

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES  
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE  
LABORATORY OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

**Etude Pharmaco-toxicologique pour la Valorisation  
des Feuilles de *Codiaeum variegatum* (Euphorbiaceae)  
dans le Traitement de l'Amibiase intestinale**

Thèse présentée et soutenue le 17/04/2015 en vue de l'obtention du diplôme de  
**Doctorat/Ph.D en Biochimie**

*Spécialité : Pharmacologie Moléculaire & Toxicologie*

Par

**MFOTIE NJOYA Emmanuel**

*D.E.A en Biochimie*

Matricule : 04U552

**Composition du Jury de Soutenance :**

- Président:** BILONG BILONG Charles Félix, Professeur, Université de Yaoundé I,  
**Rapporteur:** MOUNDIPA FEWOU Paul, Professeur, Université de Yaoundé I,  
**Membres:** MBACHAM Wilfred FON, Professeur, Université de Yaoundé I,  
NKENGFACK Augustin Ephraïm, Professeur, Université de Yaoundé I,  
WATCHO Pierre, Maître de conférences, Université de Dschang,  
PENLAP BENG Véronique, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I.

Année 2015

## Table des matières

Liste des Enseignants permanents .....	i
Table des matières .....	xi
Dédicace .....	xvii
Remerciements .....	xviii
Financements.....	xxi
Liste des abréviations .....	xxii
Liste des figures .....	xxiv
Liste des tableaux .....	xxvii
Liste des annexes.....	xxviii
Resumé .....	xxix
Abstract .....	xxxii
<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Hypothèses et objectifs</b> .....	2
<b>Chapitre I: Revue de la littérature</b> .....	4
I.1. Généralités sur l'amibiase.....	4
I.1.1. L'agent pathogène et son cycle de développement.....	4
I.1.1.1. Historique et description de l'agent pathogène.....	4
I.1.1.2. Ultrastructure du trophozoïte d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	6
I.1.1.3. Cycle de vie de l'agent pathogène .....	7
I.1.2. Epidémiologie de l'amibiase.....	9
I.1.3. Physiopathologie de l'amibiase .....	10
I.1.4. Principaux facteurs de virulence d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	11
I.1.4.1. Les facteurs liés à <i>Entamoeba histolytica</i> .....	11
I.1.4.1.1. La lectine Gal/GalNAc .....	12
I.1.4.1.2. Les amoebapores.....	12
I.1.4.1.3. Les cystéine-protéinases .....	13
I.1.4.1.4. La protéine KERP1 .....	13
I.1.4.2. Les facteurs liés à l'hôte .....	14
I.1.4.2.1. La réponse immunitaire .....	14
I.1.4.2.2. La flore bactérienne et le microenvironnement intestinal.....	15
I.1.5. Mécanisme d'invasion d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	15

---

I.1.6. Biochimie du parasite .....	17
I.1.7. Diagnostic de l'amibiase.....	21
I.1.8. Traitement de l'amibiase.....	21
I.1.8.1. Traitement moderne .....	21
I.1.8.1.1. Métabolisme et mécanisme d'action du métronidazole.....	22
I.1.8.1.2. Mécanisme de résistance du parasite au métronidazole .....	24
I.1.8.2. Traitement de l'amibiase par les plantes médicinales.....	25
I.1.8.3. Traitement de l'amibiase à base d'un médicament traditionnel amélioré .....	29
I.1.8.4. Description de la plante <i>Codiaeum variegatum</i> .....	30
I.1.9. Recherche d'un vaccin anti-amoebien et prophylaxie .....	30
I.2. Développement d'un médicament à base de plantes .....	32
I.2.1. Etapes du développement d'un phytomédicament.....	33
I.2.2. Evaluation de l'activité antiamoebique des extraits de plante .....	35
I.2.2.1. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antiamoebique des extraits de plante sur une culture d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	35
I.2.2.2. Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité antiamoebique des extraits de plante sur des modèles expérimentaux de l'amibiase.....	37
I.2.3. Evaluation toxicologique des extraits de plantes .....	38
I.2.3.1. Evaluation <i>in vitro</i> de la toxicité des extraits de plantes.....	39
I.2.3.2. Evaluation <i>in vivo</i> de la toxicité des extraits de plantes.....	42
<b>Chapitre II: Matériel &amp; Méthodes .....</b>	<b>48</b>
II.1. Matériel.....	48
II.1.1. Matériel végétal .....	48
II.1.2. Culture cellulaire .....	48
II.1.2.1. Culture axénique d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	48
II.1.2.2. Culture des cellules de lymphome de souris ( <i>L5178Y</i> ) .....	49
II.1.2.3. Culture des cellules primaires hépatiques et du carcinome humain ( <i>HepG2</i> ).....	49
II.1.2.4. Culture des cellules cancéreuses du colon humain <i>Caco-2</i> (TC7) .....	50
II.1.3. Animaux d'expérience.....	50
II.1.4. Réactifs .....	50
II.1.5. Equipements .....	50
II.2. Méthodes .....	51

---

---

II.2.1. Bio-essai des extraits aqueux et détermination de l'efficacité des fractions bio-guidées sur une culture axénique d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	51
II.2.1.1. Bio-essai des extraits aqueux des feuilles de <i>Codiaeum variegatum</i> .....	51
II.2.1.1.1. Préparation des extraits aqueux .....	51
II.2.1.1.2. Essai <i>in vitro</i> de la mortalité des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	52
II.2.1.1.3. Test de viabilité cellulaire au bleu trypan.....	53
II.2.1.2. Fractionnement bio-guidé de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Codiaeum variegatum</i> sur les trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	54
II.2.1.2.1. Chromatographie flash de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Codiaeum variegatum</i> .	54
II.2.1.2.2. Chromatographie sur colonne de la fraction acétate d'éthyle (F1).....	55
II.2.1.2.3. Isolement des composés ou mélanges de composés de la sous-fraction SF9.....	56
II.2.1.2.4. Analyse du profil chimique des composés ou mélanges de composés isolés de la sous-fraction SF9 .....	56
II.2.1.3. Analyses statistiques des résultats .....	59
II.2.2. Détermination du mécanisme d'action de la sous-fraction active SF9B sur les trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	60
II.2.2.1. Caractérisation morphologique des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> traités.....	60
II.2.2.1.1. Observation microscopique des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> en fonction temps de traitement .....	60
II.2.2.1.2. Immunofluorescence indirecte des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> traités à la sous-fraction active SF9B .....	60
II.2.2.2. Evaluation de l'expression des gènes chez les trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> traités à la sous-fraction active SF9B.....	62
II.2.2.2.1. Analyse transcriptomique par la technique RNA-Seq.....	62
II.2.2.2.2. Traitement et extraction des ARN totaux des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	64
II.2.2.2.3. Analyse de l'intégrité et quantification des ARN totaux.....	65
II.2.2.2.4. Génération des données par séquençage du transcriptome.....	66
II.2.3. Evaluation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de la toxicité de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Codiaeum variegatum</i> et de la sous-fraction active SF9B .....	69
II.2.3.1. Evaluation de la cytotoxicité et des dommages sur l'ADN causés par l'extrait aqueux des feuilles de <i>Codiaeum variegatum</i> et la sous-fraction active SF9B.....	69
II.2.3.1.1. Test <i>in vitro</i> de la cytotoxicité .....	69
II.2.3.1.2. Test <i>in vitro</i> des comètes .....	71

---

II.2.3.1.3. Test <i>in vitro</i> des micronoyaux .....	74
II.2.3.1.4. Test <i>in vitro</i> de l'effet mutagène sur des cellules de mammifères .....	76
II.2.3.2. Evaluation <i>in vivo</i> de toxicité subchronique de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Codiaeum variegatum</i> .....	80
II.2.3.2.1. Traitement des animaux.....	80
II.2.3.2.2. Dosage des marqueurs biochimiques .....	81
II.2.3.3. Analyses statistiques des résultats .....	86
<b>Chapitre III: Résultats &amp; Discussions</b> .....	<b>83</b>
III.1. Efficacité des extraits aqueux et des fractions bio-guidées sur les trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	87
III.1.1. Effet des paramètres de récolte des feuilles de <i>Codiaeum variegatum</i> sur la mortalité des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	87
III.1.2. Efficacité des fractions bio-guidées sur les trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	90
III.1.2.1. Effet des fractions isolées sur la mortalité des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	91
III.1.2.2. Effet des sous-fractions isolées sur la mortalité des trophozoïtes d' <i>Entamoeba</i> <i>histolytica</i> .....	94
III.1.2.3. Effet des composés isolés ou mélanges de composés sur la mortalité des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	96
III.1.2.4. Composition phytochimique de la sous-fraction active SF9B .....	99
III.1.2.4.1. Profil CLHP de la sous-fraction active SF9B .....	99
III.1.2.4.2. Comparaison des spectres RMN des composés isolés .....	100
III.1.3. Discussion partielle .....	101
III.1.3.1. Influence des paramètres de récolte des feuilles sur l'efficacité des extraits aqueux chez les trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	101
III.1.3.2. Variation de l'efficacité des fractions isolées lors du fractionnement bio-guidé de l'extrait aqueux.....	103
III.1.4. Conclusion partielle.....	105
III.2. Mécanisme d'action de la sous-fraction active SF9B sur les trophozoïtes d' <i>Entamoeba</i> <i>histolytica</i> .....	106
III.2.1. Variations morphologiques des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> traités à la sous- fraction active SF9B et au composé SF9B2.....	106

---

III.2.2. Localisation de la Gal/GalNAc lectine chez les trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> après traitement à la sous-fraction SF9B .....	108
III.2.3. Expression différentielle des gènes chez les trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> traités à la sous-fraction SF9B .....	109
III.2.3.1. Pureté et intégrité des ARN totaux extraits .....	109
III.2.3.2. Profil d'expression des gènes chez les trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> traités à la sous-fraction active SF9B .....	111
III.2.4. Discussion partielle .....	115
III.2.5. Conclusion partielle.....	120
III.3. Toxicité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Codiaeum variegatum</i> et de la sous-fraction active SF9B .....	121
III.3.1. Toxicité <i>in vitro</i> de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active SF9B.....	121
III.3.1.1. Effet cytotoxique de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active SF9B.....	121
III.3.1.1.1. Cytotoxicité de l'extrait aqueux .....	121
III.3.1.1.2. Cytotoxicité de la sous-fraction active SF9B.....	123
III.3.1.2. Effet de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active SF9B sur l'ADN des cellules .....	125
III.3.1.2.1. Dommage sur l'ADN chez les cellules <i>L5178Y</i> .....	126
III.3.1.2.2. Dommage sur l'ADN chez les cellules <i>HepG2</i> .....	127
III.3.1.2.3. Dommage sur l'ADN chez les cellules primaires du foie de rat.....	128
III.3.1.3. Effet de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active sur la formation des micronoyaux .....	130
III.3.1.3.1. Formation des micronoyaux chez les cellules <i>L5178Y</i> .....	130
III.3.1.3.2. Formation des micronoyaux chez les cellules <i>HepG2</i> .....	132
III.3.1.4. Effet mutagène de l'extrait aqueux et de la sous-fraction SF9B.....	133
III.3.1.4.1. Effet mutagène après un traitement à court terme des cellules <i>L5178Y</i> .....	134
III.3.1.4.2. Effet mutagène après un traitement à long terme des cellules <i>L5178Y</i> .....	137
III.3.2. Toxicité subchronique <i>in vivo</i> de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Codiaeum variegatum</i> .....	140
III.3.2.1. Effet de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Codiaeum variegatum</i> sur la croissance pondérale des animaux.....	140
III.3.2.2. Effet de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Codiaeum variegatum</i> sur le poids relatif de quelques organes .....	142

III.3.2.3. Effet de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Codiaeum variegatum</i> sur les paramètres biochimiques .....	143
III.3.3. Discussion partielle .....	144
III.3.3.1. Effet toxique <i>in vitro</i> de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active SF9B .....	144
III.3.3.2. Effet toxique <i>in vivo</i> de l'extrait aqueux de <i>Codiaeum variegatum</i> .....	147
III.3.4. Conclusion partielle.....	148
III.4. Discussion générale.....	149
<b>Conclusion générale</b> .....	153
<b>Perspectives</b> .....	154
<b>Bibliographie</b> .....	155
<b>Annexes</b> .....	I

*Dédicace*

*Au Dieu tout puissant.*

*A mes parents NJOYA Isaiï et NAMEN Julienne.*



## Remerciements

La présente thèse a été réalisée au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de l'Université de Yaoundé I (Cameroun), à l'Unité de Biologie Cellulaire du Parasitisme de l'Institut Pasteur de Paris (France) et à l'Institut de Pharmacologie et Toxicologie de l'Université Julius-Maximilians de Würzburg (Allemagne). De ce fait, elle a connu la participation de plusieurs personnes à qui je me dois d'adresser des sincères remerciements :

- Au Professeur MOUNDIPA FEWOU Paul, Chef de Département de Biochimie et Chef du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie qui m'a accepté dans son laboratoire depuis 2006 en tant qu'étudiant au Diplôme d'Etudes Approfondies et qui m'a initié dans la recherche. Votre rigueur scientifique et votre esprit critique ainsi que vos conseils précieux ont contribué à la perfection et l'accomplissement de ce travail; recevez ici toute ma gratitude et mon humilité.
- Au Dr Nancy GUILLEN qui m'a donné l'opportunité de mener à bout ce travail en m'accueillant dans son unité de recherche pour des stages de recherche en 2011 et 2012. Je ne la remercierai jamais assez pour cette collaboration fructueuse et pour avoir partagé son expérience et sa rigueur scientifique lors de mon encadrement.
- Au Prof. Dr. Helga STOPPER qui m'a accepté dans son laboratoire en 2013 pour compléter une partie de ce travail. Merci pour votre disponibilité et votre expertise qui m'ont permis d'approfondir mes connaissances en toxicologie.
- A tous les enseignants du Département de Biochimie de l'Université de Dschang et de l'Université de Yaoundé I, pour la formation et le suivi qu'ils m'ont faits bénéficier au cours de mon cursus académique.
- Aux différents membres du Jury pour avoir accepté d'examiner ce travail, recevez toute mon humilité pour le temps consacré à cet exercice.

- Aux Drs Yves JANIN, Soizic PRADO, Nora HERNANDEZ, Chung-Chau HON, Mrs Christian WEBER, Mikael KOUTERO, Mme Sylvie SYAN et tous les membres de l'Unité de recherche INSERM U786 pour leur collaboration lors des stages à l'Institut Pasteur de Paris.
- A toute l'équipe de recherche du Département de Toxicologie de l'Université Julius-Maximilians de Würzburg pour leurs suggestions lors des séminaires et la convivialité pendant cette année passée ensemble.
- Au Dr MKOUNGA Pierre du Laboratoire de Chimie Organique, Structurale et Analytique de l'Université de Yaoundé I, pour son assistance technique et ses suggestions lors du fractionnement chimique.
- Aux Drs TCHANA Angèle et NJAYOU Frédéric Nico, pour tous vos critiques et vos encouragements lors des séminaires du laboratoire.
- A tous mes aînés de laboratoire, Drs Mélanie F. G. KAMINI, DJUIDJE Marceline, CHUISSEU Pascal, DONFACK Hubert, NANTIA AKONO Edouard, MANFO TSAGUE Faustin, Wilfried ANGIE ABIA, Mme BEBOY Nathalie pour les conseils qu'ils m'ont toujours prodigués depuis la paillasse de manipulation jusqu'à la rédaction de ce travail.
- A tous mes camarades du laboratoire, OWONA AYISSI Vincent Brice, PECHANGOU NSANGOU Sylvain, GALANI TIETCHEU Borris Rosnay et à tous les cadets du laboratoire pour leur collaboration lors des diverses manipulations.
- A toutes mes mamans NDAMBA Erna, NCHINTOUO Jeanne, NYM Lydie, en témoignage de mon grand attachement envers chacune d'entre vous.
- A tous mes frères et sœurs, KPUMIE NJOYA Théodore, RIEGOUON NJOYA Florence, MFOUAPON NJOYA Marcel, NZIE NJOYA Clarisse, NJOUOM NJOYA Josué, KOUJUNDI NJOYA Donatien, MAGNEROU NJOYA Sylvie, MFOUT NJOYA

Esther, NZIE NJOYA Véronique, TALINEPOUO NJOYA François, pour leur assistance morale et/ou financière.

➤ A ma fiancée NGOUTANE KOUOTOU Elise et ma fille FANGAM MFOTIE Kendra, que ce travail soit l'expression de toute ma profonde gratitude et ma fierté de vous avoir à mes côtés et vivement que vous puissiez aussi vite suivre ce chemin.

➤ A toute la grande famille NGAPNA et plus particulièrement à YOUPOUO Jean Blaise, SECHOUT Abdel Nasser et NDAYOU Dorothée Caroline, pour leur courtoisie et leurs soutiens multiformes.

➤ A mes amis, NJOUENDOOU Abdel Jelil, MBA MAGOUA Simon Narcisse, NDAM YAKA Simon, NJIFON Ousseini, NTIECHE Benjamin, TANTO Agustin qui m'ont donné le courage de poursuivre cette recherche.

➤ A tous ceux dont les noms ne sont pas cités plus haut et qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail, je vous prie de trouver ici toute ma reconnaissance pour vos œuvres diverses.

## Financements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous les organismes qui ont contribué à la réalisation matérielle de ce travail. Je pense aux organismes tels que :

- Le **Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie** de l'Université de Yaoundé I, de m'avoir accordé de l'espace pour la mise en œuvre de ce travail.
- Aux **Laboratoires de Physiologie Animale et de Chimie Organique, Structurale et Analytique** de l'Université de Yaoundé I, pour la logistique mise à ma disposition.
- Le **Réseau International de l'Institut Pasteur** qui, à travers la programme Calmette et Yersin 2011 et 2012, m'a attribué une bourse de stage pour la réalisation d'une partie de cette thèse à l'Unité de Biologie Cellulaire du Parasitisme de l'Institut Pasteur de Paris.
- La *Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD)* qui, dans le cadre de son programme d'échange « *Deepening of knowledge* », a soutenu la finalisation de cette thèse en collaboration avec l'Institut de Pharmacologie et Toxicologie de l'Université Julius-Maximilians de Würzburg.
- La **Fondation International pour la Science** qui, à travers le financement IFS N° 4085/P-1 attribué au Dr. Melanie Flore Gondam Kamini, nous a permis d'acquérir les équipements et les solvants utilisés dans ce travail.
- L'**Agence Nationale de la Recherche** pour les financements ANR-MIE08 et ANR 2010 GENOM-BTV: GENAMIBE octroyés au Dr. Nancy Guillén, qui ont permis d'acquérir les réactifs et les équipements utilisés dans ce travail.



## Liste des abréviations

AcOEt: Acétate d'éthyle

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

ADP: Adénosine Diphosphate

ALAT : Alanine Aminotransférase

AMP: Adénosine Monophosphate

*ANOVA : Analysis of variance*

ASAT : Aspartate Aminotransférase

ATP : Adénosine Triphosphate

CBPI : *Cytochalasin B Proliferation Index*/ Indice de Prolifération à la Cytochalasine B

CCM: Chromatographie sur couche mince

CDER: *Center for Drug Evaluation and Research*

CE<sub>50</sub>: Concentration Efficace 50

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : Chlorure de méthylène

CLHP: Chromatographie Liquide Haute Performance

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de Carbone

CoA: Coenzyme A

CP: Cystéine Protéinase

DABCO: 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane

DAPI: Diamino-2-phenylindole

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DO: Densité optique

EDTA: *Ethylene diamine tetraacetic acid*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EtOH: Ethanol

FITC: *Fluorescein Isothiocyanate*

Gal: Galactose

GalNAc: N-Acétylgalactosamine

H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>: Eau double distillée

HM-1: IMSS: *Humano Mexicano I: Instituto Mexicano del Seguro Social*

CI<sub>50</sub>: Concentration inhibitrice 50

Ig: Immunoglobuline  
kb: kilobase  
kDa: kilodalton  
KERP: *Lysin and Glutamic acid rich protein*  
LPPG: lipophosphopeptidoglycane  
MeOH: Méthanol  
CMI: Concentration minimale inhibitrice  
MFO: *Mixed Function Oxidase*  
MMS: Methyl methanesulfonate  
MUC: Mucine  
NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate  
NIH: *National Institute of Health*  
NK: *Natural Killer*  
OCDE: Organisation de Coopération et Développement Economique.  
PCR: *Polymerase Chain Reaction*  
PPi: Pyrophosphate  
RNase: Ribonucléase  
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*  
SAB/BSA: *Sérum Albumine Bovin/ Bovin serum albumin*  
SCID: *Severe Combined Immunodeficiency*  
SOD: Superoxyde Dismutase  
TFT: Trifluorothymidine  
THG: Thymidine-Hypoxanthine-Glycine  
THMG: Thymidine-Hypoxanthine-Methothrexate-Glycine  
TRITC: *Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate*  
UDPGA: Acide uridine diphospho-glucuronique  
UNESCO: *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*  
UV: Ultra Violet

---

**Liste des figures**

Figure 1 : Les différentes formes d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	5
Figure 2 : Ultrastructure du trophozoïte d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	7
Figure 3 : Cycle de vie d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	8
Figure 4 : Répartition géographique de l'amibiase .....	10
Figure 5 : Mécanisme de pathogénèse d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	16
Figure 6 : Glycolyse chez <i>Entamoeba histolytica</i> .....	20
Figure 7 : Métabolisme hépatique du métronidazole .....	23
Figure 8 : Activation du métronidazole chez <i>Entamoeba histolytica</i> .....	24
Figure 9 : Etapes du développement d'un phytomédicament par une approche ethnopharmacologique .....	35
Figure 10 : <i>Codiaeum variegatum</i> (plante entière à gauche, feuilles à droite).....	48
Figure 11 : Protocole de préparation de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Codiaeum variegatum</i> .....	51
Figure 12 : Chromatographie flash de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Codiaeum variegatum</i> .....	54
Figure 13 : Chromatographie sur colonne de gel de silice de la fraction acétate d'éthyle (F1).....	55
Figure 14 : Séparation des composés ou mélanges de composés de la sous-fraction SF9 .....	56
Figure 15 : Principe de l'immunofluorescence indirecte de la Gal/GalNAc lectine d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	61
Figure 16 : Principe de l'analyse du transcriptome par RNA-Seq .....	63
Figure 17 : Principe du test de la viabilité cellulaire par la méthode de la fluorescéine diacétate/gel red.....	71
Figure 18 : Formation des micronoyaux (a) et ponts nucléoplasmiques (b) chez les cellules traitées à la cytochalasine B pendant la division nucléaire .....	74
Figure 19 : Protocole expérimental d'évaluation <i>in vitro</i> de l'effet mutagène chez les cellules de lymphome <i>L5178Y</i> de souris. ....	79
Figure 20 : Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> en présence des extraits aqueux après 48 heures d'incubation.....	87
Figure 21 : Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> en présence des extraits aqueux après 72 heures d'incubation.....	88
Figure 22 : Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> en présence des fractions après 48 heures d'incubation .....	91

Figure 23 : Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> en présence des fractions après 72 heures d'incubation .....	92
Figure 24 : Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> en présence des sous-fractions après 48 heures d'incubation.....	94
Figure 25 : Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> en présence des sous-fractions actives après 72 heures d'incubation .....	95
Figure 26 : Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> en présence des produits isolés après 24 heures d'incubation.....	97
Figure 27 : Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> en présence des produits isolés après 48 heures d'incubation.....	97
Figure 28: Chromatogramme en phase inverse de la sous-fraction active SF9B.....	100
Figure 29 : Superposition des spectres RMN <sup>1</sup> H des composés isolés de la sous-fraction SF9 .....	101
Figure 30 : Variations morphologiques des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> induites par SF9B2 et SF9B sous microscope ordinaire.....	106
Figure 31 : Mortalité des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> traités aux CE <sub>50</sub> de SF9B2, SF9B et métronidazole en fonction du temps de traitement. ....	107
Figure 32 : Immunomarquage de la Gal/GalNAc lectine chez les trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> traités au DMSO et à la sous-fraction SF9B après 12 heures.....	108
Figure 33 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% des échantillons des ARNs totaux.....	110
Figure 34 : Expression différentielle des gènes chez les trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> en fonction du temps de traitement. ....	113
Figure 35 : Mécanisme d'action hypothétique de la sous-fraction active SF9B lors de la mort des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	118
Figure 36 : Viabilité à la fluorescéine diacétate/gel red des cellules L5178Y après traitement à l'extrait aqueux pendant 4 et 24 heures.....	121
Figure 37 : Viabilité à la fluorescéine diacétate/gel red des cellules HepG2 après traitement à l'extrait aqueux pendant 4 et 24 heures.....	122
Figure 38 : Viabilité au bleu trypan des cellules Caco-2 après traitement à l'extrait aqueux pendant 48 heures.....	122
Figure 39 : Viabilité à la fluorescéine diacétate/gel red des cellules L5178Y après 4 et 24 heures de traitement avec la sous-fraction active SF9B. ....	123
Figure 40 : Viabilité à la fluorescéine diacétate/gel red des cellules HepG2 après 4 et 24 heures de traitement avec la sous-fraction active SF9B. ....	124



Figure 41 : Viabilité au bleu trypan des cellules <i>Caco-2</i> après 48 heures de traitement avec la sous-fraction active SF9B. ....	124
Figure 42 : Quantification des cassures sur l'ADN lors du test des comètes.....	125
Figure 43 : Dommages sur l'ADN des cellules <i>L5178Y</i> en fonction des concentrations de l'extrait aqueux pendant 4 et 24 heures. ....	126
Figure 44 : Dommages sur l'ADN des cellules <i>L5178Y</i> en fonction des concentrations de la sous-fraction active SF9B pendant 4 et 24 heures. ....	126
Figure 45 : Dommages sur l'ADN des cellules <i>HepG2</i> en fonction des concentrations de l'extrait aqueux pendant 4 et 24 heures. ....	127
Figure 46 : Dommages sur l'ADN des cellules <i>HepG2</i> en fonction des concentrations de la sous-fraction active SF9B pendant 4 et 24 heures. ....	128
Figure 47 : Dommages sur l'ADN des cellules primaires de foie de rat en fonction des concentrations de la sous-fraction active SF9B pendant 2 heures. ....	129
Figure 48 : Dommages sur l'ADN des cellules primaires de foie de rat en fonction des concentrations de l'extrait aqueux pendant 2 heures.....	129
Figure 49 : Formation des micronoyaux et prolifération des cellules <i>L5178Y</i> après 4 et 24 heures de traitement avec l'extrait aqueux.....	130
Figure 50 : Formation des micronoyaux et prolifération des cellules <i>L5178Y</i> après 4 et 24 heures de traitement à la sous-fraction active SF9B.....	131
Figure 51 : Formation des micronoyaux des cellules <i>HepG2</i> après 4 et 24 heures de traitement avec l'extrait aqueux.....	132
Figure 52 : Formation des micronoyaux des cellules <i>HepG2</i> après 4 et 24 heures de traitement à la sous-fraction active SF9B.....	132
Figure 53 : Colonies des cellules <i>L5178Y</i> formées dans les boîtes de Pétri lors de l'évaluation de la mutagénicité.....	133
Figure 54 : Fréquence de mutations (FM) et viabilité des cellules <i>L5178Y</i> en fonction de la concentration de l'extrait aqueux (A) et de la sous-fraction active SF9B (B) après un traitement à court terme (4 heures).....	136
Figure 55 : Fréquence de mutation (FM) et viabilité des cellules <i>L5178Y</i> en fonction de la concentration de l'extrait aqueux (A) et du produit actif SF9B (B) pendant un traitement à long terme (24 heures).....	139
Figure 56 : Evolution du poids corporel chez les rats mâles au cours de l'étude. ....	141
Figure 57 : Evolution du poids corporel chez les rats femelles au cours de l'étude. ....	141

## Liste des tableaux

Tableau I : Plantes médicinales et composés actifs sur les trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	26
Tableau II : Concentrations efficaces (CE <sub>50</sub> ) des extraits aqueux et rapport d'efficacité entre 48 heures et 72 heures d'incubation.....	89
Tableau III : CE <sub>50</sub> des fractions actives en fonction du temps d'incubation.....	93
Tableau IV: CE <sub>50</sub> des sous-fractions actives en fonction du temps d'incubation .....	96
Tableau V : CE <sub>50</sub> des composés isolés ou mélanges de composés en fonction du temps d'incubation .....	98
Tableau VI : Classes de composés identifiés dans la sous-fraction active SF9B.....	99
Tableau VII : Quantités des ARNs totaux (µg) et rapports d'absorption de chaque échantillon .....	109
Tableau VIII : Fonctions métaboliques affectées chez les trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> après traitement à la sous-fraction active SF9B.....	112
Tableau IX : Nombre de colonies et efficacité du clonage des cellules <i>L5178Y</i> après 4 heures de traitement à l'extrait aqueux.....	134
Tableau X : Nombre de colonies et efficacité de clonage des cellules <i>L5178Y</i> après 4 heures de traitement à la sous-fraction active SF9B. ....	135
Tableau XI : Nombre de colonies et efficacité de clonage des cellules <i>L5178Y</i> après 24 heures de traitement à l'extrait aqueux.....	138
Tableau XII : Nombre de colonies et efficacité de clonage des cellules <i>L5178Y</i> après 24 heures de traitement à la sous-fraction active SF9B .....	138
Tableau XIII : Poids relatifs de quelques organes vitaux (g/Kg de poids corporel) des rats en fonction du sexe et de la dose de l'extrait aqueux .....	142
Tableau XIV : Poids relatifs des organes génitaux (g/Kg de poids corporel) des rats en fonction du sexe et de la dose de l'extrait aqueux.....	143
Tableau XV: Paramètres biochimiques de toxicité rénale et hépatique en fonction de la dose de l'extrait aqueux .....	144

---

**Liste des annexes**

Annexe 1 : Préparation du milieu et culture axénique d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	I
Annexe 2 : Protocole de préparation des échantillons .....	II
Annexe 3 : Matériel utilisé pour le fractionnement.....	II
Annexe 4 : Evaluation de l'activité antiamebique.....	II
Annexe 5 : Immunofluorescence indirecte de la Gal/GalNAc lectine.....	III
Annexe 6 : Analyse transcriptomique des trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> .....	III
Annexe 7 (a) : Expression différentielle des gènes chez les trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> après 12 heures de traitement à SF9B .....	V
Annexe 7 (b) : Expression différentielle des gènes chez les trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> après 24 heures de traitement à SF9B .....	VI
Annexe 8 : Gènes modulés chez <i>Enntamoeba histolytica</i> après traitement au métronidazole en comparaison à la sous-fraction SF9B.....	VIII
Annexe 9 : Evaluation génotoxique des échantillons.....	XII
Annexe 10 : Test <i>in vitro</i> de la mutagenicité .....	XIV
Annexe 11 : Composition de l'aliment des rats .....	XVI
Annexe 12 : Dosage des protéines sériques .....	XVI
Annexe 13 : Dosage des protéines hépatiques .....	XVII
Annexe 14 : Dosage ASAT et ALAT .....	XVII
Annexe 15 : Dosage de la créatinine .....	XXI

## Resumé

L'amibiase est une infection causée par un parasite protozoaire, *Entamoeba histolytica* avec ou sans manifestations cliniques. L'homme est l'un des hôtes de ce parasite qui agit principalement au niveau intestinal et sur le foie. Le métronidazole est le médicament de référence utilisé pendant longtemps dans le traitement de cette infection. Mais, il a été rapporté une résistance médicamenteuse ou des effets secondaires dus à l'utilisation à long terme de ce médicament. Cette étude présente une alternative pour pallier aux résistances et effets secondaires liés à cette infection à travers la valorisation des feuilles de *Codiaeum variegatum*, une plante médicinale utilisée au Cameroun contre la dysentérie amibienne. Un bio-essai des différents extraits aqueux des feuilles de *C. variegatum* a été mené sur une culture axénique d'*E. histolytica* permettant d'identifier une variation de l'activité anti-amoebique en fonction des paramètres de récolte. Ainsi, les conditions optimales de récolte des feuilles pour maximiser l'efficacité des extraits ont été définies. Les extraits obtenus des vieilles feuilles et des feuilles récoltées à minuit ont été les plus efficaces. Le fractionnement bio-guidé de l'extrait aqueux a permis l'isolement des sous-fractions ou composés ayant une efficacité significativement élevée par rapport à l'extrait de départ. Le traitement des trophozoïtes d'*E. histolytica* à la sous-fraction la plus active (SF9B) a causé des changements morphologiques importants conduisant à la mort du parasite à travers une déstabilisation de la Gal/GalNAc lectine, une protéine abondante de la surface du parasite. L'analyse de l'expression différentielle des gènes par la technique RNA-seq a permis de suggérer que les composés de la sous-fraction active SF9B agissent sur plusieurs cibles moléculaires du parasite et la mort surviendrait à travers la régulation de la voie de biosynthèse de la ceramide, un lipide bioactif impliqué dans la perturbation des processus biochimiques au niveau de la membrane cellulaire dont l'inhibition de la croissance cellulaire et l'apoptose. Au regard de l'importance médicale de *C. variegatum*, nous avons initié l'étude toxicologique *in vitro* de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active

---

SF9B par l'évaluation de la cytotoxicité, la génotoxicité et la mutagénicité sur des cellules de mammifères. Les résultats ont montré une cytotoxicité sur les cellules de lymphome de souris *L5178Y*, les cellules cancéreuses du colon humain *Caco-2* et des cellules hépatiques du carcinome humain *HepG2* lorsque testés aux concentrations supérieures à 500 µg/mL de la sous-fraction active SF9B tandis que l'extrait aqueux est non cytotoxique jusqu'à 2000 µg/mL. Par ailleurs, aucun dommage n'a été observé sur l'ADN des cellules primaires hépatiques, des cellules *L5178Y* et *HepG2* par le test des comètes. Tout de même, aucune induction des aberrations chromosomiques n'a été notée aux différentes concentrations testées par le test des micronoyaux. En outre, une réduction notable de la prolifération des cellules a été identifiée lorsqu'elles sont traitées aux concentrations élevées (1000 µg/mL pour la sous-fraction SF9B et 2000 µg/mL pour l'extrait aqueux). L'évaluation de la mutagénicité sur les cellules *L5178Y* n'a conduit à aucun effet mutagène après 4 et 24 heures de traitement. En conséquence, ces résultats ont montré que l'extrait aqueux de *C. variegatum* et la sous-fraction SF9B jusqu'aux concentrations de 2000 µg/mL et 500 µg/mL respectivement, ne sont ni génotoxiques, ni mutagènes et pourraient être utilisés sans danger à faible dose pour leur vertu thérapeutique. L'administration par voie orale de l'extrait aqueux pour l'évaluation de la toxicité subaiguë chez les rats mâles et femelles pendant 4 semaines a montré qu'il est sans effet toxique sur le poids des animaux et des organes vitaux. De plus, l'extrait aqueux n'a pas causé de mortalité au cours de l'étude et il est sans effet nocif sur les paramètres biochimiques des fonctions rénale et hépatique des animaux traités. Ces différents résultats sur l'efficacité et l'innocuité de l'extrait aqueux de *C. variegatum* et de la sous-fraction amoebicide SF9B montrent que ces substances pourraient être utilisées dans le futur pour le développement des médicaments antiamoebiques.

**Mots clés:** *Codiaeum variegatum*, *Entamoeba histolytica*, céramide, mutagénicité, génotoxicité, toxicité subchronique.

---

**Abstract**

Amoebiasis is a disease caused by a protozoan parasite, *Entamoeba histolytica* with or without clinical symptoms. Human is one of the relevant hosts of this parasite which mainly targets the large intestine and the liver. The current drug, metronidazole, has been successfully used against this parasite for several years. However, some reports have shown either parasite resistance or adverse effects due to its long term usage. Our study thereby pointed alternative to solve parasite resistance and adverse effects related to this infection by investigating the rational use of *Cordia alliodora*, a medicinal plant used in Cameroon against amoebic dysentery. A bio-assay of different aqueous extracts from *C. alliodora* leaves was performed against trophozoites of *E. histolytica* axenic culture. It was found that the anti-amoebic activity of extracts changed with respect to the criteria for the collection of leaves. Thereby, optimal conditions were defined for leaves' collection to maximise the efficacy of extracts. Extracts obtained from old leaves and leaves collected at midnight were the most efficient on the parasite death. A bio-guided fractionation process was performed and we identified several sub-fractions (or isolated compounds) with significant higher anti-amoebic activity compared to the unfractionated aqueous extract. Anti-amoebic activity of the most potent sub-fraction (SF9B) was confirmed with the morphological characteristics of induced death in trophozoites through the destabilisation of Gal/GalNAc lectin, an abundant parasite cell surface protein. Differential gene expression analysis using high-throughput RNA sequencing implied a multi-target mode of action of compounds within the active sub-fraction (SF9B) and suggests the potential mechanism of its anti-amoebic activity by targeting ceramide, a bioactive lipid involved in perturbation of biochemical processes within the cell membrane including cell growth arrest and apoptosis. Due to the medical value of these extracts, we promptly initiated to investigate their genotoxicity by evaluating their cytotoxicity and quantifying DNA damage and chromosomal aberrations respectively through comet and micronucleus assays. Results showed

significant cytotoxicity of the active sub-fraction SF9B when tested at concentrations higher than 500 µg/mL on mouse lymphoma cells *L5178Y*, human colon carcinoma cells *Caco-2* and human hepatocellular carcinoma cells *HepG2* while the aqueous extract is not cytotoxic up to 2000 µg/mL. No DNA damage and induction of micronucleus formation were identified on *L5178Y* and *HepG2* cells lines even at high concentrations (up to 2000 µg/mL). Furthermore, we could observe a slight reduction on the proliferation of these cells when treated with high concentrations of the tested extracts (1000 µg/mL for the active sub-fraction SF9B and 2000 µg/mL for the aqueous extract). Moreover, mutagenic potential of these extracts evaluated by the mouse lymphoma mutation assay, revealed no mutation induction after short (4 hours) and long term (24 hours) treatment. Consequently, these results showed that the aqueous extract of *C. variegatum* and the amoebicidal sub-fraction SF9B up to concentrations of 500 µg/mL and 2000 µg/mL respectively, are neither genotoxic nor mutagenic and they could be safely used for medical purposes at lower doses. The oral administration of the aqueous extract for the subacute toxicity evaluation during 4 weeks to male and female rats, showed no toxic effect on the animal weight and vital organs. Furthermore, the aqueous extract did not cause mortality during the study's period and there was no adverse effects on biochemical parameters for renal and hepatic functions of the treated animals. These results on the efficacy and the safety of the aqueous extract of *C. variegatum* and the amoebicidal sub-fraction SF9B showed that these extracts could be safely used in the future for the development of anti-amoebic drugs.

**Keywords:** *Codiaeum variegatum*, *Entamoeba histolytica*, ceramide, mutagenicity, genotoxicity, subchronic toxicity.

**Introduction Générale**  
**Hypothèses & Objectifs**



## Introduction générale

L'amibiase est une infection causée par un parasite protozoaire *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903) avec ou sans manifestations cliniques (**WHO, 1997 ; Ximénez et al., 2011**). Elle affecte environ 10% de la population mondiale et représente la deuxième cause de mortalité par infection parasitaire après le paludisme (**Stanley, 2003**). Cette infection continue à sévir dans les régions tropicales et subtropicales où elle reste un réel problème de santé publique (**Anane and Khaled, 2005**). Le Cameroun n'est pas épargné du reste avec un taux d'infection peu connu au plan national. Toutefois, le taux de portage des kystes varie selon les régions et les saisons avec un taux de 17,9% dans la région forestière (**Bello, 1992**) et de 12,1% dans l'Adamaoua (**Ripert et al., 1995**). Le métronidazole est le médicament de référence utilisé depuis longtemps en pratique clinique dans le traitement de cette infection (**Barre et al., 1997, Lofmark et al., 2010**). Ce médicament a été rapporté comme potentiellement cancérigène chez l'homme en raison du fait qu'il est mutagène sur les bactéries, génotoxique sur des cellules humaines et cancérigène chez les animaux (**Bendesky et al., 2002**). De même, il a été rapporté des dommages sur l'ADN des lymphocytes après traitement par ce médicament (**Menendez et al., 2001**), de nombreux effets secondaires (**Kapoor et al., 1999 ; Espinosa et al., 2003**) et la résistance de certaines souches de ce parasite (**Wassmann et al., 1999 ; Bansal et al., 2006**). La découverte d'un vaccin anti-amoebien procurant une immunité acquise à long terme reste un défi majeur à relever.

Dans la perspective d'obtenir d'autres alternatives de traitement et en anticipant le développement de nouvelles résistances, il est donc important de chercher de nouveaux médicaments antiamoebiques qui soient efficaces contre le parasite et sans effet toxique. Ainsi, l'identification des composés actifs et la caractérisation de leur mécanisme d'action restent utiles en vue de la recherche de nouveaux candidats pour le développement de médicaments antiamoebiques. Les plantes médicinales ont été reconnues par l'Organisation Mondiale de la

Santé (OMS) comme une alternative dans le traitement de diverses maladies et selon cette organisation, près de 80% de la population dans les pays en voie de développement utilisent les plantes médicinales pour leurs soins primaires de santé (WHO, 2008). De ce fait, l'intérêt des professionnels de la santé pour les plantes médicinales augmente jour après jour. Grâce à la composition en divers métabolites, les plantes médicinales peuvent être utilisées pour prévenir ou guérir la maladie, ou promouvoir la santé et le bien-être (Calixto, 2000; Salim *et al*, 2008). Au cours des dernières décennies, la recherche des preuves scientifiques sur la valeur médicinale de produits végétaux a suscité des préoccupations du public au sujet de la conservation de tels produits, dans le but de promouvoir leur importance économique et thérapeutique (Sharma and Sharma, 2001). De plus, les industries pharmaceutiques modernes reposent principalement sur la diversité des métabolites des plantes médicinales pour la découverte de nouveaux composés avec de nouvelles propriétés biologiques. On estime que les produits naturels et leurs dérivés et analogues représentent plus de 50% de tous les médicaments utilisés en clinique (Gurib-Fakim, 2006). Par ailleurs, la recherche des médicaments dérivés des plantes nécessite le screening d'un grand nombre d'extraits de plantes, l'isolement et l'identification des composés actifs, l'étude de leur mécanisme d'action, ainsi que la preuve de leur innocuité chez l'homme. Au Cameroun, la biodiversité des plantes est une source importante de composés naturels bioactifs et l'exploration de cette biodiversité, basée sur une approche ethnopharmacologique, représente une stratégie prometteuse pour la découverte de nouveaux médicaments contre diverses maladies y compris les infections intestinales.

## Hypothèses et objectifs

Une investigation a été menée auprès des tradipraticiens afin d'identifier les plantes médicinales utilisées dans le traitement des maladies hépatiques et intestinales. A l'issue de cette investigation, 55 plantes médicinales ont été collectées et les extraits ont été préparés soit après macération, soit après décoction. Ces extraits ont été testés *in vitro* sur une culture

polyxénique d'*E. histolytica* et l'extrait aqueux des feuilles de *C. variegatum* a présenté une activité antiamebique proche de celle du métronidazole (Moundipa *et al.*, 2005). De plus, il a été démontré que les classes de composés telles que les alcaloïdes, les tannins (Euphorbins), les polyphénols (acide gallique et myricitrine), les flavonoïdes (quercitol et quercétine), les phytostérols et les triterpènes chez certaines plantes médicinales, ont une activité anti-diarrhéique et antiamebique (Sharma and Sharma, 2001; Sandeep *et al.*, 2009). Le mécanisme d'action de ces classes de composés sur le parasite *E. histolytica* est très peu connu. Par ailleurs, l'analyse phytochimique de l'extrait aqueux des feuilles de *C. variegatum* a indiqué la présence des flavonoïdes, des terpenoïdes, des tannins, des polyphénols, des coumarines et des sucres (Kamini, 2005). L'isolement et la caractérisation de ces différentes classes de composés contenus dans l'extrait aqueux pourraient-ils conduire à la découverte de nouveaux composés antiamebiques ? Quel serait le mécanisme d'action des composés actifs sur la mort du parasite ?

