,5 mL de BaCl_2 (1%) dans une éprouvette gradué et compléter à 100 mL avec H_2SO_4 (1%)

Observation d'une solution blanchâtre

Lecture de la DO à 625 nm ($0,08 > \text{DO} > 0,1$)

Lecture de la DO à 450 nm

■ Préparation de l'eau physiologique :

- Na Cl.....9 g.
- Eau distillée.....1000 ml.

■ Composition gélose Mueller-Hinton :

Infusion de viande de bœuf déshydratée ----- 300 g
Hydrolysate de caséine -----17,5 g
Amidon de maïs -----1,5 g
Agar agar -----13 g
Eau distillée -----1000 ml
pH final -----7,2 - 7,4

• Préparation

Mettre en suspension 38,0 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée

Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.

Répartir en tubes ou en flacons.

Stériliser à l'autoclave à 115°C pendant 15 minutes.

■ Composition de la gélose de Sabouraud au chloramphénicol :

Peptone pepsique de viande10,0 g
Glucose.....20,0 g
Chloramphénicol0,5 g
Eau distillée.....1000 ml

Agar agar.....15,0 g
 pH du milieu5,7 ± 0,2.

• **Préparation**

Mettre en suspension 45,5 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée
 Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
 Répartir en tubes ou en flacons.
 Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

■ **Composition gélose SS :**

Peptone:.....5,0 g
 Extrait de Viande:.....5,0 g
 Lactose:.....10,0 g
 Citrate de Sodium:.....10,0 g
 Citrate de Fer III:.....1,0 g
 Sels Biliaires:.....8,5 g
 Vert Brillant:.....3,3 mg
 Rouge Neutre:.....25 mg
 Thiosulfate de Sodium 8,5 g
 Agar12,0 g
 pH7,3

• **Préparation**

Mettre en suspension 63,0 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ;
 Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution ;
 Ne pas autoclaver.

■ **Composition de Chapmann mannitol :**

• **Préparation**

■ **Composition du milieu Endo :**

• **Préparation**

Annexe 3: Schéma montant le protocole d'essai de la toxicité aiguë (OCDE, 2001)

