

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCES
DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

**ETUDE CHIMIQUE DE QUELQUES Entada
(Mimosaceae) ET Aframomum (Zingiberaceae):
POTENTIELS TRYPANOCIDES ET BACTERICIDES**

Doctorat/Ph.D en Chimie Organique

Par :

TCHANA SATCHET Emmanuella Marthe
DEA en Chimie Organique

Sous la direction
NYASSE Barthélémy
Professeur

Année Académique
2014-2015





AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire de Yaoundé I. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : biblio.centrale.uyi@gmail.com

WARNING

This document is the fruit of an intense hard work defended and accepted before a jury and made available to the entire University of Yaounde I community. All intellectual property rights are reserved to the author. This implies proper citation and referencing when using this document.

On the other hand, any unlawful act, plagiarism, unauthorized duplication will lead to Penal pursuits.

Contact: biblio.centrale.uyi@gmail.com

DEDICACES

A :

- feu mon père TCHANA Jean ;
- feu mon époux KELEKO ATSAGMO Elvis William ;
- feu ma belle-mère TONFACK Cécile ;
- ma mère KAMENI EMAKOUA Jeannette ;
- mes enfants KELEKO TCHANA Franklin Steve, KELEKO ASSONZON Pierre Michel, KELEKO TONFACK Irène Merveilles et KELEKO KAMENI Ange Flaure ;
- mes sœurs KOUEKAM TCHUITCHAM Adeline Théophile et TCHANA MAGOMOU Léonie.

Que tous les sacrifices consentis, le bonheur, la joie et l'amour que nous partageons, trouvent ici la force et la satisfaction suffisantes pour un lendemain meilleur.

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie Médicinale de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, en collaboration avec plusieurs autres équipes de recherche.

Je voudrais témoigner ma reconnaissance :

au Professeur NYASSE Barthélemy, qui m'a proposé le sujet de thèse et a dirigé sa réalisation. Il n'a ménagé aucun effort pour me faire bénéficier de son expérience dans le domaine des Substances Naturelles et de la Synthèse Organique ;

au Professeur NKENGFACK Augustin Ephrem, Chef de Département de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I, pour le soutien dont j'ai bénéficié depuis mon admission dans ce Département ;

aux membres du jury de cette thèse. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude pour toutes leurs suggestions qui nous permettront d'améliorer la qualité scientifique de ce travail ;

au Professeur YANKEP Emmanuel, pour ses conseils et sa franche collaboration ;

au Professeur SONKE Bonaventure, Enseignant au Département des Sciences Biologiques de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé, pour la récolte et l'identification des différentes plantes étudiées au sein de notre équipe de recherche ;

au Professeur KOUAM FOGUE Siméon, Enseignant au Département de Chimie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé pour ses conseils ;

à tous les Enseignants du Département de Chimie Organique pour l'encadrement et les conseils dont j'ai bénéficiés. Qu'ils trouvent ici toute ma profonde reconnaissance ;

au Docteur SCHNEIDER Bernd de l'Institut Max Planck de Chimie Ecologique de Jena (Allemagne), pour les analyses spectrales des composés isolés dans notre équipe de recherche ;

au Docteur DENIER Colette, Maître de Conférences à l'Université Paul Sabatier de Toulouse (France), du Groupe de Chimie Organique Biologique au sein du Laboratoire de Synthèse et Physicochimie des Molécules d'Intérêt Biologique (UMR 5068), pour tous les tests d'activités biologiques effectués sur nos produits ;

au Docteur HANNAERT Véronique de l'Université Catholique de Louvain, Bruxelles (Belgique), Unité de Recherche pour les Maladies Tropicales, Institut International des

Pathologies Cellulaires & Moléculaires et Unité de Biochimie, pour les tests sur les cellules de parasites et de mammifères ;

au Docteur KUETE Victor, Maître de Conférences à l'Université de Dschang, pour les tests sur les bactéries multi-drogues résistantes ;

au Docteur RASKIN Ilya de l'Université Rutgers du New Brunswick (USA), pour les spectres HPLC-MS ;

au Docteur NKWENGOUA TCHOUBOUN Ernestine épouse ZONDEGOUMBA, Chargée de Cours au Département de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I, pour ses conseils, son sens d'équipe et pour la franche collaboration ;

au Docteur NONO Jean-Jules pour tous ses conseils et tous les encouragements qu'il a toujours formulés à mon endroit ;

au Docteur NGANTCHOU Igor pour les échanges et les discussions scientifiques que nous avons eus ;

aux Docteurs NGANSO DITCHOU Yves Oscar et SOH Désiré pour nos échanges et leur disponibilité ;

aux Docteurs MKOUNGA Pierre, KEMMEGNE Justin Claude, TATSIMO Simplicite, TCHAMAGO serge, SIMO Ingrid, pour leur soutien moral et les encouragements.

A tous les jeunes chercheurs du Laboratoire de Chimie Médicinale, en l'occurrence AMBONO Carole, TCHEBEMOU Bruno, KOMBOU NANKO Virgeline Aimée, NGUIDJOL TOUMAL MPOUMA, NDOGO ETEME Olivier pour les moments d'échange et de discussion scientifiques que nous avons eus au laboratoire et pour tous les instants que nous avons passés même en dehors du laboratoire.

Aux Chercheurs du Laboratoire de Chimie Analytique de l'Université de Yaoundé I, pour toute la collaboration qui existe entre nos deux laboratoires.

A tous mes amis notamment Dr. TIANI MOUTE Gesquière Laure, Dr. FODJA SAAH Edwige, Dr. CHEUMANI Arnaud, Dr. NGEUTEU Alexis et l'Abbé ESSOMBA Albert. Que ce travail soit pour nous un signe de succès qui nous motivera face aux difficultés futures.

Aux familles TCHANA, TCHUITCHAM, KELEKO, KENFACK, DOMO, KEDY et TSOYEM, pour le soutien constant dans la joie et la tristesse.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réussite de ce travail. Qu'ils Trouvent ici l'expression de ma profonde et sincère reconnaissance.

SOMMAIRE

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	i
DEDICACES.....	x
REMERCIEMENTS	xi
SOMMAIRE	xiii
ABREVIATIONS	xv
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
LISTE DES FIGURES.....	xviii
LISTE DES SCHEMAS.....	xxii
RESUME.....	xxiii
ABSTRACT	xxv
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	4
I.1. Généralités sur les <i>Trypanosomatidae</i>	5
I.1.1. La Trypanosomiase Humaine Africaine (THA)	5
I.1.2. La Trypanosomiase Humaine Americaine: la maladie de Chagas	10
I.1.3. La Leishmaniose	11
I.1.4. Stratégies de lutte contre les trypanosomiasés	12
I.2. Généralités sur les bactéries.....	42
I.2.1. Voies de pénétration des bactéries	43
I.2.2. Bactéries multirésistantes (BMR).....	43
I.3. Etudes antérieures sur les Mimosaceae et les Zingibéraceae.....	45
I.3.1. Etudes antérieures sur les Mimosaceae.....	45
I.3.1.4. Quelques utilisations des espèces du genre <i>Entada</i>	48
I.3.1.5. Travaux chimiques antérieurs effectués sur le genre <i>Entada</i>	50
I.3.2. Etudes antérieures sur les Zingibéraceae	53
I.3.2.1. Aperçu botanique sur les Zingiberaceae	53

I.3.2.3. Quelques utilisations des espèces du genre <i>Aframomum</i>	55
I.3.2.4. Métabolites secondaires isolés du genre <i>Aframomum</i> et activités biologiques ...	56
CHAPITRE II :RESULTATS ET DISCUSSION	64
II.1. Etude de <i>Entada abyssinica</i>	65
II.1.1. Extraction et isolement des produits de <i>Entada abyssinica</i>	65
II.1.2. Caractérisation des composés isolés.....	66
II.2. Etude de <i>Entada africana</i>	73
II.2.1. Extraction et isolement des produits de <i>Entada africana</i>	73
II.2.2. Caractérisation des composés isolés.....	75
II.3. Etude de quelques <i>Aframomum</i> (Zingiberaceae).....	98
II.3.1. Extraction et isolement des produits de <i>Aframomum daniellii</i>	98
II.3.2. Caractérisation du composé AD1	100
II.3.3. Réduction du composé 95 (AD1) et caractérisation du composé réduit	106
II.3.4. Analyses comparatives des extraits de quelques <i>Aframomum</i>	113
II.4. Activités biologiques de quelques composés obtenus	127
II.4.1. Activité antitrypanosomale.....	127
II.4.2. Cinétique enzymatique du composé AD1(95).....	130
II.4.3. Activité antimicrobienne	138
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	142
CHAPITRE III :PARTIE EXPERIMENTALE	145
III.1. Matériels.....	146
III.1.1. Matériels d'études chimiques.....	146
III.1.2. Matériels d'études biologiques.....	146
III.2. Méthodes	147
III.2.1. Matières végétales : récoltes	147
III.2.2. Activités biologiques.....	149
BIBLIOGRAPHIE	157
ANNEXES	169

ABREVIATIONS

A.: *Aframomum*

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADP: Adénosine diphosphate

AMP: Adénosine monophosphate

ATP: Adénosine triphosphate

B. s.: *Bacillus stearothermophilus*

CCM: Chromatographie sur Couche Mince

CDCl₃: Chloroforme deutéré

CG: Chromatographie en phase Gaseuse

CMB: Concentration minimale bactéricide

CMI: Concentration minimale inhibitrice

COSY: Correlation spectroscopy

DDT: Dichlorodiphényltrichloroéthane

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DL_{min}: Dose Létale minimale

E. C.: Enzymes Commission

ED₅₀: Effective dose 50

EC₅₀: Effective Concentration 50

EDTA: Acide éthylène diamine tétraacétique

IE: Impact électronique

GAP: Glycéraldéhyde-3-phosphate

GAPDH: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

HMBC: Heteronuclear multiple bond coherence

HPLC: high performance liquid chromatography

HSQC: Heteronuclear single quantum coherence

IC₅₀: Inhibition Concentration 50

K_M: Constante moyenne

1,3-diPG: acide 1,3-bisphospho-*D*-glycérique

LDH: Lactate déshydrogénase

L. infantum: *Leishmania infantum*

L. m.: *Leishmania mexicana*

m/z: Rapport masse/charge atomique

MTH: Module de haute technologie
NAD: Nicotinamide adénosine dinucléotide
NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
PEP: Phosphoénolpyruvate
PFK: Phosphofructokinase
Pi: Phosphate inorganique
PGI: Phosphoglucose isomérase
PGK: Phosphoglycérate kinase
ppm: Partie par millions
PyK: Pyruvate kinase
RMN ¹³C: Résonance magnétique nucléaire du carbone 13
RMN ¹H: Résonance magnétique nucléaire du proton
ROESY: Rotating frame nuclear overhauser and exchange spectroscopy
SM: Spectrométrie de Masse
T. brucei: *Trypanosoma brucei*
T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*
THA: Trypanosomiase Humaine Africaine
WHO: World Health Organization

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Diterpènes isolés des <i>Aframomum</i>	56
Tableau II : Aryldécanones isolés des <i>Aframomum</i>	61
Tableau III : Quinones isolés des <i>Aframomum</i>	62
Tableau IV: Diarylheptanoïdes isolés des <i>Aframomum</i>	62
Tableau V : Sesquiterpènes isolés des <i>Aframomum</i>	63
Tableau VI : Données spectroscopiques de RMN ¹³ C et RMN ¹ H du composé EA1	67
Tableau VII : Données spectroscopiques de masse des composés 133 à 142.....	73
Tableau VIII: Données spectroscopiques de RMN ¹³ C et RMN ¹ H du composé AD1	106
Tableau IX: Données spectroscopiques de RMN ¹³ C et RMN ¹ H du composé 147	111
Tableau X : Données des analyses HPLC/MS des extraits de quelques <i>Aframomums</i>	125
Tableau XI : Résultats des tests d'inhibition du composé 94 sur quelques enzymes de la chaîne glycolytique.....	128
Tableau XII: Résultats des tests d'inhibition du composé 95 sur les enzymes	129
Tableau XIII: Résultats des tests d'inhibition enzymatique du composé 147	130
Tableau XIV: Résultats de la cinétique enzymatique du composé 94 sur l'aldolase et la PyK.	138
Tableau XV: Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB) des extraits des plantes et du chloramphénicol (µg/ml)...	140
Tableau XVI: Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB) des produits, fractions de <i>E. africana</i> , et du chloramphénicol (µg/ml)	141
Tableau XVII : Composition du mélange de PFK	153
Tableau XVIII: Composition du mélange de PyK	154
Tableau XIX: Composition des sels de GAPDH	154
Tableau XX: pH et concentration des tampons TEA en fonction des enzymes.....	156

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Glossine ou mouche tsé-tsé	6
Figure 2: La THA au Cameroun en 1930	8
Figure 3: Représentation schématique de différents stades de développement des trypanosomes.....	9
Figure 4: Cycle de développement de <i>T. brucei rhodesiense</i> et <i>T. brucei gambiense</i>	10
Figure 5: Un Triatome	11
Figure 6: Un phlébotome (DEDET, 2001)	11
Figure 7 : Deux modèles de piège à vecteurs conçus pour les glossines	13
Figure 8: Bactérie <i>Escherichia coli</i>	42
Figure 9 : <i>Entada abyssinica</i>	47
Figure 10 : <i>Entada africana</i>	47
Figure 11 : <i>Aframomum melegueta</i> : fruits frais et secs, tiges	54
Figure 12 : <i>Aframomum daniellii</i> : fruits verts et matures, fleurs	54
Figure 13: Spectre ^1H du composé EA3.....	68
Figure 14: Spectre ^{13}C du composé EA3.....	69
Figure 15: Spectre DEPT du composé EA3.....	69
Figure 16: Spectre COSY du composé EA3	70
Figure 17: Spectre HMBC du composé EA3	70
Figure 18: Spectre de masse de l'ester du composé EA3	72
Figure 19: Spectre de masse du mélange d'acides gras	72
Figure 20: Spectre ^{13}C du composé TEA1.....	76
Figure 21: Spectre ^1H du composé TEA1	76
Figure 22: Spectre HSQC du composé TEA1	77
Figure 23: Spectre HMBC du composé TEA1	77

Figure 24: Spectre CG-SM du composé TEA1	78
Figure 25: Spectre ^1H du composé TEA2	80
Figure 26: Spectre ^{13}C du composé TEA2.....	80
Figure 27: Spectre DEPT 135 du composé TEA2	81
Figure 28: Spectre HSQC du composé TEA2	81
Figure 29: Spectre HMBC du composé TEA2	82
Figure 30: Spectre ^{13}C du composé TEA3.....	83
Figure 31: Spectre DEPT 135 du composé TEA3	84
Figure 32: Spectre ^1H du composé TEA3	84
Figure 33: Spectre HSQC du composé TEA3	85
Figure 34: Spectre HMBC du composé TEA3	85
Figure 35: Spectre COSY du composé TEA3	86
Figure 36: Spectre ^{13}C du composé TEA4.....	89
Figure 37: Spectre DEPT 135 du composé TEA4	90
Figure 38: Spectre ^1H du composé TEA4	90
Figure 39: Spectre ^1H élargi du composé TEA4.....	91
Figure 40: Spectre HMBC du composé TEA4.....	91
Figure 41: Spectre de Masse du composé TEA4	92
Figure 42: Spectre ^{13}C du composé TEA6.....	94
Figure 43: Spectre DEPT 135 du composé TEA6	94
Figure 44: Spectre ^1H du composé TEA6	95
Figure 45: Spectre HSQC du composé TEA6.....	95
Figure 46: Spectre HMBC du composé TEA6.....	96
Figure 47: Spectre CG- SM du composé TEA6	97
Figure 48: Spectre IR du composé AD1	100

Figure 49: Spectre RMN ¹³ C du composé AD1.....	101
Figure 50: Spectre DEPT du composé AD1	102
Figure 51: Spectre RMN ¹ H du composé AD1	103
Figure 52: Spectre élargi RMN ¹ H du composé AD1.....	103
Figure 53: Spectre HSQC du composé AD1.....	104
Figure 54: Spectre HMBC du composé AD1.....	105
Figure 55: Spectre IR du composé 147	108
Figure 56: Spectre élargi RMN ¹³ C du composé 147	109
Figure 57: Spectre élargi RMN ¹³ C du composé 147	109
Figure 58: Spectre RMN ¹ H du composé 147	110
Figure 59: Spectre élargi [0.4-2.4 ppm] RMN ¹ H du composé 147	110
Figure 60: Chromatogrammes des extraits des graines des différents <i>Aframomum</i>	114
Figure 61: Chromatogramme des extraits méthanoliques des feuilles, tiges et racines de <i>A. melegueta</i> (A1), <i>A. daniellii</i> (A2) et <i>A. sulcatum</i> (A4).....	115
Figure 62: Chromatogrammes HPLC des extraits de graines de <i>A. melegueta</i> <i>A. daniellii</i> , <i>A. citratum</i> , <i>A. sulcatum</i> , <i>A. letestuianum</i> et de <i>A. melegueta</i> de référence.....	117
Figure 63: Chromatogrammes HPLC des extraits de graines de <i>A. pruinatum</i> , <i>A. latifolium</i> ou <i>kaserianum</i> et de <i>A. melegueta</i> de référence.....	118
Figure 64: Chromatogrammes HPLC-MS 1 des extraits de graines de <i>A. melegueta</i> , <i>A. daniellii</i> , <i>A. citratum</i> , <i>A. sulcatum</i> , <i>A. letestuianum</i> et de <i>A. melegueta</i> de référence	119
Figure 65: Chromatogrammes HPLC-MS 2 des extraits de graines de <i>A. melegueta</i> , <i>A. daniellii</i> , <i>A. citratum</i> , <i>A. sulcatum</i> , <i>A. letestuianum</i> et de <i>A. melegueta</i> de référence	120
Figure 66: Chromatogrammes HPLC-MS 3 des extraits de graines <i>A. melegueta</i> , <i>A. daniellii</i> , <i>A. citratum</i> , <i>A. sulcatum</i> , <i>A. letestuianum</i> et de <i>A. melegueta</i> de référence	121
Figure 67: Chromatogrammes HPLC des extraits hexaniques des pulpes des fruits de <i>A. melegueta</i> , <i>A. daniellii</i> et <i>A. melegueta</i> de référence.....	123
Figure 68: Chromatogrammes HPLC des extraits méthanoliques de la pulpe des fruits de <i>A. melegueta</i> , <i>A. daniellii</i> et de <i>A. melegueta</i> de référence	124

Figure 69: Courbe hyperbolique traduisant le comportement michaëlien de l'aldolase de <i>T. brucei</i> : $v = f([F16BP])$	132
Figure 70: Représentation graphique de lineweaver- burk en double inverse de l'aldolase de <i>T. brucei</i>	132
Figure 71: Tracé $1/v = f(1/[F16BP])$ Inhibition incompétitive de l'aldolase de <i>T. brucei</i> par le composé 95	133
Figure 72 : Tracé secondaire : Détermination de $K'i$ du composé 95	134
Figure 73 : Courbe hyperbolique traduisant le comportement michaëlien de la PyK de lapin : Détermination de V_m et K_m	135
Figure 74: Détermination de V_m et K_m du composé 95	135
Figure 75: Représentation graphique de lineweaver-burk du composé 95 comme étant un inhibiteur mixte de la PyK de muscle de lapin.....	136
Figure 76 : Détermination du K_i	136
Figure 77 : Détermination du $K'i$	137

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Cascade glycolytique et enzymes impliquées	32
Schéma2: Equation de conversion du glucose en glucose-6-phosphate catalysée par l'hexokinase	33
Schéma 3: Equation de conversion du glucose-6-phosphate en Fructose-6-phosphate catalysée par la PGI	33
Schéma 4 : Equation catalysée impliquant la PFK.....	34
Schéma 5 : Equation catalysée par l'aldolase.....	35
Schéma 6 : Transformation du glycéraldéhyde-3-phosphate en dihydroxyacétonephosphate par la triose phosphate isomérase	35
Schéma 7 : Equation réactionnelle catalysée par la GAPDH	36
Schéma 8 : Modèle de site actif de GAPDH illustrant l'hémithioacétal entre la 3-phosphoglycerate et la cystéine-149 et montrant les liaisons hydrogènes ainsi que les interactions ioniques avec les acides aminés terminaux et le cofacteur NAD ⁺ (Cane et Sohng, 1994).....	36
Schéma 9 : Transformation de l'acide 1,3-bis-phosphate-glycerique en acide 3-phosphoglycerique.....	41
Schéma 10 : Equation réactionnelle impliquant la PyK	42
Schéma 11: Protocole d'extraction et d'isolement des produits de <i>Entada abyssinica</i>	65
Schéma 12: Réarrangement de McLafferty et ions provenant du clivage de la liaison voisine de C=O	71
Schéma 13: Protocole d'isolement des produits de <i>Entada africana</i>	74
Schéma 14: Protocole d'isolement des produits de <i>Aframomum daniellii</i>	99
Schéma 15: Réaction de réduction de aframodial par le NaBH ₄	107
Schéma 16: Mécanisme de la réaction de réduction de aframodial par le NaBH ₄	112
Schéma 17 : Mécanisme général d'inhibition d'une enzyme E par un inhibiteur I	137
Schéma 18: Synthèse du GAP.....	155

RESUME

Le travail que nous présentons dans cette thèse porte sur l'étude phytochimique de quelques plantes des genres *Entada* (*E.*)(Mimosaceae) et *Aframomum* (*A.*)(Zingibéraceae) comme sources potentielles de nouvelles molécules présentant des activités antiparasitaires et antibactériennes. Certaines espèces de ces genres sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses affections telles que la fièvre, les douleurs rhumatismales et abdominales, les inflammations, la bronchite, la blennorragie, la maladie du sommeil.

L'étude phytochimique des écorces de *E. abyssinica* nous a permis d'isoler un diterpène nouveau de la série kolavane (l'acide 15-méthylester kolavique), un stérol (le β -sitostérol) et un mélange de dix acides gras saturés (C_{20} - C_{29}). Les structures ont été déterminées grâce à l'interprétation de leurs spectres RMN (1D et 2D).

L'étude phytochimique des écorces de *E. africana* nous a permis d'isoler quatre composés: le 15-méthylester de l'acide kolavique, le lupéol, le β -sitostérol, et l'octacosanoate de 2,3-dihydroxypropyle; puis de caractériser deux mélanges dont l'un est constitué de l'octacosanol, d'acides gras tétracosanoïque et hexacosanoïque, et l'autre de trois esters de l'acide férulique (C_{26} , C_{28} et C_{30}).

L'étude phytochimique de *Aframomum daniellii* nous a permis d'isoler le composé majoritaire aframodial, qui a été réduit en aframodiol. De plus, l'analyse par Chromatographie en Phase Liquide Haute Pression couplée à la Spectroscopie de Masse (HPLC-MS) des extraits de 7 espèces d'*Aframomum* (*A. melegueta*, *A. daniellii*, *A. citratum*, *A. sulcatum*, *A. pruinatum*, *A. letestuianum* et *A. kayserianum* ou *A. latifolium*) a montré la présence des composés tels que 6-gingérol, 6-shogaol et 6-paradol uniquement dans les graines de *A. melegueta*, tandis qu'on retrouve uniquement le 6-gingérol dans la pulpe des fruits de *A. melegueta* et de *A. daniellii*. Nous avons également constaté que le 6-gingérol est plus abondant dans l'extrait hexanique des pulpes des fruits de *A. daniellii* à une concentration de 3.32 μ g/g d'extrait.

Les tests d'inhibition sur la croissance de certaines cellules montrent que l'acide 15-méthylester kolavique présente une IC_{50} de 1.7 μ M sur les cellules de *Trypanosoma brucei* et une $IC_{50} > 32$ μ M sur celles de *Leishmania infantum*. Aframodial et Aframodiol ne sont pas cytotoxiques.

Les tests d'inhibition enzymatique réalisés avec l'acide 15-méthylester kolavique nous révèlent qu'il est un inhibiteur sélectif des enzymes pyruvate kinase (PyKs) de *Leishmania mexicana* et *Bacillus stearothermophilus*. Les résultats les plus importants sont

ceux obtenus sur la glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et l'aldolase. En effet, il est respectivement 3 et 66 fois plus actif sur la GAPDH des parasites *Trypanosoma cruzi* et *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) que sur celle de l'hôte; il inhibe 13 fois plus l'aldolase de *T. brucei* que celle de l'hôte. Aframodial quant-à lui est 2 fois plus actif sur la phosphoglucose isomérase (PGI) de *T. brucei* que sur son homologue chez l'hôte et 11 fois plus actif sur l'aldolase de *T. brucei* que sur son homologue isolée du muscle de lapin. De même aframodiol active la phosphoglycérate kinase (PGK) de *T. brucei*, la phosphofruktokinase (PFK) du muscle de lapin et l'hexokinase de la levure ; il est 2 fois plus actif sur la GAPDH du muscle du lapin que sur celle de *T. brucei*.

La cinétique enzymatique montre que aframodial est un inhibiteur mixte de la PyK du muscle de lapin ($K_i = 30 \pm 2 \mu\text{M}$; $K'_i = 65 \pm 2 \mu\text{M}$), et un inhibiteur incompétitif de l'aldolase de *T. brucei* ($K'_i = 22.5 \pm 2 \mu\text{M}$).

Les tests antibactériens effectués sur les composés isolés montrent que l'octacosanoate de 2,3-dihydroxylpropyle est actif sur deux souches de *Escherichia coli*. Aframodial est bactéricide sur la souche NAE16 de *Providencia. stuartii*. Aframodiol quant-à-lui inhibe la croissance des souches NAE16 de *Providencia. stuartii* et KP55 de *Klebsiella pneumoniae*.

Les extraits à l'hexane, au chlorure de méthylène et au mélange chlorure de méthylène méthanol 1:1 de *Entada africana* sont bactéricides de la souche AG100A de *Escherichia coli*.

A la lumière de ce qui précède, il est possible d'établir une corrélation entre l'usage de ces plantes dans la médecine traditionnelle et les activités trypanocides et bactéricides ainsi mises en évidence.

Mots clés

Entada abyssinica, *Entada africana*, Acide 15-méthylester kolavique, *Aframomum daniellii*, enzymes glycolytiques, Trypanocides, bactéricides.

ABSTRACT

The present work is focused on the phytochemical study of plants of the genus *Entada* (*E.*) (Mimosaceae) and *Aframomum* (*A.*) (Zingiberaceae) which can be potential sources of new molecules with antiparasitic and antibacterial activities. Some species of these genera are used in traditional medicine for the treatment of various ailments such as fever, rheumatic and abdominal pain, inflammation, bronchitis, gonorrhea, sleeping sickness.

The phytochemical study of the bark of *E. abyssinica* led to the isolation of a new diterpene of kolavane series (15-methylester kolavic acid), a sterol (β -sitosterol) and a mixture of ten saturated fatty acids (C₂₀-C₂₉). The structures were determined by the interpretation of their NMR spectra (1D and 2D).

From the bark of *E. africana* we isolate four pure compounds: 15-methylester kolavic acid, lupeol, β -sitosterol and octacosanoate of 2,3-dihydroxypropyl, and two mixtures: the first containing octacosanol, tetracosanoic and hexacosanoic acids and the second composed of three isomers of alkyl ferulic acid (C₂₆, C₂₈ et C₃₀).

The seeds of *Aframomum daniellii* gave us the major component aframodial which has been transformed into aframodiol by reduction. Analysis by Liquid Chromatography coupled to the High Pressure Mass Spectrometry (HPLC-MS) of seven species of *Aframomum* (*A. melegueta*, *A. daniellii*, *A. citratum*, *A. sulcatum*, *A. pruinatum*, *A. letestuanum* and *A. kayserianum* or *A. latifolium*) showed the presence of compounds 6-gingerol, 6-shogaol and 6-paradol only in the seeds of *A. Melegueta* while we found only 6-gingerol in the fruit pulp of *A. melegueta* and *A. daniellii*. We also found that 6-gingerol is more abundant in the hexane extract of the fruit pulp of *A. daniellii* at a concentration of 3.32 μ g / g.

Inhibition tests carried out on the cells reveal that 15-methylester kolavic acid shows an IC₅₀ of 1.7 μ M on the cells of *Trypanosoma brucei* and an IC₅₀ > 32 μ M on those of *Leishmania infantum*. Aframodial and aframodiol are non cytotoxic.

The enzyme inhibition test carried out on glycolytic enzymes revealed to us that 15-methylester kolavic acid inhibits pyruvate kinase (PyKs) enzyme of *Leishmania Mexicana* and *Bacillus stearothermophilus*. The most important results are those obtained from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and aldolase. In fact, it is 3 and 66 times more active on GAPDH of the parasites *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* than that of the host; it inhibits 13 times more the aldolase of *Trypanosoma brucei* than the mammal. Aframodial is 2 times more active on the phosphoglucose isomerase (PGI) of *Trypanosoma brucei* than on its homologous in the host; it is 11 times more active on the

aldolase of *Trypanosoma brucei* than on its homologous isolated from the muscle of a rabbit. Aframodiol activates the phosphoglycerate kinase (PGK) of *Trypanosoma brucei*, the phosphofructokinase (PFK) of rabbit muscle and the hexokinase of yeast; it is 2 times more active on the GAPDH of the rabbit's muscle than on *Trypanosoma brucei*.

The study of the enzymatic kinetic shows that aframodial is a mixt inhibitor of PyK of the rabbit's muscle ($K_i = 30 \pm 2 \mu\text{M}$; $K'_i = 65 \pm 2 \mu\text{M}$), and an uncompetitive inhibitor of the aldolase of *Trypanosoma brucei* ($K'_i = 22.5 \pm 2 \mu\text{M}$).

The antibacterial tests carried out on isolated compounds show that octacosanoate of 2,3-dihydroxylpropyle is active on two strains of *Escherichia coli*. Aframodial is bactericidal on the NAE16 strain of *Providencia stuartii*. Aframodiol inhibits the growth of NAE16 *P. stuartii*'s and KP55 of *K. pneumonia* strains.

The extracts of hexane, methylene chloride and methylene chloride/ methanol (1:1) of *Entada africana* are bactericidal on the AG100A *Escherichia coli*'s strain.

Referred to what preceed, it is possible to establish a correlation between the use of these plants in traditional medicine and the trypanocidal and bactericidal activities showed.

Keywords

Entada abyssinica, *Entada africana*, 15-methylester kolavic Acid, *Aframomum daniellii*, glycolytics enzymes, Trypanocides, bactericides.

INTRODUCTION GENERALE

Les protozoaires sont des protistes (eucaryotes unicellulaires) qui se nourrissent uniquement de constituants organiques préexistants et qui ingèrent leur nourriture par phagocytose. Ils peuvent causer des graves maladies comme le paludisme, la leishmaniose, la maladie de chagas, la maladie du sommeil et l'amibiase. Ces pathologies font parties des maladies tropicales essentiellement liées à la pauvreté, et connues sous l'étiquette de « maladies tropicales négligées ». Le traitement de ces différentes affections fait face à des résistances multi-médicamenteuses ou multi-résistances, qui sont des conditions permettant aux microorganismes pathogènes (bactéries, virus, champignons ou parasites) de résister aux antimicrobiens, antibiotiques, antiviraux et antiparasitaires. Cette situation est une préoccupation majeure de l'OMS car les bactérioses et les parasitoses sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité importantes à travers le monde. Les bactérioses ayant une incidence socio-économique incontestable, il serait important de s'y intéresser. Parmi les parasitoses qui affectent aussi bien l'homme que les animaux, la Trypanosomiase est très préoccupante puisqu'il n'existe à ce jour aucun vaccin ni aucune chimiothérapie adaptée pour la manager.

De même, la mise au point des tests cliniques applicables sur le terrain pour déterminer le stade de la maladie reste très difficile (Croft, 1997 ; WHO, 2003 ; Boelaert, 2010 ; Astelbauer, 2011 ; Aksoy, 2011 ; Nounedem et al., 2013).

La Trypanosomiase Africaine, plus connue sous le nom de maladie du sommeil, est une maladie parasitaire provoquée par un protozoaire flagellé qui est transmis par la piqûre de la mouche tsé-tsé ou glossine du genre *Glossina*. Elle affecte essentiellement les populations pauvres, marginalisées et rurales, qui vivent de leurs terres et de leur labour.

Deux sous-espèces d'un trypanosome (*Trypanosoma brucei*) génèrent chez l'humain des pathologies différentes : *Trypanosoma brucei ssp. gambiense* (*T.b.g.*) qui sévit en Afrique de l'Ouest et du Centre, et *Trypanosoma brucei ssp. rhodesiense* (*T.b.r.*) qui sévit en Afrique de l'Est. Signalée pour la première fois en 1374, elle est bien contrôlée dans les années 1960. Malheureusement, un manque de ressources humaines et financières ainsi que des années de guerre dans la plupart des pays affectés, ont anéanti les efforts menés pour contrôler et surveiller la maladie (Sinou, 1998).

De nos jours, la maladie est endémique dans certaines régions de l'Afrique subsaharienne, couvrant environ 36 pays et menaçant 60 millions de personnes. Il est estimé que 50 000 à 70 000 individus sont actuellement infectés par an, peu étant sous surveillance

médicale. Les pays les plus touchés sont l'Angola, la République Démocratique du Congo et le Soudan. Au Cameroun, il existe six foyers actifs qui sont : Campo et Bipindi dans la région du Sud, Mamfé et Fontem dans la région du Sud-Ouest, Doumé dans la région de l'Est et Mbandjock dans la région du centre ; et quatre foyers quiescents que sont Bafia dans la région du centre, le Wouri dans la région du Littoral, la plaine de Mbos dans la région de l'Ouest et Yokadouma dans la région de l'Est (Gentilini, 1993 ; Farçois Caillat, 2011 ; MINEPAT, 2010).

Les stratégies de lutte menées actuellement concernent d'une part, la lutte préventive (utilisation des pièges à vecteurs et des insecticides), et d'autre part, la chimiothérapie. Malheureusement, les médicaments (Pentamidine, Melarsoprol, Suramine, Eflornithine) pour traiter la THA lorsqu'ils sont disponibles, ne sont pas toujours à la portée des populations des zones endémiques parce que coûtant chers et nécessitant parfois des périodes d'hospitalisation pour être administré. Ils ne sont pas toujours efficaces à tous les stades de la maladie; sont rares, fortement toxiques et font face à de multiples phénomènes de résistances (Van Nieuwenhove, 1992 ; Kuzoe, 1993 ; Pépin et Milord, 1994 ; Iten et *al.*, 1995 ; Legros et *al.*, 1999 ; WHO, 2000 ; Stanghellini et Josenando, 2001 ; MINEPAT, 2010). De ce fait, la population des zones endémiques a donc recours à l'utilisation des plantes médicinales pour se soigner.

En raison des résistances multi-médicamenteuses, l'attention est maintenant mise sur des produits biologiquement actifs isolés d'espèces végétales couramment utilisées comme plantes médicinales. Celles-ci peuvent offrir de nouvelles sources d'agents antiparasitaire, antibactérienne, antivirale ou antifongique.

Notre travail, dans ce contexte, vise d'une part l'isolement des produits naturels trypanocides capables d'inhiber les enzymes de la glycolyse chez les *Trypanosomatidae*, laquelle est établie comme source énergétique vitale chez ces parasites. D'autre part, elle porte sur l'isolement des composés antibactériens. La découverte et le développement de nouveaux médicaments devant satisfaire à un double objectif biologique et économique deviennent une priorité pour la recherche scientifique. Sur le plan biologique, ces agents actifs doivent être plus efficaces et avoir de moindres effets toxiques et/ou secondaires. Sur le plan économique, ils doivent permettre une plus grande accessibilité des médicaments aux populations malades, donc un meilleur ratio qualité/prix. C'est dans le souci de satisfaire ce double objectif et sur la base des connaissances ethnopharmacologiques que nous avons entrepris l'étude phytochimique des plantes des genres *Entada* (*Mimosaceae*) et *Aframomum* (*Zingibéraceae*), puis l'évaluation de leurs activités biologiques d'une part sur quelques

enzymes de la glycolyse (glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), phosphofructokinase (PFK), aldolase, phosphoglucose isomérase (PGI) et la pyruvate kinase (PyK) de *Trypanosoma brucei*; pyruvate kinase (PyK) et Hexokinase de *Leishmania mexicana*), et d'autre part sur des bactéries dites résistantes (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Providencia stuartii*).

Dans la pharmacopée traditionnelle camerounaise et africaine, *E. abyssinica* est essentiellement utilisée pour lutter contre la maladie du sommeil (Freiburghaus et al., 1996) tandis que les plantes du genre *Aframomum* sont utilisées comme antifongiques, antimicrobiens, antibiotiques et trypanocides (Doherty, 2010 ; Okigbo, 2006 ; Enti, 1998 ; Erukaine, 2011 ; Tane et al., 2005).

Le présent travail, dans sa première partie repose sur une revue de la littérature, consistant d'abord en une brève présentation de la Trypanosomiase Humaine Africaine (THA), de la Trypanosomiase Américaine (Maladie de Chagas), de la Leishmaniose et de quelques bactéries. Nous donnerons ensuite les stratégies de lutte contre les Trypanosomiasés qui ont pour cibles les enzymes de la glycolyse (glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), Phosphofructokinase (PFK), Pyruvate kinase (Pyk) aldolase, Phosphoglycérate Kinase (PGK), Phosphoglucose isomérase (PGI) et Hexokinase); enfin, nous présenterons les travaux antérieures sur les plantes qui font l'objet de notre étude.

Cette description théorique débouchera sur la présentation et la discussion de nos résultats (de l'isolement des produits naturels à leurs activités biologiques) dans la deuxième partie de notre travail. Nous conclurons nos travaux et présenterons les perspectives d'avenir sur notre sujet.

Le présent document de thèse se refermera avec une partie expérimentale, la bibliographie et les annexes.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. Généralités sur les *Trypanosomatidae*

Les *Trypanosomatidae* sont une famille unique dans l'ordre *Trypanosomatida*, des protozoaires flagellés pathogènes d'animaux et de végétaux appelés Trypanosomes et Leishmanioses. Chez l'homme, les *Trypanosoma* provoquent des trypanosomiasés. On distingue les trypanosomiasés africaines (maladie du sommeil) et américaine (maladie de Chagas) dont les agents pathogènes sont *Trypanosoma brucei* et *Trypanosoma cruzi* respectivement. Les *Leishmania* provoquent des leishmaniosés. On distingue les leishmaniosés viscérales, cutanées et cutanéomuqueuses.

I.1.1. La Trypanosomiase Humaine Africaine (THA)

La Trypanosomiase humaine africaine ou maladie du sommeil reste un problème de santé publique en Afrique subsaharienne. Le nombre réel de cas, très souvent sous-estimé à cause de la faible proportion de population à risque sous surveillance, oscillerait entre 300 000 et 500 000 (Jamonneau et al., 2001). Il existe deux trypanosomes différents, tous deux agents de la THA :

- *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) qui se trouve en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale,
- *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*) qui se trouve en Afrique de l'Est et en Afrique Australe.

T. b. gambiense regroupe 95% des cas notifiés de THA et provoque une maladie chronique pouvant atteindre plusieurs années, tandis que *T. b. rhodesiense* regroupe moins de 5% des cas notifiés et provoque une maladie aiguë qui dure quelques semaines (OMS, 2004 ; Odiit M, 1997 ; Checchi F, 2008).

I.1.1.1. Vecteur et répartition géographique

Le vecteur appelé glossine ou mouche tsé-tsé (Figure 1) est un diptère hématophage qui pique surtout le jour. Les mouches tsé-tsé vivent en Afrique et leur distribution est liée à leur habitat : la végétation au bord des cours d'eaux et des lacs, des forêts-galeries et des vastes étendues de savane arbustive. On distingue : *Glossina palpalis*, *Glossina tachinoides* qui transmettent *T. b. gambiense* et *Glossina morsitans* qui transmet *T. b. rhodesiense*. La glossine s'infeste chez l'homme ou chez un animal porteur de parasite pathogène pour l'homme. L'inoculation se fait par piqûre infestante. La présence des glossines dépend de quatre facteurs : la chaleur (température entre 25 et 30°C), l'humidité, l'ombrage, la présence de nourriture. (Gentilini, 1993 ; Wery M, 2000).



Figure 1 : Glossine ou mouche tsé-tsé (<http://upload.wikimedia.org/wikipedia>) , consulté le 10 novembre 2014.

On estime que le nombre effectif de cas est actuellement de 30 000 et que la population exposée au risque de THA est de 70 millions de personnes (aide mémoire 2013).

La THA a été découverte au Cameroun vers les années 1920, durant sa deuxième pandémie, grâce aux travaux du Dr. Eugène JAMOT. De nombreux foyers sont alors découverts progressivement à travers tout le territoire national (figure 2). Ces foyers étaient regroupés dans 4 grandes régions :

- les foyers de l'Ouest : Fontem, Mamfé, la plaine des Mbos ;
- les foyers du Littoral : Wouri et Campo ;
- les foyers du Centre et de l'Est : Bafia, bassin du Nyong (Doumé, Abong-Bang, Lomié) ;
- les foyers du Nord : Logone et Chari.

C'est dans la vallée du Nyong que le Dr. JAMOT mettra en œuvre ses principes de lutte qui marquent encore profondément les services des grandes endémies d'Afrique Centrale et Occidentale. La maladie re-émerge dans les années 1980 (WHO, 1998).

Actuellement, compte tenu des modifications du milieu liées à la sécheresse, aux activités humaines et au développement urbain, plusieurs foyers ont disparu. La sécheresse du climat a entraîné la disparition des glossines dans les foyers du Logone et du Chari. Le développement urbain a favorisé le recul voire l'extinction du foyer du Wouri. Le foyer de Bafia a disparu du fait de la lutte. Dans le foyer du Nyong, on assiste néanmoins à deux résurgences : Bipindi et Doumé. Les foyers de l'Ouest (Fontem et Mamfé) et celui de Campo persistent toujours. Jusqu'à présent, six foyers de la THA sont encore actifs au Cameroun (Gentilini, 1993 ; Farçois Caillat, 2011 ; MINEPAT, 2010). Ce sont les foyers de :

- Bipindi et Campo dans la région du Sud ;

- Fontem et Mamfé dans la région du Sud-Ouest ;
- Doumé dans la région de l'Est ;
- Mbandjock dans la région du Centre.

De 1998 à 2000, 98 nouveaux trypanosomés ont été dépistés dans l'ensemble de ces foyers. En 2001, sur une population de 4713 personnes examinées par les techniciens de l'OCEAC et du PNLTHA (Programme National de Lutte contre la Trypanosomiase Humaine Africaine), 15 malades ont été dépistés et, en 2002, sur 17401 habitants examinés, 35 malades ont été dépistés (Louis et al., 2003).

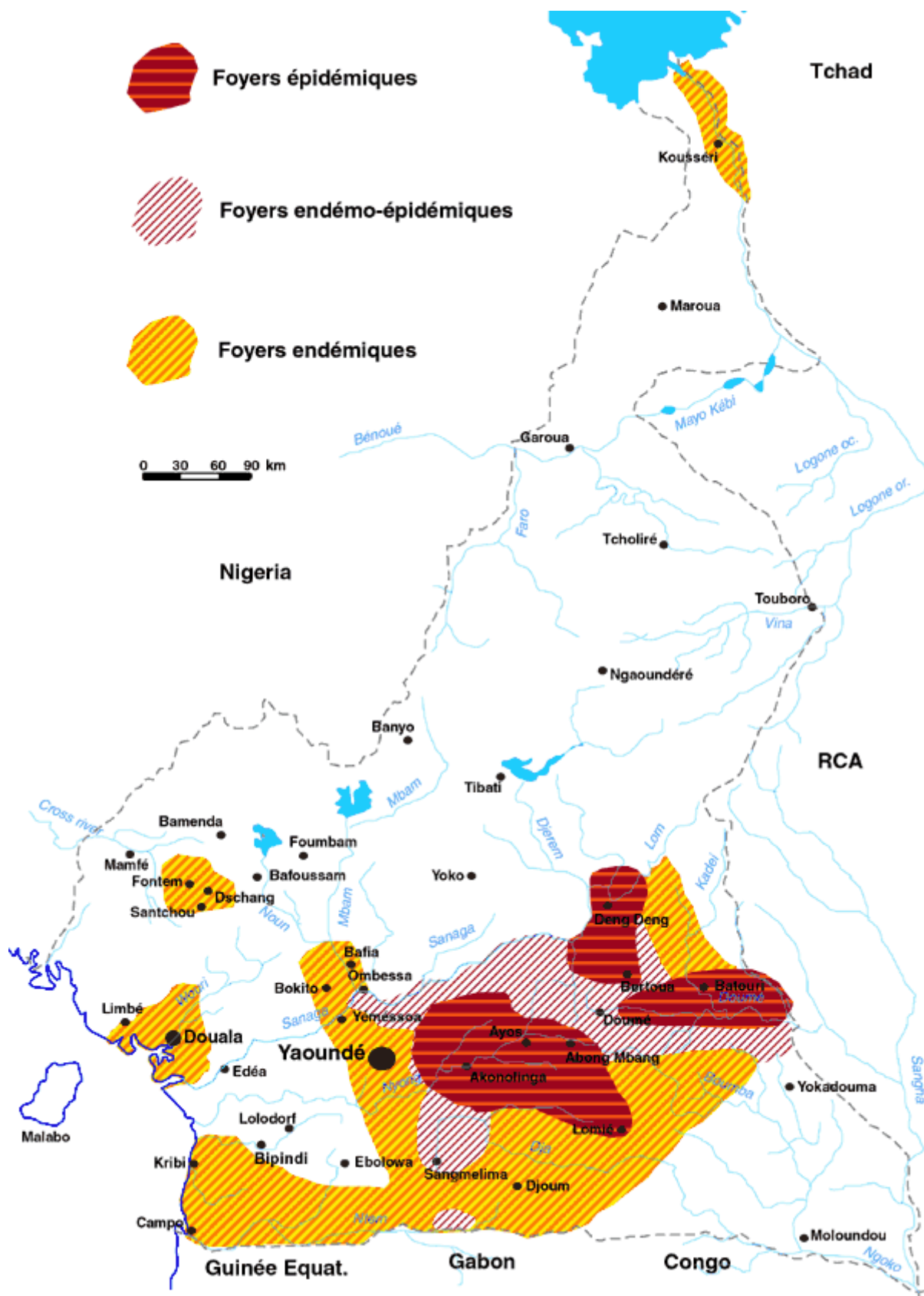


Figure 2: La THA au Cameroun en 1930
 (http://www.sleeping-sickness.ird.fr/Images_gif/carte_cameroun30.gif), consulté le 10 novembre 2014.

Afin de lutter efficacement contre ce fléau, il est nécessaire de connaître et de comprendre le cycle de développement du parasite responsable de la maladie.

I.1.1.2. Biologie du Parasite

Les protozoaires du genre *Trypanosoma* sont des protozoaires flagellés de l'ordre des *Kinetoplastidae* caractérisés par la présence à l'intérieur de leur mitochondrie unique d'une structure composée essentiellement d'ADN: le kinétoplaste. Ils possèdent un cycle biologique complexe avec changement d'hôte (cycles hétéroxènes). Classiquement, leur cycle évolutif se réfère à des étapes bien précises identifiées par la forme de la cellule, la position du complexe corps basal-kinétoplaste par rapport au noyau et l'extension de l'appareil flagellaire (Sinou, 1998).

I.1.1.3. Les différentes formes du cycle biologique et Cycle évolutif de *Trypanosoma brucei*

Les différents types morphologiques (Figure 3) adoptés par les trypanosomes au cours de leur cycle biologique sont présentés ci-dessous :

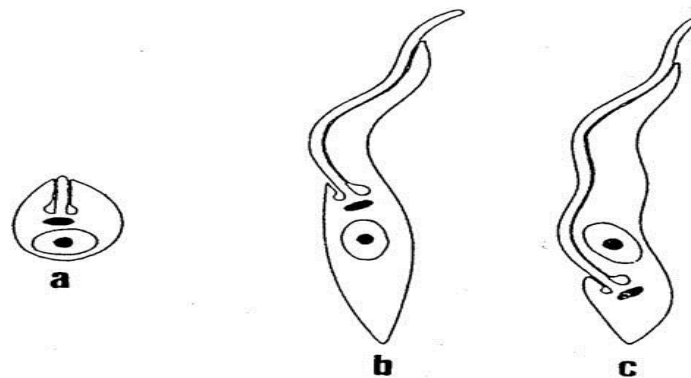


Figure 3: Représentation schématique de différents stades de développement des trypanosomes (d'après Vickerman, 1976)

a: amastigote; **b:** épimastigote; **c:** trypomastigote.

a- amastigote (5 à 7 μm de long): cellule ronde dépourvue de flagelle externe, représente la forme multiplicative intracellulaire (fig. 5a). **b- épimastigote** (20 à 40 μm de long): kinétoplaste antérieur, la membrane flagellaire est accolée à la membrane plasmique sur une partie de sa longueur faisant apparaître une membrane ondulante et laissant libre l'extrémité distale (fig. 5b). **c - trypomastigote** (25 μm de long): kinétoplaste postérieur, la membrane flagellaire est accolée à la membrane plasmique sur la plus grande partie de sa longueur formant ainsi une longue membrane ondulante (fig. 5c).

Les trypanosomes ingérés par l'insecte vecteur au cours d'un repas sanguin se développent dans l'intestin moyen sous la forme trypomastigote dite procyclique à ce stade. Ils migrent ensuite vers les glandes salivaires où, après une étape épimastigote intermédiaire, ils se transforment à nouveau en trypomastigotes. A ce stade, le parasite est qualifié de métacyclique. Les trypanosomes sont alors susceptibles d'être inoculés à un mammifère où ils

se développent dans le sang. Le parasite envahit finalement le liquide céphalo-rachidien où sa présence cause les troubles caractéristiques de la maladie du sommeil. Après piqûre d'un homme infecté, les trypanosomes se retrouvent dans le tube digestif de la glossine. Après un cycle d'environ 20 jours, ils vont se localiser dans les glandes salivaires, ce qui va rendre la prochaine piqure infectante.

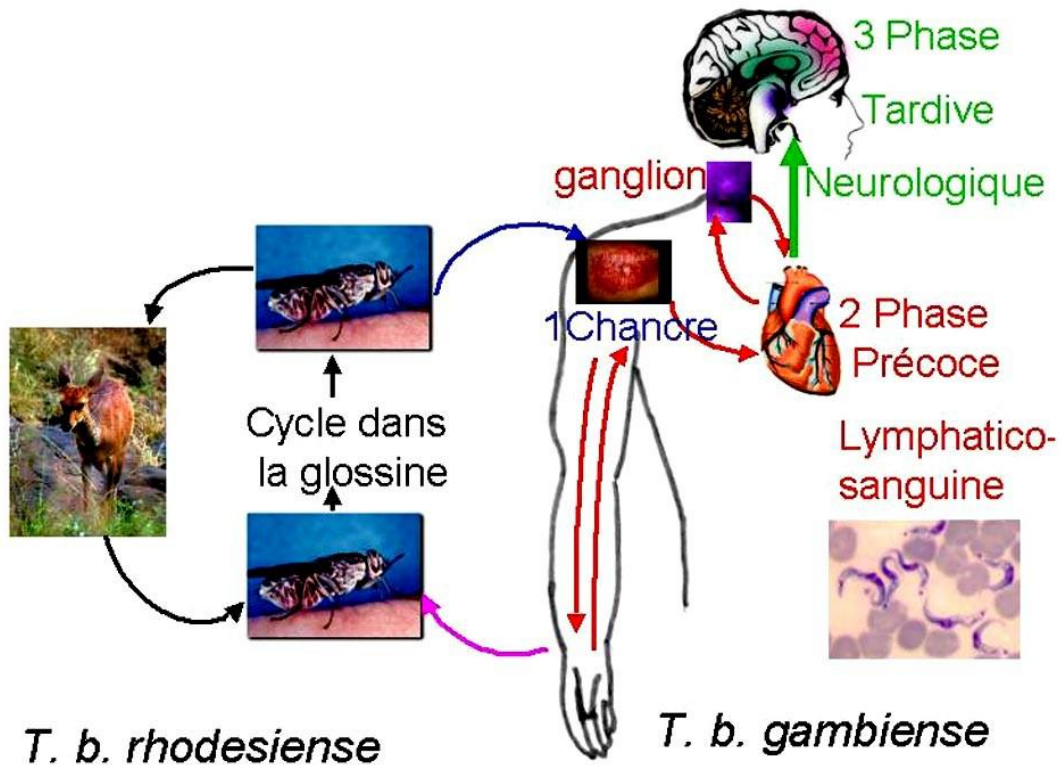


Figure 4: Cycle de développement de *T. brucei rhodesiense* et *T. brucei gambiense* (campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/.../site/html/cours.pdf), consulté le 10 novembre 2014.

La maladie de Chagas en Amérique (homologue de la THA) et les leishmanioses sont deux maladies parasitaires assez proches de la THA.

I.1.2. La Trypanosomiase Humaine Américaine: la maladie de Chagas

La Trypanosomiase américaine est décrite pour la première fois par Carlos Chagas en 1909. C'est une maladie grave qui affecte actuellement 8 à 10 millions de personnes, avec quelque 100 millions d'autres (25 % de la population latino-américaine) potentiellement exposées au risque de contracter la maladie. Elle tue environ 50 000 personnes chaque année et touche essentiellement 21 pays d'Amérique latine. Les pays non endémiques (dont l'Europe) comptent de nombreux cas d'importation (en Espagne et en Suisse) (Grijalva MJ, 2005; Gascon J, 2010; WHO, 2000, Jackson Y, 2008). Elle est due au parasite *Trypanosoma*

cruzi (Chagas C, 1909; Redhead et al., 2006; WHO, 2000 ; Gentilini, 1993 ; Carlier, 2003 ; aide-mémoire, 2013).

La maladie de Chagas peut être transmise aux humains de trois manières: soit par la piqûre d'un insecte infecté appelé triatome (Figure 5), soit par la transfusion d'un sang infecté ou la transplantation d'un organe infecté, soit de la mère à l'enfant pendant la grossesse ou durant l'accouchement (Gentilini, 1993).



Figure 5: Un Triatome

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/a5/Triatoma_infestans.jpg/350px-Triatoma_infestans.jpg), consulté le 10 novembre 2014.

I.1.3. La Leishmaniose

La leishmaniose est une réticulo-endothéliose parasitaire transmise à l'homme par la piqûre de la femelle hématophage d'un insecte diptère dénommé Phlébotome (Figure 6). Le parasite est un protozoaire flagellé du genre *Leishmania* (WHO, 2007, Faure, 1999a).



Figure 6: Un phlébotome (DEDET, 2001)

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la leishmaniose est endémique dans 88 pays du monde et répartis sur quatre continents : Afrique, Amérique, Asie et Europe ; 350 millions de personnes au total sont exposées (Institut Pasteur, 1998 ; WHO, 1996 ; WHO, 2003a ; WHO, 2006).

On distingue principalement trois formes de leishmanioses qui sont : la leishmaniose viscérale ou Kala Azar, transmise par *Leishmania donovani*, *L. infantum* et *L. chagasi* ; la leishmaniose cutanée transmise par *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. aethiopica*, *L. major* et *L.*

guyanensis et la leishmaniose cutanéomuqueuse due à *L. braziliensis* (Faure, 1999a ; WHO, 1996).

I.1.4. Stratégies de lutte contre les trypanosomiasés

Les différentes méthodes de lutte déployées visent à interrompre la chaîne épidémiologique de ces maladies. Elles sont transmises à l'homme par la piqûre d'un insecte. Le parasite ainsi inoculé va se multiplier au sein de l'organisme de l'hôte et détruire certaines cellules vitales. Le cycle de développement implique à la fois le vecteur et l'organisme hôte. Pour une lutte efficace, il faut agir sur toutes les composantes de ce cycle, l'hôte devant être épargné le plus possible.

En l'absence de tout vaccin, deux stratégies sont actuellement développées: la lutte préventive qui repose sur la lutte antivectorielle (filets, insecticides, utilisation des moustiquaires...) et le traitement par la chimiothérapie.

I.1.4.1. Lutte antivectorielle (Laveissière et Penchenier, 2005)

Première méthode de lutte et certainement la moins onéreuse, elle est pratiquement la seule qui puisse être considérée comme méthode préventive. La lutte contre le vecteur se fait principalement de deux façons différentes : l'utilisation des pièges (filets) à vecteurs et l'utilisation des insecticides et moustiquaires.

I.1.4.1.1. Les pièges à vecteurs

La lutte antivectorielle requiert qu'on aille chercher le vecteur dans son habitat. Les premiers moyens de lutte réalisés consistaient tout simplement à éclairer les zones forestières où vivent ces parasites. L'élagage sélectif de la végétation forestière a donc contribué en son temps à la réduction considérable de la population parasitaire, grâce à la modification des conditions climatiques (surtout la température et l'humidité). La technique la plus utilisée au début du siècle est la prophylaxie agronomique dont l'objectif est de remplacer la végétation bordant les cours d'eau par des cultures.

Au tout début du XX^e siècle, Maldonado, colon portugais de l'île de Principe, tenta avec succès l'élimination des glossines par un procédé original : faire porter par ses manœuvres des dossards noirs enduits de colle. Depuis lors, la qualité et la forme des pièges ont beaucoup évolué avec des résultats variables (Figure 7).



Figure 7 : Deux modèles de piège à vecteurs conçus pour les glossines : piège de Harris à gauche et piège biconique à droite (sleeping-sickness.ird.fr), consulté le 9 avril 2014.

Le premier modèle, conçu par Harris (1930) a eu un succès retentissant au Zululand. En 1931, Harris a placé 487 pièges qui ont capturé 7 millions de glossines ; en 1937, il a placé 8 928 pièges qui n'ont plus capturé que 57 000. La densité des glossines a été réduite de 99,96%. Cette technique est abandonnée après la seconde guerre mondiale avec l'avènement du DDT.

I.1.4.1.2. Utilisation des insecticides

A partir des années 1950 la lutte chimique est l'objet de nombreuses recherches, tant sur les insecticides que sur l'appareillage et les techniques. On passe de la nébulisation aux pulvérisations terrestres puis aux pulvérisations aériennes. Les pulvérisations classiques, dites rémanentes, sont ensuite remplacées par des techniques moins offensives pour le milieu comme les "Ultra Low Volume" (U.L.V.).

Les premiers insecticides utilisés, les organochlorés (comme le DDT), sont remplacés par les organophosphorés puis finalement par les pyréthrinoïdes de synthèse. En réalité ces techniques ne sont utilisées, avec un certain succès d'ailleurs, que dans la lutte contre les trypanosomoses du bétail, au Nigeria et surtout dans toute l'Afrique orientale. Cette méthode de lutte finit quand même par être très critiquée par tous les protecteurs de l'environnement du fait de ses effets néfastes sur la faune non cible.

Il est recommandé aux populations vivant dans des zones endémiques de dormir sous des moustiquaires à tissu serré ou imprégnées afin de réduire le contact avec insectes.

Une fois atteint par la maladie, il existe quelques médicaments disponibles qui ne sont malheureusement pas toujours actifs à tous les stades.

I.1.4.2. La chimiothérapie

Pour traiter les leishmanioses, l'OMS recommande d'utiliser des médicaments dérivés de l'antimoine (antimoniés). La voie d'administration (intraveineuse, intramusculaire ou intralésionnelle) et la durée du traitement varient selon la forme de la parasitose. Le traitement par ces médicaments nécessite une hospitalisation car ils ont des effets toxiques, en particulier pour le cœur. D'autres médicaments peuvent être utilisés; certains sont donnés par voie injectable ou locale (paramomycine), d'autres par voie orale (antifongiques imidazoles, amphotéricine B).

Il existe actuellement deux médicaments disponibles contre *T. cruzi* : le nifurtimox et le benznidazole, dont l'efficacité est comparable et varie selon l'âge du sujet et le stade de la maladie. Leur disponibilité est encore problématique ; en outre, ces substances sont très toxiques, ont de nombreux effets secondaires et ne peuvent pas être administrés sans surveillance médicale. L'agent antifongique nommé amphotéricine B a été proposé comme traitement de deuxième intention, mais le coût et la toxicité relativement élevée de cette molécule limite son utilisation. Dans la phase chronique, le traitement a pour but de contrôler les manifestations cliniques car la maladie elle-même n'est pas curable (Prata A, 2001; Barrett M, 2003; Bern C, 2007).

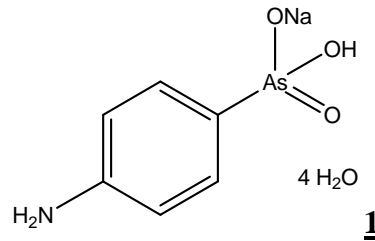
Le traitement de la THA est fonction du stade de la maladie, les médicaments utilisés au cours de la première phase étant moins toxiques et plus faciles à administrer. Plus le diagnostic est précoce, plus les perspectives de guérison sont bonnes. Le succès du traitement au cours de la seconde phase dépend de l'utilisation d'un médicament capable de franchir la barrière hémato-encéphalique pour atteindre le parasite. De tels produits sont toxiques et plus délicats à administrer. Les premiers médicaments utilisés sont à base d'arsenic. Les cas d'arséno-résistance ont permis la mise sur pieds de nouveaux dérivés arsénicaux et non arsénicaux (De Raadt, 1999).

I.1.4.2.1. Les médicaments à base d'arsenic

Le mode d'action de l'arsenic était inconnu, mais son effet sur les réactions provoquées par les piqûres de mouche tsé-tsé chez le cheval avait été remarqué par Livingstone (1858). Son efficacité contre les trypanosomes avait été confirmée par Broden, Mesnil et Laveran au début du XX^e siècle (Janssens et Burke, 1992). La solution arsenicale de Loeffler, composée d'acide arsénieux en solution neutre, fut un des premiers composés à base d'arsenic testé dans le traitement de la THA. Les injections (sous cutanées) étaient très

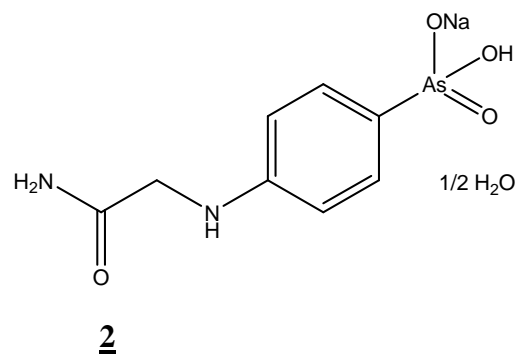
douloureuses et assez mal tolérées par les malades. La voie orale fut testée mais limitait la dose journalière d'acide arsénieux (Broden et Rodhain, 1908a).

- L'atoxyl



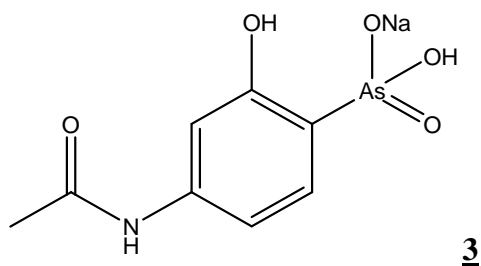
L'atoxyl 1 (acide aminophenolarsinique ou acide arsinique), composé arsenical organique pentavalent découvert en 1863 par Béchamp et commercialisé en 1905 par les industries Bayer, a été le premier trypanocide utilisé à large échelle. Il était également prescrit dans le traitement du paludisme (en adjuvant à la quinine), de la syphilis (Vassal, 1908) et des maladies chroniques de la peau. Le traitement atoxylique avait une efficacité maximale chez les malades en première période et exposait les malades, notamment ceux en deuxième période, à des accidents oculaires graves (rétinites, cécité dans 3 à 5% des cas) (Janssens, 1992). L'atoxyl fut assez vite utilisé dans un but prophylactique pour éliminer le portage de trypanosomes dans le système lymphatico-sanguin afin de réduire la transmission de la maladie.

- La tryparsamide



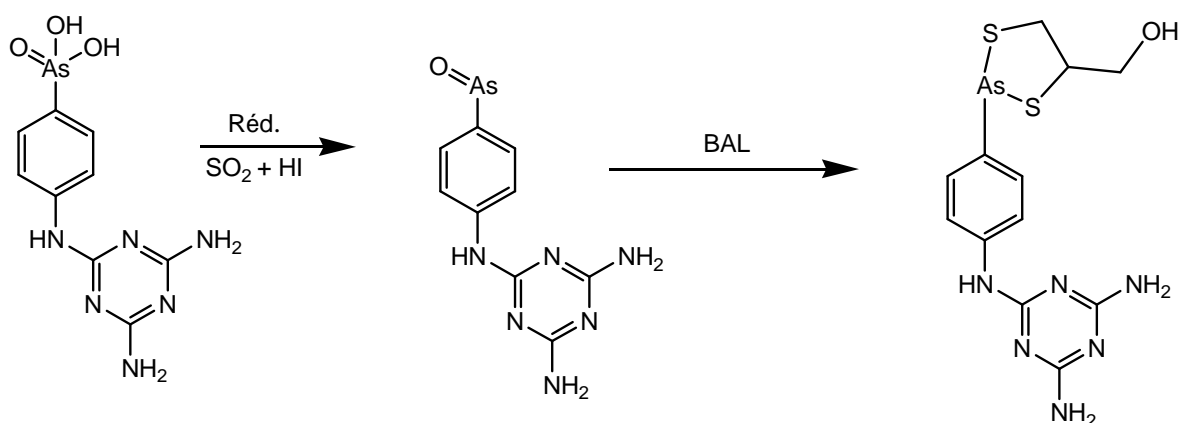
La tryparsamide 2, découverte en 1919 et expérimentée à partir de 1921, devint le premier médicament actif sur les phases nerveuses de THA. Le coût d'un traitement par tryparsamide étant élevé, chaque puissance coloniale cherchait à fabriquer des produits équivalents moins coûteux (Bado, 1996). Des cas d'arseno-résistance apparurent dans le Mayumbe (Congo Belge) au début des années 1930, et, à partir de 1934, la tryparsamide fut utilisée en association avec d'autres molécules, notamment la suramine et l'orsanine sodique (Burke, 1971).

- **L'orsanine**



L'orsanine sodique **3** (Fourneau 270), fut utilisée à partir de 1925 et pendant une quinzaine d'années soit seule chez les patients en «période douteuse», soit en association avec la tryparsamide chez les malades en seconde période (Dutertre et Labusquière, 1966).

- **Le mélarsoptol (Mel B, Arsobal®)**



Réd.= réduction ; BAL= dimercaprol

4

5

6

Le mélarsoptol **4** (arsenical 4289 ou pentavalent incolore) a été introduit en 1939 avec une indication dans les deux stades de la maladie, et très vite abandonné en raison des taux d'échecs importants et d'une toxicité élevée (Jonchère et *al.*, 1953).

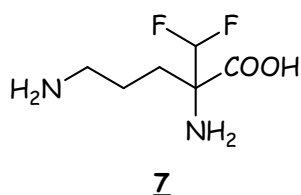
Le mélarsoptol oxyde **5** (arsenical 2065) est un arsenical trivalent, synthétisé en 1941 par réduction du mélarsoptol. Il a été administré à de petites séries de malades aux deux stades de la maladie et sur des cas de THA résistants à la tryparsamide (Jonchère et *al.*, 1953). L'insuffisance des résultats thérapeutiques et l'importance des effets secondaires ont également entraîné l'abandon rapide de cette molécule (Jonchère et *al.*, 1953).

Le mélarsoptol **6** ou Mel B est découvert en 1945 et mis sur le marché en 1949. Il associe un dérivé organique trivalent de l'arsenic, le mélarsoptol oxyde, à un chélateur de

métaux lourds, le BAL (British Anti-Lewisite ou dimercaprol). Il est actif dans les phases tardives de THA à *T. b. rhodesiense*. Il permet de faire face, au moins partiellement, aux problèmes liés à l'arséno-résistance mais est très toxique. Administré par voie intraveineuse, Il a de nombreux effets indésirables dont Le plus grave est l'encéphalopathie réactive (syndrome encéphalopathique) qui est potentiellement mortelle (dans 3 à 10 % des cas) (Jonchère et *al.*, 1953).

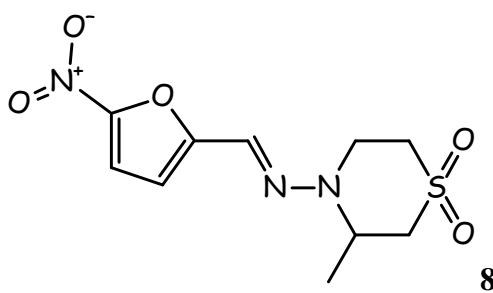
I.1.4.2.2. Les non-arsénicaux

- L'Éflornithine (Ornidyl®)



L'éflornithine **7** (DFMO ou Ornidyl), médicament synthétisé en 1979 et développé au début des années 1980 dans le cadre de la recherche anticancéreuse s'est avéré trop toxique pour cette prescription, mais actif sur *T. brucei in vivo* (Bacchi et *al.*, 1980). L'éflornithine est efficace aux 2 stades de l'infection à *T. b. gambiense*, mais décevante pour l'infection à *T. b. rhodesiense*. Ce traitement est coûteux, d'administration difficile et compliquée. Il devrait être réservé aux cas réfractaires au mélarsoprol.

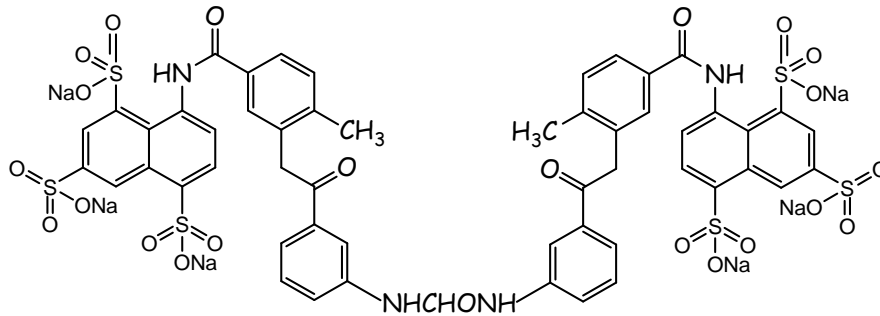
Le nifurtimox



Le nifurtimox **8** est homologué pour le traitement de la trypanosomiase américaine mais non pour la trypanosomiase humaine africaine. Bien que n'ayant jamais reçu d'indication officielle pour le traitement de la THA, il a été utilisé à partir des années 1980. Un traitement associé de nifurtimox et d'éflornithine a récemment été introduit (2009). Son administration est plus simple que l'éflornithine en monothérapie, mais malheureusement il n'est pas efficace contre la trypanosomiase à *T. b. rhodesiense*. Son utilisation en association avec l'éflornithine a été acceptée et figure désormais sur la liste OMS des médicaments essentiels, et il est fourni

gratuitement à cette fin par l'OMS (Pépin et *al.*, 1992 ; Van Nieuwenhove, 1992 ; Aide-mémoire, 2013).

- La suramine (Moranyl®)

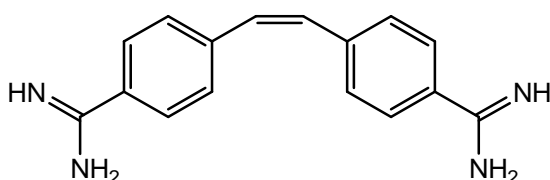


9

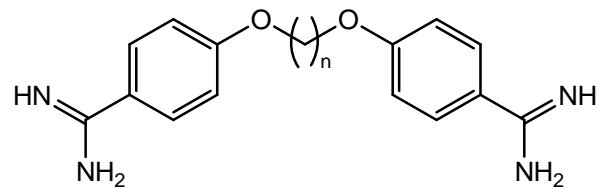
La suramine **9** (Bayer 205, Fourneau 309), issue de la modification chimique d'un colorant, le trypan violet, fut utilisée à partir du début des années 20 chez des patients en phase lymphatico-sanguine ou en cas d'arseno-résistance. Une utilisation en chimioprophylaxie, testée au Kasai (Burke, 1971), fut limitée par le mode d'administration (intra veineuse) et les doses nécessaires trop élevées (Jonchère, 1951). La suramine est utilisée pour le traitement de la première phase de la trypanosomiase à *T. b. rhodesiense*, malgré une toxicité importante notamment cutanée, neurologique et rénale.