Ainsi, dans l'optique de rechercher de nouveaux composés antiamebiques et de comprendre le mécanisme d'action au niveau cellulaire et moléculaire, ce travail a visé à évaluer l'activité pharmacologique et le profil toxicologique de l'extrait aqueux des feuilles de *C. variegatum* afin de valoriser l'utilisation traditionnelle de cette plante dans le traitement de l'amibiase intestinale. Pour y parvenir, nous nous sommes fixés comme objectifs spécifiques:

- ❖ Evaluer l'activité antiamebique des extraits aqueux de *C. variegatum* et des fractions bio-guidées sur une culture axénique d'*Entamoeba histolytica*.
- ❖ Déterminer le mécanisme d'action de la sous-fraction active sur la mort du parasite.
- ❖ Evaluer *in vitro* et *in vivo* la toxicité de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active.

**Chapitre I:**  
**Revue de la littérature**

## I.1. Généralités sur l'amibiase

### I.1.1. L'agent pathogène et son cycle de développement

#### I.1.1.1. Historique et description de l'agent pathogène

*Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903) a été décrit pour la première fois par Feder Losch (1875) dans les échantillons de matières fécales. Ce parasite était considéré seulement comme responsable du maintien du processus inflammatoire et non pas comme une cause de la dysentérie. Par la suite, Fritz Schaudinn (1903) a établi la distinction entre *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba coli* et a décidé ainsi d'appeler *Entamoeba histolytica* l'espèce ayant la capacité de provoquer la lyse des tissus (Pinilla *et al.*, 2008). En 1925, Emile Brumpt a constaté que seulement 10% des porteurs d'amibes développaient une pathologie amibienne. Ainsi, il a émis l'hypothèse de l'existence d'une amibe pathogène (*E. histolytica*) et d'une autre non pathogène (*E. dispar*). Ces deux formes d'amibes sont morphologiquement identiques et indiscernables en microscopie optique. Ce n'est que depuis 1993 que l'existence de ces deux espèces a été reconnue (Sargeant, 1992 ; Ravdin, 1995 ; Gonzalez and Wright, 1998). De nos jours, on distingue six espèces du genre *Entamoeba* dans le tractus gastro-intestinal humain, à savoir : *E. coli* (Grassi, 1879), *E. dispar* (Brumpt, 1925), *E. hartmanni* (Prowazek, 1912), *E. polecki* (Prowazek, 1912), *E. moshkovskii* (Tshalaia, 1941) et *E. histolytica* (Schaudinn, 1903) (Lucas and Upcroft, 2001 ; Fotedar *et al.*, 2007). De toutes ces espèces, *E. histolytica* est l'agent responsable de l'amibiase invasive et la seule amibe intestinale pathogène chez l'homme (Diamond and Clark, 1993 ; Stanley, 2003).

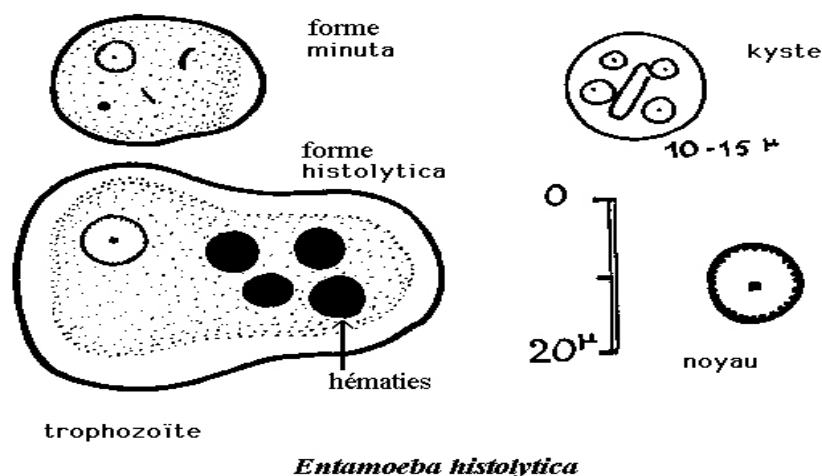
*Entamoeba histolytica* est un organisme unicellulaire qui appartient à l'ordre des *Amoebida*, à la famille des *Entamoebidae* (Brumpt *et al.*, 1967). Il se présente sous trois états morphologiques dont deux formes végétatives et une forme kystique.

La forme végétative hématophage (*E. histolytica histolytica*) : avec un diamètre compris entre 20 µm et 40 µm, elle est la forme pathogène de l'amibe qu'on retrouve dans les selles

dysentériques examinées à l'état frais. Elle se déplace rapidement dans une direction donnée en émettant des pseudopodes. Elle se multiplie par division sexuée ou bipartition (Clark, 2000). Cette forme est caractérisée par son pouvoir invasif et cytotoxique (Stanley, 2003) grâce à ses enzymes protéolytiques qui lui permettent de pénétrer les tissus et provoquer des micro-abcès (Devinder *et al.*, 1996).

La forme végétative non hématophage (*E. histolytica minuta*) : Plus petite (10 à 20  $\mu\text{m}$ ) que la forme hématophage, elle vit en saprophyte dans la lumière colique et peut être retrouvée dans les selles non dysentériques des convalescents ou des porteurs sains. Elle se déplace essentiellement en émettant des pseudopodes mais avec une mobilité plus faible que celle du type *histolytica*. Elle se multiplie par bipartition et se nourrit de résidus alimentaires et de bactéries.

La forme kystique : Forme de dissémination et de résistance de l'amibe, elle est sphérique et immobile contenant un à quatre noyaux selon l'état de maturité. Son diamètre est d'environ 10 à 15  $\mu\text{m}$ . Elle possède une coque épaisse et résistante à la dessiccation et même aux agents désinfectants usuels. On la retrouve dans les selles des malades et des porteurs sains. C'est essentiellement l'agent de transmission de l'amibiase et la forme la plus fréquente de l'amibe (Gentilini, 1993).



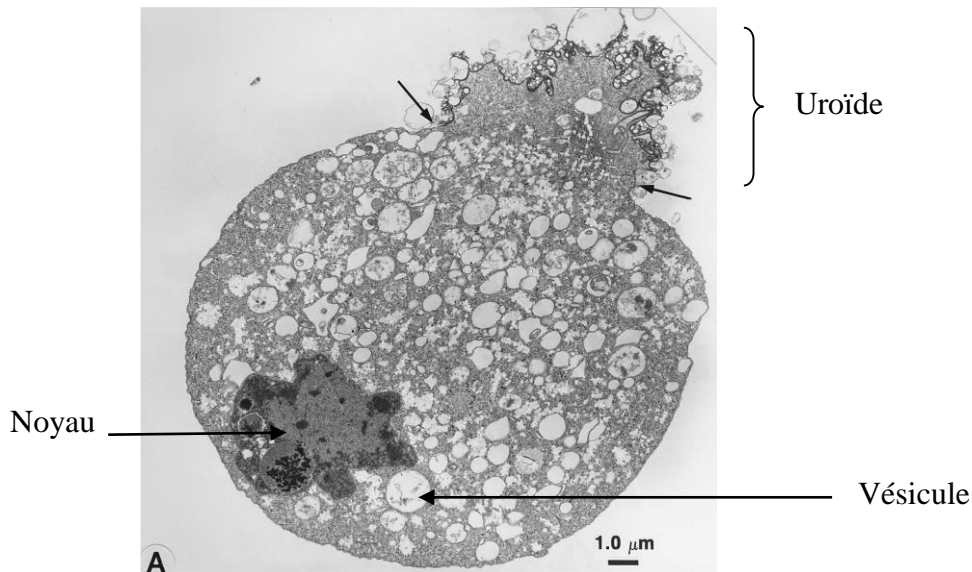
**Figure 1** : Les différentes formes d'*Entamoeba histolytica*

(Source : <http://arachosia.univ-lille2.fr>)

### **I.1.1.2. Ultrastructure du trophozoïte d'*Entamoeba histolytica***

Les trophozoïtes d'*E. histolytica* possèdent un noyau délimité par une membrane nucléaire et sont classées comme des Eucaryotes (**Avron and Chayen, 1988**), mais avec une compartimentalisation subcellulaire singulière telle que décrite sur la figure 2 ci-dessous. Par conséquent, les organites intracellulaires habituellement observés dans une cellule eucaryote, tels que les peroxyosomes, l'appareil de Golgi ou le réticulum endoplasmique rugueux, ne sont pas visibles. L'étude des protéines spécifiques du réticulum et de l'appareil de Golgi a démontré une sous-compartimentalisation originale du réticulum (**Mazzuco et al., 1997; Girard-Misguich et al., 2008**) et un appareil de Golgi très peu développé mais fonctionnel (**Mazzuco et al., 1997**).

Le cytoplasme est hyalin et renferme des organites exclusivement vésiculaires, représentant 40% du volume cellulaire. Le noyau d'*E. histolytica* est l'organite intracellulaire le plus imposant, mesurant jusqu'à 7 µm de diamètre. Il renferme un caryosome, dont la position colocalise avec la tubuline, un des composants du centre organisateur des microtubules (**Vayssie et al., 2004**). *Entamoeba histolytica* ne possède pas de mitochondries mais un mitosome pour permettre l'oxydation des composés organiques (**Tovar et al., 1999 ; Aguilera et al., 2008**). Cet organite est une relique mitochondriale qui aurait un rôle dans l'activation des sulfates, cofacteurs essentiels impliqués dans le processus de transfert d'électrons ou dans les réactions d'oxydoréduction (**Mi-ichi et al., 2009**). Le cytoplasme de ce parasite possède aussi des lysosomes, ainsi que de nombreux phagosomes caractéristiques de cet organisme hautement phagocytaire (**Marion et al., 2005**).



**Figure 2 :** Ultrastructure du trophozoïte d'*Entamoeba histolytica* (Arhets *et al.*, 1995)

**Légende :** Les flèches délimitent l'uroïde (un appendice situé à l'extrémité postérieure du parasite et extrudé dans le milieu extérieur) dont la formation a été induite par un traitement à la concanavaline A.

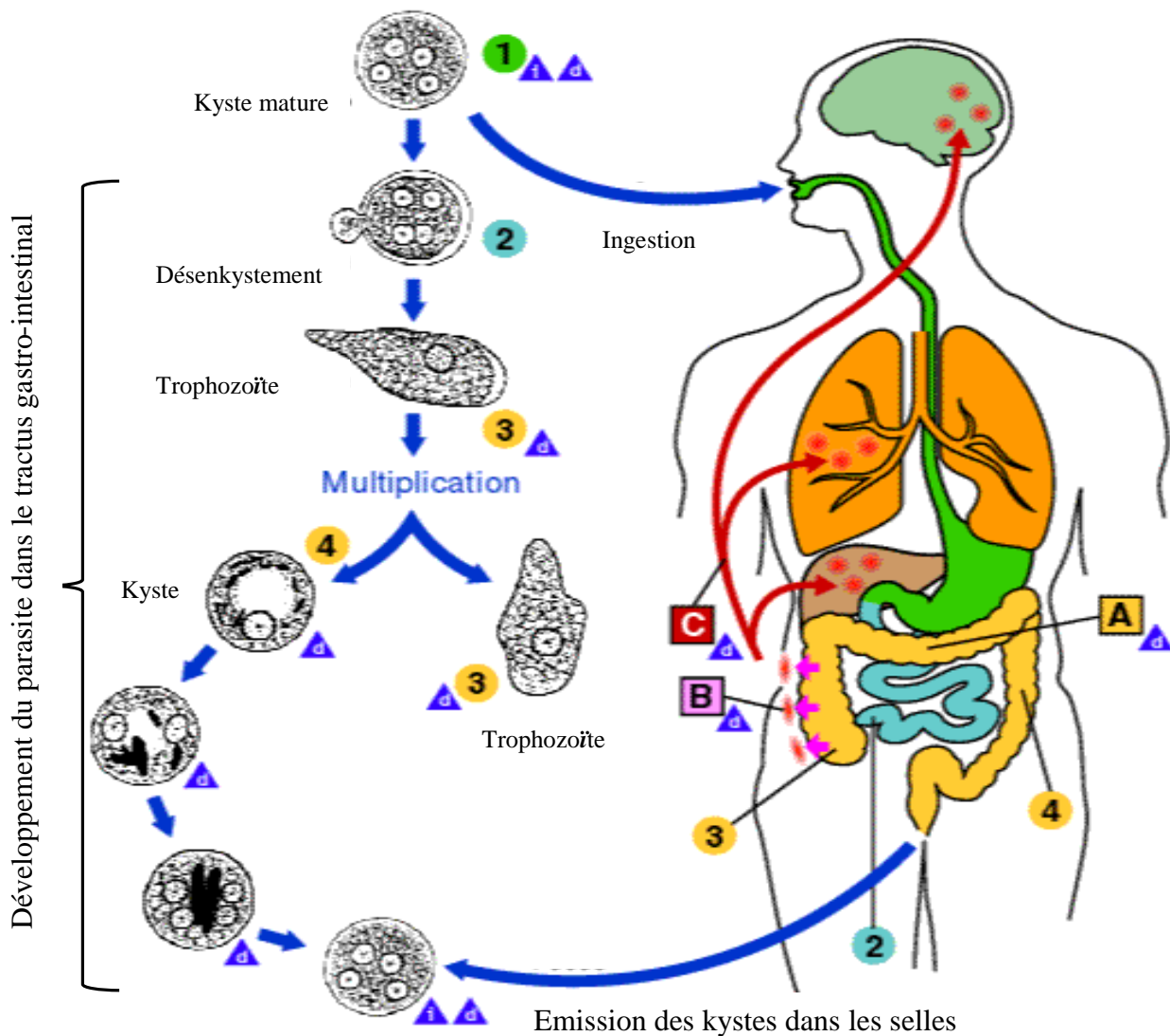
### I.1.1.3. Cycle de vie de l'agent pathogène

Lorsque les kystes sont ingérés par l'homme, ils se développent selon deux cycles dont un non pathogène et l'autre pathogène comme le présente la figure 3 ci-dessous.

- Le cycle non pathogène « kyste - *E. histolytica minuta* – kyste » qui traduit l'amibiase infection. La forme *minuta* et les kystes vivent silencieusement sur la muqueuse intestinale chez le porteur sain. En effet, après ingestion des kystes, ils perdent leur coque, lysée par la trypsine pancréatique du suc digestif pour se transformer en amibe métakystique. Après une division nucléaire, la division cytoplasmique libère huit amoebules qui redonnent dans le côlon des formes *minuta*. Ces dernières se multiplient par bipartition cellulaire et dans certaines conditions mal connues, elles s'entourent d'une nouvelle coque pour donner des kystes à un, deux puis quatre noyaux (Petri *et al.*, 2002).
- Le cycle pathogène « kyste - *E. histolytica minuta* - *E. histolytica histolytica* » qui est responsable de l'amibiase-maladie. Il résulte de la transformation des formes *minuta* en



formes *histolytica*. Les facteurs permettant le passage de la forme *minuta* à la forme *histolytica* ne sont pas encore tous connus mais, on peut citer le génotype de l'hôte, celui du parasite ainsi que des facteurs environnementaux (Ali *et al.*, 2007 ; Ralston and Petri, 2011). La forme *histolytica* possède un riche équipement enzymatique (collagénase, cystéine protéinase) qui provoque une déplétion et une destruction du mucus intestinal (Petri *et al.*, 1987 ; Petri *et al.*, 2002).



**Figure 3 :** Cycle de vie d'*Entamoeba histolytica*

(Source: <http://allaboutlaboratory.blogspot.com/2012/01/amoebas.html>)

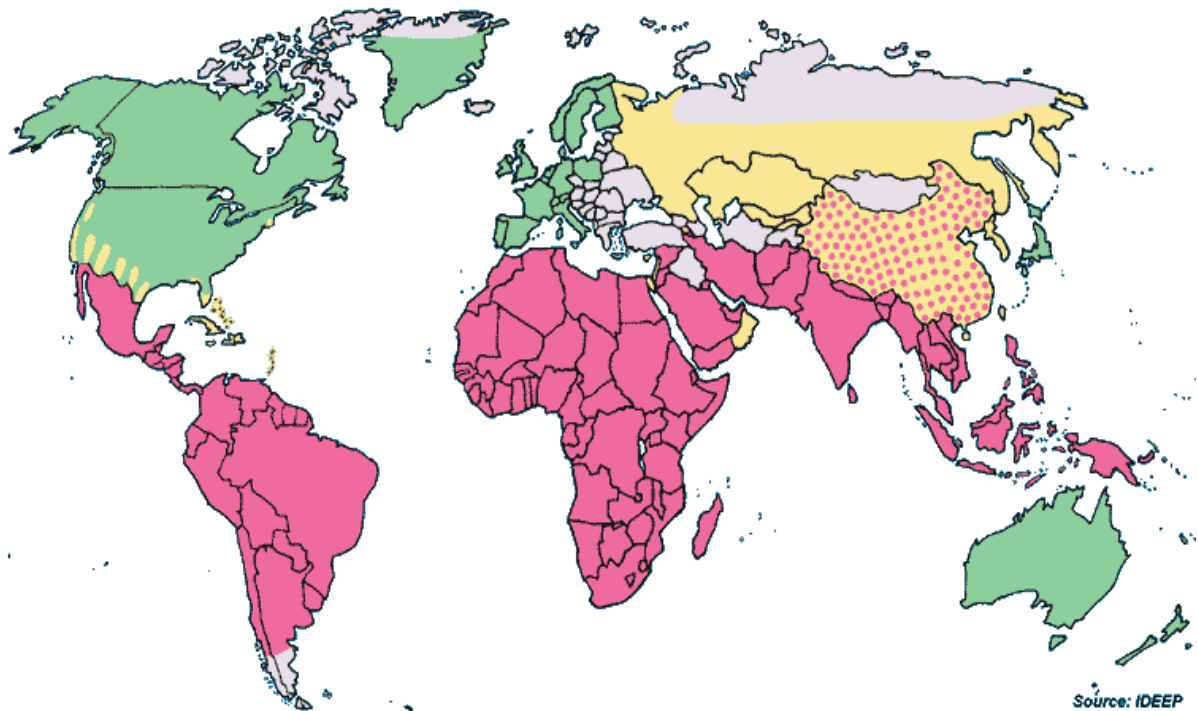
**Légende** : A : colonisation non invasive ; B : amibiase intestinale ; C : amibiase extra-intestinale ; cycle pathogène « kyste - *E. histolytica minuta* - *E. histolytica histolytica*: (1, 2 et 3) » ; cycle non pathogène « kyste - *E. histolytica minuta* – kyste : (1, 2, 3 et 4) ».

### I.1.2. Épidémiologie de l'amibiase

L'amibiase est une maladie liée au péril fécal et la transmission est assurée par l'ingestion des kystes d'*E. histolytica* répandus par les selles d'un porteur sain ou d'un malade. La transmission interhumaine est parfois directe dans les collectivités aux conditions d'hygiène rudimentaires, ou indirecte par consommation des boissons ou aliments souillés (**Espinosa-Cantellano et al., 2000**).

Selon la dernière estimation de l'OMS en 1997, 10% de la population mondiale (environ 500 millions d'individus) est infectée par des parasites du genre *Entamoeba*. Parmi les personnes infectées, 10 à 20% développent des signes sévères de la maladie avec une mortalité de 40.000 à 100.000 par an principalement dans les régions chaudes et pauvres du globe (**WHO, 1997 ; Jackson, 2000**). Ce qui fait de l'amibiase, la seconde cause de mortalité par infection parasitaire après le paludisme (**Stanley, 2003 ; Ralston and Petri, 2011**). La prévalence de l'infection à *E. histolytica* varie entre les pays et aussi entre les régions aux conditions socioéconomiques différentes. Parfois, elle peut atteindre 50% de la population dans les régions aux conditions d'hygiène rudimentaires (**Caballero-Salcedo et al., 1992**). Au Cameroun, le taux de portage des kystes varie selon les régions et les saisons avec un taux de 17,9% dans la région forestière (**Bello, 1992**) et de 12,1% dans l'Adamaoua (**Ripert et al., 1995**).

L'amibiase est une maladie qui sévit plus dans les régions tropicale et subtropicale à climat chaud et humide (**Ripert, 1996**). Elle existe aussi dans les zones tempérées (Europe et aux Etats-Unis) surtout chez des immigrants et des touristes ayant séjourné dans les pays à forte endémicité (**Weinke et al., 1989**) et chez les homosexuels (**Peters et al., 1986**). La figure 4 ci-après présente la répartition géographique de l'amibiase à travers le monde.



**Figure 4 : Répartition géographique de l'amibiase (Beys, 2011)**

**Légende :**

	<b>Absence de données</b>
	<b>Exceptionnel</b>
	<b>Intermédiaire</b>
	<b>Fréquent / très fréquent</b>

### I.1.3. Physiopathologie de l'amibiase

L'amibiase n'est pas une maladie générale à l'organisme car l'amibe a en principe une action locale au niveau de l'intestin. *Entamoeba histolytica* cause généralement une infection asymptomatique, toutefois dans une minorité de cas (environ 10% de personnes infectées), il provoque des symptômes allant jusqu'à une diarrhée sanguinolente (Haque *et al.*, 2006). Par ailleurs, la forme végétative du parasite peut migrer via la circulation sanguine vers certains organes. En effet, grâce à son équipement enzymatique, *E. histolytica* possède une double particularité qui consiste :

- d'une part à sa capacité à envahir la muqueuse intestinale, donnant une maladie avec des rechutes fréquentes (amibiase intestinale) dont la principale manifestation clinique est une diarrhée sanguinolente suivie d'une déshydratation et d'un amaigrissement du malade et,

- d'autre part à sa tendance à migrer vers d'autres organes tels que le foie, les poumons et le cerveau, provoquant des amibiases dites extra-intestinales tel que l'indique la figure 3 ci-dessus (**Petri et al., 2001**). L'amibiase hépatique est la plus fréquente des amibiases extra-intestinales et les signes cliniques observés dans ce cas sont des douleurs abdominales, une fièvre, des nausées, une anorexie, des vomissements et une diarrhée sanguinolente (**Espinosa-Cantellano and Martinez-Palomo, 2000**). La sévérité de la maladie est étroitement liée à la balance entre les facteurs de virulence du parasite et la réponse de l'hôte (**Xuchu and Sharon, 2000**).

#### **I.1.4. Principaux facteurs de virulence d'*Entamoeba histolytica***

Les principaux événements responsables de l'amibiase proviennent d'une cascade d'actions coordonnées et régulées entre l'hôte et le parasite au cours de l'invasion, faisant appel à de nombreux composants amibiens (la lectine, les cystéine-protéinases et les amoebapores) et des facteurs liés à l'hôte tels que la réponse immunitaire et la flore bactérienne intestinale (**Padilla-Vaca et al., 2010 ; Faust and Guillen, 2012**).

##### **I.1.4.1. Les facteurs liés à *Entamoeba histolytica***

Depuis longtemps, la triade lectine Gal/GalNAc, amoebapores et cystéine-protéinases a été considérée comme les facteurs majeurs responsables de la pathogénèse de l'amibiase. Cependant, d'autres molécules impliquées dans ce processus, telles que la lipophosphopeptidoglycane, la peroxiredoxine, l'arginase et la protéine KERP1 ont été mises en évidence (**Lejeune et al., 2009**). De tous ces facteurs cités, quatre ont été étudiés et caractérisés car ils sont importants dans des étapes précises de l'invasion des tissus. Il s'agit de la lectine Gal/GalNAc, des amoebapores, des cystéine-protéinases et de la protéine riche en lysine et acide glutamique (KERP1).

#### **I.1.4.1.1. La lectine Gal/GalNAc**

La lectine Gal/GalNAc est un complexe protéique membranaire composé de deux chaînes protéiques : une chaîne lourde transmembranaire de 170 kDa (Hgl) et une chaîne légère de 31 à 35 kDa (Lgl), associées l'une à l'autre par des ponts disulfures et ancrées à la membrane plasmique du trophozoïte d'*E. histolytica* par un résidu glycosylphosphatidylinositol (**Ramakrishnan et al., 2000 ; Cheng et al., 2001**). La lectine Gal/GalNAc permet aux trophozoïtes d'adhérer au mucus et aux cellules cibles (entérocytes, neutrophiles et érythrocytes) en se liant aux résidus galactose et/ou N-acétyl-D-galactosamine présents sur les mucines et la surface des cellules (**Espinosa-Cantellano and Martinez-Palomo, 2000 ; Hughes et al., 2003**). La lectine Gal/GalNAc est un antigène immunodominant prévalent dans le sérum des patients souffrant de l'amibiase. Des études utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la chaîne lourde Hgl ont démontré le rôle de la lectine dans la cytotoxicité en l'impliquant dans l'induction de la mort cellulaire (**Saffer and Petri, 1991**). Elle est aussi impliquée dans la survie du parasite en inhibant l'activité de certaines protéines de l'immunité innée secrétées par l'hôte (**Braga et al., 1992**).

#### **I.1.4.1.2. Les amoebapores**

*Entamoeba histolytica* est capable de produire les amoebapores A, B et C qui sont encore qualifiées de perforines. Ces amoebapores sont de petites protéines d'environ 77 acides aminés possédant une activité cytotoxique à l'encontre des cellules eucaryotes ainsi que des bactéries (**Andra and Leippe, 1994 ; Bracha et al., 2002**). Les amoebapores sont capables de former des canaux à ions ou des pores sur les membranes lipidiques ou sur les cellules cibles dépolarisées. A travers ces canaux vont transiter les ions et entraîner la création des flux ioniques modifiant ainsi le potentiel électrique dans les cellules cibles. Ce qui conduit à la lyse de ces dernières. Les amoebapores sont stockés dans des granules cytoplasmiques à pH acide et ne sont pas constitutivement secrétées par les trophozoïtes (**Leippe et al., 1994 ; Leippe et**

*al.*, 1995). Les amoebapores possèdent un domaine « *saposin-like protein* » caractéristique de la saposine B, un détergent naturel (Munford *et al.*, 1995), et une séquence homologue à la NK-lysine (responsable de la formation des pores) exprimée par les cellules « *Natural Killer* ». Leur capacité à former des pores est largement influencée par le pH, qui doit de préférence se situer entre 4 et 6 pour déclencher la protonation d'un résidu histidine à l'origine de l'activation des perforines (Leippe *et al.*, 2005).

#### **I.1.4.1.3. Les cystéine-protéinases**

Plusieurs gènes codant potentiellement des protéases ont été identifiés dans le génome d'*E. histolytica*, incluant 10 protéases à sérine, 4 protéases à aspartate, 22 métallo-protéases et 50 protéases à cystéine (Bruchhaus *et al.*, 2003 ; Clark *et al.*, 2007). De toutes ces protéases, trois sont majoritairement exprimés et leur activité enzymatique est responsable de 90% de l'activité totale mesurée. Il s'agit de trois protéases à cystéine (CPs), la CP-A1, CP-A2 et la CP-A5 (Bruchhaus *et al.*, 2003). Les protéases à cystéine ont été particulièrement étudiées et leur rôle dans la pathogénèse de l'amibiase intestinale et hépatique est multiple. Elles sont impliquées dans la dégradation de protéines du mucus (Keene *et al.*, 1986 ; Moncada *et al.*, 2006), de la matrice extracellulaire (Hellberg *et al.*, 2002), le clivage des immunoglobulines (Kelsall and Ravdin, 1993), l'inactivation des anaphylotoxines C3a et C5a (Reed *et al.*, 1995) et l'invasion de la muqueuse intestinale (Bansal *et al.*, 2009). *Entamoeba histolytica* produit et sécrète jusqu'à mille fois plus d'activité cystéine-protéinase que l'espèce d'amibe non pathogène *Entamoeba dispar*. Cette dernière ne possède pas le gène codant pour la CP-A5 et le gène CP-A1 conduit à la production d'une protéase non fonctionnelle (Reed *et al.*, 1989 ; Reed *et al.*, 1995).

#### **I.1.4.1.4. La protéine KERP1**

KERP1 est une protéine membranaire de petite masse moléculaire (21,5 kDa), qui contient 25% de lysine et 19% d'acide glutamique. KERP1 est un trimère  $\alpha$ -hélicoïdale qui est

capable de s'enrouler de manière réversible au cours de la dénaturation thermique avec un point de fusion thermique de 89,6 °C (**Perdomo et al., 2013**). Lors de co-cultures d'amibes et de cellules épithéliales intestinales humaines différenciées, KERP1 est associée aux bordures en brosse (**Seigneur et al. 2005**). L'analyse du transcriptome de trophozoïtes prélevés dans les abcès hépatiques chez le hamster a révélé une surexpression du gène de KERP1, suggérant son rôle lors de l'amibiase hépatique (**Santi-Rocca et al., 2008**). Le mode d'action de KERP1 reste peu élucidé mais cette protéine est un facteur clé pour la mise en place des interactions hôte-parasite dans la progression des abcès hépatiques et par conséquent, de la virulence amibienne (**Faust and Guillen, 2012 ; Perdomo et al., 2013**).

#### **I.1.4.2. Les facteurs liés à l'hôte**

En plus des composants amoebiens, il existe des facteurs liés à l'hôte qui contribuent et jouent un rôle important dans la virulence des trophozoïtes d'*E. histolytica* chez l'homme. Ces facteurs sont la réponse immunitaire inefficace et la flore bactérienne de l'intestin (**Mirelman, 1988 ; Wilson et al., 2012**).

##### **I.1.4.2.1. La réponse immunitaire**

Le développement de l'amibiase invasive pourrait être dû à une réponse immunitaire inefficace ou inappropriée qui n'empêche pas l'invasion du côlon par le trophozoïte. En effet, au cours de l'invasion, le contact des trophozoïtes d'*E. histolytica* avec les cellules épithéliales à travers la lectine Gal/GalNAc induit l'apoptose. Cette apoptose est due à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, résultant à une inflammation des tissus caractéristiques des ulcères. Ainsi, les cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages, eosinophiles etc.) sont mobilisées vers le site d'invasion et, tout en attaquant les trophozoïtes, elles augmentent la pathologie causée par l'invasion (**García-Zepeda et al., 2007**). Les espèces réactives RNS (*Reactive Nitrogen Species*) et ROS (*Reactive Oxygen Species*) libérées par les cellules immunitaires détruisent les trophozoïtes d'*E. histolytica*. Toutefois, ces dernières développent

très rapidement des mécanismes pour minimiser ces dommages, soit à travers l'expression des molécules antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la peroxyredoxine, le thioredoxine reductase, l'hydrogenase (**Bruchhaus and Tannich, 1994 ; Choi et al., 2003**) ; ou par l'internalisation et la destruction des cellules immunitaires de l'hôte par phagocytose (**Voigt et al., 1999 ; Wilson et al., 2012**).

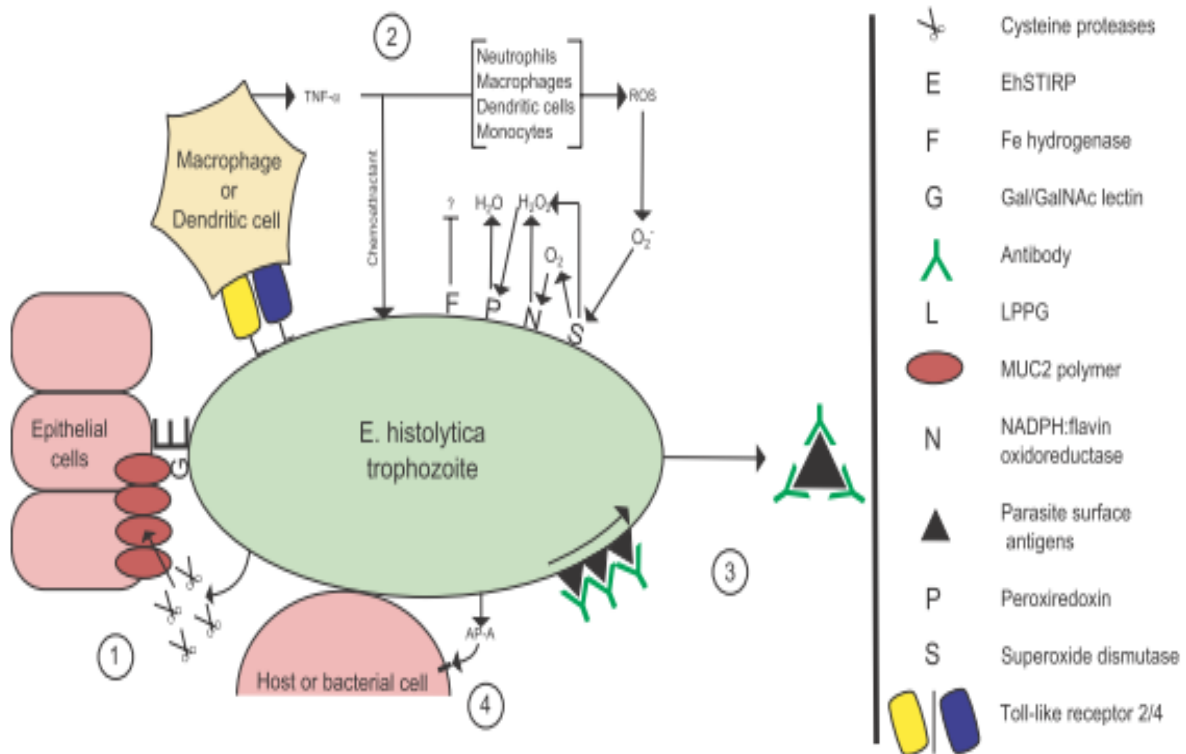
#### **I.1.4.2.2. La flore bactérienne et le microenvironnement intestinal**

Il a été également suggéré que la flore bactérienne pourrait influencer le phénotype d'*E. histolytica* et affecter la couche de mucus (**Mirelman, 1988 ; Padilla-Vaca et al., 1999 ; Verma et al., 2012**). Plusieurs chercheurs ont montré que la virulence ambiante diminue après une culture axénique prolongée, et qu'elle augmente lorsque les trophozoïtes ont été passés à travers le foie du hamster ou avec des bactéries réassociées (**Wittner and Rosenbaum, 1970 ; Diamond et al., 1974 ; Mattern et al., 1982 ; Bracha and Mirelman, 1984**). En effet, *E. histolytica* en association avec les souches de bactéries d'*Escherichia coli* 055, *Salmonella greenside* 050 et *Shigella dysenteriae* type 1, est plus cytotoxique que chacun de ces organismes (**Bracha and Mirelman, 1984**). De plus, la présence des bactéries aérobies (*E. coli* et lactobacilli) et la bactérie anaérobie *Clostridium symbiosum* dans l'intestin accroît la virulence des trophozoïtes d'*E. histolytica* (**Anaya-Velázquez and Padilla-Vaca, 1992 ; Anaya-Velazquez et al., 1997**). Ainsi, cette association des trophozoïtes d'*E. histolytica* aux bactéries augmente considérablement leur capacité de destruction des monocouches de l'intestin humain (**Gilchrist and Petri, 1999**).

#### **I.1.5. Mécanisme d'invasion d'*Entamoeba histolytica***

Les facteurs de virulence d'*E. histolytica* impliqués dans l'infection pathogène ont été identifiés après des investigations à l'échelle du génome (**Wilson et al., 2012**). Ainsi, grâce à ces facteurs, la forme végétative d'*E. histolytica* attaque la paroi de la muqueuse intestinale à travers le mécanisme décrit sur la figure 5 ci-dessous.





**Figure 5 : Mécanisme de pathogénèse d'*Entamoeba histolytica* (Wilson *et al.*, 2012)**

Ce mécanisme est mis en œuvre à travers les évènements suivants :

(1) Interaction du parasite avec la cellule cible : elle est assurée par la présence à la surface du parasite de la lectine Gal/GalNAc qui adhère aux hydrates de carbone de la cellule cible (N-acétyl-D-galactosamine) (Petri *et al.*, 1987 ; Petri *et al.*, 2002). Cette interaction dépend de la virulence du parasite qui est étroitement liée à la nature de la flore bactérienne en présence (Bracha *et al.*, 1982). EhSTIRP (*Entamoeba histolytica* serine-, threonine-, and isoleucine-rich protein) est une autre protéine impliquée dans l'adhésion du parasite à la matrice épithéliale extracellulaire (Ryan *et al.*, 2007 ; Wilson *et al.*, 2012). Cette interaction est en général suivie par la dégradation des polymères MUC2 grâce à la sécrétion de la cystéine-protéinase (Lidell *et al.*, 2006 ; Wilson *et al.*, 2012).

(2) Subversion de la réponse immunitaire de l'hôte suite à la fixation de la lipopeptidephosphoglycane (LPPG) aux récepteurs *Toll-like* 2 et 4, via la dégradation des espèces réactives de l'oxygène par la superoxyde dismutase, la NADPH flavine oxydoréductase

et peroxiredoxine (**Vivanco-Cid et al., 2007 ; Wong-Baeza et al., 2010**). La Fe-hydrogénase inhibe la réponse immunitaire par un mécanisme non encore élucidé.

(3) “*Capping and shedding*” : il s’agit de l’écèlement des antigènes de la surface des trophozoïtes par les anticorps de l’hôte et la lectine, impliquant un réarrangement du cytosquelette à transloquer les complexes antigène-anticorps sur l’uroïde de la cellule pour l’excrétion. La protéase EhROM1 (*Entamoeba histolytica* rhomboid) joue une fonction putative dans la translocation et la phagocytose (**Baxt et al., 2010**).

(4) Contact direct entre le trophozoïte et la cellule hôte, conduisant à la sécrétion de l’amoebapore-A, qui forme des pores dans la membrane cellulaire (**Wilson et al., 2012**). Cette protéine (amoebapore-A) est capable de former des canaux à ions ou des pores sur les membranes lipidiques ou sur les cellules cibles dépolarisées (**Lynch et al., 1982 ; Rosenberg et al., 1989**). Ces canaux par lesquels les ions vont transiter, entraînent la création des flux ioniques modifiant ainsi le potentiel électrique dans les cellules cibles. Ceci peut conduire à la lyse de ces dernières.

Dans certains cas, la dégradation de la matrice extracellulaire entraîne la pénétration de l’amibe dans la muqueuse intestinale pour phagocyter les cellules épithéliales et inflammatoires (**Shegal et al., 1996**). Ce sont donc ces lésions de la muqueuse colique qui sont à l’origine de la dysenterie amibienne.

### **I.1.6. Biochimie du parasite**

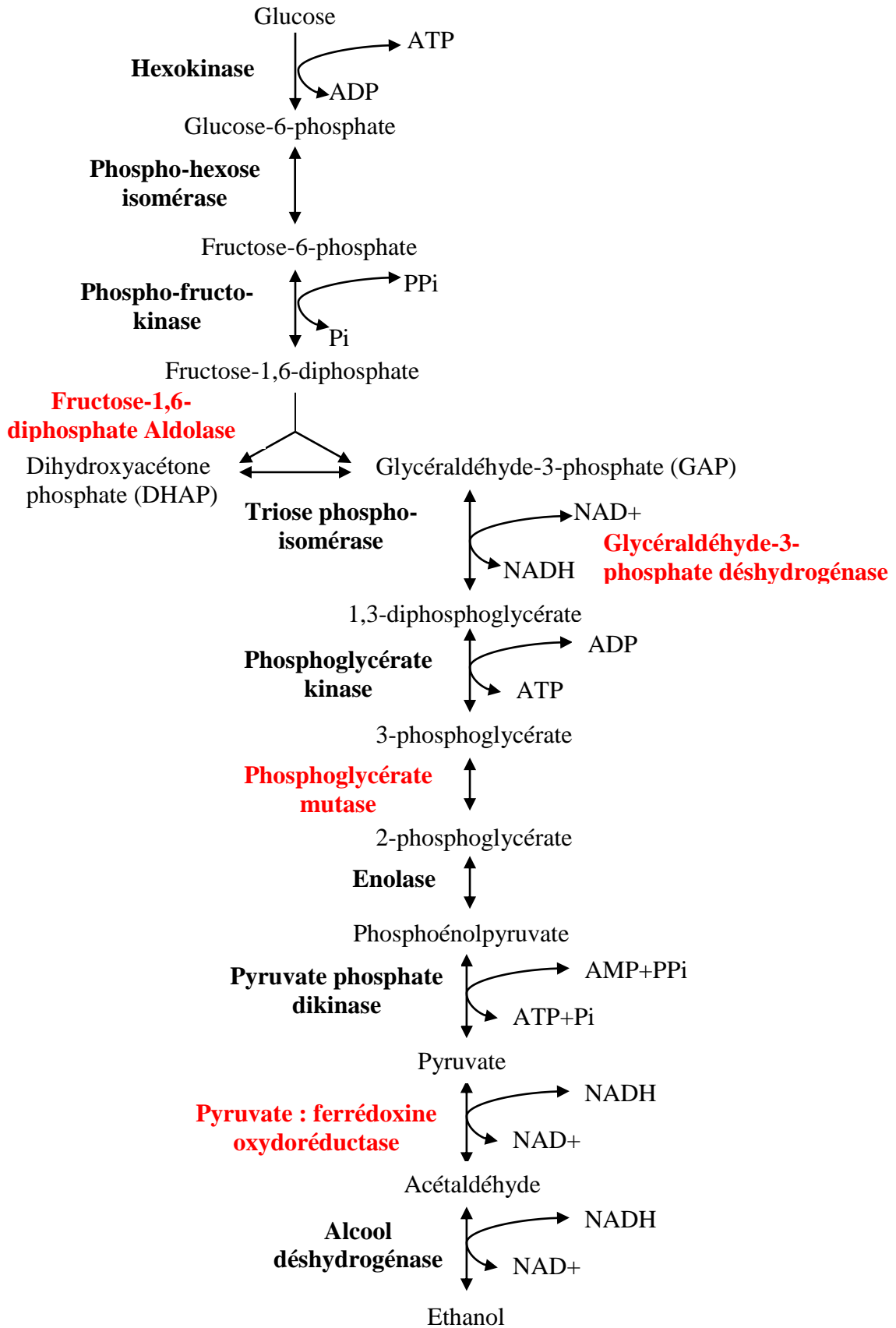
*Entamoeba histolytica* est un parasite anaérobique facultatif (**Reeves, 1984**) très sensible à un taux élevé d’oxygène (**Clark, 2000**). En effet, l’oxygène et ses produits de dégradation sont toxiques pour les trophozoïtes d’*E. histolytica* (**Gillin et al., 1982**). Pour détoxifier leur milieu de vie, les trophozoïtes d’*E. histolytica* produisent la superoxyde dismutase (SOD) (**Chen et al., 1996**).

*Entamoeba histolytica* ne possède pas les enzymes du cycle de Krebs et, du fait de l'absence de mitochondries, ne dispose pas de chaîne de transport des électrons essentielle à la réoxydation du NADH. Cependant, de nombreuses enzymes bactériennes responsables de la fermentation alcoolique ont été transférées à ce parasite grâce à sa vie dans le côlon humain et son interaction permanente avec les bactéries entériques (**Loftus et al., 2005**). Le glycogène est la principale forme de stockage de glucose qu'utilise *E. histolytica*. Ce polymère du glucose est dégradé par une glycogène-phosphorylase en glucose-1-phosphate, qui est ensuite isomérisé en glucose-6-phosphate et ce dernier entre ainsi dans la glycolyse.