L'apparition des diamidines, bien mieux tolérées que les dérivés arsenicaux et dont l'efficacité avait été prouvée par Lourie et Yorke en 1937 (King et *al.*, 1937), a permis de remettre au goût du jour le concept de prophylaxie de masse (campagnes de pentamidisation). Cette stratégie, combinée à la prise en charge thérapeutique des patients par la pentamidine, permettait d'envisager l'éradication de la maladie.

- La pentamidine (Pentacarinat®)



10

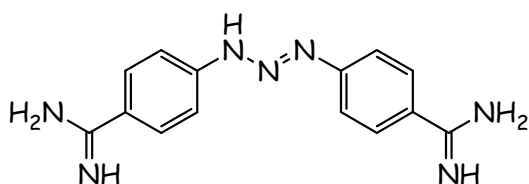


11 : n = 3

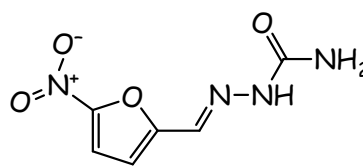
12 : n = 5

Les diamidines étaient des dérivés de la synthaline (découverte en 1936 par Jansco). La première fut la stilbamidine (**10**), suivie de la propamidine (**11**) et enfin de la pentamidine (**12**). Cette dernière est utilisée pour le traitement de la première phase de la trypanosomiase à *T. b. gambiense*. Quelques incidents ont été observés dès le début des traitements par les diamidines : nausées, hypoglycémies et hypotension (Jonchère, 1951). La pentamidine présente notamment une toxicité rénale, pancréatique et hématologique. D'une manière générale, ce produit est généralement bien toléré par les patients.

Deux autres médicaments couramment utilisés sont le Diminazène (Berenil®) **13** (en première phase de la maladie) qui est une diamidine et la nitrofurazone (Furacine®) **14**, un nitrofurane en deuxième phase.



13



14

Devant les limites des produits de synthèse dans les différents traitements, nous sommes amenés à nous tourner vers les produits naturels dont certains montrent d'intéressantes activités.

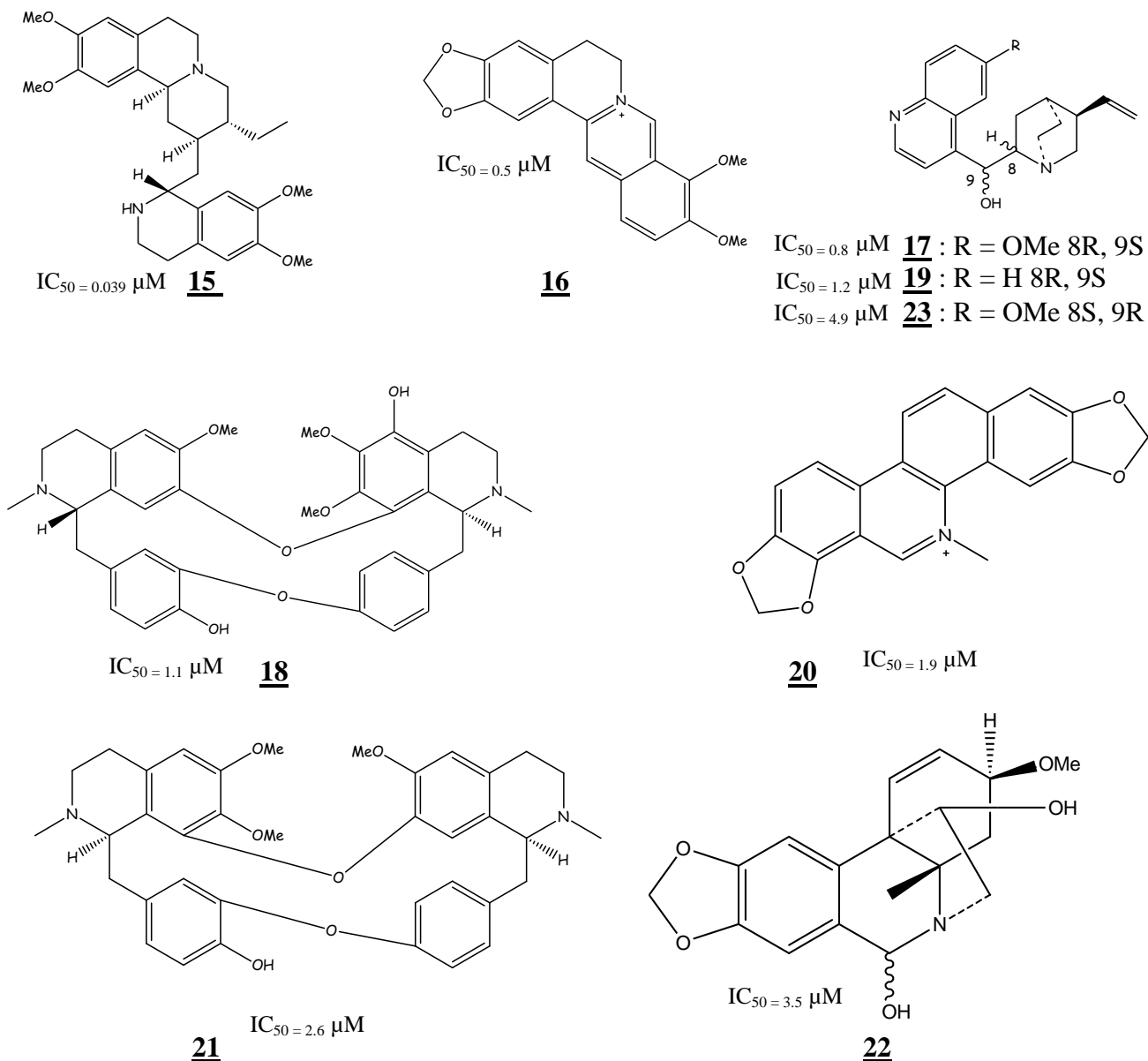
I.1.4.3. Quelques substances d'origine naturelle douées d'activités trypanocides

La littérature montre que beaucoup de métabolites secondaires testés comme trypanocides le sont surtout sur les formes trypomastigotes (et un peu moins sur les formes amastigotes) des cellules de *T. brucei* ou *T. cruzi*. Très peu de résultats sont connus sur des substances d'origine naturelle dont les tests ont été directement réalisés sur des cibles enzymatiques de ces parasites. Plusieurs classes de composés organiques ont pu être testées sur des cellules de trypanosomes avec des activités intéressantes.

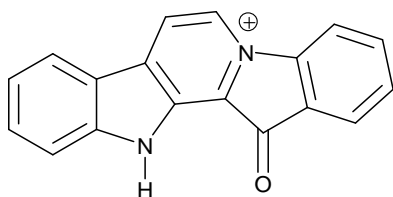
I.1.4.3.1. Les alcaloïdes

De nombreuses études *in vitro* sur diverses classes d'alcaloïdes ont été faites sur les trypanosomes. Ces études montrent que les alcaloïdes possédant des squelettes piperidine, pyridine, tropane, quinolizidine, indole ou purine sont très peu actifs sur les formes sanguines de *T. brucei* (Merschjohann et al., 2001). Cependant, les alcaloïdes de type isoquinoline, quinoline, bisbenzylisoquinoline et crinane sont très actifs sur les formes sanguines de *T. brucei* (Merschjohann et al., 2001 ; Camacho et al., 2002). Parmi les alcaloïdes les plus actifs

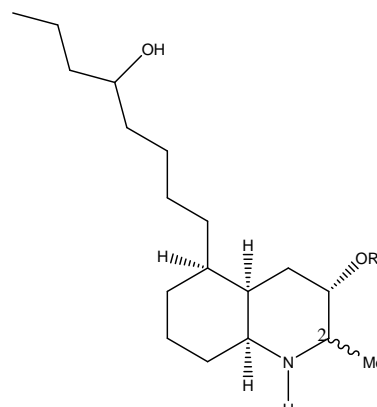
($IC_{50} < 5 \mu M$), on peut citer l'émétine (**15**), la berbérine (**16**), la quinidine (**17**), la thalisopidine (**18**), la cinchonine (**19**), la sanguinarine (**20**), la berbamine (**21**), l'haemanthidine (**22**) et la quinine (**23**), dont les IC_{50} respectives sont de 0.039, 0.5, 0.8, 1.1, 1.2, 1.9, 2.6, 3.5 et 4.9 μM sur les formes sanguines de *T. brucei* (Merschjohann et al., 2001 ; Herrera et al., 2001a et 2001b ; Camacho et al., 2002).



Plusieurs alcaloïdes isolés d'organismes marins (éponges, ascidies et tuniciers) ont également été évalués pour leurs activités trypanocides ; parmi les plus significatifs, on a la fascaphysine (**24**) qui a une IC_{50} de 0.6 μM sur *T. b. rhodesiense in vitro*, et deux diastéréoisomères (**24** et **25**) qui ont une IC_{50} inférieure à 1 μM sur le même parasite (Kirsch et al., 2000).



24 $IC_{50} = 0.6 \mu M$

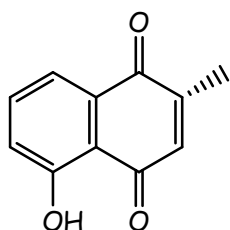


$IC_{50} < 1 \mu M$

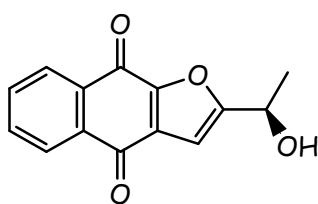
25: R = COCH=CH(CH₂)₄CH₃ 2R
26: R = COCH=CH(CH₂)₄CH₃ 2S

I.1.4.3.2. Les quinones

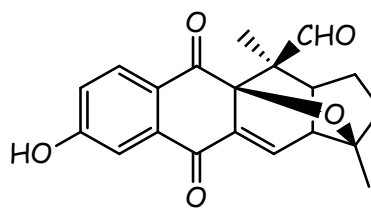
Les travaux de Salmon-Chemin et *al.* (2001) montrent que les quinones, en particulier les 1,4-naphthoquinones comme la plumbagine **27** peuvent induire le stress oxydatif chez *T. cruzi*. Ceci peut s'expliquer par leur réduction en radicaux semi-quinones par des enzymes comme celles impliquées dans la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie et la trypanothione réductase, une enzyme clé du métabolisme antioxydant des trypanosomes. La plumbagine a une IC_{50} comprise entre 1.5 et 6.5 μM sur *T. brucei* (Salmon-Chemin et *al.*, 2001). Des études bioguidées réalisées sur *Kigelia pinnata* (Bignoniaceae) par Moideen et *al.* en 1999 montrent que la 2-(1-hydroxyméthyl) naphtho-2,3-furan-4,9-dione **28** et l'isopinnatal **29** sont très actives sur les formes sanguines de *T. brucei brucei* et *T. brucei rhodesiense* avec des IC_{50} respectives de 0.12 et 0.045 μM pour le composé **28** et 0.37 et 0.73 μM pour le composé **29**.



27 $1.5 < IC_{50} < 6.5 \mu M$



28 $IC_{50} = 0.12 \mu M$ (Tbb)
 $IC_{50} = 0.045 \mu M$ (Tbr)

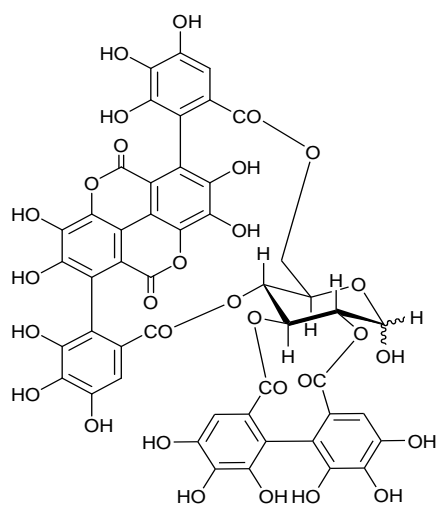


29 $IC_{50} = 0.37 \mu M$ (Tbb)
 $IC_{50} = 0.73 \mu M$ (Tbr)

I.1.4.3.3. Les composés phénoliques

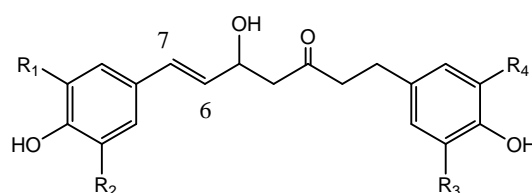
Les travaux d'Asres et *al.* (2001) réalisés sur *Combretum molle* (Combretaceae) ont permis d'isoler entre autres composés, la punicalagine **30** qui a une $IC_{50} = 1.75 \mu M$ sur *T. b. rhodesiense*; de même leurs travaux sur les graines de *Aframomum letestuanum* ont permis d'isoler la letestuanine C **31** et le (4Z,6E)-5-hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)hepta-4,6-

dien-3-one **32**, composés actifs sur la forme sanguine de différentes espèces de *T. brucei* avec des valeurs de IC_{50} variant de 4 à 9 μM . De nombreux composés phénoliques ont également été évalués pour leur activité trypanocide. Les travaux de thèse de B. Răz (1998) ont été réalisés sur 132 flavonoïdes, et leurs activités antitrypanosomales *in vitro* ont été évaluées. Parmi les composés phénoliques les plus actifs qui ont été étudiés, la 7,8-dihydroxyflavone **33**, la quercetagine **34**, la justicidine B **35**, la cissampeloflavone **36**, la chrysoptine **37** et le chrysoféhol D **38** ont respectivement des IC_{50} de 0.16, 0.8, 0.55, 1, 2.9 et 4.7 μM sur la forme sanguine de *T. brucei rhodesiense* (Asres, 2001 ; Ramirez et al., 2003 ; Gertsch et al., 2003).



$IC_{50} = 1.75 \mu M$

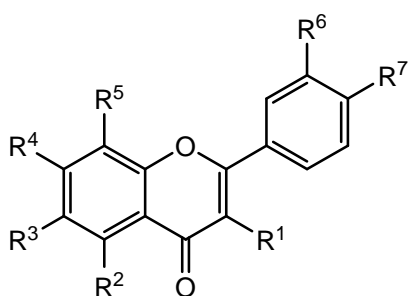
30



$4 < IC_{50} < 9 \mu M$

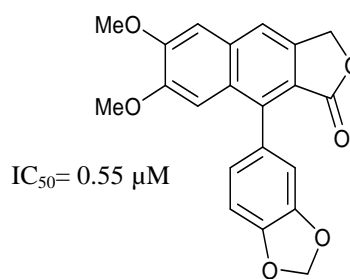
31: $R^1, R^2, R^3, R^4 = H$ 6, 7-dihydro

32: $R^1, R^2, R^3, R^4 = H$



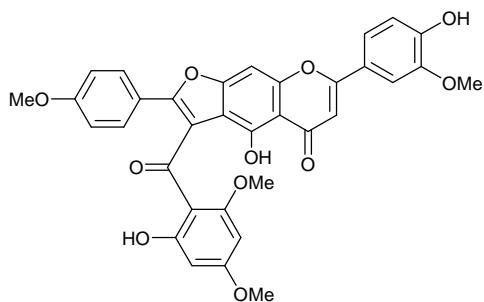
33: $R^1, R^2, R^3, R^6, R^7 = H, R^4, R^5 = OH$ $IC_{50} = 0.16 \mu M$

34: $R^1, R^2, R^3, R^4, R^6, R^7 = OH, R^5 = H$ $IC_{50} = 0.18 \mu M$

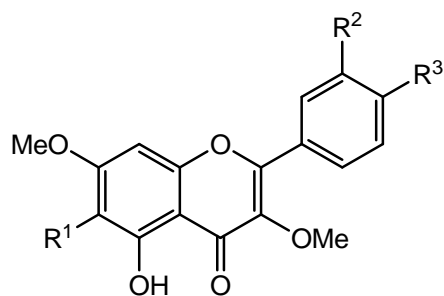


$IC_{50} = 0.55 \mu M$

35



36 IC₅₀ = 1 μM



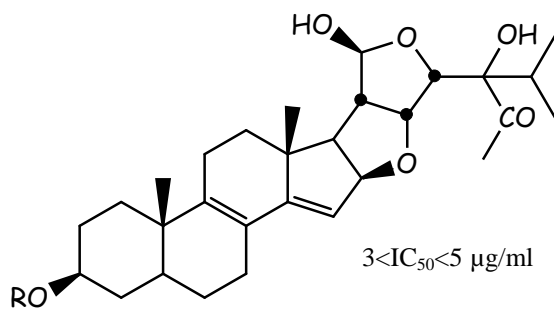
IC₅₀ = 2.9 μM **37**: R¹, R²=OMe, R³=OH

IC₅₀ = 4.7 μM **38**: R¹=OMe, R², R³=OH

I.1.4.3.4. Les terpènes et autres composés

Dans leur programme visant à trouver de nouvelles molécules antiparasitaires, Tchinda *et al.*, en 2002 ont isolé la vernoguinosterol (**39**) et la vernoguinoside (**40**) à partir des écorces de *Vernonia guineensis* (Asteraceae). Ces composés ont montré d'intéressantes activités trypanocidales sur quatre souches de la forme sanguine de *T. brucei rhodesiense* avec des IC₅₀ comprises entre 3-5 μg/ml. De plus, les travaux de Mikus *et al.*, (2000) ont permis de mettre en évidence l'activité antitrypanosomale (IC₅₀ = 0.13 μM) d'un alcool monoterpénique, le terpinèn-4-ol (**41**).

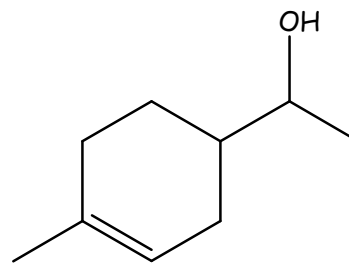
Les travaux de Schmidt *et al.*, (2002) ont montré l'activité antitrypanosomale de l'hélenaline (**42**) et de la mexicanine I (**43**) sur les trypomastigotes sanguins de *T. brucei rhodesiense* avec des valeurs de IC₅₀ égales à 0.03 et 0.32 μM respectivement. Cette activité serait due à la présence des fonctions α,β-insaturées (cyclopentenone et α-méthylène-γ-lactone) qui sont des centres d'alkylations pouvant réagir avec le groupe sulfhydryl de plusieurs enzymes. Freiburghaus *et al.*, (1998) ont déterminé l'activité trypanocide (IC₅₀=8.6 μM) d'un diastéréoisomer du diterpène kolavénol (**44**) isolé des écorces des racines de *Entada abyssinica* (Mimosaceae) sur *T. b. rhodesiense*.



39: R = H

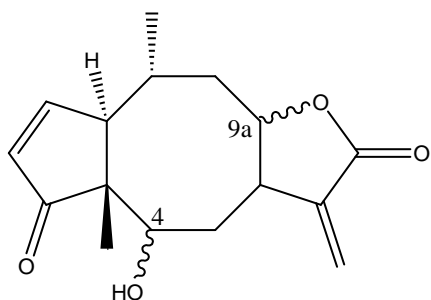
40: R =béta-D glucopyranose

3 < IC₅₀ < 5 μg/ml



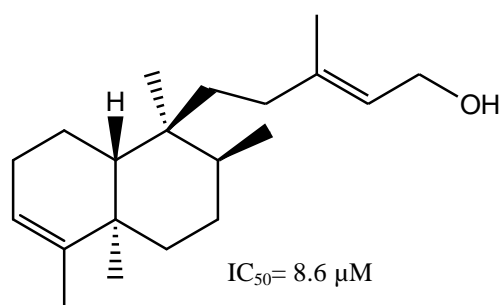
41

IC₅₀ = 0.13 μM



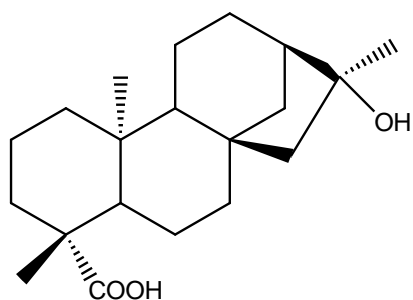
IC₅₀ = 0.03 μM **42**: 4S, 9Ar

IC₅₀ = 0.32 μM **43**: 4R, 9aS

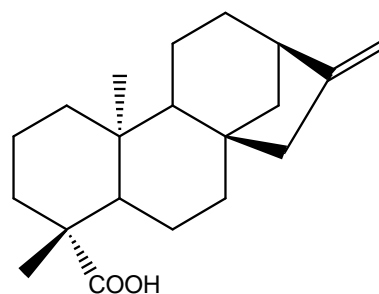


44

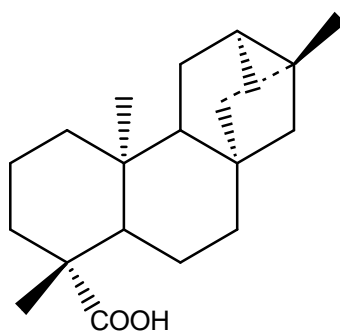
Les dérivés de labdanes, en l'occurrence l'acide ent-kaur-16a-ol-9-oïque (**45**) isolé de *Mikania obusta*, l'acide ent-kauran-16-en-oïque (**46**), isolé de *Wedelia paludosa* et l'acide (-) trachyloban-19-oïque (**47**), isolé de *Vaspillioides* (Asreraceae) montrent des activités significatives contre *T. brucei* (Richome et al., 1991 ; Batista et al., 1999).



45

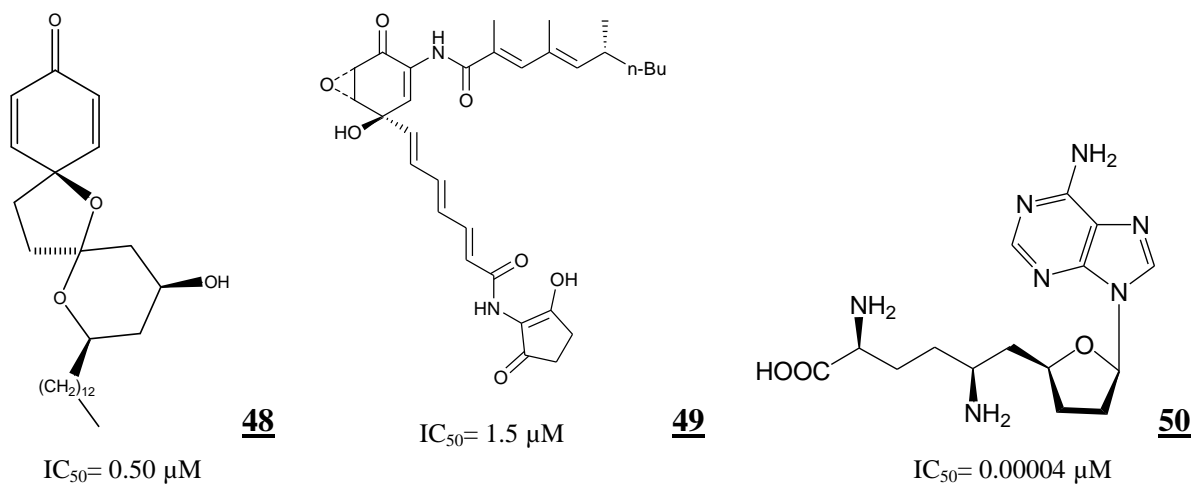


46

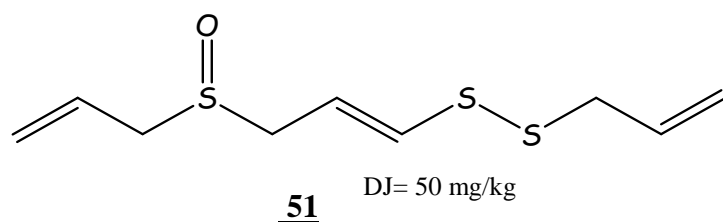


47

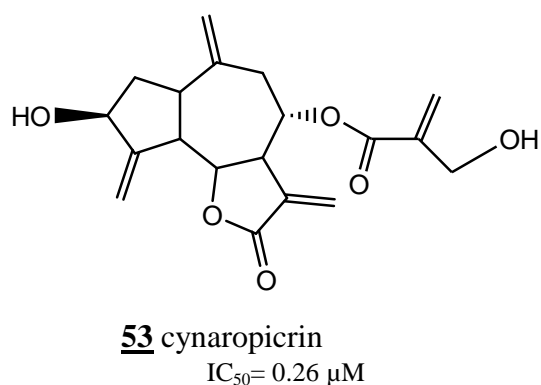
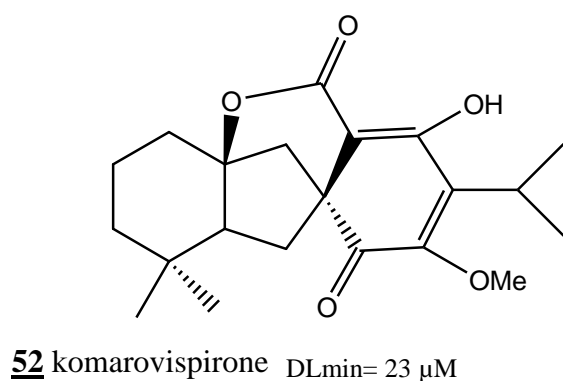
Par ailleurs, plusieurs autres classes de composés ont été testées sur diverses souches de trypanosomes dont les plus significatifs sont l'aculéatine D (**48**), la manumycine A (**49**) et la sinéfungine (**50**), les IC₅₀ étant respectivement 0.5, 1.5 et 0.0004 μM sur *T. brucei* (Ali et al., 1999, Kamisky et al., 1996, Heilmann et al., 2000 et 2001).

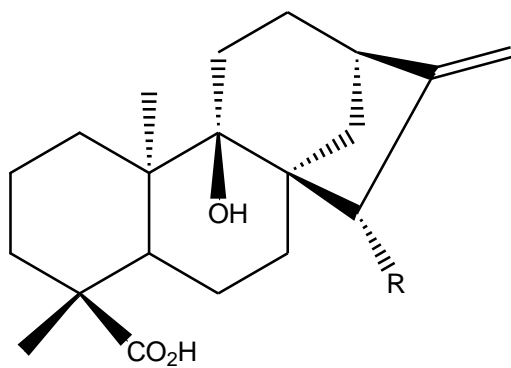


Des acides organiques, des lipides, des acétogénines, des polyènes et des ajoènes ont également été testés pour leurs activités biologiques sur des cellules de trypanosomes. L'ajoène (**51**) constitue un bel exemple de ces composés soufrés d'origine naturelle (*Allium sativum*, Liliaceae) qui sont dotés d'activité antitrypanosomale importante. Le composé **51** inhibe la croissance *in vivo* des trypanosomes à des doses journalières de 50 mg/kg pendant 12 jours (Perez et al., 1994).

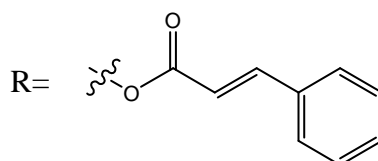


Uchiyana et al., (2004) ont évalué l'activité trypanocide de la komarospirone (**52**) sur l'épimastigote de *T. cruzi* et ont obtenu comme dose létale minimale la valeur de 23 μM . Les travaux de Schinor et al., ont montré que le cynaropicrin (**53**) a une activité trypanocide ($IC_{50} = 0.26 \mu M$) sur les trypanostigotes de *T. cruzi* *in vitro*. Mendes et al., ont montré que l'acide ent-9 α -hydroxy-15 β -E-cinnamoyloxy-16-kauren-19-oïque (**54**) et le 8 β -hydroxyzaluzinine (**55**) ont des activités trypanocides sur *T. cruzi*.

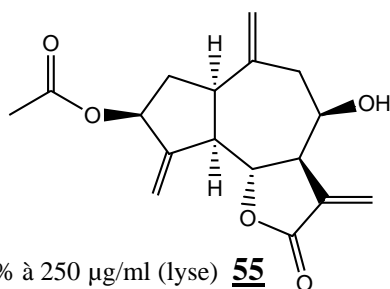




Reduction de 61.73% à 100 µg/ml (lyse)



54



Reduction de 56.6% à 250 µg/ml (lyse) **55**

I.1.4.4. Quelques substances d'origine naturelle douées d'activités leishmanicides

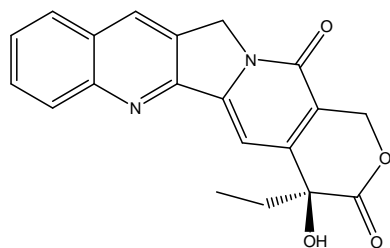
Pour lutter contre les leishmanioses, les populations des zones endémiques utilisent principalement leurs plantes médicinales compte tenu du fait que les médicaments disponibles sont d'un coût élevé pour leur bourse. Dans le souci de justifier le succès et l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle, plusieurs scientifiques ont mené des études bioguidées qui leur ont permis d'isoler plusieurs métabolites secondaires qui seraient responsables des activités biologiques connues à ces plantes. Parmi ces métabolites, on rencontre surtout les alcaloïdes, les quinones, les composés phénoliques et les terpènes, dont quelques uns sont présentés ci-dessous.

I.1.4.4.1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes constituent la classe de composés la plus étudiée parmi ceux qui ont été testés contre les parasites du genre *Leishmania*. Comme pour la plupart des composés testés contre les trypanosomes, les métabolites secondaires isolés sont testés sur des cellules parasitaires et non sur des cibles enzymatiques de *Leishmanies*.

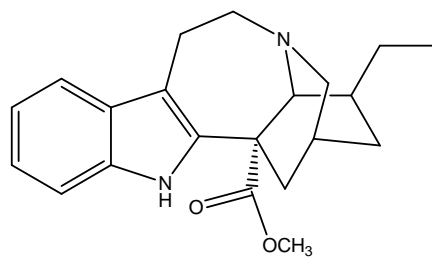
Parmi les alcaloïdes qui ont été testés pour leurs activités antileishmaniales, on peut citer la camphotécine (**56**) et certains de ses dérivés (10,11-méthylènedioxy) qui ont de bonnes activités avec des IC₅₀ qui varient de 32 à 160 nM sur des souches de *L. donovani in vitro* (Werbovetz, 2000). La coronarinie (**57**) et la N-méthylliriodendrinone (**58**) ont

également des activités intéressantes avec des IC_{50} respectives de 10 et 36.1 $\mu\text{g/ml}$ sur *L. amazonensis* et *L. donovani* respectivement (Delorenzi et al., 2001 ; Del Rayo et al., 2000).



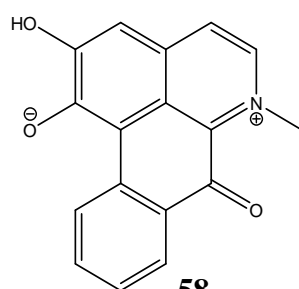
$32 < IC_{50} < 160$ nM

56



$IC_{50} = 10$ $\mu\text{g/ml}$

57



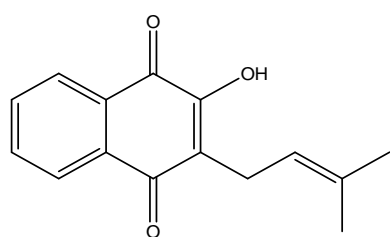
$IC_{50} = 36.1$ $\mu\text{g/ml}$

58

I.1.4.4.2. Les quinones

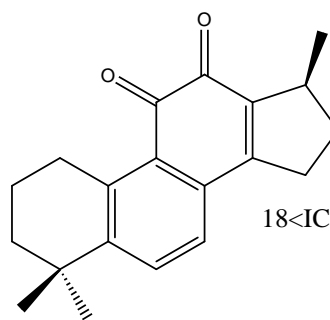
Parmi les quinones qui ont été le plus étudiées pour leurs activités antileishmaniales, le lapachol (**59**) et ses dérivés occupent une place importante (Teixeira et al., 2001 ; Croft et al., 1985 ; Fournet et al., 1994). Le lapachol a été testé *in vitro* et *in vivo* respectivement sur *L. braziliensis* et sur des hamsters infectés par *L. braziliensis* (Teixeira et al., 2001). Ces travaux montrent que le lapachol a un effet antiamastigote *in vitro* ; cependant, *in vivo*, il n'a pas pu atténuer le développement des lésions après une dose orale de 300 mg/kg/jr pendant 42 jours. Cette différence d'activité *in vitro* et *in vivo* peut s'expliquer par la transformation du lapachol en des métabolites inactifs.

De plus, les travaux de Sairafianpour et al. (2001) réalisés sur les racines de *Perovskia abrotanoides*, une *Lamiaceae* traditionnellement utilisée en Iran pour soigner les Leishmanioses, ont permis d'isoler la cryptotanshinone (**60**) et la 1 β -hydroxycryptanshinone (**61**). Ces composés sont doués de propriétés leishmanicides avec des IC_{50} variant entre 18-47 μM sur *L. major*.



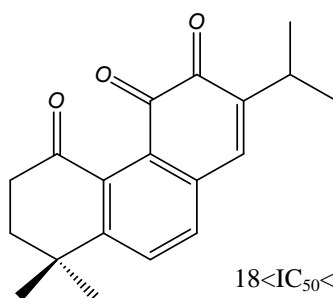
$IC_{50}=11.9 \pm 6.9 \mu\text{g/ml}$

59



$18 < IC_{50} < 47 \mu\text{M}$

60



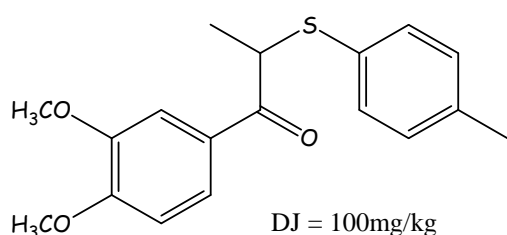
$18 < IC_{50} < 47 \mu\text{M}$

61

I.1.4.4.3. Les composés phénoliques

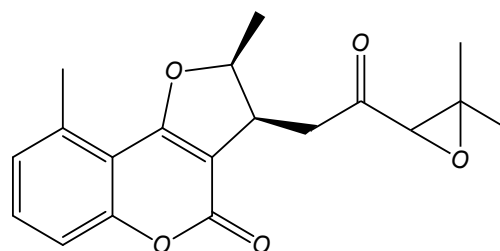
De nombreuses études ont été menées sur des composés comportant des unités phénoliques. Ces composés se recencent essentiellement dans les classes telles que les lignanes et les flavonoïdes.

En effet, les travaux de Barata et *al.*, (2000) sur *Virola surinamensis* et *V. pavonis* (Myristicaceae) ont permis d'évaluer l'activité antileishmaniale d'une trentaine de néolignanes *in vitro* sur les amastigotes et les promastigotes de *Leishmania donovani*. La meilleure activité a été celle de la (3,4-diméthoxy)-2-(4-méthylthiophénoxy) propiophénone (**62**) qui a réduit *in vivo*, 42% de la croissance des amastigotes de *L. donovani* à une dose de 100 mg/kg/jr pendant 5 jours. Oketch-Rabah et *al.* (1997) ont montré dans leurs travaux que l'époxide 2'-epicycloisobrachycoumarinone (**63**) et ses stéréoisomères isolés de *Vernonia brachycalyx* (Asteraceae) ont des IC_{50} comprises entre 37.1 et 39.2 $\mu\text{g/ml}$ sur *L. major*. Ankisetty et *al.* (2006) ont trouvé que la grandiuvarone A (**64**) a une IC_{50} de 0.7 $\mu\text{g/ml}$ sur *L. donovani*.



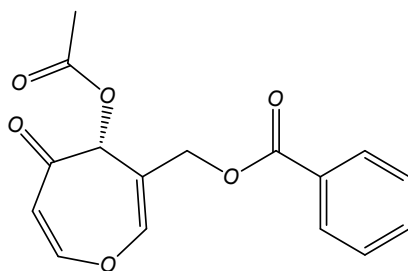
DJ = 100mg/kg

62



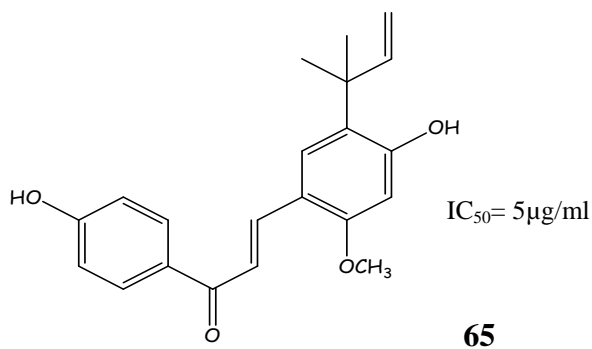
$37.1 < IC_{50} < 39.2 \mu\text{g/ml}$

63



64 $IC_{50} = 0.7 \mu\text{g/ml}$

Parmi les composés qui sont testés comme leishmanicides, nombreux sont ceux qui appartiennent à la classe des flavonoïdes. Le plus prometteur d'entre eux est la licochalcone A (**65**) qui a initialement été isolée de *Glycyrrhiza glabra* (Fabaceae). Une vingtaine de chalcones isolées de plantes médicinales ont été testées et se sont révélées antileishmaniales avec les meilleurs résultats entre 0.39 et 0.41 $\mu\text{g/ml}$ sur *L. donovani*, et une cytotoxicité qui varie entre 0.19 et 2.06 $\mu\text{g/ml}$ (Kayser et Kiderlen, 2001 ; Zhai et al., 1995).

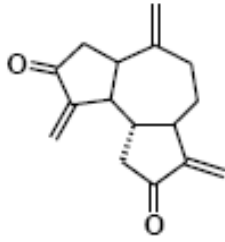


$IC_{50} = 5 \mu\text{g/ml}$

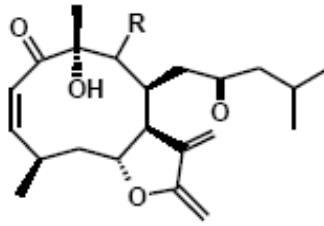
65

I.1.4.4.4. Les terpénoïdes

Les métabolites secondaires appartenant à la classe des terpénoïdes se sont révélés être de bons leishmanicides. Ainsi les travaux de Kenedey et al. (2001) étudient le pouvoir leishmanicide de 17 sesquiterpènes sur *L. tropica* ; ceux de Gallwitz et al. (1999) et de Picman et al. (1979) montrent que la parthénine (**66**) est capable de bloquer des sites spécifiques du parasite responsables de la synthèse de la glutathionylspermidine et du trypanothion à partir des précurseurs cystéine et glutathion de *Leishmania* et *Trypanosoma*. D'autres sesquiterpènes intéressantes sont les neurolines A (**67**) et B (**68**) qui inhibent la croissance des leishmanies avec des EC_{50} respectives de 0.92 et 0.62 μM (François et al., 1996).



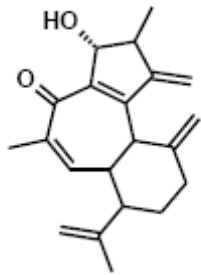
66 $IC_{90} = 2.5 \mu\text{g/ml}$



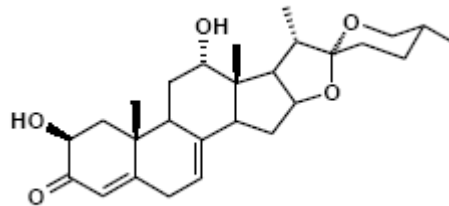
67 : R = H $EC_{50} = 0.92 \mu\text{M}$

68 : R = OAc $EC_{50} = 0.62 \mu\text{M}$

De nombreux autres terpénoïdes (diterpènes, triterpènes,...) ont également fait l'objet d'études afin de déterminer leur activité antileishmaniale. Parmi ces composés, on a les exemples de la jatrogrossidione (**69**) et la muzanzagénine (**70**) qui ont des EC_{50} respectives de $0.75 \mu\text{g/ml}$ et $70 \mu\text{M}$ (Schmeda-Hirschman et *al.*, 1996 ; Oketch-Rabah et *al.*, 1997a).



69 $EC_{50} = 0.75 \mu\text{M}$



$EC_{50} = 70 \mu\text{M}$

70

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des médicaments disponibles ou potentiels, l'OMS a validé un certain nombre de cibles permettant de développer de nouveaux agents trypanocides. Ces cibles sont entre autres:

- l'inhibition de la croissance parasitaire ;
- l'inhibition des enzymes du parasite :
 - les enzymes glycolytiques ;
 - la protéine farnésyl transférase ;
 - la trypanothione réductase ;
 - la dihydrofolate réductase.

Les cibles choisies dans notre travail sont : l'inhibition de la croissance de *T. brucei* et l'inhibition des enzymes de sa glycolyse.

I.1.4.5. La glycolyse comme cible pour la conception de nouveaux Trypanocides

Un ensemble de travaux menés sur les trypanosomes révèle que leurs formes sanguines sont entièrement dépendantes de la glycolyse jusqu'au stade de pyruvate comme seule source d'approvisionnement en énergie nécessaire à leur survie (Bakker *et al.*, 1999 ; Wilson *et al.*, 1994 ; Perié *et al.*, 1993).

En effet, une fois qu'il a pénétré le flux sanguin d'un mammifère, le trypanosome africain *T. brucei* est totalement dépendant du glucose présent dans le sang de son hôte pour subvenir à ses besoins énergétiques. Comme le parasite ne possède qu'une mitochondrie fortement réprimée (absence de cycle de Krebs fonctionnel et de système de phosphorylation oxydative), tout l'ATP synthétisé par ce parasite résulte de la conversion du glucose en pyruvate (Ladame, 2001). Etant donné qu'il est incapable de stocker les métabolites énergétiques, un manque significatif de réserves en polysaccharides et en phosphates hautement énergétiques (phosphagènes) le contraint à utiliser des sources exogènes de glucose. Chaque parasite consomme ainsi en une heure l'équivalent de son propre poids sec en glucose (Fairlamb *et al.*, 1986). Par contre, au cours de son développement dans l'intestin de la mouche tsé-tsé, *T. brucei* n'utilise pas le glucose comme principale source d'énergie mais la proline, acide aminé abondant chez son nouvel hôte, et à ce stade, la mitochondrie devient alors active (Ladame, 2001).

Le rôle essentiel de la glycolyse pour la survie du parasite fait des enzymes de ce métabolisme une cible clairement identifiée pour la recherche de nouveaux trypanocides (Michels, 1988). Ci-après, nous présentons un schéma simplifié de la glycolyse présentant nos principales cibles (Schéma 1).

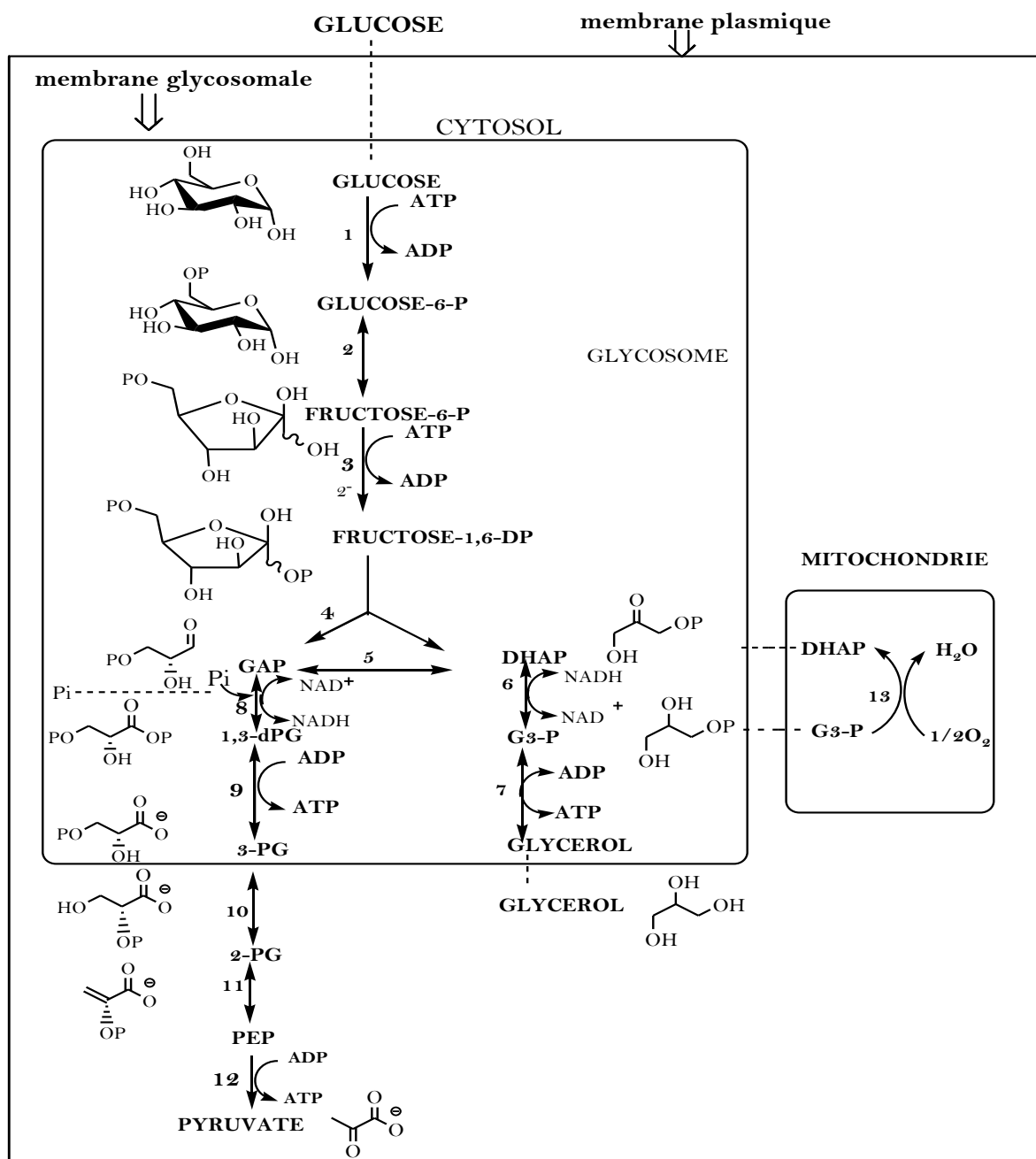


Schéma 1 : Cascade glycolytique et enzymes impliquées chez les Trypanosomatidae

1. Hexokinase
2. Phosphoglucose isomérase
3. Phosphofructokinase (PFK)
4. Aldolase
5. Triosephosphate isomérase
6. Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
7. Glycérol kinase
8. Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH)
9. Phosphoglycérate kinase
10. Phosphoglycérate mutase
11. Enolase
12. Pyruvate kinase (PyK)
13. Glycérol-3-phosphate oxydase (Michels, 1988; Faouzi et al., 2002).

I.1.4.5.1. L'hexokinase

L'hexokinase est la première enzyme de la chaîne glycolytique qui transforme le glucose en glucose-6-phosphate en présence d'ATP-Mg. Le glucose-6-phosphate est ensuite

transformé en 6-phosphogluconate par l'enzyme auxiliaire glucose-6-phosphate déshydrogénase mise en grand excès en utilisant le NADP^+ qui se réduit en NADPH. Le suivi de la réaction est effectué à 340 nm où l'on suit l'apparition du NADPH.

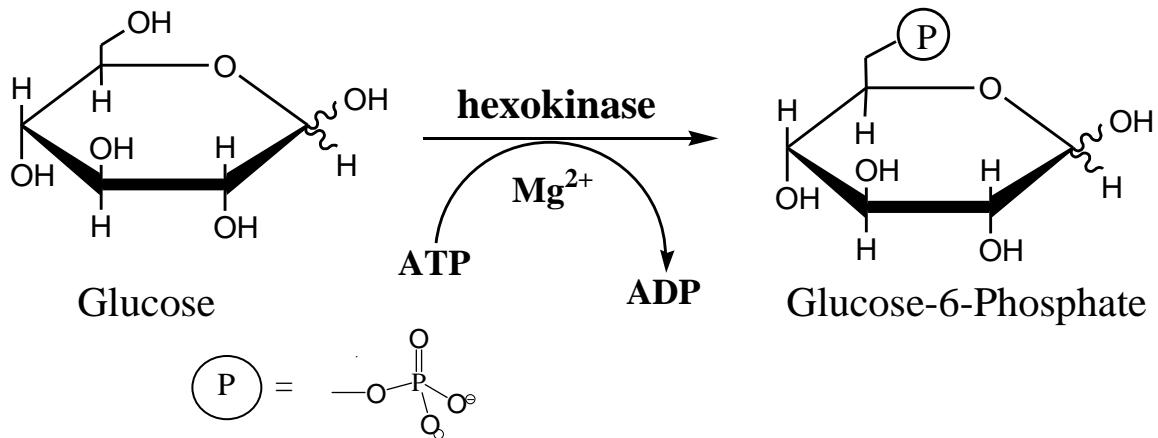


Schéma 2: Equation de conversion du glucose en glucose-6-phosphate catalysée par l'hexokinase

I.1.4.5.2. la Glucose Phosphate isomérase (PGI)

C'est la deuxième enzyme de la cascade glycolytique qui transforme le Fructose-6-phosphate en Glucose-6-phosphate, lequel est transformé en 6-phosphogluconate par l'enzyme auxiliaire Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) avec l'aide du cofacteur NADP qui se transforme en NADPH. On suit l'apparition du NADPH à 340 nm.

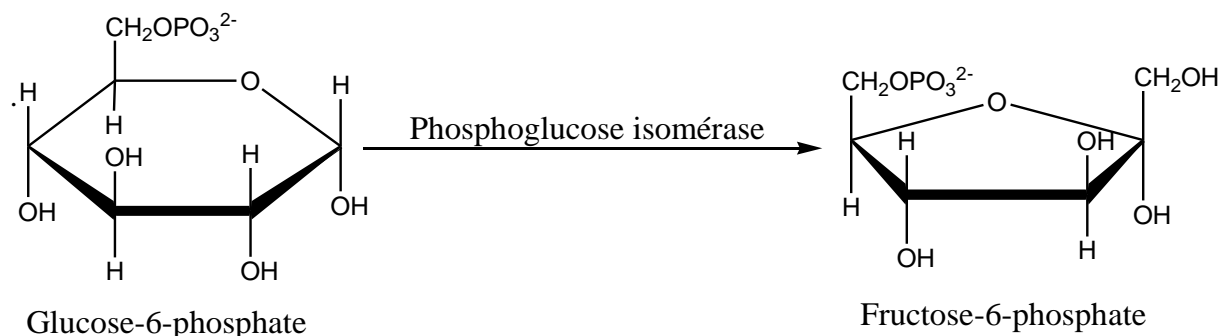


Schéma 3: Equation de conversion du glucose-6-phosphate en Fructose-6-phosphate catalysée par la PGI

I.1.4.5.3. La phosphofructokinase

C'est la 3^{ème} enzyme de la chaîne glycolytique qui catalyse la conversion du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-diphosphate. Cette réaction nécessite la présence d'ATP

(Adénosine Triphosphate) et de Mg^{2+} . L'ADP (Adénosine diphosphate) formé est utilisé comme substrat dans une deuxième réaction qui utilise la PyK pour déphosphoryler le PEP en pyruvate. Celui-ci est transformé en acide lactique grâce à la lactate déshydrogénase. Cette troisième réaction nécessite un cofacteur, le NADH, qui est oxydé en NAD^+ . On suit sa disparition en fonction du temps au spectrophotomètre à 340 nm.

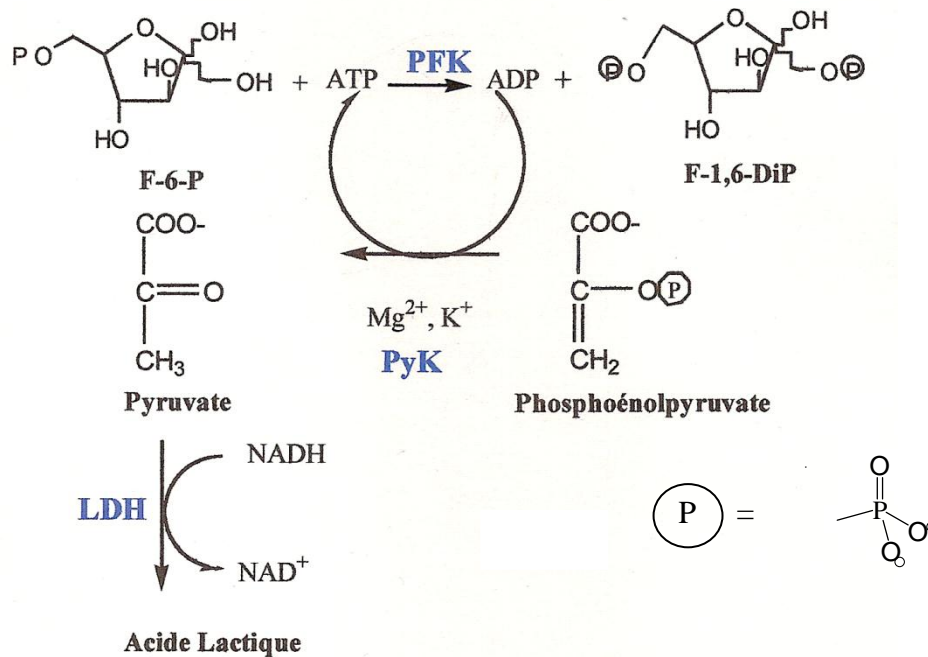


Schéma 4 : Equation catalysée impliquant la PFK

I.1.4.5.4. L'aldolase ou fructose-bis-phosphate aldolase.

C'est la 4^{ème} enzyme de la glycolyse qui catalyse une condensation aldolique (l'addition d'un groupement méthylène activé sur la double liaison d'un carbonyle) ou la réaction inverse (ce qui est le cas en l'occurrence dans la glycolyse). Le fructose 1,6-bis-phosphate est ainsi scindé en deux molécules de trioses phosphates, la glycéraldéhyde-3-phosphate et la dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) qui sont des isomères inter-convertibles sous l'action d'une triose phosphate isomérase.

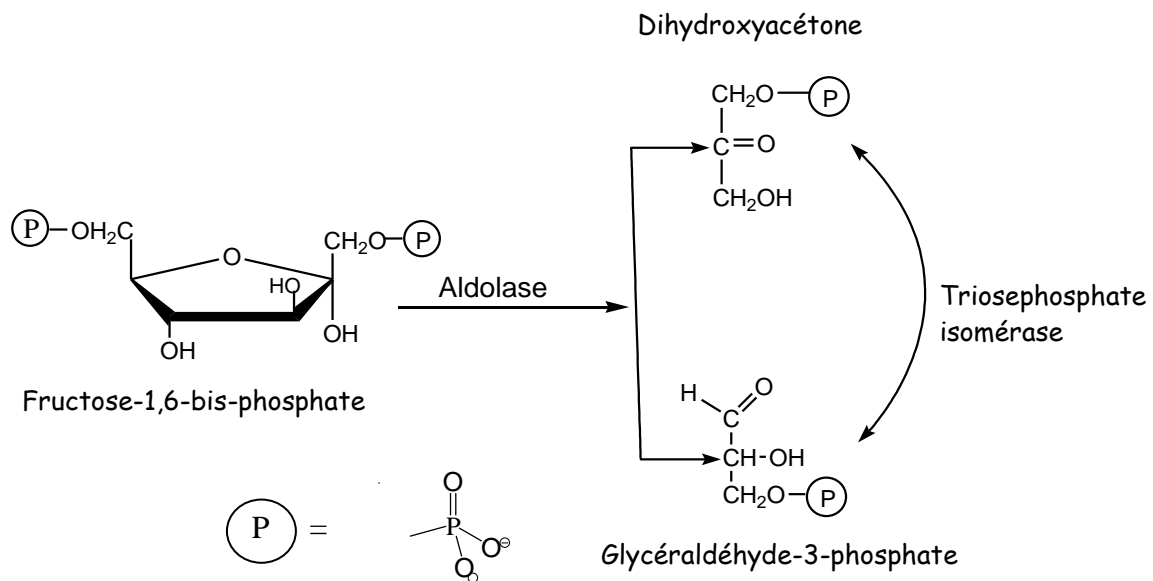


Schéma 5 : Equation catalysée par l'aldolase

I.1.4.5.5. la Triose Phosphate Isomérase (TIM)

La Triose Phosphate isomérase est la cinquième enzyme de la chaîne glycolytique qui transforme le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) en dihydroxyacétonephosphate (DHAP). Le DHAP formé est ensuite transformé en glycérol-3-phosphate par la GDH en large excès, en présence du cofacteur NADH qui est oxydé en NAD^+ . Le suivi de la réaction est effectué à 340 nm où l'on suit la disparition du NADH.

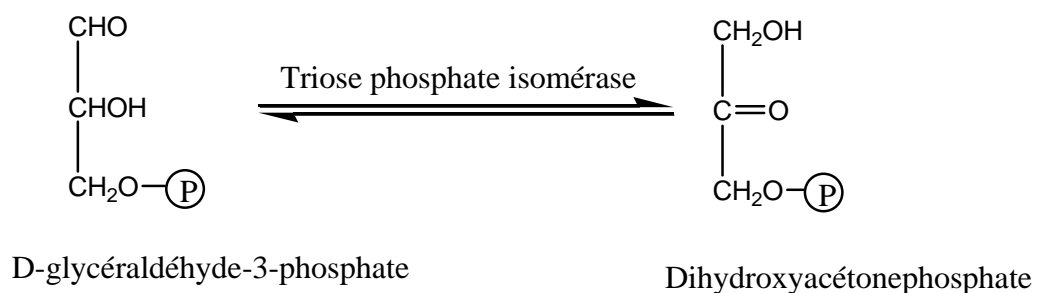


Schéma 6 : Transformation du glycéraldéhyde-3-phosphate en dihydroxyacétonephosphate par la triose phosphate isomérase

I.1.4.5.6. La GAPDH

La GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) est la huitième enzyme de la chaîne glycolytique. Elle est la première enzyme de la voie des trioses catalysant réversiblement la réaction de phosphorylation oxydante du D-glyceraldéhyde-3-phosphate (GAP) en acide 1,3-disphosphoglycerate (1,3-di-PG) en présence d'un phosphate inorganique (P_i) et de son cofacteur NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide).

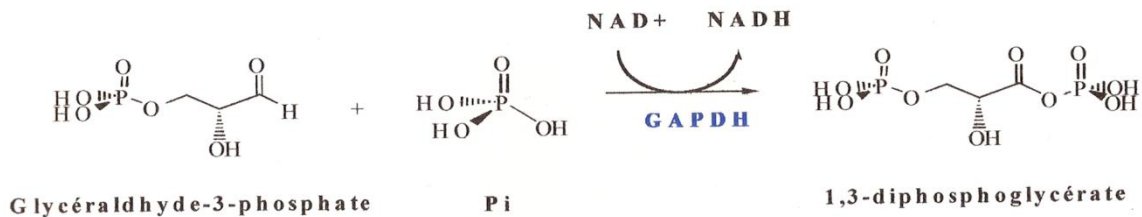


Schéma 7 : Equation réactionnelle catalysée par la GAPDH

Les GAPDHs sont des enzymes constituées de quatre sous-unités identiques, dont seule la forme tétramérique est active et les quatre sites sont simultanément actifs. Le schéma 8 nous présente des illustrations de ces sites (Seydoux, 1973 ; Peczon, 1972).

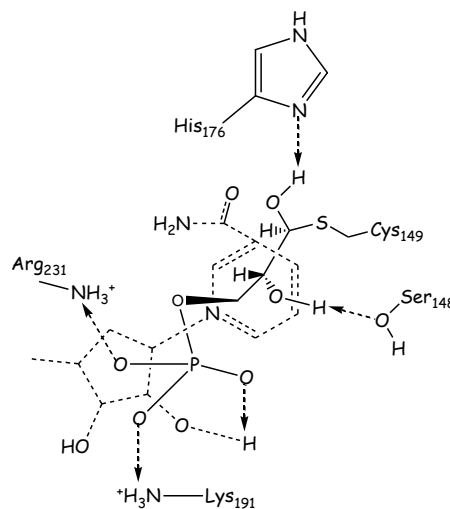


Schéma 8 : Modèle de site actif de GAPDH illustrant l'hémithioacétal entre la 3-phosphoglycerate et la cystéine-149 et montrant les liaisons hydrogènes ainsi que les interactions ioniques avec les acides aminés terminaux et le cofacteur NAD^+ (Cane et Sohng, 1994)

Chaque sous unité comporte deux domaines ayant chacun une fonction spécifique. Le domaine N-terminal, comprenant environ 150 résidus, est impliqué dans la fixation du

cofacteur NAD⁺. Le domaine C-terminal, comprenant entre 150 et 180 acides aminés, contient les résidus responsables de la fixation du substrat, de la catalyse et des contacts entre les sous unités. Le site actif est situé dans le sillon formé entre ces deux domaines (Ladame, 2001 ; Cane, 1994).

Les structures tridimensionnelles d'un grand nombre de GAPDHs sont aujourd'hui disponibles (Lin, 1993 ; Skarzynski, 1987 ; Mercer, 1976) plus précisément celles de *Trypanosoma brucei* (3.2A°) (Velieux, 1993) et *Trypanosoma cruzi* (2.8A°) (Souza, 1998). L'ensemble de ces structures a permis de préciser la nature des sites de fixation spécifiques du GAP, du Pi et du cofacteur dans le site actif. En effet, les sites de fixation du phosphate du GAP (noté Ps) et du phosphate inorganique (noté Pi) ont été définis sur la base des travaux de modélisation de l'intermédiaire thiohémiacétal et identifiés à deux pôles cationiques (Cane et Sohng, 1994 ; Moras et al., 1975).

Dans le cas particulier du site Ps, pour toutes les GAPDHs, l'ion sulfate (ou phosphate pour la GAPDH de *Leishmania mexicana*) est lié à la protéine par interaction avec des résidus Arginine et Thréonine ainsi que par liaison hydrogène avec l'hydroxyle en position 2' du ribose portant la nicotinamide. Le cofacteur apparaît donc comme élément de construction de ce site de fixation Ps (Ladame, 2001 ; Cane et Sohng, 1994).

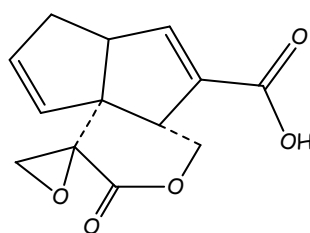
Pour le site Pi, les interactions par liaisons hydrogènes du sulfate (ou phosphate) occupant ce site impliquent des résidus Sérine, Thréonine et Glycine. Une Arginine contribue également à la stabilisation de l'anion dans ce site par l'intermédiaire de deux molécules d'eau (Ladame, 2001).

Alors que ces deux sites furent d'abord considérés comme points d'encrage spécifiques à chacun des substrats, les travaux de Branlant, depuis 1990, ont permis d'établir un mécanisme enzymatique plus complexe faisant intervenir un possible basculement du phosphate du GAP d'un site à l'autre au cours du cycle catalytique (Ladame, 2001).

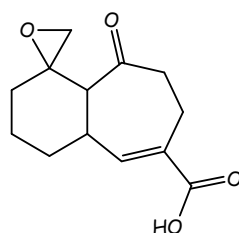
Les inhibiteurs de la GAPDH

Les inhibiteurs sont des composés qui peuvent ralentir l'activité des enzymes en influençant la formation (ou la destruction) des complexes enzyme-substrat ou enzyme-produit. Ils ont depuis été utilisés pour élucider le métabolisme enzymatique par l'accumulation des intermédiaires réactionnels (Gelpi et al., 1993). Les inhibiteurs des réactions enzymatiques ont acquis une place importante dans la recherche médicale et pharmaceutique pour le traitement d'un grand nombre de maladies et parmi elles la trypanosomiase humaine africaine. On distingue deux types d'inhibiteurs : les inhibiteurs

comme inhibiteurs de la GAPDH. Ces deux sesquiterpènes hydrophobes inhibent les GAPDHs de différents organismes (parasite, bactérie, levure...). Il a été démontré que la Pentalenolactone, isolée de *Streptomyces areae*, inhibe de manière irréversible l'enzyme du muscle du lapin, par réaction sur la cystéine 149 essentielle du site actif (Cane et Sohng, 1989 ; Lambeir et *al.*, 1991) alors que l'acide koningique, isolé de *Trichoderma koningii*, est un meilleur inhibiteur de la GAPDH des eucaryotes que de celle des bactéries (Kato et *al.*, 1992).

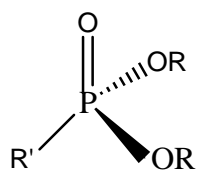


74



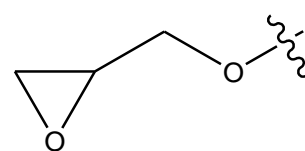
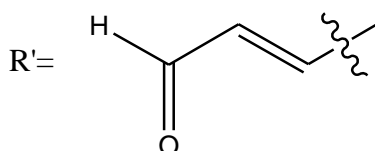
75

Consécutivement à la mise en évidence de cette forte réactivité d'époxydes et d' α -énone sur la GAPDH, des travaux ont permis de développer une famille d'analogues du glycéraldéhyde-3-phosphate (**76**) contenant soit un époxyde, soit une α -énone capable de se lier de façon covalente et irréversible à la GAPDH (Willson et *al.*, 1994 ; Lauth, 1991).



76

R= Me, Et, iPr, Bn, H

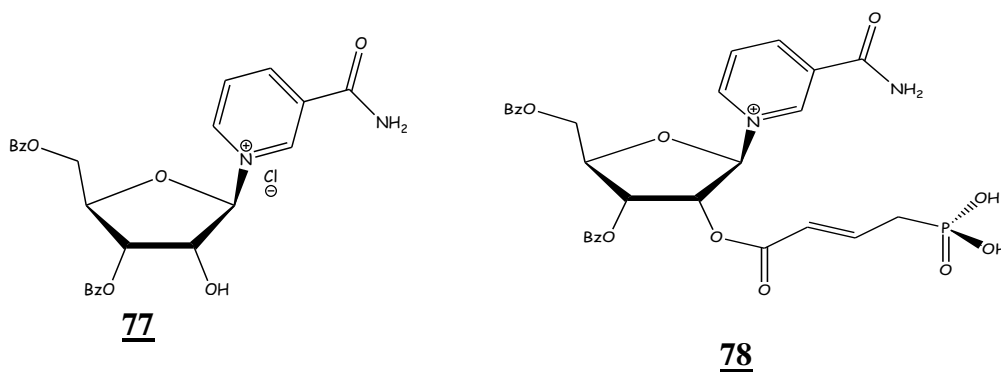


Par des études de RMN, par des cinétiques enzymatiques et titration des cystéines libres, il a été démontré que ces époxydes et α -énones phosphorylées se lient au site actif de l'enzyme par formation d'un lien covalent entre le résidu cystéine du site actif et le carbone du carbonyle de l'inhibiteur. Des études comparatives d'inhibitions réalisées parallèlement sur les protéines de parasite et de mammifère ont également montré une affinité plus importante pour l'enzyme glycosomale de *T. brucei*. De plus, l'étude de l'effet de ces analogues du GAP sur la multiplication des trypanosomes *in vitro* a mis en évidence que certains de ces composés ont une activité significative pour des concentrations plus faibles que les drogues trypanocides (pentamidine, difluorométhyl-ornithine) couramment utilisées dans le traitement de la maladie du sommeil, puisqu'ils présentent des IC₅₀ de l'ordre de 0.3 μ M. Cependant, leur trop faible sélectivité d'inhibition rend les molécules inexploitable pour des projets

d'utilisation thérapeutique (Ladame, 2001). Cette stratégie sera accessoirement utilisée pour les cibles secondaires PFK et PyK.

* Inhibition de la GAPDH par des analogues bisubstrats NAD⁺-GAP

La conception d'une nouvelle classe d'inhibiteurs bi-substrats comportant la partie nicotinamide du cofacteur NAD⁺ et un groupement phosphonyle mimant le phosphate du GAP a montré que ces derniers pouvaient être des inhibiteurs potentiellement plus efficaces car ils peuvent interagir aux deux sites d'interaction Pi et Ps du site actif (Ladame, 2001 ; Ladame et al., 2005).



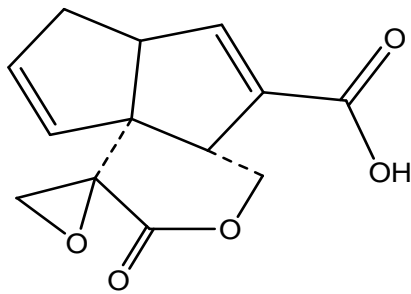
* Inhibition de la GAPDH par des inhibiteurs naturels : la Pentalenolactone et l'acide koningique.

La Pentalenolactone (74) et l'acide koningique (75) sont deux antibiotiques naturels sesquiterpéniques isolés respectivement de *Streptomyces areae* et *Trichoderma koningii*. Ces deux sesquiterpènes hydrophobes sont des inhibiteurs de la GAPDH de différents organismes (parasite, bactérie, levure...).

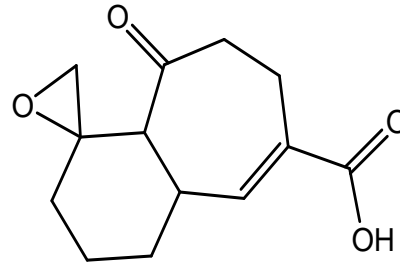
La Pentalenolactone inhibe de manière irréversible la GAPDH du muscle de lapin et inhibe de manière réversible la GAPDH de *Trypanosoma brucei* (Cane et Sohng 1989, Lambeir et al., 1991). Dans le cas de l'inhibition du muscle de lapin, il inhibe la cystéine 149 (supposée être le site réactionnel) par la formation d'une liaison covalente. Dans le cas de *T. brucei*, le composé se lierait sur le site du substrat ; cependant, la nature du complexe inhibiteur-enzyme n'est pas encore bien établie (Willson et al., 1994). L'acide koningique inhibe mieux la GAPDH des eucaryotes que celle des bactéries mais les raisons de cette différence restent à établir (Kato et al., 1992).

L'inhibition de ces antibiotiques serait due à la présence dans leurs structures respectives des fonctions époxydes et α -énone, considérées comme accepteurs de Michael.

Ces fonctions permettraient à ces inhibiteurs de se lier aux sites actifs de l'enzyme en formant des liaisons de covalence qui conduisent à une inhibition irréversible.



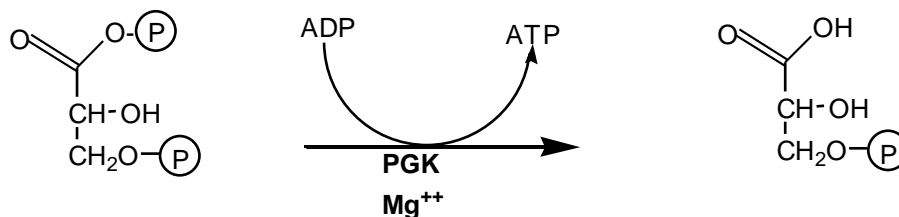
74



75

I.1.4.5.7. La phosphoglycérate kinase (PGK)

La Phosphoglycérate kinase est la 9^{ème} enzyme de la chaîne glycolytique qui catalyse la conversion du 1,3 diphosphoglycérate (1,3-diPG) en 3-phosphoglycérate (3-PG) de manière réversible. Cette catalyse se fait en présence d'une molécule d'ADP (Adénosine diphosphate) avec production d'une molécule d'ATP (Adénosine Triphosphate) suivant le schéma 9 ci-dessous. Cette réaction de phosphorylation requiert un cation, le Mg^{2+} .



Acide 1,3-bis-phosphate-glycerique

Acide 3-phosphoglycerique.