La glycolyse est la source principale de production d'énergie chez *E. histolytica*. Ce parasite ne possède pas de compartiment spécialisé dans la production d'énergie tel que les glycosomes chez les trypanosomes dans lesquels s'effectuent les réactions de la glycolyse (**Parsons, 2004**). Chez *E. histolytica*, la glycolyse est un processus cytoplasmique qui convertit le glucose en pyruvate, utilisant l'énergie libérée lors de cette conversion pour former les molécules d'ATP et NADH (Figure 6). La régulation du flux de glycolyse chez *E. histolytica* est assurée par les enzymes tels que la fructose-1,6-diphosphate aldolase, la phosphoglycérate mutase, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et la pyruvate phosphate dikinase (**Saavedra et al., 2005**). *Entamoeba histolytica* ne possède pas les enzymes classiques responsables de la décarboxylation oxydative du pyruvate que sont le pyruvate déshydrogénase NAD<sup>+</sup> dépendante et la pyruvate décarboxylase (**Reeves, 1984**). Cette étape primordiale de décarboxylation oxydative du pyruvate en acetyl-CoA est assurée par le pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (PFOR). Les électrons dérivés de la décarboxylation oxydative du pyruvate sont transférés à la ferrédoxine, pour régénérer le pool de NADH intracellulaire d'une part (**Peter et al., 2001**), et d'autre part, pour l'activation du métronidazole, qui peut à son tour réagir avec d'autres biomolécules et entraîner les dommages cellulaires. Pour échapper à cet effet auto-suicidaire, certains protozoaires tels que *T. vaginalis* ont développé un mécanisme

consistant à diminuer la synthèse de PFOR afin de diminuer la quantité de métronidazole activé (Kulda, 1999 ; Hrdy *et al.*, 2005). A cause de l'absence du cycle de krebs chez l'amibe, l'acetyl-CoA est hydrolysé en CoA et acétaldéhyde lors de la fermentation alcoolique. L'acétaldéhyde est par la suite oxydé en éthanol. La réduction de l'acetyl-CoA en éthanol permet aussi la régénération du NADH (Saavedra *et al.*, 2005).

Une alternative à la glycolyse pour fournir l'énergie aux cellules consiste à la dégradation des acides gras par le processus de la  $\beta$ -oxydation. Une étude transcriptomique a mis en évidence la transcription des gènes codant les lipases et phospholipases chez *E. histolytica* (Gilchrist *et al.*, 2006). Une autre molécule dans le métabolisme de ce parasite est la cystéine. Cet acide aminé est la principale source de thiol intracellulaire présent chez *E. histolytica* et son taux élevé a pour rôle de compenser le manque de glutathion, une composante essentielle de la résistance au stress oxydatif dans de nombreux organismes (Fahey *et al.*, 1984 ; Loftus *et al.*, 2005).



**Figure 6 :** Glycolyse chez *Entamoeba histolytica* (adapté des travaux publiés par Avron and Chayen, 1988 ; Saavedra *et al.*, 2005)

### I.1.7. Diagnostic de l'amibiase

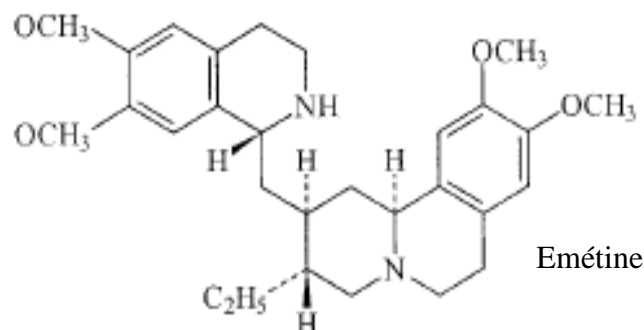
Le test coprologique est un examen microscopique incontournable dans le diagnostic de l'amibiase intestinale aiguë. Il s'effectue de préférence sur des selles fraîchement émises (Merens *et al.*, 2004). Toutefois, l'existence de plusieurs espèces d'*Entamoeba* rend un peu complexe la distinction au microscope entre *E. histolytica* (amibe pathogène) et les autres espèces non pathogènes. Ces diverses formes d'amibes sont identiques et indiscernables en microscopie optique (Diamond and Clark, 1993 ; Gonzalez and Wright, 1998). Ainsi, des méthodes biochimiques, immunologiques et génétiques ont été développées afin de mettre en évidence les différences entre souches pathogènes et non pathogènes. On peut citer la technique de culture sur milieu polyxénique ou axénique, l'électrophorèse d'isoenzymes, la méthode ELISA, la PCR et la sérologie (Tanyuksel and Petri, 2003).

### I.1.8. Traitement de l'amibiase

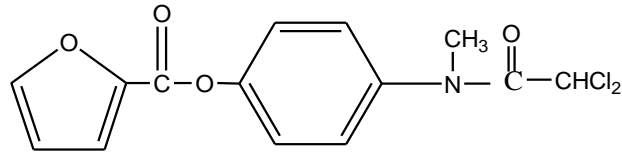
#### I.1.8.1. Traitement moderne

Le traitement dépend du stade d'évolution de la maladie mais en général, il est médico chirurgical. Concernant le traitement médical, on distingue les amœbicides tissulaires, de contact et mixtes mais en général les 5-nitro imidazolés sont prescrits soit isolement, soit en association (Distasi, 1995).

Les amœbicides tissulaires sont l'émétine et ses dérivés

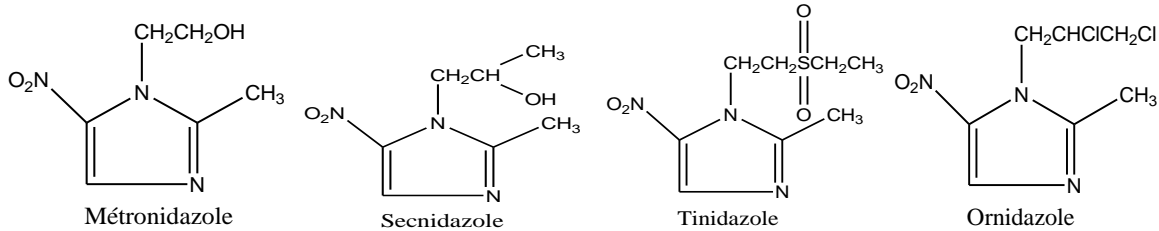


Les amœbicides de contact sont le diloxanide furoate et ses dérivés dichloroacétamides



Diloxanide furoate

Les amœbicides mixtes sont le métronidazole, le tinidazole, le secnidazole et l'ornidazole.



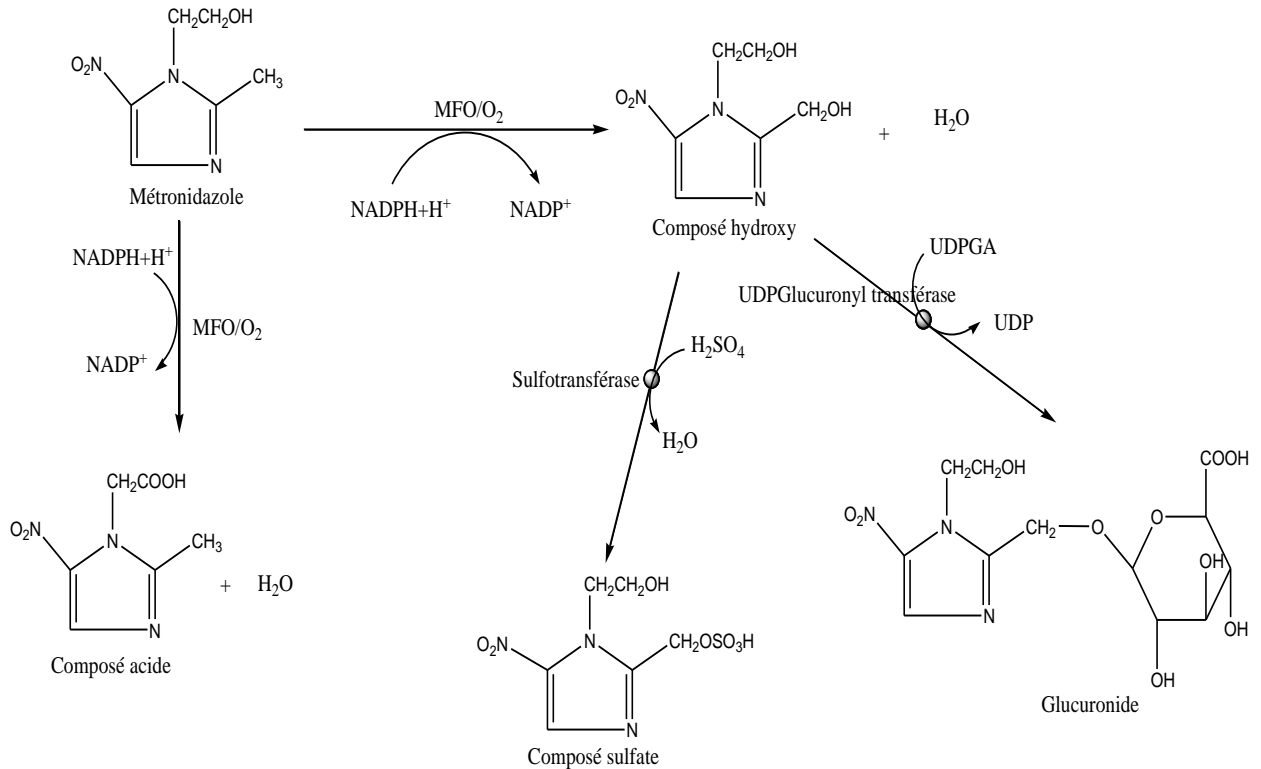
De toutes ces molécules, le métronidazole est le médicament de choix utilisé dans le traitement de l'amibiase invasive. Les autres nitroimidazolés sont efficaces mais sont utilisés de façon alternative. Le diloxanide furoate est prescrit principalement pour le traitement des porteurs des kystes (WHO, 1997). L'émétine est rarement utilisée à cause de sa grande toxicité (Knight, 1980). Le métronidazole se présente en comprimés, solutions buvables et en solutions injectables pour perfusion. La posologie est de 30 à 50 mg/kg/J chez l'adulte et 30 à 40 mg/kg/J chez l'enfant à administrer trois fois par jour pendant 5 à 10 jours. La voie orale est préférée et donc plus utilisée tandis que la voie intraveineuse n'est réservée que pour des cas graves.

Le traitement chirurgical n'est appliqué que pour des cas sévères tels que ceux des amœbomes (pseudotumeur inflammatoire du côlon pouvant entraîner un cancer) et il doit être accompagné par un traitement médical.

#### I.1.8.1.1. Métabolisme et mécanisme d'action du métronidazole

Le métabolisme du métronidazole est hépatique. Il aboutit à la formation de 5 métabolites dont 2 essentiels: un composé acide et un composé hydroxyl. Le composé acide (acide-2-méthyl-5-nitroimidazole-1-acétique) a un rôle négligeable en pratique clinique par rapport au composé hydroxyl (1-(2-hydroxyméthyl)-2-hydroxyméthyl-5-nitroimidazole) qui

conserve une activité antibactérienne d'environ 30 à 65% de l'activité du métronidazole contre 5% pour le composé acide (Susan *et al.*, 1994). Trois autres métabolites sont détectables : un glucuronide, un composé sulfate et un produit d'oxydation (Freeman *et al.*, 1997 ; Lamp *et al.*, 1999). La figure 7 ci-dessous décrit le métabolisme hépatique du métronidazole.

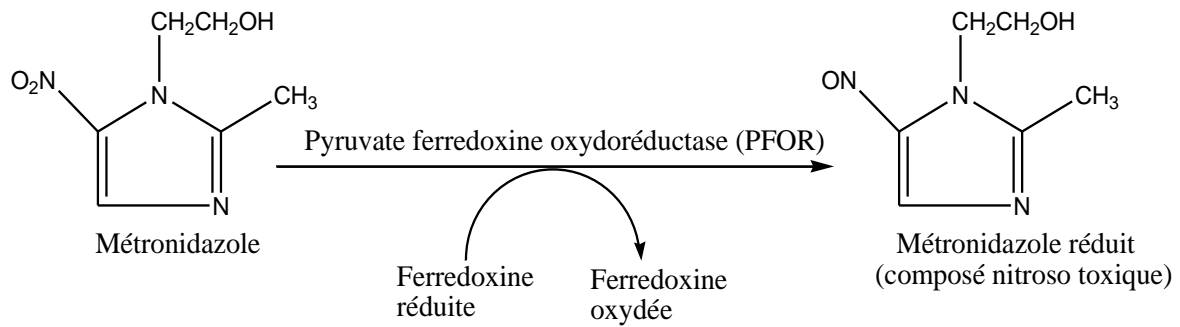


**Figure 7** : Métabolisme hépatique du métronidazole (Lamp *et al.*, 1999)

(MFO: Mixed-function oxidase, UDPGA: acide uridine diphospho-glucuronique)

Le métronidazole (RNO<sub>2</sub>) entre dans le parasite par diffusion passive et agit via son groupe nitro qui est réduit par la ferredoxine ou la flavodoxine en radicaux nitroso (RNO) cytotoxiques qui peuvent donc attaquer les acides nucléiques (ARN, ADN) et les protéines intracellulaires pour entraîner la destruction du parasite. La flavodoxine est un accepteur d'électrons de la pyruvate ferredoxine oxydoréductase, de l'hydrogénase et de certaines enzymes retrouvées spécifiquement chez des micro-organismes aérobies facultatifs et les parasites protozoaires (Wassmann *et al.*, 1999). La figure 8 ci-après décrit l'activation du métronidazole chez le parasite *E. histolytica*.





**Figure 8 :** Activation du métronidazole chez *Entamoeba histolytica* (Wassmann *et al.*, 1999)

En présence d'oxygène, les radicaux toxiques nitroso (RNO) peuvent s'oxyder et entraîner la formation d'un cycle : c'est la détoxification du médicament. Au cours de cette réaction, des radicaux anioniques superoxydes sont formés et peuvent être toxiques aux organismes anaérobiques (Wassmann *et al.*, 1999).

#### I.1.8.1.2. Mécanisme de résistance du parasite au métronidazole

L'utilisation du métronidazole a été démontrée moins efficace sur les amibiases tissulaires que sur l'amibiase intestinale (Bhopale *et al.*, 1995). De plus, le taux d'efficacité du métronidazole évalué à 90% après 5 à 10 jours de traitement suggère que certaines souches d'amibes résistent à ce médicament. C'est le cas des parasites de souches HM-1: IMSS et HTH-56: MUTM (isolés chez des patients ayant des ulcères rectaux et abcès amoebiques respectivement) qui se multiplient en culture *in vitro* en présence de 10  $\mu\text{M}$  de métronidazole, une concentration supposée létale aux parasites (Gault *et al.*, 1985 ; Upcroft and Upcroft, 2001). En effet, *E. histolytica* possède des enzymes qui ont été identifiées comme antioxydantes. Ces enzymes sont : une superoxyde dismutase contenant du fer (Fe-SOD) qui catalyse la conversion du superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ) en oxygène ( $\text{O}_2$ ) et peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Bruchhaus and Tannich, 1994), une flavine réductase (NADPH flavine oxydoréductase) qui réduit l'oxygène ( $\text{O}_2$ ) en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Bruchhaus *et al.*, 1998), enfin une protéine riche en groupements thiols (« TSA : thiol-specific antioxidant ») ou peroxyredoxine ayant à la fois des activités peroxydases et antioxydantes (Poole *et al.*, 1997 ; Choi *et al.*, 2005). Ainsi, en

présence des radicaux superoxydes toxiques produits lors de l'activation du métronidazole, *E. histolytica* résiste en sécrétant ces enzymes antioxydantes pour détoxifier son environnement (Chen *et al.*, 1996). Il ressort du mécanisme d'action du métronidazole que la résistance d'*E. histolytica* est due à l'augmentation de l'expression des enzymes antioxydantes et à la baisse de l'expression de la ferredoxine ou flavodoxine (Wasmann *et al.*, 1999).

### **I.1.8.2. Traitement de l'amibiase par les plantes médicinales**

Les infections parasitaires sont fréquentes dans les régions tropicales d'Afrique, d'Asie et d'Amérique latine et relativement moins fréquentes dans les pays développés. Les médicaments actuellement disponibles pour traiter ces infections sont efficaces dans de nombreux cas. En effet, les métabolites bioactifs d'origine végétale peuvent offrir une alternative facilement accessible. D'où l'importance des connaissances indigènes qui sont des ressources précieuses pour la sélection des plantes pour de nouveaux médicaments (Varughese *et al.*, 2010). Dans notre contexte de travail, une approche est faite pour examiner les progrès récents dans l'utilisation ethnomédicinale des plantes contre l'amibiase.

Pendant ces dernières années, la recherche des composés antiamebiotiques à partir des plantes médicinales s'est basée sur les informations obtenues de la médecine traditionnelle. En effet, les extraits de plantes et les composés isolés ont été testés *in vitro* sur les cellules d'*E. histolytica* en culture ou *in vivo* sur des modèles expérimentaux de l'amibiase pour évaluer leur activité antiamebiotique. A partir de certaines plantes médicinales, plusieurs composés ont été isolés avec de meilleures activités antiamebiotiques proches ou comparables au médicament de référence. Le tableau I ci-après présente les plantes médicinales et les composés actifs sur les souches diverses d'*Entamoeba histolytica*.

**Tableau I : Plantes médicinales et composés actifs sur les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* (Sharma and Sharma, 2001)**

Identification botanique (Famille)	Partie de la plante utilisée	Extrait/Classe de composés ou composés purs isolés	Concentration efficace	Souche d' <i>E. histolytica</i> testée	Références
<i>Alium sativum</i> (Liliaceae)	Gousse	Extrait brut d'huile	CI <sub>50</sub> (0,3 mg/mL)	<i>E. histolytica</i>	Mirelman <i>et al.</i> (1987); Behnia <i>et al.</i> , (2008)
		Extrait à l'hexane	3 mg/mL	SAW 1734R/c1AR	
		Allicine	30 µg/mL		
<i>Adina cordifolia</i> (Rubiaceae)	Ecorce/	Extrait au benzène	CI <sub>50</sub> (2,92 µg/mL)	<i>E. histolytica</i>	Iqbal <i>et al.</i> , (2009)
	Racine	Extrait à l'acétate d'éthyle	2,50 µg/mL	HM1-IMSS	
		7-hydroxycoumarin	6,38 µg/mL		
		7- β-D-glucosylcoumarin	4,35 µg/mL		
<i>Cephaelis ipecacuanha</i> (Rubiaceae)	Racine	Alcaloïdes	CI <sub>50</sub>	<i>E. histolytica</i> NIH 200	Wright <i>et al.</i> (1989)
		Emétine	1,7 µg/mL		
		Cephaeline	3,26 µg/mL		
		Psysotrine	8,19 µg/mL		
<i>Brucea javanica</i> (Simaroubaceae)	Fruit	Quassinoids (Butanol extract)	CI <sub>50</sub> (8,25 µg/mL)	<i>E. histolytica</i> NIH 200	Keene <i>et al.</i> (1986)
		Bruceantin	0,35 µg/mL		
		Bruceine C	10 µg/mL		
		Emetine	0,07 µg/mL		
		Quinidine	16,6 µg/mL		
		Cinchonamine	14,8 µg/mL		
		3-Epiquinamine	12,9 µg/mL		

Tableau I (suite)

Identification botanique (Famille)	Partie de la plante utilisée	Extrait/Classe de composés ou composés purs isolés	Concentration efficace	Souche d' <i>E. histolytica</i> testée <i>in vitro</i>	Références
<i>Brucea antidysenterica</i> (Simaroubaceae)	Fruit	Quassinoids	CI <sub>50</sub>	<i>E. histolytica</i>	Gillin <i>et al.</i> (1982)
		Bruceantin	0,018 µg/mL	HM1-IMSS	
		Simalilactone D	0,047 µg/mL		
		Ailanthinone	0,068 µg/mL		
		Glaucarubolone	0,12 µg/mL		
		Glaucarubin	1,57 µg/mL		
<i>Centipeda minima</i> (Asteraceae)	Plante entière	Sesquiterpène lactone		<i>E. histolytica</i>	Heinrich <i>et al.</i> (1992)
		Brevilin A	CI <sub>50</sub> (4,5-9 µM)		
<i>Cigarrilla mexicana</i> (Rubiaceae)	Feuille	Méthanol	CI <sub>50</sub> (45,13 µg/mL)	<i>E. histolytica</i>	Calzada <i>et al.</i> (1998a)
				HM1-IMSS	
<i>Cuphea pinetorum</i> (Lythraceae)	Racine	Méthanol/Flavonoïdes	CI <sub>50</sub> (73,23 µg/mL)	<i>E. histolytica</i>	Calzada <i>et al.</i> (1999)
		Kaempferol	7,93 µg/mL	HM1-IMSS	
		Quercetine	114,3 µg/mL		
<i>Holarrhena pubescens</i> (Apocyanaceae)	Ecorce	Alcaloïdes	CI <sub>50</sub>	<i>E. histolytica</i>	Wright <i>et al.</i> (1989)
		Conessine	8,97 µg/mL	NIH 200	
		Conessimine	1,87 µg/mL		
		Isoconessimine	20,9 µg/mL		
		Conessidine	2,29 µg/mL		
		Holonamine	3,96 µg/mL		

Tableau I (suite et fin)

Identification botanique (Famille)	Partie de la plante utilisée	Extrait/Classe de composés ou composés purs isolés	Concentration efficace	Souche d' <i>E. histolytica</i> testée <i>in vitro</i>	Références
<i>Gossypium herbacium</i> (Malvaceae)	Graine	Huiles extraites Gossypol	CI <sub>50</sub> 0,015 µg/mL	<i>E. histolytica</i> HM1-IMSS	Gonzalez-Garza and Said-Fernandez (1988)
<i>Codiaem variegatum</i> (Euphorbiaceae)	Feuille	Décoction	CE <sub>50</sub> (10,74 µg/mL)	<i>E. histolytica</i>	Moundipa <i>et al.</i> , (2005)
<i>Haliclona exigua</i>	Feuille	Methanol	CMI (125 µg/mL)	<i>E. histolytica</i>	Lakshmi <i>et al.</i> (2009)
		Methanol/Chloroforme (1:1)	250 µg/mL	HM1-IMSS	
		Araguspongin-C	250 µg/mL		
<i>Morinda morindoides</i> (Rubiaceae)	Feuille	Extrait aqueux	CI <sub>50</sub> (3,1 µg/mL)	<i>E. histolytica</i>	Tona <i>et al.</i> (1998)
		Extrait au methanol 80%	1,7 µg/mL		
		Epoxygaertneroside	1,3 µg/mL		
		Methoxygaertneroside	2,3 µg/mL		
<i>Piper longum</i> (Piperaceae)	Fruit	Ethanol	CE <sub>50</sub> (1000 µg/mL)	<i>E. histolytica</i>	Ghoshal <i>et al.</i> (1996)
		n-butanol	100 µg/mL	NIH 200	
<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	Feuille	Décoction	CMI (62,5 µg/mL)	<i>E. histolytica</i>	Tona <i>et al.</i> (1998)
	Ecorce	Décoction	CMI ( $\leq$ 7,81 µg/mL)		
<i>Oxalis corniculata</i>		Galacto-glycerolipid	CI <sub>50</sub> (15 µg/mL)	<i>E. histolytica</i> HM1-IMSS	Manna <i>et al.</i> , (2010)

### I.1.8.3. Traitement de l'amibiase à base d'un médicament traditionnel amélioré

Dysenteral® est un médicament traditionnel amélioré (MTA) autorisé par le Ministère de la Santé au Mali et produit par le Département de Médecine Traditionnelle de l'Institut National de Recherche en Santé Publique du même pays (Maiga and Toure, 2005 in Willcox et al., 2012). Ce médicament est fabriqué à partir de la partie aérienne de la plante *Euphorbia hirta*, une Euphorbiaceae largement utilisée dans de nombreux pays africains pour le traitement de la dysenterie (Adjanohoun et al., 1979 in Willcox et al., 2012). *Euphorbia hirta* est actif contre plusieurs micro-organismes qui causent la diarrhée ou la dysenterie (Vlietinck et al., 1995 ; Sudhakar et al., 2006 ; Ogbulie et al., 2007). De plus, une étude *in vitro* montre que l'extrait aqueux de cette plante possède une activité antiamoebique sur *E. histolytica*. L'extrait aqueux de la plante entière est plus actif (CI<sub>50</sub>=31,25 µg/mL) que celui des feuilles seules (CI<sub>50</sub>=250 µg/mL) (Tona et al., 1998). Par ailleurs, l'analyse phytochimique d'*E. hirta* indique la présence des tanins (Euphorbins A, B, C, D, E), des polyphénols (acide gallique et myricitrine) et des flavonoïdes (quercitol et quercétine), qui ont une activité anti-diarrhéique et antiamoebique (Galvez et al., 1993 ; Sandeep et al., 2009). L'administration unique par voie orale de l'extrait aqueux jusqu'à la dose de 30 g/Kg n'a produit aucun signe de toxicité chez les rats. De même, l'administration quotidienne de l'extrait éthanolique jusqu'à la dose de 1 g/kg chez des rats pendant 27 jours n'a montré aucun effet toxique (Ogbulie et al., 2007). Cent vingt-cinq sur 150 patients ont été guéris avec une dose journalière de 7,2 g de matière végétale sèche (extrait sous forme de comprimé) pendant 8 jours, avec normalisation des selles au bout de 2 à 6 jours, et sans effets secondaires (Ridet and Chartol, 1964 in Willcox et al., 2012). Au Mali, dysenteral® se présente en paquet de neuf sachets de tisane dosé à 10 g de poudre séchée de la partie aérienne de la plante. La posologie est de trois sachets par jour en trois prises, pendant trois jours et le dysenteral® est administrée en faisant bouillir la quantité indiquée dans un litre d'eau pendant 10 minutes (Willcox et al., 2012). Ce traitement a été testé au Mali dans un

essai clinique non publié. Il résulte de cette étude que la disparition des trophozoïtes d'*E. histolytica* dans les selles des patients était observée au bout de 2 jours de traitement, ce qui équivaut à un traitement par le métronidazole (Diallo *et al.*, 2005 in Willcox *et al.*, 2012).

#### **I.1.8.4. Description de la plante *Codiaeum variegatum***

*Codiaeum variegatum* (L.) Blume, (1954) est une Euphorbiaceae communément appelée « croton », poussant dans les régions tropicales humides d'Asie et d'Afrique. Sa culture se fait par bouturage et de ce fait nécessite un sol humide pour sa croissance. Cette plante est d'une hauteur maximale d'environ 1,5 mètre et elle présente un feuillage décoratif. En effet, les feuilles sont ondulées et courtes, de couleur verte, tachetées de points blanchâtres. En plus de son usage décoratif, *C. variegatum* est aussi utilisé pour ses propriétés thérapeutiques. La décoction des feuilles sèches est consommée sous forme de thé chez les Filipinos (Australie) tandis que la boisson à base des feuilles fraîches est utilisée dans le traitement des diarrhées. La racine et l'écorce sont utilisées contre la syphilis, la constipation, les maux d'estomac, l'anorexie et la dysurie (Saffoon *et al.*, 2010). Au Cameroun, la décoction des feuilles fraîches de *C. variegatum* est utilisée par la population locale dans le traitement de la dysentérie amibienne. Dans nos travaux antérieurs, il a été rapporté que l'extrait aqueux des feuilles de *C. variegatum* possède une activité anti-amœbique significative sur culture polyxénique d'*E. histolytica* (Moundipa *et al.*, 2005).

#### **I.1.9. Recherche d'un vaccin anti-amœbien et prophylaxie**

La prévalence élevée de l'infection à *E. histolytica* dans certaines populations vulnérables du monde suggère qu'un vaccin anti-amibien efficace aura pour impact direct la réduction de la morbidité et la mortalité causées par cette infection avec en projection l'élimination de ce parasite à long terme. Cela serait particulièrement indispensable pour les enfants des pays en voie de développement où l'épidémiologie indique que ces derniers vivant dans la pauvreté sont exposés à un risque très élevé d'infection. Pour ce faire, plusieurs

protéines d'*E. histolytica* ont été testées comme candidats potentiels pour la recherche d'un vaccin anti-amibien. Ces molécules cibles incluent une protéine de 25 kDa riche en sérine « SREHP : Serine Rich *E. histolytica* Protein », la Gal/GalNAc « Galactose and N-acetyl Galactosamine-inhibitable lectin », la peroxyrédoxine, lipophosphoglycane et la cystéine protéinase (**Margaret and Stanley, 2006**). Certaines de ces protéines ont été identifiées comme efficaces sur le modèle animal. Les candidats les plus prometteurs sont la « SREHP » et la lectine Gal/GalNAc qui sont des récepteurs de surface associés à la membrane du parasite (**Lotter and Tannich, 2006 ; Parija, 2010**).

La fonction exacte de la protéine « SREHP » reste inconnue toutefois, il a été montré qu'elle constitue un agent chimio-attractif et sert de médiateur dans la liaison des trophozoïtes d'*E. histolytica* aux cellules eucaryotes (**Stanley et al., 1995 ; Lotter and Tannich, 2006**). La forme recombinante SREHP/MBP (Maltose Binding Protein) s'est montrée efficace chez 85% des gerbilles vaccinées par voie intrapéritonéale avec une protection complète contre les abcès hépatiques après l'inoculation hépatique directe de souches virulentes d'*E. histolytica* (**Zhang et al., 1994**). En outre, les souris SCID immunisées avec l'antisérum de cette protéine recombinante ont également été protégées contre le développement induit des abcès hépatiques, suggérant que les anticorps sont principalement responsables de la protection observée (**Zhang et al., 1994 ; Lotter and Tannich, 2006**).

Des études ont démontré que la présence dans les fèces d'un niveau élevé d'immunoglobuline (IgA) ciblant les protéines d'*E. histolytica* était associée à une diminution du risque de réinfection intestinale (**Haque et al., 2001**). L'immunité acquise contre *E. histolytica* étant en partie corrélée à l'immunité mucoale, un vaccin administré par voie orale engendrant l'induction d'une réponse IgA au niveau de la lumière intestinale serait une solution préventive et thérapeutique adaptée contre l'amibiase (**Ravdin et al., 2003**). Ainsi, une stratégie consistant à exprimer un antigène immunodominant de l'amibe, la lectine Gal/GalNAc dans la



lumière intestinale en utilisant un système bactérien a été expérimentée (**Lotter et al., 2008**). Cette étude a démontré qu'après immunisation de gerbilles et de souris C57BL/6, les résultats étaient différents en fonction de l'espèce, du sexe et du peptide utilisé. En outre, l'instillation intra-nasale de la lectine Gal/GalNAc chez les gerbilles a induit la production d'IgA et d'IgG ainsi qu'une protection contre la formation d'abcès hépatiques (**Ivory et Chadee, 2007**). La réalisation d'un essai de vaccination sur des babouins par instillation intra-nasale d'un mélange de quatre épitopes de la lectine Gal/GalNAc a mis en évidence l'apparition d'une immunité muqueuse caractérisée par la présence d'IgA intestinales capables de neutraliser l'adhérence des trophozoïtes (**Abd Alla et al., 2007**). Plus récemment, un nouveau modèle expérimental de l'amibiase invasive a été mis au point chez les babouins et l'instillation intra-nasale de la lectine Gal/GalNAc s'est montré efficace dans la prévention de l'amibiase invasive et colique chez cet animal (**Abd Alla et al., 2012**).

La découverte d'un vaccin anti-amoebien engendrant une immunité acquise à long terme et une protection contre les kystes reste un challenge majeur qui doit être relevé. En ce moment, les seules mesures pour lutter efficacement contre cette maladie consistent soit à dépister et à traiter les porteurs sains, soit à insister sur l'apprentissage des règles d'hygiène et à lutter contre le péril fécal.

## **I.2. Développement d'un médicament à base de plantes**

Ce sont des médicaments manufacturés exclusivement à partir de plantes (parties aériennes et non aériennes, jus de fruits, les résines et de l'huile), soit à l'état brut soit comme une formulation pharmaceutique (**Rates, 2001**). Selon l'OMS (2003), une plante médicinale est tout végétal contenant dans un ou plusieurs de ses organes des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse chimico-pharmaceutique. La phytothérapie désigne la médecine basée sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels. On peut la subdiviser en trois types de pratiques :

- une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'OMS (2003), cette phytothérapie est considérée comme la médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement. C'est le plus souvent une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'études cliniques (**Newman and Cragg, 2007**).
- une pratique de prophylaxie qui a été déjà utilisée dans l'antiquité notamment dans la cuisine, avec l'usage de la ciboulette, de l'ail, du thym, du gingembre ou simplement du thé vert. En effet, une alimentation équilibrée et contenant certains éléments bioactifs est considérée comme une phytothérapie prophylactique (**Newman and Cragg, 2007**).
- Une pratique basée sur les avancées et preuves scientifiques recherchées dans les extraits actifs des plantes. Cette pratique débouche suivant les cas sur la fabrication de médicaments pharmaceutiques ou médicaments traditionnels améliorés (MTA) ou de phytomédicaments (**Rates, 2001 ; Newman and Cragg, 2007**).

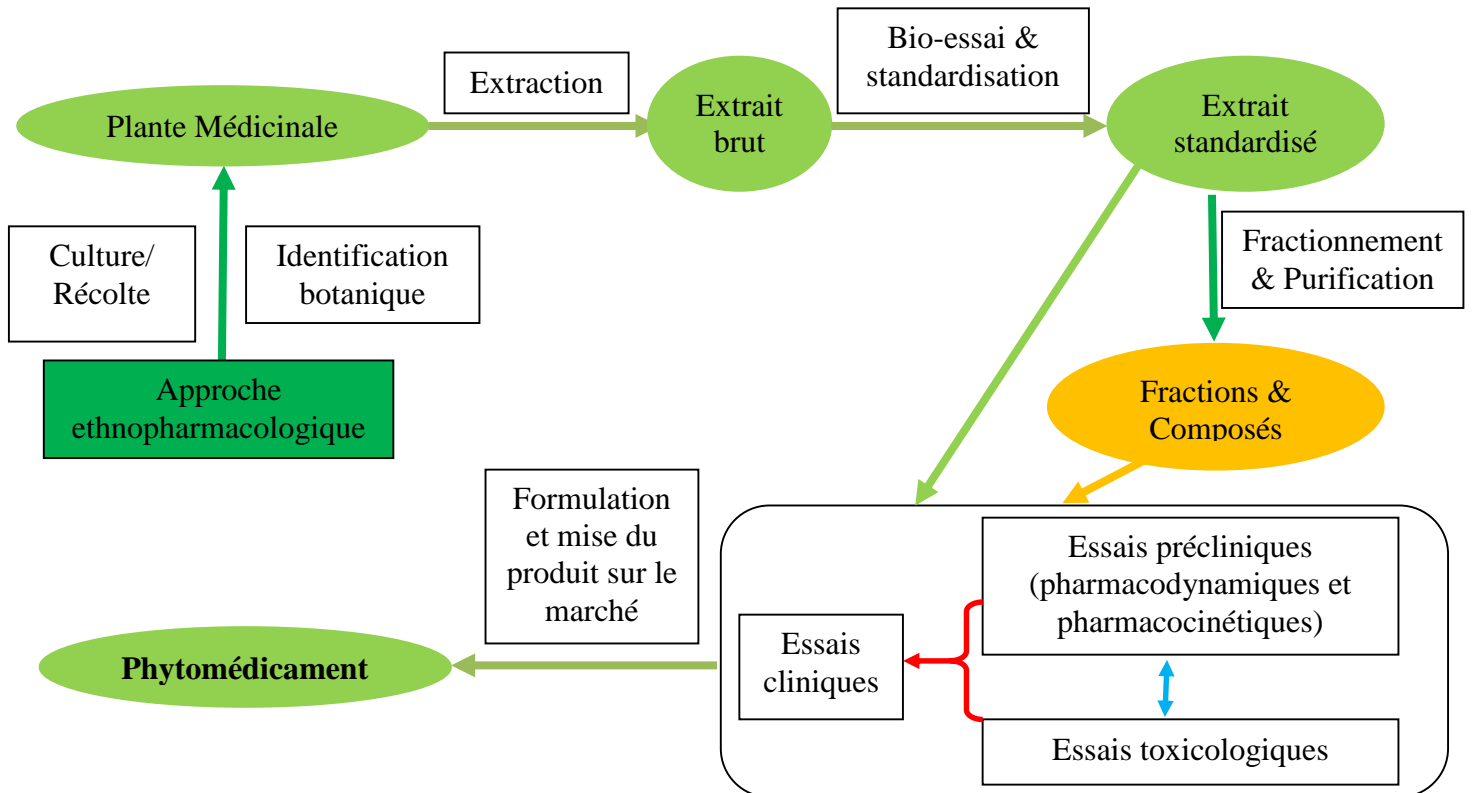
### **I.2.1. Etapes du développement d'un phytomédicament**

Le développement d'un médicament est un processus complexe, qui nécessite des investissements considérables et pas moins de 10 à 15 ans de recherche fondamentale et d'essais cliniques. Ce processus commence par le choix des plantes ou des composés actifs d'une plante à travers les approches aléatoire, chimiotaxonomique, ethno-guidée, écologique, le criblage phytochimique, et la bio-informatique appliquée (**Igoli et al., 2005 ; Queiroz et al., 2009**).

L'approche ethno-guidée est la stratégie la plus utilisée dans le choix des plantes pour le développement des médicaments à base de plantes. Elle met en évidence l'ethnobotanique, l'ethnomédecine et l'ethnopharmacologie. Récemment, l'ethnopharmacie a été structurée de manière à fournir une interface entre les sciences pharmaceutiques et la phytothérapie populaire où les espèces de plantes médicinales peuvent être sélectionnées pour le développement de

phytomédicaments et pour une utilisation dans les soins de santé primaires, en conformité avec les exigences de la sécurité et de l'efficacité (**Barbosa et al., 2011**).

L'ethnopharmacologie est la technique la plus utilisée et la mieux élaborée pour la découverte de phytomédicaments. Par définition, l'ethnopharmacologie est l'exploration scientifique interdisciplinaire des agents biologiquement actifs d'origines animale, végétale ou minérale, provenant des connaissances et des pratiques traditionnelles que les différentes cultures utilisent à des fins thérapeutiques ou de diagnostic, pour modifier l'état d'un organisme vivant (**Dos Santos and Fleurentin 1990 ; Barbosa et al., 2011**). Elle implique d'une part un travail sur le terrain qui consiste à mener des enquêtes auprès des tradipraticiens afin de recenser les plantes médicinales avec les pratiques médicales qui les accompagnent et d'autre part, une mise en œuvre d'un travail de laboratoire qui, grâce aux outils modernes de la pharmacologie, de la chimie et de la biologie, vise à mieux comprendre et à définir l'activité thérapeutique des substances testées (**Fleurentin et Balansard, 2002**). En effet, l'ethnopharmacologie cherche à collecter l'information qui a conduit un peuple à utiliser certaines plantes précises dans le traitement d'une maladie spécifique. Cette information est très importante pour le développement de médicaments à base de plantes. De plus, l'évaluation de la forme originale d'utilisation de la plante est déterminante pour l'élaboration de la formulation phytopharmaceutique (**Barbosa et al., 2011**). La figure 9 ci-dessous représente les principales étapes mises en œuvre dans l'élaboration d'un médicament avec les plantes comme point de départ selon l'approche ethnopharmacologique.



**Figure 9** : Etapes du développement d'un phytomédicament par une approche ethnopharmacologique (adapté du travail publié par **Barbosa et al., 2011**)

### I.2.2. Evaluation de l'activité antiamebique des extraits de plante

Pendant ces dernières années, la recherche des extraits de plantes et composés antiamebiques est réalisée par le biais des essais *in vitro* sur les cellules d'*E. histolytica* en culture ou *in vivo* sur des modèles expérimentaux de l'amibiase.

#### I.2.2.1. Evaluation *in vitro* de l'activité antiamebique des extraits de plante sur une culture d'*Entamoeba histolytica*

L'évaluation *in vitro* de l'activité antiamebique des extraits de plante sur les trophozoïtes d'*E. histolytica* est réalisée sur des milieux de culture variés, selon la nature et la composition de ces derniers, on distingue :

- une culture polyxénique d'*E. histolytica* définie comme celle dans laquelle le parasite d'intérêt se multiplie en présence de plusieurs espèces de bactéries (**Clark and Diamond,**

2002 ; Fotedar *et al.*, 2007). Le milieu utilisé pour ce type de culture est celui décrit par Boeck et Drbohlav en 1925. Il est constitué d'une phase solide (albumine + solution de Ringer) et d'une phase liquide (solution Lock + sérum de bœuf) et de l'amidon de riz ajouté à chaque ensemencement. D'autres milieux tels que le milieu diphasique de Robinson et le milieu monophasique TYSGM-9 sont également utilisés dans ce type de culture (**Diamond, 1982 in Clark and Diamond, 2002**). Les échantillons de selles fraîchement émises de patients souffrant de la dysentérie amibienne sont en général la source commune de matériel à ensemercer. Parfois, les biopsies rectales ou les aspirations des abcès hépatiques sont utilisées comme point de départ de cette culture (**Tanyuksel and Petri, 2003 ; Fotedar *et al.*, 2007**),

- une culture monoxénique d'*E. histolytica* qui est une culture dans laquelle le parasite d'intérêt se multiplie en présence d'une seule bactérie bien connue. Mise au point par Cleveland et Sanders en 1930, cette culture utilise le milieu modifié monobactérien de Shaffer-Frye (**Reeves *et al.*, 1957 ; Clark and Diamond, 2002**). *Trypanosoma cruzi*, *Escherichia coli* et *Crithidia fasciculata* sont des micro-organismes de choix associées à cette culture (**Diamond, 1968 ; Padilla-Vaca *et al.*, 1999**). Les échantillons pour cette culture sont des trophozoïtes ou kystes provenant d'une culture polyxénique (amibes-bactéries) lavée plusieurs fois au tampon phosphate salin puis traitée aux antibiotiques pour éliminer les bactéries (**Diamond, 1968 in Clark and Diamond, 2002**). L'utilisation de ce type de culture est limitée de nos jours car elle n'est considérée que comme une étape transitoire entre les cultures polyxénique et axénique,
- une culture axénique d'*E. histolytica* dans laquelle les amibes se multiplient en l'absence de tout autre organisme vivant. Réalisée par **Diamond** en 1978, cette culture utilise un milieu semi-synthétique assez complexe, le TYI-S-33 composé de trypticase, d'extrait de levure, du sérum de bœuf, du glucose et des vitamines (**Diamond *et al.*, 1978 in Clark and**

**Diamond, 2002**). Cette culture se fait soit à partir d'une souche pure d'*E. histolytica* ou d'un échantillon de la culture monoxénique traitée avec un antibiotique spécifique à la bactérie concernée. L'axénisation d'*E. histolytica* est un processus long et laborieux impliquant à chaque étape l'adaptation du parasite à un nouvel environnement de développement (**Clark and Diamond, 2002**). Un milieu de culture axénique (PEHPS) a été décrit comme une alternative au milieu TYI-S-33. Ses principaux constituants sont les extraits de foie de bœuf et de pancréas de bœuf et de porc (**Said-Fernandez et al., 1988**). Ce milieu assure le développement des trophozoïtes d'*E. histolytica* en partant d'inoculats ne renfermant qu'une amibe par millilitre et sur de longues durées.