Schéma 9 : Transformation de l'acide 1,3-bis-phosphate-glycerique en acide 3-phosphoglycerique

L'anhydride mixte (ou acyl-phosphate) transfère son groupement phosphate à l'ADP pour former l'ATP grâce à la 3-phosphoglycérate kinase. Il s'agit là d'une phosphorylation de l'ADP en ATP couplée avec une oxydation.

La PGK de *T. brucei* intervient en créant un schunt qui génère l'ATP dans le cytosol, ce qui empêche la production importante d'ATP dans le glycosome. Cet ATP inhibe la première étape de consommation d'énergie de la glycolyse (Blattener et *al.*, 1998).

I.1.4.5.8. La pyruvate kinase

C'est la 12^e enzyme de la chaîne glycolytique. La pyruvate kinase (PyK) catalyse la conversion du phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate par addition d'un proton et synthèse d'une molécule d'adénosine triphosphate (Rose et Kuo, 1989).

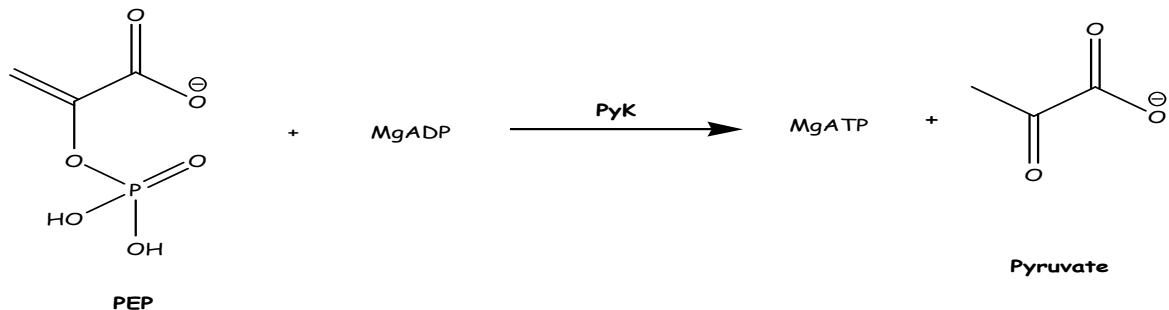


Schéma 10 : Equation réactionnelle impliquant la PyK

Les espèces du genre *Entada* et *Aframomum* sont utilisées en ethnopharmacologie dans le traitement des maladies parasitaires, infectueuses, virales..., d'où l'intérêt de notre étude (Cos et al., 2002; Erukainure, 2011).

I.2. Généralités sur les bactéries

Les bactéries sont des organismes cellulaires simples appelés Procaryotes qui ne contiennent pas de noyaux et qui sont d'habitude trouvées en très grand nombre parce qu'elles peuvent se multiplier rapidement. La bactérie *E. Coli* est un exemple d'une cellule bactérienne typique (Figure 8).

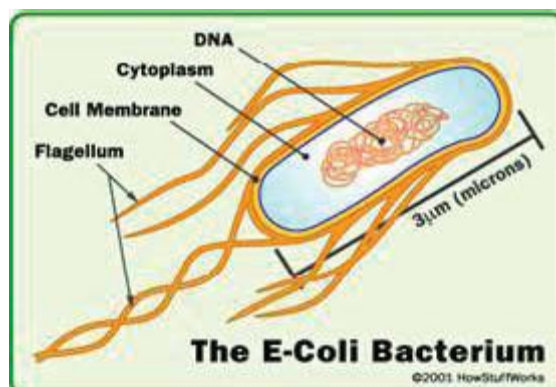


Figure 8: Bactérie *Escherichia coli* (escherichiocoli.fr), consulté le 10 Avril 2013.

Bien que les bactéries soient microscopiques, elles ont beaucoup de formes et tailles différentes. Les formes les plus communes sont les tiges, les cocci (circulaire) et la spirale. L'homme vit avec les bactéries de plusieurs manières : commensale (la bactérie est

avantagée alors que l'homme n'est ni lésé ni aidé), mutualiste (toutes les parties sont avantagées) ou parasitique (la bactérie porte atteinte ou vit aux dépens de l'hôte). Le commensalisme et le mutualisme sont contrôlés par l'immunité ; cependant, un déséquilibre peut survenir conduisant à l'infection. Les bactéries qui causent des maladies sont appelées bactéries pathogènes. Elles peuvent causer la maladie chez les hommes, les animaux ou les plantes. Parmi les bactéries pathogènes, nous pouvons citer : les bactéries pathogènes obligatoires qui causent toujours les maladies, et les bactéries pathogènes opportunistes habituellement peu pathogènes. Les bactéries opportunistes peuvent devenir pathogènes lors du déséquilibre de la flore normale de leur habitat (antibiothérapie), lors de l'affaiblissement des défenses immunitaires de l'hôte (immunodépression, âge...), ou lors de la migration dans un autre territoire (infection urinaire, endocardites).

I.2.1. Voies de pénétration des bactéries

Les bactéries ont plusieurs voies de pénétration dans l'organisme qui sont : digestives, génitales, respiratoires ou cutanées.

- Les bactéries digestives provoquent les diarrhées. Exemple : *Salmonella shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *E. coli*, *vibrio cholervibrio cholerae*.
- Les bactéries génitales provoquent des ulcérations génitales, des urétrites, des cervicites, etc... Exemple : *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamidia trachomatis*.
- Les bactéries respiratoires provoquent les diphtéries, des angines, des pneumonies, des méningites, des tuberculoses, etc.... Ces bactéries sont : *Corynebacterium*, *Diphtheriae*, *Streptococcus pneumonia*, *Mycobacterium tubercuelosis*.
- Les bactéries cutanées passent généralement par les peaux lésées et causent des furoncles, le tétanos, les impétigos, etc.... Exemple : *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*.

I.2.2. Bactéries multirésistantes (BMR)

Les bactéries sont dites multirésistantes aux antibiotiques lorsque, du fait de l'accumulation des résistances naturelles et / ou acquises, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapie (les BMR ne sont pas plus virulentes que les bactéries non-résistantes de la même espèce).

I.2.2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) est une bactérie qui compose 80 % de la flore intestinale, elle y est donc naturellement présente. Elle empêche d'autres souches de bactéries pathogènes (à

l'origine de maladies) de coloniser la flore intestinale et participe à la production de la vitamine k, qui aide à la coagulation sanguine. Si la plupart des souches de *E.coli* sont inoffensives, certaines sont pathogènes. Dans la plupart des cas, la transmission s'effectue par ingestion d'aliments souillés (boeuf crû ou insuffisamment cuit, fruits et légumes frais lors du lavage avec de l'eau contaminée, jus de fruits non pasteurisés ou lait cru). Les autres modes de transmission sont notamment des mains souillées portées à la bouche ou une eau de baignade contaminée par les égouts (ex : lac, rivière). Les pathologies généralement associées aux souches *E.Coli* pathogènes sont des infections urinaires, des diarrhées, des gastro-entérites, des méningites ou encore des septicémies (santé-médecine, 2014).

I.2.2.2. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) du genre ***Klebsiella*** (klebsielles), de la famille des entérobactéries, est l'espèce la plus fréquente des bactéries à Gram-négatif impliquée dans les cas de pneumonies nosocomiales (dont le taux de mortalité atteint souvent environ 50 %). *K. pneumoniae* est présente dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire des Hommes et des animaux en tant que bactéries commensales. *Klebsiella pneumoniae* détermine des infections respiratoires (pneumonies, abcès pulmonaires, pleurésies), intestinales et urinaires (Lawlor et *al.*, 2005).

I.2.2.3. *Enterobacter aerogenes*

Enterobacter aerogenes (*E. aerogenes*) est associée à des épidémies nosocomiales et est considérée comme pathogène opportuniste. La transmission se fait par contact direct ou indirect des surfaces muqueuses avec l'agent infectieux (ex. la bactérie peut être transmise par des mains contaminées dans les unités néonatales ou dans des urinoirs contaminés) ou dans le cas de la flore endogène, par le transfert à des régions du corps adjacentes prédisposées et stériles. Elles peuvent causer de nombreux types d'infections, y compris abcès cérébraux, pneumonie, méningite, septicémie et infection de plaies, infection des voies urinaires et de la cavité abdominale ou des intestins (Pagotto et *al.*, 2003; Hart, 2006).

I.2.2.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*), autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, bacille du pus bleu ou pyo, est une bactérie gram-négatif du genre *Pseudomonas*. Dans certaines conditions, elle peut être pathogène. Très résistante, elle est avec d'autres bactéries à gram-négatif de plus en plus responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint

50 % chez les patients vulnérables (immunodéprimés). Elle vit dans les sols et en milieu humide (nuages, robinets, bouchons) (Mans, 2008).

I.2.2.5. *Providencia stuartii*

Providencia stuartii (*P. stuartii*) est une bactérie gram-négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est une bactérie habituellement rencontrée dans le sol et dans l'eau. *P. stuartii* peut être responsable d'infections urinaires et autres infections chez l'homme (http://en.wikipedia.org/wiki/Providencia_stuartii, consulté le 12 octobre 2013).

L'émergence généralisée de la résistance bactérienne acquise aux antibiotiques est un grave problème de santé publique, non seulement sous la forme des épidémies, mais aussi sous la forme des pandémies. Cette résistance aux antibiotiques a conduit à l'apparition des superbactéries ou multi-drogues bactéries résistantes. De ce fait, l'attention est maintenant décalée vers des composants biologiquement actifs isolés d'espèces végétales couramment utilisées comme plantes médicinales, car ils peuvent offrir une nouvelle source de médicaments à activités antibactérienne, antifongique et antivirale (Djeussi et al., 2013).

I.3. Etudes antérieures sur les Mimosaceae et les Zingibéraceae

I.3.1. Etudes antérieures sur les Mimosaceae

I.3.1.1. Aperçu botanique sur les Mimosaceae

Ce groupe de Légumineuses tire son nom d'un de ses genres : le *Mimosa*. Il ne contient guère que des arbres, des arbustes et rarement des plantes herbacées. Elles sont abondamment représentées sous les climats à saison sèche (Aubreville, 1950). Leurs fleurs sont très petites et regroupées soit en boule sphérique soit en épiphyse (Berhaut, 1975). Les pétales sont valvaires, ordinairement soudés entre eux à la base. Elles sont jaunâtres, blanchâtres ou rosacées et le fruit est une gousse pouvant être déhiscente ou non.

I.3.1.2. Aperçu botanique sur le genre *Entada*

Le genre *Entada* est représenté par des arbustes à fût tortueux, noueux et rarement droit (Aubreville, 1950). Leurs fleurs sont en épis de couleur verdâtre ou jaunâtre. Elles sont solitaires ou fasciculées, supraaxillaires et situées à l'aisselle des feuilles terminales. Les fruits sont de grandes gousses plates, brunâtres, à forte suture et possédant des valves membranaires. Les feuilles présentent à la base des rachis secondaires une paire de minuscules appendices apiculés, placés à l'insertion de la première paire de folioles. Le rachis est régulièrement coudé au niveau de ses appendices (Aubreville, 1950).

I.3.1.3. Aperçu botanique sur *Entada abyssinica* et *Entada africana*, répartition géographique

Entada abyssinica est un arbuste de 2 à 5 m de hauteur qui peut, suivant les régions, atteindre 10 à 12 m de haut (Figure 9). Ses feuilles possèdent de petites et nombreuses folioles avec une nervure principale transversale (Abreville, 1950). Les fleurs, solitaires ou groupées en panicule, ont une longueur d'environ 2 mm, elles sont odorantes et de couleur blanc-crème devenant jaune. Les fruits sont des gousses de 15 à 39 cm de long et 5 à 7 cm de large, à sutures ondulées (Troupin, 1982). Cette plante se rencontre en Afrique occidentale, orientale et centrale (Olajide et Alada, 2001 ; Debella et *al.*, 2000 ; Aubreville, 1950). Au Cameroun, cette espèce se trouve dans les villes de Ngaoundéré, Banyo, Tibati, Betaré-Oya, Bertoua, Ngorin, Bamenda, Santa, Dschang, Yoko et Bangangté (Herbier National du Cameroun, Yaoundé).

Entada africana est un petit arbre de 4-5 m de haut à cime étroite et ouverte avec des écorces crevassées fibreuses de couleur gris-brun (Figure 10). Ses feuilles alternées sont bipennées (3 à 7 paires de pinnules). *Entada africana* a des fleurs en racèmes blanc crème ou jaunâtre. Les fruits sont des gousses aplaties de plus de 20 cm sur 5 cm de large et articulées, restant assez longtemps sur l'arbre. Les fruits sont renflés légèrement de chaque côté sur l'emplacement des graines. Chaque graine ovoïde tombe séparément en restant entourée du mésocarpe membraneux (Kerharo et Adam, 1974 ; Adjanohoun *et coll.*, 1981, Malgras, 1992).). Au Cameroun, cette espèce se trouve dans les régions du Nord, Extrême-Nord, Adamaoua et Ouest (Herbier National du Cameroun,



Figure 9 : *Entada abyssinica* (flickr.com), consulté le 10 Avril 2013.



Figure 10 : *Entada africana* (www.tanisiaina.com), consulté le 10 Avril 2013.

Les espèces du genre *Entada* sont utilisées en médecine traditionnelle et moderne, et elles constituent également un bien économique.

I.3.1.4. Quelques utilisations des espèces du genre *Entada*

- Valeur économique

L'écorce de *E. abyssinica* sert à la réalisation de liens et de cordages. La cendre du bois est utilisée dans la fabrication des savons et détergents aux Phillipines. La mousse obtenue après macération de la racine dans l'eau est consommée sous forme de boisson (Okada et al., 1987 ; Aubreville, 1950).

L'extrait de la graine de *E. africana* est utilisé comme poison de pêche (Bouquet et Debray, 1974). Ses écorces servent à faire de la tannerie (Berhaut, 1975).

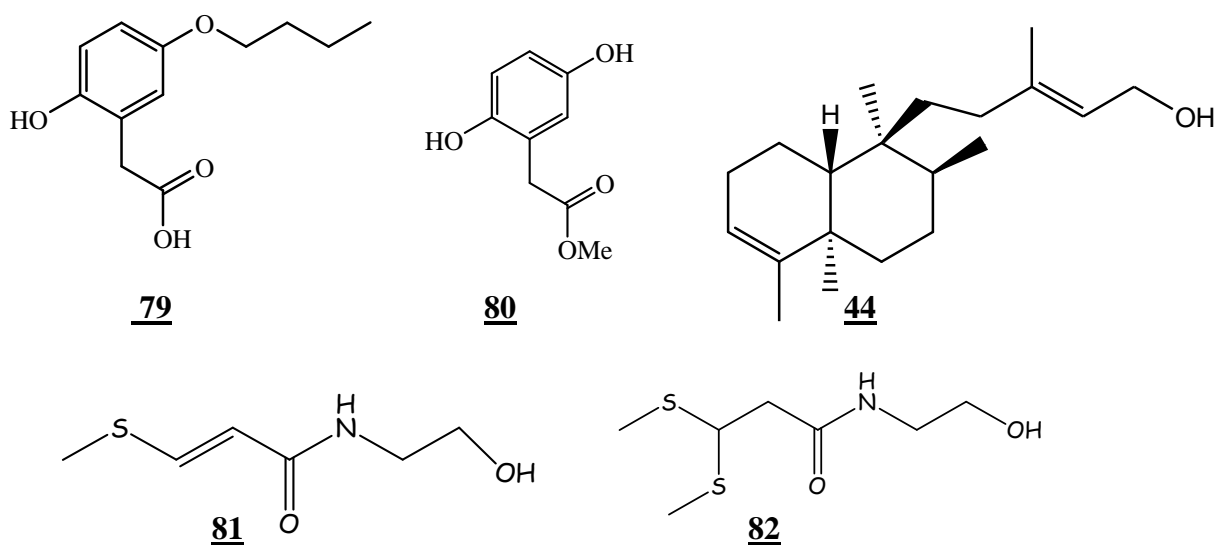
Le feuillage de *E. sudanica* est un bon fourrage pour le bétail. L'extrait des feuilles est également utilisé comme poison de pêche. On utilise les fibres provenant des écorces du tronc et des racines pour tresser les cordes (Berhaut, 1975).

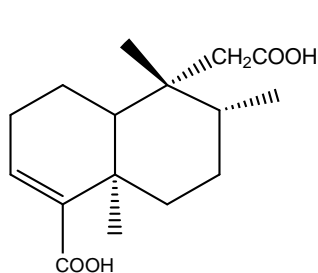
- Valeur thérapeutique

E. abyssinica est utilisée en médecine traditionnelle africaine pour traiter de nombreuses maladies, principalement la bronchite, la fièvre, la toux et les douleurs rhumatismales et abdominales. Cette plante est utilisée en instillation pour soigner les inflammations des yeux (Olajide et Alada, 2001 ; Cos et al., 2002). L'écorce de *E. abyssinica* consommée crue provoque des vomissements dans le but de réduire les effets induits par la morsure de serpent (Aubreville, 1950). Elle est utilisée en Ouganda par des tradi-praticiens pour soigner la maladie du sommeil (Freiburghaus et al., 1996). Les feuilles de *E. africana* donnent une infusion tonique et stomachique, elles empêchent aussi la suppuration des plaies (Diallo et al., 2001 ; Berhaut, 1975). On peut également utiliser son écorce comme abortif. La décoction de ses racines est donnée en boisson comme stimulant et reconstituant. La plante est employée comme contre-poison dans diverses intoxications grâce à ses propriétés émétiques (Berhaut, 1975). Les extraits des écorces de *E. africana* ont montré leurs activités anti-virale contre les virus des hépatite B et C (Galani et al., 2014). *E. phaseoloides* est utilisé en Indonésie pour ses propriétés émétiques et contre les maux d'estomac. Au Burma et en Chine, elle est respectivement utilisée comme fébrifuge et pour traiter les hémorroïdes (Dai et al., 1991). L'infusion des feuilles ou de l'écorce de *E. sudanica* est administrée aux patients comme tonique et stomachique. Les feuilles permettent de réaliser un bon pansement des blessures afin d'éviter leur suppuration. La sève de ses écorces est appliquée sur les plaies comme hémostatique, antiseptique et cicatrisant. En traitement interne, le macéré des écorces est

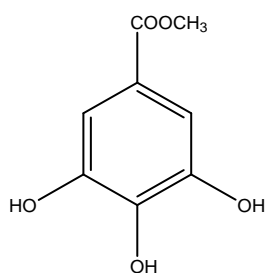
administré pour le traitement de la bronchite et de la toux et, en traitement externe, ce macéré est appliqué comme antiseptique sur les plaies. Pour traiter l'angine, on frotte le fond de la gorge à l'aide d'un bâtonnet sur lequel on a enroulé des lanières d'écorce puis, on boit une décoction d'écorce et on s'en gargarise. Le macéré des écorces du tronc est une boisson antiblennorragique et son extrait avec du natron naturel serait abortif (Berhaut, 1975). Quelques travaux effectués sur *E. abyssinica* montrent ses propriétés antifongique, antivirale, antibactérienne (Cos et al., 2002 ; Fabry et al., 1998) et anti-inflammatoire (Olajide et Alada, 2001).

Très peu d'études visant à évaluer une quelconque activité biologique ont été faites sur des composés isolés des espèces du genre *Entada*. Les travaux de Dai et al. (1991) présentent les résultats de l'étude de la cytotoxicité de l'acide 2-hydroxy-5-butoxyphénylacétique (**79**) et du méthylester de l'acide 2,5-dihydroxyphénylacétique (**80**) sur les cellules P-388 ($DE_{50}=1,0$ et $1,7 \mu\text{g/ml}$ respectivement). Les travaux de Freiburghaus et al. (1991) montrent que le Kolavenol (**44**) a une activité trypanocide intéressante : $IC_{50} = 2,5 \mu\text{g/ml}$ sur *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Les travaux de Ikegami et al. (1989) montrent que les entadamides A et B (**81** et **82**) ont une activité inhibitrice de la 5-lipogénase des cellules RBL-1 à 10^{-4} g/ml . L'acide (5S, 6R, 8aR)-5-(carboxyméthyl)-3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-octahydro-5, 6, 8a-triméthylnaphtalènecarboxylique (**83**), le 3, 4, 5-trihydroxybenzoate de méthyle (**84**), le benzène-1, 2, 3-triol (**85**) et le triacontanoate de 2, 3-dihydroxypropyle (**86**) présentent une activité antibactérienne ; les composés **84**, **85** et **86** présentent également une activité antioxydante (Teke et al., 2011). Les composés **83** et **84** présentent une activité antidiarrhéique (Teke et al., 2012).

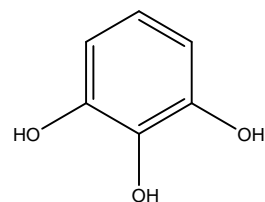




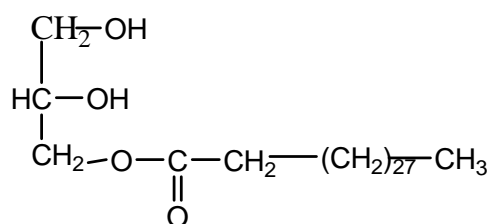
83



84



85

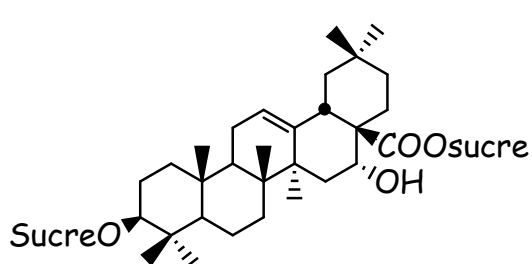


86

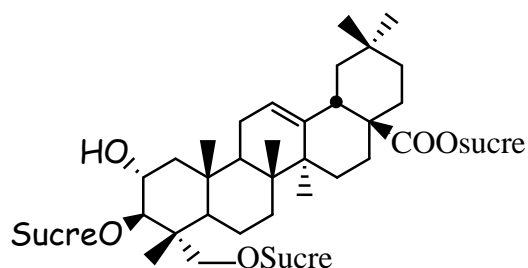
I.3.1.5. Travaux chimiques antérieurs effectués sur le genre *Entada*

Le genre *Entada* n'a pas suffisamment été étudié sur le plan chimique. Seuls quelques composés ont déjà été isolés des espèces de ce genre. La littérature en notre possession nous donne :

➤ Des saponines : entada-saponine III isolée de *E. phaseoloides* par Okada et al. (1987), cinq composés isolés de *E. pursaetha* par Tapondjou et al., (2005), neuf autres composés isolés de *E. africana* par cioffi et al., (2006), rheediinosides A et B isolés de *E. rheedii* par Nzowa et al., (2010), et des ginsenosides isolés de *E. leptostachya* par Kareru et al., (2008). Toutes ces structures ont pour squelette de base les structures **87** ou **88** ci après :

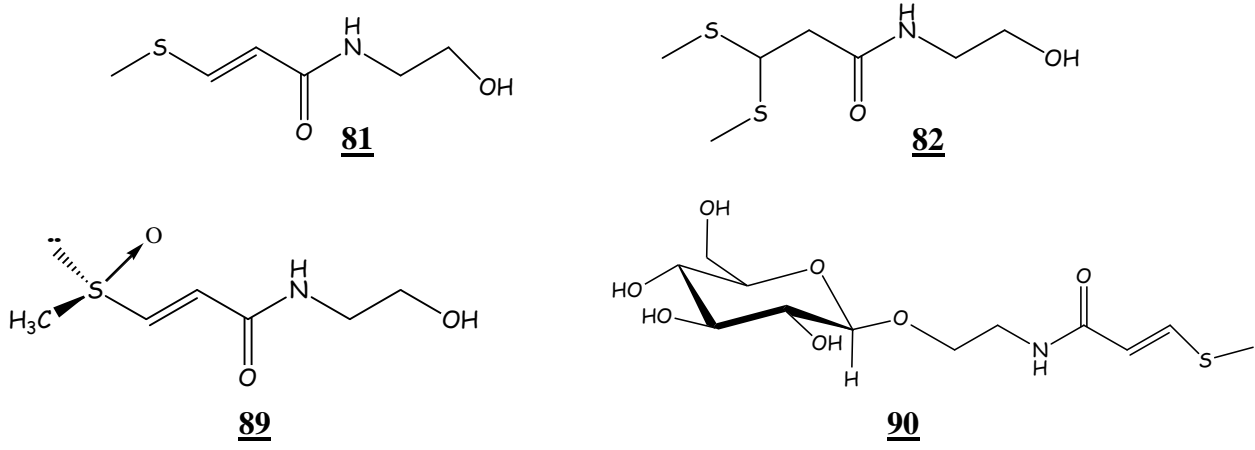


87

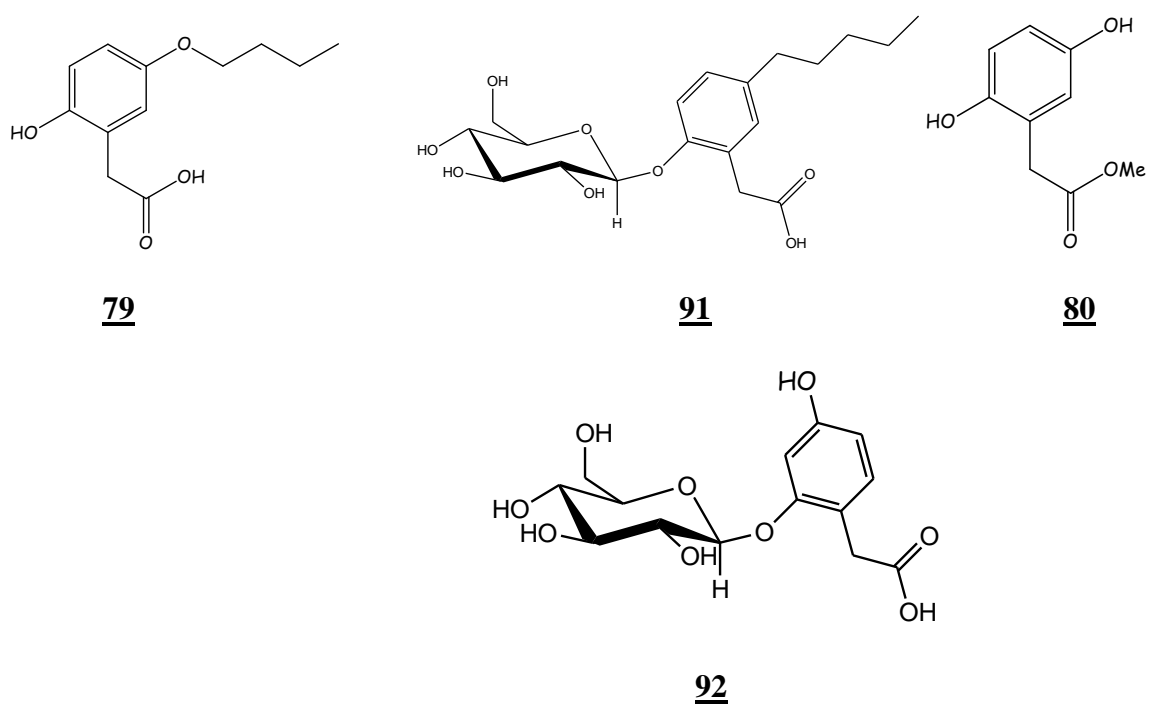


88

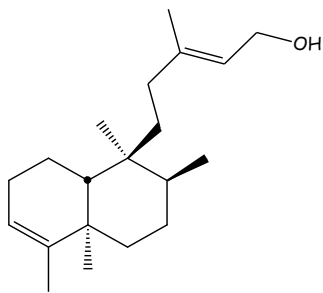
➤ Quatre amides soufrées : entadamide A (**81**), entadamide B (**82**), entadamide C (**89**) et entadamide A-β-D-glucopyranoside (**90**), tous isolés de *E. phaseoloides* (Ikegami et al., 1989 et 1987 ; Dai et al., 1991).



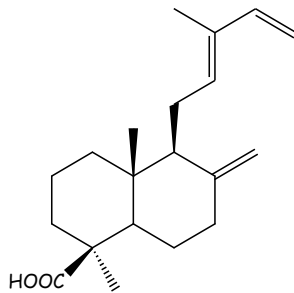
➤ Quatre dérivés de l'acide phénylacétique: l'acide 2-hydroxy-5-butoxyphénylacétique (**79**), la 2,5-dihydroxyphénylacétate de méthyle (**80**) et l'acide 2-β-D-glucopyranosyl-5-butoxyphénylacétique (**91**) isolés de *E. phaseoloides* par Dai et al. (1991), et le phaseoloidin (**92**) isolé de *E. phaseoloides* par Yuqiong D. et al., (2010). Plusieurs polysaccharides isolés de *E. africana* par Diallo et al. (2001) et Anderson et al. (1987).



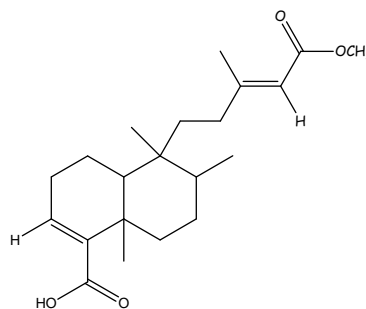
➤ Trois diterpènes : le kolavenol (**44**), l'acide trans-communiqué (**93**) et l'acide 15-méthylester kolavique (**94**) isolés de *E. abyssinica* (Freiburghaus et al., 1998 ; Debella et al., 2000 ; Nyasse et al., 2004).



44

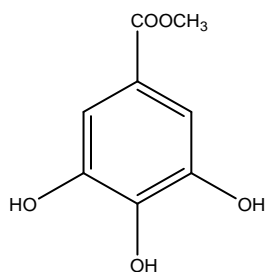


93

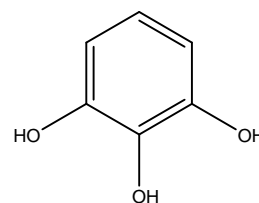


94

➤ Deux polyphénols : le 3, 4, 5-trihydroxybenzoate de méthyle (**84**), le benzène-1, 2, 3-triol (**85**) isolés de *Entada abyssinica* (Teke et al., 2011).

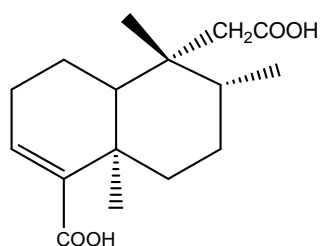


84



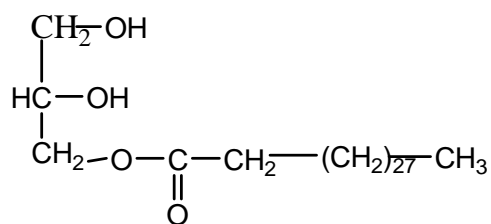
85

➤ Un dérivé du naphthalène, L'acide (5S, 6R, 8aR)-5-(carboxyméthyl)-3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-octahydro-5, 6, 8a-triméthylnaphthalèncarboxylique (**83**) obtenu de *Entada abyssinica* (Teke et al., 2011).



83

➤ Un ester d'acide gras, le triacontanoate de 2, 3-dihydroxypropyle (**86**) isolé de *Entada abyssinica* (Teke et al., 2011).



86

L'ensemble de ces travaux présente des structures ayant des activités biologiques inéressantes (Trypanocides, bactéricides...), d'où notre intérêt pour ce genre.

I.3.2. Etudes antérieures sur les Zingibéraceae

I.3.2.1. Aperçu botanique sur les Zingiberaceae

Les zingiberaceae sont constitués d'une cinquantaine de genres avec plus de 1000 espèces. Ce sont des plantes tropicales, principalement importantes en Asie tropicale et dans l'Archipel malais ; il n'y a que 6 genres en Afrique dont l'un, *Aframomum*, est propre au continent Africain. Au Cameroun, 5 genres sont indigènes: *Aframomum*, *Aulotandra*, *Costus*, *Kaempferia* et *Renalmia* ; 3 autres ont été introduits : *Phaeomeria*, comme plante ornementale, *Zingiber* et *Curcuma* comme plantes à condiments. Les zingiberaceae sont des herbes rhizomateuses terrestres, rarement épiphytes, dressées et souvent de grandes tailles, rarement rampantes ou acaules. Les tiges sont feuillées simples, souvent distinctes des tiges florifères. Ce sont des plantes souvent aromatiques. Les feuilles sont engaïnantes à la base, à gaine fendue ou ouverte. Les fleurs sont zygomorphes, parfois de grande taille, souvent vivement colorées, hermaphrodites. Les fruits sont capsulaires, à déhiscence loculicide plus ou moins nette, parfois charnus et à pulpe acidulée. Les graines sont de forme variables, arillées, arille entier ou découpé, souvent coloré (Koechlin, 1965).

I.3.2.2. Aperçu botanique sur le genre *Aframomum* et répartition géographique

Les *Aframomum* sont des herbes pérennes, généralement de grande taille, rhizomateuses, aromatiques lorsque l'on en écrase les différentes parties. Ce sont les plantes des sous-bois, rarement en savane et formant parfois des peuplements denses. Les tiges sont feuillées, pouvant atteindre plusieurs mètres de haut et portant vers le bas des gaines aphyllées, puis des feuilles distiques, le plus souvent subsessiles. Les inflorescences naissent à la base des tiges ou sur les rhizomes en épis simples ou capituliformes plus ou moins longuement pédonculés, ou en grappes d'épis unis ou pluriflores. Les fleurs sont grandes, fragiles, vivement colorées, le plus souvent en mauve ou en rouge, parfois en jaune ou en blanc. Les fruits sont en baie allongée, ovoïdes, généralement rouges et surmontés des restes persistants

du calice. Les graines sont nombreuses, souvent très aromatiques, enrobées dans une pulpe acidulée. Les graines de certaines espèces sont utilisées comme condiment. Il existe environ 40 espèces, toutes d'Afrique intertropicale, dont une vingtaine au Cameroun (Koechlin, 1965).

Ces 40 espèces sont réparties en quatre variétés d'*Aframomum* au Cameroun. La forme et le goût déterminent la différence entre les uns et les autres (Lekane, Yaoundé I). C'est ainsi que l'on distingue :

- la première variété qui présente à maturité les fruits de couleur rouge, une forme arrondie et une taille supérieure aux autres. Cette variété présente à l'intérieur de son péricarde, une mousse blanche mélangée aux petites graines noires ayant un goût sucré ;
- la deuxième variété a des fruits de couleur marron, avec une forme arrondie et une taille plus petite par rapport à la première variété. Les graines de cette variété sont noires et ont une taille plus grande que celle de la première variété ;
- la troisième variété a aussi des fruits de couleur marron et la taille de son péricarde est petite. Les graines des fruits sont marron ayant cependant une saveur piquante (goût pimenté) ;
- la dernière variété présente à maturité des fruits de couleur marron, en forme de bâtonnet ou de croissant, de longueur variable.



Figure 11 : *Aframomum melegueta*: fruits frais et secs, tiges (gernot-katzers-spice-pages.com)



Figure 12 : *Aframomum daniellii*: fruits verts et matures, fleurs (prota4u.info)

I.3.2.3. Quelques utilisations des espèces du genre *Aframomum*

- Valeur culinaire

A. daniellii et *A. sulcatum* sont utilisés comme ingrédients dans la préparation de la sauce jaune (NAH-POH) chez les bamiléés. *A. citratum* et *A. sulcatum* sont utilisés comme épices dans la sauce du MBÔNGÔ chez les Bassa (Noumi, 1987). *A. tsa-ko* Crevost est utilisé en Asie comme condiment (Starkenman et al, 2007).

- Valeur thérapeutique

A. melegueta (rocoe) K. Schum. est utilisé dans la lutte contre la faiblesse sexuelle, l'impuissance érectile ainsi que pour stimuler l'appétit sexuel (Noumi et al, 1998; Betti, 2002 ; Noumi, 1987 ; Noumi, 2004). Les extraits des graines de *A. melegueta* sont utilisés pour le traitement des maladies infectieuses; ils sont également antifongiques, antimicrobiens, et antibiotiques (Doherty, 2010; Okigbo, 2006; Enti, 1988). Les graines de *A. melegueta* sont mâchées pour soigner la dysenterie; elles sont utilisées comme sédatif pour les douleurs dentaires, préventif de la migraine, curatif de la fièvre et dans le traitement du diabète (Neboja, 2010). Ces graines sont également utilisées comme pesticides naturels (Escoubas, 1995). Elles possèdent une activité membrano-stabilisante empêchant la lyse des cellules rouges (Umokoro, 2008). Les extraits aqueux des graines de *A. melegueta* ont un potentiel anti-stress. Les rhizomes de *A. melegueta* sont également utilisés dans le traitement de la dysenterie et de la diarrhée (Dokossi, 1998; Umukoro, 2005). Les extraits des feuilles de *A. melegueta* ont une activité antifongique (Okigbo, 2006).

Les graines de *A. corrorima* (braun) sont utilisées contre les convulsions toniques, les maux de tête et d'estomac. Elles ont des propriétés carminatives et purgatives (Eyob, 2008).

Les graines de *A. daniellii* ont une activité anti-oxydante (Fasoyiro, 2006); leurs racines sont purgatives. Les graines de *A. daniellii* auraient un effet facilitateur de la déglutition chez les serpents (Kimbu et al., 1979; Kimbu et al., 1987); ces graines sont également utilisées comme anti-inflammatoires (Odukoya et al., 1999).

Les extraits des rhizomes de *A. sceptrum* sont utilisés dans le traitement d'infections à *Trypanosoma spp.* Ces extraits ont montrés également une activité intéressante sur *Trypanosoma brucei* (champy et roblo). Les fruits de *A. sceptrum* ont des activités antioxydantes (Erukainure, 2011).

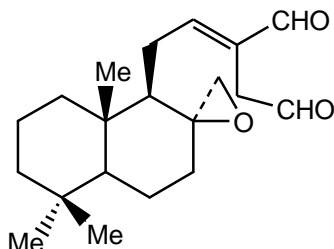
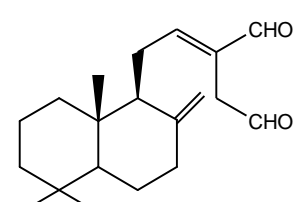
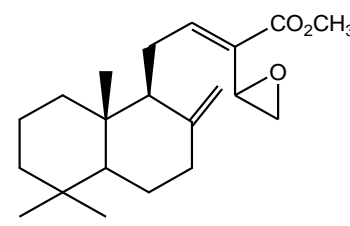
Les populations des grassfields et sawa du sud Cameroun utilisent les fruits des *Aframomum* dans les rites d'initiation dans les sociétés secrètes, d'intronisation des chefs traditionnels, d'anoblissement et de succession. Elles les utilisent également lors des cérémonies de valorisation des jumeaux (Lekane, 2009).

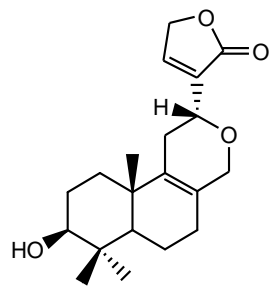
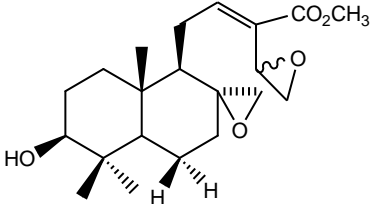
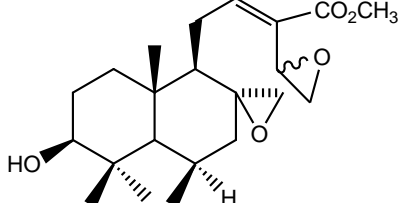
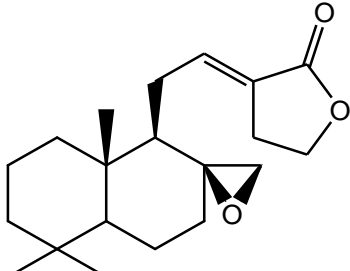
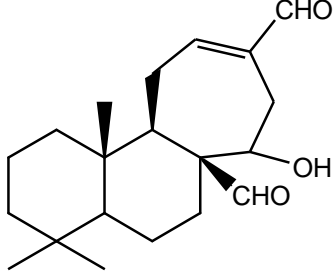
I.3.2.4. Métabolites secondaires isolés du genre *Aframomum* et activités biologiques

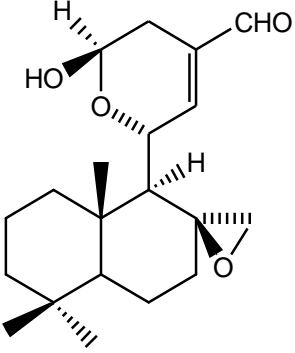
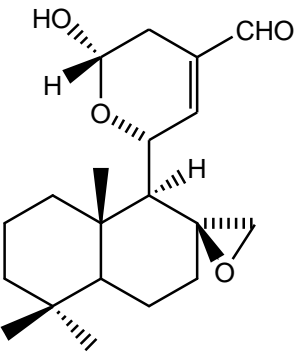
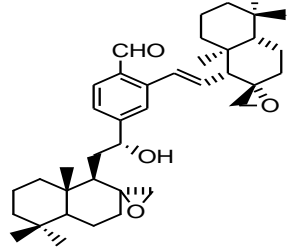
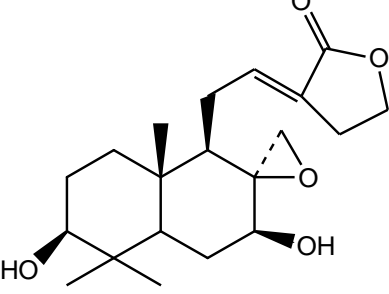
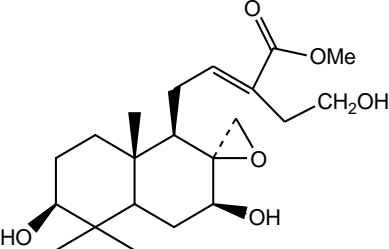
* Classe des diterpènes

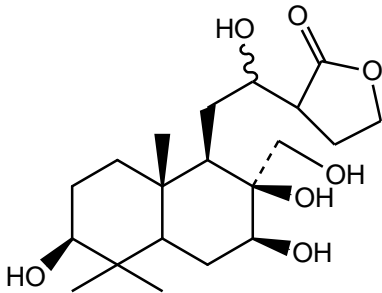
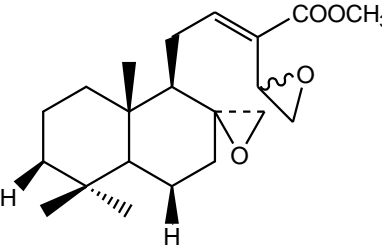
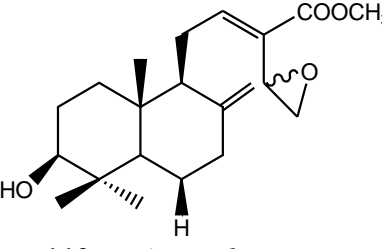
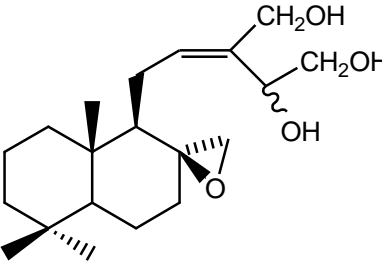
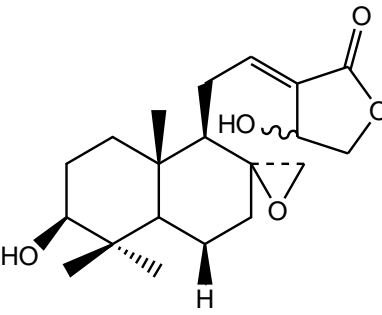
Les différents diterpènes isolés du genre *Aframomum* sont présentés dans le tableau 1.

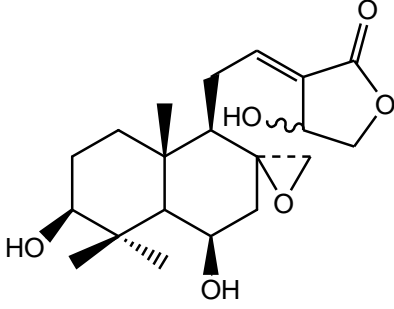
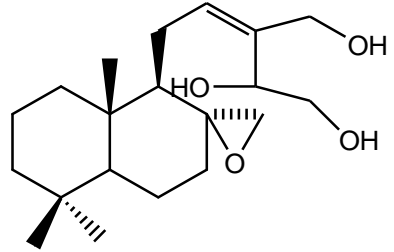
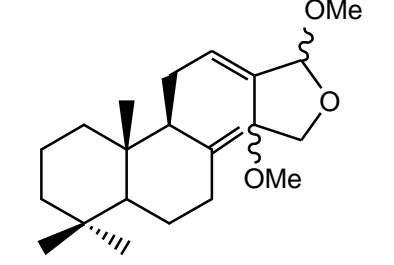
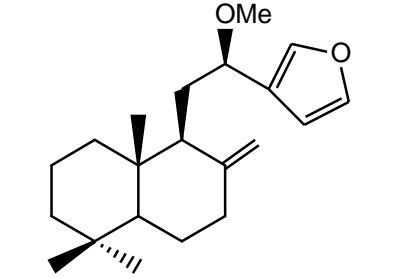
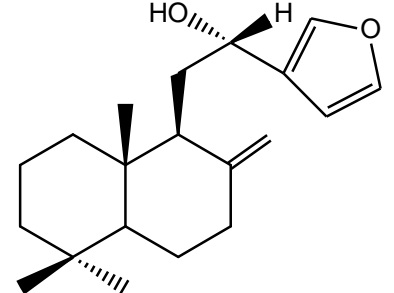
Tableau I : Diterpènes isolés des *Aframomum*

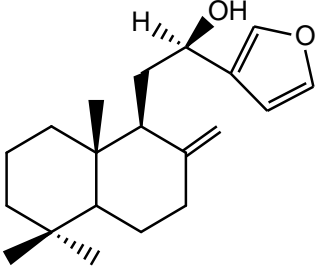
Noms	Structures	Activités biologiques	Références
(E)-8β,17-époxyabda-12-ène-15,16-dial (afromodial)	 <p>95 <i>A. daniellii</i> <i>A. alboviolaceum</i> <i>A. zambesiaceum</i> <i>A. arundinaceum</i></p>	Antimicrobienne Antifongique Inhibiteur du HMG-CoA réductase Cytotoxique Antileucémique	Kimbu et al. (1979). Kimbu et al. (1987). Tanabe et al. (1993). Marlier et al. (1993). Ayafor et al. (1994). Nyasse et al. (2000). Kenmogne et al. (2006). Wabo et al. (2006).
8(17),12E-labdadiène-15,16-dial	 <p>96 <i>A. daniellii</i> <i>A. alboviolaceum</i></p>		Kimbu et al. (1987). Marlier et al. (1993).
Méthyl14 ζ,15-époxy8(17),12 E-labdadiène-16-oate	 <p>97 <i>A. daniellii</i> <i>A. arundinaceum</i></p>		Kimbu et al. (1987). Wabo et al. (2006).

<p>12α,17-époxy-3β-hydroxy-8(9),13-labdadien-16,15-olide (aulacocarpinolide)</p>	 <p>98 <i>A. aulacocarpos</i></p>		<p>Ayafor et al. (1994).</p>
<p>Methyl3β-hydroxy-8β,17 :14,15-diepoxy-12 E-labden-16-oate (aulacocarpin A)</p>	 <p>99 <i>A. aulacocarpos</i> <i>A. escapum</i></p>		<p>Ayafor et al. (1994). Ayimele et al. (2004). Kenmogne et al. (2006).</p>
<p>Methyl3β,6β-dihydroxy-8β,17 :14,15-diépoxy-12E-labden-16-oate (aulacocarpin B)</p>	 <p>100 <i>A. aulacocarpos</i> <i>A. escapum</i></p>		<p>Ayafor et al. (1994). Ayimele et al. (2004). Kenmogne et al. (2006).</p>
<p>Galanolactone</p>	 <p>101 <i>A. daniellii</i> <i>A. zambesiicum</i> <i>A. arundinaceum</i></p>		<p>Nyasse et al. (2000). Kenmogne et al. (2006). Wabo et al. (2006).</p>
<p>Galanal B</p>	 <p>102 <i>A. daniellii</i></p>		<p>Nyasse et al. (2000).</p>

<p>8β,17-époxy-11,15-époxy-15-hydroxy-12-labden-16-al</p>	 <p>103 <i>A. sulcatum</i></p>		<p>Tsopmo et al. (2002).</p>
<p>8β,17-époxy-11,15-époxy-15-hydroxy-12-labden-16-al</p>	 <p>104 <i>A. sulcatum</i></p>		<p>Tsopmo et al. (2002).</p>
<p>Sulcanal</p>	 <p>105 <i>A. sulcatum</i></p>		<p>Tsopmo et al. (2002).</p>
<p>8β,17-époxy-3β, 7β-dihydroxy-12(E) – labden-16,15-olide</p>	 <p>106 <i>A. sceptrum</i></p>		<p>Tomla et al. (2002).</p>
<p>Methyl8β,17-époxy-3β,7β,15-trihydroxy-12(E)-labden-16-oate</p>	 <p>107 <i>A. sceptrum</i></p>		<p>Tomla et al. (2002).</p>

<p>3β, 7β, 8β, 12ζ, 17-pentahydroxylabdan-15,16-olide</p>	 <p>108 <i>A. sceptrum</i></p>		<p>Tomla et al. (2002).</p>
<p>3-deoxyaulacocarpin</p>	 <p>109 <i>A. zambesiicum</i></p>	<p>Antiplasmodiale</p>	<p>Kenmogne et al. (2006).</p>
<p>Methyl-14ζ,15-époxy-3β-hydroxy-8(17),12E-labdadien-16-oate</p>	 <p>110 <i>A. zambesiicum</i></p>		<p>Kenmogne et al. (2006).</p>
<p>8β,17-epoxy-12E-labdene-14ζ,15,16-triol</p>	 <p>111 <i>A. zambesiicum</i></p>		<p>Kenmogne et al. (2006).</p>
<p>Zambesiacolactone A</p>	 <p>112 <i>A. zambesiicum</i></p>		<p>Kenmogne et al. (2006).</p>

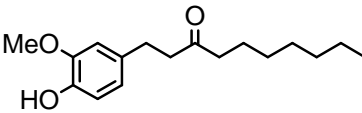
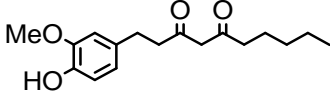
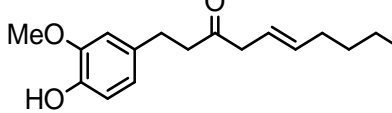
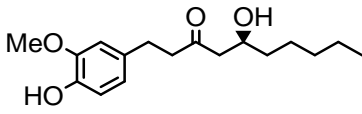
Zambesiacolactone B	 113 <i>A. zambesiacum</i>		Kenmogne et al. (2006).
Aulacocarpin C	 114 <i>A. aulacocarpos</i>	Trypanocide	Sob et al. (2007).
Aulacocarpin D	 115 <i>A. aulacocarpos</i>		Sob et al. (2007).
15,16-epoxy-12β- methoxylabda-8(17)- 13(16),14-triene	 116 <i>A. aulacocarpos</i>		Sob et al. (2007).
15,16-epoxy-12α- hydroxylabda-8(17)- 13(16),14-triene	 117 <i>A. aulacocarpos</i>		Sob et al. (2007).

<p>15 16 epoxy-12β-hydroxylabda-8(17)-13(16),14-triène</p>	 <p>118 <i>A. aulacocarpos</i></p>		<p>Sob et al. (2007).</p>
---	--	--	---------------------------

*** Classe des aryldécانونes**

Les différents aryldécانونes isolés du genre *Aframomum* sont présentés dans le tableau 2.

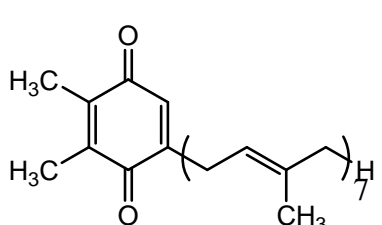
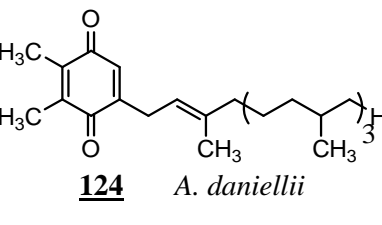
Tableau II : Aryldécانونes isolés des *Aframomum*

Noms	Structures	Activités biologiques	Références
<p>1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)decan-3-one ([6]-paradol)</p>	 <p>119 <i>A. melegueta</i></p>	<p>Anti-apétante Antiinflammatoires</p>	<p>Escoubas et al. (1995). Nebojsa et al. (2010).</p>
<p>5-oxo-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)decan-3-one (gingerdione)</p>	 <p>120 <i>A. melegueta</i></p>	<p>Anti-apétante</p>	<p>Escoubas et al. (1995).</p>
<p>1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)dec-5-en-3-one ([6]-shogaol)</p>	 <p>121 <i>A. melegueta</i></p>	<p>Anti-apétante Antiinflammatoires</p>	<p>Escoubas et al. (1995). Nebojsa et al. (2010).</p>
<p>5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)decan-3-one ([6]-gingerol)</p>	 <p>122 <i>A. melegueta</i></p>	<p>Anti-apétante Antiinflammatoires</p>	<p>Escoubas et al. (1995). Nebojsa et al. (2010).</p>

*** Classe des quinones**

Les différentes quinones isolées du genre *Aframomum* sont présentés dans le tableau 3.

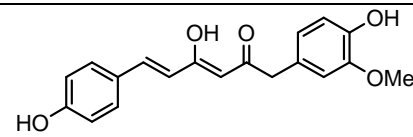
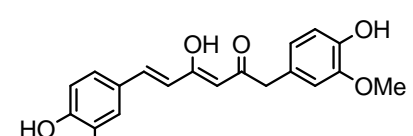
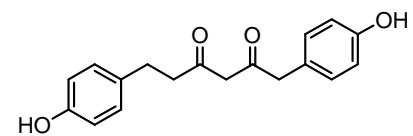
Tableau III : Quinones isolés des *Aframomum*

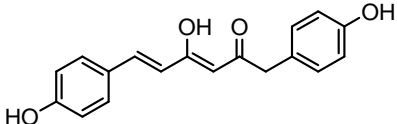
Noms	Structures	Activités biologiques	Références
Plastoquinone-7	 <p>123 <i>A. daniellii</i></p>	Anti inflammatoire	Odukoya et al. (1999).
phytylplatoquinone	 <p>124 <i>A. daniellii</i></p>	Anti inflammatoire	Odukoya et al. (1999).

*** Classe des diarylheptanoïdes**

Les différents diarylheptanoïdes isolés du genre *Aframomum* sont présentés dans le tableau 4.

Tableau IV: Diarylheptanoïdes isolés des *Aframomum*

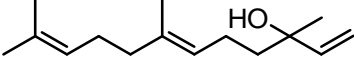
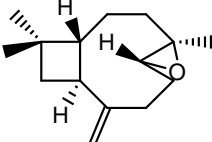
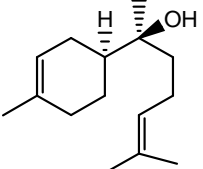
Noms	Structures	Activités biologiques	Références
Letestuianin A	 <p>125 <i>A. letestuianum</i></p>	Antitrypanosomale	Kamnaing et al. (2003).
Letestuianin B	 <p>126 <i>A. letestuianum</i></p>	Antitrypanosomale	Kamnaing et al. (2003).
Letestuianin C	 <p>127 <i>A. letestuianum</i></p>	Antitrypanosomale	Kamnaing et al. (2003).

(4Z,6E)-5-hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)hepta-4,6-dien-3-one	 <p>128 <i>A. letestuianum</i></p>	Antitrypanosomale	Kamnaing et al. (2003).
--	--	-------------------	-------------------------

*** Classe des sesquiterpènes**

Les différents sesquiterpènes isolés du genre *Aframomum* sont présentés dans le tableau 5.

Tableau V : Sesquiterpènes isolés des *Aframomum*

Noms	Structures	Activités biologiques	Références
nerolidol	 <p>129 <i>A. escapum</i> <i>A. zambesiaceum</i></p>		Kenmogne et al. (2006).
6,7-epoxy-3(15) caryophyllene	 <p>130 <i>A. arundinaceum</i></p>		Wabo et al. (2006).
(-)- α -bisabolol	 <p>131 <i>A. arundinaceum</i></p>		Wabo et al. (2006).

CHAPITRE II :RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. Etude de *Entada abyssinica*

II.1.1. Extraction et isolement des produits de *Entada abyssinica*

Les écorces du tronc de *E. abyssinica* récoltées à Dschang (région de l'Ouest, Cameroun) en décembre 2001, découpées en petits morceaux, séchées et pulvérisées, ont donné 6227g de poudre. 5000g de cette poudre ont été macérés à froid dans du dichlorométhane. La solution obtenue, évaporée sous pression réduite à 45°C, a fourni 91g d'extrait brut. La partition de cet extrait à l'hexane a donné 73g d'extrait hexanique. Des chromatographies successives effectuées sur l'extrait à l'hexane nous ont permis d'isoler deux composés purs dont un nouveau : le 15-méthylester de l'acide kolavique (**94**) et le β -sitostérol (**132**) ; et un mélange de dix acides gras saturés (**133-142**).

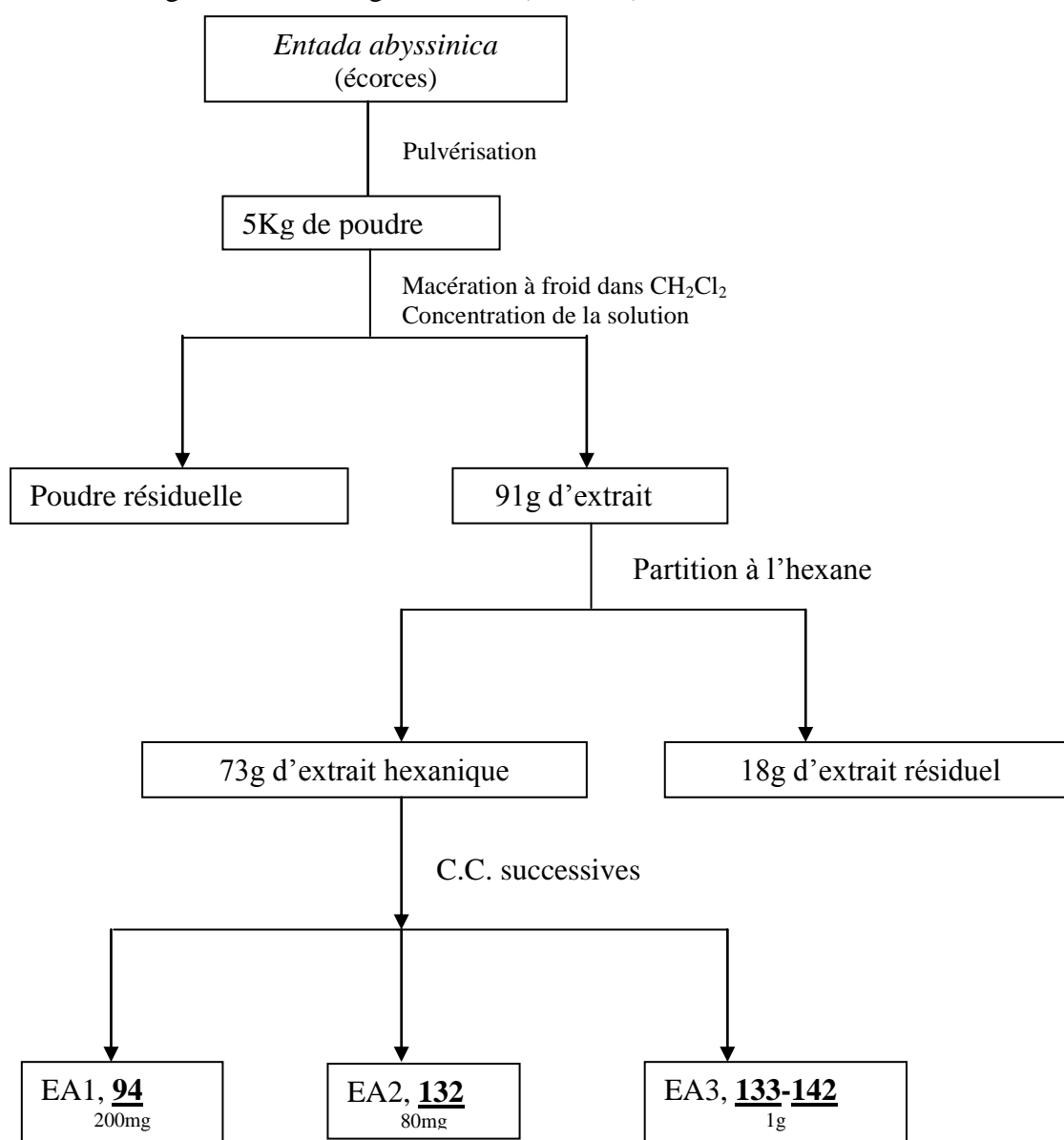


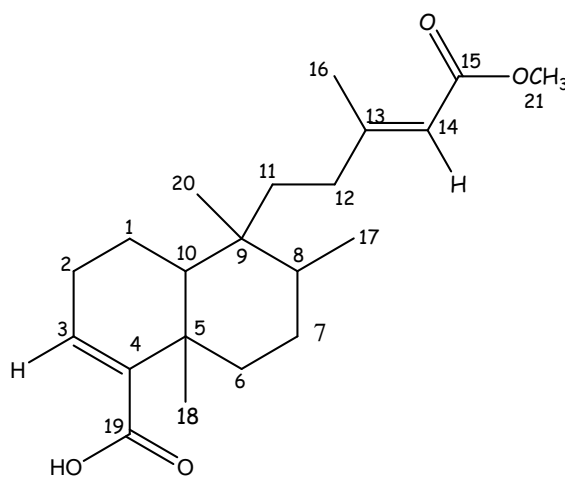
Schéma 11: Protocole d'extraction et d'isolement des produits de *Entada abyssinica*

II.1.2. Caractérisation des composés isolés

II.1.2.1. Caractérisation du composé EA1

Le composé **EA1** est un solide qui cristallise sous forme de paillettes blanches. Il est soluble dans le dichlorométhane et fond entre 162 et 163°C. Il réagit négativement aux tests caractéristiques des triterpènes, stérols, flavonoïdes et alcaloïdes, et décolore l'eau de brome ; ce qui suggère la présence de liaisons multiples (double ou triple liaison C-C).

L'analyse des spectres 1D et 2D (RMN¹³C, RMN-¹H, APT, DEPT, HMBC) nous ont permis d'identifier ce composé comme étant un dérivé de l'acide kolavique, son dérivé 15-méthylester (**94**) tel que décrit dans notre publication de pharmacie (B. Nyasse, I. Ngantchou, E.M. Tchana, B. Sonke, C. Denier et C. Fontaine).



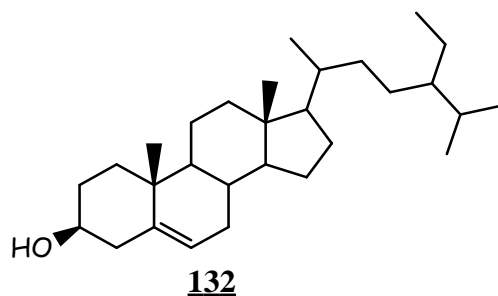
**94: Acide cléroda-15-méthylcarboxylate-3,13-diène-19-oïque
ou Acide 15-méthylester kolavique**

Tableau VI : Données spectroscopiques de RMN ¹³C et RMN ¹H du composé EA1

N°Carbone	δ- ¹³ C (ppm)	δ- ¹ H (ppm)	HMBC (N° de carbone)	NOESY (δ- ¹ H, ppm)
1	17,4			
2	27,8	2,30 et 2,15		2,15 et 2,30
3	140,3	6,80	1, 2, 4, 6, 18	
4	142,1	/		
5	38,0	/		
6	38,1			
7	25,8	1,40		
8	35,3	1,60		0,93 et 1,6
9	37,9	/		
10	45,5	1,45		1,45 et 2,20
11	29,6	2,20		
12	34,7	2,08		
13	162,0	/		
14	115,2	5,68	12, 14	2,18 et 3,68
15	167,6	/		
16	21,7	2,18 Me	12, 13, 14, 15	
17	15,1	0,93 Me	7	5,68
18	19,6	0,95 Me		
19	172,8	/	6, 8, 10	
20	20,7	1,30 Me	4, 6, 10, 11	
21	51,2	3,69 OMe	14, 15	

II.1.2.2. Caractérisation du composé EA2

Le composé **EA2** se présente sous forme de cristaux blancs. Il est soluble dans le chlorure de méthylène et fond entre 137.5 et 139.0°C. Il réagit négativement aux tests caractéristiques des flavonoïdes et des alcaloïdes. Il répond positivement au test de Libermann Buchard et donne une coloration bleue caractéristique des stérols. Il décolore l'eau de brome, ce qui suggère la présence de liaisons éthyléniques. Il a été identifié au β-sitostérol grâce à une comparaison par CCM avec un échantillon présent dans notre laboratoire ; en effet, le composé **EA2** et le β-sitostérol (**132**) ont le même rapport frontal.



II.1.2.3. Caractérisation du composé EA3

Le composé **EA3** se présente sous forme de poudre blanche. Il est soluble dans le chlorure de méthylène et fond entre 79.8 et 80.3°C. Il réagit négativement aux tests

caractéristiques des triterpènes, stérols, flavonoïdes et des alcaloïdes. Les analyses RMN nous révèlent que le composé **EA3** est un mélange d'acides gras saturés. Son identification a été faite en estérifiant le mélange afin d'obtenir le mélange d'esters méthylés correspondant par le diazométhane dans l'éther. L'ensemble a ensuite été analysé par le couplage de la chromatographie en phase gazeuse (GC) et de la spectroscopie de masse (MS). Le mélange de composés est d'abord séparé par chromatographie puis chaque composé est identifié grâce aux fragments qu'il génère dans le spectre de masse.

Sur le spectre proton (Figure 13), on observe le signal d'un méthyle qui apparaît sous forme de triplet dans les champs forts à 0.88 ppm, ce qui signifie que ce méthyle terminal couple avec un méthylène. Sur ce même spectre, on observe un triplet à 2.34 ppm, un multiplet à 1.63 ppm et un grand pic correspondant à plusieurs méthylènes. Ces informations laissent supposer que nous avons soit un acide gras, soit un alcool gras.

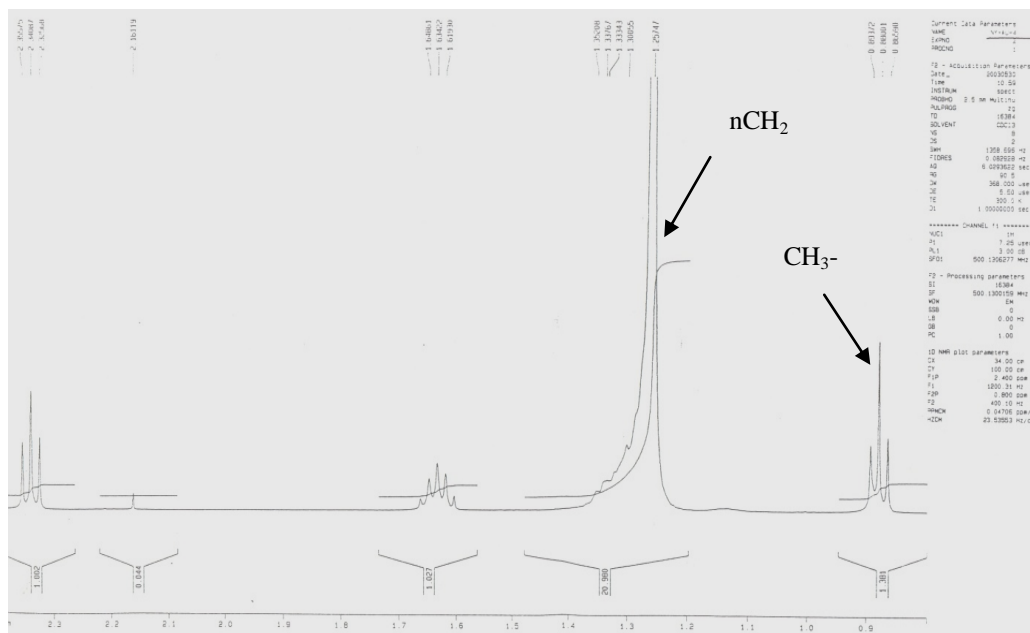


Figure 13: Spectre ^1H du composé EA3

L'analyse du spectre carbone (Figure 14) nous révèle la présence d'un carbonyle des acides à 179 ppm et d'un méthyle à 14.1 ppm, ce qui confirme que notre composé est bel et bien un acide gras. Sur le spectre DEPT (Figure 15), on constate qu'en dehors du carbonyle des acides et du méthyle terminal, tous les autres carbones sont des méthylènes.