#### **I.2.2.2. Evaluation *in vivo* de l'activité antiamebique des extraits de plante sur des modèles expérimentaux de l'amibiase**

À ce jour, il n'existe aucun modèle expérimental reproduisant le cycle complet du parasite et les lésions invasives de l'amibiase chez l'homme (**Tsutsumi and Shibayama, 2006 ; Bansal et al., 2009 ; Faust and Guillen, 2012**). Néanmoins, des modèles spécifiques ont été développés en fonction de l'organe cible visé par le parasite, de la sensibilité et la résistance de l'espèce animale. Ainsi, on distingue divers modèles expérimentaux de l'amibiase :

- le modèle intestinal qui est plus reproductible chez les rongeurs tels que les gerbilles de Mongolie (*Meriones unguiculatus*) et les souches de souris ayant une sensibilité vis-à-vis de l'infection à *E. histolytica*. Chez ces derniers, seules les premières étapes de l'invasion intestinale peuvent être investiguées, ceci en raison de la résorption spontanée des lésions intestinales et de la disparition des parasites (**Faust and Guillen, 2012**). Dans ce modèle, les trophozoïtes d'*E. histolytica* sont inoculés à travers le caecum. Au bout de 4 à 5 jours, par exemple, chez la souris de souche C3H/HeJ, on observe une production de l'inflammation hémorragique et des ulcères similaires à ceux décrits dans l'amibiase humaine (**Ghosh et al., 2000 ; Houpt et al., 2002**),

- le modèle hépatique largement mis en œuvre chez les hamsters qui développent facilement les abcès hépatiques (**Tsutsumi and Shibayama, 2006**). Chez cette espèce, les mâles sont très sensibles et produisent de gros abcès, avec des caractéristiques histologiques similaires à celles décrites chez l'homme. Les trophozoïtes d'*E. histolytica* sont inoculés soit directement dans le lobe hépatique ou par la veine porte puis les animaux sont laissés pendant une semaine pour le développement de l'infection (**Tsutsumi et al., 1984**). Les gerbilles sont aussi sensibles à l'amibiase hépatique malgré le fait que les trophozoïtes y montrent un comportement moins virulent que chez les hamsters (**Zhang et al., 1994 ; Tsutsumi and Shibayama, 2006**),
- le modèle *ex-vivo* qui a été établi sur des segments du côlon humain adulte et qui permet d'évaluer l'interaction entre les trophozoïtes d'*E. histolytica* et ces tissus au stade précoce de l'amibiase intestinale (**Bansal et al., 2009**). Tout récemment, un modèle a été décrit sur des explants du côlon du porc avec pour avantage qu'il pourrait aider à étudier simultanément le développement de lésions intestinales et extra-intestinales (**Girard-Misguich et al., 2011**). L'intérêt d'utiliser le porc repose en particulier sur les grandes similitudes entre l'homme et le porc par rapport à l'anatomie, la physiologie et la génétique.

### **I.2.3. Evaluation toxicologique des extraits de plantes**

L'évaluation toxicologique est essentielle dans le processus de développement des médicaments. Elle représente la charnière incontournable entre les essais précliniques et cliniques. La toxicité d'une substance se définit comme étant la mesure de sa capacité à provoquer des effets néfastes sur toute forme de vie, telle qu'un être humain, un microorganisme, une plante ou une sous-structure de cet organisme (**Schorderet, 1992**). La toxicité d'une substance peut être observée par l'étude des expositions accidentelles, les études *in vitro* utilisant des cellules ou lignées cellulaires et l'exposition *in vivo* sur des animaux de laboratoire.

La plupart des études toxicologiques indiquent que les effets toxiques dûs à l'utilisation de la médecine à base de plantes sont associés soit à une hépatotoxicité, soit aux effets toxiques sur les reins, les systèmes nerveux, immunitaire et cardiovasculaire (**Saad *et al.*, 2006a ; Chen and Vieira, 2010 ; Alferah, 2012**). De plus, les effets néfastes tels que la mutagénicité et la cancérogénicité des plantes médicinales ont également été publiés dans des revues médicales (**Soliman, 2001; Konan *et al.*, 2007; Sowemimo *et al.*, 2007; Akaneme and Amaefule, 2012**). De manière préventive, pour assurer la sécurité des médicaments à base de plantes, la preuve des effets indésirables peut être donnée en utilisant des tests *in vitro* et *in vivo*.

### **I.2.3.1. Evaluation *in vitro* de la toxicité des extraits de plantes**

L'évaluation *in vitro* de la toxicité des extraits de plantes médicinales représente la première phase de la procédure de l'analyse toxicologique. Elle est un outil puissant pour les études prédictives sur la toxicité des médicaments en industrie pharmaceutique. En général, on recourt aux techniques expérimentales standardisées sur des modèles de culture cellulaire afin de déterminer les effets indésirables des extraits de plantes.

#### **❖ Tests de cytotoxicité**

Ce test évalue la mort cellulaire ou dommage causé sur les cellules lors de leur incubation avec un composé chimique. La technique mise en oeuvre est basée sur l'extraction de composés actifs de plantes qui sont incubés à différentes concentrations avec des lignées cellulaires. Après exposition des cellules aux extraits de plantes, la cytotoxicité est évaluée par différentes méthodes telles que l'analyse microscopique de la morphologie cellulaire, l'évaluation de la viabilité par le test au bleu trypan, le test au méthyltetrazolium (MTT), la fixation du rouge neutre, la mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) (**Saad *et al.*, 2006b**).



❖ **Tests de mutagénicité et genotoxicité**

Ces tests permettent une prédiction sur l'impact génétique des extraits ou des composés testés sur la prochaine génération. En effet, ils évaluent les dommages potentiels causés par un composé sur l'ADN. Les formes les plus courantes de dommage ou de fixation de l'ADN sont :

- la mutation du gène conduisant au changement dans la séquence de bases : « *AMES Assay* ». Il s'agit d'un essai relativement simple évaluant la réversion de la mutation chez les bactéries et qui a été développé pour détecter les substances ou composés chimiques qui peuvent produire des altérations génétiques conduisant aux mutations génétiques (**Maron and Ames, 1983** in **Tejs, 2008**). Ce test utilise les souches bactériennes de *Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli* portant des mutations différentes sur les gènes nécessaires à la synthèse de l'histidine ou du tryptophane. En absence d'une source externe de cet acide aminé, les cellules ne peuvent pas se développer pour former des colonies. Lorsque les souches de bactéries sont cultivées sur une plaque de milieu minimum d'agarose contenant les traces de l'histidine ou de tryptophane, la reprise de la croissance des colonies en présence d'un composé testé est observée en cas d'une réversion de la mutation, ce qui traduit la reprise de la production d'histidine ou du tryptophane. Ainsi, seuls les composés mutagènes pourront provoquer une augmentation du nombre de colonies mutantes par rapport au témoin négatif. Le comptage des colonies mutantes permet de déterminer l'étendue de la mutagenèse induite par le composé mutagène suspecté. Le nombre de colonies révertantes par boîte augmente généralement de manière dose-dépendante (**Mortelmans and Zeiger, 2000**),
- les mutations chromosomiques responsables des modifications structurelles ou une aberration chromosomique *in vitro* : « *in vitro mammalian cell gene mutation assay* ». Ce test est parfois utilisé comme une variante du test d'AMES. Contrairement à ce dernier, au lieu des cellules bactériennes, il utilise un modèle des cellules de mammifères permettant

d'établir une distinction entre les mutations au niveau des gènes et des chromosomes (Oberly *et al.*, 1997). L'un des systèmes les plus couramment utilisés est le test *in vitro* de mutagenicité sur les cellules de lymphome de souris  $L5178Y^{TK+/-}$ . Ce test permet de détecter les mutations sur le locus de la thymidine kinase (TK) causée par des changements de paires de bases, du cadre de lecture et de délétions. Les cellules mutantes, déficientes en TK en raison d'une mutation préalable sur le locus TK ( $TK^{+/-}$  vers  $TK^{-/-}$ ), sont résistantes à l'effet cytotoxique des analogues de la thymidine comme la trifluorothymidine (TFT). Ainsi, la mutagenicité des composés testés est indiquée par l'augmentation du nombre de mutants après le traitement (Mitchell *et al.*, 1997),

- les mutations du génome induisant des altérations du nombre de chromosomes : «*Micronucleus Assay*». Le test du micro-noyau a émergé comme l'une des méthodes privilégiées pour l'évaluation des dommages chromosomiques, car il évalue à la fois de façon fiable la perte de chromosomes et les cassures chromosomiques (Fenech, 2000 ; Fenech, 2008). Ce test permet ainsi l'identification et l'analyse sélective de la fréquence des micronoyaux dans les cellules qui ont complété une mitose. Ce test aboutit à la détection de substances qui induisent la formation des micronoyaux dans le cytoplasme des cellules en interphase. Ces micronoyaux peuvent provenir de fragments acentromériques (fragments de chromosomes sans centromère) ou des chromosomes entiers qui sont incapables de migrer avec les autres lors de l'anaphase de la division cellulaire à cause de l'effet cytotoxique ou génotoxique du composé testé (Kirsch-Volders *et al.*, 1997). Le système couramment utilisé est « *Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN) assay* » dont le but est de détecter les composés qui modifient la structure des chromosomes et la ségrégation de manière à entraîner l'induction de micronoyaux dans les cellules en interphase (Kirsch-Volders *et al.*, 2011),

- les dommages causés sur l'ADN : « *COMET Assay* ». Le test des comètes est une technique électrophorétique sur microgel permettant la détection et la quantification des cassures simple et double du brin d'ADN, les sites labiles alcalins et les sites de réparation par excision-resynthèse dans des cellules eucaryotes individuelles exposées aux composés génotoxiques (Tice *et al.*, 2000). Le test des comètes est utilisé pour confirmer ou non les résultats positifs observés lors de la batterie de tests réglementaires cités ci-dessus. Il peut permettre de faire la distinction entre un cancérogène génotoxique (substance capable d'altérer le patrimoine génétique donc l'ADN avec perte ou gain de matériel génétique et une erreur de traduction) et un cancérogène épigénétique (substance pouvant causer des modifications de l'expression génique transmissibles d'une génération à l'autre sans altération des séquences nucléotidiques et avec un caractère réversible).

### **1.2.3.2. Evaluation *in vivo* de la toxicité des extraits de plantes**

L'évaluation *in vivo* de la toxicité est réalisée sur les animaux de laboratoire considérés proches de l'homme. C'est une étape clé de l'évaluation toxicologique permettant l'extrapolation des résultats vers l'homme. Ainsi, il est admis qu'un effet positif dans une étude *in vivo* de toxicité chez l'animal est révélateur d'un effet possible chez l'homme (OCDE, 2008a). En fonction de la dose, de la fréquence et de la durée d'administration, on distingue : la toxicité aiguë, la toxicité subaiguë ou subchronique et la toxicité chronique.

#### **❖ Toxicité par administration unique ou toxicité aiguë**

La toxicité aiguë se définit comme l'étude quantitative et qualitative des phénomènes toxiques pouvant résulter d'une administration de la dose unique d'une substance ou dans certains cas, les effets de plusieurs doses réparties sur 24 heures (Gennari *et al.*, 2004). L'évaluation de cette toxicité permet :

- de déterminer la dose létale 50 (DL<sub>50</sub>) qui est celle qui est capable de causer la mort de 50% d'une population animale donnée (Trevans 1927, Diener *et al.*, 1994). Cette valeur

qui caractérise la sensibilité de l'animal face à la substance dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels il y a le sexe, l'âge, le régime alimentaire et la voie d'administration **(Emerson et al., 1993)**,

- de définir la nature des effets toxiques observés et de donner des indications dans la mise en place des études de toxicité par administration répétée chez l'animal,
- de donner une indication sur les conséquences d'un surdosage aiguë chez l'homme après administration ou exposition.

La détermination de la DL<sub>50</sub> implique l'utilisation d'un grand nombre d'animaux et un taux de mortalité élevé. En raison de telles limites, des méthodes alternatives ont été développées. Ainsi, pour évaluer la toxicité aiguë d'une substance, on distingue les essais à dose létale tels que la méthode classique de toxicité aiguë «*Acute Toxic Class* » et la méthode de l'ajustement des doses «*Up-and-Down Procedure* » et l'essai à dose non létale défini par la méthode de la dose fixe «*Fixed Dose Procedure* » **(Gennari et al., 2004)**.

La méthode classique de toxicité aiguë est une procédure séquentielle dans laquelle trois animaux de même sexe (généralement des femelles) sont utilisés à chaque étape **(OECD, 2001a)**. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose donnée détermine l'étape suivante, c'est à dire soit l'arrêt de l'essai, soit l'administration de la même dose à trois animaux supplémentaires, soit enfin l'administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à trois animaux supplémentaires **(Diener et al., 1994 ; OECD, 2001a)**. Dans cette méthode, la substance d'essai est administrée à une dose unique aux animaux à jeûn. La première dose est choisie entre 5, 50, 300 et 2000 mg/Kg poids corporel. L'essai limite correspond à la dose de 2000 mg/Kg de poids corporel (exceptionnellement 5000 mg/Kg). Les animaux sont observés attentivement pendant les quatre premières heures et au quotidien pendant 14 jours. A l'issue de l'essai, tous les animaux devraient subir une autopsie générale **(OCDE, 2001a)**.

La méthode de l'ajustement des doses est une procédure adaptative pour mener des expériences dose-réponse ayant pour finalité un oui ou non (**Bruce, 1985 ; OECD, 2008b**). Dans cet essai, on applique une progression de doses uniques sur les animaux, un par un, à des intervalles d'au moins 48 heures. Le premier animal reçoit une dose située juste en dessous de la meilleure estimation de la  $DL_{50}$  et il est observé pendant 48 heures. En cas de survie, le second animal reçoit la dose correspondant à la dose initiale multipliée par un facteur de 3,2 ; en cas de mortalité, la dose administrée à l'animal suivant est divisée par le même facteur. Il convient d'observer chaque animal attentivement durant 48 heures au maximum avant de décider de poursuivre l'essai afin de définir la dose de traitement sur le prochain animal (**OECD, 2008b**). L'essai limite est séquentiel et réalisé sur cinq animaux au maximum et la dose expérimentale de 2000 mg/Kg, voire de 5000 mg/Kg dans des cas exceptionnels, peut être appliquée.

La méthode de la dose fixe est une procédure dont l'objectif vise à identifier la dose produisant des signes évidents de toxicité mais pas de mortalité (**OECD, 2001b**). Des groupes d'animaux (n=5) d'un seul sexe reçoivent des doses fixes de 5, 50, 300 et 2000 mg/Kg (exceptionnellement 5000 mg/Kg) selon une procédure séquentielle. La dose initiale, choisie sur la base d'une étude d'orientation est susceptible de provoquer des effets toxiques, sans causer des effets toxiques sévères ou la mortalité. En fonction de l'absence ou de la manifestation d'effets toxiques ou de mortalité, d'autres groupes d'animaux reçoivent des doses plus fortes ou faibles. La procédure se poursuit jusqu'à l'identification de la dose causant un effet toxique évident ou la mortalité d'un seul animal. Elle est également interrompue si la dose la plus forte n'entraîne aucun effet toxique ou si la mortalité est observée avec la dose la plus faible (**Van den Heuvel et al., 1990 ; OECD, 2001b**).

De manière générale, il est préconisé que l'évaluation de la toxicité aiguë soit réalisée sur au moins deux espèces de mammifères de souche identifiée (un rongeur et un non-rongeur)

et qu'au moins deux voies d'administration doivent être utilisées : une identique à celle prévue chez l'homme et la deuxième garantissant une exposition systémique à la substance testée (CDER, 1996 ; Diallo *et al.*, 2010).

❖ **Toxicité par administration répétée**

Le but de cet essai est de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou anatomo-pathologiques consécutives aux administrations répétées d'une substance testée et d'établir les conditions de l'apparition de ces altérations en fonction des doses et des rythmes d'administration. Cet essai permet de déterminer la dose maximale tolérable « *Maximun Tolerated Dose : MTD* » et la dose sans effet toxique observable « *No-Observed-Adverse-Effect-Level : NOAEL* » (Dorato and Engelhardt, 2005 ; Denny and Stewart, 2013). En fonction de la durée d'administration, on distingue : la toxicité subaiguë et/ou subchronique et la toxicité chronique.

La toxicité subaiguë ou toxicité à court terme c'est à dire d'une durée de 2 à 4 semaines ou de 3 mois (toxicité subchronique), permet de déterminer si la substance testée est tolérable aux doses multiples et de fournir une évaluation satisfaisante de la dose sans effet toxique (OECD, 2008c). La méthode utilisée pour sa mise en oeuvre est basée sur l'administration orale quotidienne de la substance testée pendant une période limitée. Pour la toxicité subaiguë, au moins 10 animaux (5 femelles et 5 mâles) doivent être utilisés pour chaque dose et trois groupes essais au moins. La substance testée est administrée soit par gavage, soit via la nourriture ou la boisson. Un essai limite à la dose de 1000 mg/Kg de poids corporel par jour peut être effectué si aucun effet n'est observé à cette dose au préalable (OECD, 2008c). Dans le cas de la toxicité subchronique, au moins 20 animaux (10 femelles et 10 mâles) doivent être utilisés pour chaque groupe d'essai (OECD, 1998).

La toxicité chronique ou toxicité à long terme est celle d'une durée de 6 à 12 mois, voire plus en fonction de la durée du traitement chez l'homme. Cet essai a pour but de faire des

prédictions des effets toxiques chroniques, de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action et de quantifier les limites d'innocuité du produit testé chez l'homme. Cet essai est essentiellement réalisé chez les rongeurs et au moins 20 animaux (10 femelles et 10 mâles) doivent être utilisés pour chaque groupe d'essai (**OECD, 2009**).

A l'issue de chaque essai de toxicité, les indicateurs de tolérance tels que les observations cliniques et fonctionnelles, le poids corporel, la consommation de nourriture/d'eau, les données d'hématologie et de biochimie clinique, ainsi que l'autopsie générale et l'histopathologie, sont utilisés pour apprécier la nature des effets toxiques (**Denny and Stewart, 2013**). Au cours des essais de toxicité ci-dessus cités, l'effet du produit testé doit être évalué en association sur les systèmes considérés sensibles tels que:

- la toxicité sur la fonction de reproduction permettant l'évaluation des effets néfastes pour la descendance ou des altérations sur la fécondité mâle ou femelle,
- la toxicité embryofœtale ayant pour but d'examiner les effets tératogènes possibles sur le produit de la conception, lorsque la substance testée est administrée à la femelle au cours de la gestation,
- le pouvoir mutagène *in vivo* dont l'intérêt majeur est de mettre en évidence *in vivo* le potentiel mutagène d'un produit qui n'aurait pas été détecté *in vitro*, faute des systèmes adéquats d'activation métabolique.

Bien qu'il y ait beaucoup d'exigences dans les études de toxicité à doses répétées destinées à soutenir les essais cliniques chez l'homme, la durée minimum suggérée des études diffère selon chaque organisme régional de régulation dans le monde. Par exemple, aux États-Unis et l'Union européenne, une étude de toxicité pendant deux semaines chez les rongeurs et/ou non-rongeurs peut supporter un essai clinique à dose unique ou à doses répétées à court terme chez l'homme, tandis qu'au Japon, une étude de toxicité chez les rongeurs pendant quatre semaines et deux semaines chez les non-rongeurs est suffisante pour soutenir l'essai clinique

de phase I (**Parkinson *et al.*, 1996 ; ICH, 2010 ; Denny and Stewart, 2013**). De même, selon l'OMS, une étude de toxicité à moyen terme est légalement suffisante pour les médicaments qui seront administrés à dose unique chez l'Homme (**WHO, 1993**).



**Chapitre II:**  
**Matériel & Méthodes**

## II.1. Matériel

### II.1.1. Matériel végétal

Pour cette thèse, les arbustes de *Codiaeum variegatum* ont été cultivés dans un jardin à Nsimeyong (Yaoundé) et dans un champ du village Mbankomo situé à une quinzaine de kilomètres de la ville de Yaoundé - Région du Centre - Cameroun. Les feuilles fraîches ont été récoltées, puis séchées à l'ombre à température ambiante. Les feuilles séchées ont été identifiées à l'Herbier National du Cameroun sous le numéro 33570 HNC (*Codiaeum variegatum*, **Blume, 1954**). Ces feuilles séchées ont été finement broyées et la poudre obtenue a été utilisée pour la préparation des extraits. La figure 10 ci-dessous présente une photographie de la plante étudiée.



**Figure 10** : *Codiaeum variegatum* (plante entière à gauche, feuilles à droite) (**Mfotie, 2011**)

### II.1.2. Culture cellulaire

#### II.1.2.1. Culture axénique d'*Entamoeba histolytica*

Les trophozoïtes d'*E. histolytica* de souche HM1-IMSS (*Humano Mexicano I: Instituto Mexicano del Seguro Social*) ont été cultivés dans des conditions axéniques à une température d'incubation de 37°C et dans le milieu TYI-S-33 supplémenté au sérum de bœuf et à la vitamine Diamond Tween 80 (**Diamond et al., 1978**). La culture des trophozoïtes d'*E. histolytica* a été effectuée dans des tubes en verre de 15 mL et le repiquage a été fait tous les trois jours pour

renouveler la culture et assurer une croissance exponentielle des trophozoïtes. La composition, le mode de préparation ainsi que la procédure de renouvellement du milieu de culture sont indiqués en annexe.

Pour l'essai *in vitro* de l'activité antiamebique, la préparation de la suspension d'*Entamoeba histolytica* a été réalisée dans un tube de culture lors de la phase logarithmique de croissance des trophozoïtes d'*E. histolytica*. En effet, on a vidé le milieu du tube puis les cellules ont été délicatement rincées avec 2 mL du nouveau milieu de culture. Après ajout de 5 mL du milieu, le tube a été plongé dans un bain de glace pendant 5 min pour favoriser le détachement des amibes. Enfin, on a homogénéisé le contenu du tube et on a prélevé 20 µL de ce contenu pour faire un comptage des trophozoïtes sur la cellule de Neubauer en utilisant un hémocytomètre. La concentration cellulaire de la suspension mère et le volume à prélever pour obtenir la suspension à la concentration désirée ont été déterminés.

#### **II.1.2.2. Culture des cellules de lymphome de souris (L5178Y)**

Les cellules de lymphome de souris *L5178Y* (CRL-9518) ont été cultivées en suspension à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> sur milieu RPMI 1640 supplémenté à 10% (v/v) de sérum de cheval, 1% (v/v) de L-glutamine (200 mM), 1% (v/v) de pyruvate de sodium (100 mM) et 0,4% (v/v) d'antibiotiques (50 U/mL péniciline et 50 mg/mL streptomycine) (**Beer et al., 1983**). La culture des cellules a été effectuée dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> et le passage des cellules a été fait une fois tous les 2 jours.

#### **II.1.2.3. Culture des cellules primaires hépatiques et du carcinome humain (HepG2)**

Les cellules hépatiques du carcinome humain *HepG2* (HB-8065) sont des cellules adhérentes qui se multiplient en monocouche à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> sur le milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contenant le glucose (1 g/L) et supplémenté à 10% (v/v) de sérum de veau foetal, 1% (v/v) de L-glutamine, 0,4% (v/v) de pyruvate de sodium (100 mM) et 1% (v/v) d'antibiotiques (50 U/mL péniciline et 50 mg/mL streptomycine) (**Knowles et al.,**

1980). La culture des cellules a été effectuée dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> et le passage a été fait une fois tous les 3 jours.

Les cellules primaires hépatiques ont été isolées par lavage du foie frais de rat (ZUC-Lrp<sup>fa</sup>) dans le tampon phosphate salin puis transférées dans 3 mL du milieu de culture ci-dessus. Le foie a été ensuite rapidement découpé en petits morceaux avec des ciseaux dans la glace. Les cellules primaires extraites ont été collectées par filtration sous filtre de pores 100 µm (Heidelberg, Germany) puis centrifugation à 1000 trs/min pendant 5 minutes à 4°C. Les cellules collectées ont été suspendues dans 1 mL du milieu de culture des cellules *HepG2* et la viabilité a été évaluée au bleu trypan.

#### **II.1.2.4. Culture des cellules cancéreuses du colon humain *Caco-2* (TC7)**

Les cellules cancéreuses du colon humain *Caco-2* (TC7) ont été cultivées en milieu DMEM supplémenté à 15% de sérum de veau foetal et de 1% d'acides aminés non essentiels. Ces cellules ont été incubées à 37°C avec 10% de CO<sub>2</sub> (Trainer *et al.*, 1988). Ces cellules ont été maintenues en culture par repiquages successifs une fois par semaine.

#### **II.1.3. Animaux d'expérience**

Les rats *Mus musculus* de souche *Wistar albino* utilisés dans l'évaluation de la toxicité *in vivo* ont été élevés à l'animalerie du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie. Ces animaux ont été soumis à une alimentation équilibrée et ont reçu de l'eau de robinet *ad libitum* tout au long de l'expérience. La composition de l'alimentation est indiquée en annexe.

#### **II.1.4. Réactifs**

Tous les réactifs utilisés au cours de ce travail sont de grade supérieur. Les méthodes de leur préparation sont résumées à l'annexe.

#### **II.1.5. Equipements**

Les équipements utilisés seront annoncés au fur et à mesure de la description de la méthodologie. Les détails sur la marque de chaque équipement utilisé sont indiqués en annexe.

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Bio-essai des extraits aqueux et détermination de l'efficacité des fractions bio-guidées sur une culture axénique d'*Entamoeba histolytica*

#### II.2.1.1. Bio-essai des extraits aqueux des feuilles de *Codiaeum variegatum*

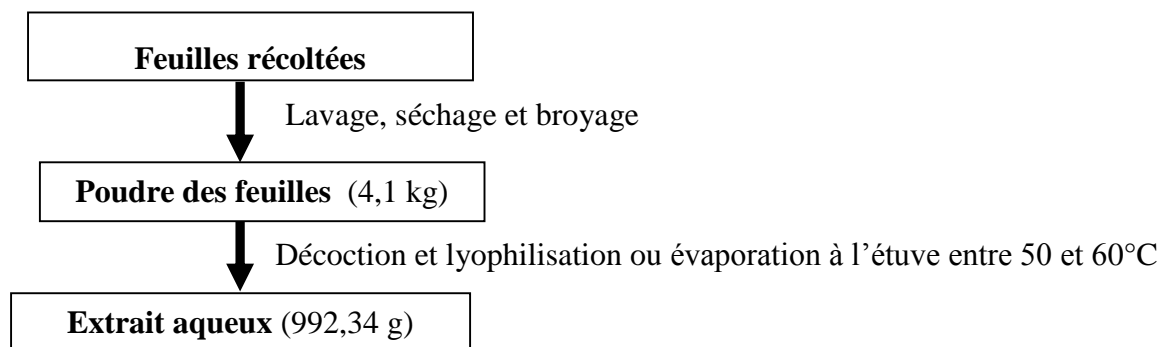
##### II.2.1.1.1. Préparation des extraits aqueux

Les feuilles de *Codiaeum variegatum* ont été récoltées selon les critères suivants :

- sites de récolte : champ (Mbankomo) et jardin (Nsimeyong),
- période de récolte : matin (06h), midi (12h), après-midi (18h) et minuit (24h),
- stade de croissance des feuilles : jeunes et vieilles feuilles (récoltées du champ).

**NB** : les jeunes et vieilles feuilles ainsi que les feuilles provenant du champ ou du jardin ont été toutes récoltées le matin.

Les différentes feuilles récoltées ont été lavées à l'eau courante puis rincées à l'eau distillée. Après un séchage à l'air libre à température ambiante, les feuilles ont été broyées à la moulinette. La poudre obtenue a été mélangée à l'eau distillée dans la proportion de 200 g pour 2 L d'H<sub>2</sub>O distillée et le mélange a été porté à ébullition (100°C) pendant 1 heure. Après refroidissement, le mélange a été filtré au papier filtre Whatman n°1 et le filtrat a été lyophilisé ou laissé à l'étuve entre 50°C et 60°C pour évaporation pendant 2 à 3 jours. Le résidu obtenu a constitué l'extrait aqueux. La figure 11 ci-dessous résume le protocole de préparation de l'extrait aqueux.



**Figure 11** : Protocole de préparation de l'extrait aqueux des feuilles de *Codiaeum variegatum*

En fonction des différents paramètres de récolte, 8 extraits aqueux ont été préparés selon le même protocole décrit ci-dessus :

- extrait des feuilles récoltées en champ (E<sub>1</sub>),
- extrait des feuilles récoltées au jardin (E<sub>2</sub>),
- extrait des feuilles récoltées le matin (E<sub>3</sub>),
- extrait des feuilles récoltées à midi (E<sub>4</sub>),
- extrait des feuilles récoltées dans l'après-midi (E<sub>5</sub>),
- extrait des feuilles récoltées à minuit (E<sub>6</sub>),
- extrait obtenu des jeunes feuilles (E<sub>7</sub>),
- extrait des feuilles récoltées des vieilles feuilles (E<sub>8</sub>).

#### **II.2.1.1.2. Essai *in vitro* de la mortalité des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica***

Dans une microplaque de culture de 48 puits, on a introduit dans chaque puits, 995 µL d'une suspension contenant  $5 \times 10^3$  trophozoïtes. La microplaque a été ensuite introduite dans un *genbag anaer* (charbon absorbant l'oxygène) pour une pré-incubation à 37°C pendant 2 heures pour laisser les cellules adhérer à la paroi. Cinq microlitres (5 µL) de l'extrait aqueux dissous dans du DMSO et testé aux concentrations 31,25 ; 62,5 ; 125 ; 250 et 500 µg/mL, ont été ajoutés dans chaque puits. La microplaque a été ensuite introduite dans un *genbag anaer* puis incubée à 37°C pendant 48 heures et 72 heures. Le métronidazole (aux concentrations 1,56 ; 3,12 ; 6,25 ; 12,5 et 25 µg/mL) a été utilisé dans les mêmes conditions lors de chaque essai comme témoin positif. En plus, il existe deux témoins négatifs pour chaque essai: le premier contenant 1 mL de la suspension et le second contenant 995 µL de la suspension et 5 µL de DMSO. La mortalité causée par chaque extrait a été évaluée par le test de viabilité au bleu trypan.

### II.2.1.1.3. Test de viabilité cellulaire au bleu trypan

#### a) Principe

La coloration au bleu de trypan est une méthode de coloration des cellules mortes. En effet, le bleu de trypan a tendance à pénétrer dans les cellules qu'il rencontre. Une fois dans la cellule, un mécanisme d'exclusion éjecte cette molécule dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules vivantes possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi, une cellule vivante expulse ce colorant et reste brillante au microscope, par contre une cellule morte ne disposant pas de moyen de le rejeter reste colorée en bleu (**Louis and Siegel, 2011**).

#### b) Mode opératoire

Après traitement et incubation des trophozoïtes d'*E. histolytica* avec l'échantillon testé, le milieu a été enlevé de la microplaque et 300 µL du bleu trypan (0,4%) dilué au 20<sup>ème</sup> ont été ajoutés dans chaque puits. La microplaque a été laissée à température ambiante pendant 5 min. Le dénombrement de trophozoïtes dans chaque puits a été effectué au microscope sous grossissement 200X, en utilisant la cellule de Neubauer. La moyenne des trophozoïtes pour chaque essai a été calculée sur le programme « Excel » de « Microsoft office » et le pourcentage de mortalité des trophozoïtes d'*E. histolytica* représentant l'activité antiamoebique a été déterminé par rapport au témoin négatif selon la formule suivante :

$$\% \text{ de mortalité} = \frac{N_c - N_E}{N_c} \times 100$$

$N_E$  : nombre de trophozoïtes dans le puits essai,

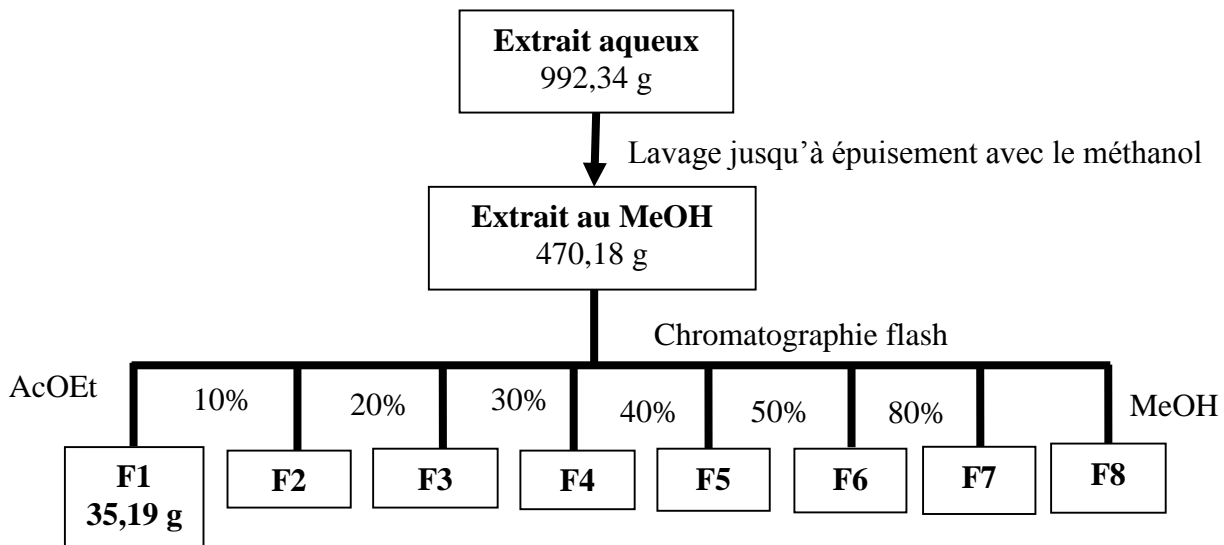
$N_c$  : nombre de trophozoïtes dans le puits témoin négatif (DMSO).

### II.2.1.2. Fractionnement bio-guidé de l'extrait aqueux des feuilles de *Codiaeum variegatum* sur les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica*

A l'issue de l'évaluation de l'activité antiamebique des différents extraits aqueux, l'extrait obtenu des vieilles feuilles recoltées le matin ayant présenté la meilleure efficacité ( $CE_{50}$  la plus faible) a été utilisé pour l'isolement des produits actifs.

#### II.2.1.2.1. Chromatographie flash de l'extrait aqueux des feuilles de *Codiaeum variegatum*

L'extrait aqueux (obtenu des vieilles feuilles recoltées le matin) a été épuisé avec du méthanol et le liquide recueilli a été concentré à l'évaporateur rotatif pour donner l'extrait au méthanol. Cet extrait a été partitionné par une chromatographie flash avec le système solvant acétate d'éthyle/méthanol de polarité croissante. La figure 12 ci-dessous représente la procédure de fractionnement de l'extrait aqueux.



**Figure 12 :** Chromatographie flash de l'extrait aqueux des feuilles de *Codiaeum variegatum*

**Légende :** F : fraction, AcOEt : acétate d'éthyle, MeOH : méthanol

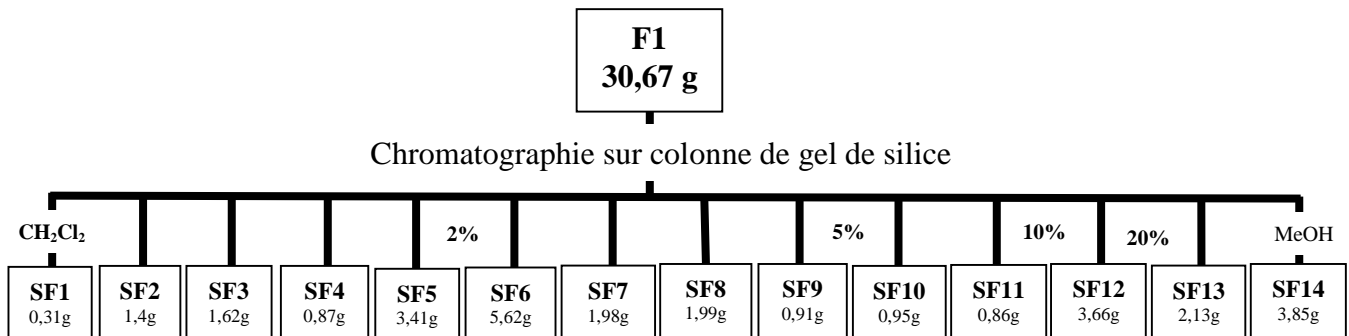
En fonction du solvant ou système solvant utilisé, huit fractions ont été obtenues. Il s'agit de la fraction F1 (AcOEt), de la fraction F2 (AcOEt/MeOH 10%), de la fraction F3 (AcOEt/MeOH 20%), de la fraction F4 (AcOEt/MeOH 30%), de la fraction F5 (AcOEt/MeOH 40%), de la fraction F6 (AcOEt/MeOH 50%), de la fraction F7 (AcOEt/MeOH 80%) et de la



fraction F8 (MeOH). Ces fractions ont été testées aux concentrations de 31,25 ; 62,5 ; 125 ; 250 et 500 µg/mL sur une culture axénique d'*E. histolytica* pendant 48 à 72 heures d'incubation et le pourcentage de mortalité des trophozoïtes d'*E. histolytica* a été évalué tel que décrit plus haut (II.2.1.1.2. et II.2.1.1.3).

#### II.2.1.2.2. Chromatographie sur colonne de la fraction acétate d'éthyle (F1)

Du fait que la fraction F1 (AcOEt) ait présenté une efficacité plus importante parmi toutes les autres fractions testées, elle a été par la suite partitionnée sur une colonne du gel de silice par le système solvant chlorure de méthylène/méthanol en utilisant un gradient de polarité croissante. Six systèmes solvants ont été utilisés : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (2%), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (5%), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (10%), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (20%), MeOH et plus d'une centaine d'échantillons (80 mL pour chaque) ont été collectés. Pour chaque échantillon, le solvant a été évaporé à l'évaporateur rotatif. Les résidus obtenus ont été regroupés en fonction de leur profil en chromatographie sur couche mince (CCM) avec révélation à l'ultra violet. La figure 13 décrit la procédure de fractionnement de la fraction F1.



**Figure 13** : Chromatographie sur colonne de gel de silice de la fraction acétate d'éthyle (F1)

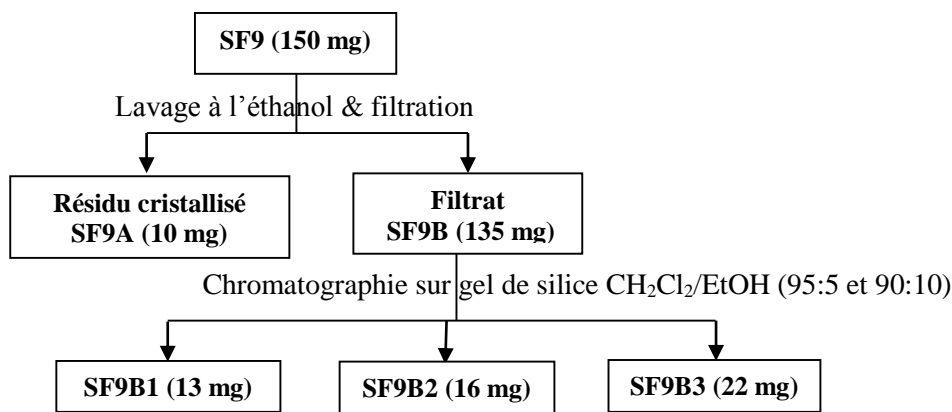
**Légende** : SF : sous-fraction, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : chlorure de méthylène, MeOH : méthanol.

Quatorze sous-fractions ont été obtenues selon les rapports frontaux en CCM. Ces fractions ont été testées aux concentrations de 15,62 ; 31,25 ; 62,5 ; 125 et 250 µg/mL sur une culture axénique d'*E. histolytica* pendant 48 heures à 72 heures d'incubation et le pourcentage

de mortalité des trophozoïtes d'*E. histolytica* a été évalué tel que décrit précédemment (II.2.1.1.2. et II.2.1.1.3).

### II.2.1.2.3. Isolement des composés ou mélanges de composés de la sous-fraction SF9

Grâce à son efficacité biologique élevée, la sous-fraction SF9 a été plus explorée par un lavage à l'éthanol et un fractionnement sur gel de silice couplé à un détecteur ultra-violet au seuil de détection de 0,2 et à la longueur d'onde de 254 nm. La figure 14 ci-dessous représente la procédure d'isolement des composés de la sous-fraction SF9. Les nouvelles sous-fractions ou produits isolés ont été testés aux concentrations de 1,56 ; 3,12 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 et 50 µg/mL sur une culture axénique d'*E. histolytica* pendant 24 heures à 48 heures d'incubation et le pourcentage de mortalité des trophozoïtes d'*E. histolytica* a été évalué tel que décrit précédemment (II.2.1.1.2. et II.2.1.1.3).



**Figure 14** : Séparation des composés ou mélanges de composés de la sous-fraction SF9

**Légende** : SF : sous-fraction, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : chlorure de méthylène, EtOH : éthanol.

### II.2.1.2.4. Analyse du profil chimique des composés ou mélanges de composés isolés de la sous-fraction SF9

#### a) Screening phytochimique de la sous-fraction SF9B

Le screening phytochimique est un test qualitatif qui révèle la présence des classes de composés dans un échantillon à travers la formation d'un précipité ou le changement de couleur selon la méthode décrite par **Trease and Evans, 1989**.

- **Test des triterpènes et stérols : test de Liebermann-Burchard**

Dans un tube à essai, on a dissous la sous-fraction SF9B dans du méthanol. A ce mélange, on a ajouté 0,5 mL d'anhydride acétique puis 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. Les terpénoïdes et leurs saponines donnent une coloration rouge-brique puis violette, bleue et finalement vert foncé. Quant aux stérols, leur coloration bleue vire rapidement au vert foncé.

- **Test des flavonoïdes**

Dans une solution de SF9B dissoute dans du méthanol, on a ajouté quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré et quelques grains du copeau de magnésium. La présence des flavonoïdes s'est traduite par une effervescence avec changement de coloration (bleu ou rouge brique).

- **Test des polyphénols**

Dans une solution de SF9B dissoute dans du méthanol, on a ajouté 3 gouttes d'une solution de cyanure ferrique fraîchement préparée (1 mL de FeCl<sub>3</sub> 1% et 1 mL de K<sub>3</sub>Fe(CN)). L'apparition d'une coloration bleu-vert a marqué la présence de polyphénols.

- **Test des sucres: test de Molish**

La sous-fraction SF9B a été dissoute dans une solution alcoolique d'alpha naphthol, on a laissé couler sur la paroi du tube à essai quelques gouttes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. La présence des sucres s'est traduite par la formation à l'interface d'un anneau rouge violacé.

- **Test des tanins**

Dans une solution de SF9B dissoute au méthanol, on a ajouté quelques gouttes de chlorure ferrique. La présence des tanins est marquée par un changement de la coloration de la solution.

**b) Chromatographie en phase Liquide à Haute Pression (CLHP) de la sous-fraction SF9B**

- **Principe de la CLHP**

La CLHP est une technique chromatographique utilisée pour séparer un mélange de composés en vue de l'identification, de la quantification ou de la purification des composants individuels d'un mélange. Elle est basée sur la pression exercée par un liquide (phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie. Après injection, le mélange à séparer se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne. En fonction de la phase stationnaire, les composants du mélange sont inégalement retenus lors de la traversée dans la colonne. De ce phénomène appelé rétention, il résulte que les composants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés. Le détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. Le temps de rétention (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté) caractérise qualitativement chaque composant. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque composé dans le mélange injecté.