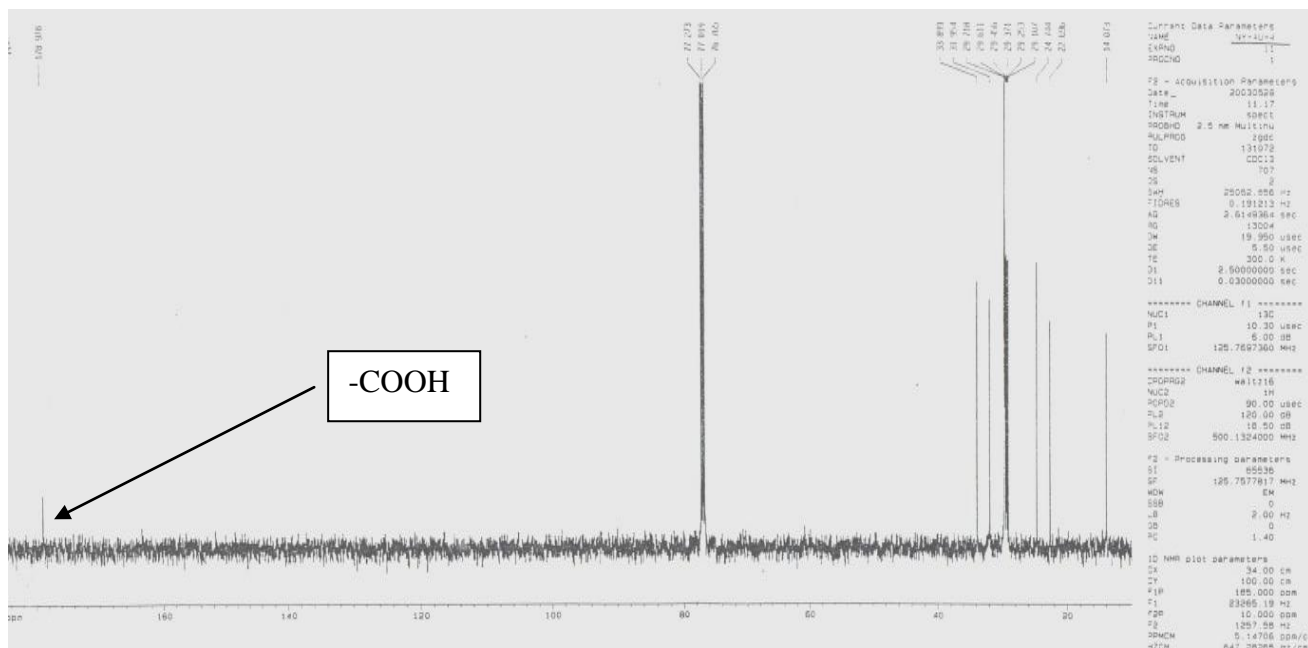


Figure 14: Spectre ^{13}C du composé EA3

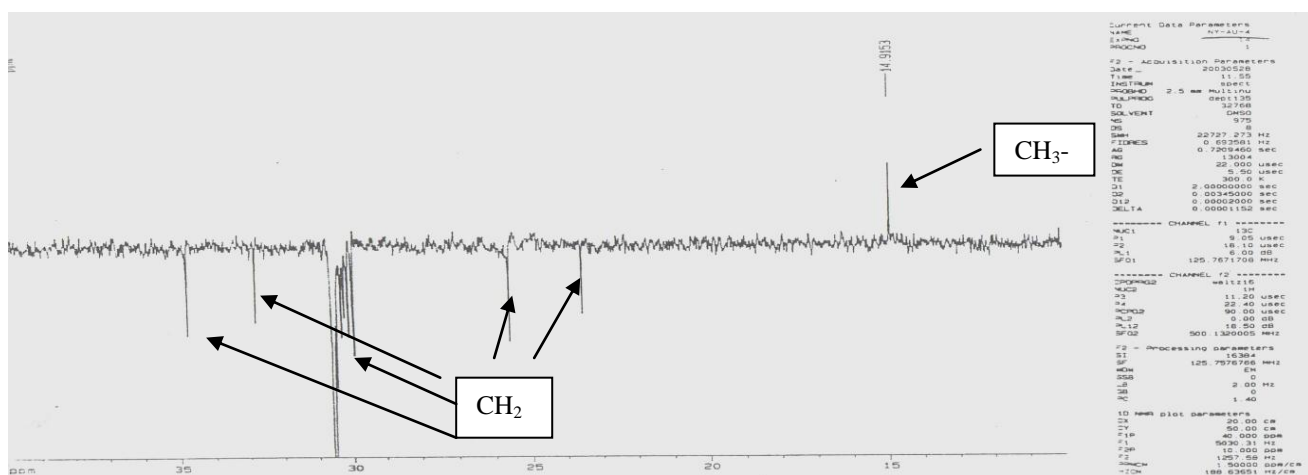
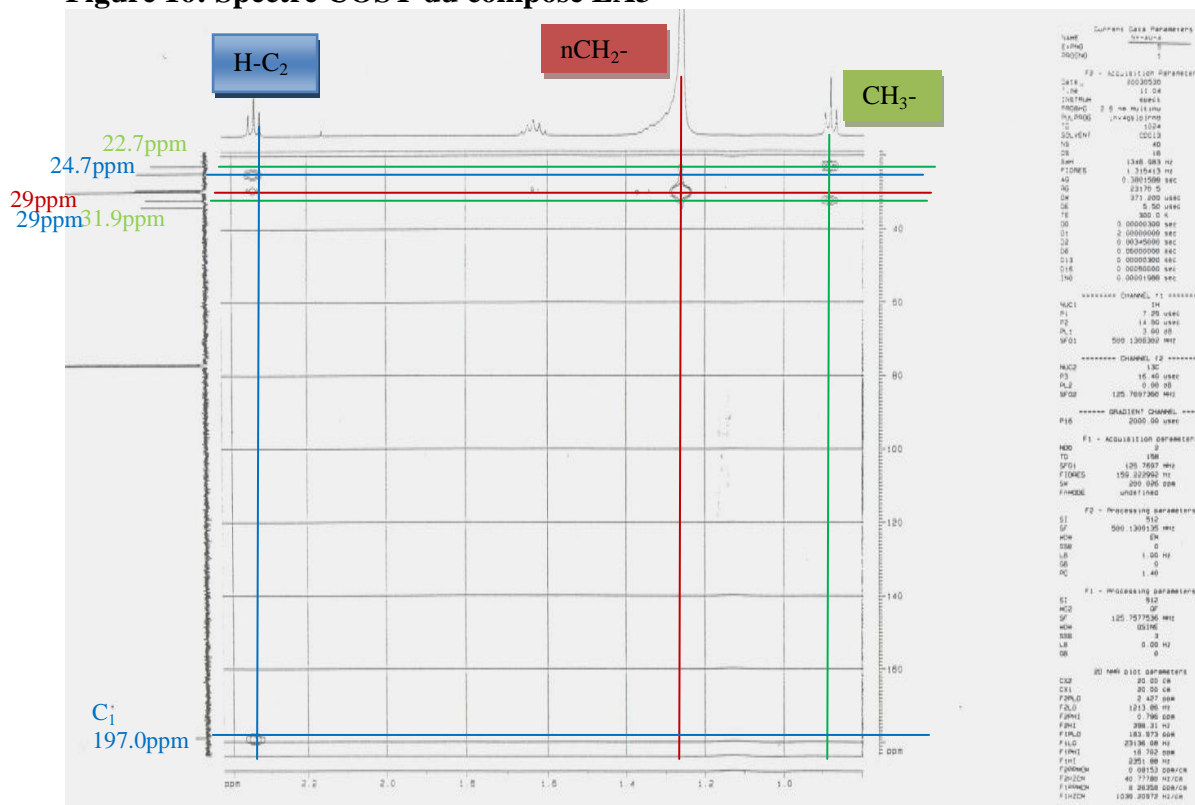
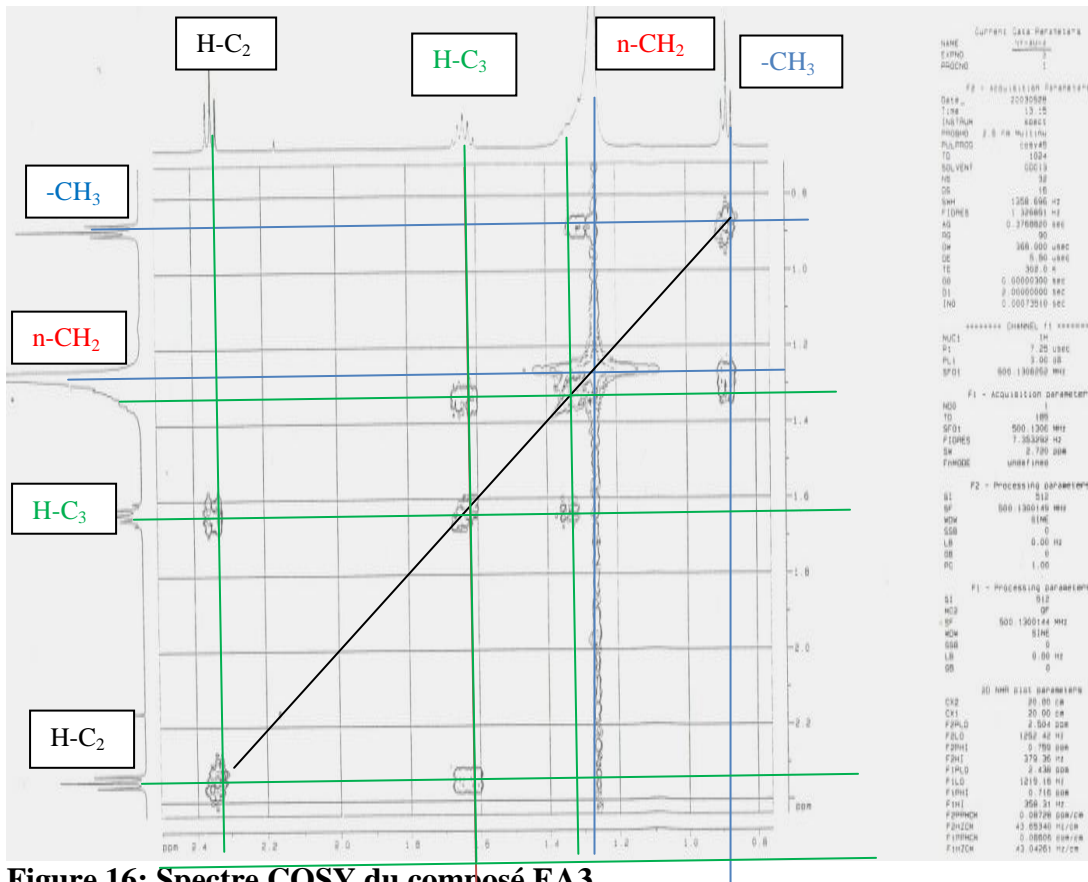


Figure 15: Spectre DEPT du composé EA3

Les informations ci-dessus sont corroborées par les spectres COSY et HMBC. Sur le spectre COSY (Figure 16), on observe des corrélations entre les protons du méthyle et les protons du grand pic de méthylène. De même, on observe des corrélations entre les protons du méthylène C₃ avec ceux du méthylène C₂ et du grand pic de méthylène.

Sur le spectre HMBC (Figure 17), on observe des taches de corrélation des protons du méthyle avec les méthylènes résonnant à 22.7 ppm et à 31.9 ppm. Nous avons également des taches de corrélation entre les protons du carbone C₂ et le carbonyle des acides d'une part, et

entre les protons du même carbone C₂ et les méthylènes résonant à 24.7 ppm et 29 ppm d'autre part.



Sur le spectre de masse (Figure 18) on voit le pic de l'ion moléculaire à m/z 326, compatible avec la formule $C_{21}H_{42}O_2$. On observe également le pic de base à m/z 74, pic caractéristique des acides gras non ramifiés en α . Parmi les ions fragments, nous avons des ions de formule générale $C_nH_{2n-1}O_2^+$ tels que $C_{18}H_{35}O_2^+$, $C_8H_{15}O_2^+$, $C_7H_{13}O_2^+$ qui sont obtenus suivant le schéma 12. Les ions de formule générale $C_nH_{2n}O_2^+$ proviennent des ruptures simultanées des liaisons C-C et ester.

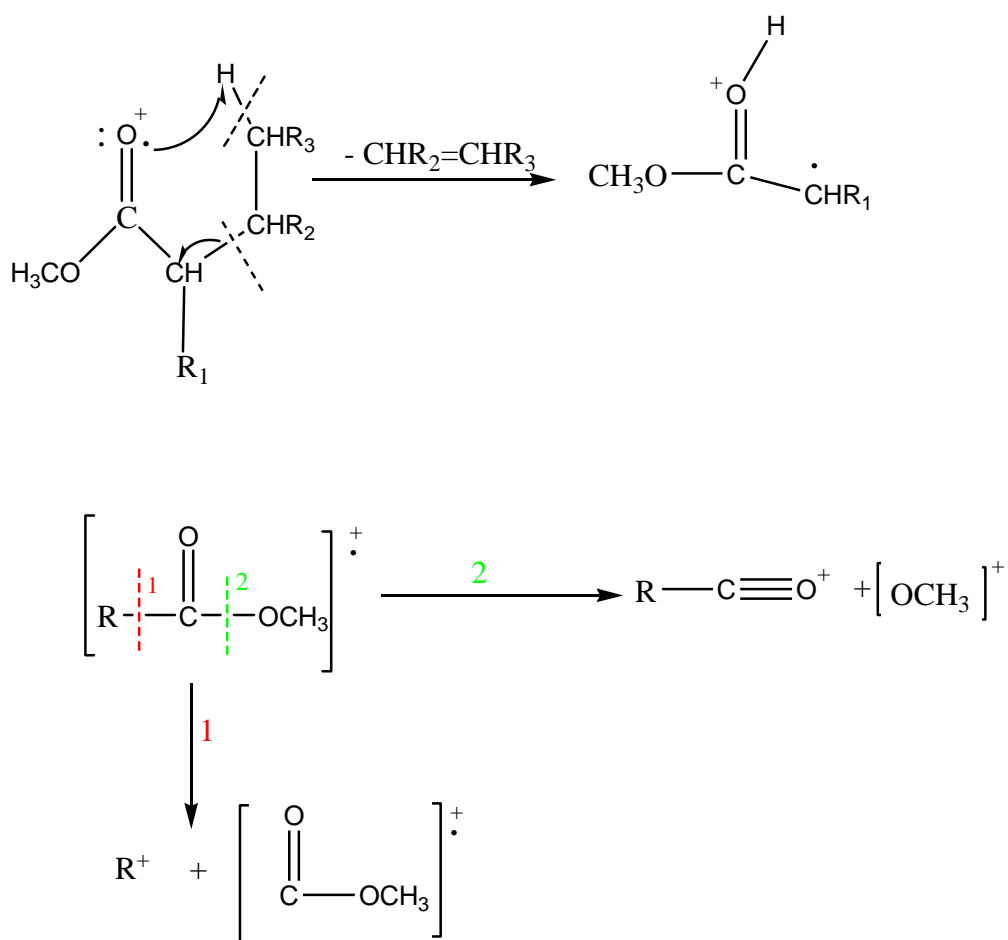


Schéma 12: Réarrangement de McLafferty et ions provenant du clivage de la liaison voisine de C=O

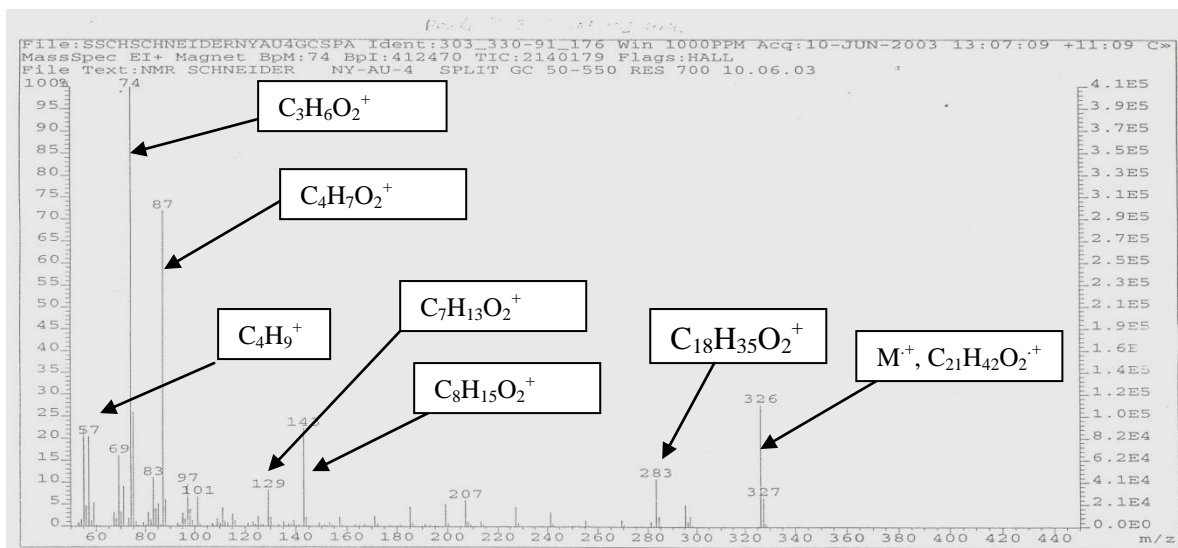


Figure 18: Spectre de masse de l'ester du composé EA3

L'analyse de la figure 19 montre les pics des différents esters d'acides gras constituant Le composé **EA3** obtenus par le couplage de la Chromatographie en phase Gazeuse (GC) et de la Spectroscopie de Masse (MS). Ce composé se révèle être un mélange de dix acides gras. Les structures des autres esters sont déduites de celle-ci-dessus et elles sont contenues dans le tableau 7.

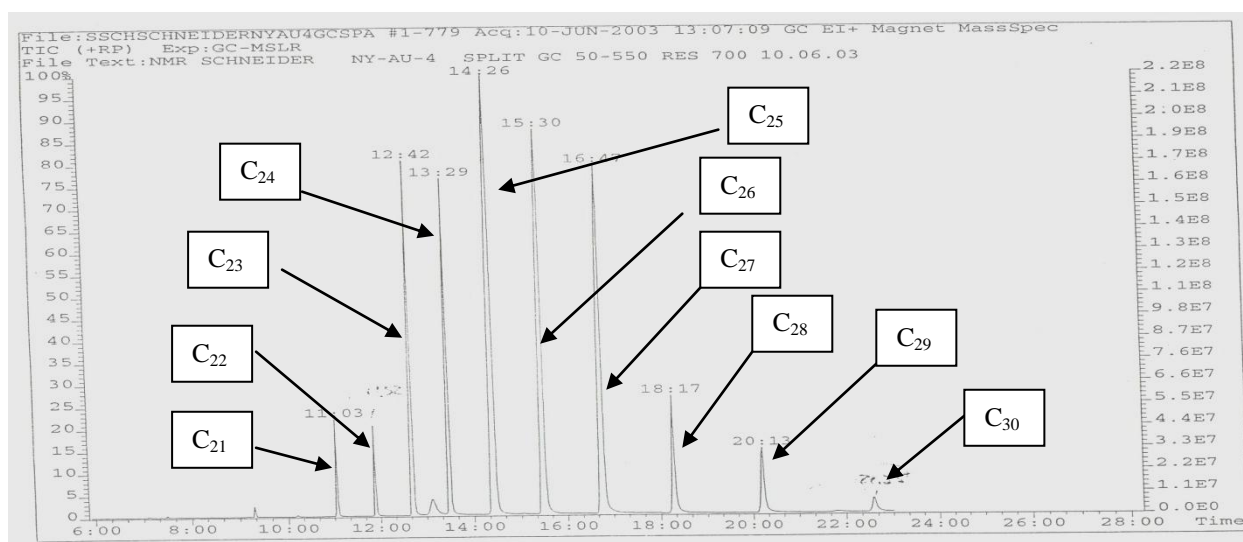
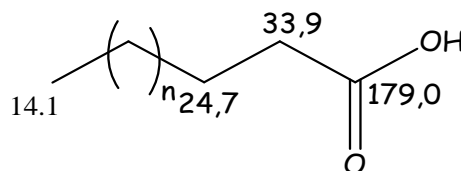
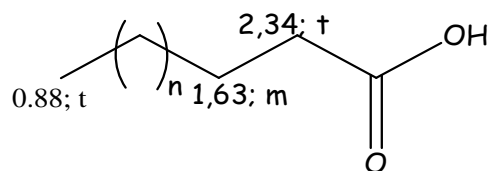


Figure 19: Spectre de masse du mélange d'acides gras



133 – 142 ($16 \leq n \leq 25$)

Tableau VII : Données spectroscopiques de masse des composés 133 à 142.

Numéro	m / z	Formule du méthylester	Abondance relative dans le mélange (%)	Formule de l'acide correspondant
<u>133</u>	326	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	07,58	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
<u>134</u>	340	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	08,09	C ₂₁ H ₄₂ O ₂
<u>135</u>	354	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	42,63	C ₂₂ H ₄₄ O ₂
<u>136</u>	368	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	40,07	C ₂₃ H ₄₆ O ₂
<u>137</u>	382	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	100,00	C ₂₄ H ₄₈ O ₂
<u>138</u>	396	C ₂₆ H ₅₂ O ₂	85,62	C ₂₅ H ₅₀ O ₂
<u>139</u>	410	C ₂₇ H ₅₄ O ₂	85,54	C ₂₆ H ₅₂ O ₂
<u>140</u>	424	C ₂₈ H ₅₆ O ₂	20,19	C ₂₇ H ₅₄ O ₂
<u>141</u>	438	C ₂₉ H ₅₈ O ₂	13,42	C ₂₈ H ₅₆ O ₂
<u>142</u>	452	C ₃₀ H ₆₀ O ₂	03,25	C ₂₉ H ₅₈ O ₂

II.2. Etude de *Entada africana*

II.2.1. Extraction et isolement des produits de *Entada africana*

Les écorces du tronc de *E. africana* récoltées à l'Extrême-Nord en février 2011, découpées en petits morceaux, séchées et pulvérisées ont donné 6 kg de poudre. 5kg de cette poudre ont été macérés à froid dans le mélange dichlorométhane/Méthanol (1:1). Après filtration et évaporation sous pression réduite, nous avons obtenu 200g d'extrait brut. Des chromatographies successives effectuées sur cet extrait nous ont permis d'isoler quatre composés purs : le 15-méthylester de l'acide kolavique (**94**), le lupéol (**144**), le β-sitostérol (**132**), un monoester du glycérol et de l'acide octacosanoïque C₂₈H₅₆O₂ (**146**); puis de caractériser deux mélanges dont l'un est constitué de deux acides gras saturés (**137**, **139**) et d'un alcool gras saturé (**143**), et l'autre des isomères cis et trans de trois esters de l'acide

férulique (**145a**, **145b**, **145c**) indexés TEA3, TEA2, TEA5, TEA6, TEA1 et TEA4 respectivement.

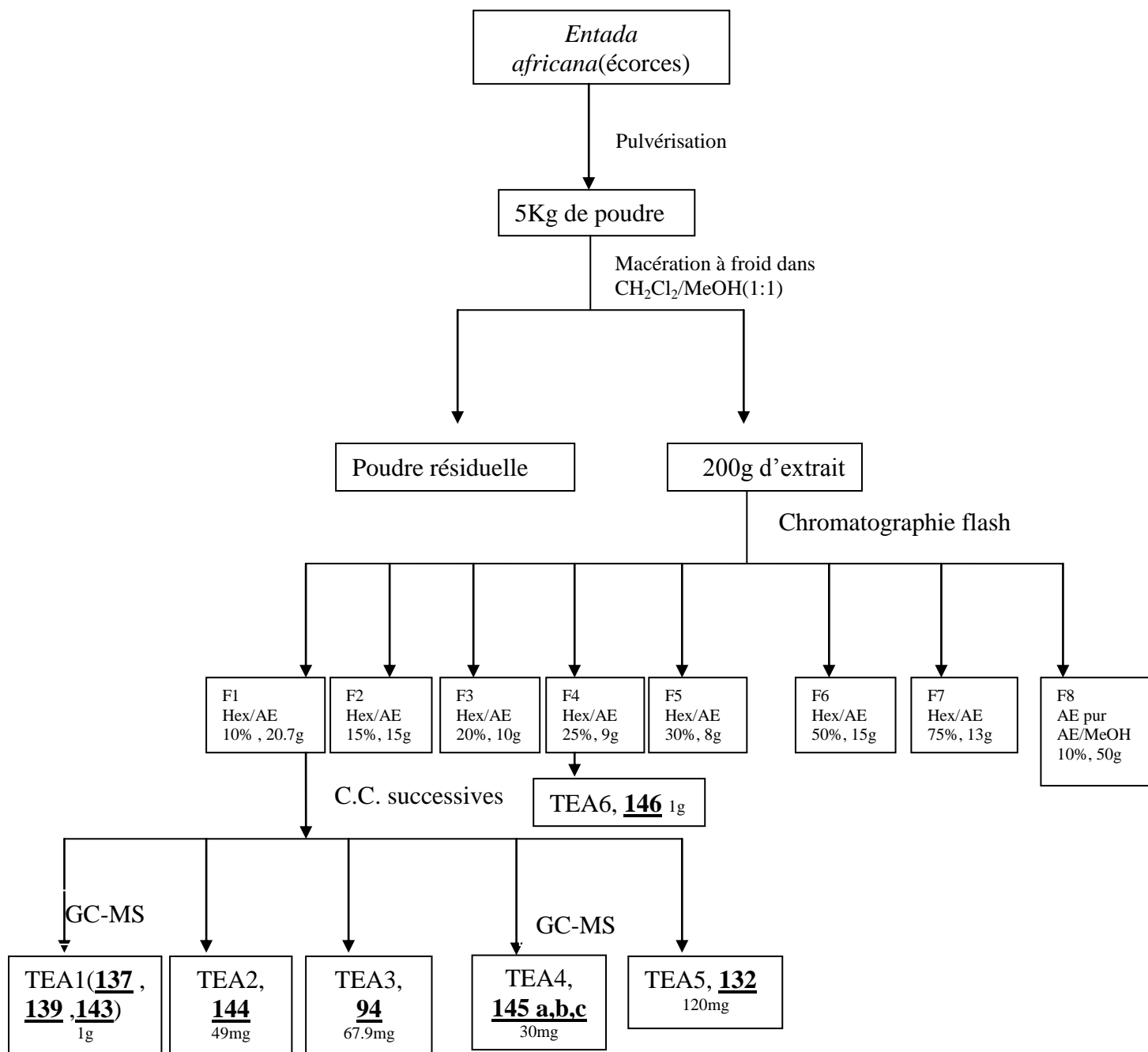


Schéma 13: Protocole d'isolement des produits de *Entada africana*

II.2.2. Caractérisation des composés isolés

II.2.2.1. Caractérisation de TEA1

TEA1 est une poudre blanche soluble dans le chloroforme. Il réagit négativement aux tests caractéristiques des triterpènes, stérols, flavonoïdes et des alcaloïdes.

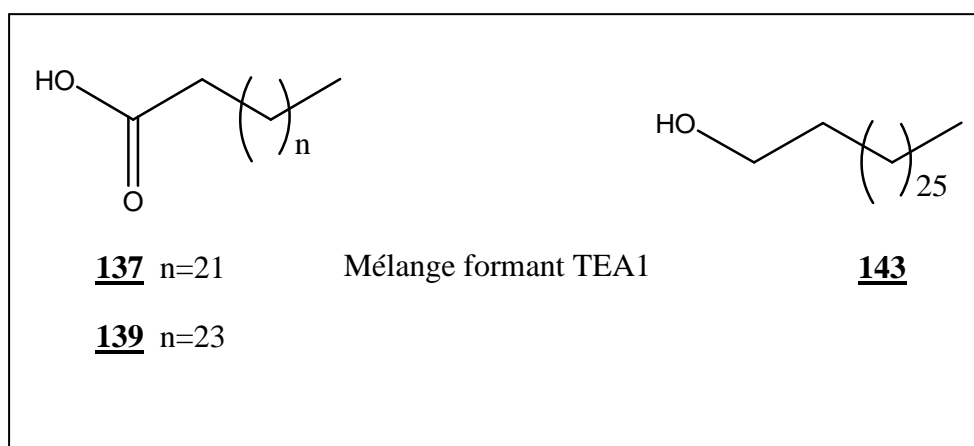
L'analyse de cette poudre au moyen de la technique CG-SM (Figure 24) montre qu'elle est constituée d'un mélange de plusieurs composés dont trois ont été identifiés. Le spectre de masse à haute résolution de **TEA1** nous donne en plus de deux ions moléculaires dont l'un à m/z 368.3661 correspondant à la formule brute $C_{24}H_{48}O_2$ renfermant une insaturation et l'autre à m/z 396.3976 correspondant à la formule brute $C_{26}H_{52}O_2$ renfermant également une insaturation, un troisième ion moléculaire à m/z 392.4382 attribuable à $[M+H - H_2O]^+$ associé à la formule brute $C_{28}H_{58}O$ ne renfermant aucune insaturation.

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (Figure 20) nous montre le pic du carbonyl d'un acide à 176.98 ppm et celui d'un oxyméthylène à 63.0 ppm. Sur ce même spectre on observe le pic d'un méthyle à 14.4 ppm ainsi que les pics de plusieurs méthylènes résonnant entre 22 et 35 ppm.

Sur le spectre RMN 1H (Figure 21), on constate que les protons de l'oxyméthylène résonnant à 3.6 ppm apparaissent sous forme de triplet d'où la proximité d'un méthylène. De même, les protons en alpha de la fonction acide et résonnant à 2.27 ppm apparaissent sous forme de triplet.

L'analyse du spectre HMBC (Figure 23) nous montre que les protons résonnant à 2.27 et 1.59 ppm corrélient avec le carbone résonnant à 176.98 ppm, tandis que les protons résonnant à 3.6 ppm corrélient avec les carbones résonnant à 32.9 et 25.9 ppm.

Des informations qui précèdent, nous pouvons déduire que nous avons un mélange d'alcool et d'acide gras. Nous avons pu identifier l'alcool gras à l'octacosan-1-ol (**143**) et les acides gras aux acides tétracosanoïque (**137**) et hexacosanoïque (**139**).



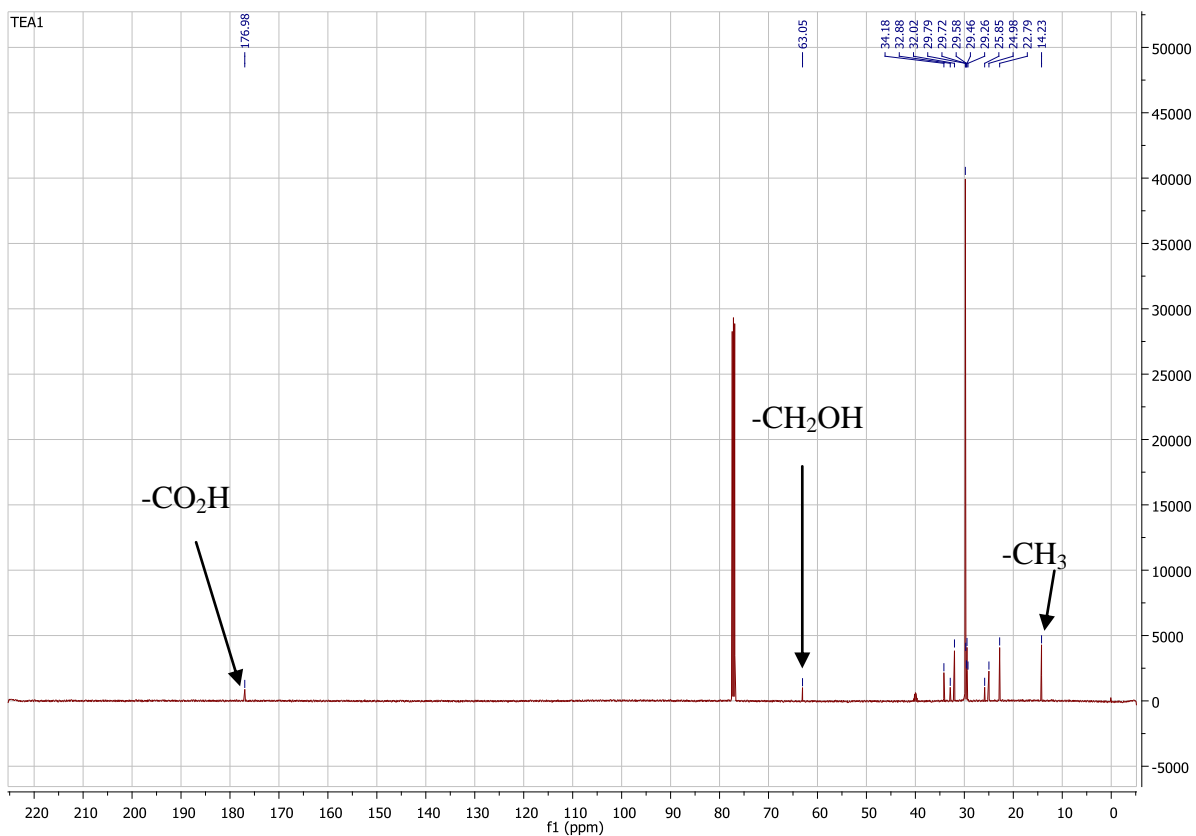


Figure 20: Spectre ¹³C du composé TEA1

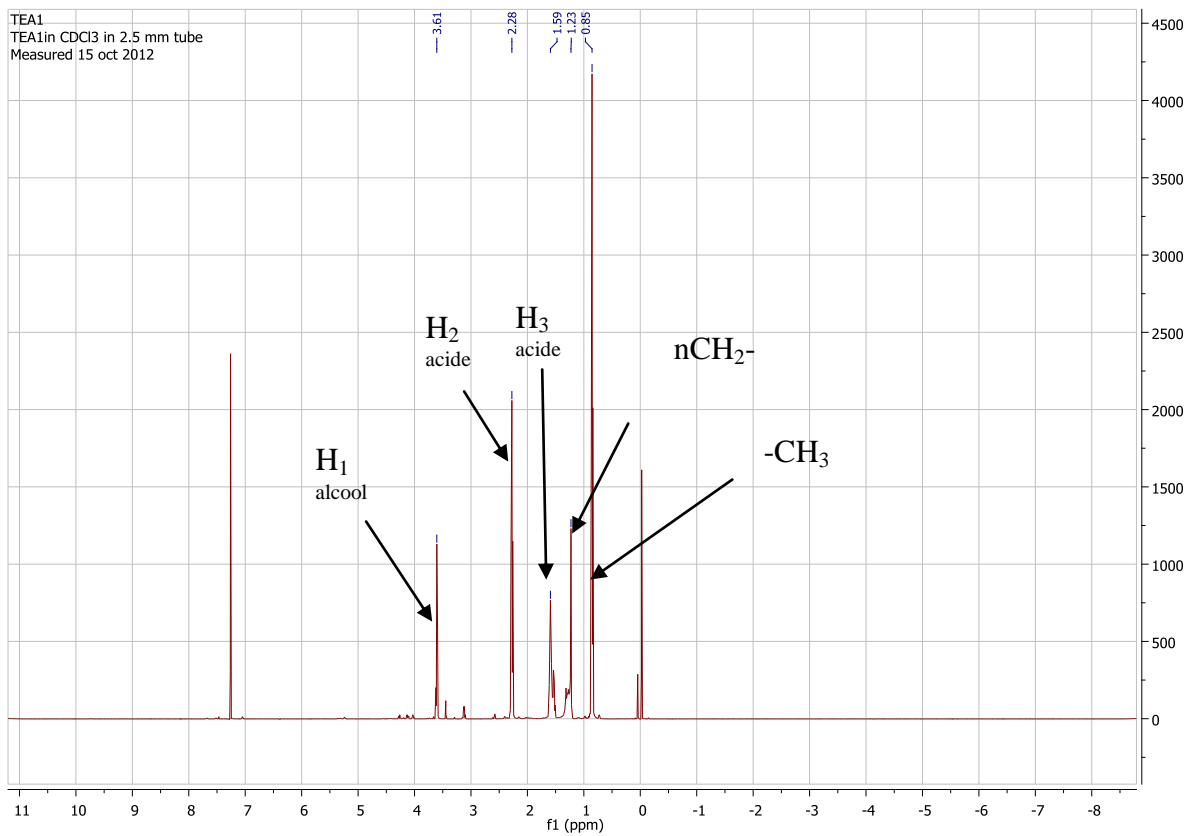


Figure 21: Spectre ¹H du composé TEA1

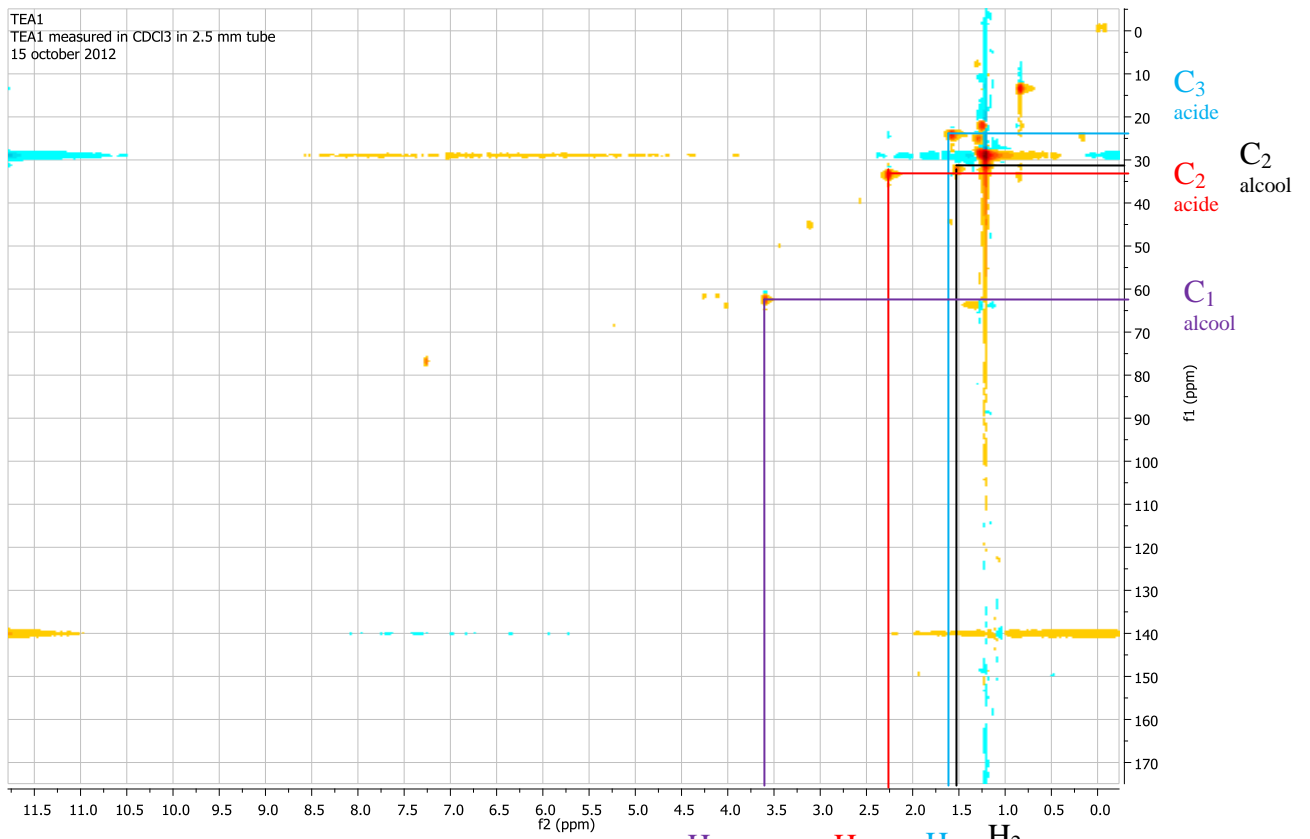


Figure 22: Spectre HSQC du composé TEA1

H₁ alcool
H₂ acide
H₃ acide
H₂ alcool

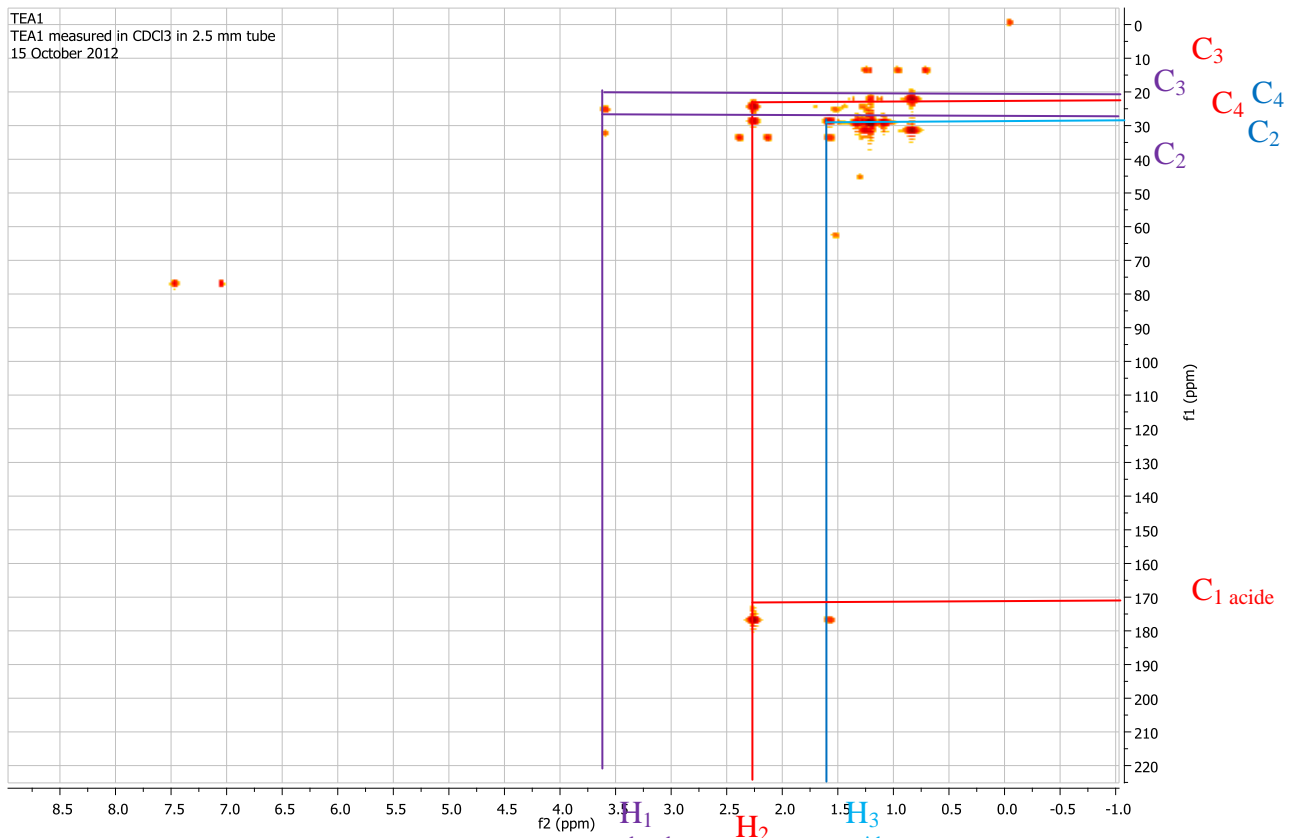
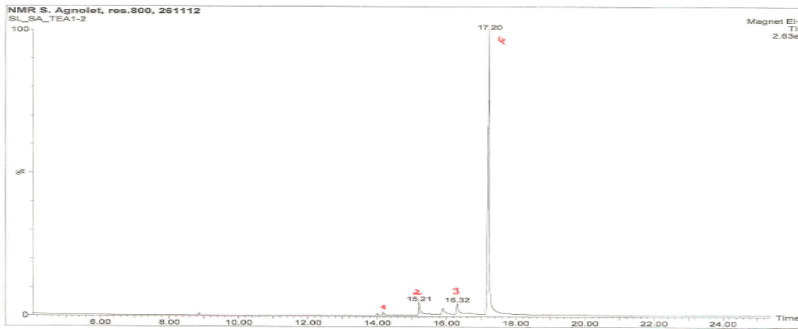


Figure 23: Spectre HMBC du composé TEA1

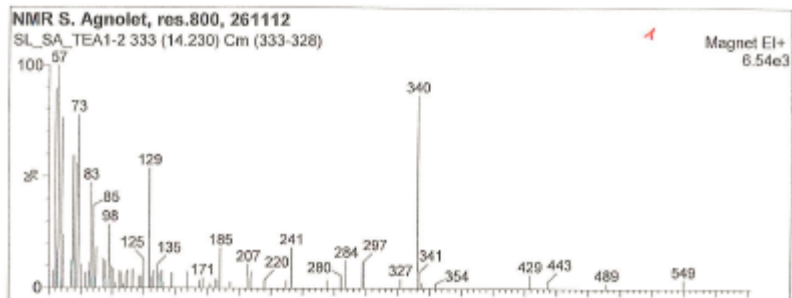
H₁ alcool
H₂ acide
H₃ acide



Elemental Composition Date : 27-NOV-2002

File:SL_SA_3501-498 Ident:129.11 F2 94V1.7) HRMS(28.15,-3.0)
 Mass(Dic: EI+ Voltage 846.381 Ept:123734 TIC:43322 Flags:30M
 Sample Test:433227 File Test:MR S. Agnolot, res.300, 27112
 Reference:Hex: 20 Ion: Both Ben and OH
 Limits:

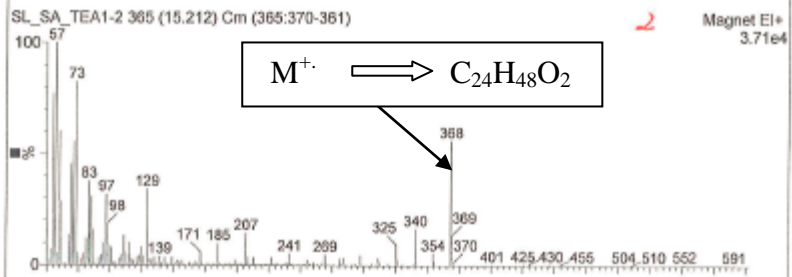
Mass	HM	std	Calc. Mass	DRE	C	H	O
398.36678	10.0	-0.5	0	0	0	0	0
398.36678	-1.8	-0.6	368.36581	1.0	24	48	2



Elemental Composition Date : 27-NOV-2002

File:SL_SA_3501-498 Ident:129.22 F3 900.7) HRMS(28.15,-3.0)
 Mass(Dic: EI+ Voltage 846.381 Ept:123734 TIC:43322 Flags:30M
 Sample Test:433227 File Test:MR S. Agnolot, res.300, 27112
 Reference:Hex: 20 Ion: Both Ben and OH
 Limits:

Mass	HM	std	Calc. Mass	DRE	C	H	O
398.37933	10.0	-0.5	0	0	0	0	0
398.37933	-2.3	-0.9	368.37671	1.0	26	52	2



Elemental Composition Date : 27-NOV-2002

File:SL_SA_3501-498 Ident:46.51 900.7) HRMS(28.15,-1.0)
 Mass(Dic: EI+ Voltage 846.381 Ept:124543 TIC:62700 Flags:30M
 Sample Test:433227 File Test:MR S. Agnolot, res.300, 27112
 Reference:Hex: 20 Ion: Both Ben and OH
 Limits:

Mass	HM	std	Calc. Mass	DRE	C	H	O
392.43827	10.0	-0.5	0	0	0	0	0
392.43827	-0.1	0.0	392.43502	1.0	28	56	0

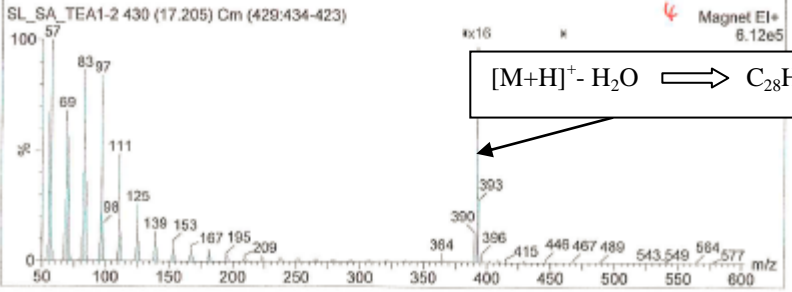
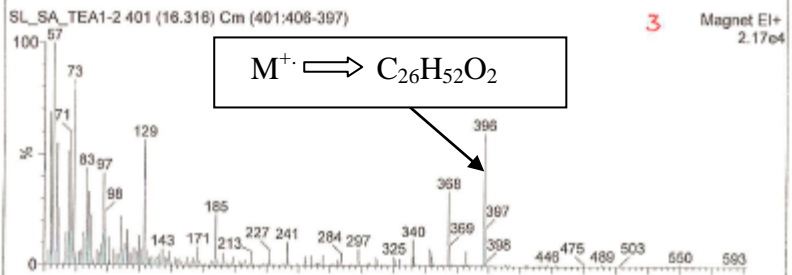
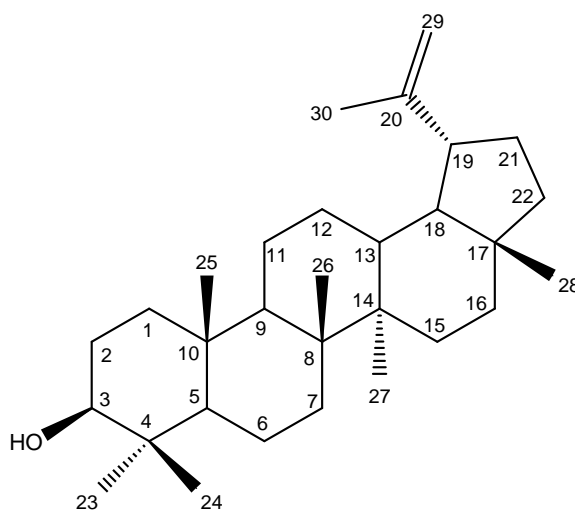


Figure 24: Spectre CG-SM du composé TEA1

II.2.2.2. Caractérisation du composé TEA2

Le composé **TEA2** est une poudre blanche qui précipite dans le mélange Hex/ EtOAc 2.5%. Il est soluble dans le chlorure de méthylène et fond entre 190 et 192°C. Il donne une coloration rouge violacée au test de Libermann Buchard caractéristique des triterpènes.

On observe sur les spectres de RMN ^1H (Figure 25), RMN ^{13}C (Figure 26) et DEPT 135 (Figure 27) des signaux à $\delta(\text{H})/\delta(\text{C})$ 4.68 (1H, singlet large)/109.3, 4.54 (1H, singlet large)/109.3, 2.97 (1H, m)/76.7 correspondant aux déplacements chimiques des protons et carbones du méthylène terminal 29 et de l'oxyméthine en position 3 des composés de la classe de lup-20(29)-èn-3-ol. Sur le spectre découplé large bande (Figure 26), on observe un signal à 150.2 ppm correspondant au carbone 20 du lupéol. Sept singulets apparaissent sur le spectre ^1H à 0.65 ppm ; 0.76 ppm ; 0.77 ppm ; 0.87 ppm ; 0.91 ppm ; 0.99 ppm et 1.64 ppm correspondant aux méthyles angulaires. Toutes ces données nous ont permis, en accord avec la littérature (Gallo et Sarachine, 2009; Mahato et Kundu, 1994), d'identifier TEA2 au lupéol (**144**).



144

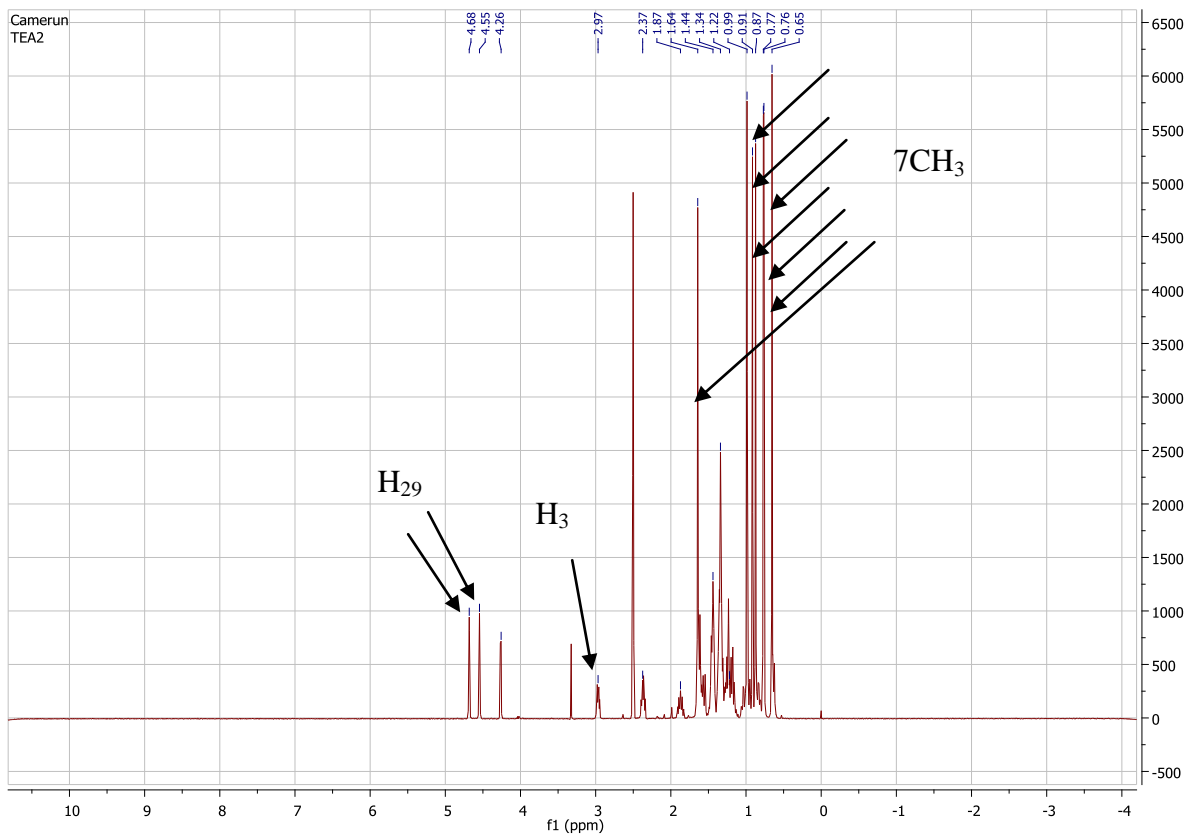


Figure 25: Spectre ^1H du composé TEA2

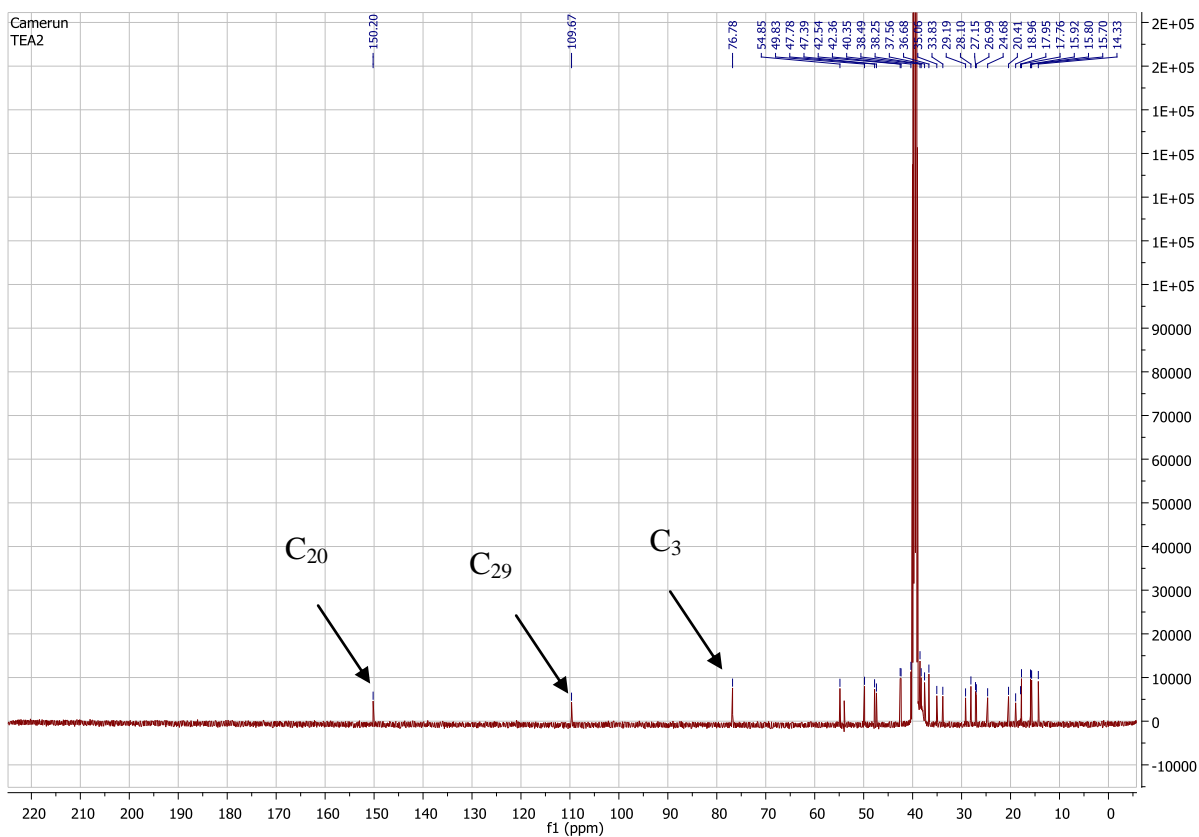


Figure 26: Spectre ^{13}C du composé TEA2

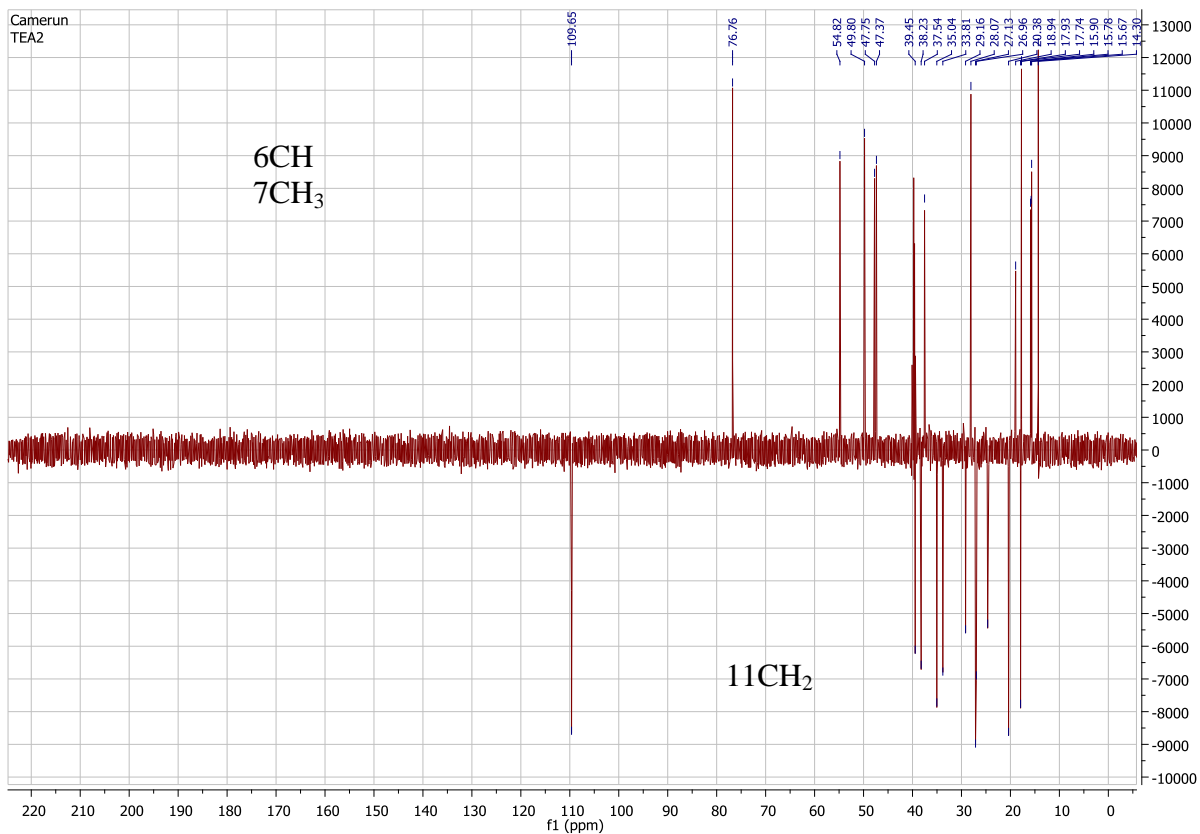


Figure 27: Spectre DEPT 135 du composé TEA2

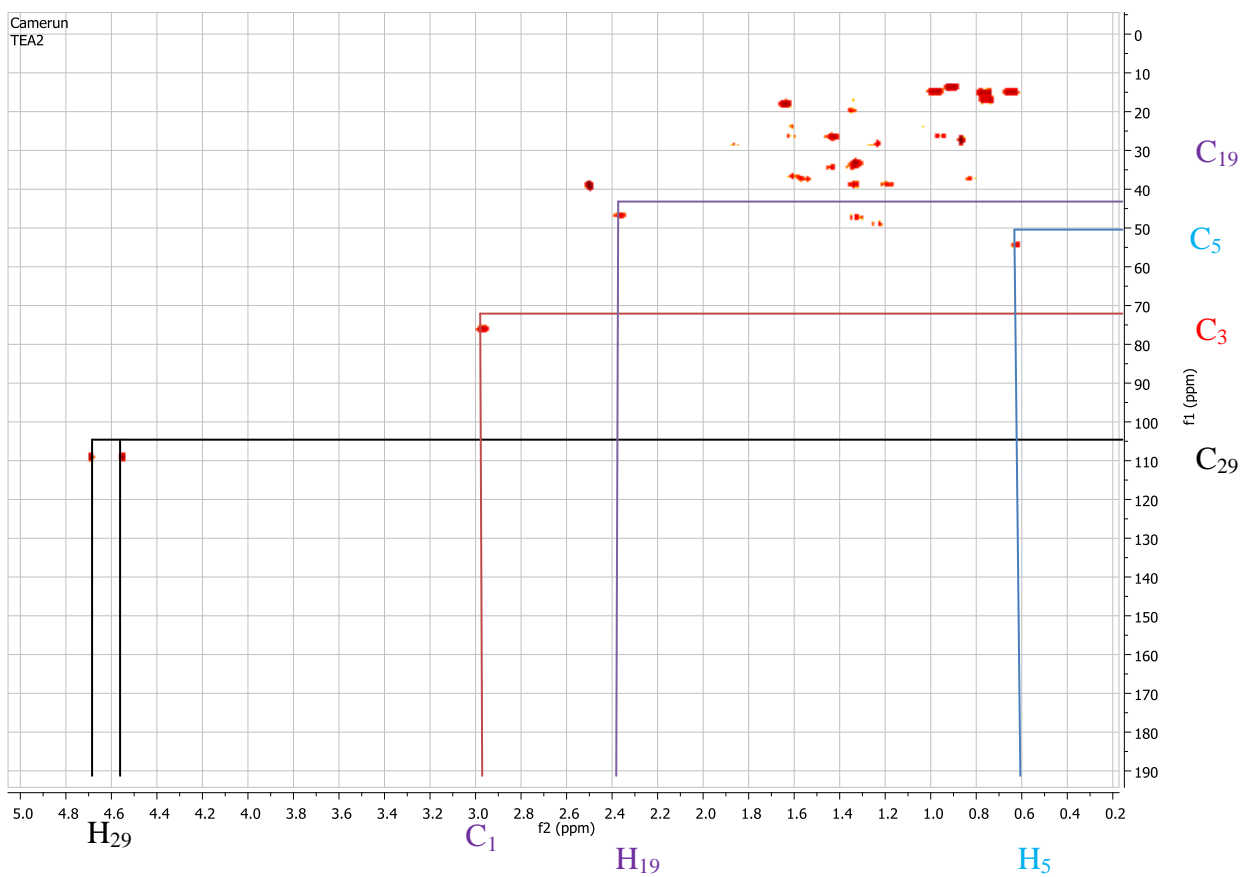


Figure 28: Spectre HSQC du composé TEA2

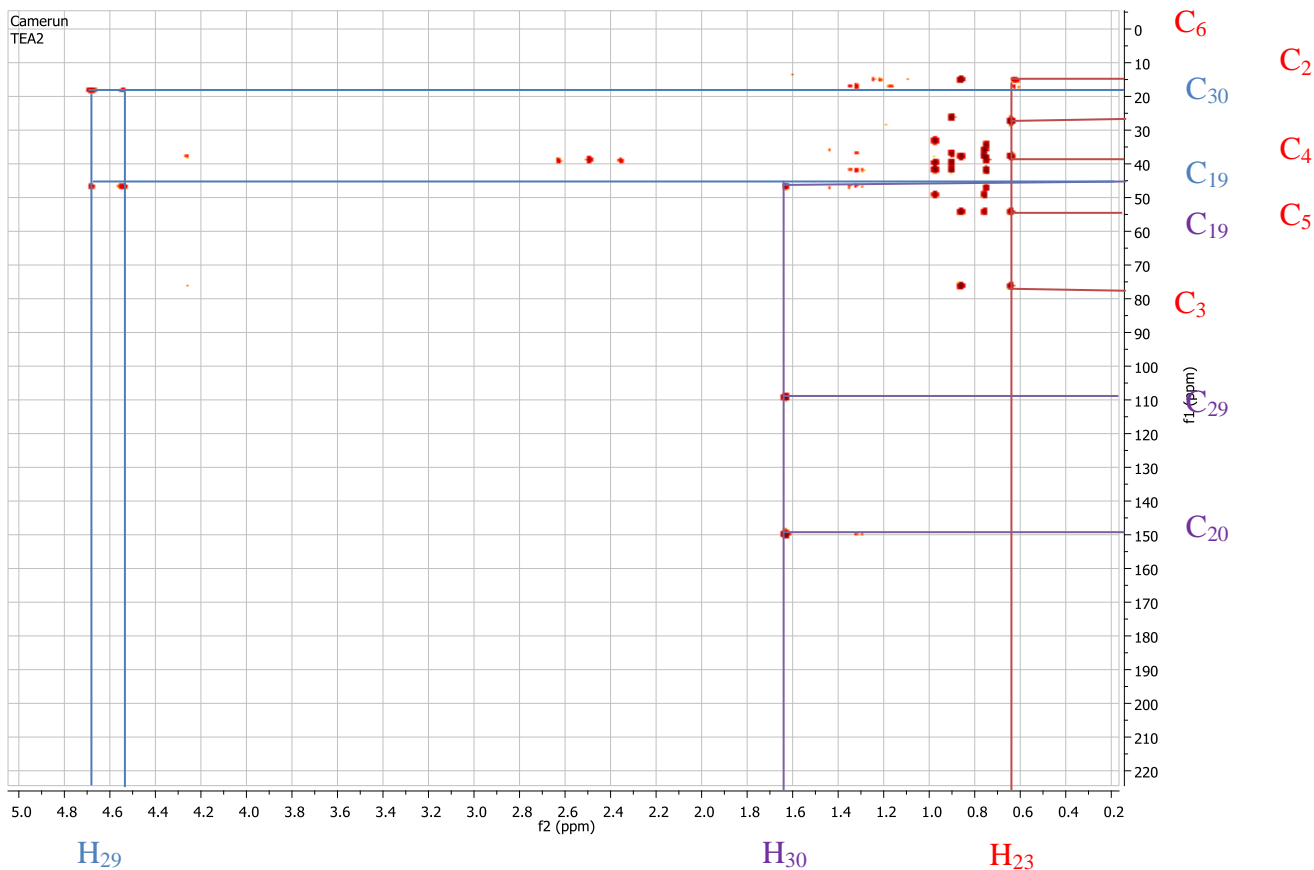
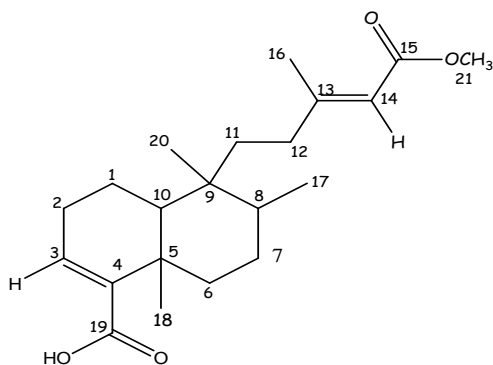


Figure 29: Spectre HMBC du composé TEA2

II.2.2.3. Caractérisation du composé TEA3

Le composé **TEA3** est un solide qui cristallise sous forme de paillettes blanches. Il est soluble dans le dichlorométhane et fond entre 162-163°C. Il réagit négativement aux tests caractéristiques des triterpènes, stérols, flavonoïdes et alcaloïdes. Il décolore l'eau de brome: ce qui suggère la présence de liaisons multiples (double ou triple liaisons C-C).

Sur son spectre RMN ^{13}C complètement découplé (Figure 30), on dénombre les signaux de 21 atomes de carbone dont le carbonyle d'un acide à 171.9ppm et celui d'un ester à 167.5ppm. Son spectre DEPT 135 (Figure 31) nous montre les signaux de 6 méthylènes, 4 méthynes et 5 méthyles dont un carbométhoxy résonnant à 51.07ppm. Les informations ci-dessus ainsi que la comparaison des données spectrales de **TEA3** à celles de **EA1** isolé de *Entada abyssinica* nous ont permis de l'identifier à l'acide cléroda-15-méthylcarboxylate-3,13-diène-19-oïque (**94**). Ce composé est obtenu ici pour la première fois de *Entada africana*.