- **Mode opératoire**

La sous-fraction SF9B a été dissoute dans du méthanol et 20  $\mu\text{L}$  du mélange ont été injectés dans l'appareil CLHP utilisant un détecteur GILSON 170 Diode Array Detector® avec des canaux allant de  $\lambda = 190$  à  $700$  nm. La détection a été faite à la longueur d'onde  $\lambda = 254$  nm. La phase stationnaire utilisée est une colonne de silice en phase inverse KROMASIL® C18. L'élution a été réalisée en mode isocratique avec le système solvant  $\text{H}_2\text{O}$  (35%)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (65%) coulant à un débit de  $0,8$  mL/min.

---

**c) Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) des composés ou mélanges de composés isolés de la sous-fraction SF9**

- **Principe de la RMN**

La RMN est la méthode de choix pour l'identification des composés isolés. Elle est basée sur le fait que les atomes d'hydrogène et de carbone peuvent dans un champ magnétique intense émettre un signal qui dépend de leur voisinage. Placés dans un champ magnétique extérieur, ils prennent par rapport à celui-ci certaines orientations bien définies auxquelles correspondent des niveaux d'énergie distincts. Bref, le spectre RMN d'une molécule permet de connaître le nombre d'hydrogène de cette molécule et la nature électronique du voisinage de ces hydrogènes (sur un cycle aromatique, sur une chaîne carbonée, sur un atome d'oxygène).

- **Mode opératoire**

On a dissous la sous-fraction ou le produit isolé (1-10 mg) dans 0,7 mL de DMSO deutéré et cette solution a été introduite dans un tube adapté à l'appareil (Bruker Avance 400 spectrometer). Les composés dissouts ont été ensuite soumis à un champ magnétique intense et les résonances ont été mesurées à la fréquence de 400 MHz pour les protons.

### **II.2.1.3. Analyses statistiques des résultats**

Tous les essais antiamebiotiques ont été réalisés en triplicat et toutes les données sont présentées en moyenne  $\pm$  écart type. Le test-*t* de *Student Newman Keuls* a été utilisé pour déterminer les valeurs du seuil de probabilité (*p*) pour les différences observées entre l'extrait et le témoin négatif par le logiciel *GraphPad InStat 3.0*. Les résultats ont été considérés comme significativement différents lorsque  $p < 0,05$ . La représentation graphique du pourcentage de mortalité en fonction des différentes concentrations de l'échantillon testé a permis de déterminer les concentrations efficaces 50 (CE<sub>50</sub>) par projection en utilisant le logiciel *Statgraphics Plus version 5.0*.

## **II.2.2. Détermination du mécanisme d'action de la sous-fraction active SF9B sur les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica***

Nous avons entrepris la détermination du mécanisme d'action de la sous-fraction SF9B à travers la caractérisation morphologique par une immunofluorescence indirecte de la lectine Gal/GalNAc et l'analyse transcriptomique des trophozoïtes traités par la technique RNA Seq.

### **II.2.2.1. Caractérisation morphologique des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* traités**

L'évaluation du changement morphologique a été effectuée par une observation microscopique des trophozoïtes en fonction du temps de traitement au composé actif SF9B2 ou à la sous-fraction active SF9B. Ensuite, l'immunofluorescence indirecte a permis la localisation de la lectine Gal/GalNAc, une protéine abondante à la surface d'*E. histolytica*.

#### **II.2.2.1.1. Observation microscopique des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* en fonction temps de traitement**

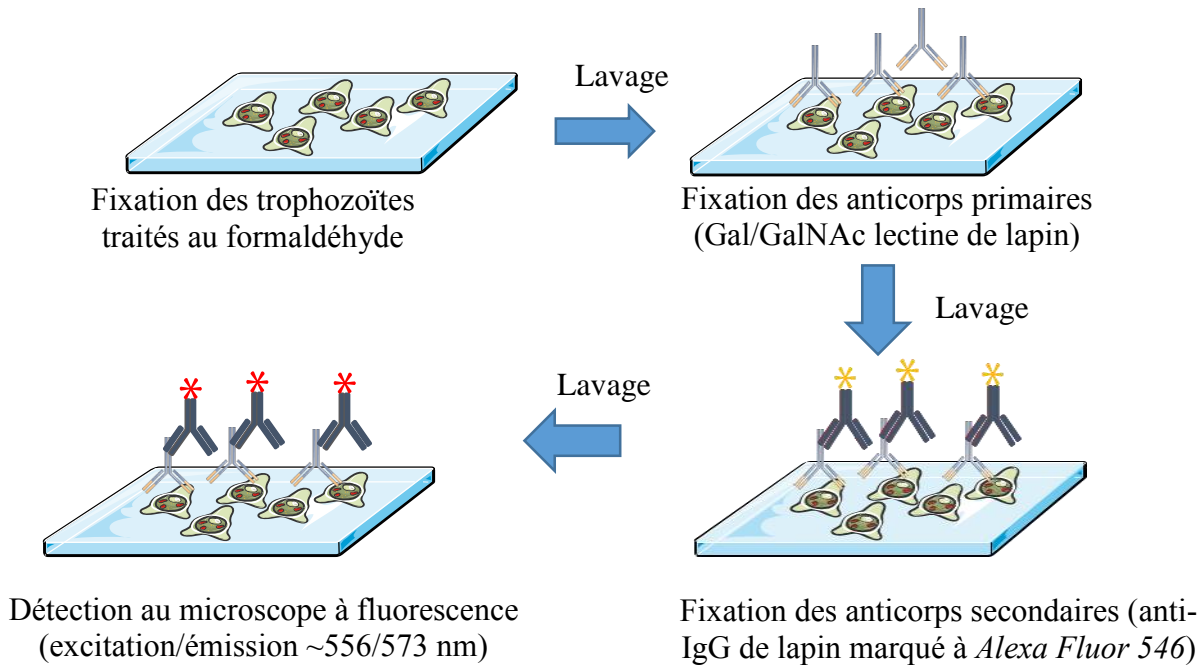
Dans chaque puits d'une microplaque (48 puits), on a introduit 995  $\mu\text{L}$  d'une suspension contenant  $5 \times 10^3$  trophozoïtes d'*E. histolytica*. Après 2 heures au repos à 37°C, on a ajouté 5  $\mu\text{L}$  de SF9B ou de SF9B2 pour obtenir respectivement des concentrations finales de 2,75  $\mu\text{g/mL}$  et 3,78  $\mu\text{g/mL}$  correspondant à leurs  $\text{CE}_{50}$ . La microplaque a été alors introduite dans un *genbag anaer* puis incubée à 37°C pendant 12 heures, 24 heures et 48 heures. La viabilité cellulaire a été évaluée au test au bleu trypan tel que décrit précédemment (II.2.1.1.3) et les parasites ont été observés au microscope pour leur morphologie.

#### **II.2.2.1.2. Immunofluorescence indirecte des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* traités à la sous-fraction active SF9B**

##### **a) Principe**

L'immunofluorescence indirecte est une technique d'immunomarquage, qui utilise des anticorps ainsi que des fluorochromes pour identifier principalement les échantillons biologiques. Elle est basée sur la spécificité de l'anticorps pour son antigène combinée à une

détection par un anticorps secondaire marqué à un composé fluorescent. Elle permet ainsi de cibler les biomolécules à l'intérieur ou à l'extérieur d'une cellule et par conséquent de visualiser la répartition de la molécule cible dans l'échantillon. La figure 15 ci-dessous représente le schéma de ce principe.



**Figure 15** : Principe de l'immunofluorescence indirecte de la Gal/GalNAc lectine d'*Entamoeba histolytica* (adapté du travail publié par **Arhets et al., 1998**)

### b) Mode opératoire

Le même essai décrit ci-dessus a été réalisé sur des *Lab-Tek® Chamber Slide System* (8 puits) avec une lame comme témoin (DMSO) et une lame essai (SF9B). Les lames *Lab-Tek®* ont été introduites dans un *genbag anaer* et incubées à 37°C pendant 12 heures. Après incubation, les trophozoïtes d'*E. histolytica* ont été fixés avec 1 mL de formaldéhyde 3,7% pendant 30 minutes. Après avoir retiré le formaldéhyde, on a introduit 1 mL de BSA/PBS 3% pour éviter toute fixation non spécifique. L'incubation a été poursuivie pendant 30 minutes à 37°C. Après lavage au BSA/PBS 1%, on a introduit 75 µL d'anticorps primaire Gal/GalNAc lectine de lapin (1:100 dilué dans du BSA/PBS 1%) et les lames ont été couvertes du papier

humidifié et du papier aluminium et l'ensemble a été incubé pendant une heure à 37°C. Les plaques ont été lavées deux fois avec du BSA/PBS 1%. Par la suite, 100 µL d'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin marqué à *Alexa Fluor 546* (1:200 dilué dans le BSA/PBS 1%) ont été introduits et incubés pendant 45 minutes à 37°C. A l'issue de l'expérience, les lames ont été lavées trois fois avec du tampon phosphate salin et le montage au *Vectashield* avec le diamino-2-phenylindole (DAPI) a été utilisé pour la coloration du noyau. Les lames ont été recouvertes des lamelles et après polymérisation du *Vectashield* pendant au moins 6 heures, elles ont été observées sous un microscope à fluorescence de marque *Olympus Optica*. Les images ont été prises au grossissement 600X.

#### **II.2.2.2. Evaluation de l'expression des gènes chez les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* traités à la sous-fraction active SF9B**

L'évaluation de l'expression des gènes sur les cellules *via* la mesure des taux d'ARNm a été depuis longtemps d'un intérêt capital car elle représente un outil important pour déterminer comment la machinerie transcriptionnelle de la cellule est affectée en présence de signaux externes, ou en fonction de l'état physiologique des cellules pour différencier entre un état sain et un état pathologique. L'analyse de l'expression des gènes d'*E. histolytica* a été effectuée par le séquençage du transcriptome par la technique RNA-Seq (Wang *et al.*, 2009).

##### **II.2.2.2.1. Analyse transcriptomique par la technique RNA-Seq**

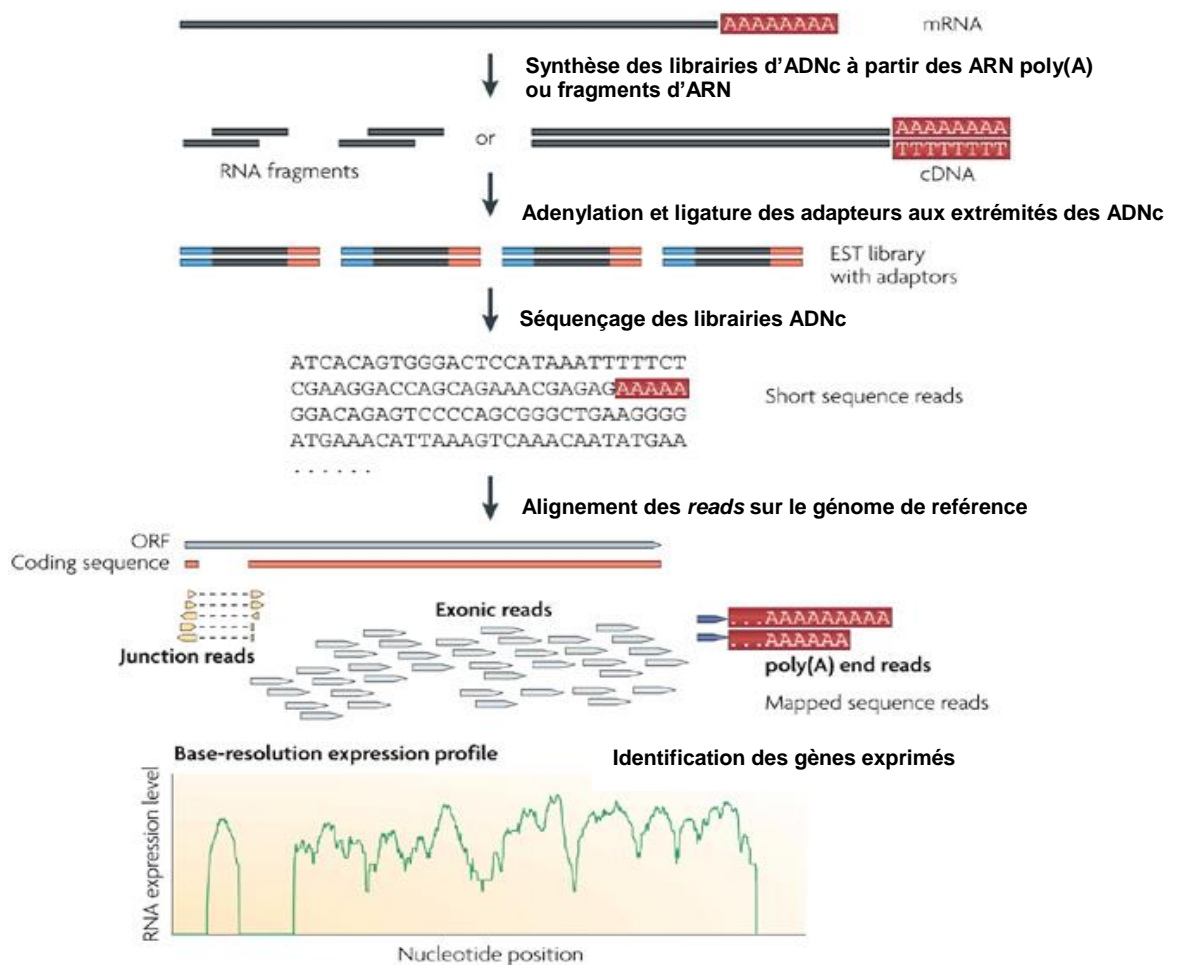
La RNA-Seq est une approche développée récemment pour définir le profil transcriptomique en utilisant une technologie avancée de séquençage. Les objectifs clés de la transcriptomique sont les suivants:

- le catalogage de toutes les espèces de transcription (ARNm, ARN non-codants et « *small* » ARNs),



- la détermination de la structure de la transcription des gènes, en fonction de leurs sites d'initiation, les extrémités 5' et 3', les modèles d'épissage et d'autres modifications post-transcriptionnelles,
- la quantification de l'évolution des niveaux d'expression de chaque gène transcrit au cours du développement et dans des conditions différentes (Wang *et al.*, 2009).

La figure 16 ci-dessous représente le principe de l'analyse transcriptomique par la technique RNA-Seq.



**Figure 16** : Principe de l'analyse du transcriptome par RNA-Seq (Wang *et al.*, 2009)

**Légende** : EST (*Expressed Sequence Tag*) est une courte portion séquencée d'un ADN complémentaire (ADNc), utilisée comme marqueur pour différencier les gènes entre eux dans une séquence ADN ; ORF (*Open Reading Frame*) correspond à un fragment codant dans lequel on ne trouve pas de codon-stop.

#### **II.2.2.2.2. Traitement et extraction des ARN totaux des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica***

Les trophozoïtes d'*E. histolytica* ( $1 \times 10^6$ ) ont été cultivés dans les tubes de 15 mL sur milieu TYI-S-33 à 37°C pendant 24 heures. Après ce temps, 2 tubes pour chaque condition ont été traités par ajout de 65 µL de la sous-fraction SF9B (2,75 µg/mL) ou du DMSO (0,5%) et incubés à 37°C pendant 12 heures et 24 heures. Les trophozoïtes traités ont été détachés en plaçant les tubes dans la glace pendant 5 minutes et récupérés par centrifugation à 5000 trs/min et à 4°C pendant 5 minutes avec lavage deux fois au tampon phosphate salin à froid. Chaque essai a été réalisé en triplicat dans les mêmes conditions.

Les trophozoïtes ont été lysés par ajout de 1,5 mL de trizol, suivi d'une homogénéisation au vortex et le mélange a été laissé au repos à température ambiante pendant 5 minutes. On a ajouté ensuite 300 µL de chloroforme et le mélange a été homogénéisé et laissé au repos à température ambiante pendant 5 minutes. Après centrifugation à 9500 trs/min à 4°C pendant 30 min, on a obtenu trois phases (une phase aqueuse : RNA ; une interphase : DNA et une phase organique : protéines et lipides). La phase aqueuse a été récupérée avec délicatesse pour éviter toute contamination et on y a ajouté 1,5 mL d'isopropanol et le mélange a été incubé à -20°C pendant environ 12 heures. Il s'est formé un précipité blanc constituant les ARNs totaux. On a procédé alors à une centrifugation à 9500 trs/min à 4°C pendant 30 minutes et le culot a été lavé à l'éthanol 75% (dilué dans l'H<sub>2</sub>O double distillée débarassée de RNase) et centrifugé à nouveau. On a récupéré délicatement l'éthanol et le culot a été incubé à 56°C pendant 30 minutes pour évaporer l'éthanol restant. Le culot a été suspendu à nouveau dans 100 µL d'H<sub>2</sub>O double distillée (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) et deux aliquotes de 1 µL chacun ont été utilisés pour l'analyse de la pureté et la quantification des ARN extraits. Pour la conservation à long terme, on a ajouté à la suspension restante 13,3 µL d'acétate d'ammonium (7,5 M) et 100 µL d'éthanol absolu et le mélange a été conservé à -20°C.

### II.2.2.2.3. Analyse de l'intégrité et quantification des ARN totaux

La détermination de toute contamination et la concentration de l'ARN ont été évaluées par dosage spectrophotométrique au biophotomètre (Eppendorf 6131) par comparaison des densités optiques à 230 nm, 260 nm et 280 nm puis la pureté et l'intégrité des ARN extraits ont été contrôlées par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%.

#### a) Lecture des densités optiques par spectrophotométrie

On a dilué 1  $\mu\text{L}$  de la suspension d'ARN totaux avec du  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  pour un volume final de 50  $\mu\text{L}$ . Le mélange a été introduit dans la cuve spectrophotométrique en quartz et les densités optiques ont été lues au biophotomètre aux longueurs d'onde 230 nm, 260 nm et 280 nm contre le blanc constitué d'  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ . Les rapports DO (260 nm)/DO (280 nm) et DO (260 nm)/DO (230 nm) sont déterminés de façon automatique pour évaluer respectivement la contamination aux protéines et à l'éthanol ou aux sels chaotropiques. Pour s'assurer de la pureté des ARN extraits :

- le rapport DO (260 nm)/DO (280 nm) doit être compris entre 1,8 et 2,
- le rapport DO (260 nm)/DO (230 nm) doit varier entre 2 et 2,2.

De plus, lors de la lecture au biophotomètre, la concentration des ARN totaux dans le mélange introduit dans la cuve spectrophotométrique est lue directement. La détermination de la quantité des ARN totaux dans chaque échantillon a été effectuée selon la formule ci-dessous:

$$(\text{ARN totaux})_{\text{échantillon}} (\mu\text{g}) = [\text{ARN dilué}]_{\text{lue}} \times 50 \times 100$$

50 correspond au volume (en  $\mu\text{L}$ ) de la solution diluée pour la lecture et 100 correspond au volume (en  $\mu\text{L}$ ) de la solution initiale.

#### b) Préparation du gel d'agarose 0,8%

On a pesé 0,4 g d'agarose (*Invitrogen*) qui a été mélangé à 50 mL du tampon Tris-Borate-EDTA (pH 8,0). Le mélange a été chauffé au four à micro-onde jusqu'à dissolution complète de l'agarose. On a ensuite coulé la solution d'agarose 0,8% sur une plaque avec un peigne et le gel a été laissé à température ambiante pendant 10 minutes pour solidification.

Enfin, le peigne a été récupéré laissant des puits qui serviront au dépôt des échantillons à analyser.

### **c) Electrophorèse sur gel d'agarose**

Le gel a été introduit dans une cuve d'électrophorèse et couvert du tampon Tris-Borate-EDTA (pH 8,0). Les échantillons des ARN totaux ont été dilués dans une solution de migration (*Gel loading dye blue 6X*). Le marqueur (*DNA 1 Kb ladder*) a été utilisé comme témoin. On a introduit 10  $\mu$ L de chaque échantillon dilué dans un puits du gel et on a laissé migrer à 120 volts pendant 20 minutes. Le gel a été récupéré et introduit dans une solution d'eau contenant 3 gouttes de bromure d'éthidium. Il a été trempé avec agitation dans cette solution pendant 10 minutes puis observé sous la lampe UV pour la visualisation des bandes. Les bandes des ARN 28S et 18S ont été observées par passage du gel sous lampe UV.

## **II.2.2.2.4. Génération des données par séquençage du transcriptome**

### **a) Purification de l'ARN poly(A)**

A partir de 10  $\mu$ g d'ARN totaux, on a purifié l'ARN poly(A) en utilisant une colonne dont la phase fixe est pourvue de billes magnétiques d'oligo (dT) selon les instructions du fabricant (*Thermo Scientific*). L'ARN poly(A) enrichi a été chimiquement fragmenté à ~ 100 pb (*Ambion*) et purifié avec le kit de nettoyage *RNeasy MinElute* (*Qiagen*) selon les instructions du fabricant. Les extrémités 5' des fragments d'ARN ont été homogénéisées en 5' OH par hydrolyse avec la phosphatase. Les fragments d'ARN ont été monophosphorylés à leurs extrémités 5' par une T4 polynucléotide kinase et purifiés à l'aide du kit de nettoyage *RNeasy MinElute* (*Qiagen*).

### **b) Construction des bibliothèques**

Les bibliothèques d'ADNc ont été construites selon le protocole décrit par le kit *TruSeq Small RNA Sample Prep* (*Illumina*). En effet, la synthèse du premier brin d'ADNc a été effectuée en utilisant la transcriptase reverse (*SuperScript II*) et des amorces. Le brin complémentaire

d'ADNc a été synthétisé en utilisant la DNA polymérase I après digestion du fragment d'ARN par la RNase (Levin *et al.*, 2010). Après la purification des fragments d'ADNc à l'aide du kit de nettoyage *RNeasy MinElute (Qiagen)*, les bouts contigus ont été convertis en bouts francs en utilisant la T4 DNA polymerase et la DNA polymerase « *Klenow* ». Après adénylation des extrémités 3', les fragments d'ADNc ont été ligaturés à leurs extrémités avec des adaptateurs. Chaque essai étant réalisé en triplicat pour quatre conditions de traitement (DMSO<sub>12h</sub> ; DMSO<sub>24h</sub> ; SF9B<sub>12h</sub> et SF9B<sub>24h</sub>), au total 12 librairies d'ADNc ont été obtenues et purifiées deux fois après PCR par immobilisation réversible en phase solide en utilisant le kit *Agencourt AMPure XP*. Pour contrôler la pureté des librairies d'ADNc, ces dernières ont été analysées au bioanalyseur 2100 (*Agilent Technologies*) à puces d'ADN de haute sensibilité en utilisant le kit *Agilent RNA 6000 Nano*.

### c) Séquençage des librairies

Le séquençage de librairies a été réalisé dans un thermocycleur *HiSeq 2000* (Illumina) dans un cadre asymétrique multiplex pendant 50 cycles en utilisant les kits *TruSeq SR Cluster v3 cBot HS* et *TruSeq SBS v3 HS* (Illumina). Après la génération de séquences courtes appelées « *reads* », les séquences d'adaptateur 3' ont été supprimées des différents *reads* en utilisant le logiciel *Cutadapt* (Marcel, 2011) et le logiciel *CASAVA version 1.7* (Illumina) a été utilisé pour l'alignement et le comptage des *reads* obtenus. Les fichiers de séquences générés ont été déposés à *European Nucleotide Archive* (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB3953>).

### d) Analyses statistiques des données

Les séquences « *reads* » ont été alignées sur le génome d'*E. histolytica* (AmoebaDB v1.7, <http://amoebadb.org/amoeba/>) avec le logiciel *Tophat version 2.0.6* (Trapnell *et al.*, 2009) pour déterminer les différents gènes qui correspondent avec le génome. Les gènes exprimés de manière différentielle chez les trophozoïtes traités à la sous-fraction active SF9B en comparaison au témoin (n = 3) pendant 12 heures ou 24 heures ont été identifiés à l'aide des

logiciels *Cuffdiff* version 2.0.2 (Trapnell *et al.*, 2013) et *DESeq* version 1.12.0 (Anders and Huber, 2010). Les gènes surexprimés ou réprimés ont été définis lorsque  $p < 5\%$  avec un taux d'expression  $\geq 2$  par rapport au témoin.

### **II.2.3. Evaluation *in vitro* et *in vivo* de la toxicité de l'extrait aqueux des feuilles de *Codiaeum variegatum* et de la sous-fraction active SF9B**

La toxicité *in vitro* de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active SF9B a été analysée par l'évaluation de la cytotoxicité, la quantification des dommages sur l'ADN et des altérations chromosomiques respectivement par les tests des comètes et des micronoyaux. De plus, le potentiel mutagène de ces substances a été évalué par test de mutation sur les cellules de lymphome de souris. Enfin, l'évaluation *in vivo* de la toxicité subchronique de l'extrait aqueux a été utilisée pour identifier les organes ou les systèmes sur lesquels la substance testée pourrait agir pour causer l'effet toxique.

#### **II.2.3.1. Evaluation de la cytotoxicité et des dommages sur l'ADN causés par l'extrait aqueux des feuilles de *Codiaeum variegatum* et la sous-fraction active SF9B**

##### **II.2.3.1.1. Test *in vitro* de la cytotoxicité**

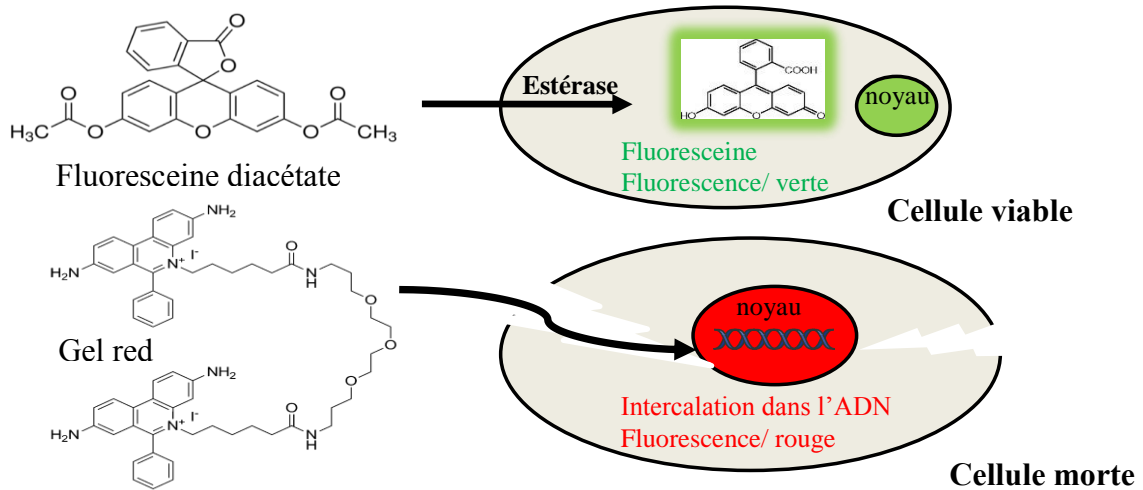
Les suspensions fraîches des cellules *L5178Y*, *HepG2* et *Caco-2* ont été préparées à partir de leurs cultures cellulaires respectives. La concentration cellulaire a été déterminée sur une cellule de Neubauer. On a introduit dans chaque puits d'une microplaque de 6 puits, 600.000 cellules pour un volume final de 3 mL du milieu de culture. Les cellules adhérentes *HepG2* ont été préincubées pendant 24 heures pour permettre leur adhésion et stabilisation dans le milieu. Les cellules *Caco-2* ont été laissées jusqu'à la confluence et l'essai a été réalisé sur les cellules différenciées obtenues 21 jours après la confluence. L'extrait aqueux et la sous-fraction active SF9B ont été dissous respectivement dans du tampon phosphate salin et du DMSO pour une concentration de 200 mg/mL et 100 mg/mL. Il est à noter qu'au delà de ces concentrations, l'extrait aqueux et la sous-fraction SF9B deviennent insolubles dans leurs solvants respectifs. Le méthyl méthanesulfonate (MMS), le cyclophosphamide (CP) et la staurosporine (STS) dissous dans le DMSO ont été utilisés comme témoins positifs respectivement sur les cellules *L5178Y*, *HepG2* et *Caco-2*.

Dans chaque puits d'une microplaque, on a ajouté 30  $\mu\text{L}$  de l'extrait aqueux ou de la sous-fraction active SF9B. Après homogénéisation, les plaques ont été incubées à 37°C avec 5%  $\text{CO}_2$  pendant 4 ou 24 heures. Après incubation, les cellules *L5178Y* ont été récupérées par centrifugation à 1000 trs/min pendant 5 min à 4°C, tandis que les cellules adhérentes (*HepG2* et *Caco-2*) préalablement incubées avec la trypsine-EDTA pendant 5 min ont été collectées après centrifugation à 1000 trs/min pendant 5 min à 4°C. Enfin, les cellules *L5178Y*, *HepG2* et *Caco-2* ont été resuspendues dans 3 mL du milieu de culture et la viabilité cellulaire a été évaluée soit par le test au bleu trypan (voir le test décrit au paragraphe II.2.1.1.3), soit par la technique de la fluorescéine diacétate/gel red.

**a) Principe du test de viabilité par la fluorescéine diacétate/gel red**

La fluorescéine diacétate est un ester non polaire qui traverse les membranes plasmiques et est hydrolysée par les estérases intracellulaires pour produire la fluorescéine libre. D'une part, les cellules viables ont la capacité d'incorporer la fluorescéine diacétate non fluorescente et de l'hydrolyser rapidement par l'estérase cytoplasmique en fluorescéine fluorescente, qui est confinée à l'intérieur des cellules qui ont une membrane plasmique intacte et peut être observée dans des conditions d'excitation appropriées (450-480 nm). D'autre part, les cellules non viables dépourvues de l'activité estérase ne sont pas fluorescentes. Ainsi, à cause de la membrane défectueuse des cellules non viables, le gel red peut pénétrer dans ces dernières et s'insérer dans l'ADN. Les cellules viables seront donc colorées en vert vif, tandis que les cellules non viables seront en rouge vif (**Jarnagin and Luchsinger, 1980**). La figure 17 ci-dessous illustre le principe du test de la viabilité cellulaire par la méthode fluorescéine/gel red.





**Figure 17** : Principe du test de la viabilité cellulaire par la méthode de la fluorescéine diacétate/gel red (Adapté du travail publié par **Jarnagin and Luchsinger, 1980**)

### b) Mode opératoire

On a mélangé 70  $\mu\text{L}$  de la suspension cellulaire avec 30  $\mu\text{L}$  de la solution stock de coloration (voir annexe). Après homogénéisation, on a prélevé 20  $\mu\text{L}$  du mélange qu'on a déposé sur une lame qu'on a recouverte ensuite d'une lamelle pour lecture au microscope à fluorescence sous filtre FITC (450-490 nm). On a dénombré les cellules viables (vertes) et les cellules mortes (rouges) sur  $3 \times 100$  cellules comptées par lame.

#### II.2.3.1.2. Test *in vitro* des comètes

Ce test est utilisé pour évaluer les cassures causées sur l'ADN des cellules lors du traitement par un agent génotoxique.

##### a) Principe

Le principe de ce test repose sur la microélectrophorèse de noyaux de cellules isolées dans les conditions alcalines, sur gel d'agarose fixé sur des lames de microscope. En effet, il s'agit de combiner l'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose et la microscopie à fluorescence pour visualiser la migration des brins d'ADN de chaque cellule noyée dans l'agarose. Lorsque l'ADN chargé négativement contient des cassures, l'ADN super-enroulé se relaxe et les

extrémités brisées migrent vers l'anode lors d'une brève électrophorèse. Par contre, lorsque l'ADN n'est pas endommagé, l'absence des extrémités libres et la grande taille des fragments empêchent la migration. La détermination de la quantité relative d'ADN ayant migré permet de mesurer le nombre de cassures sur l'ADN dans une cellule individuelle (Singh *et al.*, 1988 ; Olive and Banáth, 2006).

## **b) Mode opératoire**

### **b.1) Traitement des cellules et dépôt des gels sur les lames**

Les lignées cellulaires (*HepG2* et *L5178Y*) et les cellules primaires hépatiques du rat ont été traitées tel que décrit dans le test *in vitro* de la cytotoxicité (II.2.3.1.1). A l'issue du traitement, les cellules ont été récupérées par centrifugation à 1000 trs/min pendant 5 min à 4°C, puis suspendues dans 0,5 mL du milieu de culture frais. La suspension a été conservée dans de la glace. Dans des tubes eppendorf (0,5 mL) préchauffés sur une plaque à 37°C, on a introduit 180 µL d'agarose de point de fusion bas (0,5%). Après avoir homogénéisé la suspension cellulaire au vortex, 20 µL ont été prélevés et ajoutés dans l'agarose, le mélange a été à nouveau homogénéisé puis 45 µL ont été déposés sur des lames couvertes au préalable d'agarose de point de fusion haut (1,5%). Ces lames ont été recouvertes des lamelles (21×26 mm) et deux lames ont été préparées pour chaque échantillon.

### **b.2) Lyse cellulaire et déroulement de l'ADN**

Après solidification de l'agarose de point de fusion bas, les lamelles ont été délicatement enlevées et les lames ont été introduites dans une cuvette contenant une solution de lyse ((NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 100 mM, 1% Sarcosinate de sodium), 10% DMSO et 1% Triton X-100) puis la cuvette a été incubée pendant au moins une heure à 4°C. Ce qui a permis la destruction de la matrice extracellulaire et de la membrane nucléaire. Les lames ont été ensuite rincées à l'eau distillée à la suite de l'étape de lyse puis déposées dans la cuve électrophorétique. Le déroulement de l'ADN a été effectué dans le tampon d'électrophorèse (NaOH 5 M, EDTA

200 mM, pH>13) pendant 20 min. Le pH élevé du tampon permet la visualisation des coupures simple-brin et l'expression des sites alcali-labiles.

### **b.3) Electrophorèse et neutralisation**

Les lames ont été couvertes par le tampon ci-dessus et soumises à une électrophorèse pendant 20 min, sous une tension de 25 V avec l'ampérage ajusté 300 mA par ajout ou retrait du tampon. Les molécules d'ADN et les fragments libres chargés négativement du fait des groupements phosphates externes migrent alors vers l'anode, permettant d'obtenir les figures caractéristiques de comètes.

Les lames ont été introduites dans le tampon de Tris (0,4 M et pH 7,5) pendant 5 min. Cette étape est importante pour la lecture car elle permet de rétablir des appariements ponctuels des brins d'ADN. Les lames ont été ensuite transférées dans une cuvette de méthanol à -20°C pendant 5 min, pour la fixation des cellules. Enfin, elles ont été séchées dans un incubateur à 37°C pendant 10 min.

### **b.4) Coloration et évaluation des comètes**

Les noyaux ont été colorés en déposant 20 µL de la solution de gel red/1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) (1:4 (v/v)) sur chaque lame. Les lames ont été recouvertes de lamelles et lues au grossissement 200X d'un microscope à fluorescence Labophot-2 (Nikon, Allemagne) équipé d'un filtre TRITC et relié à une caméra et à un ordinateur. En utilisant le logiciel *Komet 5* (BFI Optilas, Allemagne), on a analysé 50 cellules situées au centre du gel sur chaque lame. L'analyseur d'image *Komet 5* mesure les paramètres tels que l'aire (en µm<sup>2</sup>) de la cellule, la proportion de l'ADN dans la tête « *Head DNA* » et la proportion d'ADN présente dans la queue « *Tail DNA* ».

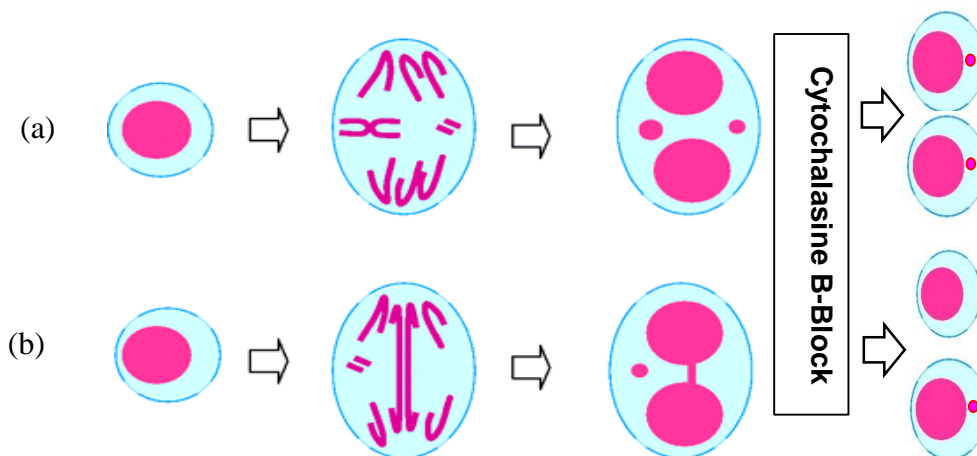
A l'issue de l'évaluation des comètes, les graphes ont été générés en utilisant le logiciel « *Analysis Macro 2000* » représentant la proportion d'ADN présente dans la queue (moyenne ± écart-type) en fonction des différentes concentrations de l'échantillon testé.

### II.2.3.1.3. Test *in vitro* des micronoyaux

Ce test permet d'évaluer les altérations chromosomiques chez les cellules traitées par un agent génotoxique.

#### a) Principe

Ce test est basé sur la détection et la quantification des fragments de chromosomes ou des chromosomes entiers, disloqués lors de la mitose. En effet, le traitement des cellules par une substance génotoxique entraîne une perturbation de la migration des chromosomes entiers ou une cassure des chromosomes lors de la séparation au cours de l'anaphase de la division cellulaire. Les chromosomes ou leurs fragments issus de ce dysfonctionnement pendant la mitose apparaissent au final chez les cellules filles à côté des noyaux principaux sous forme de micronoyaux. La formation des micronoyaux ne pouvant se faire que chez les cellules ayant accompli un cycle de division nucléaire, l'utilisation d'un inhibiteur de la cytokinèse (la cytochalasine B) permet d'observer l'effet génotoxique tout en évaluant la prolifération des cellules en présence de la substance testée. Ainsi, la fréquence d'apparition des micronoyaux et l'indice de prolifération de la cytochalasine B (CBPI) indiquent l'étendue de l'effet génotoxique de la substance utilisée (Fenech *et al.*, 2011). La figure 18 ci-dessous décrit le principe du test des micronoyaux en présence ou en absence de la cytochalasine B.



**Figure 18** : Formation des micronoyaux (a) et ponts nucléoplasmiques (b) chez les cellules traitées à la cytochalasine B pendant la division nucléaire (Fenech *et al.*, 2011)

## **b) Mode opératoire**

### **b.1) Traitement des cellules**

Pour le test des micronoyaux, nous avons utilisé les cellules de lymphome de souris (*L5178Y*) et les cellules hépatiques du carcinome humain (*HepG2*). Dans chaque puits d'une microplaque (6 puits), on a introduit 600.000 cellules pour un volume final de 3 mL. On y a ajouté 30 µL de l'extrait aqueux ou de la sous-fraction active SF9B, dissous dans du tampon phosphate salin ou du DMSO respectivement. Les témoins positifs MMS et CP dissous dans du DMSO ont été utilisés à la concentration de 200 µM et 2,5 mM respectivement. Les microplaques ont été incubées à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> pendant 4 et 24 heures, temps au bout duquel les cellules ont été récupérées par centrifugation à 1000 trs/min pendant 5 min. Elles ont été suspendues dans 3 mL du milieu de culture puis transférées dans les microplaques. Après ajout de 18 µL de cytochalasine B, les microplaques ont été incubées à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> pendant 20 heures pour les cellules *L5178Y*. Quant aux cellules *HepG2*, elles ont été incubées pendant 40 heures sans ajout de la cytochalasine B car elles ne tolèrent pas la présence de la cytochalasine B. Ensuite, les cellules des deux lignées ont été récupérées à nouveau par centrifugation à 1000 trs/min pendant 5 min et resuspendues dans 3 mL du milieu de culture. Enfin, elles ont été conservées dans de la glace.

### **b.2) Coloration et comptage des micronoyaux**

Environ 40.000 cellules ont été fixées sur des lames par centrifugation à 1000 trs/min pendant 5 min à l'aide de la cyto centrifugeuse (*CytoSpin 3*). Ces lames ont été incubées dans du méthanol à -20°C pendant au moins 2 heures, après elles ont été récupérées puis laissées quelques minutes pour évaporation du méthanol et ont reçu 20 µL de la solution gel green (1 :100, (v/v)). Ces lames ont été ensuite couvertes des lamelles (21×26 mm) et incubées à l'obscurité pendant 7-8 min puis lavées au tampon phosphate salin pour enlever les lamelles et

la solution de coloration. Les lames ont été montées avec 20 µL de DABCO et couvertes des lamelles pour l'évaluation des micronoyaux.

L'évaluation des micronoyaux a été effectuée au grossissement 400X du microscope à fluorescence en utilisant le filtre fluoresceine isothiocyanate (FITC). Le cytoplasme des cellules est coloré en rouge et les noyaux en jaune. On a compté par lame, 1000 cellules en distinguant les cellules mononuclées, binuclées, multinuclées, les cellules en mitose, les cellules apoptotiques et les cellules binuclées ou multinuclées ayant un, deux ou plusieurs micronoyaux. Ainsi, on a calculé l'indice de prolifération à la cytochalasine B (CBPI : *Cytochalasin B Proliferation Index*) (Fenech, 2000).

$$CBPI = \frac{(1 \times MN) + (2 \times BN) + (3 \times MuN)}{MN + BN + MuN}$$

(MN : nombre de cellules mononuclées ; BN : nombre de cellules binuclées ; MuN : nombre de cellules multinuclées)

La CBPI renseigne sur l'effet inhibiteur de la division cellulaire par la substance testée. L'évaluation de l'effet génotoxique est effectuée par comptage des micronoyaux sur 1000 cellules binuclées.

#### II.2.3.1.4. Test *in vitro* de l'effet mutagène sur des cellules de mammifères

Ce test permet de mesurer la fréquence de mutations sur le locus de la thymidine kinase (TK) chez les cellules de lymphome *L5178Y* de souris et de définir le potentiel mutagène d'une substance.

##### a) Principe

Ce test est basé sur la détection sur un milieu de culture sélectif des mutations éventuelles qui peuvent affecter le locus de la thymidine kinase (TK) chez les cellules de lymphome *L5178Y* de souris au cours d'un traitement avec une substance. En effet, les cellules déficientes de ce locus en raison de la mutation TK<sup>+/-</sup> vers TK<sup>-/-</sup>, sont résistantes aux effets cytotoxiques de la trifluorothymidine (un analogue de la thymidine) car elles ne peuvent pas

l'incorporer dans leur ADN. Par contre, les cellules ayant conservé leur locus TK sont capables d'incorporer la TFT dans leur ADN. Ceci a pour conséquence l'inhibition du métabolisme cellulaire et l'arrêt de la division cellulaire. Ainsi, il en résulte une prolifération des cellules mutantes en présence de la TFT, tandis que la croissance des cellules normales contenant le locus TK est inhibée (Clive and Spector, 1975; Cole *et al.*, 1999).