94

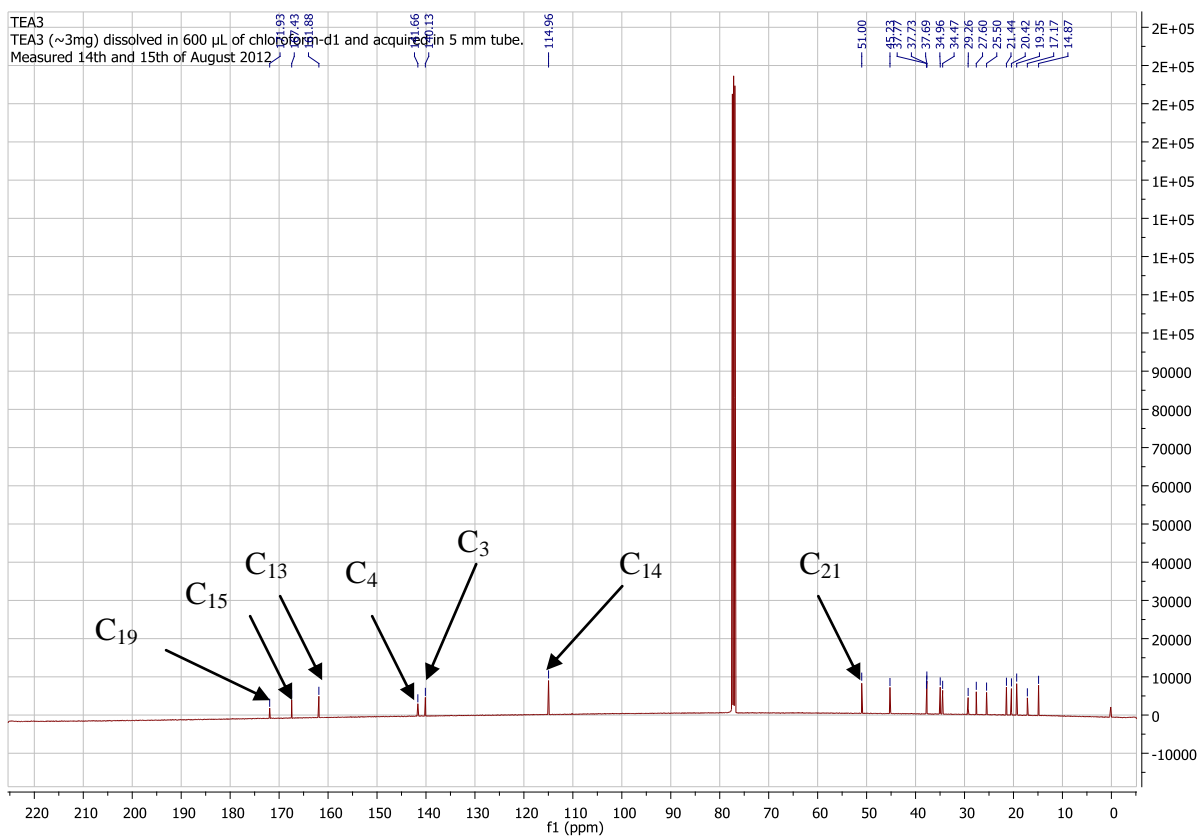


Figure 30: Spectre ^{13}C du composé TEA3

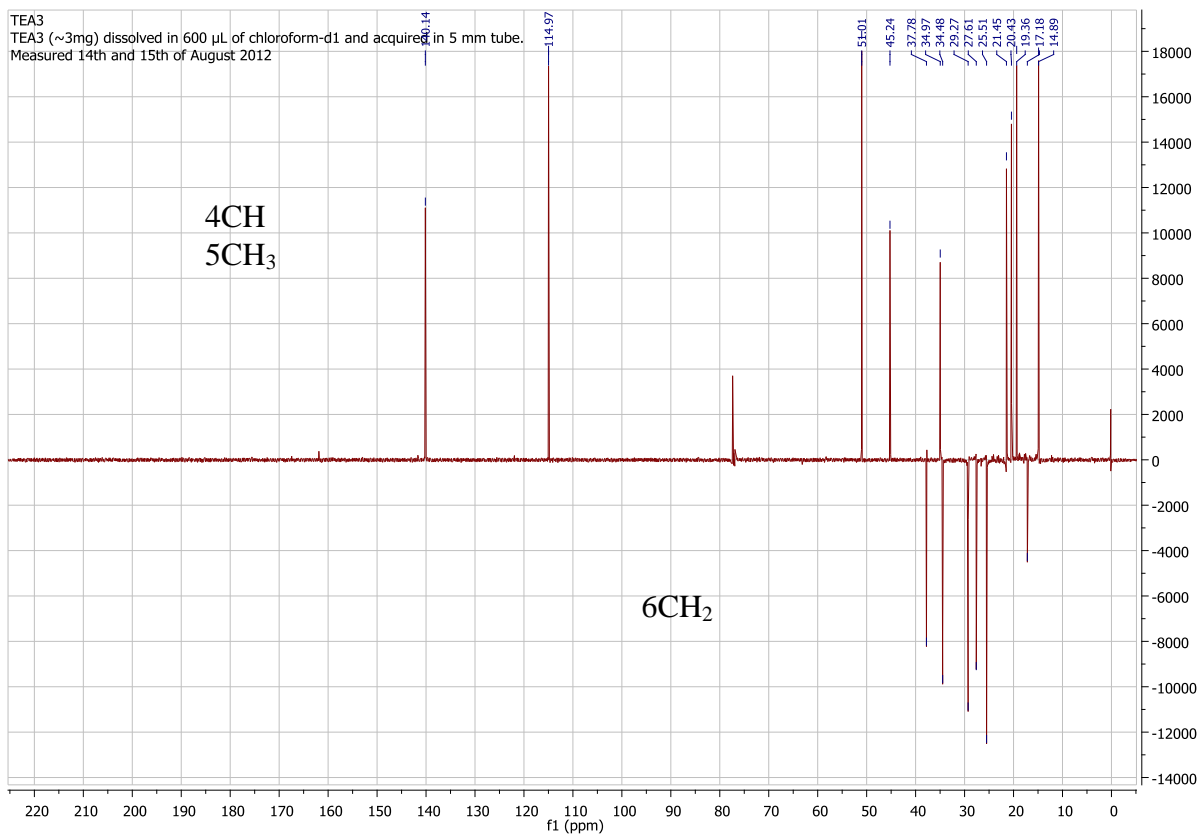


Figure 31: Spectre DEPT 135 du composé TEA3

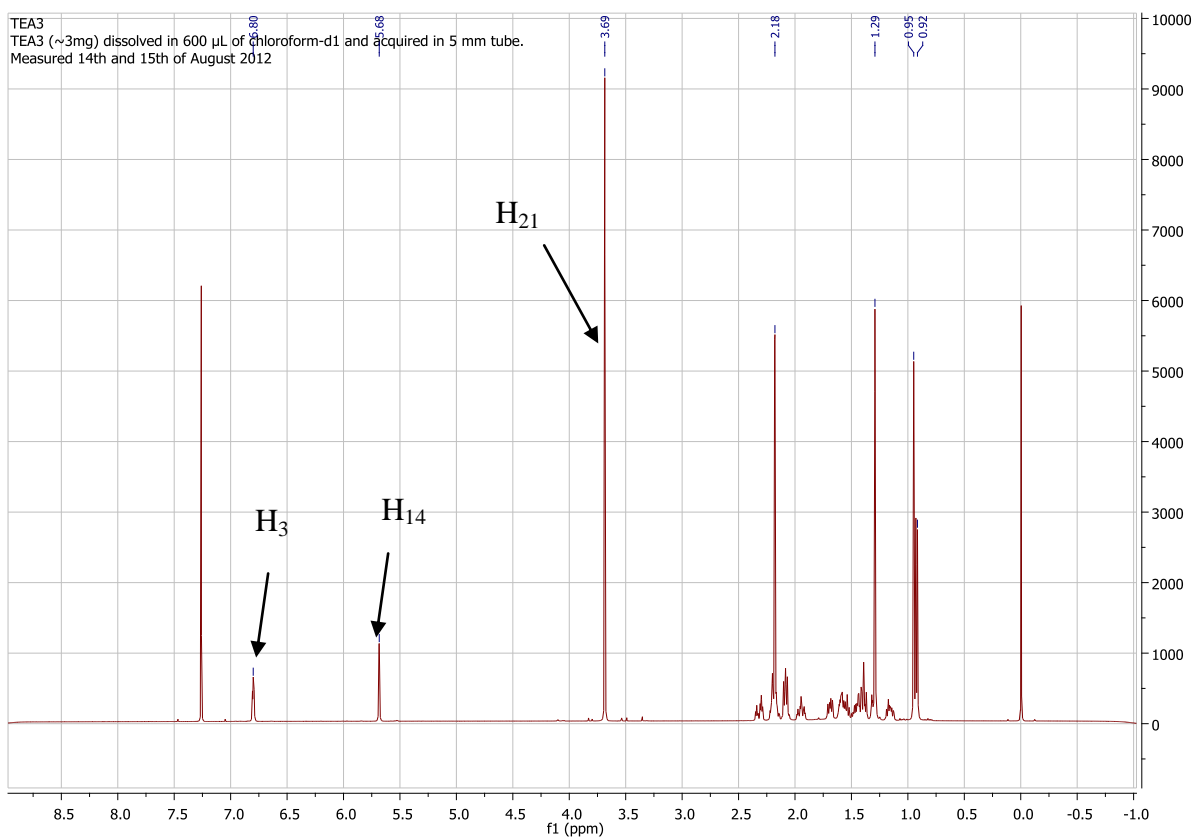


Figure 32: Spectre ¹H du composé TEA3

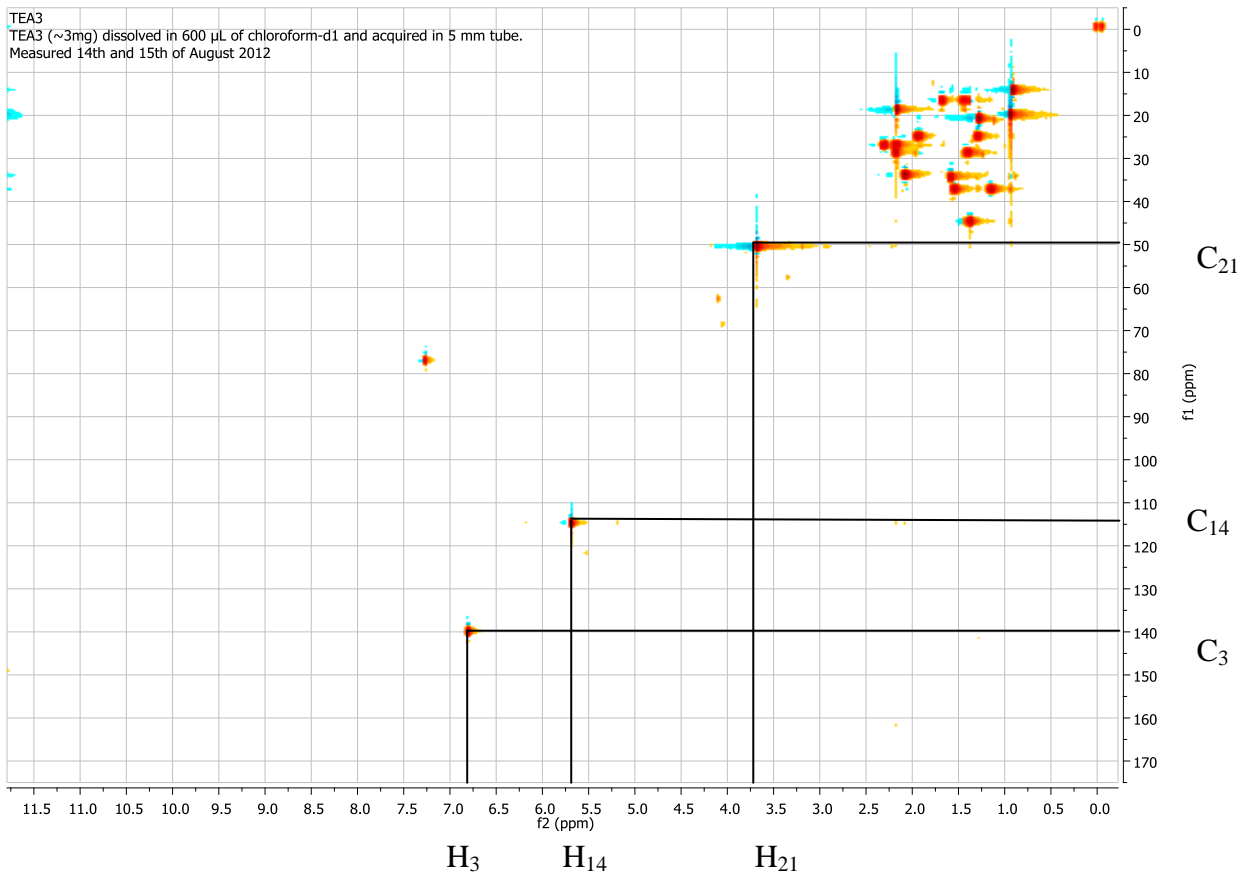


Figure 33: Spectre HSQC du composé TEA3

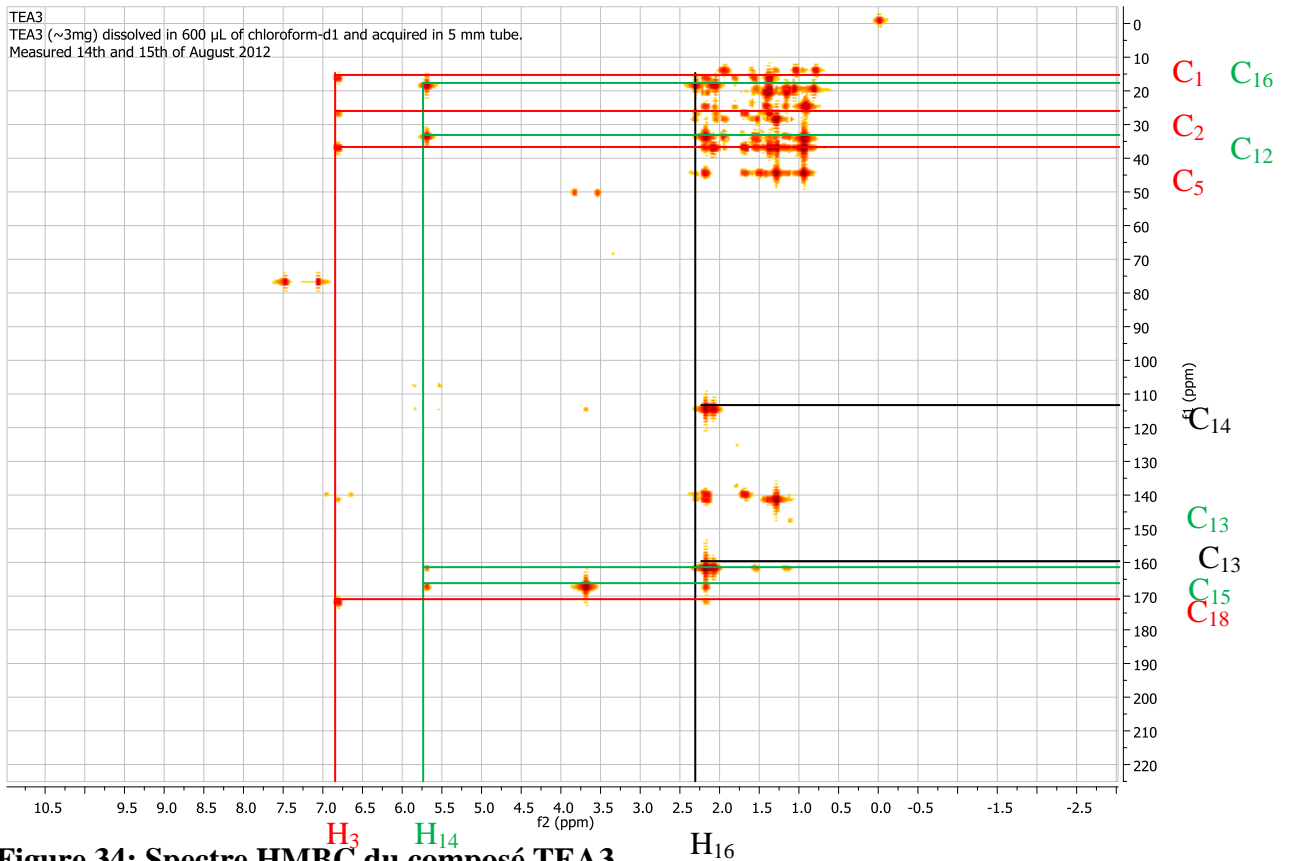


Figure 34: Spectre HMBC du composé TEA3

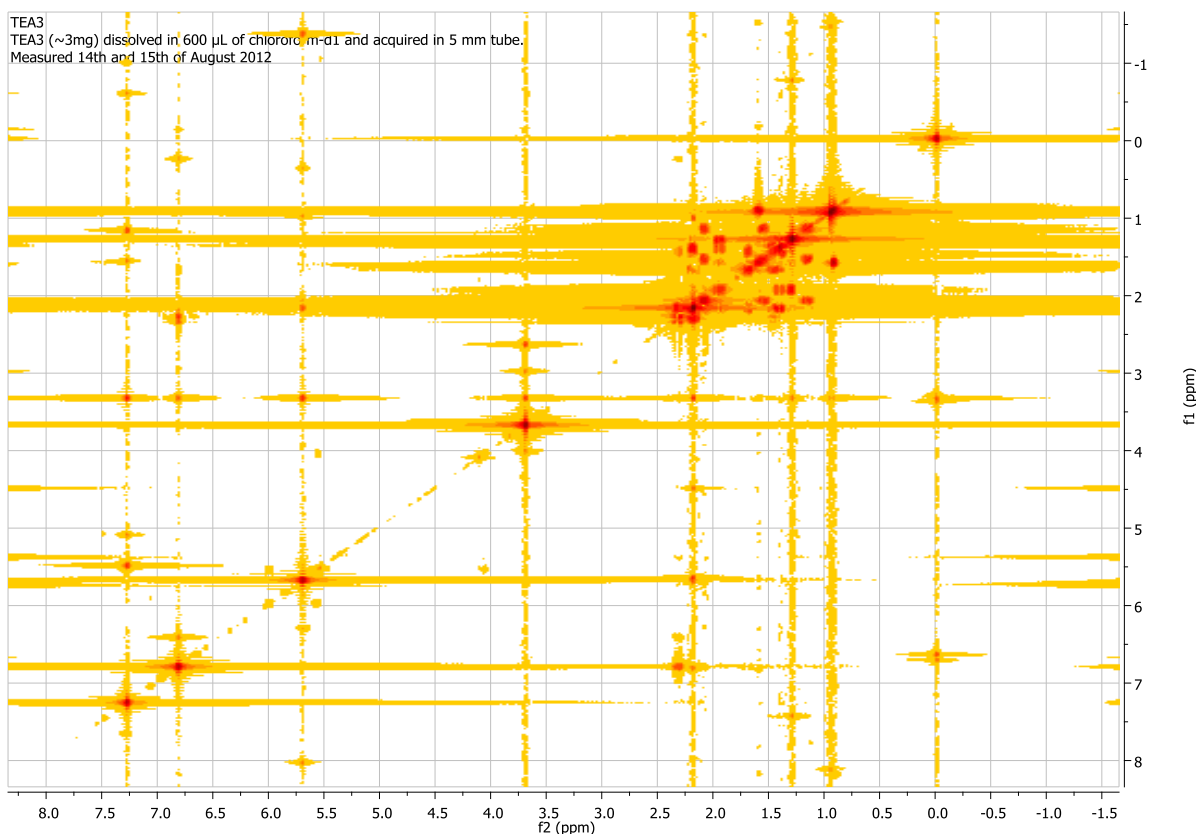


Figure 35: Spectre COSY du composé TEA3

II.2.2.4. Caractérisation de TEA4

TEA4 est une poudre blanche soluble dans le chloroforme. Il réagit négativement aux tests caractéristiques des triterpènes, stérols, flavonoïdes et des alcaloïdes. Il décolore l'eau de brome indiquant la présence des liaisons multiples. Il répond positivement au test au chlorure ferrique caractéristique des phénols.

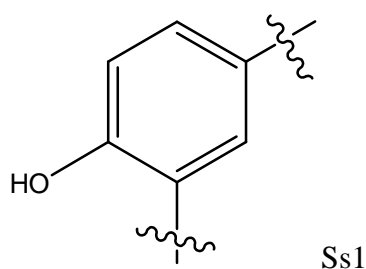
Sur le spectre RMN ^{13}C (Figure 36), on observe à 167.6 ppm un signal correspondant au carbonyle d'un ester. Entre 109 et 148 ppm on observe 8 signaux de carbones hybridés sp^2 dont 6 appartenant au noyau aromatique (résonnant à 109.4, 114.8, 123.2, 127.2, 146.9 et 148.0 ppm) et deux appartenant à une double liaison (résonnant à 115.8 et 144.8 ppm). Sur ce même spectre, on observe à 64.8 ppm, 56.2 ppm et 14.3 ppm trois pics correspondant respectivement à un oxyméthylène, un oxyméthyle et à un méthyle terminal. On constate qu'au pied des pics des carbones résonnant à 109.4, 114.8, 115.8, 123.2, 144.8 et 167.6 ppm on observe des pics de faible intensité suggérant la présence d'un isomère géométrique résultant de la présence d'une double liaison.

Sur le spectre DEPT 135 (Figure 37), on observe entre 22.8 et 32.1 ppm plusieurs signaux correspondant aux méthylènes dont un intense autour de 29 ppm attribuable à une longue chaîne carbonée. Ce spectre confirme la présence de l'oxyméthylène, de l'oxyméthyle

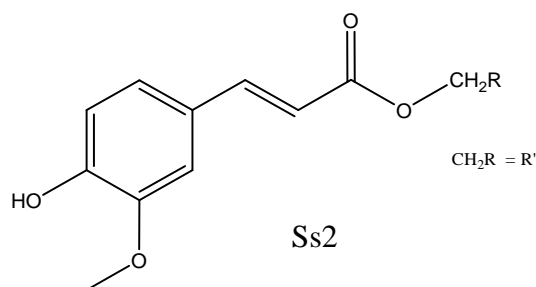
et du méthyle terminal respectivement à 64.8, 56.2 et 14.3 ppm. Il confirme également la présence des méthylènes entre 22.8 et 32.1 ppm.

L'analyse du spectre RMN ^1H (Figure 38) nous montre deux doublets à 6.30 et 7.61 ppm correspondant aux deux protons éthyléniques de constante de couplage $J_{\text{trans}}=16.0\text{Hz}$, induisant une isométrie géométrique trans.

L'analyse du spectre élargi RMN ^1H (Figure 39) présente deux doublets à 6.92 et 7.04 ppm de constante de couplage respective $J_o=8.0\text{ Hz}$ et $J_m=2.0\text{ Hz}$. On observe sur le même spectre un doublet dédoublé résonnant à 7.07 ppm et de constante de couplage $J_o=8.0\text{ Hz}$ et $J_m=2.0\text{ Hz}$. Ces informations nous permettent d'affirmer que **TEA4** possède un noyau aromatique trisubstitué ayant au moins un hydroxyle: d'où la sous-structure 1 (Ss1).

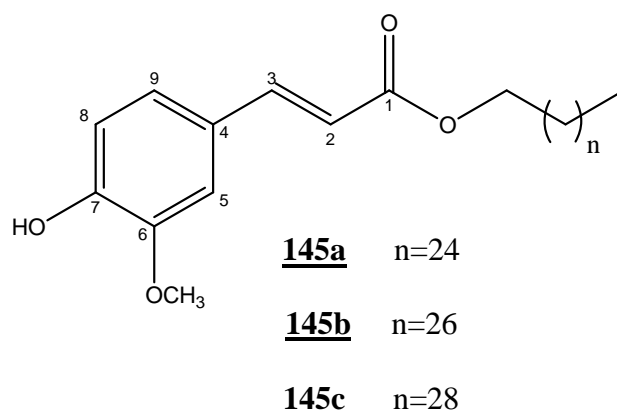


Sur le spectre HMBC (Figure 40), on observe des corrélations entre le proton éthylénique résonnant à 7.61 ppm et les carbones aromatiques résonnant à 123.2 et 109.4 ppm, ainsi qu'avec le carbonyle de l'ester résonnant à 167.6 ppm; le proton éthylénique résonnant à 6.30 ppm quant à lui corrèle avec le carbone aromatique résonnant à 127.2 ppm et le carbonyle à 167.6 ppm. Les protons de l'oxyméthyle résonnant à 3.93 ppm corrélerent avec le carbone aromatique résonnant à 146.9 ppm. De ce qui précède nous en déduisons que les trois substituants du noyau aromatique sont: un groupement hydroxyle, un oxyméthyle et une chaîne latérale comportant une double liaison conjuguée à une fonction ester. Les corrélations observées entre le proton aromatique résonnant à 6.92 ppm et les carbones résonnant à 146.9, 127.2 et 123.2 ppm nous permettent, en accord avec les informations ci-dessus de fixer les substituants sur le noyau aromatique d'où la sous-structure 2.



La longueur du groupement R' est déterminée par les informations contenues dans le spectre de masse à haute résolution (Figure 41) enregistré à la suite des analyses couplées GC-MS, qui nous montre des pics des ions moléculaires à m/z 558.4270, 586.4775 et 614.5391: nous avons donc trois groupements alkyles possédant respectivement 26, 28 et 30 atomes de carbones.

Il ressort de ce qui précède et en accord avec la littérature (Addae-Mensah et al.,1992) que TEA4 est un mélange de trois esters d'acide ferulique **145** (a, b, c), l'isomère trans étant majoritaire. De ces trois esters, le composé majoritaire est **145b** car le pic de l'ion moléculaire apparaissant à m/z 586.4775 est le plus intense.



Isomère Trans

Données RMN ^1H (δ , ppm; multiplicité; J , Hz): 0.88 (3H, t, $J = 7.0$, MeCH_2); 1.25 (m, $(\text{CH}_2)_n$); 1.38 (2H, m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.69 (2H, m, OCH_2CH_2); 3.93 (3H, s, OCH_3); 4.19 (2H, t, $J = 7.0$, OCH_2CH_2); 6.30 (d, $J = 16.0$, H-2); 6.92 (d, $J = 8.0$, H-8); 7.04 (d, $J = 2.0$, H-5); 7.07 (dd, $J = 8.0, 2.0$, H-9); 7.61 (d, $J = 16.0$, H-3).

Données RMN ^{13}C , δ : 167.6 (C-1), 115.8 (C-2), 144.8 (C-3), 127.2 (C-4), 109.4 (C-5), 146.9 (C-6), 148.0 (C-7), 114.8 (C-8), 123.2 (C-9), 56.0 (OCH_3), 64.8 (OCH_2CH_2), 28.9 (OCH_2CH_2), 26.1 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 32.1 (MeCH_2CH_2), 22.9 (MeCH_2), 14.3 (MeCH_2), 29.46, 29.52, 29.70, 29.76, 29.81, 29.85 (CH_2) $_n$.

Isomère Cis

Données RMN ^1H (δ , ppm; multiplicité; J , Hz): 0.88 (3H, t, $J = 7.0$, MeCH_2); 1.25 (m, $(\text{CH}_2)_n$); 1.64 (2H, m, OCH_2CH_2); 3.93 (3H, s, OCH_3); 4.12 (2H, t, $J = 7.0$, OCH_2CH_2); 5.81 (d, $J = 13.0$, H-2); 6.88 (d, $J = 8.0$, H-8); 7.77 (d, $J = 2.0$, H-5); 7.10 (dd, $J = 8.0, 2.0$, H-9); 6.80 (d, $J = 13.0$, H-3).

Données RMN ^{13}C , δ : 166.8 (C-1), 117.0 (C-2), 143.8 (C-3), 127.4 (C-4), 112.8 (C-5), 146.9 (C-6), 148.0 (C-7), 113.9 (C-8), 125.7 (C-9), 56.1 (OCH_3), 64.6 (OCH_2CH_2), 28.8 (OCH_2CH_2), 14.3 (MeCH_2).

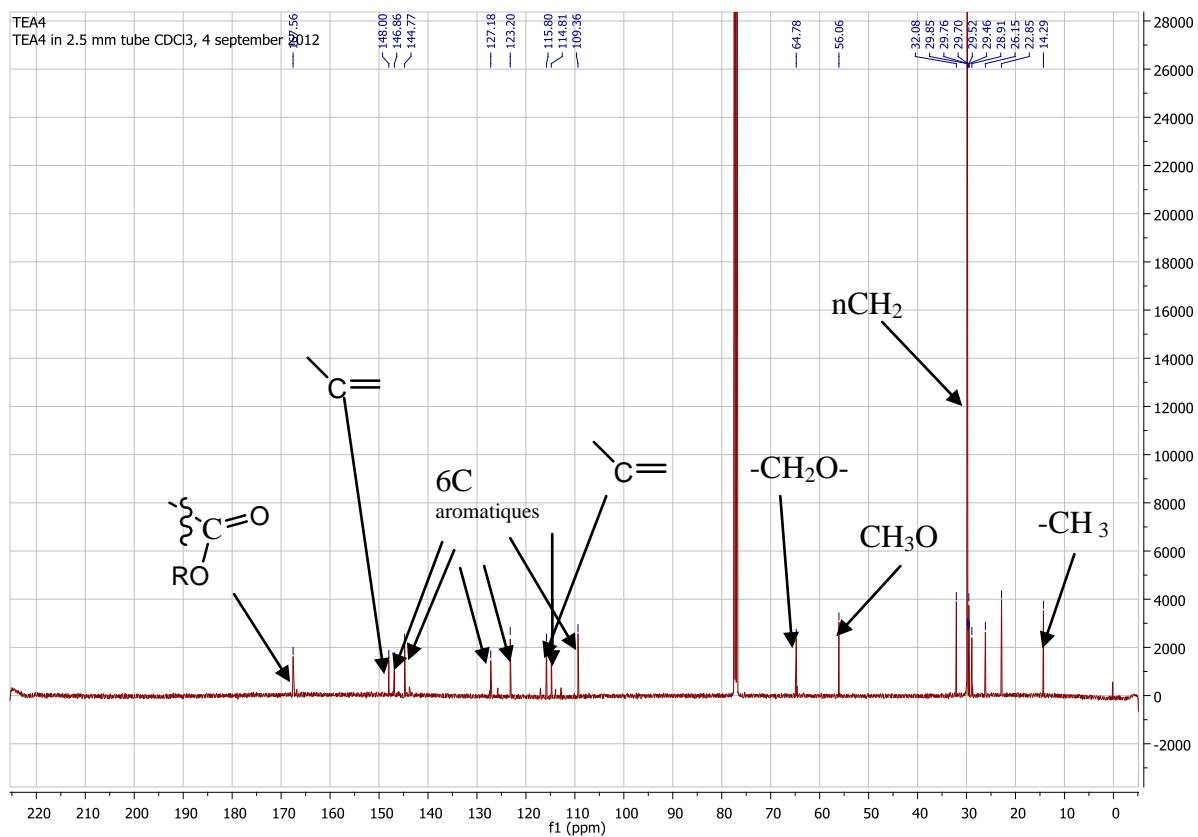


Figure 36: Spectre ^{13}C du composé TEA4

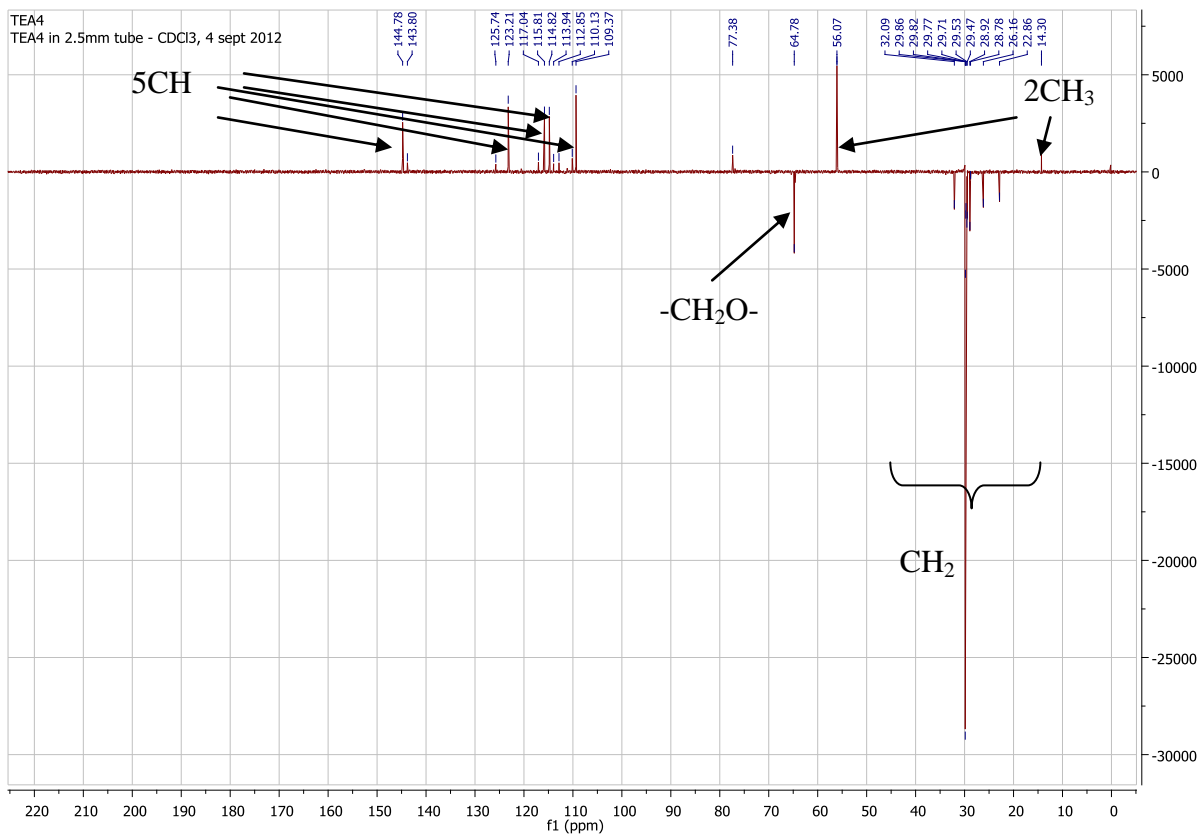


Figure 37: Spectre DEPT 135 du composé TEA4

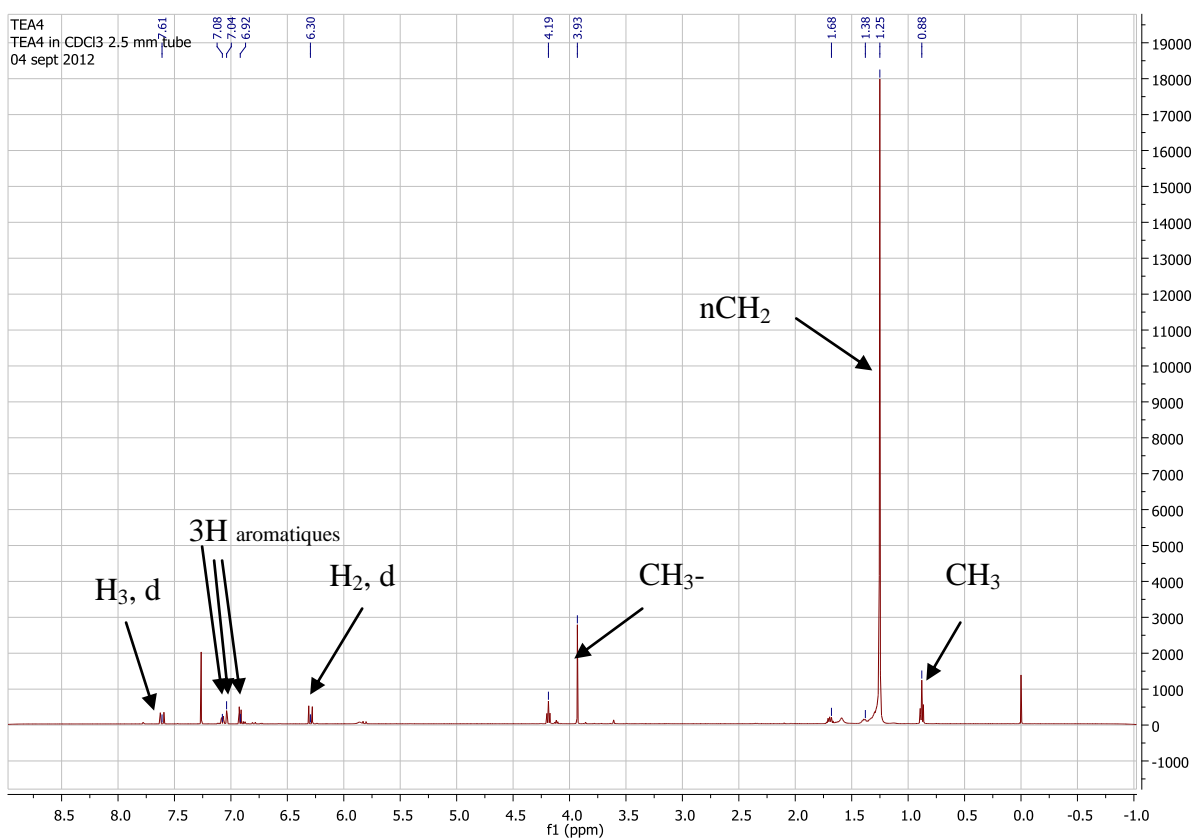


Figure 38: Spectre ¹H du composé TEA4

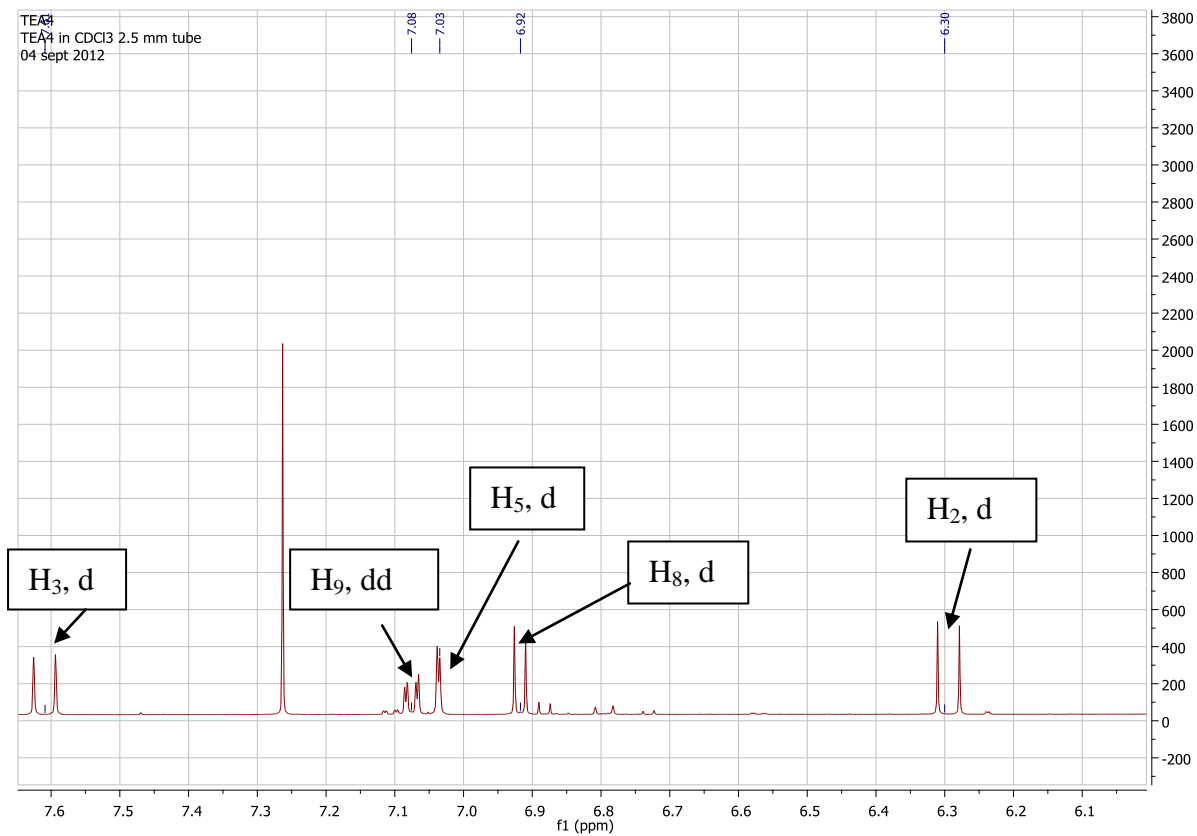


Figure 39: Spectre ^1H élargi du composé TEA4

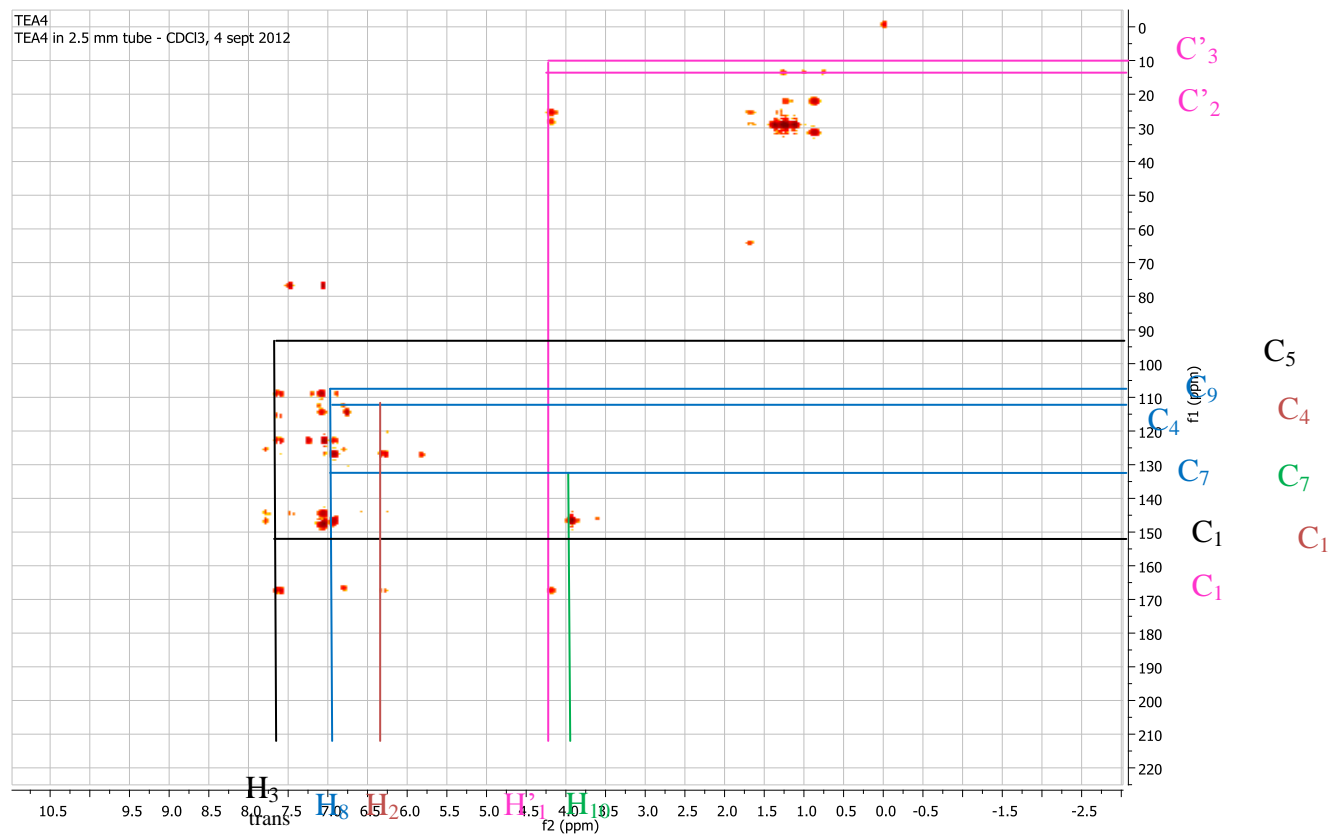


Figure 40: Spectre HMBC du composé TEA4

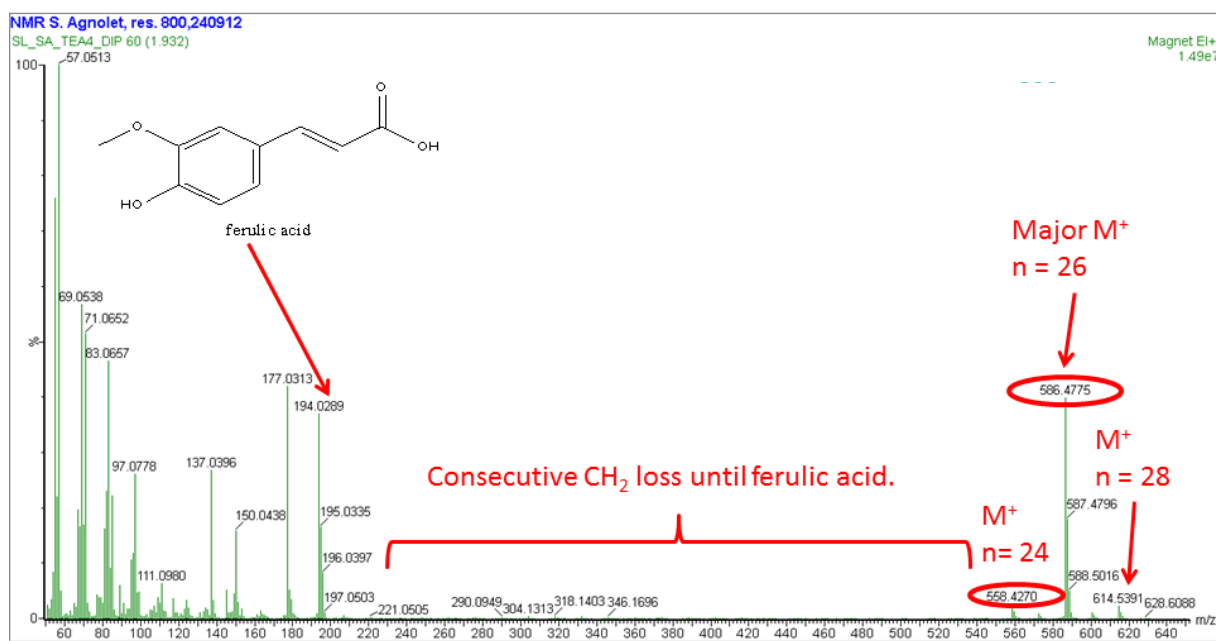
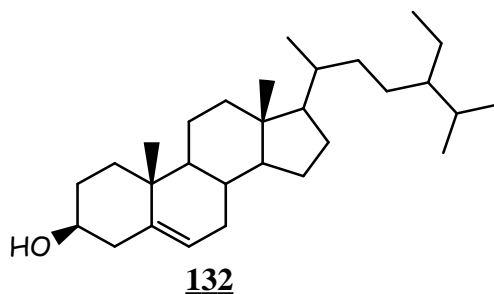


Figure 41: Spectre de Masse du composé TEA4

II.2.2.5. Caractérisation du composé TEA5

Le composé **TEA5** se présente sous forme de cristaux blancs. Il est soluble dans le chlorure de méthylène et fond entre 137.5 et 139.0°C. Il réagit négativement aux tests caractéristiques des flavonoïdes et des alcaloïdes. Il répond positivement au test de Libermann Buchard et donne une coloration bleue caractéristique des stérols. Il décolore l'eau de brome, ce qui suggère la présence de liaisons multiples C-C. Il a été identifié au β -sitostérol grâce à une comparaison par CCM avec un échantillon présent dans notre laboratoire ; en effet, le composé **TEA5** et le β -sitostérol (**132**) ont le même rapport frontal.

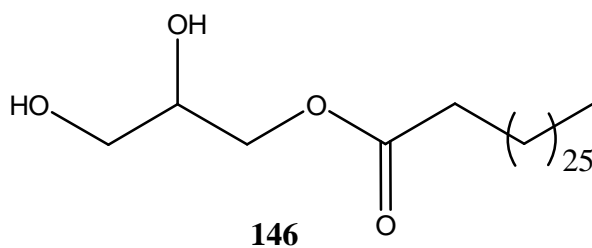


II.2.2.6. Caractérisation du composé TEA6

Le composé **TEA6** se présente sous forme d'une poudre blanche. Il est soluble dans le dichlorométhane et fond entre 89 et 90°C. Il réagit négativement aux tests caractéristiques des triterpènes, stérols, flavonoïdes et des alcaloïdes.

L'analyse de **TEA6** par la technique CG-SM (Figure 47) montre un composé majoritaire ayant un temps de rétention de 1.47 s. Le spectre de masse à haute résolution de ce composé nous donne l'ion moléculaire à m/z 498.4652, compatible avec la formule brute C₃₁H₆₂O₄ renfermant une insaturation.

Sur le spectre RMN ¹³C (Figure 42), on observe à 174.5 ppm le signal du carbonyl d'un acide ou d'un ester ; sur le même spectre, on observe les signaux de deux oxyméthylènes résonnant à 62.9 et 64.8 ppm, ainsi que le signal d'un oxyméthyne résonnant à 70.4 ppm. Sur ce spectre, on observe également un pic très intense entre 29.3 et 29.8 ppm, ce qui nous laisse supposer que **TEA6** comporte une longue chaîne aliphatique. Ces informations sont confirmées par le spectre DEPT 135 (Figure 43) sur lequel on observe d'une part le signal du méthyle terminal résonnant à 14.8 ppm, et d'autre part le signal de l'oxyméthyne ainsi que les signaux de plusieurs méthylènes. L'existence de la longue chaîne carbonée est confirmée sur le spectre RMN ¹H (Figure 44) par la présence d'un pic intense à 1.25 ppm. Sur ce même spectre, on constate que les protons des deux oxyméthylènes sont diastéréotopiques, ce qui nous permet d'affirmer que ces oxyméthylènes sont situés de part et d'autre de l'oxyméthyne. Sur le spectre HMBC (Figure 46), on constate que les protons résonnant entre 3.5 et 4.25 ppm ne corrélaient pas avec les méthylènes résonnant entre 22 et 34 ppm. Des informations précédentes, nous pouvons déduire que **TEA6** est un ester du glycerol et d'un acide gras. Nous avons attribué au composé **TEA6** la structure **146** qui est celle de l'octacosanoate de 2,3-dihydroxypropyle.



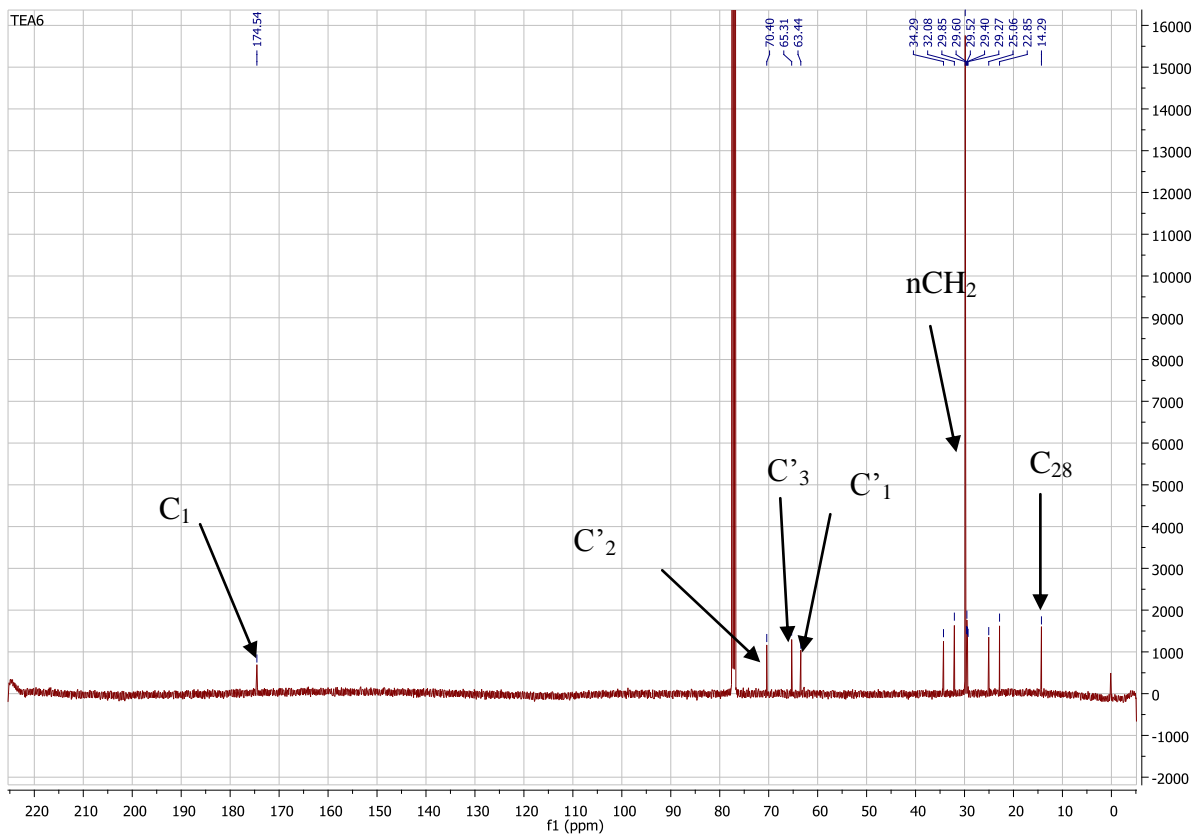


Figure 42: Spectre ^{13}C du composé TEA6

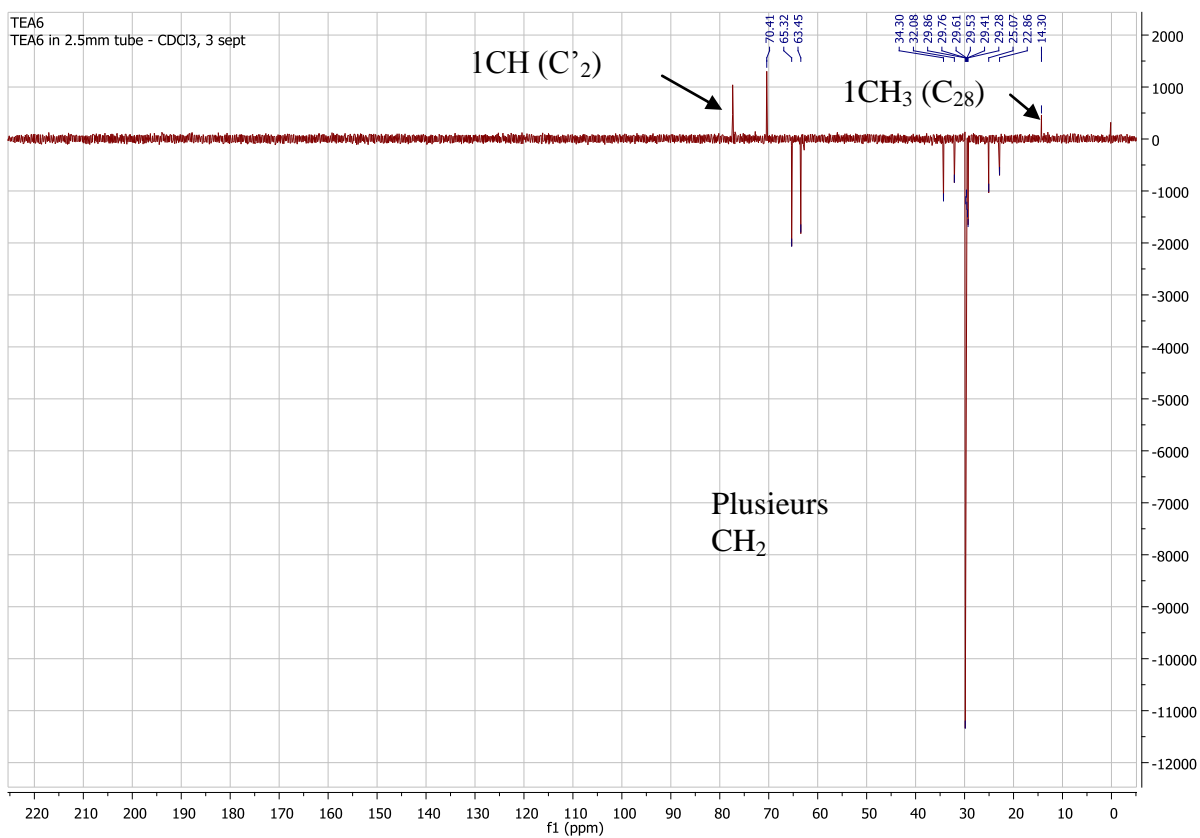


Figure 43: Spectre DEPT 135 du composé TEA6

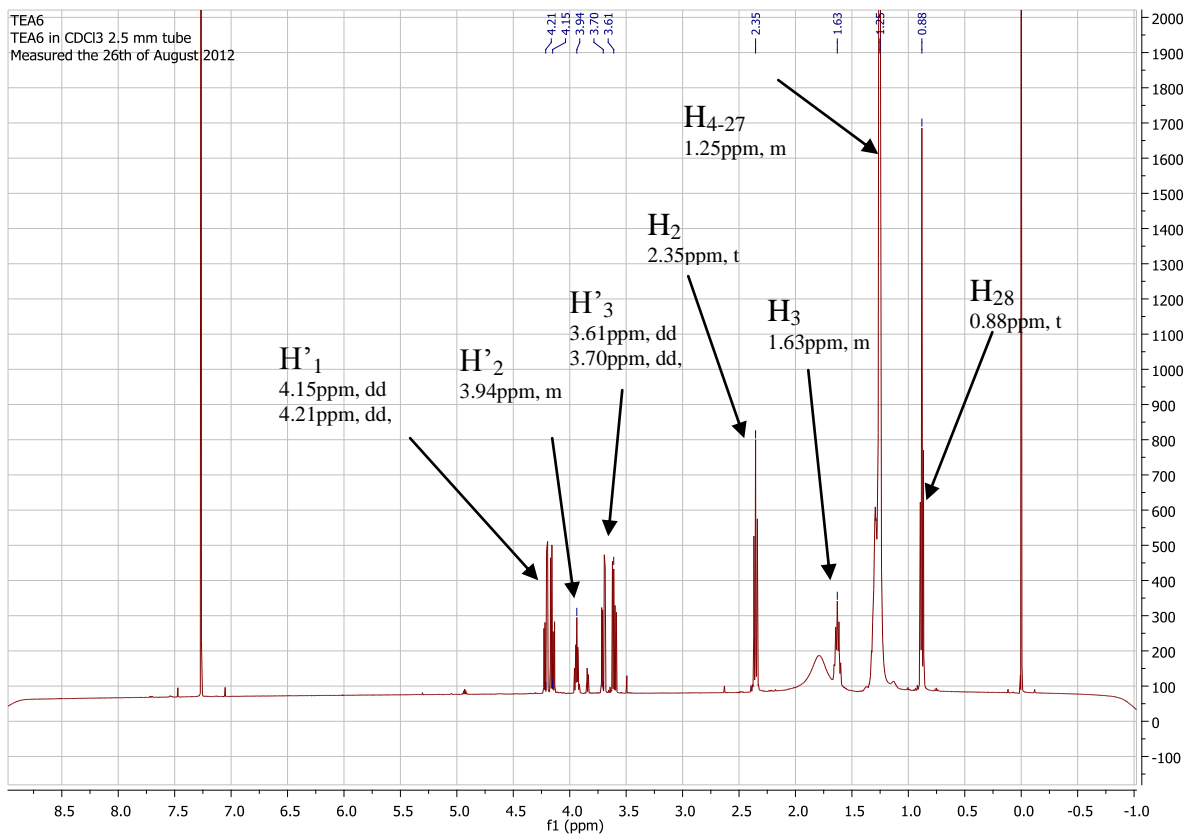


Figure 44: Spectre ¹H du composé TEA6

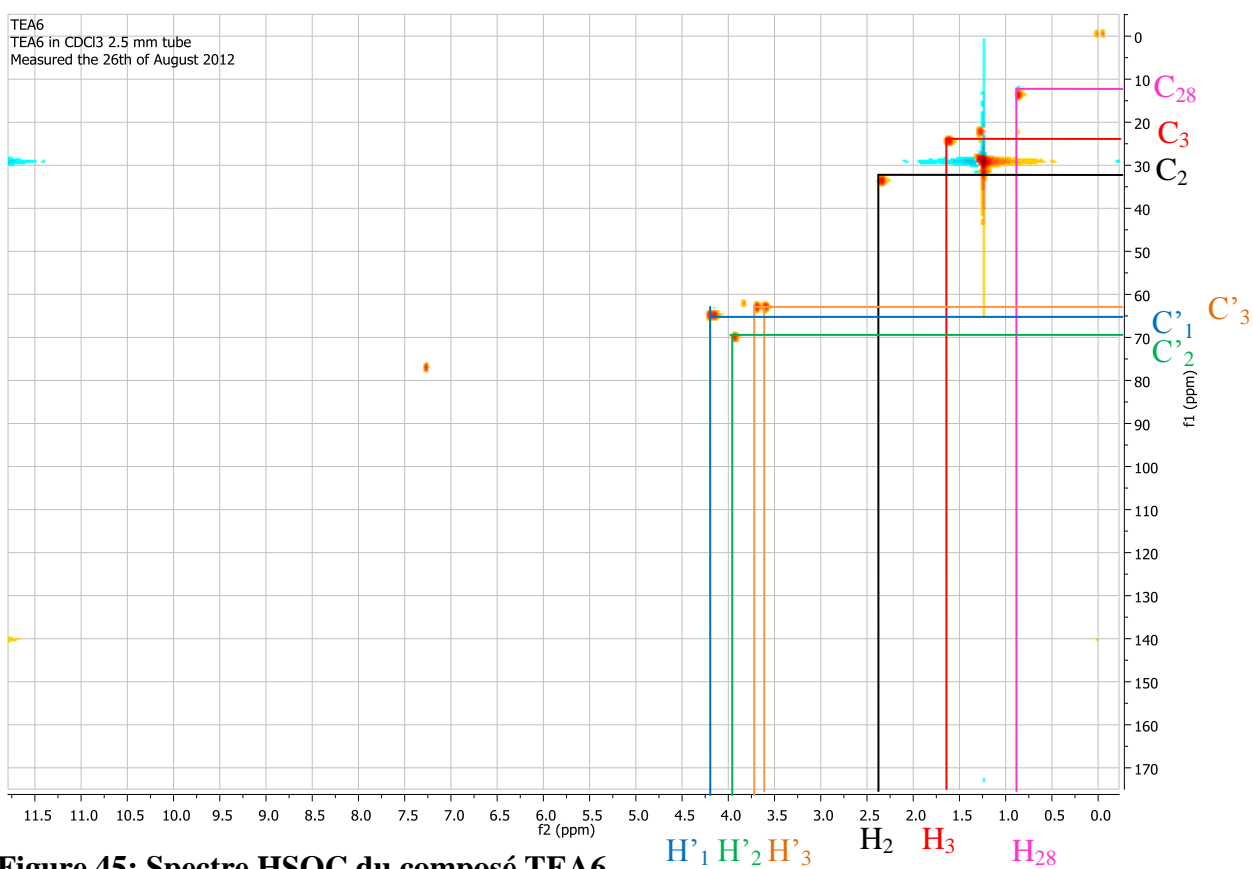


Figure 45: Spectre HSQC du composé TEA6

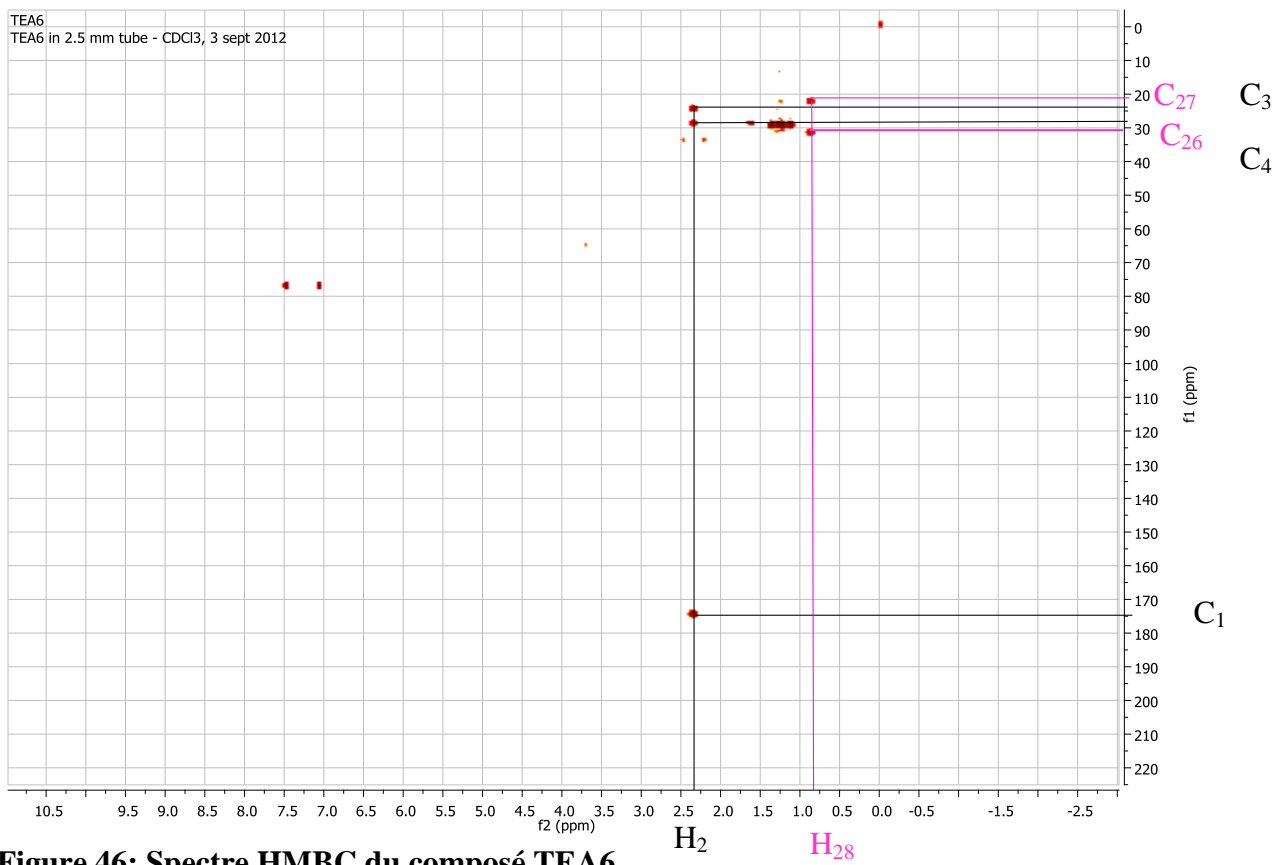
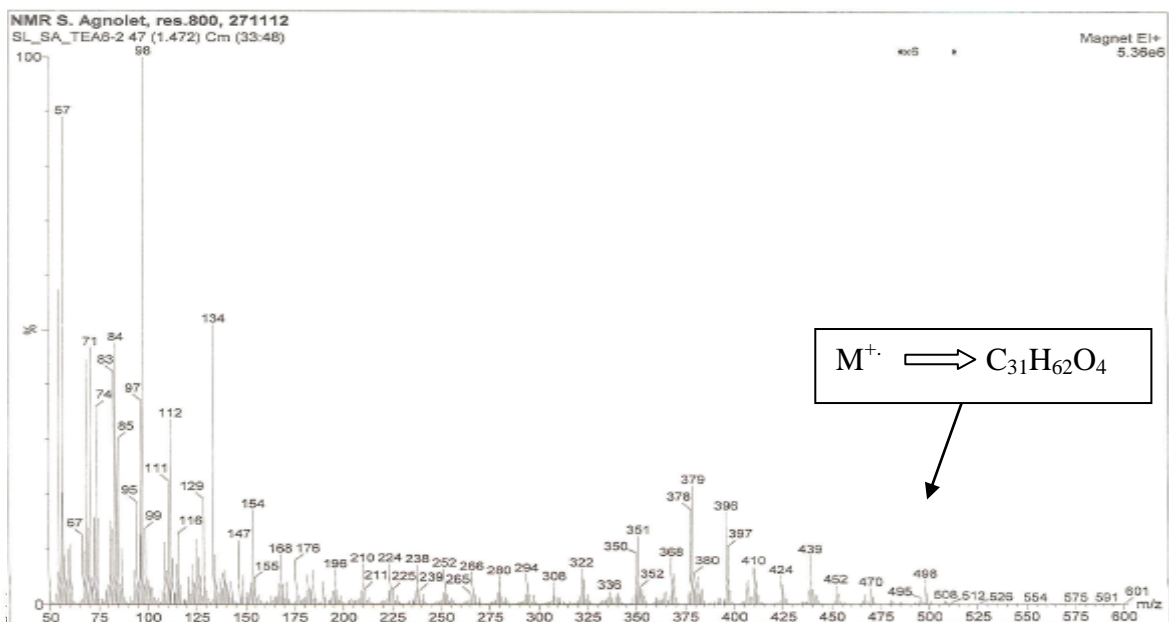
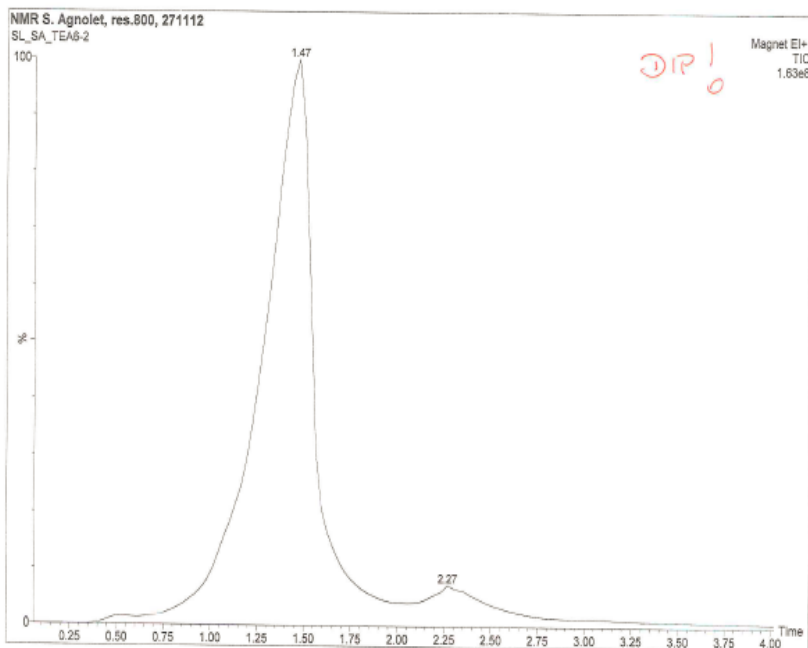


Figure 46: Spectre HMBC du composé TEA6



Heteroatom Max: 20 Ion: Both Even and Odd
Limits:

498.465208	10.0	-0.5	0	0	0
Mass	PM	nDa	Calc. Mass	DBE	C H O
498.465208	-0.8	-0.4	498.464811	1.0	31 62 4

Figure 47: Spectre CG- SM du composé TEA6

II.3. Etude de quelques *Aframomum* (Zingiberaceae)

II.3.1. Extraction et isolement des produits de *Aframomum daniellii*

Les fruits d'*Aframomum daniellii* ont été récoltés à Sonbegué, localité située à Edéa en mars 2008 par M. Nana de l'Herbier National. Ces fruits ont été respectivement identifiés par le Pr. Bonaventure Sonké et M. Koufani Anaclet de l'Herbier National du Cameroun où des échantillons sont déposés.

Les graines de *Aframomum daniellii* pulvérisées ont donné une pâte de 503g. La pâte obtenue a été extraite à chaud dans l'hexane à l'aide d'un Soxhlet. Après évaporation sous pression réduite à 70°C, nous avons obtenu 40g d'extrait brut. Cet extrait a été filtré afin de séparer le dépôt solide [S₁] de masse 5g du filtrat. Une deuxième filtration nous a permis d'obtenir un dépôt solide [S₂] de masse 1g. La purification de [S₁] par chromatographie sur colonne ouverte nous a permis d'isoler le composé majoritaire Aframodial (**95**).

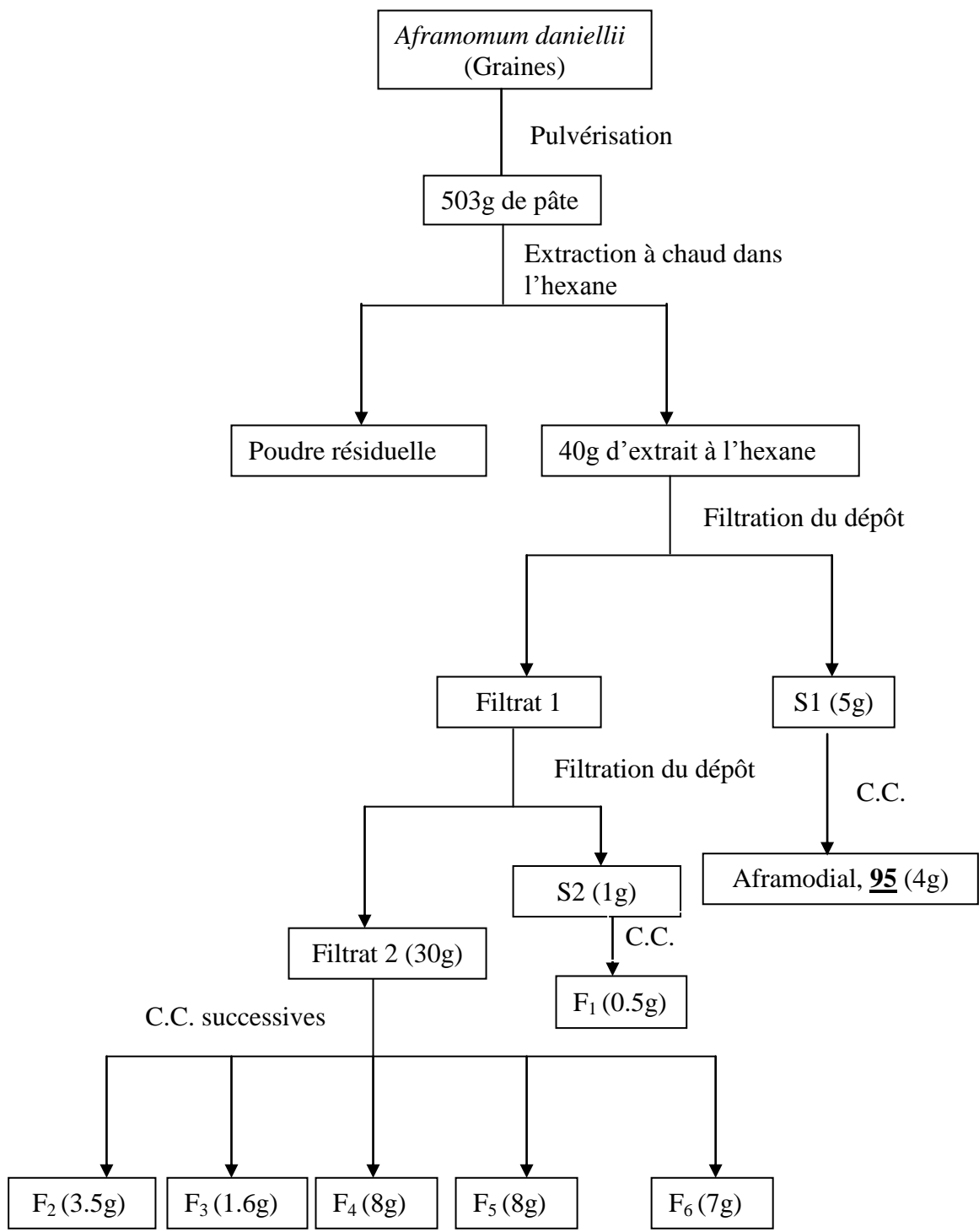


Schéma 14: Protocole d'isolement des produits de *Aframomum daniellii*

II.3.2. Caractérisation du composé AD1

Le composé **AD1** est un solide qui cristallise sous forme d'aiguilles blanches. Il est soluble au dichlorométhane, à l'acétate d'éthyle et au méthanol. Il fond entre 90 et 92°C. Il réagit négativement aux tests caractéristiques des triterpènes, des stérols, des flavonoïdes et des alcaloïdes. Il décolore l'eau de brome, ce qui suggère la présence de liaisons oléfiniques (double ou triple), et il réagit positivement au test à la 2,4-dinitrophénylhydrazine caractéristique des carbonyles.

L'analyse du spectre IR (Figure 48) du composé **AD1** nous montre des bandes d'absorption caractéristiques : des doubles liaisons à 1645.64 cm⁻¹, des aldéhydes simples et conjugués respectivement à 1725.25 et 1674.82 cm⁻¹, et enfin des liaisons C_{sp3}-H à 2925.52 cm⁻¹.

Sur le spectre RMN ¹³C complètement découplé (Figure 49) du composé **AD1**, on dénombre les signaux de 20 atomes de carbone. Le spectre DEPT (Figure 50) nous permet de constater d'une part qu'entre 15 et 50 ppm, nous avons 3 méthyles et 8 méthylènes, d'autre part nous avons entre 50 et 197 ppm 5 méthynes dont 3 hybridés sp² et 2 hybridés sp³. Les informations ci-dessus nous permettent de proposer la formule brute C₂₀H₃₀O_x ayant 6 insaturations. La présence des oxygènes est confortée d'une part, par la présence du signal à 49.84 ppm attribuable au méthylène d'un époxyde, et d'autre part, grâce aux signaux à 196.71 et 196.74 ppm attribuables à deux carbonyles.

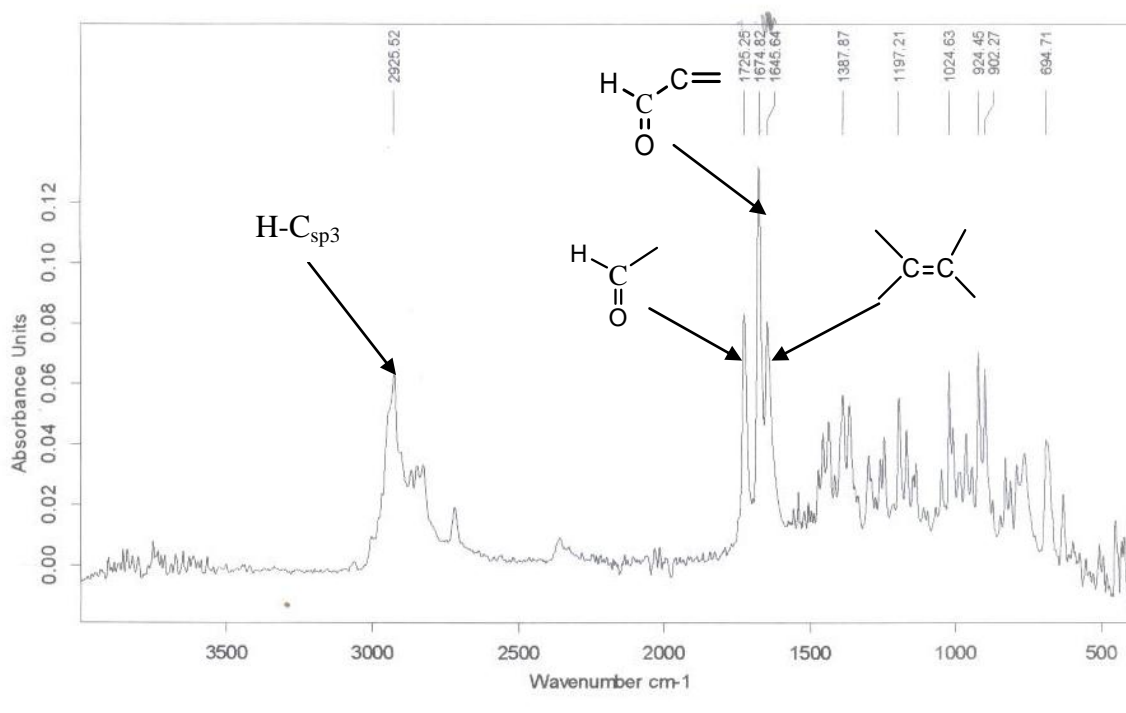


Figure 48: Spectre IR du composé AD1

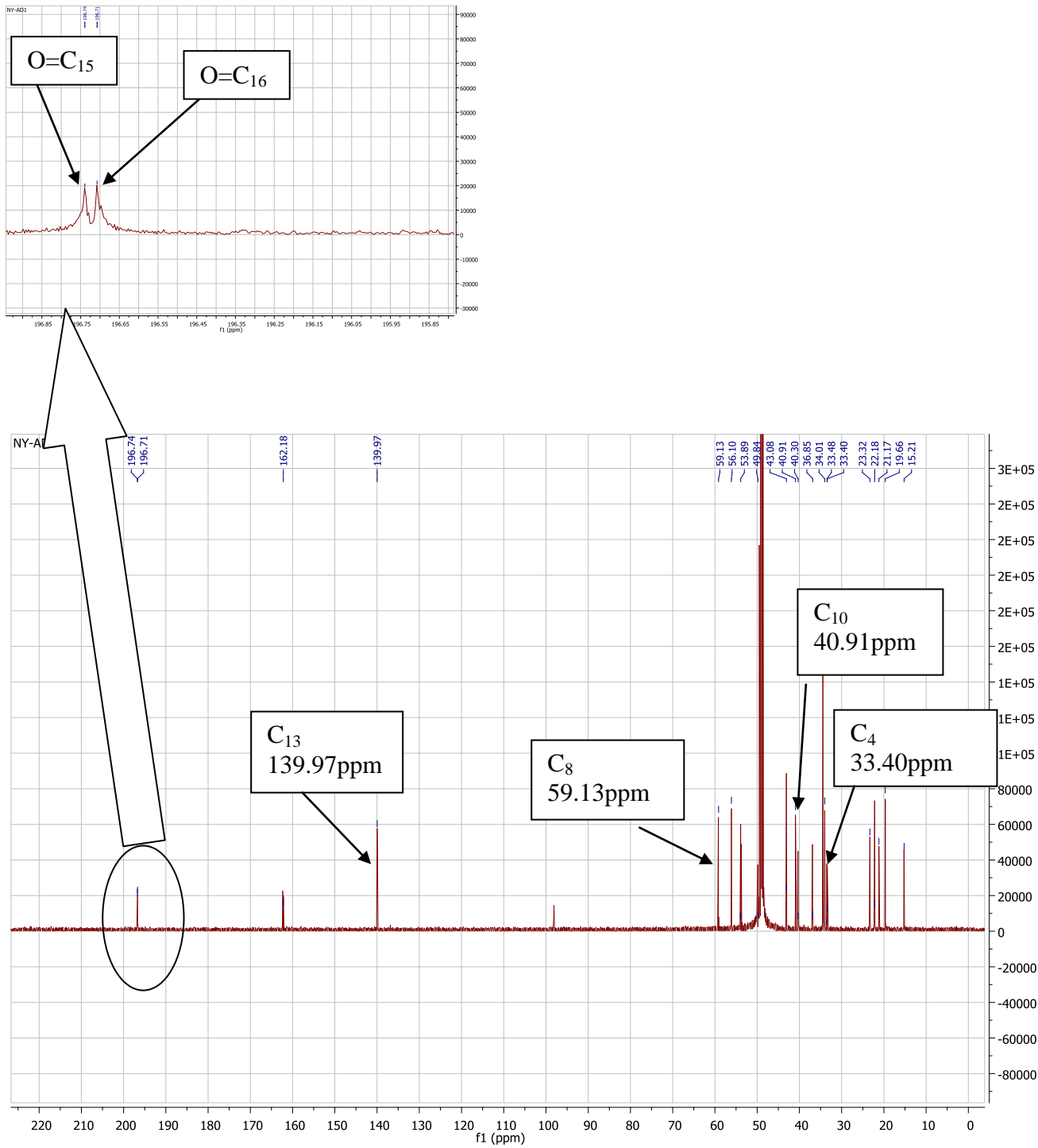


Figure 49: Spectre RMN ^{13}C du composé AD1

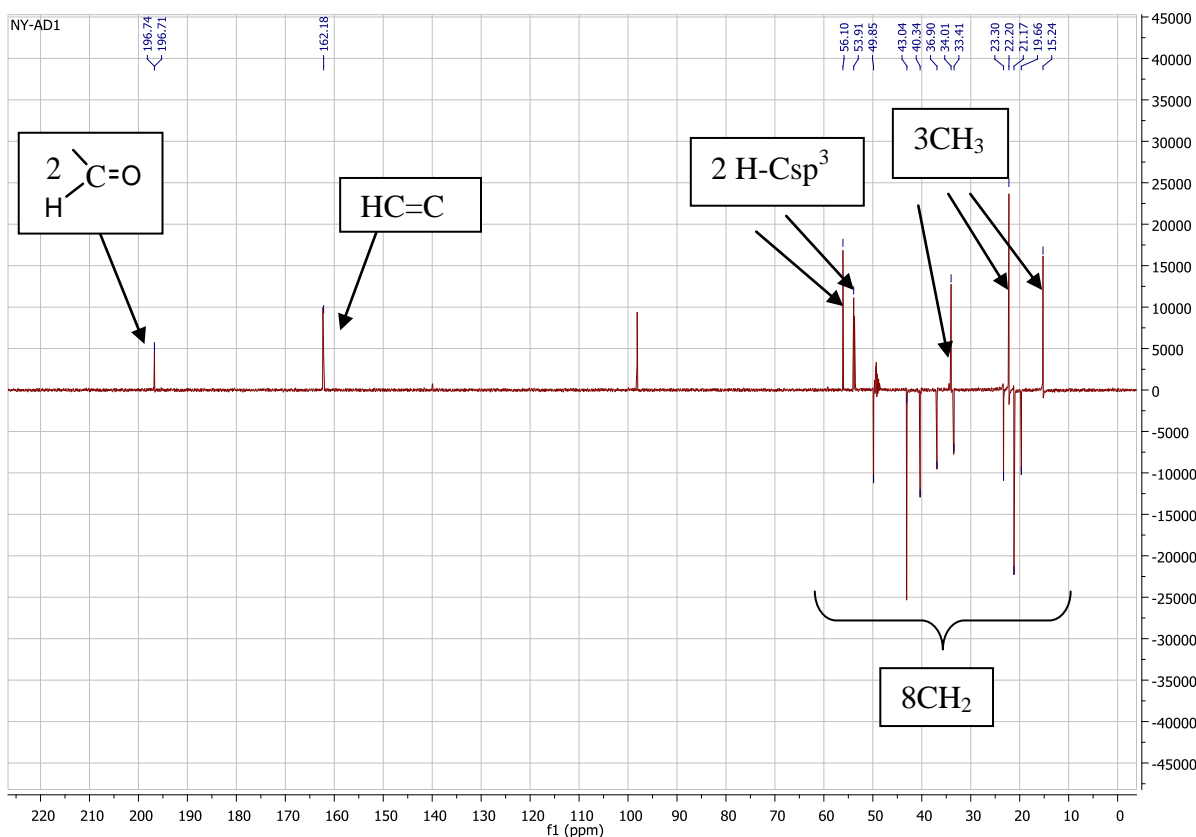


Figure 50: Spectre DEPT du composé AD1

Sur le spectre RMN ¹H (Figure 51), nous observons la présence à 6.63 ppm d'un signal attribuable à 1 proton éthylénique ; le signal à 9.30 ppm serait celui des 2 protons des aldéhydes dont les carbones résonnent à 196.71 et 196.74 ppm. Sur ce même spectre, nous observons les signaux de 3 méthyles résonnant entre 0.85-1.1 ppm

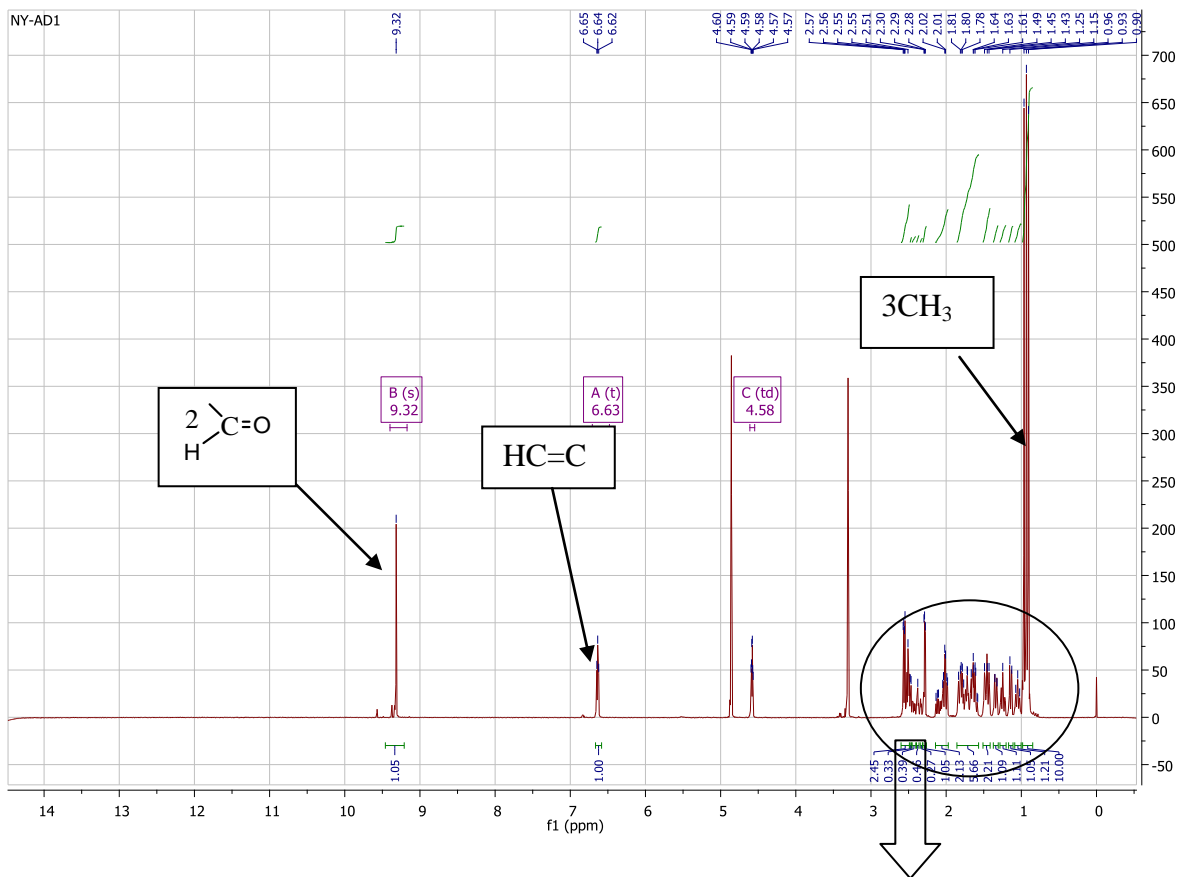


Figure 51: Spectre RMN ^1H du composé AD1

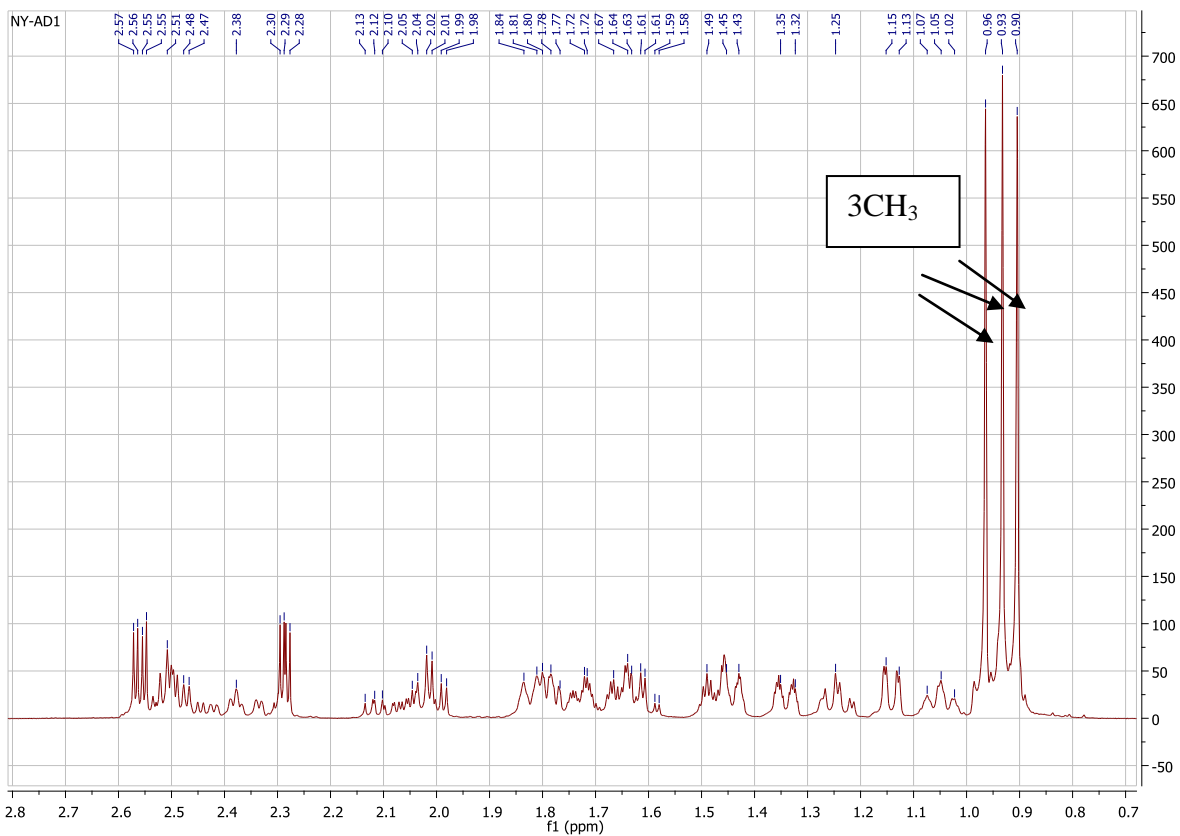


Figure 52: Spectre élargi RMN ^1H du composé AD1

Sur le spectre HSQC (Figure 53), nous observons la corrélation entre le proton résonnant à 6.63 ppm et le carbone apparaissant à 162.18ppm. De même nous observons des corrélations entre les protons résonnant à 2.35 et 2.46 ppm avec le carbone C₁₇ apparaissant à 49.84 ppm.

Sur le spectre HMBC (Figure 54), nous observons d'une part les corrélations entre le proton aldéhydique résonnant à 9.32 ppm et les carbones C₁₂, C₁₃ et C₁₄, et d'autre part la corrélation entre le proton résonnant à 9.31 ppm et le carbone C₁₃.

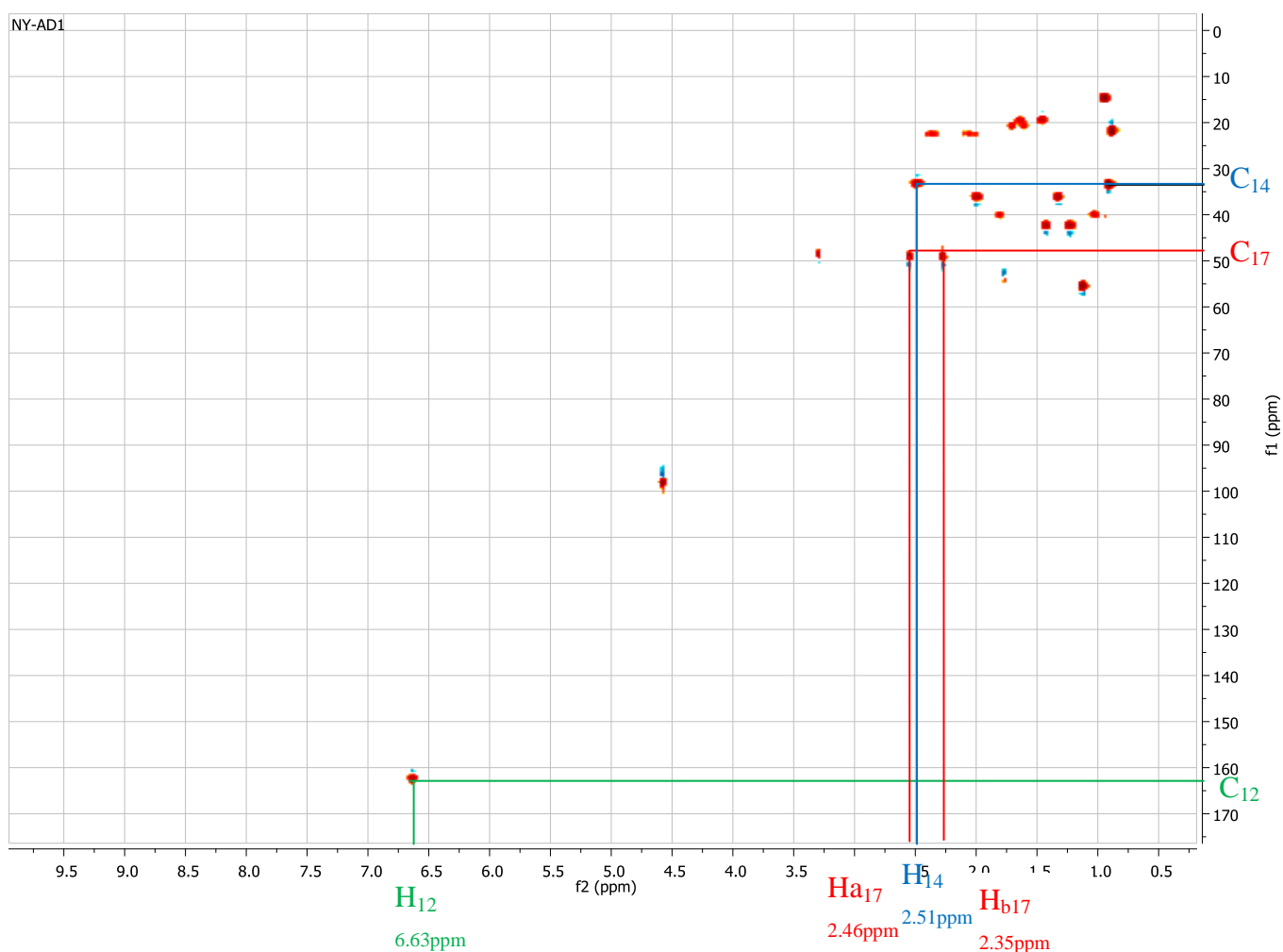


Figure 53: Spectre HSQC du composé AD1

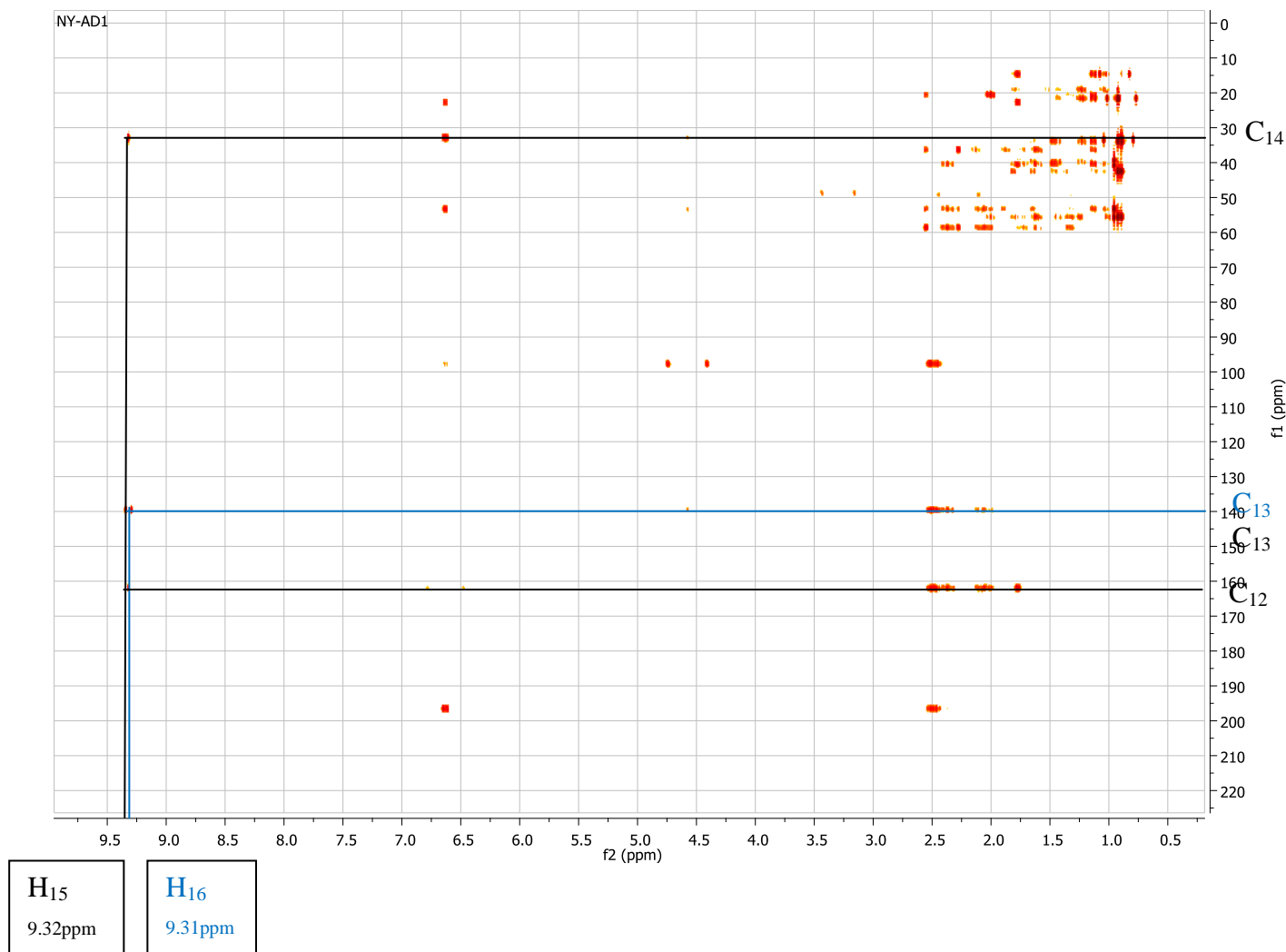


Figure 54: Spectre HMBC du composé AD1

Les travaux de Kimbu et al. (1979 et 1987) nous montrent qu'Aframodial, composé carbonylé et ayant une double liaison, est le composé majoritaire de cette espèce ; la comparaison de nos données spectrales (RMN ^{13}C et ^1H) du composé indexé **AD1** à celles se trouvant dans la littérature (Kimbu et al.,1979 ; Kimbu et al.,1987 ; Nyasse et Ndjakou, 2000) nous a permis d'identifier le composé **AD1** au (E)-8béta(17)-époxyabd-12-ène-15,16-dial connu sous le nom d'aframodial (**95**).

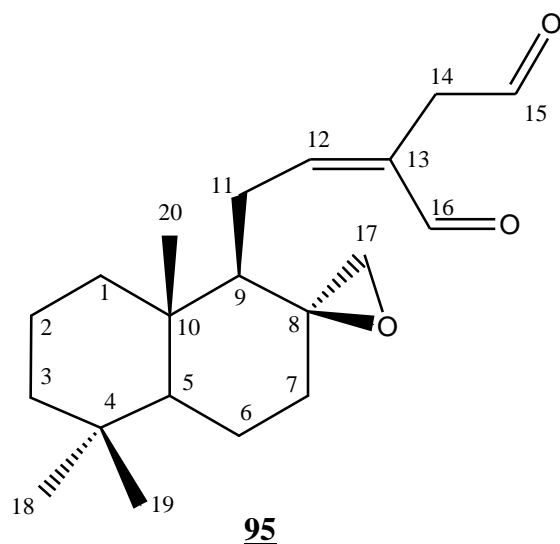


Tableau VIII: Données spectroscopiques de RMN ^{13}C et RMN ^1H du composé AD1

N°Carbone	$\delta\text{-}^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta\text{-}^1\text{H}$ (ppm)	$\delta\text{-}^{13}\text{C}$ (ppm) (Kimbu et al., 1979)
1	40.30	/	39.6
2	19.66	/	18.4
3	36.85	/	42.0
4	33.40	/	33.6
5	56.10	/	52.8
6	21.17	/	20.0
7	43.08	/	39.6
8	59.13	/	57.6
9	53.89	/	55.2
10	40.91	/	40.0
11	23.32	/	22.4
12	162.18	6.63	161.2
13	139.97	/	136.0
14	34.0	2.51	36.0
15	196.74	9.32	198.0
16	196.71	9.31	194.0
17	49.84	2.35/2.46	48.8
18	33.48	0.93	33.6
19	22.18	0.90	21.6
20	15.21	0.96	14.8

II.3.3. Réduction du composé 95 (AD1) et caractérisation du composé réduit

II.3.3.1. Réduction du composé 95 par le NaBH_4

Le composé 95 (100mg, 0.314mmol) est dissout dans 30 ml de méthanol et agité à température ambiante avec un excès de NaBH_4 pendant 2h. La réaction est arrêtée par ajout de 50ml d'eau et le milieu réactionnel est extrait avec le dichlorométhane. La phase organique est séchée avec le Na_2SO_4 (Rosselli et al., 2007). Le résidu obtenu a été purifié par

chromatographie sur colonne en utilisant comme système d'éluion des portions croissantes d'acétate d'éthyle dans l'hexane, et une masse de 90mg du composé **AD1R (147)** a été obtenue.

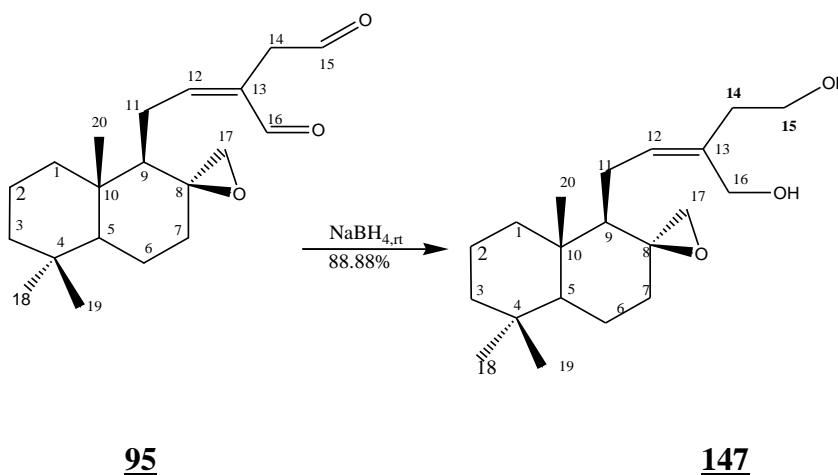


Schéma 15: Réaction de réduction de aframodial par le NaBH_4

II.3.3.2. Caractérisation du composé **147** (AD1R)

Le composé **147** est un solide qui cristallise sous forme d'aiguilles blanches. Il est soluble au dichlorométhane et fond entre 86-88°C. Il répond négativement au test à la 2,4-dinitrophénylhydrazine caractéristique des carbonyles, ce qui suggère la disparition des fonctions carbonyles initialement présentes dans le composé **95**. Il décolore l'eau de brome, ce qui suggère la présence de la double liaison contenue dans le composé **95**.

Le spectre IR (Figure 55) confirme la présence des hydroxyles (3242, 1041.60, 1000.84-970 cm^{-1}), de l'époxyde (2995, 1202.75, 900-800 cm^{-1}) et des groupements méthyles (1472.42-1432.78 cm^{-1}).

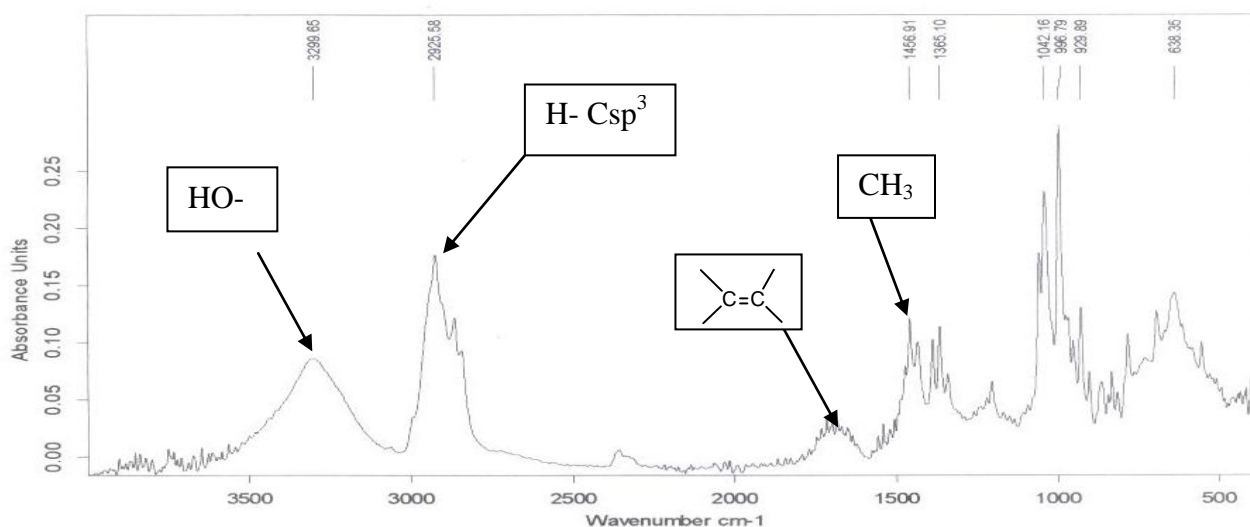


Figure 55: Spectre IR du composé 147

Sur le spectre élargi du carbone (Figure 56), on constate la disparition des pics du composé 95 apparaissant à 196.71 et 196.74 ppm au profit de l'apparition des pics à 61.7 et 68.8 ppm, preuve de la réduction des carbonyles en alcool ; cette réduction est confirmée sur le spectre proton (Figure 58) par le déplacement des pics résonnant à 9.17 et 9.18 ppm vers des champs plus forts (3.48 et 3.86 ppm). On constate également sur le spectre carbone que le carbone résonnant à 34.0 ppm a migré dans des champs légèrement forts (33.5 ppm); cette information suggère la disparition de l'effet de déblindage du cône d'anisotropie du carbonyle en position 14, ce qui est confirmé sur le spectre proton par l'apparition d'un multiplet à 2.2 ppm (Figure 59). Les pics des carbones éthyléniques apparaissent à 133.0 et 137.0 ppm (Figure 57) tandis que le proton du carbone 12 résonne à 5.28 ppm. Le carbone 17 conserve sensiblement la même valeur de déplacement chimique, impliquant la conservation de la fonction époxyde. Toutes ces informations ainsi que celles contenues dans la littérature (Sob et al. 2007, Zhou et al. 1997 et Kenmogné et al. 2006) nous ont permis d'identifier le composé **AD1R** au (E)-8bêta (17) époxylabd-12-ène-15,16-diol (Aframodiol **147**). Les données spectrales du composé 147 sont contenues dans le tableau 9.

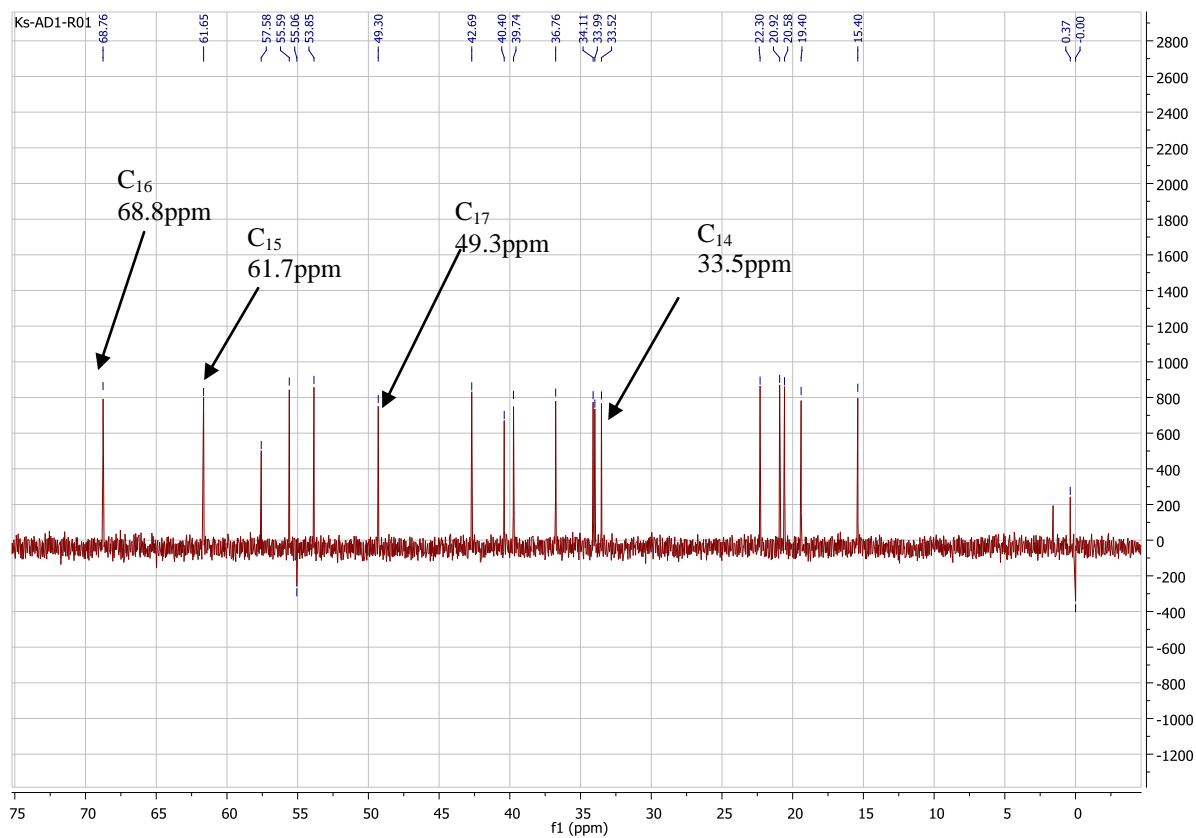


Figure 56: Spectre élargi RMN ^{13}C du composé 147

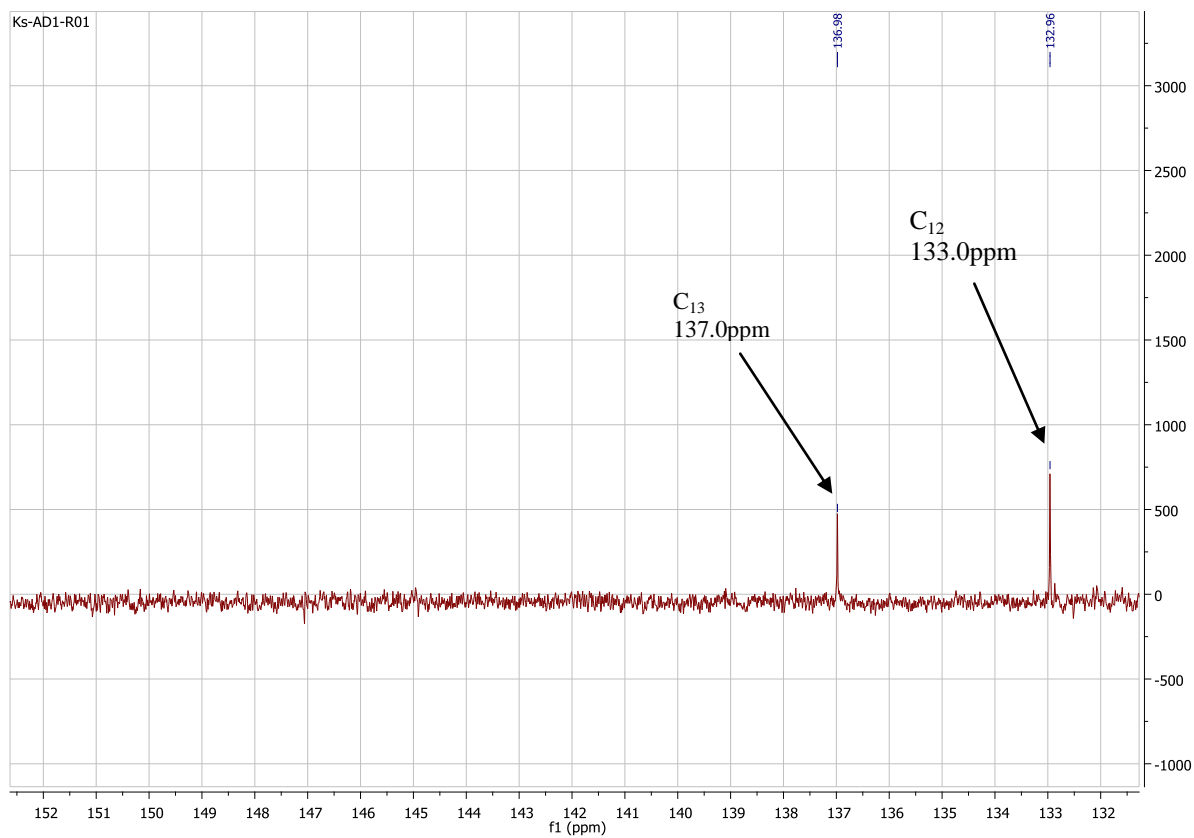


Figure 57: Spectre élargi RMN ^{13}C du composé 147

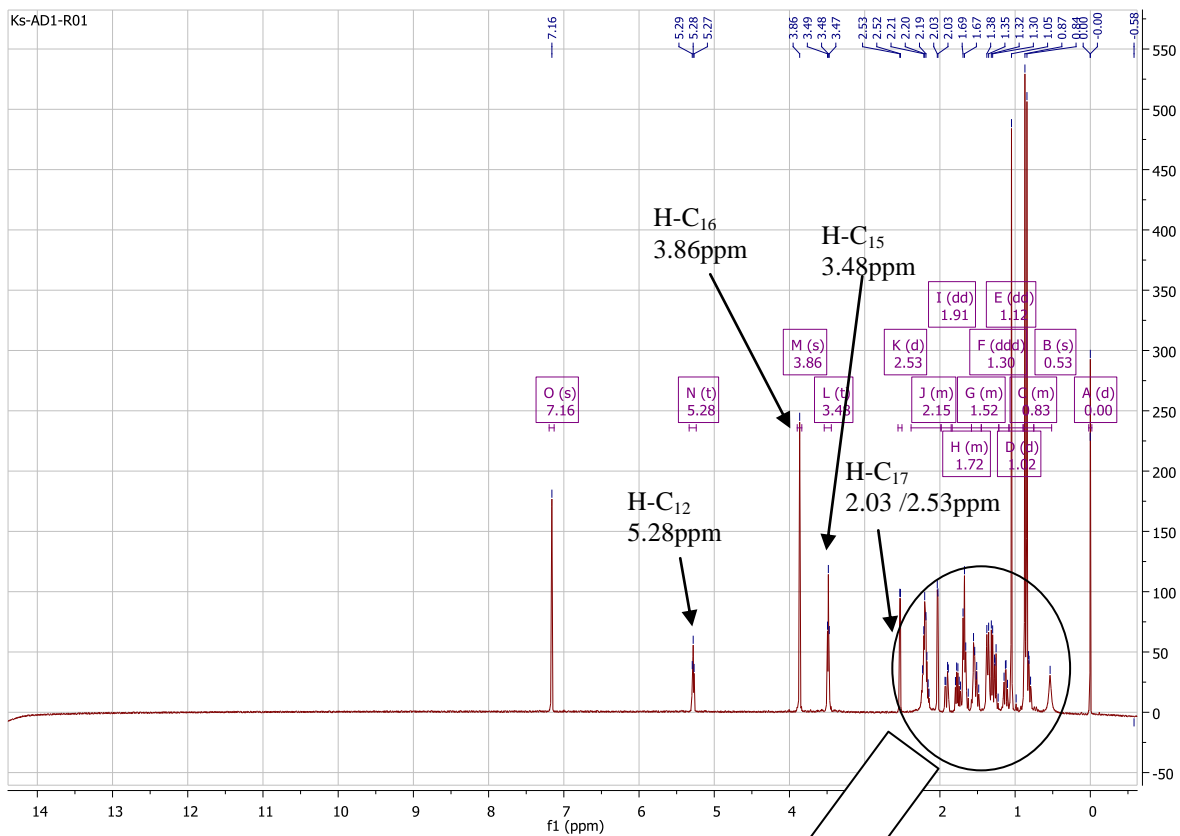


Figure 58: Spectre RMN ^1H du composé 147

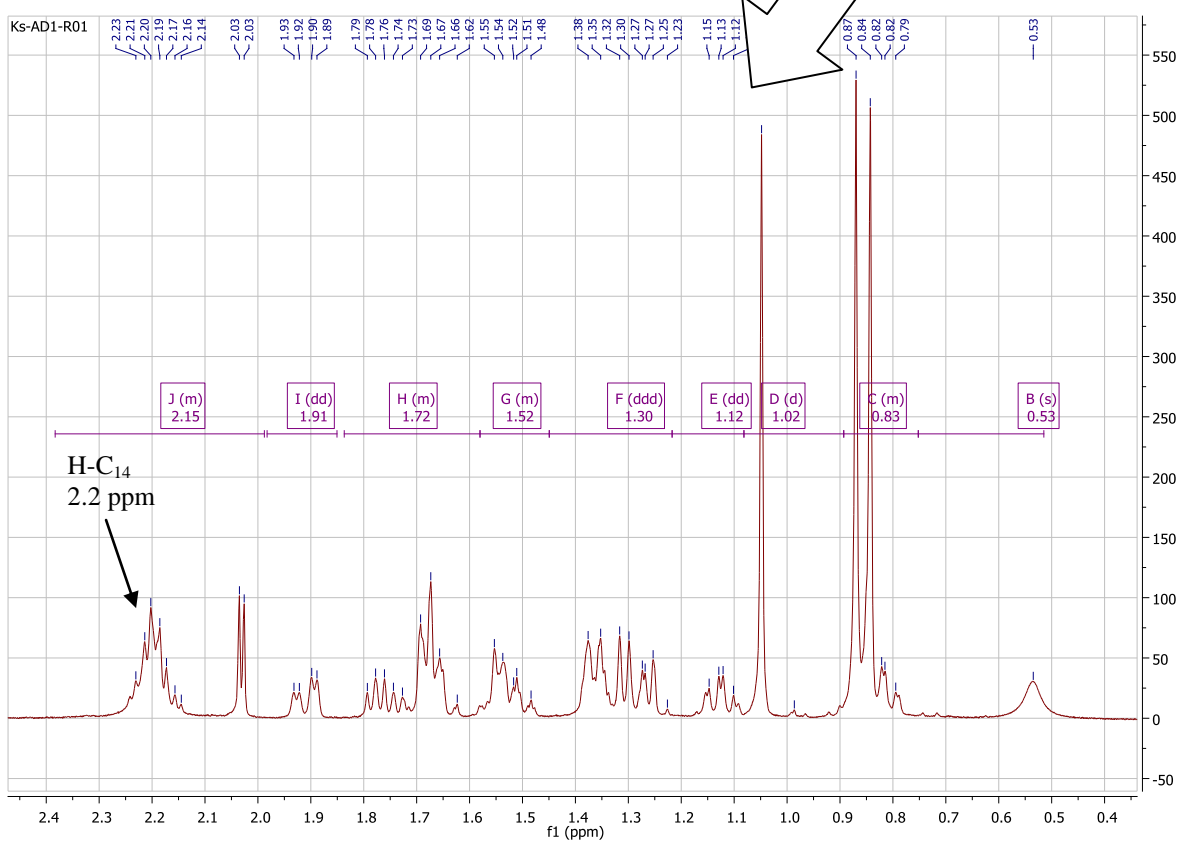
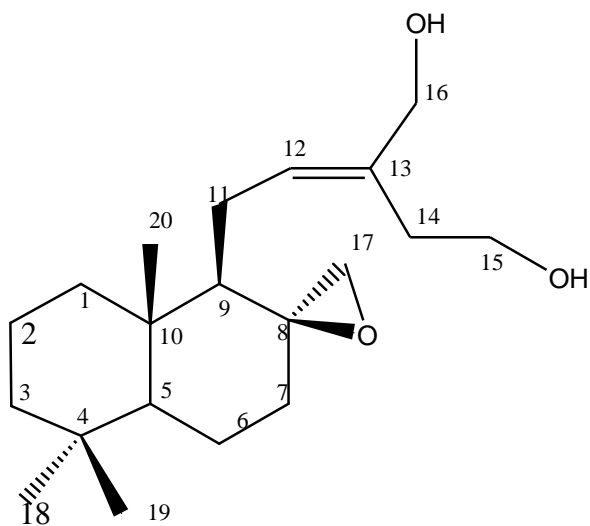


Figure 59: Spectre élargi [0.4-2.4 ppm] RMN ^1H du composé 147



147

Tableau IX: Données spectroscopiques de RMN ¹³C et RMN ¹H du composé 147

N° Carbone	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)
1	39.74	1.68/0.81
2	19.4	1.36/1.53
3	42.7	1.37/1.13
4	34.0	/
5	55.6	0.86
6	20.9	1.55/1.68
7	36.8	1.26/1.68
8	57.6	/
9	53.9	1.31
10	40.4	/
11	20.6	1.77/1.91
12	133.0	5.28
13	137.0	/
14	33.5	2.20
15	61.7	3.48
16	68.8	3.86
17	49.3	2.03/2.53
18	34.1	0.87
19	22.4	0.84
20	15.4	1.05

II.3.3.3. Mécanisme de la réaction du composé AD1 avec le NaBH₄

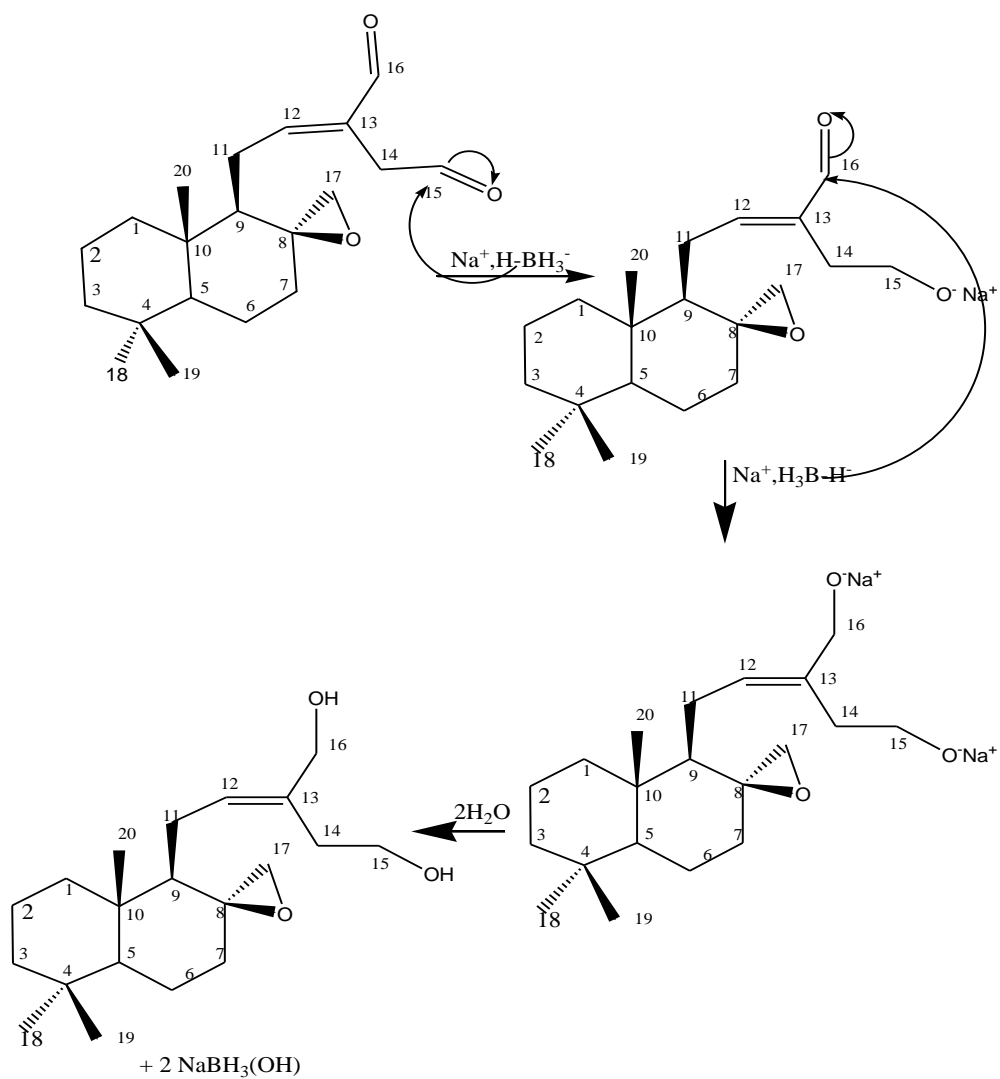


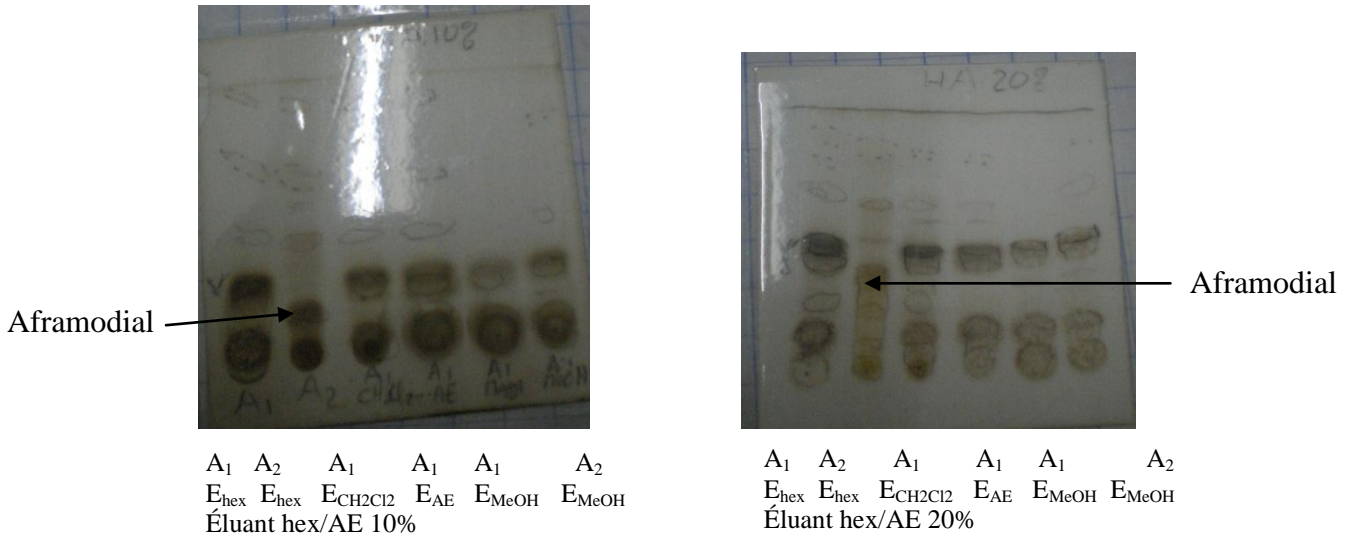
Schéma 16: Mécanisme de la réaction de réduction de aframodial par le NaBH₄

II.3.4. Analyses comparatives des extraits de quelques *Aframomum*

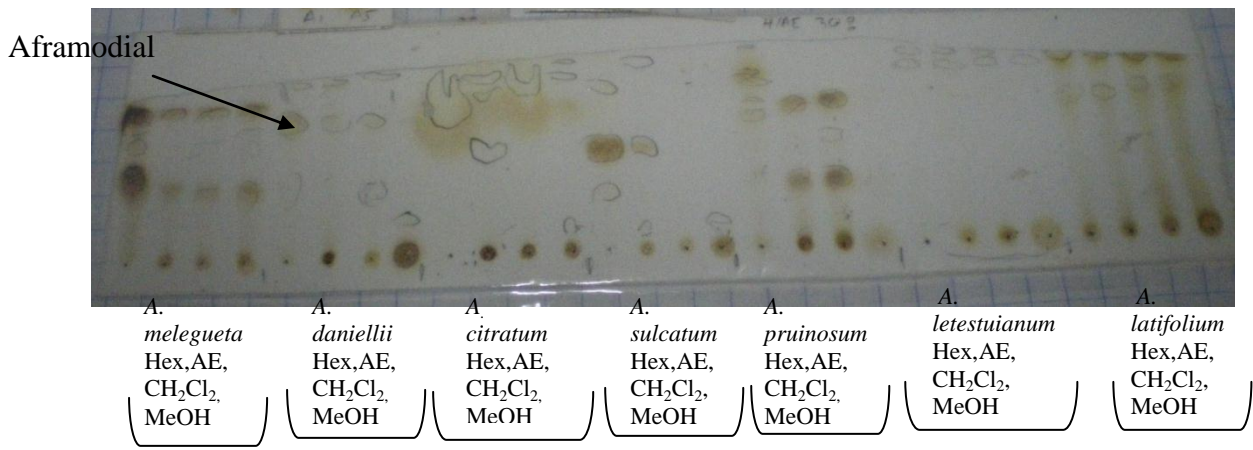
La présence de Aframodial dans *A. daniellii* comme composé majoritaire nous a amené à rechercher ce composé dans d'autres *Aframomum*. C'est ainsi que nous avons extrait les graines de *A. melegueta*, *A. citratum*, *A. sulcatum*, *A. pruinatum*, *A. letestuanum* et *A. kayserianum* ou *A. latifolium*, puis la pulpe des fruits de *A. melegueta*, et enfin les feuilles, tiges et racines de *A. melegueta* et *A. sulcatum* afin de les comparer aux extraits correspondant de *A. daniellii* par CCM ; par ailleurs, nous avons effectué des analyses HPLC dans le but de rechercher d'autres métabolites secondaires des espèces du genre *Aframomum* dont l'obtention est souvent difficile par chromatographie sur colonne.

II.3.4.1. Analyses comparatives des extraits de quelques *Aframomum* par CCM

Une étude comparée des extraits de plusieurs espèces du genre *Aframomum* a été faite afin de détecter la présence éventuelle de Aframodial, composé majoritaire des graines de *Aframomum daniellii*. A cet effet, différentes parties de plusieurs espèces de *Aframomum* à savoir *A. melegueta*, *A. daniellii*, *A. citratum*, *A. sulcatum*, *A. pruinatum*, *A. letestuanum* et *A. kayserianum* ou *A. latifolium* indexés respectivement A₁ à A₇, ont subi des essais d'extraction dans différents solvants organiques et leurs CCM comparées sont présentées dans les chromatogrammes ci-après :



A₁ = *A. melegueta*; A₂ = *A. daniellii*



Éluant: hex /AE 30%

Figure 60: Chromatogrammes des extraits des graines des différents *Aframomum*

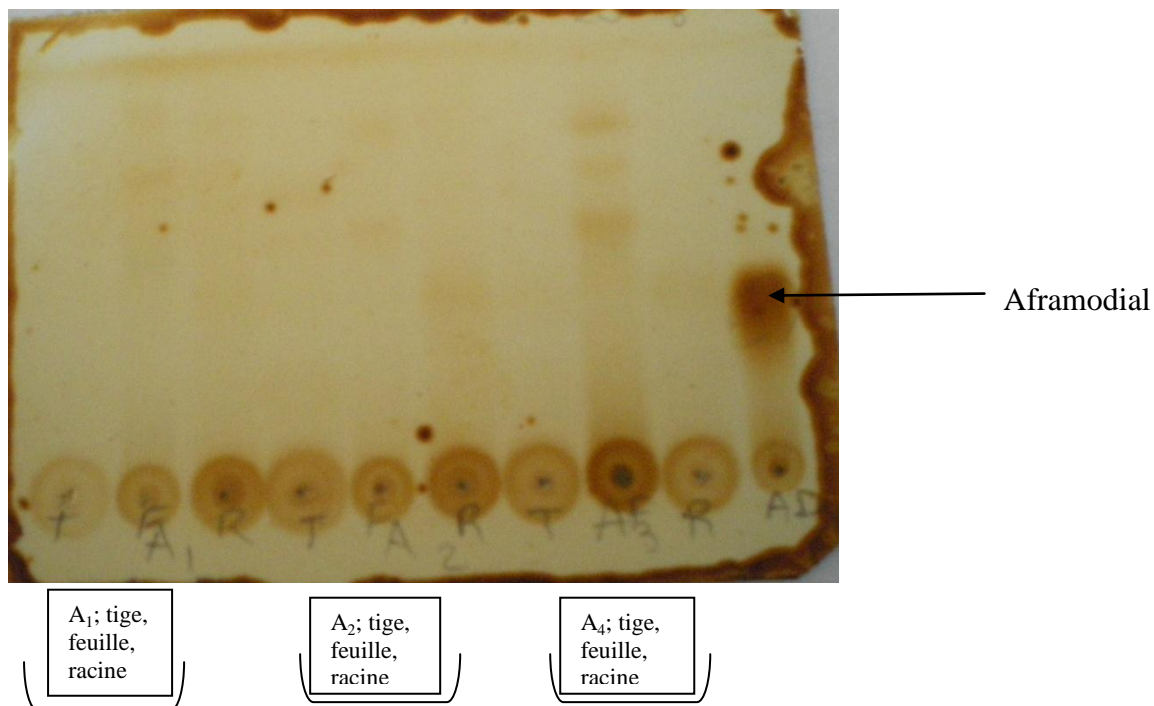


Figure 61: Chromatogramme des extraits méthanoliques des feuilles, tiges et racines de *A. melegueta* (A1), *A. daniellii* (A2) et *A. sulcatum* (A4)

Il ressort des Figures 60 et 61 que les graines de *A. daniellii* sont la partie la plus riche en Aframodial ; ce composé se retrouve également dans les graines des espèces *A. pruinatum* et *A. kaserianum* ; il est en trace dans *A. sulcatum*. Aframodial serait présent en faible proportion dans les racines de *A. daniellii* et de *A. sulcatum*. L'absence d'Aframodial dans les autres espèces rend donc impossible son utilisation comme marqueur taxonomique.

Afin de compléter notre étude phytochimique, nous avons entrepris des analyses HPLC-MS de quelques extraits d'*Aframomum* en notre possession.

II.3.4.2. Analyse HPLC-MS comparatives des extraits de quelques *Aframomum* du Cameroun

Les analyses par Chromatographie en phase liquide couplée à la Spectroscopie de Masse (HPLC-MS) des extraits de 7 espèces d'*Aframomum* du Cameroun indexés de A₁ à A₇ ont été faites dans le but de rechercher d'autres métabolites secondaires contenus dans leurs différentes parties : il s'agit des graines pour les 7 espèces à savoir *A. melegueta* (A₁), *A. daniellii* (A₂), *A. citratum* (A₃), *A. sulcatum* (A₄), *A. pruinatum* (A₅), *A. letestuanum* (A₆) et *A. kayserianum* ou *A. latifolium* (A₇), de la pulpe, des feuilles, des racines et des tiges pour A₁, A₂ et A₄. L'extrait de référence est un extrait de *A. melegueta* déjà caractérisé par les analyses couplées HPLC-MS.

II.3.4.2.1. Analyse HPLC-MS comparatives des extraits de graines de quelques *Aframomum* du Cameroun

Les chromatogrammes HPLC-MS des extraits des graines des différents *Aframomum* en notre possession sont représentés par les figures 62 à 66 ci-dessous.

L'analyse de la figure 62 nous montre plusieurs pics parmi lesquels trois ayant pour temps de retention les valeurs 28.452 min, 33.723 min et 35.452 min, appartenant aux extraits des graines de *A. melegueta*. Les ions moléculaires obtenus en mode ESI (-) des composés ayant pour temps de retention les valeurs 28.452 min, 33.723 min et 35.452 min apparaissent à m/z 293, 275 et 277 respectivement. Une comparaison de nos valeurs avec celles de notre échantillon de référence (*A. melegueta*) nous révèle que les pics dont les temps de retention sont 28.452 min, 33.723 min et 35.452 min correspondent au 6-gingérol (**122**), 6-shogaol (**121**) et au 6-paradol (**119**) respectivement.