## **b) Mode opératoire**

### **b.1) Culture et traitement des cellules *L5178Y***

Les cellules du lymphome *L5178Y* de souris ( $4 \times 10^6$ ) ont été tout d'abord nettoyées de toute mutation spontanée par une culture à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> dans 20 mL du milieu R10 contenant 600 µL du milieu THMG (Thymidine, Hypoxanthine, Methotrexate et Glycine). Après 24 heures d'incubation, les cellules ont été récupérées par centrifugation à 800 trs/min pendant 10 minutes et suspendues dans du milieu R10. La concentration cellulaire a été déterminée sur la cellule de Neubauer et on a prélevé à nouveau  $4 \times 10^6$  cellules qu'on a cultivées à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub>, pendant 24 heures, dans 20 mL du milieu R10 contenant 600 µL du milieu THG (Thymidine, Hypoxanthine et Glycine). Les cellules ont été récupérées par centrifugation à 800 trs/min pendant 10 minutes puis suspendues dans un milieu R5 et le nombre de cellules a été déterminé sur la cellule de Neubauer (voir la composition des milieux de culture R5 et R10 en annexe).

Dans des flacons de culture de 25 cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-one GmbH, Germany), on a introduit  $10^6$  cellules dans 5 mL du milieu R5 et 50 µL de la substance d'essai aux différentes concentrations. L'extrait aqueux ou la sous-fraction SF9B a été dissous respectivement dans du tampon phosphate salin ou du DMSO considéré comme témoins négatifs, tandis que le MMS dissous dans du DMSO est utilisé comme témoin positif aux concentrations de 100 µM et 50 µM respectivement pendant 4 et 24 heures de traitement. Les cellules ont été récupérées par

centrifugation à 800 trs/min à 4°C pendant 10 minutes puis suspendues dans 5 mL du milieu R10. La concentration cellulaire a été également déterminée sur la cellule de Neubauer.

### **b.2) Fixation des cellules traitées dans le gel d'agarose**

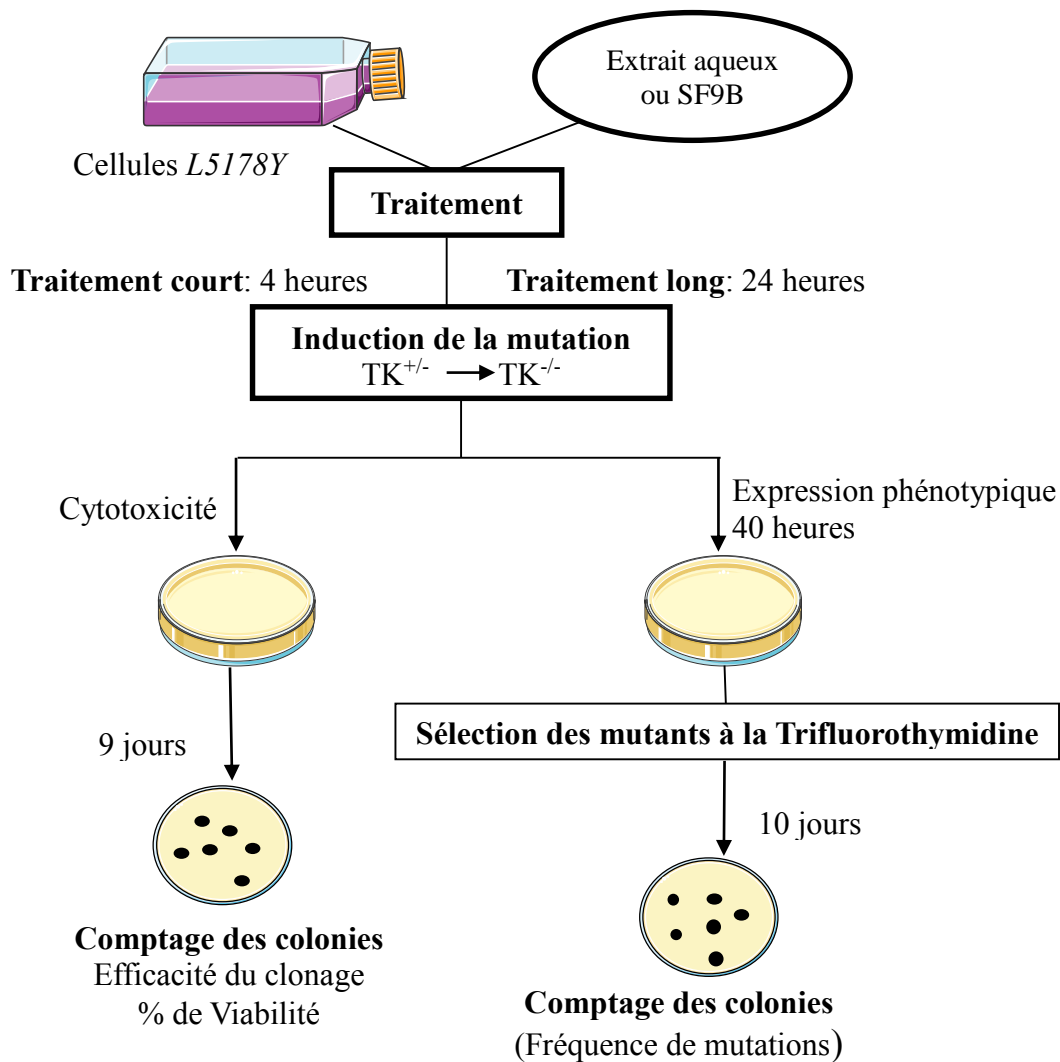
Pour chaque traitement, on disposait de : deux flacons de culture contenant respectivement 90 mL (flacon « V ») et 43 mL (flacon « M ») du milieu R10, d'un tube eppendorf avec 15,7 mL du milieu R10, de deux boîtes de Pétri (Sarstedt, USA) pour la sélection des colonies mutantes (boîte « M ») et de trois boîtes de Pétri (Sarstedt, USA) pour l'évaluation de la viabilité (boîte « V »). L'agarose a été préparé à la concentration de 3,5% autoclavé à 121°C pendant 30 minutes puis conservé à 65°C dans un incubateur. On a ajouté ensuite 4,5 mL et 9 mL d'agarose 3,5% respectivement dans les flacons « M » et « V ». Par la suite, on a introduit 500.000 cellules traitées à la substance d'essai dans le flacon « M ». Après homogénéisation, on a prélevé 1 mL (~ 10.000 cellules) qu'on a introduit dans le tube eppendorf contenant 15,7 mL du milieu R10. Le mélange a été homogénéisé et on a prélevé 1 mL (~ 600 cellules) de ce mélange qu'on a transféré dans le flacon « V ». Les contenus des flacons « M » et « V » ont été respectivement coulés dans les boîtes de Pétri « M » et « V » qu'on a laissées sous poste de sécurité microbiologique (PSM) à la température ambiante pendant 1 heure. Après solidification de l'agarose, les boîtes de Pétri « M » ont été incubées à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> pendant 40 heures pour permettre l'expression phénotypique des cellules. Pour les boîtes de Pétri « V », elles ont été incubées à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> et le comptage des colonies a été effectué 9 jours après fixation des cellules dans le gel d'agarose.

### **b.3) Sélection des colonies mutantes sur milieu sélectif**

Après l'expression phénotypique, on a ajouté dans chaque boîte de Pétri « M », 15 mL du milieu de culture sélectif contenant de la trifluorothymidine (concentration finale : 3 µg/mL) et de l'agarose 3,5%. Les boîtes de Pétri ont été laissées pendant 1 heure sous PSM puis elles ont été incubées à nouveau à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub>. Le comptage des colonies a été effectué 10



jours après ajout du milieu de culture sélectif pour les boîtes de Pétri « M ». La figure 19 ci-dessous indique le protocole expérimental d'évaluation de la mutation.



**Figure 19** : Protocole expérimental d'évaluation *in vitro* de l'effet mutagène chez les cellules de lymphome *L5178Y* de souris (Adapté du travail publié par Clive and Spector, 1975)

#### b.4) Evaluation de l'efficacité du clonage et de la fréquence de mutations

Au terme de l'essai, la détermination de l'effet mutagène de l'extrait aqueux ou de la sous-fraction SF9B a été effectuée après comptage des colonies survivantes et mutantes en comparaison au témoin négatif. Ainsi, les paramètres tels que la viabilité ou le pourcentage de survie, l'efficacité du clonage et la fréquence de mutations ont été déterminés selon les formules ci-dessous.

$$\text{Viabilité (\%)} = \frac{\sum \text{Colonies survivantes (essai)}}{\sum \text{Colonies survivantes (témoin)}} \times 100$$

$$\text{Efficacité du Clonage (EC)} = \frac{\sum \text{Colonies survivantes}}{600} \times 100$$

$$\text{Fréquence de Mutations (mutants/10}^6 \text{ cellules)} = \frac{\sum \text{Colonies mutantes}}{(\text{EC} \times 0,5)}$$

### II.2.3.2. Evaluation *in vivo* de toxicité subchronique de l'extrait aqueux des feuilles de *Codiaeum variegatum*

#### II.2.3.2.1. Traitement des animaux

Quarante-huit (48) rats mâles et femelles (*Mus musculus* de souche *Wistar albino*) âgés de 6 à 7 semaines et pesant entre 170 et 210 g ont été repartis uniformément selon leur poids. En fonction du sexe, les rats ont été repartis en 4 groupes de 6 individus chacun et ils ont été laissés à l'animalerie pendant une semaine pour acclimatation. Pendant 4 semaines, les rats ont été gavés quotidiennement par administration orale grâce à une sonde endogastrique aux différentes doses de l'extrait aqueux des feuilles de *C. variegatum* en fonction de leur groupe:

- Groupe I (témoin) : eau distillée,
- Groupe II : 50 mg/Kg de poids corporel,
- Groupe III : 100 mg/Kg de poids corporel,
- Groupe IV : 200 mg/Kg de poids corporel.

Les solutions à administrer ont été préparées dans l'eau distillée et administrées à raison de 10 mL/Kg de poids corporel. Pendant le traitement, la consommation alimentaire, la variation du poids et la mortalité ont été enregistrés. Au terme du traitement, les rats ont été sacrifiés après anesthésie à l'éther, par section cervicale, du sang a été collecté dans un tube sec. Ce sang a été laissé dans de la glace pendant 1 à 2 heures puis il a été centrifugé à 5000

trs/min pendant 10 min, le surnageant (sérum) a été récupéré et stocké en 2 aliquots à -20°C pour les analyses biochimiques. Les reins, le foie, les poumons, le cœur, la rate ainsi que les organes génitaux tels que la prostate, les vésicules séminales, les testicules, les épидидymes (chez les rats mâles) ou les ovaires et l'utérus (chez les rats femelles) ont été excisés, nettoyés dans du NaCl 0,9%, essorés sur papier buvard et pesés. Le foie a servi à la préparation des homogénats à 20% dans du tampon Tris 50 mM, KCl 150 mM (pH 7,4). En effet, le foie a été broyé dans un mortier avec de la glace puis le broyat a été centrifugé à 5000 tours/min pendant 30 min, le surnageant a été stocké en deux aliquotes à -20°C pour le dosage des protéines hépatiques.

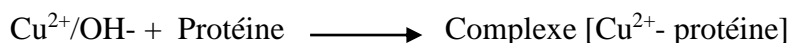
#### II.2.3.2.2. Dosage des marqueurs biochimiques

##### a) Dosage des protéines sériques

Les protéines sériques ont été dosées par la méthode de Biuret (**Gornall *et al.*, 1949**).

- **Principe**

En milieu alcalin, l'ion cuivrique se fixe sur les protéines au niveau des liaisons peptidiques pour donner un complexe hexacoordonné de coloration variant du rose violet au bleu violet, qui absorbe à une longueur d'onde maximale de 540 nm (confert réaction suivante). L'intensité de la coloration à cette longueur d'onde est proportionnelle à la quantité de protéines dans le milieu.



- **Mode opératoire**

L'étalonnage a été effectué en présence d'une solution standard de protéines constituée de l'albumine de sérum bovin à la concentration 3 mg/mL. Pour le dosage, 50 µL de sérum ont été ajoutés à 3,95 mL du tampon Tris 50 mM, KCl 150 mM (pH 7,4) et 3 mL de réactif du Biuret. Après incubation des tubes pendant 30 min à l'abri de la lumière et à température ambiante, les densités optiques ont été lues au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 540

nm. La droite d'étalonnage est utilisée pour déterminer la quantité de protéines dans chaque échantillon de sérum (voir annexe).

#### **b) Dosage des protéines hépatiques**

Les protéines tissulaires ont été dosées par la méthode de **Bradford (1976)**.

- **Principe**

En milieu acide dilué, le bleu de Coomassie G-250 se fixe sur les résidus hydrophobes des protéines en formant un complexe bleu qui absorbe avec un maximum à 595 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la densité optique et à la quantité de protéines en solution.

- **Mode opératoire**

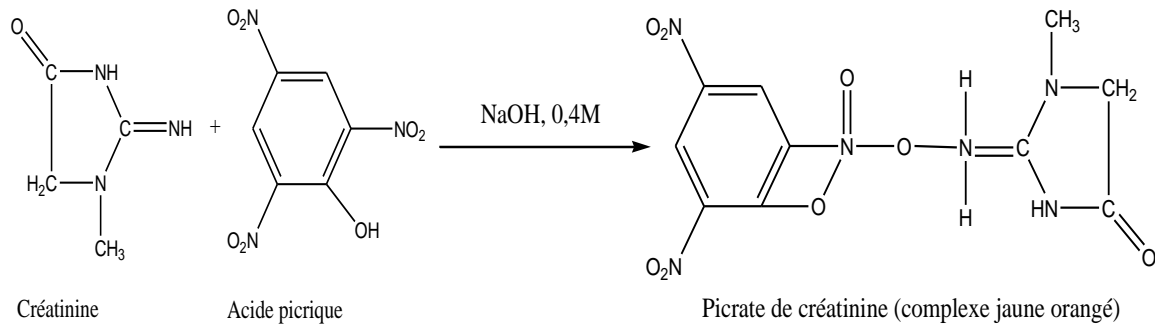
L'étalonnage a été effectué en présence d'une solution standard de Sérum Albumine de Bovin (SAB) à la concentration 50 µg/mL. Pour le dosage, 10 µL d'homogénat ont été ajoutés à 1,99 mL de tampon Tris 50 mM, KCl 150 mM (pH 7,4) et 2 mL du réactif de Bradford. Après incubation des tubes pendant 15 min à l'abri de la lumière, les densités optiques ont été lues au spectrophotomètre à 595 nm. La droite d'étalonnage est utilisée pour déterminer la quantité de protéines dans l'homogénat (voir annexe).

#### **c) Dosage de la créatinine sérique**

La créatinine sérique a été dosée selon **Bartels et al., (1972)**.

- **Principe**

En milieu alcalin, la créatinine forme avec l'acide picrique un complexe jaune orangé selon la réaction ci-dessous. Ce complexe absorbe à 492 nm et son apparition est suivie par une méthode cinétique deux points. L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en créatinine.



- **Mode opératoire**

Dans une cuve spectrophotométrique, on a introduit 1 mL de solution de dosage [acide picrique + NaOH 0,4 M (v/v)]. On a ajouté 100  $\mu\text{L}$  de l'étalon créatinine dans le tube témoin et 100  $\mu\text{L}$  de sérum dans le tube test. Après mélange par inversion de la cuve, les densités optiques ont été lues après 20 secondes de stabilisation et 1 min après incubation. La concentration en créatinine a été obtenue par la formule ci-dessous :

$$\text{Créatinine (mg/L)} = \frac{\Delta \text{DO Test}}{\Delta \text{DO Etalon}} \times [\text{Etalon}]$$

$\Delta$  DO test: variation de la densité optique (DO) de l'échantillon pendant 1 min d'incubation,

$\Delta$  DO Etalon: variation de la DO de l'étalon pendant 1 min d'incubation,

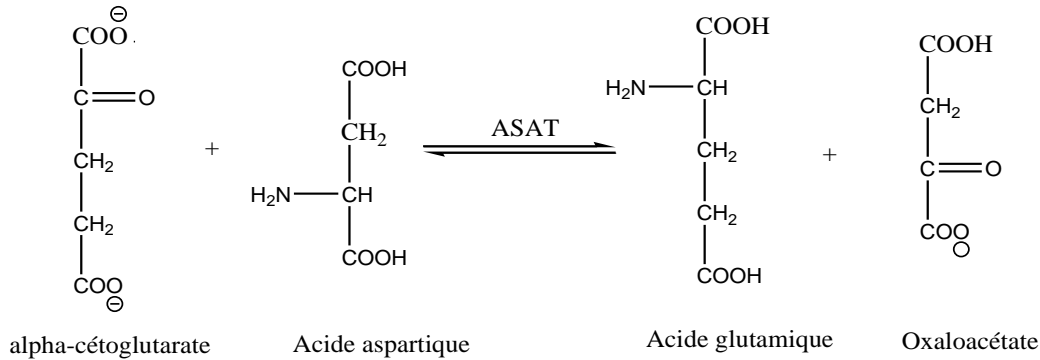
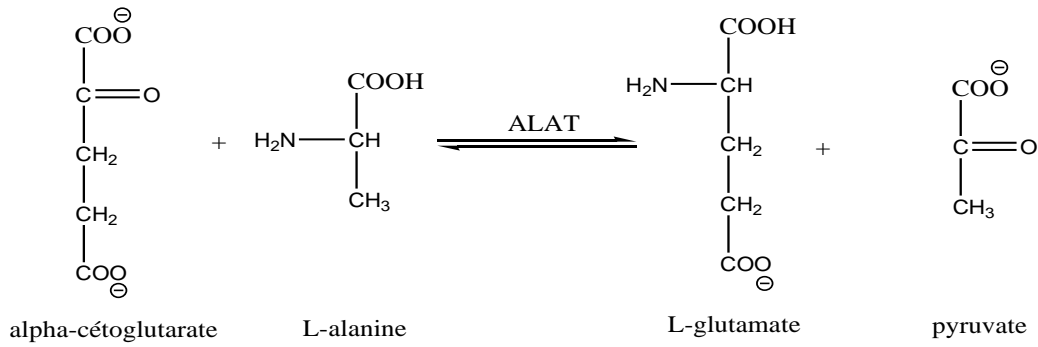
[Étalon] : concentration de l'étalon créatinine (15 mg/L).

**d) Dosage des transaminases sériques**

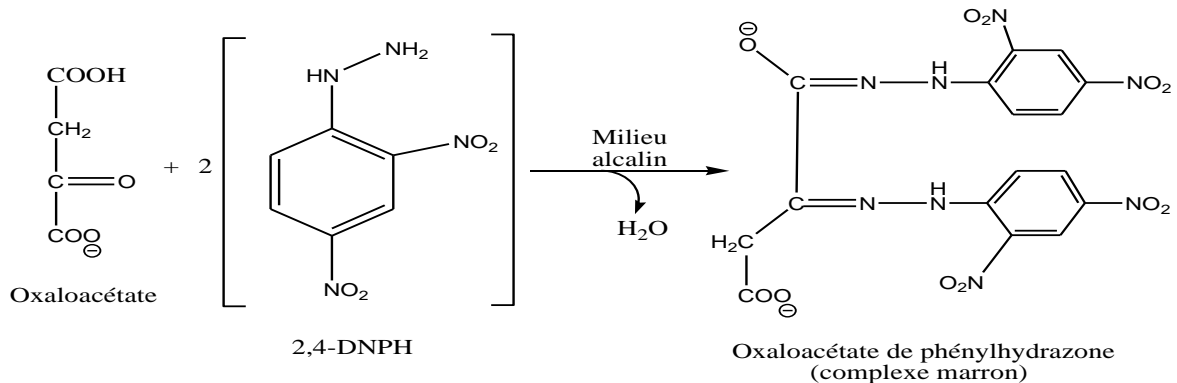
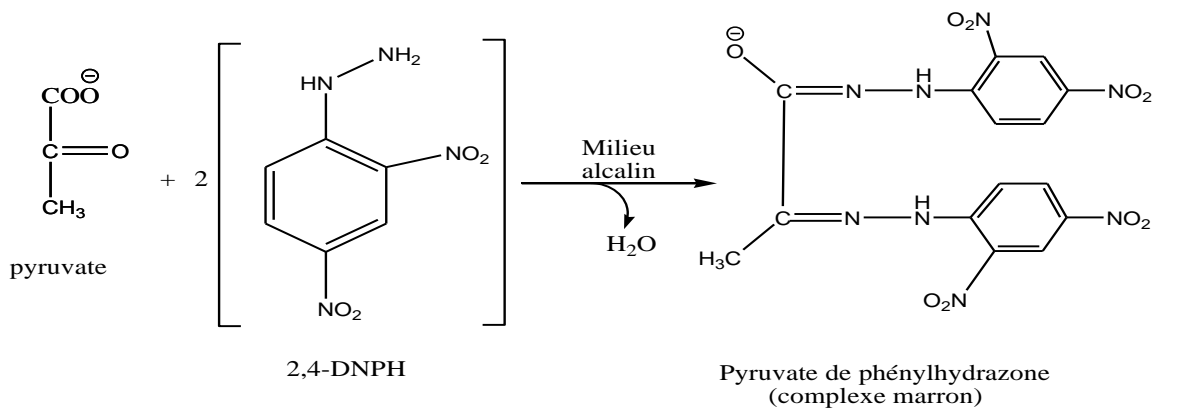
Ce dosage a été effectué par la méthode **de Reitman and Frankel, (1957)**.

- **Principe :**

L'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT) catalysent le transfert du groupe aminé respectivement de l'alanine sur l' $\alpha$ -cétoglutarate pour former le pyruvate et le glutamate et de l'aspartate sur l' $\alpha$ -cétoglutarate pour former de l'oxaloacétate et du glutamate selon les réactions suivantes.



Le pyruvate ou l'oxaloacétate formé réagit avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH) pour former le complexe hydrazone de couleur marron selon les réactions ci-dessous. Ce complexe absorbe à 505 nm en présence du NaOH 0,4 M.



L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la quantité du pyruvate ou de l'oxaloacétate du milieu (jusqu'à une certaine concentration) ; donc elle est reliée à l'activité de l'ALAT ou de l'ASAT.

- **Mode opératoire**

- **Dosage de l'ALAT**

Pour chaque échantillon de sérum, on a disposé de deux tubes à essai. Ainsi, on a introduit dans les tubes témoin et essai 100  $\mu$ L de substrat ALAT. Après une pré-incubation à 37°C pendant 5 min, on a ajouté 20  $\mu$ L de sérum dans le tube essai. Après avoir bien mélangé, le mélange a été encore incubé à 37°C pendant 30 min. A la sortie des tubes du bain-marie, on a introduit dans chacune 200  $\mu$ L de 2,4 DNPH et 20  $\mu$ L de sérum dans les tubes témoins. Le contenu des tubes a été homogénéisé et laissé au repos à la température ambiante pendant 20 min. Enfin, on a ajouté 2000  $\mu$ L de NaOH 0,4 M et après mélange, les densités optiques ont été lues 30 min plus tard à 505 nm contre le blanc pour chaque essai.

Les activités ALAT sont obtenues par la courbe d'étalonnage établie sur la base des résultats obtenus dans les mêmes conditions de manipulation que les essais, au moyen d'une solution de pyruvate de sodium (voir annexe).

- **Dosage de l'ASAT**

La procédure est la même que celle décrite pour le dosage de l'ALAT, à la seule différence que le substrat ALAT est remplacé par le substrat ASAT et l'incubation au bain-marie après ajout du sérum dans les tubes essai a duré 1 heure.

Les activités ASAT ont été obtenues grâce à la courbe d'étalonnage établie sur la base des résultats obtenus dans les mêmes conditions de manipulation que les essais, au moyen d'une solution de pyruvate de sodium (voir annexe).

### II.2.3.3. Analyses statistiques des résultats

Pour l'évaluation *in vitro* de la toxicité de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active SF9B, chaque essai a été réalisé en triplicat et toutes les données sont présentées en moyenne  $\pm$  écart type. Le test-*t* de *Student Newman Keuls* a été utilisé pour déterminer les valeurs du seuil de probabilité (*p*) pour les différences observées entre l'essai et le témoin négatif par le logiciel *GraphPad Instat 3.0*. Les résultats ont été considérés comme significativement différents lorsque  $p < 0,05$ .

Quant à l'évaluation *in vivo* de la toxicité de l'extrait aqueux, pour chaque paramètre évalué, on a calculé la valeur moyenne et l'écart type entre 6 animaux de chaque groupe d'étude. Les différences entre les valeurs du groupe témoin et celles des groupes essais ont été séparées par *ANOVA* à un facteur et comparées à l'aide du test *t* de *Student-Newman-Keuls* qui a permis également de déterminer les valeurs du seuil de probabilité (*p*) par le logiciel *GraphPad Instat 3.0*. Les résultats sont considérés comme significativement différents lorsque  $p < 0,05$ .

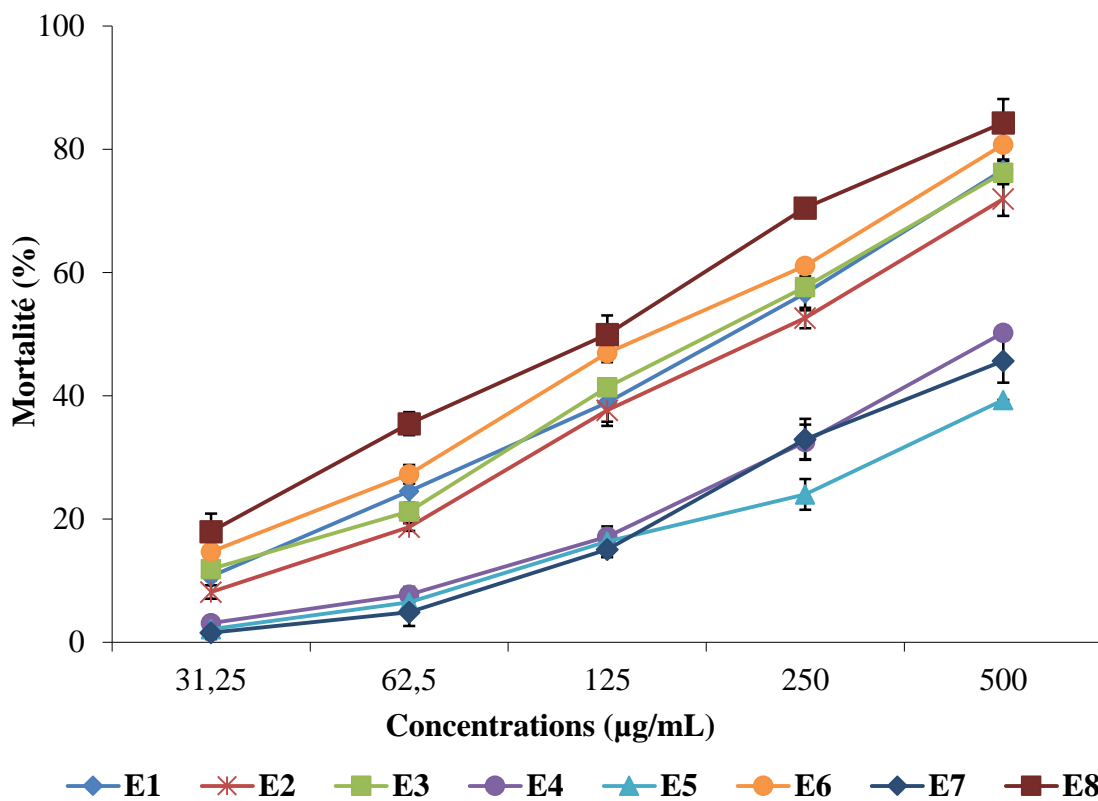


**Chapitre III:**  
**Résultats & Discussions**

### III.1. Efficacité des extraits aqueux et des fractions bio-guidées sur les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica*

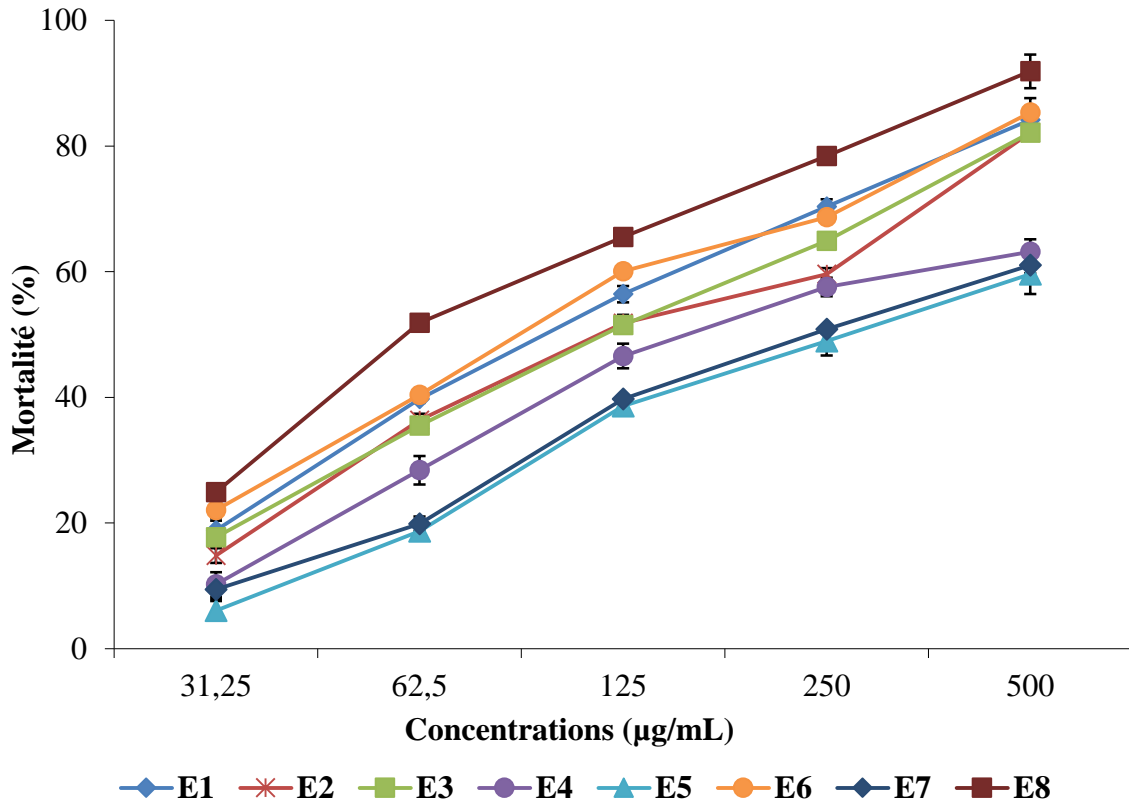
#### III.1.1. Effet des paramètres de récolte des feuilles de *Codiaeum variegatum* sur la mortalité des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica*

Les figures 20 et 21 ci-dessous représentent le pourcentage de mortalité des trophozoïtes d'*E. histolytica* en présence des différents extraits respectivement après 48 et 72 heures d'incubation.



**Figure 20 :** Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* en présence des extraits aqueux après 48 heures d'incubation

**Légende :** Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type de 3 essais. Extrait aqueux des feuilles récoltées au champ (E<sub>1</sub>), extrait aqueux des feuilles récoltées au jardin (E<sub>2</sub>), extrait aqueux des feuilles récoltées le matin (E<sub>3</sub>), extrait aqueux des feuilles récoltées à midi (E<sub>4</sub>), extrait aqueux des feuilles récoltées dans l'après-midi (E<sub>5</sub>), extrait aqueux des feuilles récoltées à minuit (E<sub>6</sub>), extrait aqueux des jeunes feuilles (E<sub>7</sub>) et extrait aqueux des vieilles feuilles (E<sub>8</sub>). Ces extraits ont été testés aux concentrations de 31,25 ; 62,5 ; 125 ; 250 et 500 µg/mL.



**Figure 21 :** Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d’*Entamoeba histolytica* en présence des extraits aqueux après 72 heures d’incubation

**Légende :** Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type de 3 essais. Extrait aqueux des feuilles récoltées au champ (E<sub>1</sub>), extrait aqueux des feuilles récoltées au jardin (E<sub>2</sub>), extrait aqueux des feuilles récoltées le matin (E<sub>3</sub>), extrait aqueux des feuilles récoltées à midi (E<sub>4</sub>), extrait aqueux des feuilles récoltées dans l’après-midi (E<sub>5</sub>), extrait aqueux des feuilles récoltées à minuit (E<sub>6</sub>), extrait aqueux des jeunes feuilles (E<sub>7</sub>) et extrait aqueux des vieilles feuilles (E<sub>8</sub>). Ces extraits ont été testées aux concentrations de 31,25 ; 62,5 ; 125 ; 250 et 500 µg/mL.

De ces deux figures, il ressort que tous les extraits ont présenté un effet antiamoebique sur les trophozoïtes d’*E. histolytica* en culture axénique. La mortalité des trophozoïtes d’*E. histolytica* varie d’une manière concentration dépendante. Les paramètres de récolte des feuilles et la temps d’incubation influencent la mortalité des amibes en culture. Malgré le fait qu’aucun extrait aqueux n’ait conduit à l’inhibition complète de la croissance des trophozoïtes d’*E. histolytica* (100% de mortalité) au bout de 72 heures d’incubation, on n’a noté aucune phase

stationnaire dans l'évolution de la mortalité due aux extraits pouvant prédire une éventuelle résistance ou une reprise de la croissance cellulaire.

L'augmentation du pourcentage de mortalité de manière concentration dépendante a permis de tracer les courbes du pourcentage de mortalité en fonction de la concentration de l'échantillon grâce au logiciel *Statgraphics Version 5.0* pour déterminer les CE<sub>50</sub>. Le tableau II ci-dessous présente les CE<sub>50</sub> des différents extraits et le rapport d'efficacité entre le temps d'incubation.

**Tableau II :** Concentrations efficaces (CE<sub>50</sub>) des extraits aqueux et rapport d'efficacité entre 48 heures et 72 heures d'incubation

Paramètre de récolte	CE <sub>50</sub> (µg/mL)			
	Temps d'incubation	48 heures	72 heures	Rapport d'efficacité (%)
Site	E <sub>1</sub> (Champ)	204,33 ± 12,02	102,00 ± 4,33 <sup>a</sup>	50,08
	E <sub>2</sub> (Jardin)	219,00 ± 3,53	118,50 ± 4,35	45,89
Période de récolte	E <sub>3</sub> (Matin)	191,16 ± 5,00 <sup>a</sup>	119,33 ± 3,61 <sup>a</sup>	37,58
	E <sub>4</sub> (Midi)	491,00 ± 3,53	169,37 ± 0,17	65,58
	E <sub>5</sub> (Après-midi)	ND	296,50 ± 7,77	ND
	E <sub>6</sub> (Minuit)	156,75 ± 3,88 <sup>ab</sup>	93,16 ± 1,52 <sup>ab</sup>	40,57
Stade de croissance des feuilles	E <sub>7</sub> (Jeunes)	ND	182,50 ± 2,82	ND
	E <sub>8</sub> (Vieilles)	120,00 ± 7,77 <sup>abc</sup>	60,54 ± 0,07 <sup>abc</sup>	49,55
Témoin positif	Métronidazole	1,38 ± 0,02 <sup>***</sup>	0,73 ± 0,03 <sup>***</sup>	72,46

**Légende :** Chaque valeur représente la moyenne ± écart-type de 3 essais. Le rapport d'efficacité est obtenu par la formule  $[(CE_{50}(48h) - CE_{50}(72h)) / CE_{50}(48h)] \times 100$ . Test *t*- de Student-Newman-Keuls : <sup>a</sup> différence significative entre les CE<sub>50</sub> des extraits obtenus en fonction du site de récolte, (*p* < 0,05), <sup>b</sup> différence significative entre les CE<sub>50</sub> des extraits obtenus en fonction de la période de récolte, (*p* < 0,05), <sup>c</sup> différence significative entre les CE<sub>50</sub> des extraits obtenus en fonction du stade de croissance des feuilles, (*p* < 0,05), <sup>\*\*\*</sup>différence significative entre la CE<sub>50</sub> du métronidazole et celles des extraits, (*p* < 0,001). ND : Valeur non déterminée.

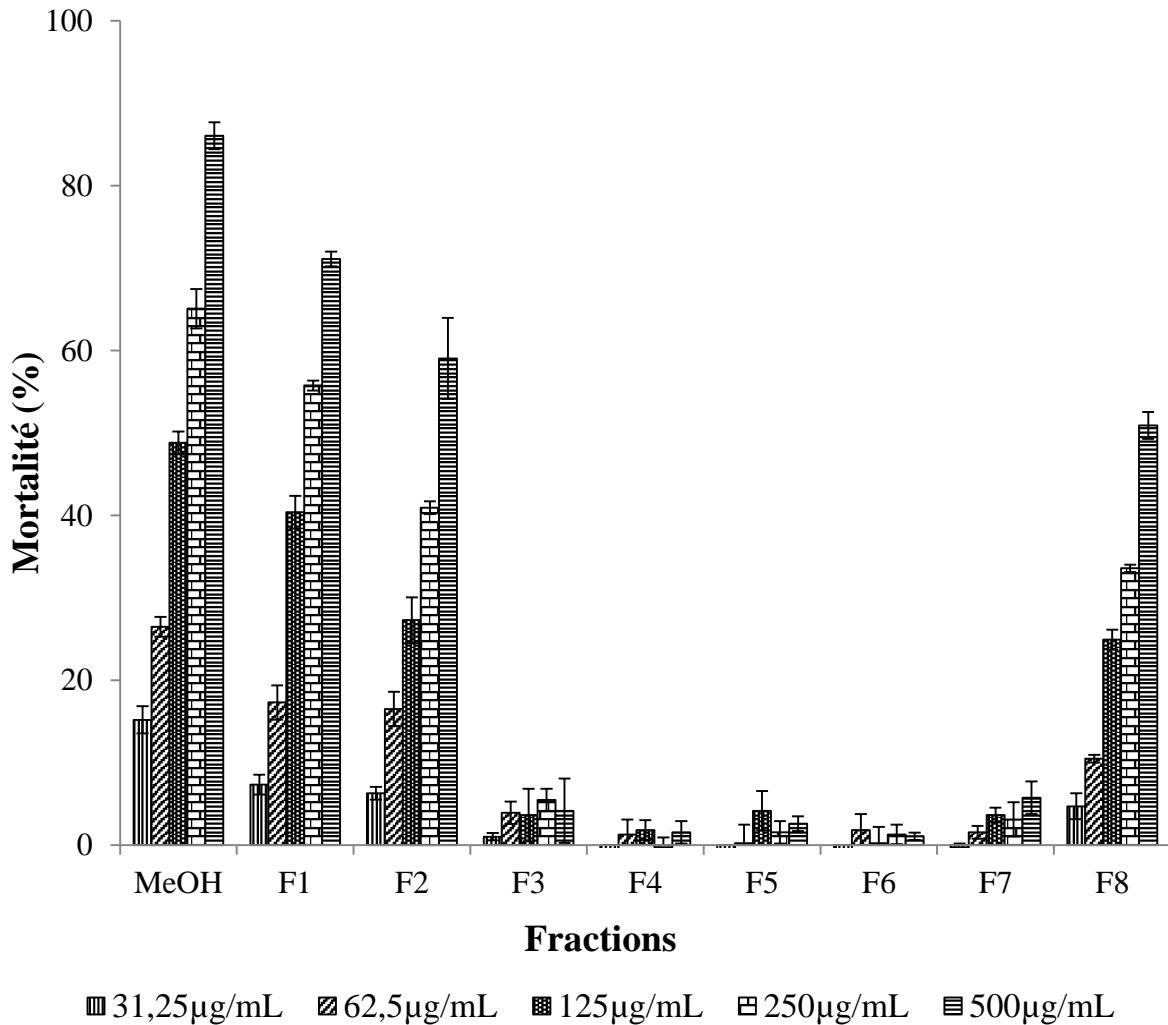
Après analyse statistique, on a noté que par rapport au site de récolte, il n'y a pas eu une différence significative de la mortalité due à l'extrait E1 et E2 après 48 heures d'incubation. Par contre, on a noté une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de l'efficacité de l'extrait E1 obtenu des feuilles récoltées au champ par rapport l'extrait E2 des feuilles récoltées au jardin après 72 heures d'incubation. Cette observation est renforcée par le rapport d'efficacité qui est de 50,08% pour E1 et 45,89% pour E2. Pour ce qui est de la période de récolte, on a observé une différence significative ( $p < 0,05$ ) de l'efficacité chez l'extrait E6 obtenu des feuilles récoltées à minuit avec des  $CE_{50}$  de  $156,75 \pm 3,88 \mu\text{g/mL}$  et  $93,16 \pm 1,52 \mu\text{g/mL}$  respectivement après 48 ou 72 heures d'incubation. Cet extrait est suivi par l'extrait E3 obtenu des feuilles récoltées le matin avec des  $CE_{50}$  de  $191,16 \pm 5,00 \mu\text{g/mL}$  et  $119,33 \pm 3,61 \mu\text{g/mL}$  respectivement après 48 ou 72 heures d'incubation. En ce qui concerne le stade de croissance des feuilles, on a noté une différence significative de l'efficacité ( $p < 0,05$ ) chez l'extrait E8 provenant des vieilles feuilles avec des  $CE_{50}$  de  $120,00 \pm 7,77 \mu\text{g/mL}$  et  $60,54 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$  respectivement après 48 ou 72 heures d'incubation. En comparant les  $CE_{50}$  de tous les extraits, l'extrait E8 obtenu des vieilles feuilles a été le plus efficace. Par contre, l'extrait E4 obtenu des feuilles récoltées à midi a présenté le meilleur rapport d'efficacité (65,58%). En comparaison au métronidazole, un composé pur et médicament de référence dont nous avons obtenu une  $CE_{50}$  de  $0,73 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$  après 72 heures d'incubation, les extraits E4 et E8 ont montré une activité antiamebique plus faible.

### **III.1.2. Efficacité des fractions bio-guidées sur les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica***

Sachant que la composition chimique complexe de l'extrait aqueux peut empêcher l'activité de certains composés, nous avons initié un fractionnement de l'extrait aqueux afin de rechercher et caractériser les produits actifs sur la culture axénique d'*E. histolytica*.

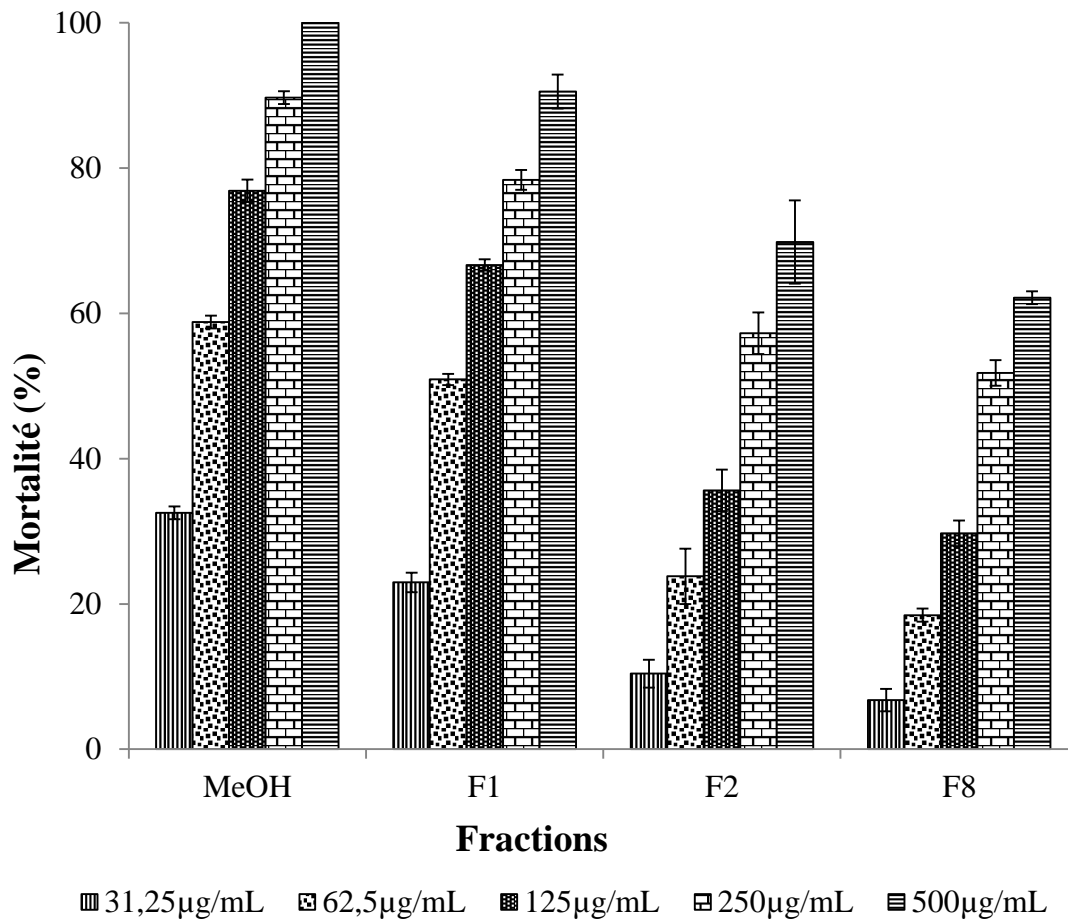
### III.1.2.1. Effet des fractions isolées sur la mortalité des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica*

Les figures 22 et 23 ci-dessous représentent l'activité antiameobique des fractions isolées en fonction des concentrations testées.