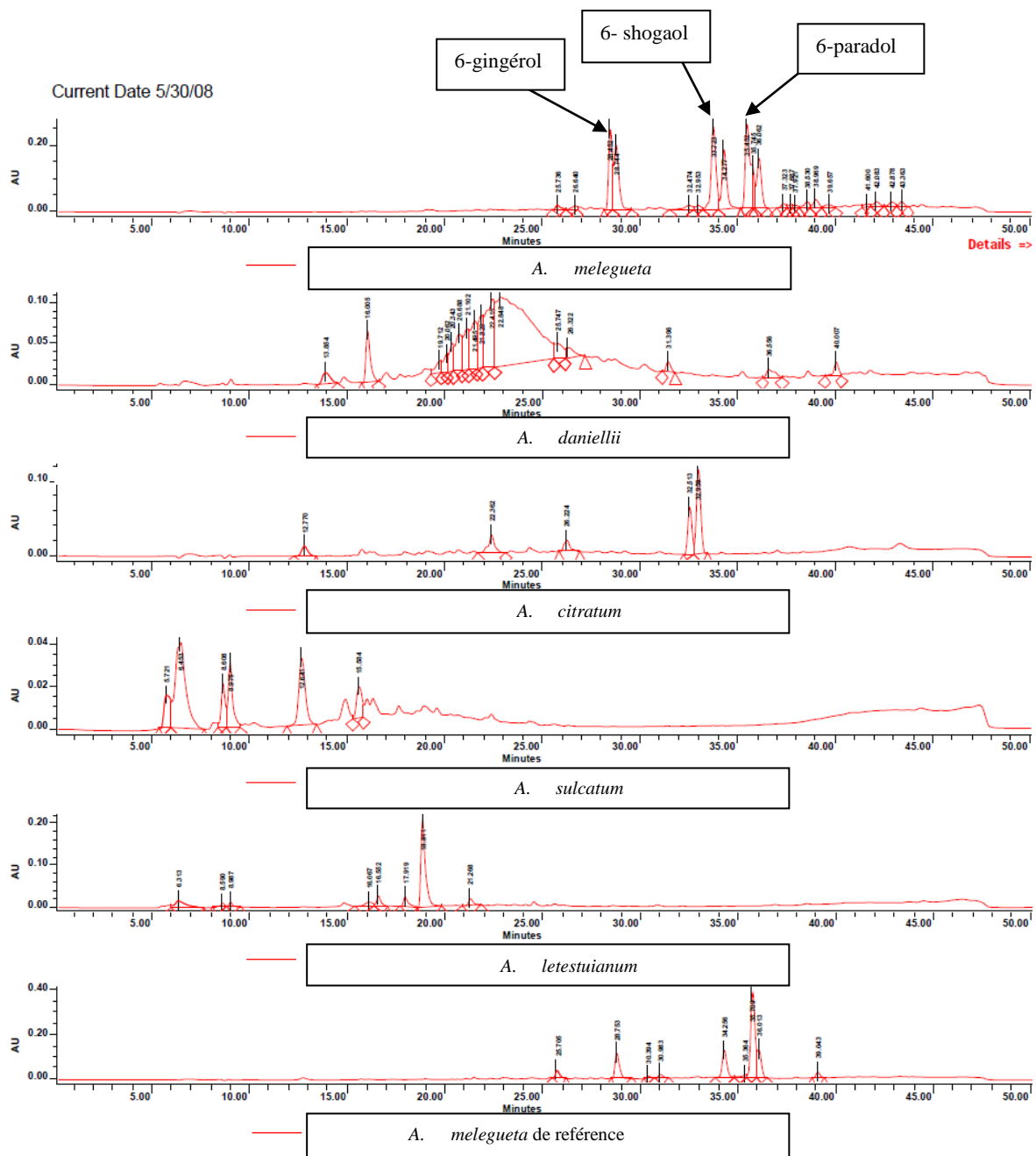


Figure 62: Chromatogrammes HPLC des extraits de graines de *A. melegueta*, *A. daniellii*, *A. citratum*, *A. sulcatum*, *A. letestiuanum* et de *A. melegueta* de référence

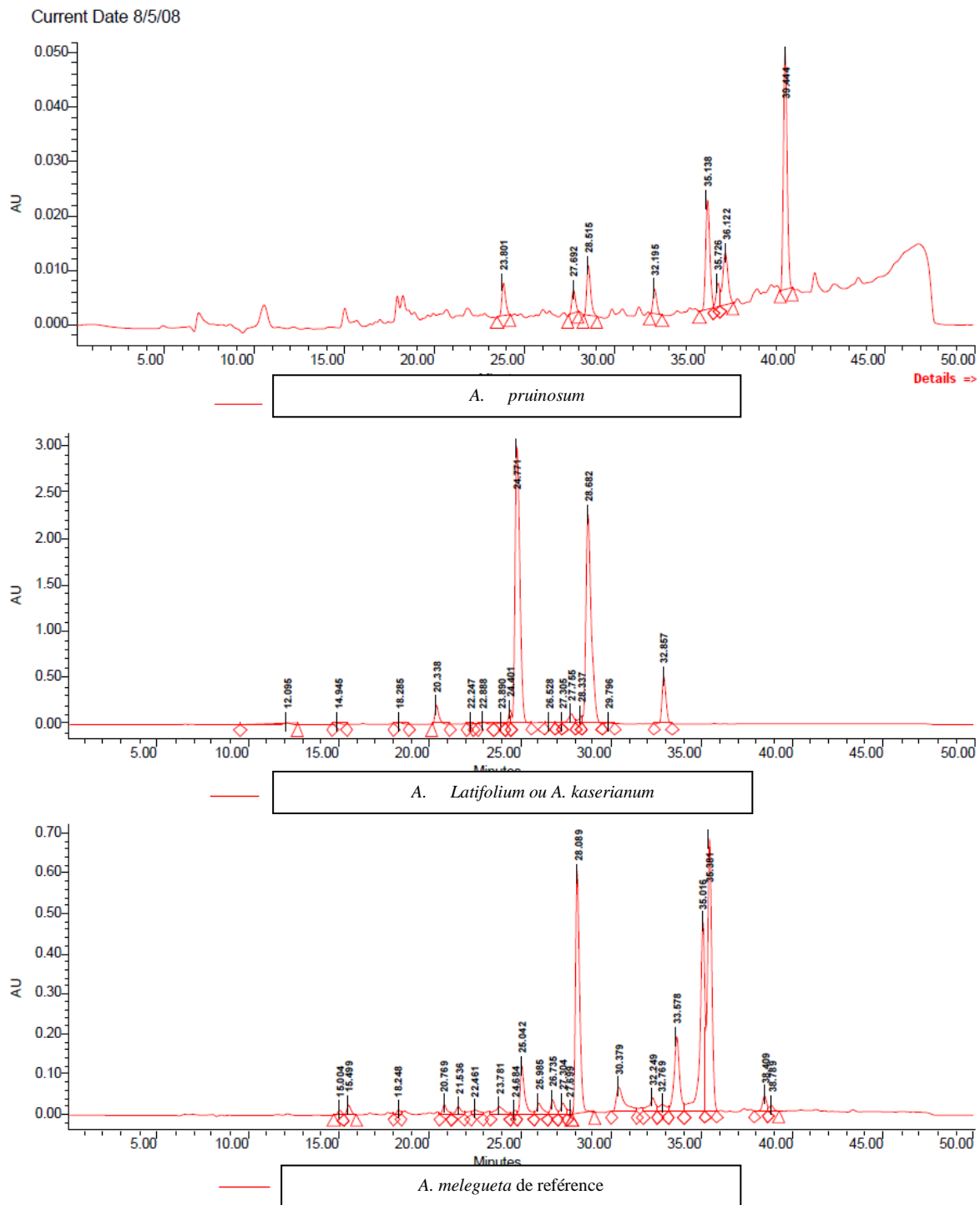


Figure 63: Chromatogrammes HPLC des extraits de graines de *A. pruinatum*, *A. latifolium* ou *kaserianum* et de *A. melegueta* de référence

Chromatogram Plots

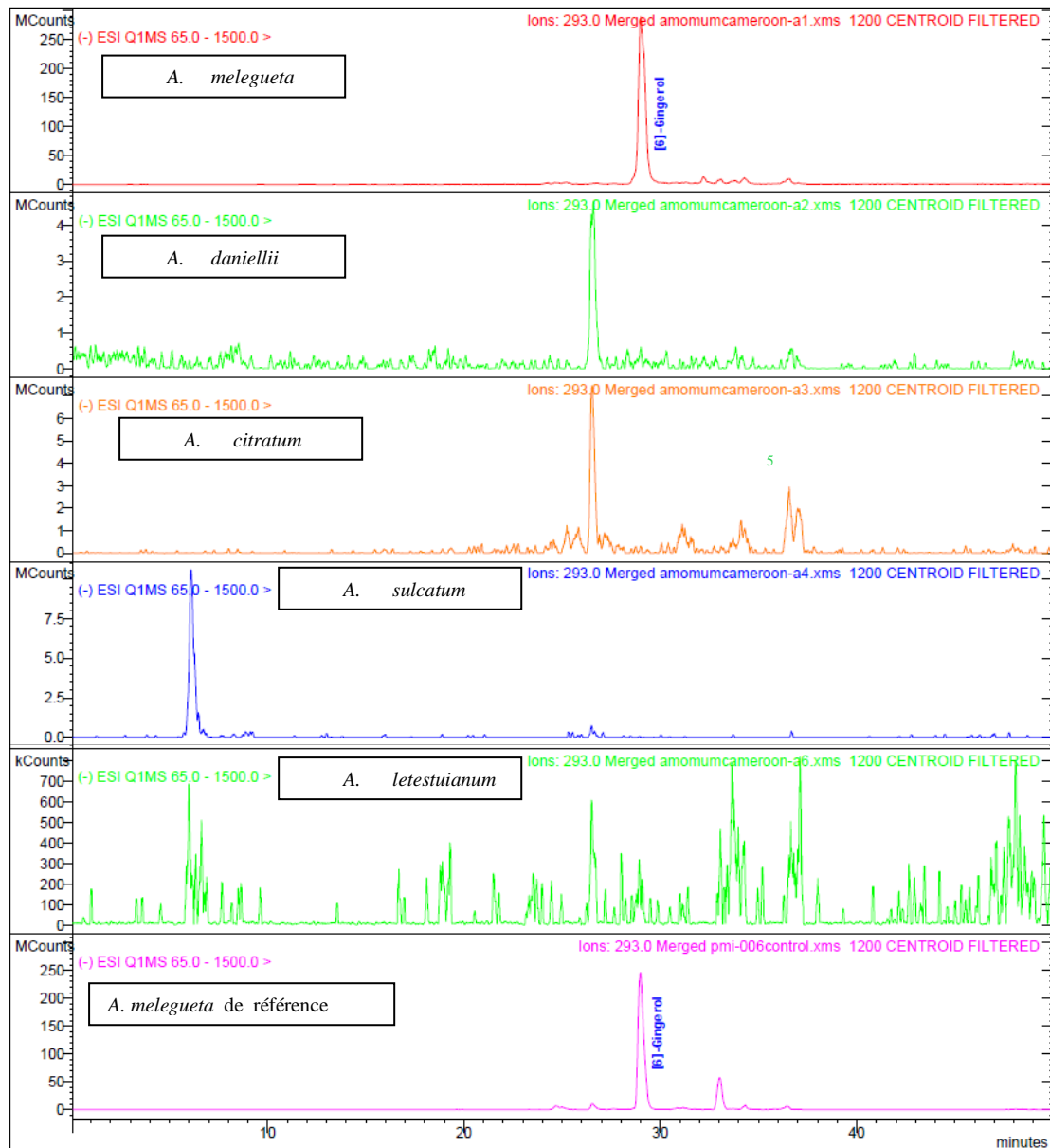


Figure 64: Chromatogrammes HPLC-MS 1 des extraits de graines de *A. melegueta*, *A. daniellii*, *A. citratum*, *A. sulcatum*, *A. letestuanum* et de *A. melegueta* de référence

Chromatogram Plots

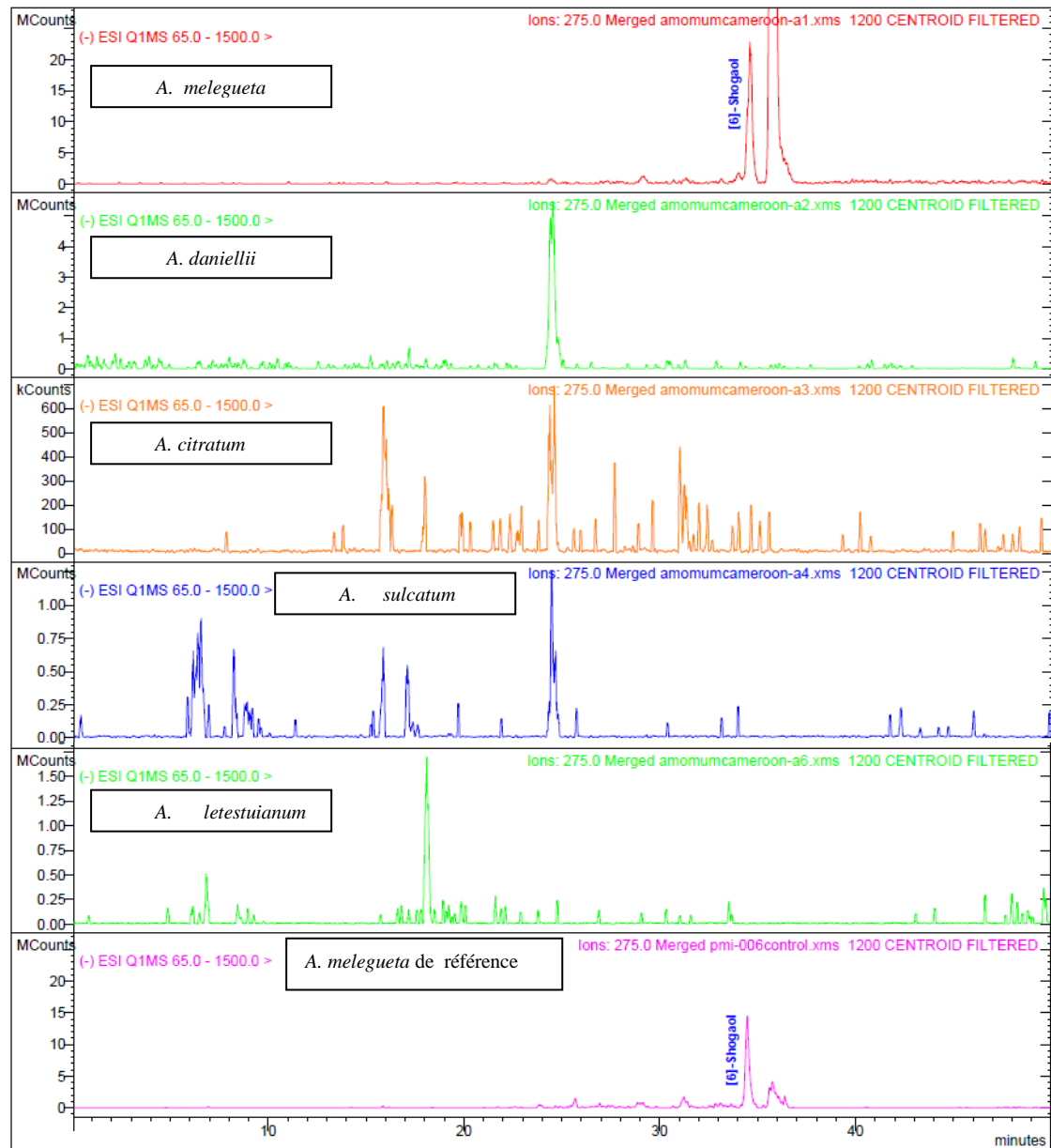


Figure 65: Chromatogrammes HPLC-MS 2 des extraits de graines de *A. melegueta*, *A. daniellii*, *A. citratum*, *A. sulcatum*, *A. letestuianum* et de *A. melegueta* de référence

Chromatogram Plots

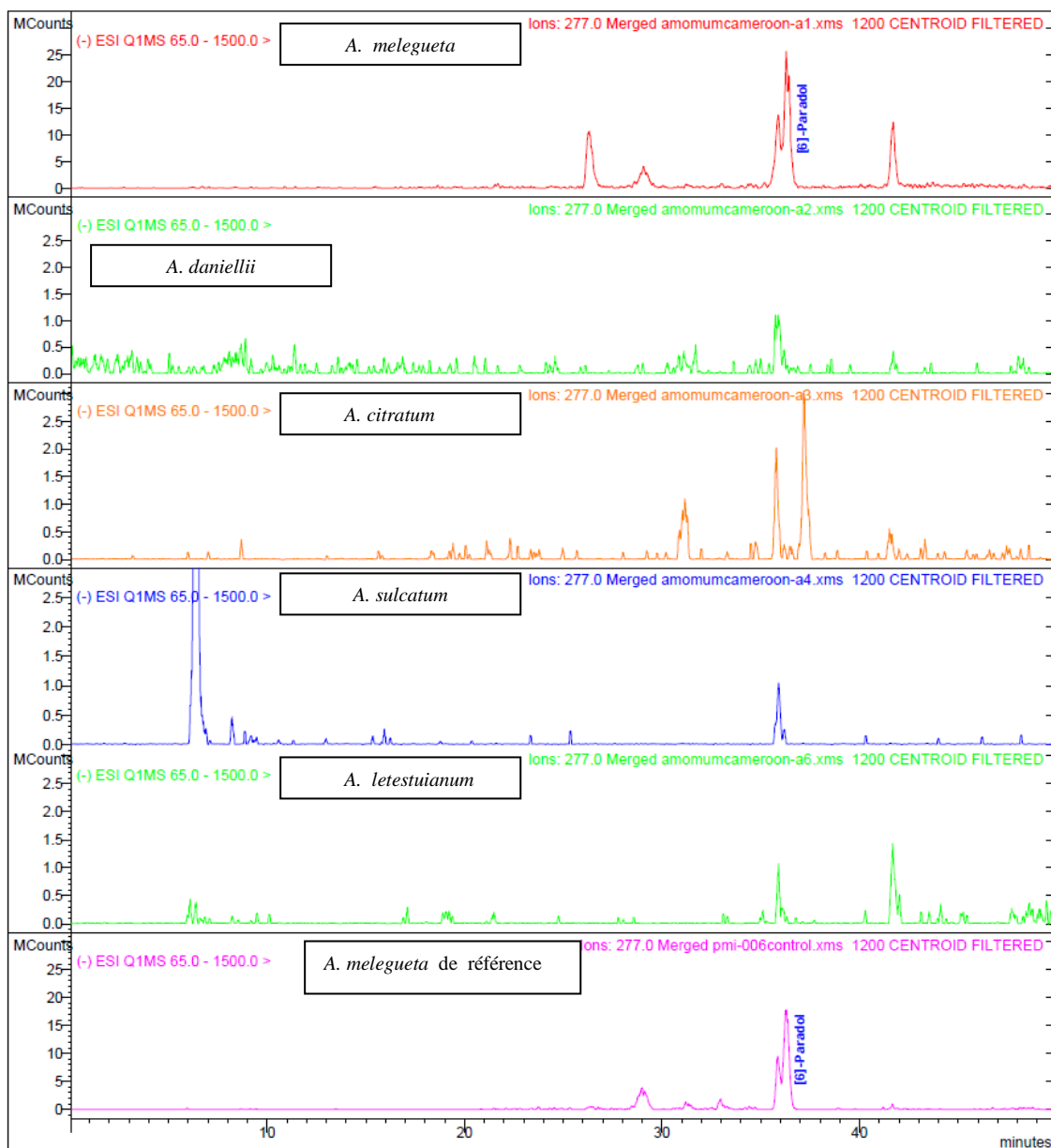


Figure 66: Chromatogrammes HPLC-MS 3 des extraits de graines *A. melegueta*, *A. daniellii*, *A. citratum*, *A. sulcatum*, *A. letestuianum* et de *A. melegueta* de référence

II.3.4.2.2. Analyse HPLC-MS des extraits de la pulpe des fruits de *Aframomum melegueta* (A₁) et de *Aframomum daniellii* (A₂)

Les chromatogrammes HPLC-MS des extraits de la pulpe des fruits de *A. melegueta* et de *A. daniellii* sont représentés par les figures 67 et 68 ci-dessous.

L'analyse de ces chromatogrammes nous révèle par comparaison de nos valeurs à celles de l'extrait de *A. melegueta* utilisé comme référence, la présence du 6-gingérol (**122**) dans les extraits hexaniques et méthanoliques de la pulpe de ces deux espèces d'*Aframomum* (Figures 67 et 68), alors que le 6-shogaol et le 6-paradol en sont absents.

Les extraits hexaniques de A₁ et A₂ contiennent respectivement 1.57 μg et 3.32 μg de 6-gingérol par gramme d'extrait tandis que leurs extraits méthanoliques en contiennent respectivement 1.26 μg et 0.91 μg. Il s'avère donc que l'extrait hexanique de la pulpe des fruits de A₂ est une source importante de 6-gingérol.

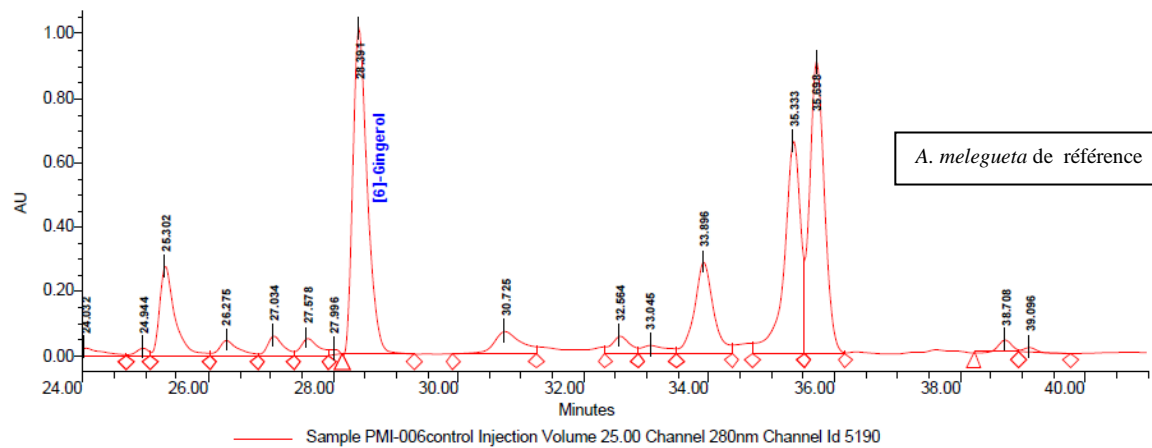
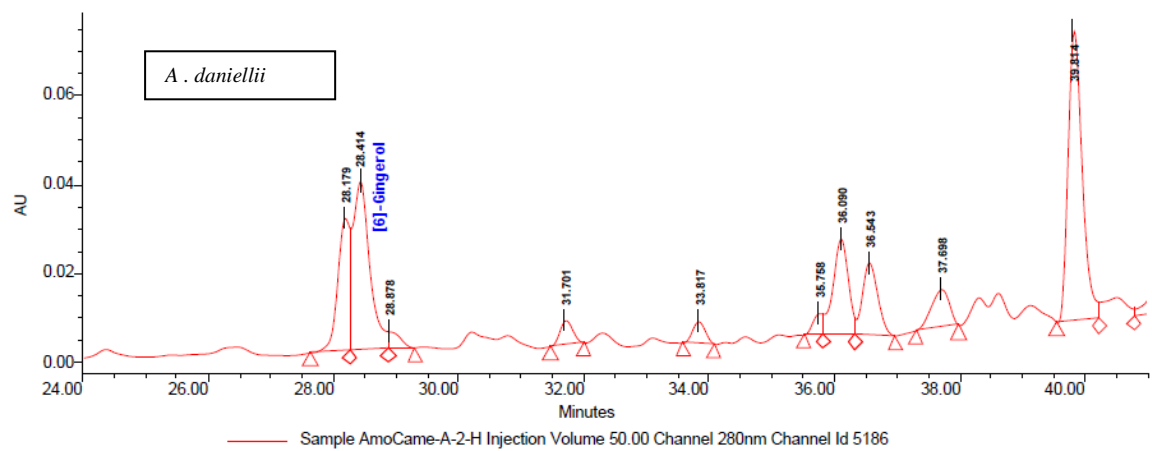
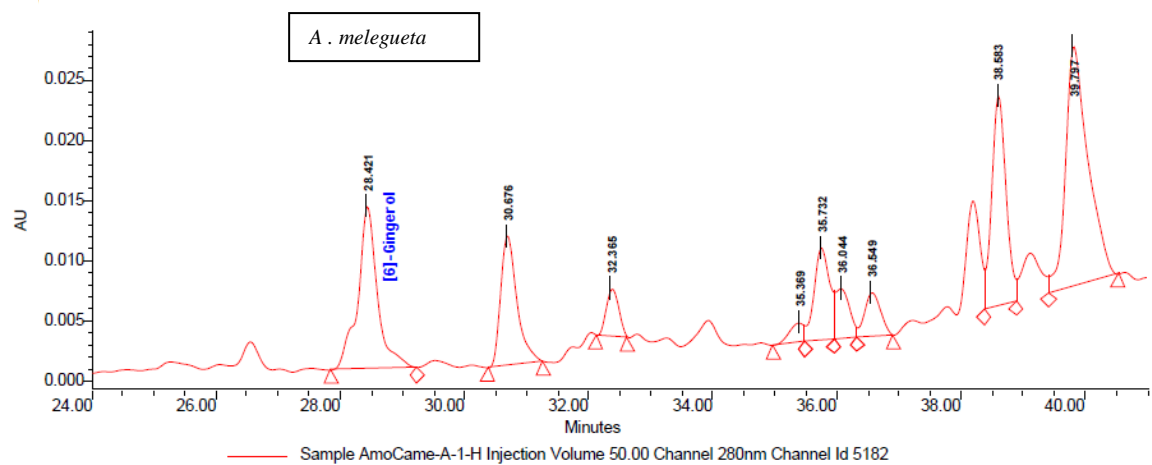


Figure 67: Chromatogrammes HPLC des extraits hexaniques des pulpes des fruits de *A. melegueta*, *A. daniellii* et *A. melegueta* de référence

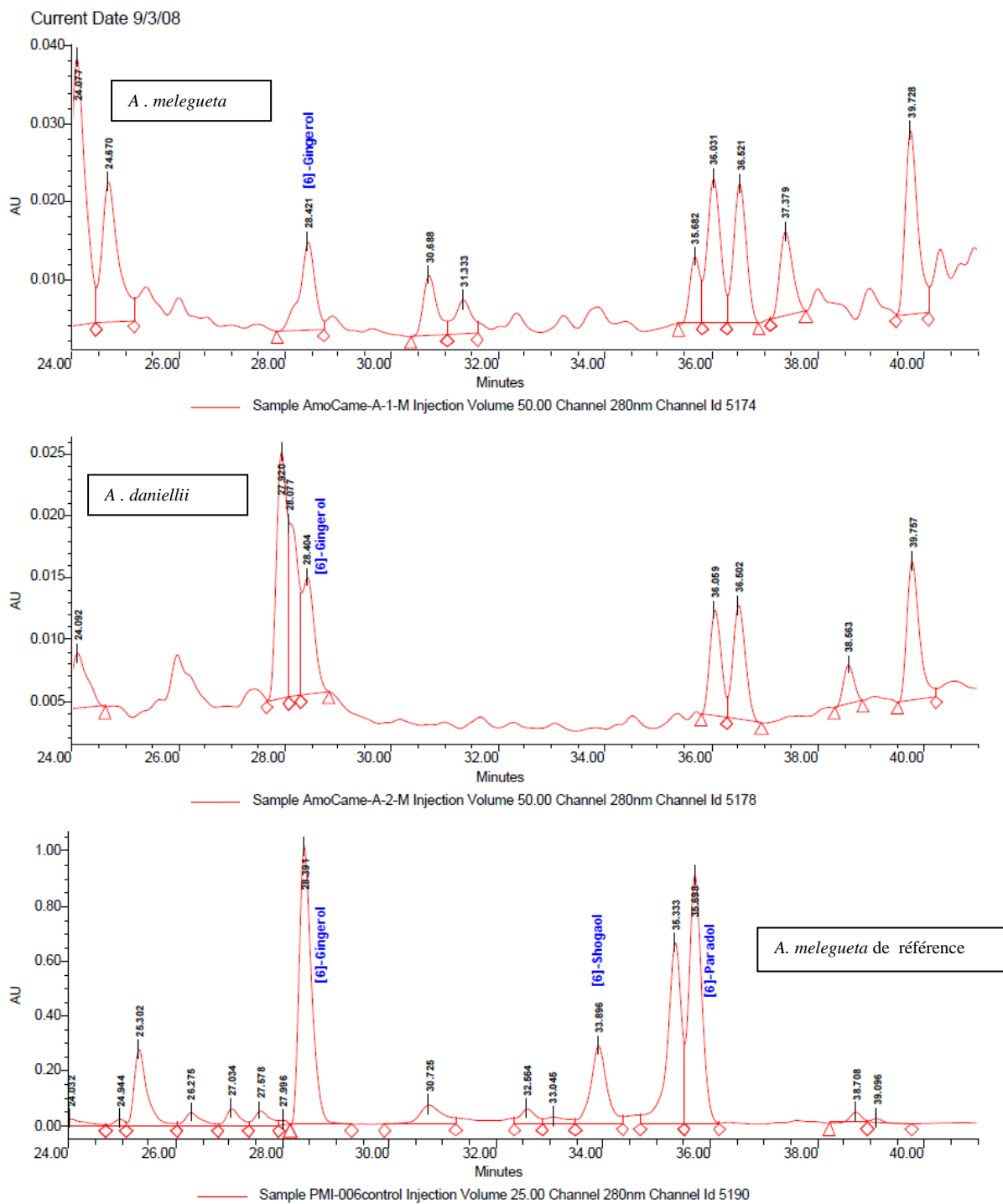


Figure 68: Chromatogrammes HPLC des extraits méthanoliques de la pulpe des fruits de *A. melegueta*, *A. daniellii* et de *A. melegueta* de référence

II.3.4.2.3. Analyse HPLC-MS des extraits des feuilles, tiges et racines de *Aframomum daniellii*, *Aframomum melegueta* et *Aframomum sulcatum*

L'analyse des spectres HPLC-MS des extraits des feuilles, tiges et racines de ces trois espèces montre qu'aucun de ces extraits ne contient le 6-gingérol, le 6-paradol ou le 6-shogaol. D'après nos conditions expérimentales, le gingérol est détectable dès la concentration de 1ng/ml d'extrait tandis que le paradol l'est dès la concentration de 2ng/ml d'extrait.

Une interprétation des résultats des analyses HPLC-MS des différents extraits d'*Aframomum* ci-dessus est résumée dans le tableau 10.

Tableau X : Données des analyses HPLC/MS des extraits de quelques *Aframomums*

<i>Aframomum</i>	interprétation	graine	Pulpe		tige	feuille	racine
			Extrait Hexanique	Extrait Méthanolique			
<i>A. melegueta</i> (A ₁)	Nombre de composés dans l'extrait	21	11	13	13	19	2
	Nombre de composés majoritaires	5	2	3	3	3	1
	Composés déjà identifiés	Gingerol (122) Paradol (119) Shogaol (121)	Gingerol (122)	Gingerol (122)	-	-	-
<i>A. Daniellii</i> (A ₂)	Nombre de composés dans l'extrait	16	13	12	3	33	2
	Nombre de composés majoritaires	2	4	2	1	-	1
	Composés déjà identifiés	-	Gingérol (122)	Gingérol (122)	-	-	-
<i>A. citratum</i> (A ₃)	Nombre de composés dans l'extrait	5	-	-	-	-	-
	Nombre de composés majoritaires	2	-	-	-	-	-

	Composés déjà identifiés	-	-	-	-	-
<i>A. sulcatum</i> (A ₄)	Nombre de composés dans l'extrait	6	-	3	8	3
	Nbre de composés majoritaires	2	-	1	3	1
	Composés déjà identifiés	-	-	-	-	-

<i>A. pruinatum</i> (A ₅)	Nbre de composés dans l'extrait	16	-	-	-	-
	Nbre de composés majoritaires	2	-	-	-	-
	Composés déjà identifiés	-	-	-	-	-
<i>A. letestuanum</i> (A ₆)	Nbre de composés dans l'extrait	8	-	-	-	-
	Nbre de composés majoritaires	1	-	-	-	-
	Composés déjà identifiés	-	-	-	-	-
<i>A. kayserianum</i> <i>ou latifolium</i> (A ₇)	Nbre de composés dans l'extrait	8	-	-	-	-
	Nbre de composés majoritaires	2	-	-	-	-
	Composés déjà identifiés	-	-	-	-	-

Il ressort du tableau 10 que l'extrait méthanolique des graines de *A. melegueta* comporte 21 composés parmi lesquels 5 peuvent être considérés comme majoritaires ; 3 des 21 composés ont été identifiés au gingérol (**122**), paradol (**119**) et shogaol (**121**). L'analyse de l'extrait hexanique de la pulpe des fruits de *A. melegueta* nous montre qu'elle contient 11 composés dont 2 majoritaires, tandis que l'extrait méthanolique en contient 13 dont 3

majoritaires. Un des composés de la pulpe a été identifié au gingérol. L'analyse des tiges, feuilles et racines de cette plante nous montre 13, 19, et 2 composés respectivement, parmi lesquels 3 sont majoritaires dans les tiges et les feuilles, et 1 dans les racines. Il ressort de ce qui précède que les graines sont plus riches en composés et les racines minoritaires.

L'extrait méthanolique des graines de *A. Daniellii* comporte 16 composés parmi lesquels 2 sont majoritaires. Les extraits hexanique et méthanolique de la pulpe de ses fruits comportent 13 et 12 composés respectivement dont 4 majoritaires dans le premier cas et 2 dans le second ; 1 de ces composés a été identifié au gingérol. Les extraits des tiges, feuilles et racines contiennent respectivement 3, 33 et 2 produits parmi lesquels 1 seul est majoritaire dans les tiges et les racines. Nous constatons que les feuilles sont plus riches que toutes les autres parties de la plante bien que n'ayant pas de composé majoritaire tandis que les racines demeurent les plus pauvres.

L'extrait méthanolique des graines de *A. citratum* comporte 5 composés parmi lesquels 2 sont majoritaires.

L'extrait méthanolique des graines de *A. sulcatum* comporte 6 produits dont 2 majoritaires. Les extraits méthanoliques des feuilles, tiges et racines contiennent 3, 8 et 3 composés respectivement. La tige et la racine ont chacune 1 composé majoritaire tandis que la feuille en a 3. Ces résultats montrent que les feuilles de *A. sulcatum* sont plus riches en composés que toute autre partie de cette plante.

Les extraits méthanoliques des graines de *A. pruinatum*, *A. lesteuianum* et *A. kayserianum* ou *latifolium* comportent respectivement 16, 8 et 8 composés ; 2 composés sont majoritaires dans *A. pruinatum* et *A. latifolium* tandis qu'on en a 1 seul dans *A. lesteuianum*.

En somme, les fruits de *A. melegueta* et la pulpe de *A. daniellii* sont des sources de gingérol, tandis-que les graines de *A₁* ont plus de produits majoritaires que les autres graines.

II.4. Activités biologiques de quelques composés obtenus

II.4.1. Activité antitrypanosomale

II.4.1.1. Activité antitrypanosomale du composé **94** (Acide cléroda-15 méthylcarboxylate-3,13-diène-19-oïque)

Comparé à la Suramine ($IC_{50} = 0.044 \mu M$) et le Mélarsoprol ($IC_{50} = 0.0068 \mu M$) respectivement, le composé **94** présente une activité ($IC_{50} = 1.7 \mu M$ et $>32 \mu M$) sur les cellules de *T. brucei* et *L. infantum* respectivement. Afin de comprendre son mode d'action, le composé **94** a été testé sur quelques enzymes de la glycolyse (tableau 11).

Tableau XI : Résultats des tests d'inhibition du composé 94 sur quelques enzymes de la chaîne glycolytique

IC ₅₀ (mM) sur les enzymes				
GAPDHs			PFKs	
<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	Muscle de lapin	<i>T. brucei</i>	Muscle de lapin
0.012 ± 0.020	0.25 ± 0.02	0.80 ± 0.02	1.20 ± 0.04	2.7 ± 0.1
PyKs			Aldolases	
<i>L. mexicana</i>	<i>B. s.</i>	Muscle de lapin	<i>T. brucei</i>	Muscle de lapin
0.62 ± 0.04	0.90 ± 0.01	PI à 3 mM	0.030 ± 0.005	0.40 ± 0.03

B.s. = *Bacillus stearothermophilus*, PI = Pas d'inhibition

Ces résultats montrent que le composé 94 est un inhibiteur des enzymes PyKs de *L. mexicana* et *B. stearothermophilus* avec des IC₅₀ respectives de 0.62 ± 0.04 mM et 0.90 ± 0.01 mM. Il est deux fois plus actif sur la PFK de *T. brucei* que sur son homologue isolé du muscle de lapin. Les résultats les plus importants sont ceux sur la GAPDH et l'aldolase. En effet, il est respectivement 3 et 66 fois plus actif sur la GAPDH des parasites *T. cruzi* et *T. brucei* que sur celle de l'hôte et il inhibe 13 fois plus l'aldolase de *T. brucei* que celle de l'hôte mammifère ; ceci montre que le composé 94 est un inhibiteur très sélectif du GAPDH de *T. brucei* sans effet à 0.080mM sur l'hôte.

L'importante activité inhibitrice que présente le composé 94 sur les GAPDH des parasites, peut s'expliquer par la présence de deux unités α -énones dans sa structure. En effet, il a été démontré que les α -énones sont de bons agents pour les additions de Michaël, surtout en présence de groupement nucléophile telle que la fonction thiol de la cystéine 149 de l'enzyme glycolytique. Les molécules possédant de telles fonctions imitent donc le comportement de la GAP (substrat naturel de la GAPDH) au niveau du site actif de la GAPDH (Cane et Song, 1989, 1994; Lambier et al., 1991). Du fait de ce leurre, l'enzyme ne fonctionne plus correctement et est ainsi plus ou moins inhibée en fonction du type d'interaction établie entre l'inhibiteur et l'enzyme.

Les résultats obtenus de l'action du composé 94 sur la GAPDH de *T. cruzi* sont d'autant plus importants qu'il n'existe pas encore de médicament efficace, d'origine naturelle, sur ce parasite responsable de la maladie de Chagas en Amérique du Sud.

En comparant nos résultats à ceux déjà publiés sur des substances d'origine naturelle (Ambrozin et al., 2005 ; Araya et al., 2003 ; Martins et al., 2003 ; De Moura et al., 2001) ayant une activité intéressante essentiellement sur les épimastigotes et les trypomastigotes, le composé 94 isolé de *E. abyssinica* et *E. aficana* peut aussi être considéré comme un inhibiteur prometteur de la GAPDH de *T. brucei*.

La faible activité inhibitrice de ce composé sur la GAPDH du mammifère hôte est intéressante dans la mesure où cette enzyme joue un rôle crucial dans plusieurs pathologies humaines importantes telles l'apoptose (Dastoor et Dreyer, 2001 ; Sunaga et *al.*, 1995), le cancer (Epner et *al.*, 1993) et la dégénérescence neuronale (Schulze et *al.*, 1993) et cela ouvre la voie à des médicaments d'origine naturelle pour ces maladies.

II.4.1.2. Activités antitrypanosomale du composé **95** (Aframodial)

Aframodial présente une ED₅₀ de 62 et 194 µM sur les cellules de *T. brucei* et MRC-5 du mammifère respectivement.

Les tests d'inhibition du composé **95** sur quelques enzymes sélectionnées de *Trypanosoma brucei* et *Leishmania mexicana* à savoir aldolase, PGK, PFK, PGI, GAPDH, TIM et PyK en comparaison avec les enzymes du mammifère (muscle de lapin), ont été effectués. Les résultats des tests sont présentés dans le tableau 12.

Tableau XII: Résultats des tests d'inhibition du composé **95 sur les enzymes**

IC ₅₀ (µM) sur les enzymes			
TIM _s		PGKs	
<i>T. brucei</i>	Muscle de lapin	<i>T. brucei</i>	Muscle de lapin
23 % à 100 µM	32% à 100 µM	50 ± 0.05	27% à 100 µM
PFKs		PGIs	
<i>T. brucei</i>	Muscle de lapin	<i>T. brucei</i>	Muscle de lapin
29% à 50 µM	PI à 50 µM	50 ± 8	110 ± 12
GAPDHs		Aldolases	
<i>T. brucei</i>	Muscle de lapin	<i>T. brucei</i>	Muscle de lapin
nd	44% d'activation	10 ± 3	110 ± 10
PyKs		Hexokinase	
<i>L. mexicana</i>	<i>B. s.</i>	Muscle de lapin	Levure
60 ± 6	nd	75 ± 12	7% à 100µM

B.s. = *Bacillus stearothermophilus*, nd = non déterminé

Ces résultats montrent que aframodial **95** inhibe sélectivement la PFK de *T. brucei*. Il est 11 fois plus actif sur l'aldolase de *T. brucei* que sur son homologue isolée du muscle de lapin. Très peu d'inhibiteurs d'origine naturelle sont connus comme étant actifs sur les différentes classes de l'aldolase de *T. brucei* ; de ce fait, ces résultats intéressants sur l'aldolase du parasite peuvent ouvrir un chemin pour de nouveaux médicaments contre la THA, ayant comme précurseur Aframodial.

II.4.1.3. Activité antitrypanosomale du composé **147**

Aframodiol (**147**) présente des ED₅₀ de 54 et 73 µM sur les cellules de *T. brucei*, et MRC-5 du mammifère respectivement. Ce résultat est inférieur à celui obtenu avec le composé

95 (62 et 194 μM). Ceci nous montre que ce composé **147** est plus actif que **95**, cependant il n'est pas sélectif car il n'y a pas un grand écart entre son activité sur le parasite et sur l'hôte.

Les résultats des tests d'inhibition enzymatique sont consignés dans le tableau 13.

Tableau XIII: Résultats des tests d'inhibition enzymatique du composé **147**

IC ₅₀ (μM) sur les enzymes			
TIM _s		PGKs	
<i>T. brucei</i>	Muscle de lapin	<i>T. brucei</i>	Muscle de lapin
PI à 50 μM	PI à 50 μM	44%d'activation à 50 μM	PI à 50 μM
PFKs		PGIs	
<i>T. brucei</i>	Muscle de lapin	<i>T. brucei</i>	Muscle de lapin
PI à 50 μM	8%d'activation à 50 μM	PI à 50 μM	PI à 50 μM
GAPDHs		Aldolases	
<i>T. brucei</i>	Muscle de lapin	<i>T. brucei</i>	Muscle de lapin
13% à 50 μM	26% à 50 μM	PI à 50 μM	10% à 50 μM
PyKs		Hexokinase	
<i>L. mexicana</i>	<i>B. s.</i>	Muscle de lapin	Levure
17% à 50 μM	13% à 50 μM	17% à 50 μM	33%d'activation à 50 μM

B.s. = *Bacillus stearothermophilus*, PI= pas d'inhibition;

Ces résultats montrent que aframodiol (**147**) active sélectivement la PGK de *T. brucei* et la PFK du muscle de lapin. Il inhibe 2 fois plus la GAPDH du muscle de lapin que celle de *T. brucei*.

Une comparaison des activités de aframodial et de aframodiol nous montre des différences importantes. En effet, aframodial inhibe l'aldolase du parasite alors qu'avec aframodiol, on n'observe aucune activité. Aframodial inhibe la PFK du parasite en restant inactif sur l'hôte alors que aframodiol active celle du muscle de lapin en étant inactif sur le parasite. Aframodial active la GAPDH du muscle de lapin tandis que aframodiol l'inhibe. Aframodial inhibe l'hexokinase de levure tandis que aframodiol l'active. Ces différences seraient dues à la disparition des fonctions α -énones suites à la transformation des fonctions carbonyles en alcools.

II.4.2. Cinétique enzymatique du composé AD1(**95**)

Les cinétiques enzymatiques d'inhibition impliquent la comparaison du substrat naturel ou du cofacteur des enzymes avec l'inhibiteur potentiel qui est mis à incuber avec l'enzyme

seule, en l'absence de ce substrat. Pour l'aldolase de *T. brucei*, le substrat naturel est le Fructose-1-6-biphosphate. La PyK du muscle de lapin quant à elle a été comparé à L'ADP (Adénoside diphosphate).

Pour décrire l'étendue de l'inhibition, plusieurs paramètres ont été évalués dans les études d'inhibiteurs réversibles. Les plus communs sont :

- la constante de dissociation des espèces enzymatiques auxquelles l'inhibiteur se lie (constante de Michaëlis-Menten): K_M ;
- la capacité inhibitrice relative (constante de l'inhibiteur) : K_i ;
- la concentration en inhibiteur nécessaire pour réduire de moitié l'activité de l'enzyme à laquelle il se lie : IC_{50} .

II.4.2.1. Courbes cinétiques d'inhibition du Composé AD1 (95) sur l'aldolase de *Trypanosoma brucei*

Avant de réaliser les cinétiques d'inhibition, il est nécessaire de connaître l'activité de l'enzyme et d'en connaître les paramètres cinétiques : V_m (vitesse ou activité maximale) et K_M (constante de Michaëlis-Menten). Les graphes suivants (Figures 69 et 70) montrent les deux manières d'étudier le comportement cinétique de l'enzyme Aldolase vis à vis de son substrat Fructose-1-6-biphosphate (F1-6P). La relation entre la vitesse observée et la concentration du substrat dans la figure 69 est hyperbolique. Ceci signifie qu'aux basses concentrations de substrat, la vitesse augmente de façon linéaire alors que pour de grandes concentrations, elle croît moins rapidement jusqu'à tendre vers une valeur limitante appelée vitesse maximale.

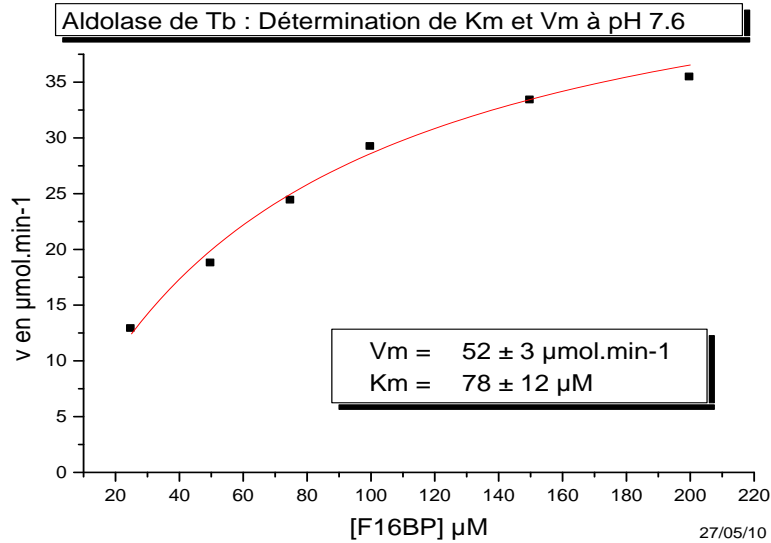


Figure 69: Courbe hyperbolique traduisant le comportement michaélien de l'aldolase de *T. brucei*: $v = f([F16BP])$

La représentation de la figure 70 est une transformation double réciproque dont l'ordonnée à l'origine nous donne la valeur de $1/V_{\max}$ tandis que l'abscisse à l'origine nous donne la valeur de $-1/K_M$.

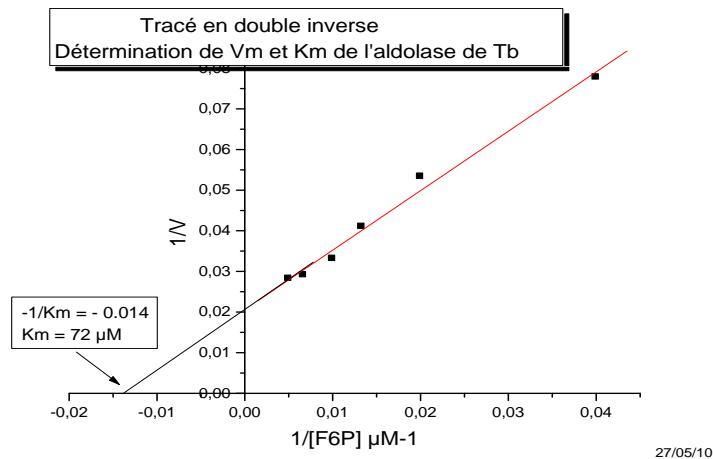


Figure 70: Représentation graphique de lineweaver- burk en double inverse de l'aldolase de *T. brucei*

Pour les cinétiques d'inhibition réversibles, l'inhibiteur potentiel est mis à incuber cinq minutes en présence de l'enzyme seule, à différentes concentrations, dans un tampon au pH optimal avant de rajouter le substrat (à différentes concentrations autour du K_M) et autres

produits nécessaires au fonctionnement de l'enzyme et au suivi de la réaction enzymatique. Les résultats sont traités graphiquement afin de préciser d'une part le type d'inhibition et d'autre part la valeur des constantes d'inhibition (K_i et K'_i).

La figure 71 ci-dessous révèle par le parallélisme des droites obtenues que le composé **95** (ou AD1) est inhibiteur incompétitif de l'aldolase du parasite ; pour des concentrations différentes en inhibiteur, la valeur de la vitesse maximale ainsi que celle du K_M diminuent. Le tracé de la figure 72 permet de déterminer la constante $K'_i = 22.5 \mu\text{M}$. Ce dernier tracé présente la variation des ordonnées à l'origine relevées sur le tracé 76 par rapport à la concentration en inhibiteur AD1. Le composé **95** se lie au complexe enzyme-substrat et non à l'enzyme libre.

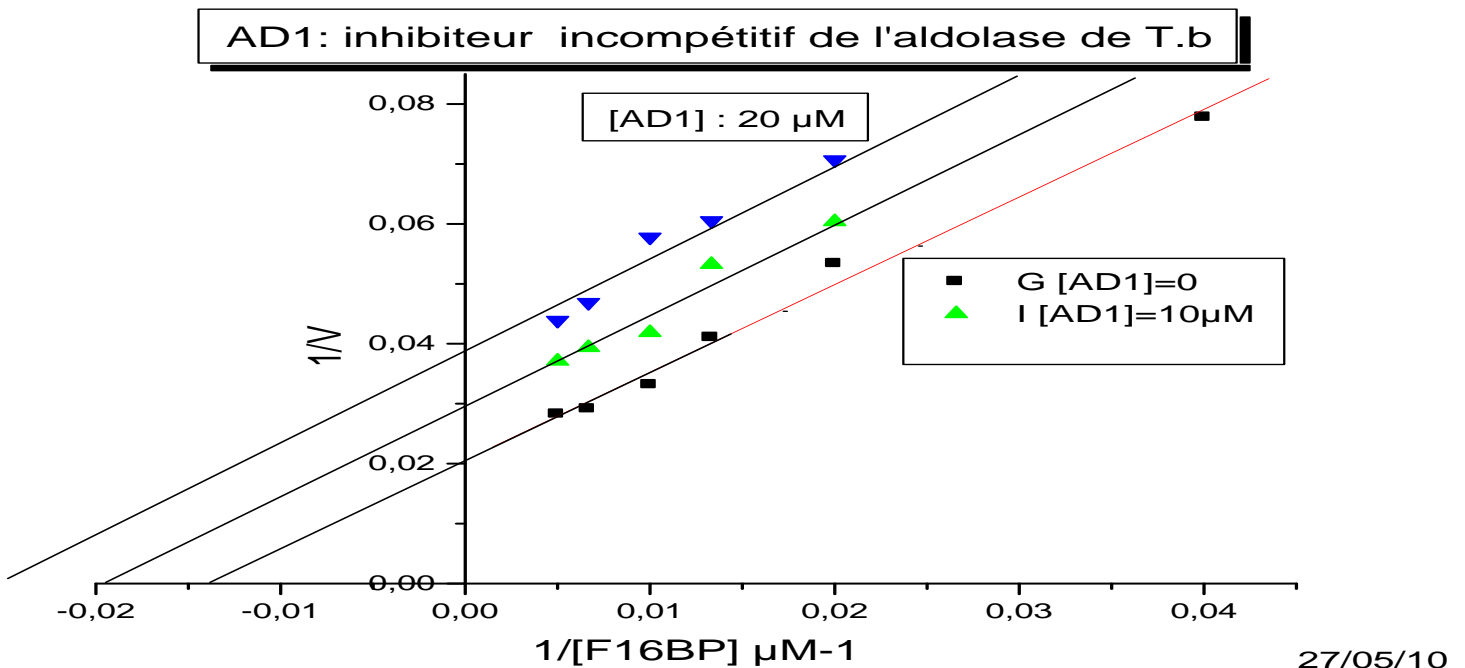


Figure 71: Tracé $1/v = f(1/[F16BP])$ Inhibition incompétitive de l'aldolase de *T. brucei* par le composé **95**

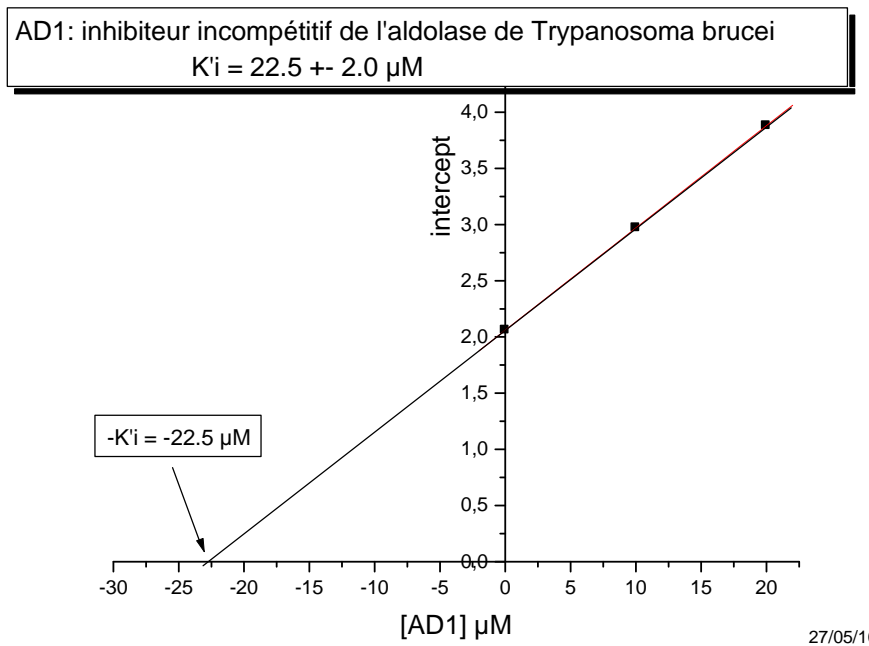


Figure 72 : Tracé secondaire : Détermination de K'_i du composé 95

La valeur de la constante d'inhibition ($K'_i = 22.5 \mu\text{M}$) montre que le composé 95 est intéressant comme trypanocide potentiel. En effet, depuis plus d'une décennie, la glycolyse a été avérée cible potentielle pour la lutte contre les trypanosomiasés et en conséquence, tout blocage de ce métabolisme via l'inhibition d'une enzyme qui y est impliquée peut être considéré comme positif dans la lutte contre ces maladies parasitaires.

II.4.2.2. Courbes cinétiques d'inhibition du Composé 95 (ou AD1) sur la pyruvate Kinase de muscle de lapin

De la même façon qu'avec l'Aldolase, il a été procédé tout d'abord à des tests d'activité de l'enzyme seule permettant de déterminer les valeurs de K_M et V_m de l'enzyme en présence de l'ADP. Puis des cinétiques d'inhibition ont été effectuées par rapport à l'ADP, en faisant varier sa concentration autour du K_M de la PyK du muscle de lapin pour l'ADP ($K_M = 263 \mu\text{M}$) et en mettant en présence de l'enzyme des quantités variables d'inhibiteur.

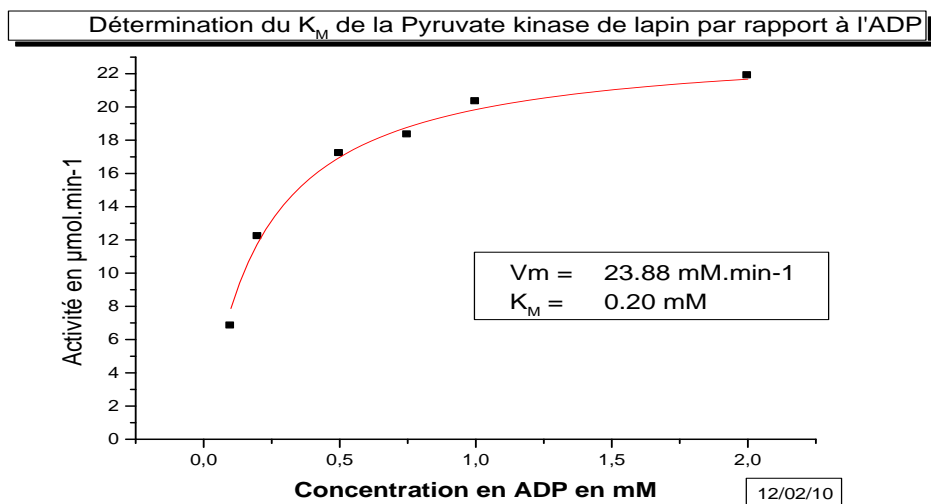


Figure 73 : Courbe hyperbolique traduisant le comportement michaëlien de la PyK de lapin : Détermination de V_m et K_m

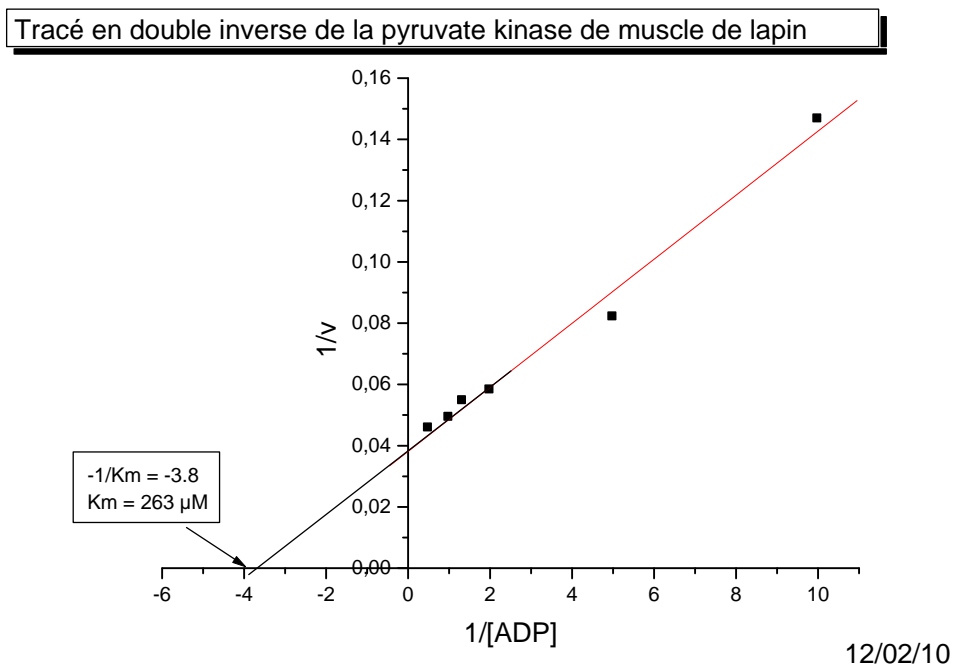


Figure 74 : Détermination de V_m et K_m du composé 95

Le tracé en double inverse de Lineweaver-Burk : $1/v = f(1/[ADP])$ de la figure 75 présente graphiquement les résultats de ces expériences. Les droites concourantes en un point hors de l'axe des ordonnées et des abscisses sont la preuve d'une inhibition mixte.

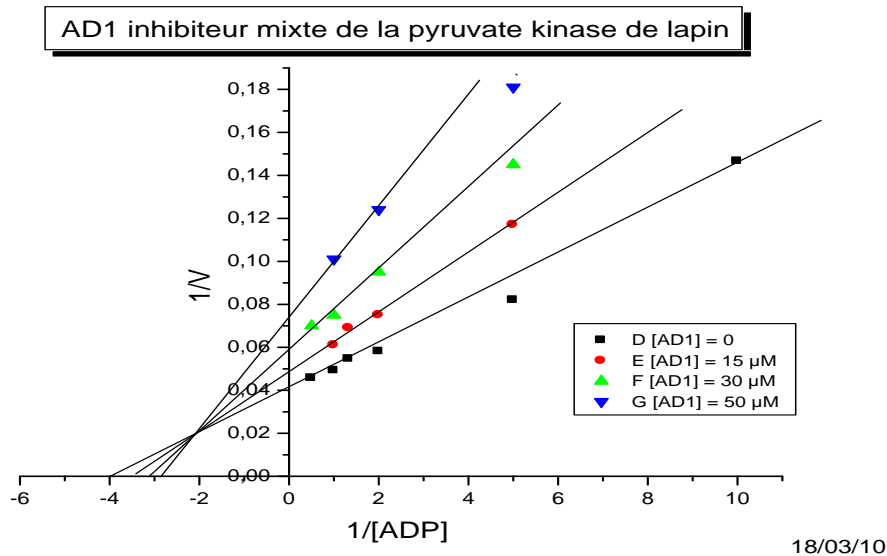


Figure 75 : Représentation graphique de lineweaver-burk du composé 95 comme étant un inhibiteur mixte de la PyK de muscle de lapin

A partir de ce tracé, en particulier la valeur des pentes et des ordonnées à l'origine (ou intercept), on réalise des tracés secondaires : pente = f ([AD1]) et ordonnée à l'origine = f ([AD1]) permettant de préciser la valeur des constantes d'inhibition K_i et K'_i (Figures 76 et 77).

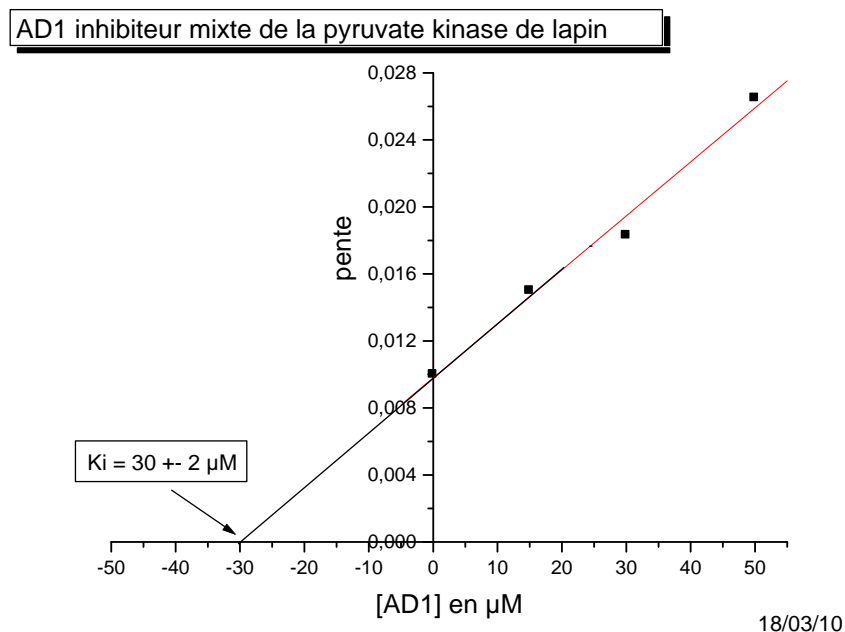


Figure 76 : Détermination du K_i

AD1 inhibiteur mixte de la pyruvate kinase de muscle de lapin

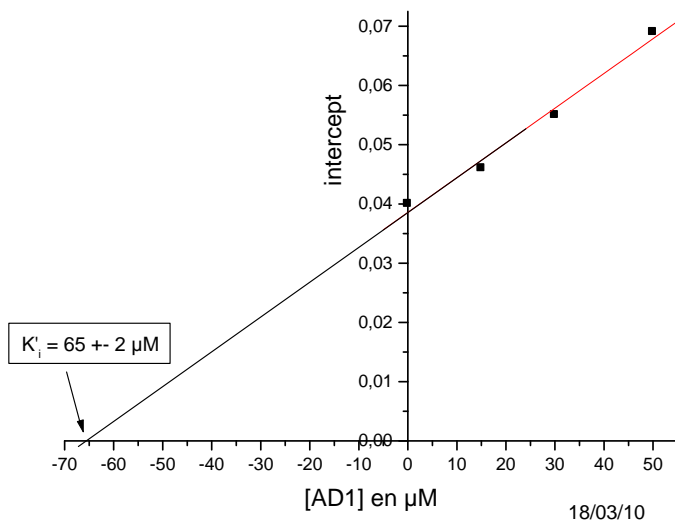


Figure 77 : Détermination du K'_i

Ces résultats montrent que le composé **95**, inhibiteur mixte de la PyK du muscle de lapin par rapport à l'ADP, se lie à la fois à l'enzyme seule et au complexe enzyme-ADP avec une préférence (2 fois plus grande) pour l'enzyme seule ($K'_i = 2 K_i$). K'_i étant supérieur à K_i , la vitesse maximale diminue tandis que le K_M s'accroît lorsqu'on fait varier la concentration de l'inhibiteur.

Un mécanisme général d'inhibition décrivant l'interaction du substrat (S) et de l'inhibiteur réversible (I) sur une enzyme (E) lorsqu'il n'y a pas d'inhibition du substrat est présenté par le schéma 21 ci-dessous :

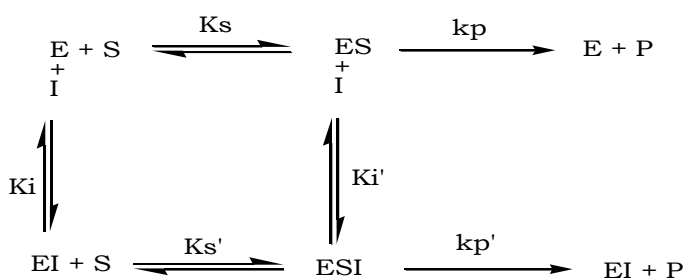


Schéma 17 : Mécanisme général d'inhibition d'une enzyme E par un inhibiteur I

Les résultats présentés dans le tableau 15 montrent de façon globale que le composé **95** est un inhibiteur incompétitif de l'aldolase de *T. brucei* ($K'_i = 22.5 \pm 2 \mu M$), de même ce composé est un inhibiteur mixte par rapport à PyK du muscle du lapin ($K_i = 30 \pm 2 M$, $K'_i = 65 \pm 2 \mu M$).

Tableau XIV: Résultats de la cinétique enzymatique du composé 95 sur l'aldolase et la PyK

Composé	Enzymes	Inhibition réversible et constante d'inhibition	Rapport : K_i/K_M
<u>95</u>	Aldolase de <i>T. brucei</i> comparé au Fructose 1-6-biphosphate avec $K_M=78 \pm 12 \mu\text{M}$	Incompétitif $K'_i = 22.5 \pm 2 \mu\text{M}$	$K'_i/K_M = 0.29$
<u>95</u>	PyK du muscle de lapin comparé à l'ADP avec $K_M=263 \mu\text{M}$	Mixte $K_i = 30 \pm 2 \mu\text{M}$ $K'_i = 65 \pm 2 \mu\text{M}$	$K_i/K_M = 0.11$ $K'_i/K_M = 0.25$

II.4.3. Activité antimicrobienne

Certains des composés isolés, certaines fractions obtenues ainsi que les extraits en notre possession ont subi des tests antimicrobiens sur dix souches de bactéries Gram-négatif dites bactéries multi-résistantes (tableaux 15 et 16). Les bactéries utilisés étaient constituées de : *Escherichia coli* (ATCC8739, AG100A), *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048, CM64), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC11296, KP55), *Pseudomonas aeruginosa* (PA124, PA01) et *Providencia stuartii* (NAE16, ATCC29916). L'antibiotique pris comme référence dans notre étude est le Chloramphenicol.

Les composés TEA1, TEA2, TEA3 et TEA4 n'ont présenté aucune activité vis-à-vis de ces souches bactériennes. Le composé TAE6 quant à lui a été actif sur deux souches de *Escherichia coli* avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 256 et 512 $\mu\text{g/ml}$. Les fractions F2, F6 et F8 ont principalement été actives sur les souches de *Escherichia coli* avec des CMI comprises entre 256 et 512 $\mu\text{g/ml}$. La fraction F7 est la plus active avec une $\text{CMI} \leq 256 \mu\text{g/ml}$; elle a inhibé la croissance de toutes les souches bactériennes avec, dans certains cas, une activité meilleure que celle du Chloramphenicol utilisé ici comme antibiotique de référence. Les différents extraits de *Entada abyssinica* et de *Entada africana* ont été actifs sur au moins une souche de *Escherichia coli* avec des valeurs de $\text{CMI} \leq 1024 \mu\text{g/ml}$. Les extraits à l'hexane, au chlorure de méthylène et au mélange chlorure de méthylène méthanol 1:1 de *Entada africana* se sont révélés bactéricides de la souche AG100A avec des $\text{CMB} \leq 512 \mu\text{g/ml}$.

L'extrait hexanique de *Aframomum daniellii* n'a présenté aucune activité vis-à-vis des bactéries testées. AD1 est actif sur les souches NAE16 et AG100A avec une $\text{CMI} \leq 128 \mu\text{g/ml}$, et est bactéricide de la souche NAE16 de *Providencia stuartii* avec une CMB égale à

64 µg/ml. AD1R quant-à-lui inhibe la croissance de NAE16 et KP55 avec une CMI \leq 256 µg/ml. La réduction des fonctions carbonyles de AD1 induirait une résistance vis-à-vis de la souche NAE16 et une augmentation de l'inhibition de la souche KP55.

Ces résultats pourraient justifier en partie l'utilisation ethnobotanique de ces plantes comme substances antibactériennes.

Tableau XV: Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB) des extraits des plantes et du chloramphénicol (µg/ml)

Espèces De bactérie	TM1 Racine HEX	TM1 Racine CH ₂ Cl ₂	TM1 Racine AE	TM1 Racine résidu	TM1' Ecorces brut	TM1 Ecorces HEX	TM1 Ecorces CH ₂ Cl ₂	TM1 Ecorces AE	TM1 Ecorces résidu	TM1 feuilles HEX	TM1 feuilles résidu	TM1 feuilles dépôt	TM1 feuilles brut	TM1' feuilles brut	TM2 Ecorces HEX	TM2 Ecorces CH ₂ Cl ₂	TM2 Ecorces AE	TM2 Ecorces CH ₂ Cl ₂ /MeOH	AD HEX	CHL
E. coli ATCC8739	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	128 (512)	-	-	-	-	-	8(128)
AG100A	256	-	-	-	-	128	1024	-	-	32	1024	-	-	-	256 (256)	512 (512)	1024	64 (256)	-	16(128)
E. aerogenes ATCC13048	-	-	256	1024	512 (-)	-	-	1024 (-)	-	-	-	-	-	-	1024	-	-	-	-	8(128)
CM64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>256 (-)
K. pneumonia ATCC11296 KP55	-	-	512 (-)	1024	1024 (-)	-	-	1024 (-)	-	-	1024	-	-	1024 (-)	-	-	-	-	-	16(256)
P.aeruginosa PA124 PA01	-	-	-	-	512 (1024)	-	-	128 (512)	-	-	512	-	-	-	-	-	-	-	-	32(1024)
P. stuartii NAE16 ATCC29916	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1024	-	1024	-	32(1024)
	-	-	-	-	1024 (-)	1024	-	-	-	1024	-	1024	-	-	-	-	1024	1024	-	32 (1024)

(-):> 1024 µg/mL pour les extraits; (entre parenthèse): CMB en µg/mL; **TM2**: *E. Africana*; **TM1'**: jeune *E. abyssinica*, **TM1**: vieux *E. abyssinica*, **AD**: *A. daniellii*; **CHL**: Chloramphenicol

Tableau XVI: Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB) des produits, fractions de *E. africana*, et du chloramphénicol (µg/ml)

Espèces De bactérie	AD1	AD1R	TEA6	F2	F5	F6	F7	F8	CHL
E. coli ATCC8739	-	-	256	512	256	512	32	256	8(128)
AG100A	128	-	512	512		512	16	512	16(128)
E. aerogenes ATCC13048	-	-	-		1024		128		8(128)
CM64	-	-	-				128		256(-)
K. pneumonia ATCC11296	-	-	-				64		16(256)
KP55	-	256	-				128		32 (1024)
P.aeruginosa PA124	-	-	-				256		>256
PA01	-	-	-				128		-
P. stuartii NAE16	(64)	128	-				32		32 (1024)
ATCC29916	-	-	-		1024		64		32 (1024)

(entre parenthèse): CMB en µg/mL; **F**: fraction; **CHL**: Chloramphenicol

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'étude phytochimique des écorces de *E. abyssinica* nous a permis d'obtenir deux composés et un mélange dont les structures ont été déterminées grâce à l'interprétation de leurs spectres RMN (1D et 2D). Nous avons ainsi isolé un diterpène nouveau de la série kolavane (l'acide 15-méthylester kolavique), un stérol (le β -sitostérol) et un mélange de dix acides gras saturés (C₂₀-C₂₉).

L'étude phytochimique des écorces de *E. africana* nous a permis d'isoler quatre composés purs : le 15-méthylester de l'acide kolavique, le lupéol, le β -sitostérol et l'octacosanoate de 2,3-dihydroxypropyl ; puis de caractériser deux mélanges dont l'un est constitué de deux acides gras saturés (C₂₄ et C₂₆) et d'un alcool gras saturé (C₂₈), et l'autre des isomères cis et trans de trois esters d'acide férulique (C₂₆, C₂₈, C₃₀).

L'étude phytochimique de *Aframomum daniellii* nous a permis d'isoler le composé majoritaire aframodial; ce composé a été transformé en aframodiol par action du NaBH₄. Les analyses par Chromatographie en Phase Liquide Haute Pression couplée de la Spectroscopie de Masse (HPLC-MS) des extraits de 7 espèces d'*Aframomum* du Cameroun à savoir : *A. melegueta*, *A. daniellii*, *A. citratum*, *A. sulcatum*, *A. pruinatum*, *A. letestuanum* et *A. kayserianum* ou *A. latifolium* indexés respectivement A₁ à A₇ ont montré la présence des composés 6-gingérol, 6-shogaol et 6-paradol uniquement dans les graines de *A. melegueta*, tandis qu'on retrouve uniquement le 6-gingérol dans la pulpe des fruits de *A. melegueta* et de *A. daniellii*. Nous avons également constaté que le 6-gingérol est plus abondant dans l'extrait hexanique des pulpes des fruits de *A. daniellii*.

Certains des composés isolés, certaines fractions obtenues et les extraits des plantes étudiées ont subi des tests biologiques et enzymatiques.

Les tests d'inhibition sur les cellules montrent que l'acide 15-méthylester kolavique présente une activité (IC₅₀ de 1.7 μ M et > 32 μ M) respectivement sur les cellules de *T. brucei* et de *L. infantum*.

Les tests d'inhibition enzymatique réalisés sur l'acide 15-méthylester kolavique nous révèlent qu'il est un inhibiteur sélectif des enzymes PyKs de *L. mexicana* et *B. stearothermophilus* avec des IC₅₀ respectives de 0.62 \pm 0.04 mM et 0.90 \pm 0.01 mM. Il est deux fois plus actif sur la PFK de *T. brucei* que sur son homologue isolé du muscle de lapin. Les résultats les plus importants sont ceux sur la GAPDH et l'aldolase ; en effet, il est respectivement 3 et 66 fois plus actif sur la GAPDH des parasites *T. cruzi* et *T. brucei* que sur celle de l'hôte, et il inhibe 13 fois plus l'aldolase de *T. brucei* que celle de l'hôte

mammifère. De plus, il est un inhibiteur très sélectif du GAPDH de *T. brucei* sans effet jusqu'à 0.080mM sur l'hôte.

Les tests d'inhibition enzymatique réalisés sur aframodial montrent qu'il est plus actif sur la PGK de *T brucei* ($IC_{50} = 50 \pm 0.05 \mu M$) que sur celle isolée du muscle de lapin (27% à 100 μM). Il est 2 fois plus actif sur la PGI de *T. brucei* que sur son homologue chez l'hôte. Il est 11 fois plus actif sur l'aldolase de *T. brucei* que sur son homologue isolée du muscle de lapin.

Les études d'inhibition enzymatique d'aframodiol montrent qu'il active la PGK de *T brucei*, la PFK du muscle de lapin et l'hexokinase de la levure. Il est 2 fois plus actif sur GAPDH du muscle du lapin que sur *T. brucei*.

La transformation des carbonyles en alcool a créé des modifications importantes au niveau des activités enzymatiques ; en effet, aframodial inhibe l'aldolase du parasite alors qu'avec aframodiol, on n'observe aucune activité. Aframodial inhibe la PFK du parasite en restant inactif sur l'hôte alors que aframodiol active celle du muscle de lapin en étant inactif sur le parasite. Aframodial active la GAPDH du muscle de lapin tandis que aframodiol l'inhibe. Aframodial inhibe l'hexokinase de levure tandis que aframodiol l'active. Ces différences seraient dues à la disparition des fonctions α -énones suite à la transformation des fonctions carbonyles en alcools.

L'étude de la cinétique enzymatique montre qu'aframodial est un inhibiteur mixte de la PyK du muscle de lapin ($K_i = 30 \pm 2 \mu M$; $K'_i = 65 \pm 2 \mu M$); il est un inhibiteur incompétitif de l'aldolase de *T. brucei* ($K'_i = 22.5 \pm 2 \mu M$).

Deux résultats qui retiennent l'attention sont d'une part celui de l'acide 15-méthylester kolavique qui est 66 fois plus actif sur la GAPDH de *T. brucei* que sur celle de l'hôte, et d'autre part celui d'aframodial qui est 11 fois plus actif sur l'aldolase de *T. brucei* que sur celle du muscle de lapin. Ces résultats sont d'autant plus importants que les médicaments actuellement disponibles sur le marché sont soit toxiques, soit chers, soit rares et ils ont des effets secondaires souvent fatals. Nos résultats sont en accord avec les thèses selon lesquelles les unités α -énones qui se prêtent aisément aux réactions de Michaël, constituent de potentiels agents trypanocides, ou antiparasitaires d'une manière générale.

Les tests antibactériens effectués sur les composés isolés de *Entada africana* montrent que seul l'octacosanoate de -2,3-dihydroxylpropyle a été actif sur deux souches de *Escherichia coli* avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 256 et 512 $\mu g/ml$. Les fractions TEA7, TEA8, TEA10 et TEA12 sont principalement actives sur les souches de *Escherichia coli* avec des CMI comprises entre 256 et 1024 $\mu g/ml$. La fraction TEA5 est la

plus active avec une CMI $\leq 256 \mu\text{g/ml}$; elle inhibe toutes les souches bactériennes avec dans certains cas une activité meilleure que celle du Chloramphenicol utilisé ici comme antibiotique de référence. Les différents extraits de *Entada abyssinica* et de *Entada africana* ont été actifs sur au moins une souche de *Escherichia coli* avec des valeurs de CMI $\leq 1024 \mu\text{g/ml}$. Les extraits à l'hexane, au chlorure de méthylène et au mélange chlorure de méthylène méthanol 1:1 de *Entada africana* sont bactéricides de la souche AG100A avec des CMB $\leq 512 \mu\text{g/ml}$.

L'extrait hexanique de *Aframomum daniellii* ne présente aucune activité vis-à-vis des bactéries testées. Aframodial est actif sur les souches NE16 et AG100A avec une CMI $\leq 128 \mu\text{g/ml}$, et est bactéricide de la souche NAE16 de *Providencia stuartii* avec une CMB égale à $64 \mu\text{g/ml}$. Aframodiol quant à lui inhibe la croissance de NAE16 et KP55 avec une CMI $\leq 256 \mu\text{g/ml}$. La réduction des fonctions carbonyles de Aframodial induirait une résistance vis-à-vis de la souche NAE16 et une augmentation de l'inhibition de la souche KP55.