**Figure 22 :** Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* en présence des fractions après 48 heures d'incubation

**Légende :** Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type de 3 essais. MeOH (Extrait au MeOH), F1 (fraction AcOEt), F2 (fraction AcOEt/MeOH 10%), F3 (fraction AcOEt/MeOH 20%), F4 (fraction AcOEt/MeOH 30%), F5 (fraction AcOEt/MeOH 40%), F6 (fraction AcOEt/MeOH 50%), F7 (fraction AcOEt/MeOH 80%), F8 (fraction MeOH). Ces fractions ont été testées aux concentrations de 31,25 ; 62,5 ; 125 ; 250 et 500  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figure 23 :** Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* en présence des fractions après 72 heures d'incubation

**Légende :** Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type de 3 essais. MeOH (Extrait au MeOH), F1 (fraction AcOEt), F2 (fraction AcOEt/MeOH 10%), F8 (fraction MeOH). Ces fractions ont été testées aux concentrations de 31,25 ; 62,5 ; 125 ; 250 et 500  $\mu\text{g/mL}$ .

Le fractionnement de l'extrait aqueux a abouti à une dispersion des principes actifs entre les différentes fractions et une baisse de l'activité antiamebique de ces dernières comparée à l'extrait aqueux de départ. L'étape de lavage de l'extrait aqueux au méthanol a permis d'obtenir une meilleure activité antiamebique que l'extrait aqueux de départ. De toutes les fractions testées sur la culture axénique d'*E. histolytica*, celle à l'acétate d'éthyle (F1) a présenté la plus grande activité antiamebique avec plus de 90% du taux de mortalité après 72 heures d'incubation. La variation de la mortalité en fonction des concentrations a permis de déterminer les  $\text{CE}_{50}$  tel que présenté dans le tableau III ci-dessous.

**Tableau III** : CE<sub>50</sub> des fractions actives en fonction du temps d'incubation

		CE <sub>50</sub> (µg/mL)	
Temps d'incubation		48 heures	72 heures
Fractions	Extrait MeOH	126,50 ± 0,70 <sup>a</sup>	53,00 ± 0,50 <sup>a</sup>
	F1	202,00 ± 3,50 <sup>b</sup>	61,83 ± 0,57 <sup>b</sup>
	F2	398,00 ± 1,83	202,25 ± 0,35
	F8	479,50 ± 2,50	234,25 ± 1,06
Témoin positif	Métronidazole	1,38 ± 0,02***	0,73 ± 0,03***

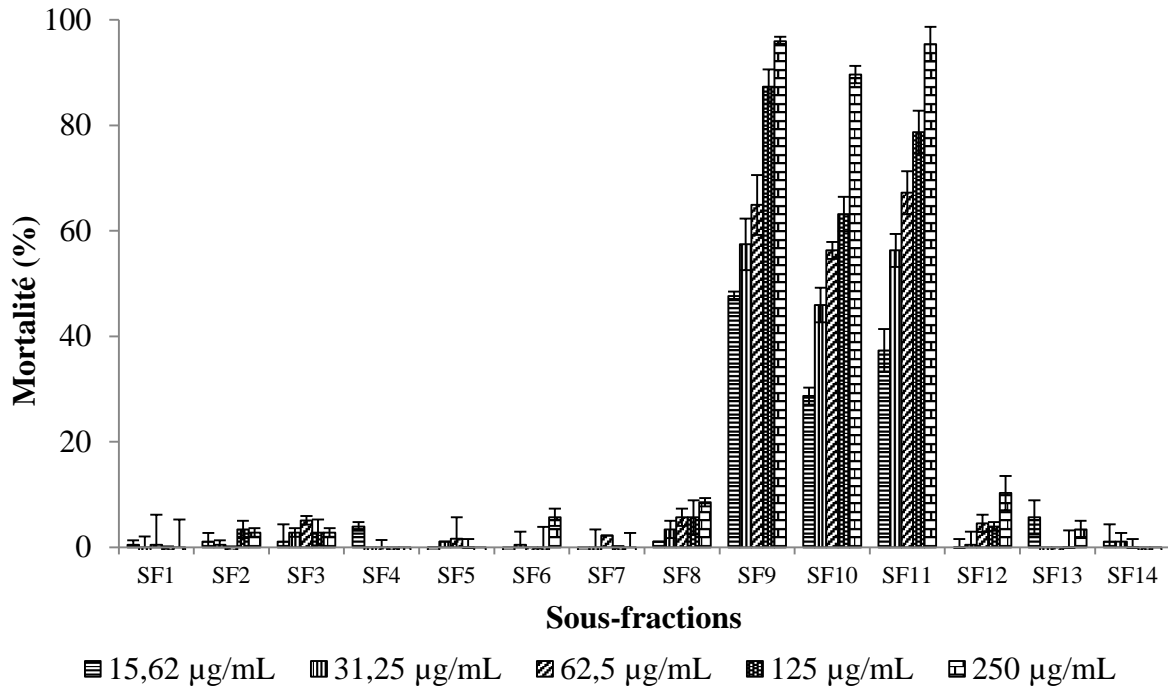
**Légende** : F1, F2 et F8 sont les fractions obtenues du fractionnement de l'extrait au méthanol par chromatographie flash. Chaque valeur du tableau représente la moyenne ± écart-type de 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : <sup>a</sup> différence significative entre la CE<sub>50</sub> de l'extrait au méthanol et celle des fractions, ( $p < 0,05$ ), <sup>b</sup> différence significative entre les CE<sub>50</sub> des fractions, ( $p < 0,05$ ), \*\*\*différence significative entre la CE<sub>50</sub> du métronidazole et celle de l'extrait au méthanol ou des fractions, ( $p < 0,001$ ).

Selon le schéma du fractionnement, on a observé que le lavage de l'extrait aqueux avec le méthanol concentre plus les principes actifs pour une efficacité plus élevée. En effet, à partir de l'extrait aqueux (CE<sub>50</sub> de 120,00 ± 7,77 µg/mL et 60,54 ± 0,07 µg/mL respectivement après 48 et 72 heures d'incubation), on a obtenu un extrait au méthanol de CE<sub>50</sub> de 126,50 ± 0,70 µg/mL et 53,00 ± 0,50 µg/mL respectivement après 48 et 72 heures d'incubation. Les fractions actives (F1, F2, F8) ont une efficacité significativement inférieure ( $p < 0,05$ ) à l'extrait au méthanol. La fraction à l'acétate d'éthyle (F1), étant la plus active de toutes, a présenté une CE<sub>50</sub> de 202,00 ± 2,47 µg/mL et 61,83 ± 0,57 µg/mL respectivement après 48 et 72 heures d'incubation. On a noté une augmentation significative de la CE<sub>50</sub> de la fraction F1 après 72 heures d'incubation bien que la différence reste significative ( $p < 0,05$ ) par rapport à celle de l'extrait au MeOH. La fraction F1 sera donc utilisée dans la suite de nos expériences pour la recherche des produits actifs antiameobiques.



### III.1.2.2. Effet des sous-fractions isolées sur la mortalité des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica*

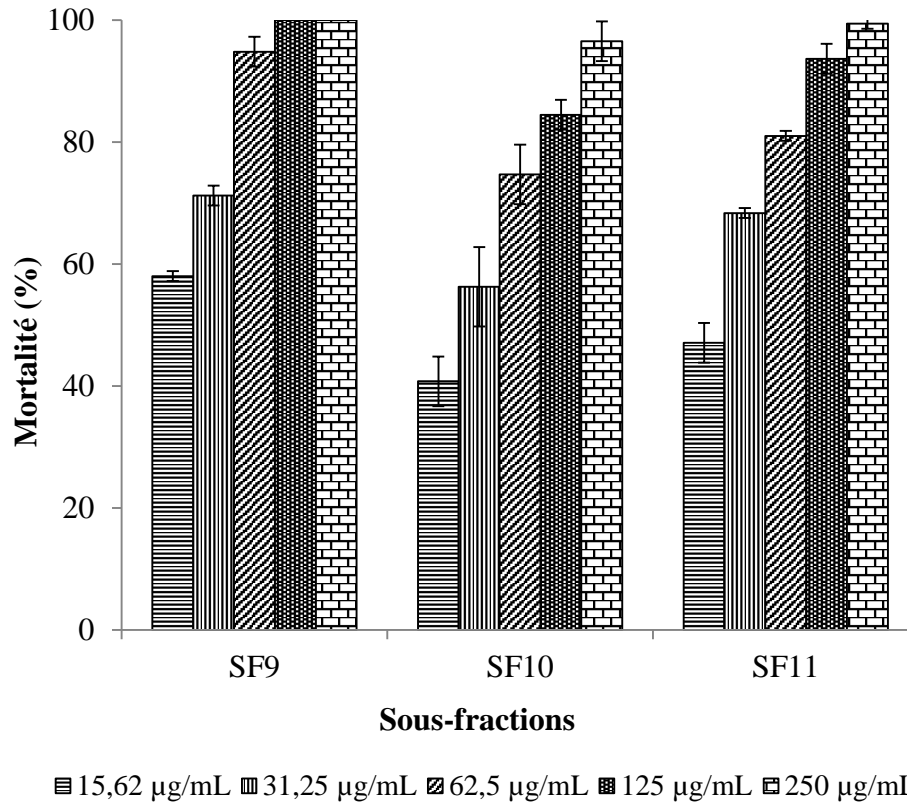
Quatorze sous-fractions ont été isolées lors du fractionnement de la fraction à l'acétate d'éthyle (F1) puis testées sur une culture axénique d'*E. histolytica*. La figure 24 ci-dessous représente l'activité anti-amoebique des sous-fractions testées après 48 heures d'incubation.



**Figure 24 :** Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* en présence des sous-fractions après 48 heures d'incubation

**Légende :** Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type de 3 essais. SF1, SF2, SF3, SF4, SF5, SF6, SF7, SF8, SF9, SF10, SF11, SF12, SF13 et SF14 sont les sous-fractions obtenues lors du fractionnement sur colonne de gel de silice de la fraction à l'acétate d'éthyle (F1). Ces sous-fractions ont été testées aux concentrations de 15,62 ; 31,25 ; 62,5 ; 125 et 250 µg/mL.

La figure 24 montre que de toutes les sous-fractions issues du fractionnement de la fraction F1, seules les sous-fractions SF9, SF10 et SF11 ont été les plus actives sur les trophozoïtes d'*E. histolytica*. Ces sous-fractions ont montré une augmentation concentration-dépendante du pourcentage de mortalité et ont été testées pendant 72 heures (voir Figure 25).



**Figure 25 :** Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* en présence des sous-fractions actives après 72 heures d'incubation

**Légende :** Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type de 3 essais. SF9, SF10 et SF11 sont les sous-fractions obtenues lors du fractionnement sur colonne de gel de silice de la fraction à l'acétate d'éthyle (F1). Ces sous-fractions ont été testées aux concentrations de 15,62 ; 31,25 ; 62,5 ; 125 et 250  $\mu\text{g/mL}$ .

On note de la figure 25 que la mortalité des trophozoïtes d'*E. histolytica* est concentration-dépendante et elle atteint 100% à la concentration de 125  $\mu\text{g/mL}$  pour la sous-fraction SF9 et 250  $\mu\text{g/mL}$  pour SF11 après 72 heures d'incubation. La sous-fraction SF9 a présenté une activité antiameobique élevée comparée aux deux sous-fractions actives. Le tableau IV ci-dessous présente les valeurs des  $\text{CE}_{50}$  des sous-fractions actives respectivement après 48 et 72 heures d'incubation.

**Tableau IV:** CE<sub>50</sub> des sous-fractions actives en fonction du temps d'incubation

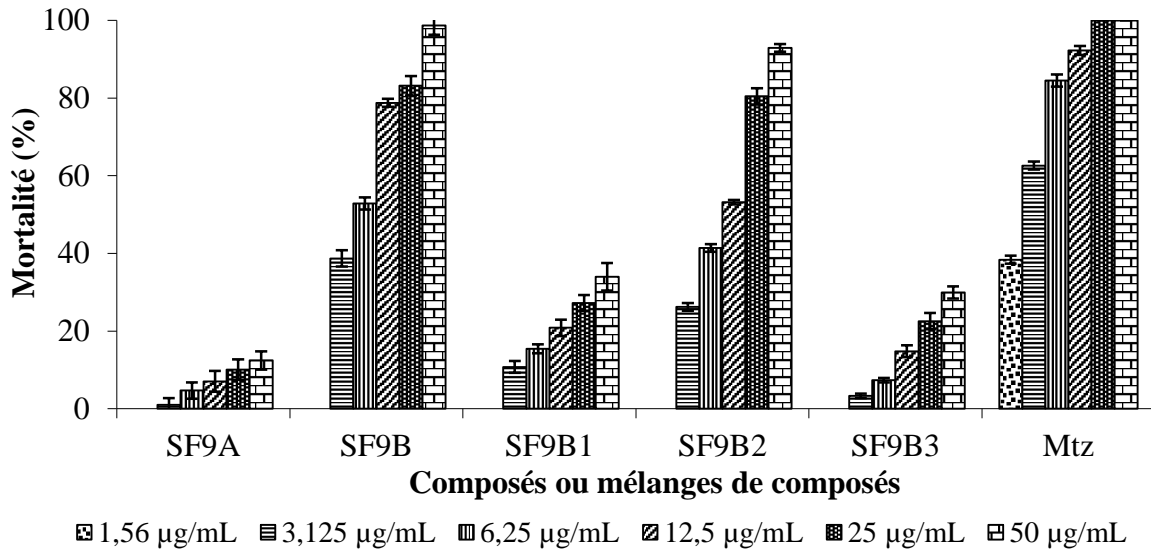
Temps d'incubation	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	
	48 heures	72 heures
SF9	18,87 ± 1,23 <sup>a</sup>	≤ 15,62 <sup>a</sup>
SF10	35,87 ± 4,41	22,87 ± 1,59
SF11	26,50 ± 1,14	17,91 ± 1,46
Métronidazole	1,38 ± 0,02**	0,73 ± 0,03**

**Légende :** SF9, SF10 et SF11 sont les sous-fractions obtenues lors du fractionnement sur colonne de gel de silice de la fraction à l'acétate d'éthyle (F1). Chaque valeur du tableau représente la moyenne ± écart-type de 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : <sup>a</sup> différence significative entre les CE<sub>50</sub> des sous-fractions, ( $p < 0,05$ ), \*\*différence significative entre la CE<sub>50</sub> du métronidazole et celle des sous-fractions, ( $p < 0,01$ ).

La sous-fraction SF9 a montré une efficacité significative ( $p < 0,05$ ) que toutes les autres avec une CE<sub>50</sub> de 18,87 ± 1,23 µg/mL et ≤ 15,62 µg/mL respectivement après 48 et 72 heures. Cette sous-fraction a été ainsi retenue pour l'isolement des composés actifs.

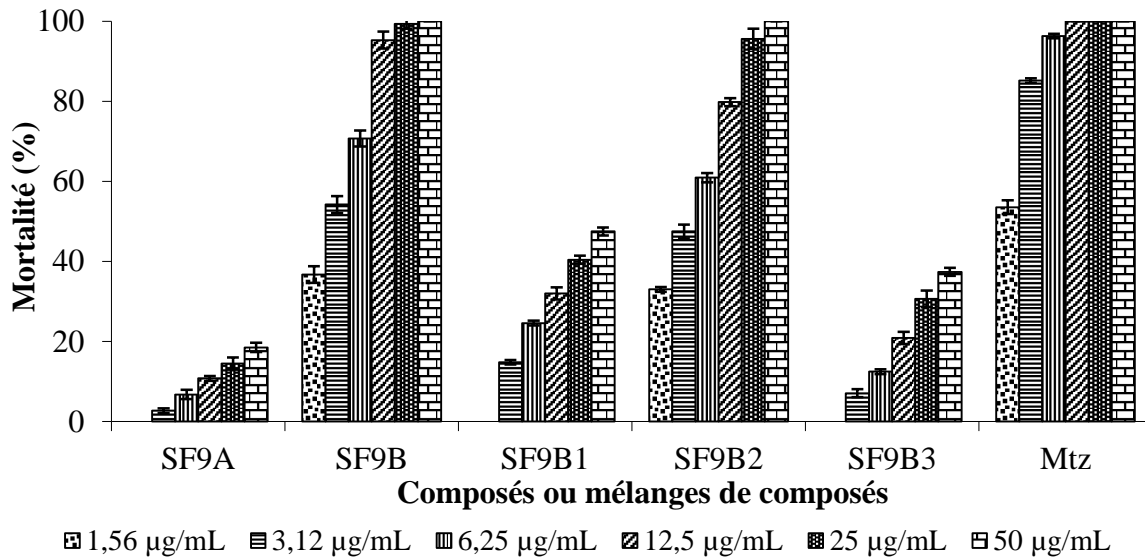
### III.1.2.3. Effet des composés isolés ou mélanges de composés sur la mortalité des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica*

Le fractionnement de la sous-fraction SF9 a conduit à l'obtention d'un résidu cristallisé (SF9A) et un filtrat (SF9B) qui, après fractionnement sur gel de silice, a donné trois composés (SF9B1, SF9B2 et SF9B3). Les figures 26 et 27 ci-dessous représentent l'activité antiamebique des composés isolés ou mélanges de composés sur une culture axénique d'*E. histolytica* en comparaison au métronidazole pendant 24 et 48 heures d'incubation.



**Figure 26** : Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* en présence des produits isolés après 24 heures d'incubation

**Légende** : Chaque valeur est la moyenne  $\pm$  écart-type de 3 essais. SF9A (résidu cristallisé) et SF9B (filtrat) ont été obtenus de la sous-fraction SF9; SF9B1, SF9B2 et SF9B3 sont des composés isolés du filtrat SF9B; Mtz : métronidazole. Ces composés ou mélanges de composés ont été testés aux concentrations de 1,56 ; 3,125 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 et 50  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figure 27** : Pourcentage de mortalité des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* en présence des produits isolés après 48 heures d'incubation

**Légende** : Chaque valeur est la moyenne  $\pm$  écart-type de 3 essais. SF9A (résidu cristallisé) et SF9B (filtrat) ont été obtenus de la sous-fraction SF9; SF9B1, SF9B2 et SF9B3 sont des composés isolés du filtrat SF9B; Mtz : métronidazole. Ces composés ou mélanges de composés ont été testés aux concentrations de 1,56 ; 3,125 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 et 50  $\mu\text{g/mL}$ .

Le résidu cristallisé (SF9A) a été moins actif sur les trophozoïtes d'*E. histolytica* alors que le filtrat concentré (SF9B) a été plus actif avec une mortalité de 100% atteinte à la concentration de 50 µg/mL après 24 heures d'incubation. Les composés isolés quant à eux ont eu chacun une activité antiameobique qui variait en fonction du temps. De tous ces composés, seul SF9B2 a montré une activité sur les trophozoïtes d'*E. histolytica* proche au filtrat concentré (SF9B) et au métronidazole. Pour les différents composés isolés, les CE<sub>50</sub> ont été déterminées et présentées dans le tableau V ci-dessous.

**Tableau V** : CE<sub>50</sub> des composés isolés ou mélanges de composés en fonction du temps d'incubation

Temps d'incubation	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	
	24 heures	48 heures
SF9A	> 50	> 50
SF9B	5,71 ± 0,24 <sup>a</sup>	2,75 ± 0,10 <sup>a</sup>
SF9B1	> 50	> 50
SF9B2	10,80 ± 0,35	3,78 ± 0,31
SF9B3	> 50	> 50
Métronidazole	2,26 ± 0,03*	1,38 ± 0,02*

**Légende** : SF9A (résidu cristallisé) et SF9B (filtrat) ont été obtenus de la sous-fraction SF9; SF9B1, SF9B2 et SF9B3 sont des composés isolés du filtrat SF9B. Chaque valeur du tableau représente la moyenne ± écart-type de 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : <sup>a</sup> différence significative entre les CE<sub>50</sub> des composés isolés ou mélanges de composés, ( $p < 0,05$ ), \*différence significative entre produits isolés en comparaison au métronidazole, ( $p < 0,05$ ).

Il est à noter qu'après analyse statistique des résultats, seule la sous-fraction SF9B a présenté une efficacité (CE<sub>50</sub> = 2,75 ± 0,10 µg/mL) proche de celle du métronidazole (CE<sub>50</sub> = 1,38 ± 0,02 µg/mL). De plus, cette sous-fraction SF9B, qui est en même temps le mélange de SF9B1, SF9B2 et SF9B3, a été plus efficace que chacun de ces composés testés seuls.

L'efficacité de la sous-fraction SF9B résulterait d'une action synergique ou additive entre les trois composés isolés. De ce fait, la sous-fraction SF9B a fait l'objet d'une caractérisation chimique plus poussée et a été utilisée dans nos futures expériences afin d'assurer une activité maximale des composés s'y trouvant.

#### III.1.2.4. Composition phytochimique de la sous-fraction active SF9B

Le tableau VI montre les différentes classes de composés chimiques mises en évidence dans la sous-fraction active SF9B.

**Tableau VI** : Classes de composés identifiés dans la sous-fraction active SF9B

Echantillon	Classes de composés testés				
	Terpenoïdes	Flavonoïdes	Polyphénols	Sucres	Tanins
SF9B	++	+	+++	-	-

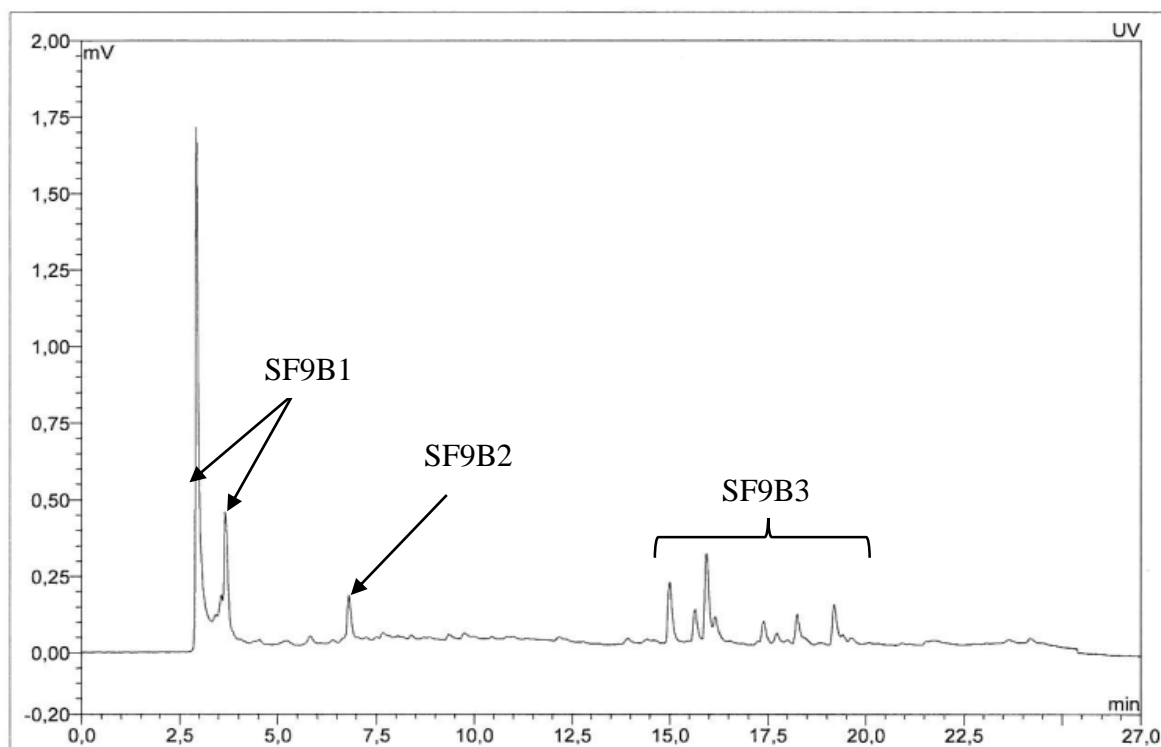
**Légende** : SF9B (filtrat obtenu du lavage à l'éthanol de la sous-fraction SF9 et concentration à l'évaporateur rotatif). + indique la présence de la classe de composés et - indique l'absence de la classe de composés.

On a remarqué, entre autres, la présence des terpénoïdes, des flavonoïdes, des polyphénols dans la sous-fraction active SF9B. Par ailleurs, on a noté l'absence des tanins et des sucres qui ont été identifiés initialement dans l'extrait aqueux dans nos travaux antérieures (résultats non présentés ici).

##### III.1.2.4.1. Profil CLHP de la sous-fraction active SF9B

La figure 28 ci-dessous illustre la composition chimique de la sous-fraction active SF9B. Le chromatogramme ci-dessous laisse percevoir plusieurs pics avec des temps de rétention et d'intensités variables représentant les différents composés contenus dans cette sous-fraction. Ainsi, il en résulte que la sous-fraction active SF9B contient plusieurs composés avec un composé majoritaire (SF9B1) élué en premier, suivi du composé SF9B2 et le mélange SF9B3 élué après lavage de la colonne au méthanol (voir figure 28).

Sample Name:	SF9B	Injection Volume:	20,0
Vial Number:	RA8	Channel:	UV
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	methode 2 loop 20 µL + 60 µL flush	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	default	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	21/6/2011 14:38	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	27,00	Sample Amount:	1,0000



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mV	Area mV*min	Rel.Area %	Amount	Type
Total:			0,000	0,000	0,00	0,000	

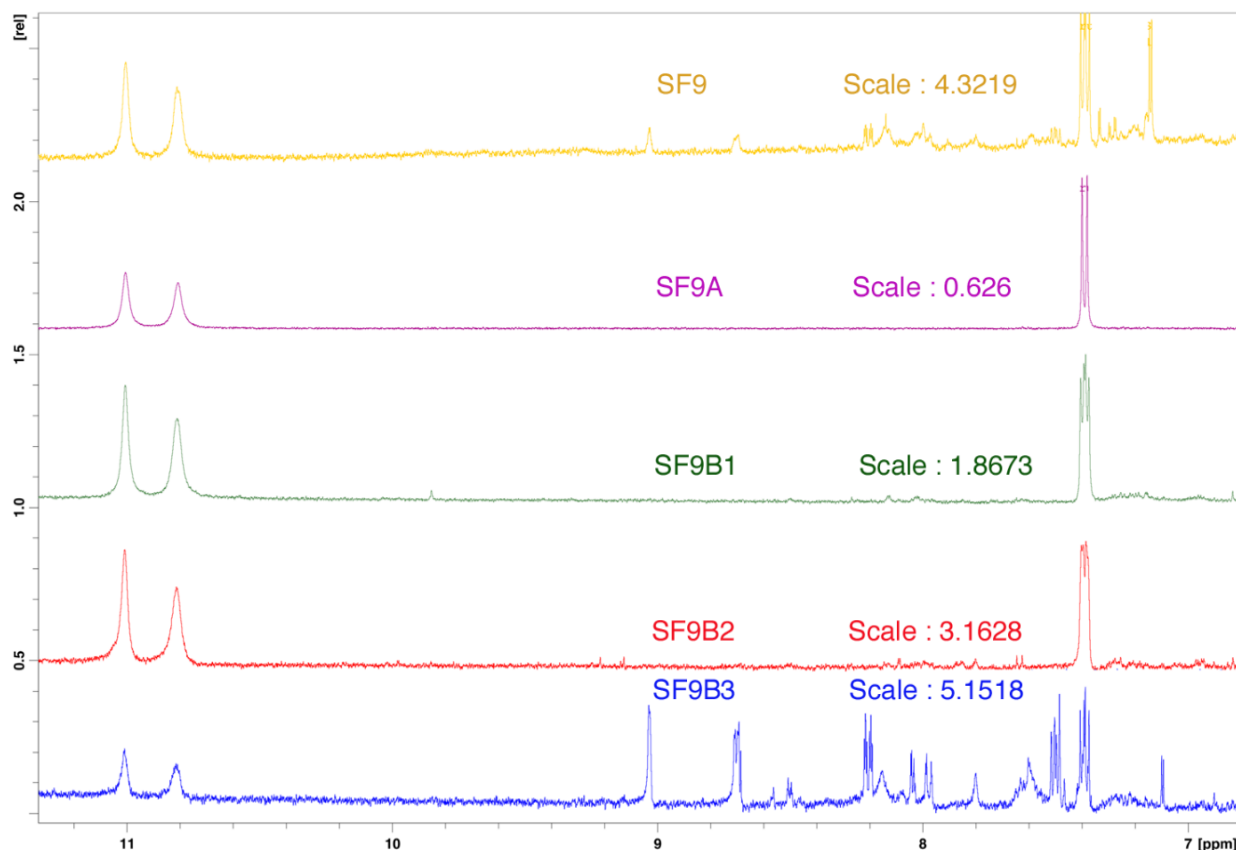
**Figure 28:** Chromatogramme en phase inverse de la sous-fraction active SF9B

**Légende :** Colonne de gel de silice en phase inverse KROMASIL® C18, élution en mode isocratique au solvant H<sub>2</sub>O (35%)/CH<sub>3</sub>CN (65%), débit : 0,8 mL/min, détection à (λ) = 254 nm. SF9B1, SF9B2 et SF9B3 ont été isolés de la sous-fraction SF9B (filtrat obtenu du lavage à l'éthanol de la SF9 et concentration à l'évaporateur rotatif).

#### III.1.2.4.2. Comparaison des spectres RMN des composés isolés

La figure 29 ci-dessous présente la superposition des différents spectres RMN protons des composés isolés de la sous-fraction SF9. Cette figure indique que SF9A, SF9B1 et SF9B2 ont des spectres similaires, suggérant un composé similaire comportant certains groupements

chimiques fonctionnels indispensables pour l'activité antiamebique observée. SF9B3 a montré un spectre différent correspondant à un mélange différent des composés SF9A, SF9B1 et SF9B2.



**Figure 29** : Superposition des spectres RMN  $^1\text{H}$  (fréquence de résonance : 400 MHz) des composés isolés de la sous-fraction SF9

**Légende** : SF9A est le résidu cristallisé séparé de la sous-fraction SF9 ; SF9B1, SF9B2 et SF9B3 ont été isolés de SF9B (filtrat obtenu du lavage à l'éthanol de la sous-fraction SF9 et concentration à l'évaporateur rotatif).

### III.1.3. Discussion partielle

#### III.1.3.1. Influence des paramètres de récolte des feuilles sur l'efficacité des extraits aqueux chez les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica*

Une enquête ethnopharmacologique des plantes médicinales appartenant aux familles différentes, et sélectionnées sur la base de leur utilisation traditionnelle contre les infections intestinales et hépatiques, a conduit à l'identification de l'activité antiamebique de l'extrait



aqueux des feuilles de *C. variegatum* sur une culture polyxénique d'*E. histolytica* (**Moundipa et al. 2005**). Ce résultat a ainsi renforcé l'utilisation locale de cette plante médicinale dans le traitement de la dysenterie. Au cours de notre étude, nous avons avancé vers la caractérisation de l'activité antiamebique sur une culture axénique d'*E. histolytica*. L'essai biologique des extraits aqueux des feuilles de *C. variegatum* sur des trophozoites d'*E. histolytica* a permis de noter une différence d'efficacité en fonction des critères de culture et de récolte. Cette étude a ainsi démontré l'impact de l'environnement sur la production de composés phytochimiques des plantes médicinales. D'une part, les plantes contiennent et produisent une complexité de métabolites primaires ou secondaires qui possèdent des activités biologique et pharmacologique intéressantes (**Elaine et al., 2002 ; Salim et al., 2008; Wink, 2012**). D'autre part, la synthèse et l'accumulation de ces métabolites varient en fonction des facteurs intrinsèques (liés à la plante elle-même) et extrinsèques (liés à l'environnement où se développe la plante) (**Calixto, 2000; Cechinel-Filho et al., 2012**). Les facteurs intrinsèques incluent la partie de la plante utilisée, l'âge de la plante lors de la récolte ou le stade de développement de la plante, tandis que les facteurs extrinsèques sont le climat, la saison, le temps et le lieu de la récolte, l'application d'agents fertilisants, la densité de la culture, etc... (**Damtew et al., 2011; Vidic et al., 2010**). Ces différents facteurs impactent sur la composition en métabolites bioactifs des feuilles récoltées ayant servi à la préparation des différents extraits testés. Les deux sites de récolte dans notre étude étant dans la même ville, on n'a observé aucune différence significative d'efficacité bien que les conditions liées à l'environnement soient variables entre le champ et le jardin. Par ailleurs, l'extrait de feuilles récoltées à minuit (E6) a montré une efficacité significativement plus élevée ( $p < 0,05$ ) par rapport à tous les extraits de feuilles récoltées aux autres périodes de la journée. En journée, les plantes et plus particulièrement les feuilles sont soumises à la photosynthèse (synthèse des métabolites primaires) nécessaire à la plante pour assurer sa survie. Dans la nuit, elles effectuent la synthèse des métabolites secondaires à partir des métabolites

primaires considérés parfois comme des précurseurs (Aharoni and Galili, 2011; Pavarini et al., 2012). Ainsi, pour optimiser l'efficacité des extraits ou l'effet thérapeutique d'une plante, il est important de rechercher les conditions appropriées de l'environnement de culture ainsi que les conditions maximales de production des métabolites bioactifs.

De tous les extraits testés sur la culture axénique d'*E. histolytica*, l'extrait obtenu à partir de vieilles feuilles et récoltées le matin (E8) a présenté l'activité antiamebique la plus élevée avec une  $CE_{50}$  de  $120,00 \pm 7,77 \mu\text{g/mL}$  après 48 heures d'incubation et  $60,54 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$  après 72 heures d'incubation. Cette efficacité est faible comparée à celle observée précédemment dans notre laboratoire où l'extrait aqueux des feuilles de *C. variegatum* sur une culture polyxénique d'*E. histolytica* avait une efficacité ( $CE_{50} = 10,74 \mu\text{g/mL}$ ) proche à celle du métronidazole (Moundipa et al., 2005). En effet, dans une culture polyxénique, plusieurs microorganismes de la flore intestinale dont les bactéries sont dans le milieu. Ces bactéries sécrètent un large éventail d'enzymes ayant un potentiel métabolique important qui peut avoir des implications majeures pour la stabilité des composés présents dans cet environnement (Sousa et al., 2008; Grundmann, 2010). Il a été démontré que le microbiote intestinal influence la réponse d'un médicament grâce à un métabolisme des composés pour donner des métabolites plus actifs (Turner et al., 1977; Wilson and Nicholson, 2009).

### III.1.3.2. Variation de l'efficacité des fractions isolées lors du fractionnement bio-guidé de l'extrait aqueux

Le fractionnement bio-guidé est la séparation successive (c'est-à-dire étape après étape) au cours de laquelle l'extrait est fractionné et re-fractionné jusqu'à l'isolement d'un produit biologiquement actif (Phillipson et al., 2002). Dans cette procédure, chaque fraction isolée a été évaluée sur la culture axénique d'*E. histolytica* et seules les fractions actives ont été à nouveau fractionnées. Au cours de notre étude, nous avons noté une variation diversifiée de l'activité antiamebique des fractions ou produits isolés de l'extrait aqueux des feuilles de *C.*

*variegatum*. D'une part, le fractionnement de l'extrait aqueux a résulté en une conservation ou augmentation de l'efficacité des fractions isolées. Ainsi, à partir d'un extrait brut ayant présenté une CE<sub>50</sub> de 60,54 ± 0,07 µg/mL, nous avons obtenu successivement, un extrait au méthanol de CE<sub>50</sub> de 53,00 ± 0,50 µg/mL puis une fraction à l'acétate d'éthyle (F1) avec une CE<sub>50</sub> de 61,83 ± 0,57 µg/mL après 72 heures d'incubation. D'autre part, la fraction à l'acétate d'éthyle (F1) retenue pour une séparation plus poussée des produits actifs a conduit à l'obtention des sous-fractions d'efficacité plus élevée avec la sous-fraction SF9 ayant une CE<sub>50</sub> ≤ 15,62 µg/mL. De plus, la séparation des composés actifs de cette sous-fraction a permis d'identifier une nouvelle sous-fraction SF9B ayant une efficacité très élevée avec une CE<sub>50</sub> de 2,75 ± 0,10 µg/mL qui est proche de celle du métronidazole avec une CE<sub>50</sub> de 1,38 ± 0,02 µg/mL après 48 heures d'incubation. Cependant, lorsque les composés de la sous-fraction SF9B sont séparés, il en résulte une perte ou baisse de l'activité de certains composés isolés. Seul le composé SF9B2 a présenté une efficacité élevée avec une CE<sub>50</sub> de 3,78 ± 0,31 µg/mL, inférieure à celle de la sous-fraction SF9B, contenant plusieurs composés selon son profil CLHP.

La perte ou la réduction de l'efficacité observée pendant le fractionnement suggère que les constituants de l'extrait ou des fractions pourraient agir par un effet synergique ou additif sur les cibles uniques ou multiples associées au processus physiologique conduisant à la mortalité des trophozoïtes d'*E. histolytica*. En effet, l'action synergique a été mise en évidence dans plusieurs cas comme un effet bénéfique car elle peut aider à éliminer les effets secondaires éventuels associés à la prédominance d'un composé unique dans l'organisme (**Kaufman et al., 1999; Briskin, 2000; Danjuma et al., 2012**). De plus, l'interaction entre les composés d'un extrait ou d'une fraction peut améliorer leur solubilité et ainsi améliorer leur biodisponibilité pour une efficacité maximale (**Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009**).

L'augmentation de l'efficacité des sous-fractions s'explique par une concentration des composés agissant par synergie. Cette synergie d'action est expérimentée par une perte ou

baisse d'activité lorsque les sous-fractions sont soumises à un fractionnement pour l'isolement des principes actifs. Par ailleurs, l'isolement des composés bioactifs à partir d'un extrait brut reste une procédure très complexe, suggérant ainsi que la phytothérapie, bien qu'ayant besoin de l'isolement des principes actifs, doit privilégier leur identification afin de définir un profil chimique et l'établissement de la phytoéquivalence pour assurer l'approbation et la standardisation des médicaments à base de plantes (Tyler, 1999). Toutefois, l'isolement de la sous-fraction SF9B et du composé SF9B2 dont la caractérisation de leurs structures chimiques permettra dans un futur proche le développement d'un médicament efficace dans le traitement de l'amibiase intestinale. Pour l'instant, notre étude apporte les preuves justifiant l'utilisation traditionnelle des feuilles de *C. variegatum* avec une possibilité immédiate de production d'un médicament traditionnel amélioré si les études toxicologiques révèlent l'innocuité de l'extrait aqueux aux doses thérapeutiques.

#### III.1.4. Conclusion partielle

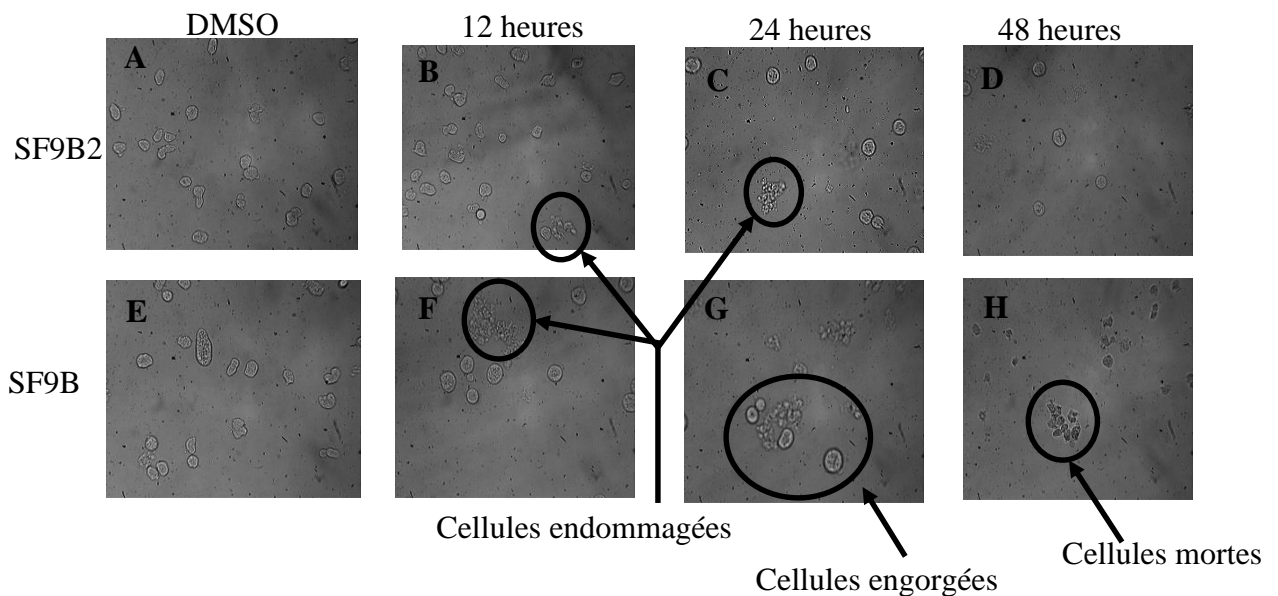
En définitive, eu égard aux résultats des différents essais, il ressort que :

- les différents extraits aqueux des feuilles de *C. variegatum* ont montré une activité antiamebique et l'extrait de plus grande efficacité a été celui obtenu des vieilles feuilles, récoltées à minuit ou le matin (à 6 h) à partir d'une plante cultivée en champ,
- le fractionnement de l'extrait aqueux a conduit à l'isolement de la sous-fraction SF9B ayant une efficacité assez prononcée proche de celle du métronidazole et les composés de cette sous-fraction agiraient de manière synergique et/ou additive,
- l'analyse chimique de la sous-fraction active SF9B a indiqué la présence des terpenoïdes, des flavonoïdes, des polyphénols et cette sous-fraction est constituée de plusieurs composés ayant des spectres similaires.