Ces résultats pourraient justifier en partie l'utilisation ethnobotanique de ces plantes dans le traitement de la maladie du sommeil et des infections bactériennes.

Dans la suite, nous comptons poursuivre avec l'isolement des autres composés révélés par HPLC-MS. L'importance de nos résultats nous impose d'étendre également nos recherches sur d'autres plantes médicinales camerounaises potentiellement riches en composés trypanocides et bactéricides, qui pourraient nous permettre de synthétiser et de tester des analogues plus actifs et plus utiles dans la lutte contre les maladies parasitaires et bactériennes.

CHAPITRE III :PARTIE EXPERIMENTALE

III.1. Matériels

III.1.1. Matériels d'études chimiques

Les points de fusion des composés isolés ont été pris sur deux appareils dont un électronique de marque « Büchi Melting Point B-540 » et l'autre non électronique de marque Gallenkamp, et ne sont pas corrigés. Les CCMs ont été réalisées sur des plaques de silice préfabriquées et destinées à cet effet de 0,25 mm d'épaisseur, de marque « Merck Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ » avec différents systèmes d'élution : hexane/acétate d'éthyle, hexane/dichlorométhane, acétate d'éthyle/méthanol et dichlorométhane/méthanol. Les spots en CCM ont été visualisés soit sous lumière UV (254 ou 365 nm), soit en immergeant les plaques CCMs dans des vapeurs d'iode, ou bien en les aspergeant d'acide sulfurique dilué à 50% et en les chauffant ensuite (spots noirs). Les colonnes de chromatographie ont été réalisées avec de la silice Merck 60 (70-230 µm de diamètre). Les spectres de RMN ont été enregistrés à 25°C soit sur un spectromètre Bruker 300MHz grâce à la collaboration de Catherine Fontaine de l'Université Joseph Fourier de Grenoble (France), soit sur un spectromètre Bruker 500MHz ou 600 MHz grâce à la collaboration de Bernd Schneider de la Max Planck Institute For Chemical Ecology de Jena (Allemagne). Les spectres GC-MS ont été réalisés avec le concours de Bernd Schneider de la Max Planck Institute For Chemical Ecology de Jena (Allemagne). Les spectres IR ont été enregistrés sur un spectromètre de marque Bruker Alpha n° 100949. Les spectres HPLC-MS ont été enregistrés à l'aide d'un système d'intégration de type Waters (Milford, MA) utilisant un spectromètre de type ESI (-) grâce à la collaboration du Dr. Ilya de l'université Rutgers du New Brunswick (USA). Le matériel de laboratoire ainsi que les réactifs ont été achetés chez Sigma-Aldrich, Merck et Co Inc, Büchi et les solvants organiques chez Cherwood International.

III.1.2. Matériels d'études biologiques

III.1.2.1. Cellules de trypanosomes et cellules de mammifères

Les souches de parasite utilisées sont *Trypanosoma brucei brucei* (souche 421) (forme sanguicole) et pour les cellules mammifères, la souche de fibroblastes humains MRC-5. Les différents milieux et réactifs ont été achetés chez GIBCO BRL, Sigma-Aldrich, Roche....

III.1.2.2. Enzymes glycolytiques

Les enzymes de parasites ont été surexprimées dans *Escherichia coli* et purifiées selon le protocole décrit par Hannaert et al (1995). Les enzymes de référence, les substrats, les cofacteurs et les enzymes auxiliaires ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Les enzymes étudiées dans notre cas sont : la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH : EC :

1.2.1.12), la phosphofructokinase (PFK : EC 2.7.1.11), la pyruvate kinase (PyK : EC : 2.7.1.40), la phosphoglycérate kinase (PGK : EC : 2.7.2.3), l'aldolase (EC : 4.1.2.13), et la phosphoglucose isomérase (PGI : EC : 5.3.1.9).

III.1.2.3. Souches bactériennes et milieu de culture

Les souches bactériennes proviennent de la collection de culture de type Américaine et des souches cliniques obtenues des laboratoires “Transporteurs membranaires, Chimiorésistance et Drug Design, UMR-MD1, IFR 88, UFRs de Médecine et de Pharmacie, Marseille, France”.

Toutes les souches ont été maintenues dans un bouillon de nutriment à 4°C et activées sur les géloses Mueller Hinton pendant 24h. Le bouillon Mueller Hinton (MHB) a été utilisé pour tous les essais antibactériens.

III.2. Méthodes

III.2.1. Matières végétales : récoltes

Selon les bonnes pratiques de terrain qui respectent les droits des détenteurs des savoirs traditionnels et protègent l'environnement, sur la base des connaissances ethnopharmacologiques et ethnosociologiques, les écorces de *Entada abyssinica* (Mimosacée) ont été récoltées à Dschang (Région de l'Ouest, Cameroun) en décembre 2001, les écorces du tronc de *E. africana* ont été récoltées à l'Extrême-Nord en février 2011 et les fruits de *Aframomum daniellii* ont été récoltés à Sonbegué, localité située à Edéa en mars 2008 par M. Nana de l'Herbier National. Les plants de *A. melegueta*, *A. daniellii* et *A. sulcatum* ont été récoltés en juin 2008 au mont Elounden. Les fruits des autres espèces d'*Aframomum* ont été achetés au Marché du Mfoundi en 2009. Ces plantes ont été identifiées par le Pr. Bonaventure Sonké, le Dr. Tchiengue Barthélemy, M. Nana, M. Koufani Anaclet et M. Mezili respectivement de l'Ecole Normale Supérieure de l'Université de Yaoundé I et de l'Herbier National du Cameroun où des échantillons sont déposés.

III.2.1.1. Extractions et isolements

III.2.1.1.1. *Entada abyssinica* (Mimosaceae)

Les écorces d'*Entada abyssinica* ont été découpées, séchées et pulvérisées pour donner 6 Kg de poudre. Divers essais d'extraction sont ensuite faits sur environ 200 mg de poudre avec les solvants organiques disponibles au laboratoire (hexane, AcOEt, CH₂Cl₂ et MeOH) et de nombreuses CCMs sont réalisées dans des systèmes de solvants différents afin de choisir selon la meilleure résolution et le nombre de composés, le meilleur solvant d'extraction et le meilleur système d'isolement des produits que contient l'extrait. C'est ainsi

que 5 kg de cette poudre ont été macérés à froid dans le dichlorométhane pendant 24h. L'évaporation sous pression réduite de la solution obtenue a donné 91 g d'extrait brut. Après avoir dissout notre extrait dans du méthanol, il a ensuite été dégraissé à l'hexane ; nous avons obtenu 73 g d'extrait hexanique. De cet extrait, nous avons pu isoler 200 mg de l'acide 15-méthylester kolavique (**94**), 80 mg de β -sitostérol (**132**) et 1g d'un mélange d'acides gras saturés (**133-142**) après plusieurs chromatographies successives utilisant comme système d'élution des portions croissantes d'acétate d'éthyle dans l'hexane.

III.2.1.1.2. *Entada africana* (Mimosaceae)

Les écorces du tronc de *Entada africana* ont été découpées en petits morceaux, séchées puis pulvérisées. 5kg de cette poudre ont été macérés à froid dans le mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1 :1) pendant 24h. Après filtration et évaporation sous pression réduite nous avons obtenu 200g d'extrait brut. La chromatographie flash de cet extrait s'est faite avec les solvants Hex /EtOAc, puis EtOAc/MeOH de gradient décroissant. Des chromatographies successives effectuées sur cet extrait nous ont permis d'isoler quatre composés purs : le 15-méthylester de l'acide kolavique (**94**), le lupéol (**144**), le β -sitostérol (**132**), un monoester du glycérol et de l'acide octacosanoïque $\text{C}_{28}\text{H}_{56}\text{O}_2$ (**146**); puis de caractériser deux mélanges dont l'un est constitué de deux acides gras saturés (**137**, **139**) et d'un alcool gras saturé (**143**), et l'autre des isomères cis et trans de trois esters d'alkyle férulates (**145a**, **145b**, **145c**).

III.2.1.1.3. *Aframomum danielli* (Zingiberaceae)

Les graines d'*Aframomum danielli* ont été broyées et nous avons obtenu une pâte de 503g. Selon la même approche décrite précédemment, 500 g de cette pâte ont été extraits à chaud dans l'hexane à l'aide d'un soxhlet. L'évaporation sous pression réduite de la solution obtenue a donné 40 g d'extrait brut. De cet extrait, nous avons pu isoler 4 g d'afromodial (**95**).

III.2.1.2. Réaction d'estérification par le diazométhane du mélange des composés 133-142

Notre mélange est dissout dans de l'éther, puis on ajoute à 0°C un excès d'une solution de diazométhane. La solution est agitée pendant 4 h à cette température puis ramenée à la température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu chromatographie est ensuite analysé par le couplage de la chromatographie en phase gazeuse (GC) et de la spectroscopie de masse (MS). Le mélange de composés est d'abord séparé par chromatographie puis chaque composé est identifié grâce aux fragments qu'il génère dans le spectre de masse. On obtient, par ordre d'élution, les composés de masse moléculaire croissante.

III.2.1.3. Réaction de réduction du composé AD1 (95) avec le NaBH₄

Le composé **95** (100mg, 0.314mmol) est dissout dans 30 ml de méthanol et agité à température ambiante avec un excès de NaBH₄ pendant 2h. La réaction est arrêtée par ajout de 50ml d'eau et la phase organique est extraite avec le dichloreméthane, puis séchée avec le Na₂SO₄. Le résidu obtenu a été purifié par chromatographie sur colonne utilisant comme système d'élution des portions croissantes d'acétate d'éthyle dans l'hexane.

III.2.1.4. Données physiques et spectrales du composé nouveau isolé

Composé **94**: Acide 15-méthylester kolavique

RMN ¹H : (CDCl₃), δ (ppm) : 0.93 (s, 3H, H-17), 0.95 (s, 3H, H-19), 1.30 (s, 3H, H-20), 1.40 (m, 2H, H-7), 1.45 (m, 1H, H-10), 1.60 (m, 1H, H-8), 2.08 (m, 2H, H-12), 2.15 (m, 1H, H-2a), 2.18 (s, 3H, H-16), 2.20 (m, 1H, H-11), 2.30 (m, 1H, H-2b), 3.68 (s, 3H, OMe), 5.68 (s, 1H, H-14), 6.80 (t, 1H, *J*=3 Hz, H-3).

RMN ¹³C : (CDCl₃), δ (ppm) : 15.12 (C-17), 17.45 (C-1), 19.56 (C-16), 20.69 (C-19), 21.70 (C-20), 25.77 (C-7), 27.84 (C-2), 29.57 (C-11), 34.80 (C-12), 35.20 (C-8), 37.96 (C-9), 37.99 (C-5), 38.06 (C-6), 45.50 (C-10), 51.19 (OMe), 115.20 (C-14), 140.33 (C-3), 142.06 (C-4), 161.99 (C-13), 167.62 (C-15), 172.80 (C-18).

III.2.2. Activités biologiques

III.2.2.1. Principe sur lequel repose les méthodes biologiques utilisées

Les tests d'inhibition de la croissance des trypanosomes et des cellules mammifères reposent essentiellement sur le fait que les composés organiques qu'on retrouve dans les plantes médicinales (organismes vivants) sont capables d'imiter les substrats naturels des enzymes clés du développement du parasite. Ils constituent ainsi de potentiels inhibiteurs de ces enzymes.

III.2.2.2. Origine des enzymes

Les enzymes GAPDH, PFK et PyK sont exprimées à partir du muscle de lapin, la LDH à partir du cœur de chèvre ; tous les substrats et cofacteurs ont été acquis chez Sigma-Aldrich Chemicals Co. Les enzymes glycolytiques exprimées de *T. brucei* l'ont été après surproduction dans *Escherichia coli* et purification selon la procédure décrite par Hannaert et al. (1995), soit au Laboratoire de Recherche sur les Maladies Tropicales de l'Université de Louvain à Bruxelles (Belgique), soit au Module de Haute Technologie (MHT) de l'Université Paul Sabatier de Toulouse (France).

III.2.2.3. Tests d'inhibition de la croissance des trypanosomes et des cellules mammifères en culture

Le test LILIT (“*Long Incubation Low Inoculation Test*”) (Brun et Lun 1994) et modifié par Ráz et al (1997) est utilisé pour les essais sur la forme sanguicole de *Trypanosome brucei* (souche 421) et les cellules mammifères afin de faciliter la comparaison des résultats.

Pour évaluer la sélectivité de l'activité antitrypanosomale *in vitro*, des tests de cytotoxicité *in vitro* ont également été réalisés. La même méthode générale a été utilisée afin de faciliter la comparaison des composés.

Les composés ont été d'abord dissous dans du DMSO à une concentration de 20 mg / ml et dilué avec le milieu.

Pour chaque composé, des dilutions en série sont réalisées dans des plaques 96 puits, chaque dilution étant testée en double. Les cellules en suspension sont ensuite ajoutées dans chaque puit à une densité telle que, après 72 h d'incubation, dans les puits contrôles la culture ait atteint la fin de la phase de croissance logarithmique (*T. brucei*), ou que les cellules adhérentes aient formé une couche monocellulaire confluite (cellules mammifères MRC-5). Après 72 h d'incubation, chaque plaque est examinée avec un microscope inversé afin de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui est la concentration à laquelle aucune cellule avec une morphologie et/ou une mobilité n'est trouvée en comparaison des cultures contrôles. Ensuite, l'Alamar Blue, un marqueur de viabilité cellulaire, est ajouté dans chaque puits et la fluorescence est quantifiée après un temps total d'incubation de 76 h à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et à une longueur d'onde d'émission de 590 nm. L'intensité de la fluorescence est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules contrôles, considérées comme 100 %, et les valeurs d'ED₅₀ (la concentration d'un composé à laquelle l'intensité de la fluorescence est réduite à 50 %) sont calculées par interpolation linéaire. Des essais avec des médicaments commerciaux sont également réalisés afin d'avoir des valeurs de référence. Tous les résultats représentent des valeurs moyennes obtenues dans au moins trois expériences indépendantes, chaque expérience comprenant un double jeu de tests.

III.2.2.4. Inhibition enzymatique et étude du mode d'action des inhibiteurs

Les produits isolés ont subi des tests d'inhibition différentiels sur les enzymes (TIM, PGK, PGI, GAPDH, PyK, aldolase et PFK) de parasite (*Trypanosoma brucei* ou *Leishmania mexicana*) et leurs équivalents chez le mammifère en l'occurrence le lapin, en raison de la très forte similitude de ses enzymes avec celles de l'homme. Les enzymes de parasite ont été surexprimées dans *Escherichia coli* et purifiées selon le protocole de Hannaert et al. [107,110]

et les enzymes de référence, les substrats, les cofacteurs et les enzymes auxiliaires ont été achetés chez Sigma–Aldrich. Deux types de cinétique enzymatique ont été réalisés : des tests d'inhibition (mesure d'IC₅₀) et des cinétiques d'inhibition réversibles (type d'inhibition et mesure de K_i ou K'_i). Les enzymes étudiées dans notre cas sont : la TIM (E.C. 5.3.1.1), la GAPDH (E.C.1.2.1.12), la PFK (E.C. 2.7.1.11), la PyK (E.C. 2.7.1.40), la PGI (E.C. 5.3.1.9), la PGK (E.C. 2.7.2.3), l'hexokinase (E.C. 2.7.1.1.) et l'aldolase (E.C. 4.1.2.13).

III.2.2.5. Bioguidage

L'activité inhibitrice sur enzymes isolées des différents produits est déterminée soit par mesure d'IC₅₀ dans des conditions saturantes en substrat (10 K_M en général), soit plus simplement par détermination du pourcentage d'inhibition à une quantité de composé isolé.

Dans le cas de l'aldolase, l'utilisation d'enzymes auxiliaires peut être contournée par un test direct d'activité basé sur la modification des trioses phosphates formés par l'hydrazine selon Boyer (Jagannathan et *al.*, 1956) et la lecture directe de l'absorbance à 240 nm due à l'hydrazine modifiée. Une approche similaire peut être développée avec la 2,4-dinitrophénylhydrazone avec une lecture à 540 nm pour l'hydrazone formée.

Dans le cas de la PFK, les enzymes auxiliaires (pyruvate kinase et lactate déshydrogénase) sont mises en grand excès afin de pallier leur éventuelle inhibition par les composés testés. L'activité est alors mesurée à 340 nm en suivant la disparition du NADH oxydé en NAD⁺. Les quantités d'enzyme utilisées devront correspondre à une vitesse maximale d'environ 30 nmol.min⁻¹.L⁻¹.

Les enzymes et les produits isolés sont incubés en quantités variables durant 5 minutes avant l'addition du substrat et la mesure de l'activité restante de l'enzyme est effectuée après l'ajout des cofacteurs et enzymes auxiliaires. Le milieu réactionnel est constitué de tampon TEA (triéthanolamine, HCl) 0.05 mol.L⁻¹ ou 0.1 mol.L⁻¹ à pH = 7.2, de force ionique 0.15, ajustée avec du NaCl.

Le pourcentage d'activité restante est évalué par comparaison avec une référence ne contenant pas de composé inhibiteur mais le solvant dans lequel ce dernier est solubilisé : DMSO, méthanol ou eau. Les effets possibles des produits sur les enzymes auxiliaires et sur l'absorbance à 340 nm sans enzyme sont effectués préalablement aux tests. La concentration en composé inhibiteur permettant de réduire de 50% l'activité de l'enzyme (IC₅₀) est déterminée à partir de 4 concentrations différentes et les expériences sont réalisées en duplicate et si possible en triplicata.

III.2.2.6. Etude cinétique d'inhibition des composés actifs isolés

Les études des différents types d'inhibition : réversible (compétitive, non compétitive, incompétitive, mixte) sont réalisées sur les enzymes de parasite et de mammifère. La détermination des paramètres cinétiques d'inhibition (K_i , K'_i, \dots) est effectuée selon les protocoles connus et établis. Les expériences sont réalisées en présence de quantités variables de substrat et d'inhibiteurs (produit pur isolé) en duplication.

III.2.2.6.1. Préparations des divers réactifs

La concentration en inhibiteur nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de l'enzyme (IC_{50}) est calculée pour chaque enzyme à des concentrations saturantes ($\geq 10K_M$) en substrat et cofacteur afin que la moindre activité de l'inhibiteur se fasse rapidement ressentir. Dans chaque cas, il y a une pré-incubation de l'enzyme avec différentes concentrations d'inhibiteur pendant 5 minutes dans la solution tampon correspondante, suivie de l'ajout du mélange réactionnel (Mix), du cofacteur et du substrat afin d'amorcer la réaction. Le pourcentage de l'activité restante de l'enzyme est calculé en comparaison à une expérience faite simultanément, sans inhibiteur, mais avec le même volume de solvant. En effet, les enzymes sont sensibles aux solvants organiques qui peuvent les inhiber partiellement en déformant leur site actif ou en changeant leur structure tridimensionnelle. Le taux d'inhibition est alors déduit de l'activité résiduelle de l'enzyme. Cette activité est contrôlée à l'aide d'un spectrophotomètre SAFAS UV-mc2 en suivant soit l'apparition, soit la disparition du NADH, cofacteur que l'on peut suivre en spectrophotométrie UV à 340 nm ($\epsilon_{340} = 6,25 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La composition du milieu de culture est différente pour chaque enzyme :

Pour la GAPDH : Tampon triéthanolamine (TEA) (100 mM ; pH 7,6 ; force ionique 0,15). Le cofacteur est NAD^+ (2 mM), le substrat est le GAP (0,8 mM). Les sels sont composés d'EDTA (1 mM), de KCl (100 mM) et de K_2HPO_4 ou KH_2PO_4 (100 mM).

Pour la PyK : Tampon triéthanolamine (TEA) (50 mM ; pH 7,2 ; force ionique 0,15). Le cofacteur est NADH (0,42 mM), le substrat est le phosphoenol pyruvate PEP (2,2 mM). Les sels sont composés de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (12,6 mM), KHCO_3 (5 mM), KCl (50,3 mM), ADP (2,12 mM). L'enzyme auxiliaire : LDH (12,5 μg).

Pour la PFK : Tampon triéthanolamine (TEA) (100 mM ; pH 7,8 ; force ionique 0,15). Le cofacteur : NADH (0,42 mM). Les substrats : PEP (2,2 mM) et Fru-6-P (2 mM). Les sels : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,5 mM), NaHCO_3 (10,7 mM), KCl (10 mM), ATP (0,5 mM) et AMP (1,6 mM). Les enzymes auxiliaires : PyK/LDH (1/1) 5 μl .

Pour la PGK : Tampon triéthanolamine (TEA) (100 mM ; pH 7,6 ; force ionique 0,15).

Le cofacteur : NADH (0,42 mM). Les sels : NaHCO₃ (4.76 mM), KCl (50 mM) et MgCl₂.7H₂O (10 mM). Les substrats PEP (2.5 mM) et ATP (0.5 mM). Les enzymes auxiliaires : LDH (25 µL) et pyK (25 µL)

Pour l'aldolase : Tampon triéthanolamine (TEA) (100 mM ; pH 7,6 ; force ionique 0,15). Substrats : PEP (2.5 mM) et F-1,6-diP (2 mM). Sels : EDTA (2 mM) et NaHCO₃ (7.2 mM). Cofacteur : NADH (0.84 mM). Enzymes auxiliaires : 20 µL d'un mélange GDH/TIM (10/1).

Pour la PGI : Tampon triéthanolamine (TEA) (50 mM ; pH 7,6 ; force ionique 0,15). Substrat : F6P (1.3 mM). Cofacteur : NADP (0.4 mM). Sels : MgCl₂.7H₂O (7 mM). Enzyme auxiliaire : G6PDH (20 µL).

III.2.2.6.2. Cinétiques enzymatiques : composition des mélanges et des sels

Pour les différents tests de cinétique enzymatique il est nécessaire de préparer par avance des solutions communément appelées Mix. Ce sont des milieux dans lesquels l'enzyme peut fonctionner de façon optimale : soit des sels de phosphates dans le tampon dans le cas le plus simple de la GAPDH, soit un ensemble de substrats et cofacteurs pour la plupart. Les enzymes auxiliaires, fragiles, sont rajoutées uniquement avant chaque série de mesures cinétiques pour activer le mélange réactionnel.

III.2.2.6.2.1. Préparation du mélange de PFK

Tableau XVII : Composition du mélange de PFK

Réactant	Concentration (mM) dans :		Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Quantité (mg) Pour 20ml de mélange
	Test	Mélange		
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.5	50	246.5	246.5
KCl	10	200	74.6	298
Fructose-6-P	2	40	304.1	244
ATP	0.5	10	605.2	120
PEP	2.2	43	208	180
AMP	1.6	32	499.2	319
NADH	0.42	8.4	709.4	120
NaHCO ₃	10.7	214	84	360

- Aliquoter les 20ml de mélange en 1ml et les congeler à -20°C
- Pour 20 tests : 1ml de mélange activé avec 25 µg de PyK + 12.5 µg de LDH et si nécessaire, 100 µl de Triton X-100 (20% en solution aqueuse)

NB : Le Fructose-6-Phosphate est le substrat naturel de la PFK (voir schéma réactionnel). Le Triton X-100 joue un rôle de détergent. MgSO₄ apporte les ions Mg²⁺ pour stabiliser l'ADP et l'ATP. Les différentes masses sont pesées et dissoutes dans 20ml de

solution Tampon (TEA pH=8, 100 mM, FI=0.15). Il est nécessaire de faire fonctionner la PFK en présence d'effecteur AMP car c'est une enzyme régulée et son fonctionnement n'est Michaëlien qu'en présence d'AMP, sinon elle est sigmoïdale.

Conditions d'expériences : NADH (0,42 mM), PEP (2,2 mM) et Fru-6-P (2 mM). Les sels : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2,5 mM), $NaHCO_3$ (10,7 mM), KCl (10 mM), ATP (0,5 mM) et AMP (1,6 mM). Enzymes auxiliaires : PyK/LDH (1/1) 25 μ l.

III.2.2.6.2.2. Préparation du mélange de PyK

Tableau XVIII: Composition du mélange de PyK

Réactant	Concentration (mM) dans :		Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Quantité (mg) Pour 10ml de mélange
	Test	Mélange		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	12.6	251.5	246.5	620
KCl	50.3	1005.4	74.6	750
ADP	2.12	42.4	471.2	200
$KHCO_3$	5	100	100.1	100

- Aliquoter les 10ml en 1ml et les congeler à -20°C
- Pour 10 tests : 1ml de mélange activé avec 5mg de NADH et 12.5 μ g de LDH
- Une solution du substrat naturel de PyK, le PEP (M=267.2 g.mol⁻¹, 100 mM) est préparée et conservée à 4°C. Elle est introduite (22 μ l) dans chaque cuve lors du test. La solution Tampon ici est TEA pH=7.2, 50mM, FI=0.15.

III.2.2.6.2.3. Préparation des sels (Pi)

Tableau XIX: Composition des sels de GAPDH

Réactant	Concentration (mM) dans :		Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Quantité (mg) Pour 10mL de mélange
	Test	Mélange		
K_2HPO_4	100	1000	174	1740
KCl	99.8	998.6	74.6	745
EDTA	1	10	372.2	37

- L'ensemble est dissout dans 10 ml de solution Tampon (TEA, pH=7.6, 0.1M, FI=0.15), aliquoter en 1ml et congeler à -20°C.

III.2.2.6.2.4. Préparation du NAD⁺ 80mM

Pour 1mL, peser 53 mg de NAD⁺ (663.4 g.mol⁻¹) à dissoudre dans 1 mL de Tampon (TEA, pH=7.6, 0.1M, FI=0.15). Ajouter 20 mg de $NaHCO_3$ pour avoir un pH neutre (pH≈6.8).

III.2.2.6.2.5. Synthèse du GAP par hydrolyse du diacétal correspondant

Le schéma réactionnel est le suivant :

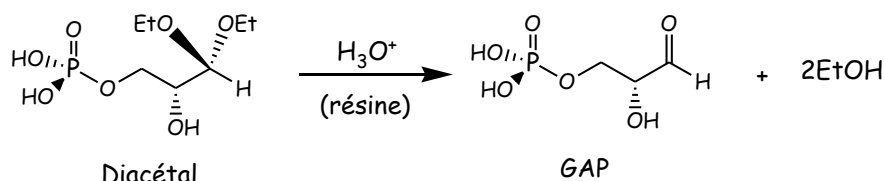


Schéma 18: Synthèse du GAP

Dans un erlenmeyer de 10 mL, peser 1.5 g de résine acide DOWEX-50 (poids sec), dissoudre dans 6 mL d'eau distillée (ou millipure) puis ajouter 100 mg d'acétal. Protéger l'erlenmeyer de la lumière avec du papier aluminium. Lorsque la réaction se produit, l'acétal se solubilise progressivement et disparaît sous agitation. Laisser l'ensemble sous agitation dans un bain d'huile de silicone à 60°C pendant une heure (au-delà de 60°C, le produit s'abîme). Filtrer ensuite, laver à l'eau distillée, ajuster à 16.6mL, aliquoter en 1mL et congeler à -20°C. On obtient ainsi 200 μ mol de GAP (\approx 34mg). La solution est à 12 mM ou 2,04 μ g/mL. Le GAP est activé avec de la soude avant son utilisation pour les tests enzymatiques.

III.2.2.7. Composition des tampons

III.2.2.7.1. Préparation du tampon EDB (Enzyme Dilution Buffer)

Pour 1L de solution : Dithiothréitol (DTT : $M=154.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) : 0.5mM soit 77mg à peser. Sérum Albumine Bovine (SAB) : 100mg. EDTA ($M=372.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) : 0.2mM soit 74.4mg à peser. On ajuste à 1L avec du Tampon TEA. Le pH et la concentration de ce tampon varient avec le type d'enzyme étudiée.

III.2.2.7.2. Préparation du tampon TEA (Tris Ethanol Amine)

Pour 500ml, TEA, HCl ($M=185.65 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$): 4.64g (50 mM), FI = 0.15. NaOH 1M afin d'ajuster le pH à la valeur voulue (7.2, 7.6 ou 8). NaCl ($M=58.5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) : 2.92 g (0.1 M) pour ajuster la force ionique à 0.15. Compléter avec de l'eau distillée dans une fiole jaugée de 500ml.

Tableau XX: pH et concentration des tampons TEA en fonction des enzymes

Enzyme	pH	Concentration (mM)
GAPDH, PGK, PGI, GDH, aldolase	7.6	0.1
PFK	8	0.05
PyK	7.2	0.1

III.2.2.8. Tests de sensibilité bactérienne

Les CMI ont été déterminés en utilisant le test de colorimétrie rapide INT (Eloff, 1998; Mativandlela et al., 2006). Les échantillons sont d'abord émulsionnés dans le DMSO/MHB (50:50 V/V) ; la solution obtenue est ensuite ajoutée à MHB et diluée en série deux fois (dans les microplaques de 96 puits). 100µl de l'inoculum (1.5×10^6 CFU/ml) préparé dans le MHB est ensuite ajouté. La plaque est recouverte d'un scellant stérile pour plaque, puis agitée afin de mélanger le contenu des puits à l'aide d'un agitateur et enfin incubée à 37°C pendant 18h. La concentration finale de DMSO a été de 2.5% et n'a pas affecté la croissance microbienne. Les puits contenant le MHB, 100 µl de l'inoculum et le DMSO à la concentration finale de 2.5% ont servi de témoins négatifs.

Les CMI des échantillons ont été déterminées après 18h d'incubation à 37°C suivi de l'ajout de 40µl d'INT à 0.2 mg/ml puis d'une incubation à 37°C pendant 30 min. Les bactéries vivantes font virer ce colorant jaune au rose.

La CMI est définie comme étant la concentration minimale de l'échantillon qui présente une inhibition complète de la croissance microbienne et empêche le changement de coloration (Kuethe et al., 2008).

La CMB a été déterminée par ajout de 50 µl des suspensions des puits n'ayant présenté aucune croissance durant la mesure de la CMI à 150ml de bouillon frais. Ces suspensions ont été réincubées à 37°C pendant 48h. La CMB est définie comme étant la concentration minimale de l'extrait qui inhibe complètement la croissance de la bactérie (Cohen et al., 1998).

Le chloramphénicol, utilisé comme antibiotique de référence, a été testé également en présence du Phénylalanine-Arginine β -Naphthylamide à une concentration finale de 30 ml/l afin de confirmer la résistance des souches bactériennes.

BIBLIOGRAPHIE

- Addae-Mensah I, Achenbach H, Thoithi GN, Waibel R and Mwangi JW** (1992). Epoxychiromodine and other Constituents of *Croton megalocarpus*. *Phytochemistry*, **31** (6): 2055-2058.
- Adjanohoun EJ, Assi, Aké, Floret L, Guinko JJ, Koumaré S, Ahyi M et Raynal AMRJ** (1981). Médecine traditionnelle et pharmacopée contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali ACCT, 3ème Edition, Paris, 291p.
- Aide mémoire** (2013). [Trypanosomiase Humaine Africaine \(maladie du sommeil\), N°259, Organisation mondiale de la Santé \(OMS\)](#).
- Ali BRS, Pal A, Croft SL, Taylor RJK, Field MC** (1999). The farnesyltransferase inhibitor manumycin A is a novel trypanocide with a complex mode of action including major effects on mitochondria. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **104**: 67-80.
- Ambrozin ARP, Mafezoli J, Vieira PC, Fernandes JB, Da Silva MFGF, Ellena JA and De Albuquerque S** (2005). New pyrone and quinoline alkaloids from *Almeidea rubra* and their trypanocidal activity. *J. Braz. Chem. Soc.*, **16**: 434-439.
- Anderson DMW, Howlett JF, McNab CGA** (1987). The hydroxyproline content of gum exudates from several plant genera. *Phytochemistry*, **26**: 309-311.
- Araya JE, Neira I, Da Silva S, Mortara RA, Manque P, Cordero E, Sagua H, Loyola A, Bórquez J, Morales G and González J** (2003). Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbrelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **98**: 413-418.
- Arbonnier M** (2000). Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. CIRAD, MNHM, UICN. . 542p.
- Aronov AM, Suresh S, Buckner FS, Van Voorhis WC, Verlinde CLMJ, Opperdoes FR, Hol WGJ, Gelb MH** (1999). Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 4273-4278.
- Asres K, Bucar F, Knauder E, Yardley V, Kendrick H, Croft SL** (2001). *In vitro* antiprotozoal activity of extract and compounds from the stem bark of *Combretum molle*. *Phytother. Res.*, **15**: 613-617.
- Aubreville A** (1950). Flore forestière soudano-guinéenne, Paris, pp. 209-250.
- Ayimele GA, Tane P and Connolly JD** (2004). Aulacocarpin A and B, nerolidol and β -sitosterol glucoside from *Aframomum escapum*. *Bio. Syst. Ecology*, **32**: 1205-1207.
- Ayafor JF, Tcheundem MHK, Nyasse B, Tillequin F and Anke H** (1994). Aframodial and other bioactive diterpenoids from *Aframomum* species. *Pure Appl. Chem.* **66** (10/11): 2327-2330.
- Bacchi CJ, Nathan S, Hutner SH, McCann PP, Sjoerdsma A** (1980). Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes. *Science*, **210**: 332-334.
- Bado JP** (1996). Médecine coloniale et grandes endémies en Afrique. Ed. Kartala, Paris, 122 p.
- Bakker BM, Michels PAM, Opperdoes FR, Westerhoff HV** (1999). What controls glycolysis in bloodstream form of *Trypanosoma brucei* *J. Biol. Chem.*, **274**: 14551-14559.
- Barrett M, Burchmore R, Stich A** (2003). The trypanosomiases. *Lancet*, **362**:1469-80.
- Batista R, Chiari E, de Oliveira AB** (1999). A new steroidal saponin from the rhizomes of *Cotus spicatus*. *Planta Med.*, **65**: 285-287.
- Berhaut J** (1975). Flore illustrée du Sénégal, Tome IV, pp. 271-535.
- Bern C, Montgomery S, Herwaldt B** (2007). Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States. *A systematic review.*, *JAMA*, **298**:2171-2181.

- Betti JL** (2002). Medicinal plants sold in Yaounde market, Cameroun. *African study Monograph*, **23** (2): 47-64.
- Blattener J, Helfert S, Michels P, Clayton** (1998). Compartmentation of phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei* plays a critical role in parasite energy metabolism. *Proc. Natl. Sci. USA*, **95**:11596-11600.
- Bouquet A et Debray M** (1974). Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire, pp. 118-122.
- Broden A et Rodhain J** (1908). Traitement de la trypanosomiase humaine par la solution arsenicale de Loeffler. Communication préliminaire. *Bull. Soc. Pathol. Exo.*, **1**: 504-507.
- Burke J** (1971). Historique de la lutte contre la maladie du sommeil au Congo. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **51**: 465-477.
- Camacho MR, Phillipson JD, Croft SL, Rock P, Marshall SJ, Schiff Jr PL** (2002). Erratum: *In vitro* activity of *Triclisia patens* and some bibenzylisoquinoline alkaloids against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Phytother. Res.*, **16**: 432-436.
- Cane DE, Sohng JK** (1989). Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by pentalenolactone: kinetic and mechanistic studies. *Arch. Biochem. Pharmacol.*, **270**: 50-61.
- Cane DE, Sohng JK** (1994). Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by pentalenolactone 2. Identification of the site of alkylation by tetrahydropentalenolactone. *Biochemistry*, **33**: 6524-6530.
- Carlier Y** (2003). [Chagas Disease \(American Trypanosomiasis\)](#). [archive] eMedicine (27 février 2003).
- Carpenter FM** (1992). Treatise on Invertebrate Paleontology. Part R: *Arthropoda 4. Volume 4: Superclass Hexapoda*. Geological Society of America and University of Kansas Press, Lawrence, Kansas.
- Chagas C** (1909). Neue Trypanosomen, *Vorläufige Mitteilung*. *Arch. Schiff. Tropenhyg.*, **13**:120-122.
- Checchi F, Filipe JA, Haydon DT, Chandramohan D, Chappuis F** (2008). Estimates of the duration of the early and late stage of gambiense sleeping sickness. *BMC Infect Dis.*, **8**: 16.
- Cioffi G, Piaz FD, De Caprariis P, Sanogo R, Marzocco S, Autore G and De Tommasi N** (2006). Antiproliferative triterpene saponins from *Entada africana*. *J. Nat. Prod.*, **69**: 1323-1329.
- Cohen MA, Huband MD, Yoder SL, Gage JW et Roland GE** (1998). Bacterial eradication by clinafloxacin, CI-990, and ciprofloxacin employing MBC test, *in-vitro* time-kill and *in vivo* time-kill studies. *J Antimicrob Chemother.*, **41**:605-614.
- Cos P, Hermans N, De Bruyne T, Apers S, Sindambiwe JB, Vanden Berghe D, Pieters L, Vlietinck AJ** (2002). Further evaluation of Rwandan medicinal plant extracts for their antimicrobial and antiviral activities. *J. Ethnopharmacol.*, **79**: 155-163.
- Croft SL** (1997). The current status of antiparasite chemotherapy. *Parasitology*, **114**: S3-S15.
- Croft SL, Evans AT and Neal RA** (1985). The activity of plumbagin and other electron carriers against *Leishmania donovani* and *Leishmania mexicana amazonensi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **79**: 651-653.
- Dai J, Kardono LBS, Tsauri S, Padmawinata K, Pezzuto JM, Kinghorn AD** (1991). Phenylacetic acid derivatives and thioamide glycoside from *Entada phaseoloides*. *Phytochem.*, **30**: 3749-3752.

- Dastoor Z and Dreyer J-L** (2001). Potential role of nuclear translocation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *Journal of Cell Science*, **114**: 1643-1653.
- Debella A, Kunert O, Schmid MG, Michl G, Bucar F, Abebe D, Haslinger** (2000). A diterpene and a flavonol glucoside from *Securdaca longipedunculata* and *Entada abyssinica*. *Monatshefte Für Chemie*, **131**: 401-408.
- Delorenzi JC, Attias M, Gattass CR, Andrade M, Rezende C, Cunha PA, Henriques AT, Bou-Habib DC, Saraiva EMB** (2001). Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Pescheira australis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**: 1349-1354.
- De Moura KCG, Emery FS, Neves-Pinto C, Pinto MCFR, Dantas AP, Salomão K, De Castro SL and Pinto AV** (2001). Synthesis and trypanocidal activity of naphthoquinones isolated from *Tabebuia* and heterocyclic derivatives. A review from an interdisciplinary study. *J. Braz. Chem. Soc.*, **12**: 325-338.
- De Raadt P** (1999). The history of sleeping sickness. In : Protozoal Diseases (ed. HM Gilles) Arnold, London, pp. 249-260.
- Del Rayo CM, Kirby GC, Warhurst DC, Croft SL, Phillipson JD** (2000). Oxoaporphine alkaloids and quinines from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. *Planta Med.*, **66**: 478-480.
- Djeussi ED, Noumedem AKJ, Seukep AJ, Fankam GA, Voukeng KI, Tankeo BS, Nkuete LHA and Kuete V** (2013). Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine* , **13**:164 doi:10.1186/1472-6882-13-164.
- Diallo D, Paulsen BS, Liljebäck THA, Michaelsen TE** (2001). Polysaccharides from the roots of *Entada Africana* Guill. Et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. *J. Ethnopharmacol.*, **74**: 159-171.
- Doherty VF, Olaniram OO and Kanife UC** (2010). Antimicrobial activities of *Aframomum melegueta* (Alligator peper). *International Journal of Biology*, **2** (2): 126-131.
- Dokossi OB** (1998). Herbs of Ghana. Ghana Universities press, 746p.
- Dutertre J et Labusquière R** (1996). La thérapeutique de la trypanosomiase. *Med. Trop.*, **26**: 342-356.
- Eloff JN** (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.*, **64**:711-713.
- Enti AA** (1998). The rejuvenation plants of tropical Africa. Ed AK Andoh, FLS, the North scale institute, san Francisco.
- Erukaine OL, Oke OV, Owolabi FO and Adenekan** (2011). Chemical composition and antioxidant activities of *Aframomum Scepترم*. *Trends in Applied Science Research*, **6** (2): 190-197.
- Escoubas P, Lajide L and Mizutani J** (1995). Termite antifeedant activity in *Aframomum melegueta*. *Phytochemistry*, **40** (4): 1097-1099.
- Eyob S, Appelgren M, Rohloff J, Tsegaye A and Messele G** (2008). Traditional medicine use and essential oil composition of leaves and rhizomes of Korarima (*Aframomum corrorima* Braun P.C.M. Jansen from southern Ethiopia. *South African Journal of botany*, **74**: 181-185.
- Fabry W, Okemo PO, Ansorg R** (1998). Antibacterial activity of East African medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, **60**: 79-84.
- Fairlamb F, Oppendoes FR** (1986). Carbohydrate metabolism in cultured cells. Edited by MJ Morgan, Plenum Publishing Corporation, New York, p. 300.
- Fasoyiro SB and Adegoke** (2006). Antioxidant activities of fractionated components of

- Aframomum daniellii* fractions in soybean oil. *World Applied Science journal*, **1** (1): 25-28.
- Faure E** (1999a): www.caducee.net/DossierSpecialises/infection/leishmaniose.asp, consulté le 10 Septembre 2014.
- Fouazi LG, Casimir B, Michelle W, Paul M and Jacque P** (2002). Glycolysis and Proteasins as targets for the design of new Anti-Trypanosome Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2**: 439-456.
- Fourneau E** (1921). Sur l'emploi de l'acide oxyaminophénylarsinique et des acides arylarsiniques en général dans le traitement des spirillooses et des trypanosomiasis. *Annales de l'Institut Pasteur*, **35**: 571-574.
- Fournet A, Barrios AA, Muñoz V, Hocquemiller R, Roblot F and Cavé A** (1994). Antileishmanial activity of tetralone isolated from *Ampelocera edentul*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *Planta Med.*, **60**: 8-12.
- Fournet A et Muñoz V** (2002). Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2**: 1215-1237.
- Freiburghaus F, Ogwal EN, Nkunya MHH, Kaminski R, Brun R** (1996). *In vitro* antitrypanosomal activity of African plants used in traditional medicine in Uganda to treat sleeping sickness. *Trop. Med. Int. Health*, **1**: 765-771.
- Freiburghaus F, Steck A, Pfander H, Brun R** (1998). Bioassay-guided isolation of diastereoisomers of kolavenol from *Entada abyssinica* active on *trypanosoma brucei rhodesiense*. *J. Ethnopharmacol.*, **61**: 179-183.
- Galani TBR, Sass G, Njyou NC, Mkounga P, Tiegs G and Moundipa FP** (2014). Anti-hepatitis C virus activity of crude extract and fractions of *Entada africana* in genotype 1b replicon systems. *Am. J. Chn. Med.*, **42** (4): 853-868.
- Gallo BCM et Sarachine JM** (2009). Biological activities of Lupeol. *International journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, **3** (1): 46-66.
- Gallwitz H, Bonse S, Martinez-Cruz A, Schlichting I, Schumacher K, Krauth-Siegel L** (1999). Ajoene is an inhibitor and a subversive substrate of human glutathione reductase and *T. cruzi* trypanothione reductase: Crystallographic, kinetic, and spectroscopic studies. *J. Med. Chem.*, **42**: 364-372.
- Gascon J, Bern C, Pinazo MJ** (2010). [Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries \[archive\]](#). *Acta Trop.*, **115**: 22-27.
- Gelpi J L, Avilés JJ, Busquets M, Imperial S, Mazo A, Cortés A, Halsall DJ, Holbrook JJ** (1993). A theoretical approach to the discrimination and characterization of the different classes of the reversible inhibitors. *J. Chem. Ed.*, **70**: 805-816.
- Gentilini M** (1993). In: Médecine tropicale. Ed. Médecine-Sciences FLAMARION, Italie, 928 p.
- Gertsch J, Tobler RT, Brun R, Sticher O, Heilmann J** (2003). Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal properties of Justicidin B and a new aryl-naphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. *Planta Med.*, **69**: 420-424.
- Grijalva MJ, Palomeque-Rodriguez FS, Costales JA** (2005). High household infestation rates by synanthropic vectors of Chagas disease in southern Ecuador. *J. Med. Entomol.*, **42**(1):68-74.
- Hannaert V, Opperdoes FR, Michels PAM** (1995). Glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*: Expression in *Escherichia coli*, purification and characterization of the enzyme. *Protein Expression and purification*, **6**: 244-250.
- Hart CA** (2006). *Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter* and *Serratia* spp. In S. H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), *Principles and practice of Clinical Bacteriology* (2nd ed., pp. 377- 386). England, UK: John Wiley and Sons Ltd.

- Heilmann J, Brun R, Mayr S, Rali T, Sticher O** (2001). Minor cytotoxic and antibacterial compounds from the rhizomes of *Amomum aculeatum*. *Phytochemistry*, **57**: 1281-1285.
- Heilmann J, Mayr S, Brun R, Rali T, Sticher O** (2000). Antiprotozoal activity and cytotoxicity of novel 1, 7-Dioxadispiro [5.1.5.2] pentadeca-9, 12-dien-11one derivatives from *Amomum aculeatum*. *Helv. Chim. Acta*, **83**: 2939-2945.
- Herrera MR, Machocho AK, Nair JJ, Campbell WE, Brun R, Viladomat F, Codina C, Bastida J** (2001a). Alkaloids from *Cyrtanthus elatus*. *Fitoterapia*, **72**: 444-448.
- Herrera MR, Machocho AK, Brun R, Viladomat F, Codina C, Bastida J** (2001b). Crinine and lycorane type alkaloids from *Zephyranthes citrina*. *Planta Med.*, **67**: 191.
- Hoet S, Stevigny C, Block S, Opperdoes F, Colson P, Baldeyrou B, Lansiaux A, Bailly C, Quetin-Leclercq** (2004) Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. *Planta Med.*, **70**: 407-413.
- Ikegami F, Ohmiya S, Ruangrunsi N, Sakai SI, Murakoshi I** (1987). Entadamine B, a second new sulphur-containing amide from *Entada phaseoloides*. *Phytochemistry*, **26**: 1525-1526.
- Ikegami F, Sekine T, Duangteraprecha S, Matsushita N, Matsuda N, Ruangrunsi N, Murakoshi I** (1989). Entadamide C, a sulphur-containing amide from *Entada phaseoloides*. *Phytochemistry*, **28**: 881-882.
- Institut Pasteur** (1998). Les *Leishmanioses*
- Iten M, Matovu E, Brun R, Kaminsky R** (1995). Innate lack of susceptibility of Ugandan *Trypanosoma brucei rhodesiense* to DL- α -difluorométhylornithine (DFMO). *Trop. Med. Parasitol.*, **46**: 190-195.
- Jackson Y, Chappuis F, Loutan L** (2008). Maladie de Chagas en Suisse: faire face à une maladie émergente et interrompre la chaîne de transmission. *Rev. Med. Suisse*, **4**:1212-1217.
- Jamonneau V, Solano P et Cuny G** (2001). Utilisation de la biologie moléculaire dans le diagnostic de la Trypanosomiase humaine africaine. *Médecine Tropicale*, **61**: 347-354.
- Janssens P, Burke J** (1992). Les trypanosomiasés africaines. Médecine et hygiène en Afrique Centrale de 1885 à nos jours, **2**, (ed. Janssens PG, Kivits & Vuylsteke J). Fondation Baudouin, Bruxelles, pp. 1399-1535.
- Jonchère H** (1951). Chimio prophylaxie de la trypanosomiase humaine en A.O.F. *Bull. Soc. Pathol.*, **44** : 83-92.
- Jonchère H** (1953). Quatrième réunion du comité scientifique international de recherche sur les trypanosomiasés et les tsé-tsé. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **46**: 359-373.
- Kato M, Sakai K and Endo A** (1992). Koningic acid (heptelidic acid) inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from various sources. *Biochim. Biophys. Acta*, **1120**: 113-116.
- Kaminsky R, Schmid C, Brun R** (1996). An “*in vitro* selectivity index” for evaluation of cytotoxicity of antitrypanosomal compounds. *In Vitro Toxicology*, **9**: 315-324.
- Kamnaing P, Tsopmo A, Tanifun EA, Tchuendem MHK, Tane P, Ayafor JF, Sterner O, Rattendi D, Iwu MM, Schuster B and Bacchi C** (2003). Trypanocidal diarylheptanoids from *Afromomum letestuiianum*. *J. Nat. Prod.*, **66**: 364-367.
- Kareru PG, Keriko JM, Gachanja AN and Kenji GM** (2008). Direct detection of Triterpenoid saponins in medicinal plants. *Afr. J. Trad. CAM*, **5** (1): 56-60.
- Kayembe D et Wery M** (1972). Observation sur la sensibilité aux diamidines de souches de *Trypanosoma gambiense* récemment isolés en République du Zaïre. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **52**: 1-8.

- Kayser O, Kiderlen AF** (2001). *In vitro* leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. *Phytoter. Res.*, **15**: 148-152.
- Kenedey ML, Cortés-Selva F, Pérez-Victoria JM, Jimenez IA, Gonzales AG, Muñoz O M, Gamarro F, Castanys S, Ravello AG** (2001). Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J. Med. Chem.*, **44**: 4668-4676.
- Kenmogne M, Prost E, Harakat D, Jacquier M-J, Frederich M, Sondengam LB, Zeches M and Waffo TP** (2006). Five labdane diterpenoids from the seeds of *Aframomum zambesiaticum*. *Phytochemistry*, **67** (5): 433-438.
- Kerharo J et Adam JG** (1974). La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Vigot et Frères, Paris, 1012p.
- Kim H, Feil IK, Verlinde CLMJ, Petra PH and Hol WGJ** (1995). Crystal structure of glycosomal Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Leishmania mexicana*: Implications for structure-based drug design and a new position for the inorganic phosphate binding site. *Biochemistry*, **34**: 14975-14986.
- Kimbu SF, Ngadjui B and Sondengam BL** (1987). A new labdane diterpenoid from the seeds of *Aframomum daniellii*. *J. Natural Products*, **50**: 230-231.
- Kimbu SF, Njimi TK and Sondengam BL** (1979). The structure of a Dialdehyde from *Aframomum daniellii*. *J.C.S. Perkin I*, 1303-1304.
- King H, Lourie EM, Yorke W** (1937). New trypanocidal substances. *Lancet*, **26**: 357-362.
- Kirsch G, Kong GM, Wright AD, Kaminsky R** (2000). New bioactive sesterterpene and antiplasmodial alkaloids from the marine sponge *hyrtios* cf. *erecta*. *J. Nat. Prod.*, **63** (6): 825.
- Koechlin J** (1965). Flore du Cameroun, Paris, pp.19-70.
- Kuzoe FAS** (1993). Current situation of African trypanosomiasis. *Acta Tropica*, **54**: 153-162.
- Kuete V, Ngameni B, Simo CCF, Tankeu RK, Ngadjui BT, Meyer JJM, Lall N et Kuate JR** (2008). Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). *J. Ethnopharmacol.* **120**:17-24.
- Lawlor MS, Hsu J, Rick PD, Miller VL** (2005). Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol Microbiol.*, **58**:1054-1073.
- Ladame S** (2001). Synthèse d'inhibiteurs de la Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase, étude mécanistique et applications. Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Ladame S, Faure R, Denier C, Lakhdar-Ghazal F, Willson M** (2005). Selective inhibition of *Trypanosoma cruzi* GAPDH by "bi-substrate" analogues. *Org. Biomol. Chem.*, **3**: 2070-2072.
- Lambeir AM, Loiseau AM, Kuntz DA, Vellieux FM, Michels PAM, Opperdoes FR** (1991). The cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. Kinetic properties and comparison with homologous enzymes. *Eur. J. Biochem.*, **198**: 429-435.
- Lauth N** (1991). Inhibiteurs d'enzymes glycolytiques du trypanosome et du mammifère. Synthèses et étude cinétique de leur mode d'action. Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Laveissiere C, Penchenier L** (2000). Manuel de lutte contre la maladie du sommeil : lutte antivectorielle. Cah.D.C.E.A.C.IRD Yaoundé Louis Jean **vol5**, éd. septembre 2000
- Laveissière C, Penchenier L** (2005): www.sleeping-sickness.com , consulté le 15 Septembre 2014.
- Legros D, Evans S, Maiso F, Enyaru JCK, Mbulamberi D** (1999). Risk factors for

- treatment failure after melarsoprol for *T. b. gambiense* trypanosomiasis in Uganda. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **93**: 439-442.
- Lekane TD** (2009). Université de Yaoundé I, Département de Géographie, colloque «Localiser les produits»
- Lin Z, Li J, Zhang F, Song S, Yang J, Liang S, Tsou C** (1993). Structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Palinurus versicolor* carrying the fluorescent NAD derivatives at 2.7Å resolution. *Arch. Biochem. Biophys.*, **302**: 161-166.
- Livingstone S** (1858). Arsenic as a remedy for the tse-tse bite. *British Med. Journal*, **1**: 360-361.
- Louis FJ, Bilenge CMM, Simarro PP, Kande BKMV, Lucas P, Janin J** (2003). Trypanosomiase Humaine Africaine en milieu urbain: une problématique émergente? *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **96**: 205-208.
- Mahato SB et Kundu AP** (1994). ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, **37**: 1517-1575.
- Malgras D** (1992). Arbres et arbustes guérisseurs des savanes Maliennes. Edits. Karthala, Paris.
- Mans S, Canouet S** (2008). [Pseudomonas aeruginosa: Une histoire d'eau](http://www.cclin-sudouest.com), sur www.cclin-sudouest.com, [Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales du Sud-Ouest](http://www.cclin-sudouest.com), consulté le 5 Novembre 2013.
- Marlier M, Le Guellec G, Wathelet JP and Severin M** (1993). Characterization of three labdane diterpenes from *Aframomum alboviolaceum*. *Planta Med.*, **59**: 455-457.
- Martins RCC, Lago JHG, Albuquerque S, Kato MJ** (2003). Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. *Phytochemistry*, **64**: 667-670.
- Masahiro T, Yuh-Dan, Ken-Ichi S and Yoshihiro K** (1993). Cholesterol biosynthesis inhibitory component from *Zingiber officinale*. *Chem. Pharm. Bull.*, **41** (4): 710-713.
- Mativandlela SPN, Lall N et Meyer JJM** (2006). Antibacterial, antifungal and antitubercular activity of *Pelargonium reniforme* (CURT) and *Pelargonium sidoides* (DC) (Geraniaceae) root extracts. *S Afr J Bot.*, **72**: 232-237.
- Mehlhorn H** (1988). In: Parasitology in focus. MEHLHORN H., Edition, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp.10-12.
- Mendes AN, Chaves JS, Albuquerque S, Rodrigues DCO** (2004). Trypanocidal properties of *Mikania stipulacea* and *Mikania hoehnei* isolated terpenoids. *Fitoterapia*, **75**: 381-384.
- Mercer WD, Win SI, Watson HC** (1976). Twinning crystals of human skeletal muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.*, **104**: 277-283.
- Merschjohann K, Sporer F, Steverding D, Wink M** (2001). In vitro effect of alkaloids on bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *T. congolense*. *Planta Med.*, **67**: 623-627.
- Michels PAM** (1988). Compartmentation of glycolysis in trypanosomes: a potential target for new trypanocidal drugs. *Biology of the cells*, **64**: 157-164.
- Michels PAM, Poliszczak A, Osinga KA, Misset O, Van Beeumen J, Wierenga RK, Borst P, Opperdoes FR** (1986). Two tandemly linked identical genes code for the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.*, **5**: 1049-1056.
- Mikus J, Harkenthal M, Steverding D, Reichling J** (2000). In vitro effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Med.*, **66**: 366-368.

- Misset O, Van Beeumen J, Lambeir AM, Van Der Meer R, Opperdoes FR** (1987). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. Comparison of the glycosomal and cytosolic isoenzymes. *Eur. J. Biochem.*, **162**: 501-507.
- Mohd YYA, Norlisa A, Srijit D, Suhaniza S and Murad NA** (2009). Chemopreventive efficacy of Ginger (*Zingiber officinale*) in ethionine induced rat hepatocarcinogenesis. *Afr. J. Traditional CAM.*, **6** (1): 87-93.
- Moideen SV, Houghton PJ, Rock SL, Croft SL, Aboagye-Nyame F** (1999). Activity of extracts and naphthoquinones from *Kigelia pinnata* against *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Planta Med.*, **65**: 536-540.
- Moras D, Olsen KW, Sebasan MN, Buehner M, Ford GC, Rossmann MG** (1975). Studies of asymmetry in three dimensional structure of lobster D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **250**: 9137-9162.
- Nebojsa I, Schimdt BM, Poulev A and Raskin I** (2010). Toxicological evaluation of grains of paradise (*Aframomum melegueta*) [Roscoe] K Schum. *J. Ethnopharmacol.*, **127**: 352-356.
- Noor H, Aun LLI, Azmi MN, Aziz AN, Thirthagiri E, Halijah I and Khalijah A** (2010). 1'S-1'-Acetoxyeugenol acetate: A new chemotherapeutic natural compound against MCF-7 human breast cancer cells. *Phytomedicine*, **17**: 935-939.
- Noumedem AKJ, Mihasan M, Lacmata TS, Stefan M, Kuate RJ et Kuete V** (2013) Antibacterial activities of the methanol extracts of ten Cameroonian vegetables against Gram-negative multidrug-resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **13**: 26 <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/26>, consulté le 5 Novembre 2014.
- Noumi E, Amvan ZPH and Lontsi D** (1998). Afrodisiac plants used in Cameroun. *Fitoterapia*, **LXIX** (2): 125-134.
- Noumi E** (2004). Impuissance érectile et traitement par les plantes dans la population de l'arrondissement d'okola (province du centre, Cameroun). *Le pharmacien d'Afrique*, **171**: 9-15.
- Noumi E et Valet G** (1987). Quelques épices, condiments et aromates du Cameroun. *Ann. Fac. Sc. Biol.-Biochimie*, **I** (4): 49-61.
- Nyasse B and Ndjakou L** (2000). Aframodial, a labdane diterpene showing selective antileukemic activity. *Pharmazie*, **55** (9): 703-704.
- Nzowa LK, Barboni L, Teponno RB, Ricciutelli M, Lupidi G, Quassinti L, Bramucci M et Tapondjou LA** (2010). Rheediinosides A and B, two antiproliferative and antioxidant triterpene saponins from *Entada rheedii*. *Phytochemistry*, **71**: 254-261.
- Odiit M, Kansime F, Enyaru JC** (1997). Duration of symptoms and case fatality of sleeping sickness caused by *Trypanosomabrucei rhodesiense* in Tororo, Uganda. *East Afr. Med. J.*, **74**: 792-795.
- Odukoya OA, Houghton PJ and Rama A** (1999). Lipxygenase inhibitors in the seeds of *Aframomum daniellii* K. Schum (zingiberaceae). *Phytomedicine*, **6**(4): 251-256.
- Okada Y, Shibata S, ikekawa T, Javellana AMJ, Kamo O** (1987). Entada saponin III, a saponin isolated from the bark of *Entada phaseoloides*. *Phytochemistry*, **26**: 2789-2796.
- Oketch-Rabah HA, Lemmich E, Dossaji SF, Theander TG, Olsen CE, Cornett C, Kharazmi A, Brogger CS** (1997). Two new antiprotozoal 5-methylcoumarins from *Vernonia brachycalyx*. *J. Nat. Prod.*, **60**: 458-461.
- Olajide OA et Alada A** (2001). Studies of the anti-inflammatory properties of *Entada abyssinica*. *Fitoterapia*, **72**: 492-496.
- Pagotto FJ, Nazarowec-White M, Bidawid S, & Farber JM** (2003). Enterobacter sakazakii: infectivity and enterotoxin production *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Food*

- Protection*, **66** (3): 370-375.
- Peczon BD, Spivey H O** (1972). Catalytic sites in rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, **11**: 2209-2217.
- Pepin J, Milord F, Meurice F, Ethie L, Loko L, Mpia B** (1992). High-dose nifurtimox for arseno-resistant *Trypanosoma brucei gambienses* sleeping sickness: an open trial in Central Zaïre. *Research in Veterinary Science*, **52**: 292-298.
- Pepin J, Milord F** (1994). The treatment of Human African Trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.*, **33**: 1-47.
- Perez HA, De La Rosa M, Apitz R** (1994). In vivo activity of ajoene against rodent malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**: 33-36.
- Périé J, Alric I, Blonski C, Gefflaut T, Viguerie N, Trinquier M, Wilson M, Opperdoes FR, Callens M** (1993). Inhibition of the glycolytic enzymes in the trypanosome: an approach in the development of new leads in the therapy of parasitic diseases. *Pharmacol. Ther.*, **60**:347-365.
- Picman AK, Rodriguez E, Towers GH** (1979). Formation of adducts of parthenin and related sesquiterpene lactones with cysteine and glutathione. *Chem. Biol. Interact.*, **28**: 83-89.
- Prata A** (2001). *Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease*. *Lancet Infect Dis.*, **1**: 92-100.
- Ramirez I, Carabot A, Melendez P, Carmona J, Jimenez M, Patel AV, Crabb TA, Blunden G, Cary PD, Croft SL, Costa M** (2003). Cissampeloflavone, a chalcone-flavone dimer from *Cissampelos pareira*. *Phytochemistry*, **64**: 645-647.
- Räz B** (1998). Isolation and evaluation of antiparasitic lead compounds from African medicinal plants, Ph.D. Thesis, Universität Base l.
- Redhead SA, Cushion MT, Frenkel JK, Stringer JR** (2006). « *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications ». *J. Eukaryot Microbiol.*, **53** (1): 2-11.
- Richomme P, Godet MC, Foussard F, Toupet L, Sévenet T, Bruneton J** (1991). A novel leishmanicidal labdane from *Polyalthia macropoda*. *Planta Med.*, **57**: 552-554.
- Rocha LG, Almeida JRGS, Macêdo RO, Barbosa-Filho JM** (2005). A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, **12**: 514-535.
- Rose IA and Kuo DJ** (1989). The substrate proton of the pyruvate kinase reaction. *Biochemistry*, **28**: 9579-9585.
- Rosselli S, Bruno M, Maggio G, Chen TH, Bastow KF, Lee KH** (2007). Cytotoxic activity of some natural and synthetic *ent*-Kauranes. *J. Nat. Prod.*, **70**: 347-352.
- Salmon-Chemin L, Buisine E, Yardley V, Kohler S, Debreu MA, Landry V, Sergheraert C, Croft SL, Krauth-Siegel RL, Davioud-Charvet E** (2001). 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox cycling activities and *in vitro* cytotoxicity. *J. Med. Chem.*, **44**: 548-565.
- Santé-Médecine** (2014). *Escherichia coli* (*E. Coli*) - Symptômes et traitement. santemedecine.commentcamarche.net, consulté le 5 Novembre 2014.
- Schinor EC, Salvador MJ, Ito IY, de Albuquerque S, Dias DA** (2004). Trypanocidal and antimicrobial activities of *Moquinia kingii*. *Phytomedicine*, **11**: 224-229.
- Schmeda-Hirschman G, Razmilic I, Sauvain M, Moretti C, Munoz V, Ruiz E, Balanza E, Fournet A** (1996). Antiprotozoal activity of jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and jatrophone from *Jatropha isabellii*. *Phytotherap. Res.*, **10**: 375-378.
- Schmidt TJ, Brun R, Willuhn G, Khalid SA** (2002). Anti-trypanosomal activity of helenalin and some structurally Related sesquiterpene lactones. *Planta Med.*, **68**, 750-751.

- Schuster R, Holzhüter HG** (1995). Use of mathematical methods for predicting the Metabolite effect of large scale enzyme activity alteration. Application to enzyme deficiencies of red blood cells. *Eur. J. Biochem.*, **29**: 403-418.
- Seydoux S, Bernhard S, Pfenninger O, Payne M, Malhotra OP** (1973). Preparation and active-site specific properties of sturgeon muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, **12**: 4290-4300.
- Simarro PP and Asumu PN** (1996). Gambian trypanosomiasis and synergism between melarsoprol and eflornithine: first case report. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **90**: 315.
- Sinou V** (1998). Nouvelles approches dans la morphogénèse du Paludisme et du trypanosome: Incidences en chimiothérapie. Thèse de Doctorat du Muséum National d'Histoire Naturelle. Paris, France.
- Skarzynski T, Moody PCE, Wonacott AJ** (1987). Structure of holo- glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **193**: 171-187.
- Sob SVT, Tane P, Ngadjui BT, Connolly JD and Ma D** (2007). Trypanocidal labdanefrom the seeds of *Aframomum aulacocarpos* (Zingiberaceae). *Tetrahedron*, **63**: 8993-8998.
- Souza DHF, Garratt RC, Araoujo APU, Guimaraes BG, Jesus WDP, Michels PA M, Hannaert V, Oliva G** (1998). *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor. *FEBS Lett.*, **424**: 131-135.
- Stanghellini A, Josenando T** (2001). The situation of sleeping sickness in Angola: a calamity. *Trop. Med. Int. Health*. **6**: 330-334.
- Tane P, Tatsimo SD, Ayimele GA, Conolly JD** (2005). Bioactive from *Aframomum* species. *11th NAPRECA Symposium Book of Poceeding*. Antanarivo, Madagascar: 214-223.
- Tapondjou AL, Miyamoto T, Mirjolet JF, Guilbaud N, Lacaille-Dubois MA** (2005). Pursaethosides A-E, triterpene saponins from *Entada pursaetha*. *J. Nat. Prod.*, **68**: 1185-1190.
- Tchinda AT, Tsopmo A, Tane P, Ayafor JF, Connolly JD, Sterner O** (2002). Vernoguinsterol and Verguinoside, Trypanocidal stigmastane derivatives from *Vernonia guineensis* (Asteraceae). *Phytochemistry*, **59**: 371-374.
- Teke NG, Lunga KP, Wabo KH, Kuate JR, Vilarem G, Giacinti G, Kikuchi H et Oshima Y** (2011). Antimicrobial and antioxidant properties of methanol extract, fractions and compounds from the stem bark of *Entada abyssinica* Stend ex A. Satabie. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **11**:57 <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/11/57>, consulté le 10 Novembre 2014.
- Teke NG, Lunga KP, Wabo KH, Kuate JR, et Dzovem JP** (2012). *In vivo* evaluation of anti-diarrhoeal activity of methanol extract, fractions and isolated compounds from *E. abyssinica* stem bark. *Pharmacologia*, **3** (11): 583-590.
- Teixeira AR, Monteiro PS, Rebelo JM** (2001). Emerging Chagas Disease: Trophic Network and Cycle of Transmission of *Trypanosoma cruzi* from Palm Trees in the Amazon *Emerg Infect Dis.*, **7** (1):100-112.
- Tomla C, Kamnaing P, Ayimele GA, Tanifum EA, Tsopmo A, Tane P, Ayafor JF and Connolly J D** (2002). Three labdane diterpenoids from *Aframomum Sceptum* (Zingiberaceae). *Phytochemistry*, **60**: 197-200.
- Troupin G** (1982). Flore des plantes ligneuses du Rwanda, Publication N°21, 428pp.

- Tsomo A, Ayimele GA, Tane P, Ayafor JF, Connolly JD and Sterner O** (2002). A norbislabdane and other labdanes from *Aframomum sulcatum*. *Tetrahedron*, **58**: 2725-2728.
- Uchiyama N, Nichiho I, Fumiyuki K, Gisho H, Yoshio T, Olimjo KK, and Ozodbek A** (2004). Trypanocidal diterpene with novel skeleton from *Dracocephalum Komarovi*. *Tetrahedron letters*, **45**: 531-533.
- Umukoro S and ashorobi RB** (2005). Effect of *Aframomum melegueta* seed extract on Castor oil-induced diarrhea. *Pharmaceutical biology*, **43** (4): 330-333.
- Umukoro S and ashorobi R B** (2005). Anti-stress potential of aqueous seed extract of *Aframomum melegueta*. *African journal of biomedical communication group*, **8**:119-121.
- Umukoro S and Ashorobi BR** (2008). Further pharmacological studies on aqueous seed extract of *Aframomum melegueta* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **115**: 489-493.
- Van Calenbergh S, Van Den Eeckhout E, Herdewijn P, De Buyn A, Verlinde CLMJ, Hol WGJ, Callens M, Van Aerschot A, Rozenski J** (1994). Synthesis and conformational analysis of 2'-deoxy-2'-(3-methoxybenzamido)adenosine, a rational-designed inhibitor of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). *Helv. Chim. Acta*, **77**: 631-644.
- Van Calenbergh S, Verlinde CLMJ, Soenens J, De Bruyn A, Callens M, Blaton NM, Peeters OM, Hol WGJ, Herdewijn P** (1995). Synthesis and structure-activity relationships of analogs of 2'-deoxy-2'-(3-methoxybenzamido)adenosine, a selective inhibitor of trypanosomal glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Med. Chem.*, **38**: 3838-3849.
- Van Nieuwenhove S** (1992). Advances in sleeping sickness therapy. *Annales de la société belge de Médecine Tropicale*, **83**: 7-12.
- Vassal J J** (1908). L'atoxyl dans le traitement de la fièvre paludéenne. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **1**: 539-544.
- Vellieux FMD, Hajdu J, Verlinde CLJM, Groendijk H, Read RJ, Greenhough TJ, Campbell JW, Kalk KH, Littlechild JA, Watson HC, Hol WGJ** (1993). Structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from Laue data. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**: 2355-2359.
- Vickerman K** (1976). The diversity of the kinetoplastida flagellates. In: *Biology of the Kinetoplastida*, (Lumsden W.H.R. & Evans D.A. Eds.). Academic Press, New York & London, Vol.1, pp. 1-34.
- Wabo H K, Tane P and Connolly JD** (2006). Diterpenoids from *Aframomum Arundinaceum*. *Bio. Syst. Ecology*, **34**: 603-605.
- Werbovetz KA, Bhattacharjee AK, Brendle JJ, Scovill JP** (2000). Analysis of stereoelectronic properties of camphotecin analogues in relation to biological activity. *Bioorg. Med. Chem.*, **8**: 1741-1747.
- Wery M** (2000). Trypanosomiases africaines, maladie du sommeil. *Encycl. Med. Chir. Maladies infectieuses*, 8504 p, p. 20.
- WHO** (1998). La trypanosomiase africaine: lutte et surveillance. Rapport de l'OMS. Série de rapports techniques, N° 881. Geneva.
- WHO** (1996). Les Leishmanioses et les coinfections Leishmania/VIH. Aide mémoire N° 116 de l'OMS, Mai 1996
- WHO** (2000). WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases. WHO/CDS/CSR/ISR/2000.
- WHO** (2004). La trypanosomiase africaine ou la maladie du sommeil - aide-mémoire. *REH*,

- 79**: 297-300.
- WHO** (2005). Lutte contre la Trypanosomiase Humaine Africaine: Une Stratégie pour la Région Africaine. Rapport de la cinquante-cinquième session Maputo, Mozambique 22-26 août 2005.
- WHO** (2006). <http://www.who.int/ctd/chagas/disease>, consulté le 5 Mars 2014.
- WHO** (2003). Tropical diseases, including Pan African tsetse and trypanosomiasis eradication campaign. Report by the Secretariat. Fifty-sixth World Health Assembly A56/9. Provisional agenda item 14.1. 14 April 2003.
- Willson M, Lauth N, Périé J** (1994). Inhibition of the glyceraldehyde 3-phosphate deshydro-Genase (GAPDH) by phosphorylated epoxides and α -enones. *Biochemistry*, **33**: 214-220.
- Yuqiong D, Haiming S, Mengyue W et Xiaobo L** (2010). A validated LC method for simultaneous determination of three major components in *Entada phaseoloides*. *Chromatographia*, **71**: 125-129.
- Zhai L, Blom J, Brogger CS, Kharazami A** (1995). The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**: 2742-2748.

ANNEXES