## III.2. Mécanisme d'action de la sous-fraction active SF9B sur les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica*

### III.2.1. Variations morphologiques des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* traités à la sous-fraction active SF9B et au composé SF9B2

Au cours des tests antiameobiques, nous avons noté que le traitement des trophozoïtes entraînait une variation morphologique en fonction de la période d'incubation. La figure 30 ci-dessous représente les différentes formes du parasite en fonction du temps d'incubation.

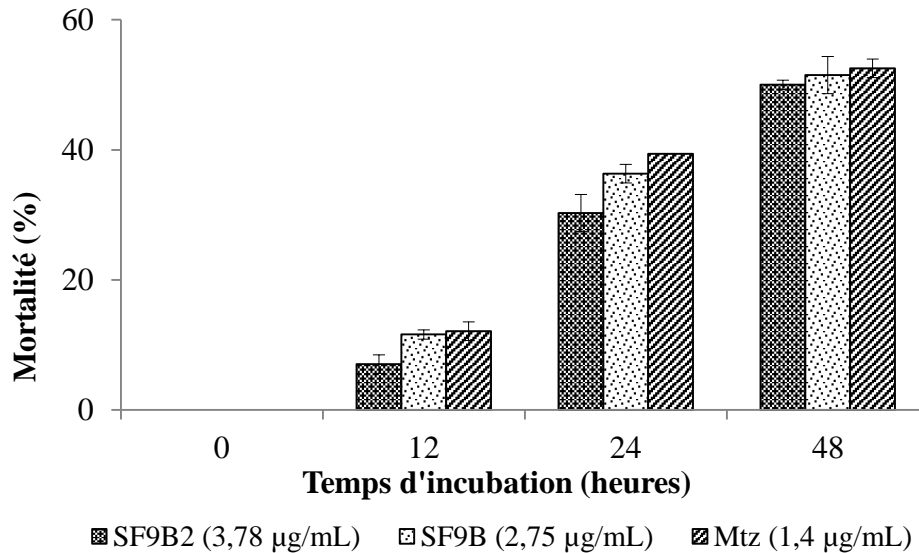


**Figure 30** : Variations morphologiques des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* induites par SF9B2 et SF9B sous microscope ordinaire (*Images au grossissement 200X*)

**Légende** : Le composé SF9B2 a été isolé de la sous-fraction SF9B (filtrat obtenu du lavage à l'éthanol de la sous-fraction SF9 et concentration à l'évaporateur rotatif). A et E indiquent les trophozoïtes traités au DMSO; B, C et D indiquent les trophozoïtes traités à la concentration de 3,78 µg/mL de SF9B2 respectivement après 12 heures, 24 heures et 48 heures; F, G et H indiquent les trophozoïtes traités à la concentration de 2,75 µg/mL de SF9B respectivement après 12 heures, 24 heures et 48 heures.

De cette figure, nous avons observé que la sous-fraction active SF9B et le composé SF9B2 entraînaient des dommages importants du parasite tout d'abord en induisant une modification de la forme des trophozoïtes par un engorgement (F et G), des dommages

cellulaires (B, C et F) et enfin survenait l'explosion des cellules ou la lyse cellulaire (H). Le comptage des cellules a permis d'évaluer la mortalité des trophozoïtes d'*E. histolytica* causée par la sous-fraction SF9B et le composé SF9B2 en fonction du temps (voir figure 31).



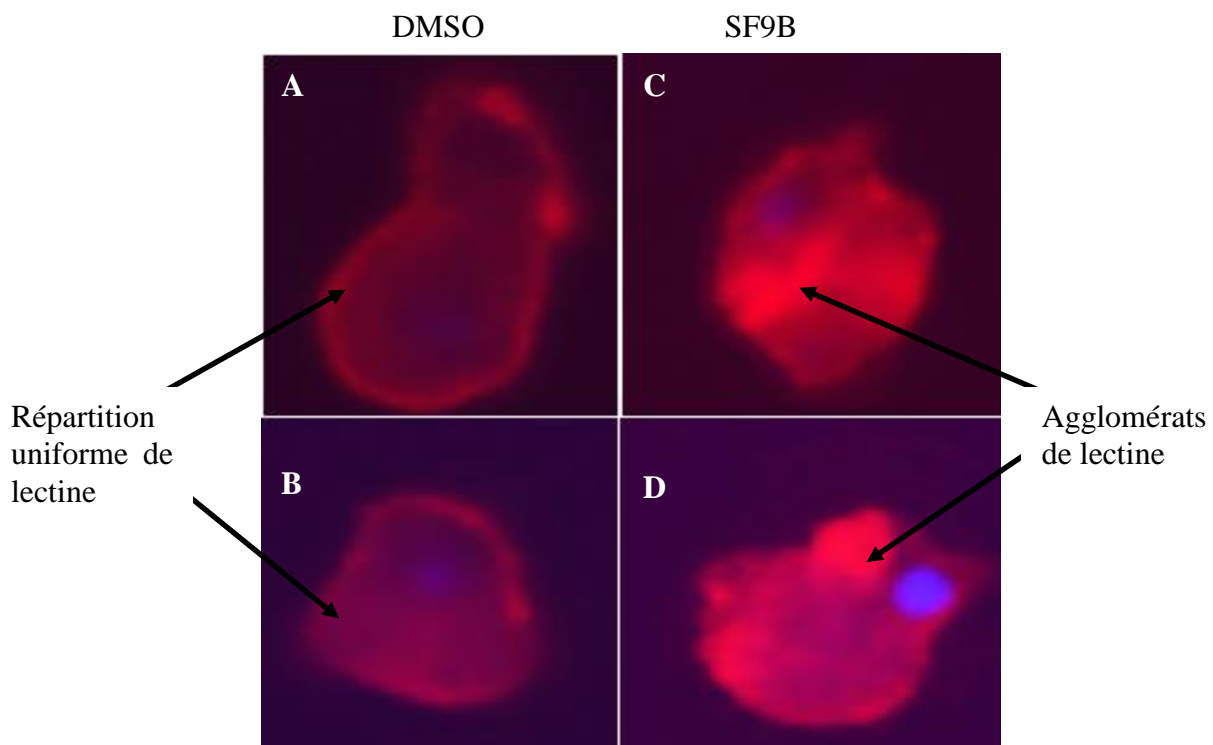
**Figure 31** : Mortalité des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* traités aux CE<sub>50</sub> de SF9B2, SF9B et métronidazole en fonction du temps de traitement

**Légende** : Le composé SF9B2 a été isolé de la sous-fraction SF9B (filtrat obtenu du lavage à l'éthanol de la sous-fraction SF9 et concentration à l'évaporateur rotatif), Mtz : métronidazole. Les trophozoïtes d'*E. histolytica* ont été traités au composé SF9B2 (3,78 µg/mL), à la sous-fraction SF9B (2,75 µg/mL) et au métronidazole (1,4 µg/mL) respectivement après 12 heures, 24 heures et 48 heures. Chaque valeur est la moyenne ± écart-type de 3 essais.

Après le traitement des trophozoïtes d'*E. histolytica* pendant 12, 24 et 48 heures, nous avons constaté que pour les produits testés, la mortalité des cellules observée est d'environ 10% après 12 heures d'incubation. Malgré ce taux de mortalité faible, l'effet sur la morphologie des trophozoïtes (engorgement de ces derniers) a été déjà identifiable au microscope (image F de la figure 30). Après 24 heures d'incubation, la mortalité s'accroît avec environ 30 à 40% des cellules mortes. Au-delà de 24 heures, la mortalité se situe autour de 50% avec une lyse des cellules (image H de la figure 30). Pour mieux caractériser les changements morphologiques observés ci-dessus, nous avons procédé à la localisation de la Gal/GalNAc lectine des trophozoïtes d'*E. histolytica* par l'immunofluorescence indirecte.

### III.2.2. Localisation de la Gal/GalNAc lectine chez les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* après traitement à la sous-fraction SF9B

La Gal/GalNAc lectine est une protéine abondante à la surface membranaire des trophozoïtes d'*E. histolytica*. Sa localisation chez les trophozoïtes traités à la sous-fraction SF9B a été utilisée pour caractériser de manière plus spécifique la variation morphologique observée lors de mort cellulaire. La figure 32 ci-dessous décrit l'effet de la sous-fraction SF9B sur la protéine Gal/GalNAc lectine de la membrane plasmique des trophozoïtes d'*E. histolytica*.



**Figure 32** : Immunomarquage de la Gal/GalNAc lectine chez les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* traités au DMSO et à la sous-fraction SF9B après 12 heures

**Légende** : Images prises au microscope à fluorescence au grossissement 600X. En rouge : marquage de la Gal/GalNAc lectine à la surface du trophozoïte, en bleu : marquage du noyau au DAPI. A et B indiquent les trophozoïtes traités au DMSO (0,5%) après 12 heures, C et D indiquent les trophozoïtes traités à la concentration de 2,75 µg/mL de la sous-fraction SF9B après 12 heures.

Cet immunomarquage de la Gal/GalNAc lectine a montré de manière générale que le traitement à la sous-fraction SF9B a entraîné un changement morphologique après 12 heures

d'incubation. Ce changement est caractérisé par l'accumulation de la protéine Gal/GalNAc lectine et la formation d'une sorte d'agglomérats à certains points de la surface du parasite (images C et D). La formation de ces agglomérats de la protéine Gal/GalNAc lectine serait le résultat d'une succession d'évènements opérés dans le parasite après traitement à travers l'activation des signaux cellulaires responsables de l'induction de la mort cellulaire. Pour en savoir plus sur les signaux cellulaires ou les modifications biochimiques pouvant expliquer la survenue de la mort des trophozoïtes d'*E. histolytica* après traitement à la sous-fraction SF9B, nous avons procédé à une analyse transcriptomique chez les trophozoïtes traités.

### III.2.3. Expression différentielle des gènes chez les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* traités à la sous-fraction SF9B

#### III.2.3.1. Pureté et intégrité des ARN totaux extraits

La pureté et l'intégrité des échantillons d'ARN ont été évaluées par dosage spectrophotométrique et par électrophorèse sur gel d'agarose respectivement. Le dosage spectrophotométrique permet de quantifier la concentration des ARNs totaux dans chaque échantillon. Trois essais indépendants ont été réalisés et le tableau VII ci-dessous présente la quantité des ARNs totaux dans chaque condition de traitement lors de chaque essai.

**Tableau VII** : Quantités des ARNs totaux ( $\mu\text{g}$ ) et rapports d'absorption de chaque échantillon

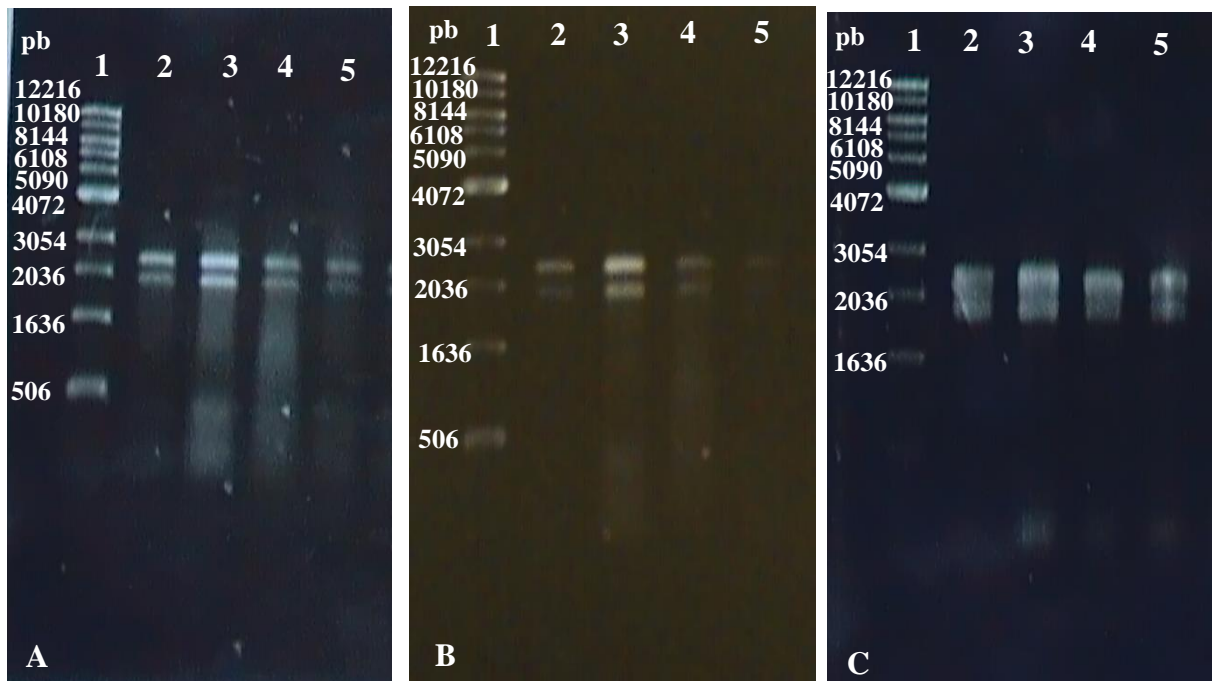
Traitement	ARNs totaux ( $\mu\text{g}$ )	DO <sub>260 nm</sub> /DO <sub>280 nm</sub>	DO <sub>260 nm</sub> /DO <sub>230 nm</sub>
DMSO (12h)	53,33 $\pm$ 15,27	1,75 $\pm$ 0,09	1,84 $\pm$ 0,17
DMSO (24h)	55,00 $\pm$ 15,00	1,80 $\pm$ 0,04	2,00 $\pm$ 0,07
SF9B (12h)	35,00 $\pm$ 8,66*	1,85 $\pm$ 0,06	1,98 $\pm$ 0,07
SF9B (24h)	28,33 $\pm$ 5,77**	1,78 $\pm$ 0,11	1,98 $\pm$ 0,06

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type de 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : différence significative entre les quantités des ARNs totaux extraits après traitement des trophozoïtes à la SF9B et au témoin DMSO correspondant, \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).



On a observé une baisse significative ( $p < 0,01$ ) des quantités des ARNs totaux extraits chez les trophozoïtes d'*E. histolytica* traités à la sous-fraction SF9B après 12 et 24 heures par rapport aux ARNs totaux des trophozoïtes traités au DMSO. Cette baisse serait due soit à l'effet cytotoxique causé par le traitement à la sous-fraction SF9B, soit à l'effet inhibiteur de cette sous-fraction sur l'expression des ARNs. Les rapports de densités optiques 260 nm/280 nm et 260 nm/230 nm sont respectivement autour de 1,8 et 2, ce qui atteste de la pureté des échantillons d'ARNs totaux extraits.

L'électrophorèse sur gel d'agarose des ARNs totaux de chaque échantillon permet d'évaluer toute dégradation de l'ARN lors de l'extraction. La dégradation de l'ARN est causée par la libération des enzymes des compartiments cellulaires lors de leur extraction à partir des échantillons biologiques ou par la contamination enzymatique d'origine humaine ou bactérienne. La figure 33 ci-dessous présente l'électrophorèse des ARNs totaux.



**Figure 33** : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% des échantillons des ARNs totaux

**Légende** : A, B et C sont respectivement les images des gels d'agarose sous lampe UV pour les 3 essais réalisés. La bande 1 est le marqueur *DNA Ikb*, les bandes 2, 3, 4 et 5 correspondent aux échantillons des ARNs totaux extraits chez les trophozoïtes traités au DMSO<sub>12h</sub>, DMSO<sub>24h</sub>, SF9B<sub>12h</sub> et SF9B<sub>24h</sub> respectivement. pb : paires de bases.

On observe de cette figure que les ARNs totaux extraits chez les trophozoïtes traités n'ont pas subi de dégradation lors de l'extraction. Ceci est identifié sur le gel d'agarose par la présence de deux bandes correspondant aux ARN 28S et 18S dans chaque échantillon.

### III.2.3.2. Profil d'expression des gènes chez les trophozoïtes d'*Entameba histolytica* traités à la sous-fraction active SF9B

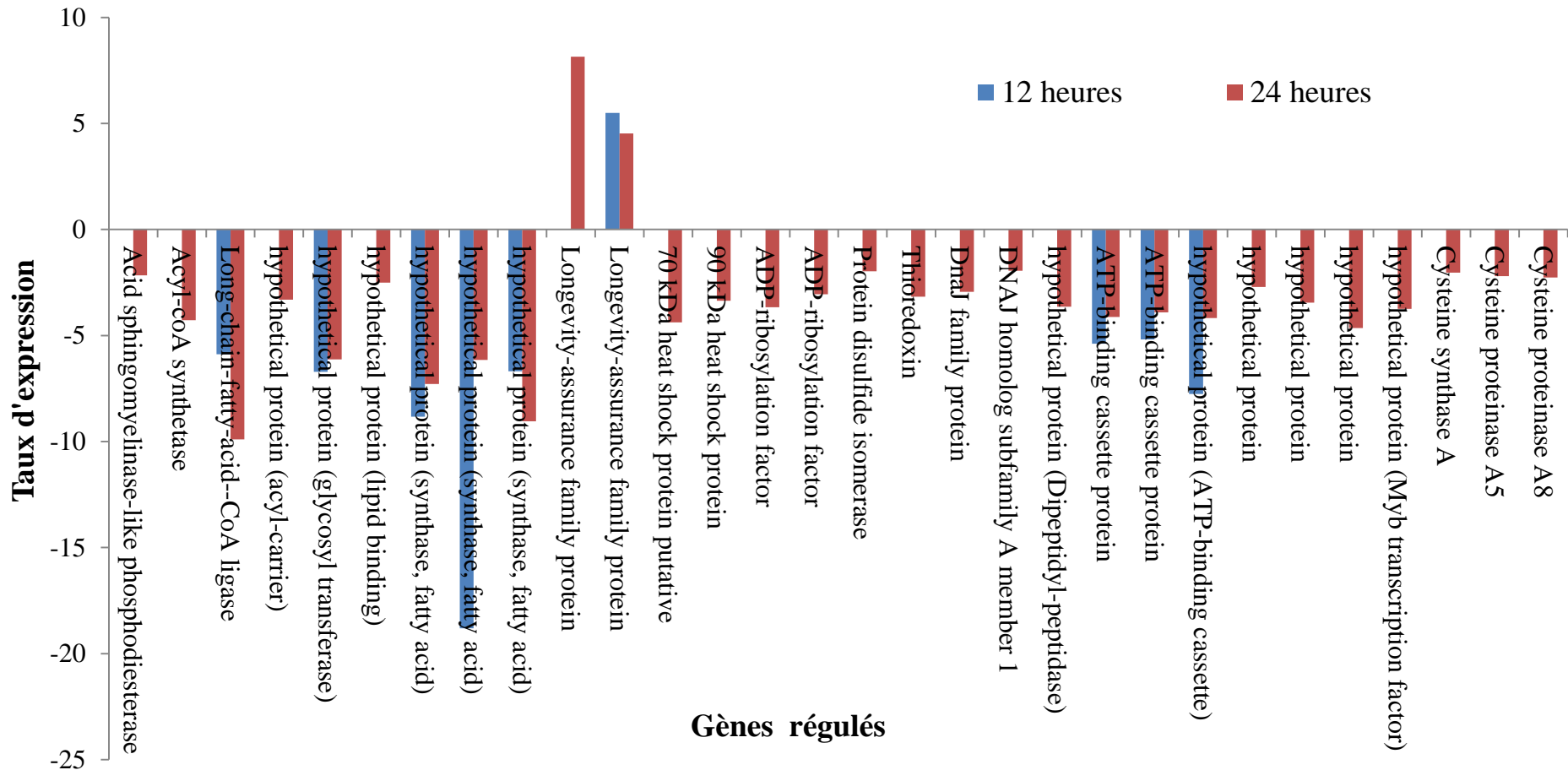
Les profils transcriptomiques des trophozoïtes d'*E. histolytica* traités à la sous-fraction active SF9B ou au DMSO comme témoin pendant 12 et 24 heures sur trois essais biologiques ont permis d'identifier les gènes transcrits dans chaque condition de traitement. Au total, 12 librairies ( $n = 4 \times 3$ ) ont été séquencées et en moyenne 13 millions de « reads » (allant de 5 à ~ 23 millions) ont été alignés aux gènes codants ( $n = 7312$ ) dans chacune des librairies. Un « read » est un fragment d'ADNc séquencé et aligné sur le génome de référence. Ainsi, le taux d'expression d'un gène est calculé à partir du nombre de copies des « reads » obtenus après traitement à la sous-fraction active SF9B comparé à celui obtenu dans le DMSO (témoin) pour le même gène. Les taux d'expression des différents gènes sont définis comme statistiquement significatifs lorsque  $p < 0,05$  respectivement par analyse aux logiciels *Cuffdiff version 2.0.2* et *DESeq version 1.12.0*. Les gènes exprimés de manière différentielle chez les trophozoïtes traités en comparaison au témoin pendant 12 ou 24 heures ont été identifiés tel que l'indique les tableaux en annexe.

Le tableau VIII et la figure 34 ci-dessous résument respectivement les processus physiologiques et biochimiques affectés dans chaque condition de traitement et le taux d'expression des gènes régulés de manière significative chez les trophozoïtes d'*E. histolytica* en fonction du temps de traitement.

**Tableau VIII** : Fonctions métaboliques affectées chez les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* après traitement à la sous-fraction active SF9B

*Identification du gène		Description	Taux d'expression	
			12 h	24 h
<b>Organisation cellulaire/Division cellulaire</b>				
01	EHI_040600	Acid sphingomyelinase	ns	-2,16
02	EHI_131880	Acyl-coA synthetase	ns	-4,28
03	EHI_079300	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase	-5,88	-9,9
04	EHI_140740	hypothetical protein (acyl-carrier)	ns	-3,31
05	EHI_073450	hypothetical protein (glycosyl transferase)	-6,71	-6,13
06	EHI_161070	hypothetical protein (lipid binding)	ns	-2,51
07	EHI_092490	hypothetical protein (synthase, fatty acid)	-8,83	-7,28
08	EHI_090430	hypothetical protein (synthase, fatty acid)	-18,81	-6,15
09	EHI_031640	hypothetical protein (synthase, fatty acid)	-6,68	-9,05
10	EHI_139080	Longevity-assurance family protein	ns	8,15
11	EHI_130860	Longevity-assurance family protein	5,5	4,53
<b>Stress et Oxydoréduction</b>				
12	EHI_199590	70 kDa heat shock protein putative	ns	-4,38
13	EHI_163480	90 kDa heat shock protein	ns	-3,36
14	EHI_073480	ADP-ribosylation factor	ns	-3,66
15	EHI_189960	ADP-ribosylation factor	ns	-3,05
16	EHI_071590	Protein disulfide isomerase	ns	-1,97
17	EHI_021560	Thioredoxin	ns	-3,17
18	EHI_022950	DNAJ family protein	ns	-2,94
19	EHI_182520	DNAJ homolog subfamily A member 1	ns	-1,94
20	EHI_019630	hypothetical protein (Dipeptidyl-peptidase)	ns	-3,64
<b>Production d'énergie</b>				
21	EHI_095820	ATP-binding cassette protein	-5,39	-4,12
22	EHI_178050	ATP-binding cassette protein	-5,18	-3,91
23	EHI_131560	hypothetical protein (ATP-binding cassette)	-7,76	-4,18
24	EHI_170940	hypothetical protein	ns	-2,71
25	EHI_119510	hypothetical protein	ns	-3,45
26	EHI_117580	hypothetical protein	ns	-4,65
27	EHI_013340	hypothetical protein (Myb factor)	ns	-3,74
<b>Virulence</b>				
28	EHI_060340	Cysteine synthase A	ns	-2,03
29	EHI_010850	Cysteine proteinase A5	ns	-2,2
30	EHI_039610	Cysteine proteinase A8	ns	-2,26

\*Numéro de référence sur le génome d'*Entamoeba histolytica* (Amoeba DB), ns: changements non significatifs. Les valeurs représentent le rapport entre la moyenne de «reads» obtenus après traitement à la sous-fraction active SF9B par rapport au DMSO comme témoin sur 3 essais biologiques après normalisation statistique aux logiciels *DESeq* et *Cuffdiff* respectivement.



**Figure 34** : Expression différentielle des gènes chez les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* en fonction du temps de traitement

**Légende** : Les valeurs représentent le rapport entre la moyenne de «reads» obtenus après traitement à la sous-fraction active SF9B par rapport au DMSO comme témoin sur 3 essais biologiques après normalisation statistique aux logiciels *DESeq* et *Cuffdiff* respectivement.

Neuf (9) et trente (30) gènes ont été significativement ( $p < 0,05$ ) exprimés respectivement après 12 et 24 heures d'incubation. Tous les 9 gènes exprimés après 12 heures d'incubation l'ont été également après 24 heures. Les taux d'expression de ces gènes sont comparables entre les deux périodes d'incubation, ce qui a permis de confirmer la cohérence des profils transcriptomiques entre les conditions et un changement progressif des profils en fonction du temps d'incubation (voir figure 34).

Des 30 gènes exprimés de manière différentielle, on a dénombré d'une part 28 gènes dont l'expression a été réprimée après le traitement à la sous-fraction active SF9B :

- neuf gènes sont impliqués dans l'organisation et la division cellulaire, parmi lesquels le gène (EHI\_040600) de la shingomyélinase acide (une enzyme qui est responsable de l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide et phosphocholine dans la membrane cellulaire). Les 8 autres gènes codent pour des enzymes (*acyl-coA synthetase*, *long-chain-fatty-acid-CoA ligase*, *acyl-carrier*, *glycosyl transferase*, *lipid binding* et *3 fatty acid synthases*) et sont impliquées dans la biosynthèse et le transport des lipides. Cinq de ces 8 gènes ont été réprimés après 12 heures de traitement à la sous-fraction active SF9B,
- neuf gènes codant pour les protéines (*70 kDa heat shock protein*, *90 kDa heat shock protein*, *2 × ADP-ribosylation factors*, *protein disulfide isomerase*, *thioredoxin*, *DNAJ family protein*, *DNAJ homolog subfamily A member 1*) et réprimés seulement après 24 heures de traitement à la sous-fraction active SF9B, sont impliqués dans le stress et les réactions d'oxydoréduction chez le parasite,
- sept gènes codant pour les protéines (*3 × ATP-binding cassette protein*, *3 × hypothetical protein* et *Myb factor*) parmi lesquels 3 gènes dont l'expression a été réprimée après 12 heures de traitement, sont impliqués dans la production d'énergie,

- trois gènes codant pour les enzymes (*Cysteine synthase A*, *Cysteine proteinase A5* et *Cysteine proteinase A8*) et tous reprimés seulement après 24 heures de traitement, sont impliqués dans la virulence du parasite.

D'autre part, seulement deux gènes distincts codant pour les protéines dites d'assurance de la longévité « *Longevity-assurance (LAG) proteins* » ont été surexprimés lors du traitement à la sous-fraction active SF9B. L'expression est progressive avec un gène (EHI\_130860) déjà exprimé après 12 heures et un second gène (EHI\_139080) s'y ajoutant après 24 heures de traitement.

#### III.2.4. Discussion partielle

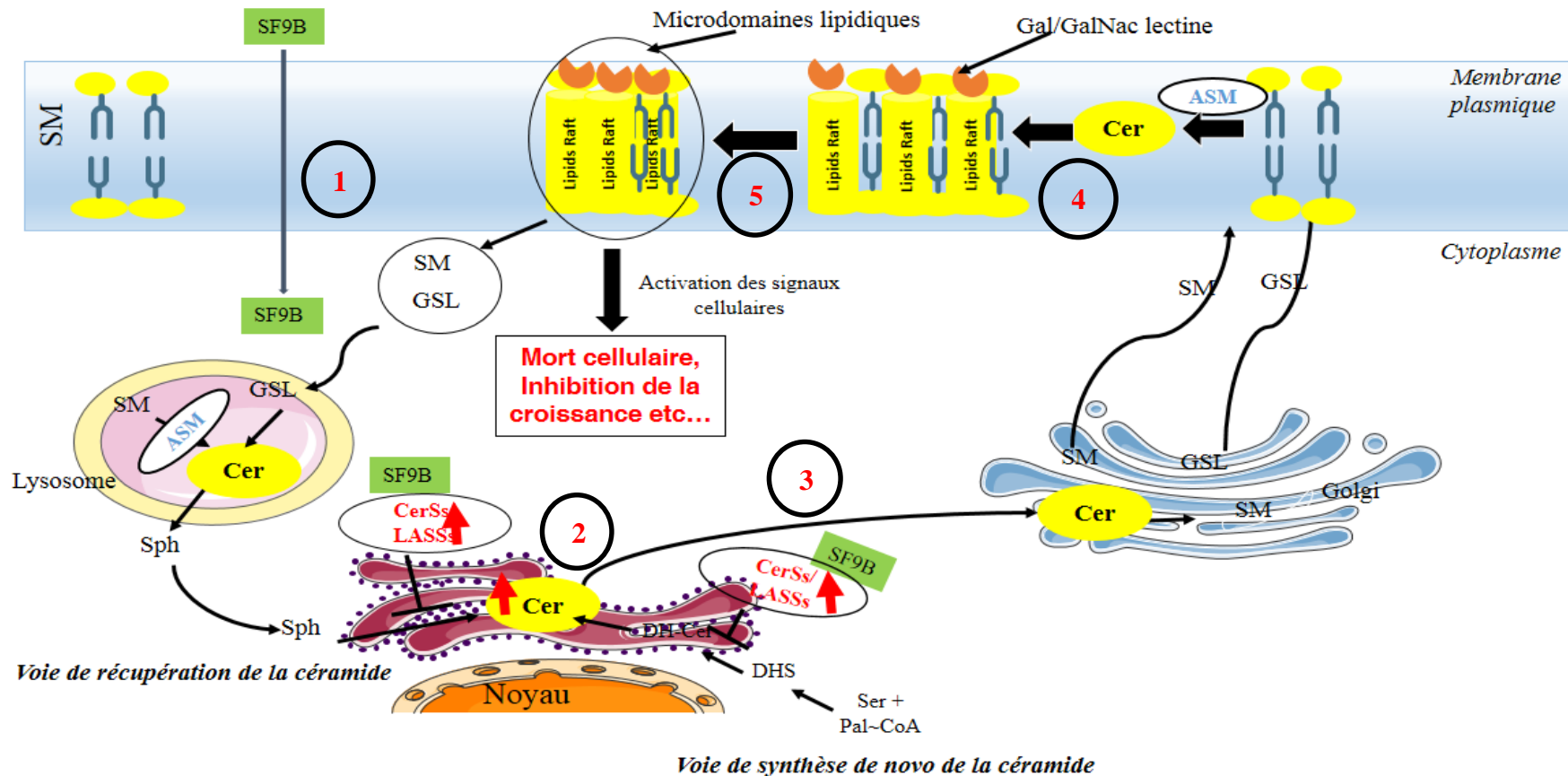
La recherche de l'efficacité des extraits de plante et la détermination de leur mécanisme d'action sont des défis majeurs et permanents pour la valorisation de la phytothérapie. Dans notre étude, nous avons observé lors du traitement des trophozoïtes, une variation morphologique contrairement à celle du témoin négatif suggérant que la mort induite par la sous-fraction active SF9B est l'aboutissement d'une succession de phénomènes biochimiques visant la déstabilisation des constituants de la membrane cellulaire et par-dessus le fonctionnement normale du parasite. Les cibles moléculaires affectées lors de cette succession des phénomènes conduisant à la mort du parasite ont été évaluées par l'immunofluorescence indirecte et par l'analyse transcriptomique par la méthode RNA-Seq.

Grâce à cette technologie avancée permettant l'évaluation du taux d'expression de milliers de gènes, nous avons comparé le transcriptome des trophozoïtes d'*E. histolytica* en fonction du temps de traitement à la sous-fraction active SF9B. L'application de cette technique dans l'étude des extraits de plantes a toujours prouvé une action sur plusieurs cibles moléculaires des différents composés pour produire l'effet physiologique observé (**Ulrich-Merzenich et al, 2007**). A cet effet, l'analyse transcriptomique selon les conditions de traitement avec la sous-fraction SF9B décrit une expression différentielle des gènes : d'une part,

la répression de 28 gènes et d'autre part la surexpression de 2 gènes. Parmi les gènes réprimés, 9 sont impliqués dans la biosynthèse de la céramide. La céramide, composée de la sphingosine et un acide gras, est située dans la membrane cellulaire comme un lipide bioactif impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que l'apoptose et l'inhibition de la croissance cellulaire (Stiban *et al.*, 2009). Ces 9 gènes réprimés incluent le gène de la shingomyélinase acide, enzyme qui catalyse la dégradation de la sphingomyéline en céramide et phosphorylcholine (Schuchman, 2010), et 8 autres gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras ou dans la production d'acyl-CoA. La répression de ces gènes pourrait impliquer une diminution des taux de céramide dans les trophozoïtes traités au produit actif SF9B. Par ailleurs, deux autres gènes distincts codant pour les protéines dites d'assurance de la longévité « *Longevity-assurance genes (LAG)* » ont été surexprimés lors du traitement. Ces deux protéines contiennent un domaine TLC (TRAM, LAG1 et CLN8) qui sont membres d'une nouvelle famille de protéines considérées comme étant impliquées dans le métabolisme, la détection des lipides dans le réticulum endoplasmique (Gorlich *et al.*, 1992 ; Pewzner-Jung *et al.*, 2006). Ces protéines contenant des domaines TLC encore dénommées « Céramide Synthase (CerS) » catalysent la synthèse de la céramide par les voies *de novo* et de récupération (Pewzner-Jung *et al.*, 2006). De plus, d'autres fonctions attribuées aux protéines TLC sont d'une part leur rôle dans la protection des protéines lors de la protéolyse par leur liaison aux ATPases vacuolaires (Pan *et al.*, 2001) et leur fonction de transport ou de liaison des lipides entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Sacher *et al.*, 1998). Selon les différentes fonctions essentielles de ces protéines, la surexpression des gènes *LAG* pourrait remédier à la déficience de la céramide chez les trophozoïtes traités. Avec une surexpression progressive de 5 à 8 fois en fonction du temps de traitement comparée au témoin, les taux élevés de céramide pourraient conduire à la modification des radeaux lipidiques membranaires associés à la lectine Gal/GalNAc, entraînant ainsi une activation des voies de signalisation

responsables de l'apoptose ou de l'inhibition de la croissance cellulaire (**Gulbins et al., 2004**). Ainsi, cette hypothèse est renforcée par le fait qu'au cours de la localisation de la lectine Gal/GalNAc par immunomarquage chez les trophozoïtes traités, nous avons observé une formation des agglomérats à la surface des ces derniers expliquant la survenue de la mort cellulaire à travers une coalescence des lipides membranaires en microdomaines par activation des protéines de signalisation inactifs en oligomères actifs responsables de la mort du parasite (**Welter et al., 2011**). Cette hypothèse doit être davantage explorée chez les trophozoïtes d'*E. histolytica*, toutefois elle peut être étayée d'une part par le fait que le traitement des cellules eucaryotes par les agents extracellulaires, tels que les agents chimiothérapeutiques, est responsable de l'accumulation de céramide (**Hannun and Luberto, 2000**). Cette accumulation de la céramide survient le plus souvent avant l'observation des variations morphologiques, suggérant son rôle capital dans la régulation de l'apoptose (**Hannun, 1996**). D'autre part, la mort cellulaire programmée a été identifiée chez les trophozoïtes d'*E. histolytica* et les caractéristiques morphologiques de ce processus comprennent l'arrondissement des cellules, la réduction du volume cellulaire, la condensation nucléaire, la fragmentation de l'ADN et la vacuolisation des trophozoïtes (**Villalba et al., 2007**). Certains de ces marqueurs ont été mis en évidence lors du traitement des trophozoïtes à la sous-fraction active SF9B suggérant que l'induction de la production de la céramide est l'étape clé pour la survenue de la mort des trophozoïtes. La figure 35 ci-dessous décrit l'hypothèse du mécanisme par lequel pourraient éventuellement agir les composés de la sous-fraction active SF9B.





**Figure 35** : Mécanisme d'action hypothétique de la sous-fraction active SF9B lors de la mort des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica*

**Légende** : 1 : traversée de la membrane plasmique facilitée par la répression des lipides membranaires, 2 : surexpression des gènes *LAG* et synthèse de la céramide par les voies de récupération et de *novo*, 3 : translocation de la céramide vers la membrane plasmique, 4 : accumulation de la céramide au niveau de la membrane plasmique, 5 : association de la céramide aux lipides rafts et à la lectine Gal/GalNAc pour la formation des microdomaines lipidiques induisant l'activation des signaux cellulaires responsables de la mort et l'inhibition de la croissance cellulaire. (ASM : sphingomyélinase acide, SM : sphingomyéline, GSL : glycosphingolipide, Cer : céramide, Sph : sphingosine, CerS : ceramide synthase, ER : endoplasmic reticulum).

D'autres gènes réprimés sont ceux codant pour les protéines du stress et de l'oxydoréduction, deux cystéine-protéinases et la cystéine synthase. La répression des "heat-shock proteins" (*Hsp 70* et *Hsp 90*), qui agissent comme des chaperones aux transducteurs de signal en bloquant certaines étapes de l'apoptose cellulaire (Beere, 2004; Arya *et al.*, 2007), indique l'inhibition de toute réparation de dommages cellulaires et ainsi annule toute chance de survie des trophozoïtes après exposition au produit actif SF9B. Un autre gène réprimé est celui codant pour la thiorédoxine, une protéine qui joue des fonctions métaboliques clés dans le maintien de l'équilibre d'oxydoréduction intracellulaire. De plus, la cystéine, un thiol majeur qui remplace le glutathion chez *E. histolytica* et qui joue un rôle principal dans la croissance et la survie des trophozoïtes d'*E. histolytica*, est synthétisée par une voie constituée de deux étapes catalysées respectivement par la serine acetyltransferase et la cystéine synthase (Fahey *et al.*, 1984; Kumar *et al.*, 2011). La répression du gène de la cystéine synthase suite au traitement au produit actif SF9B suggère la production d'un faible taux de cystéine qui est censée protéger les trophozoïtes d'*E. histolytica* contre le stress oxydatif, une cause de la mort cellulaire. Un autre groupe de gènes fortement réprimés est celui des gènes codant pour les protéines "ATP-binding cassette (ABC)" dont leur rôle est essentiel dans le transport et une variété de processus intracellulaires, y compris la régulation des gènes et de réparation de l'ADN (Klokouzas *et al.*, 2003 ; Sauvage *et al.*, 2009). Par ailleurs, la répression des cystéine-protéinases (CP-A5 et CP-A8) démontre une réduction de l'activité protéolytique de ces deux enzymes ou une réduction de la virulence chez les trophozoïtes traités. En effet, la CP-A5 en particulier joue un rôle clé dans l'invasion des tissus de l'hôte et leur destruction (Ankri *et al.*, 1999; Hou *et al.*, 2010).

De plus, les résultats de la RNA-Seq ont été renforcés par l'analyse du transcriptome des trophozoïtes d'*E. histolytica* traités par le métronidazole (50 µM) pendant une heure. L'expression des gènes a été évaluée en utilisant la technique de micropuce. Les gènes dont la transcription a été modifiée par la présence du métronidazole n'étaient pas significativement

modulés par le traitement à la sous-fraction active SF9B (voir annexe). En effet, après traitement au métronidazole, nous avons noté une répression du gène codant pour la peroxiredoxine mais aucun changement des gènes responsables de la biosynthèse de la céramide. La peroxiredoxine est un antigène de surface de 29 kDa riche en groupements thiols ayant une activité peroxydase et qui est susceptible d'être une protéine clé dans la protection du stress oxydatif interne ou externe chez *E. histolytica* (Poole *et al.*, 1997 ; Choi *et al.*, 2005).

### III.2.5. Conclusion partielle

L'étude du mécanisme d'action de la sous-fraction active SF9B lors de la mortalité chez les trophozoïtes d'*E. histolytica* nous a permis de conclure que :

- les composés de la sous-fraction active SF9B ont causé un changement morphologique chez les trophozoïtes à travers une désorganisation de la protéine Gal/GalNAc lectine,
- ces composés ont montré une action multi-cible à travers une régulation différentielle des gènes responsables de la production d'énergie, de la virulence, de l'organisation cellulaire, du stress et de l'oxydoréduction,
- la surexpression des protéines « *Longevity-assurance genes (LAG)* » encore appelées céramide synthase pourrait causer une augmentation du taux de céramide membranaire entraînant ainsi une activation des voies de signalisation responsables de la mort ou de l'inhibition de la croissance cellulaire,
- le profil d'expression des gènes après traitement à la sous-fraction active SF9B a été largement différent de celui obtenu après traitement au métronidazole, suggérant que la céramide pourrait être utilisée dans le futur comme cible dans le criblage de médicaments antiamoebiques.

### III.3. Toxicité *in vitro* et *in vivo* de l'extrait aqueux des feuilles de *Codiaeum variegatum* et de la sous-fraction active SF9B

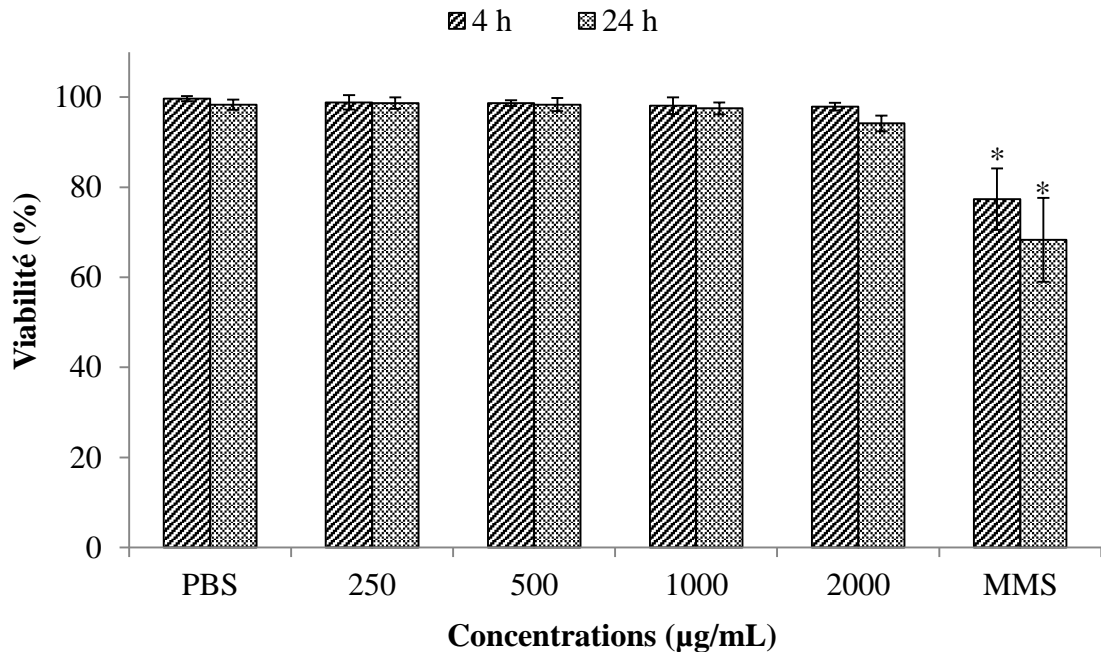
#### III.3.1. Toxicité *in vitro* de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active SF9B

##### III.3.1.1. Effet cytotoxique de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active SF9B

La cytotoxicité est la propriété d'un agent chimique ou biologique à être toxique pour les cellules jusqu'à causer des dommages cellulaires ou la mort. Ici, les cellules *L5178Y*, *HepG2* et *Caco-2* ont été traités à l'extrait aqueux et la sous-fraction SF9B pour l'évaluation de leur cytotoxicité.

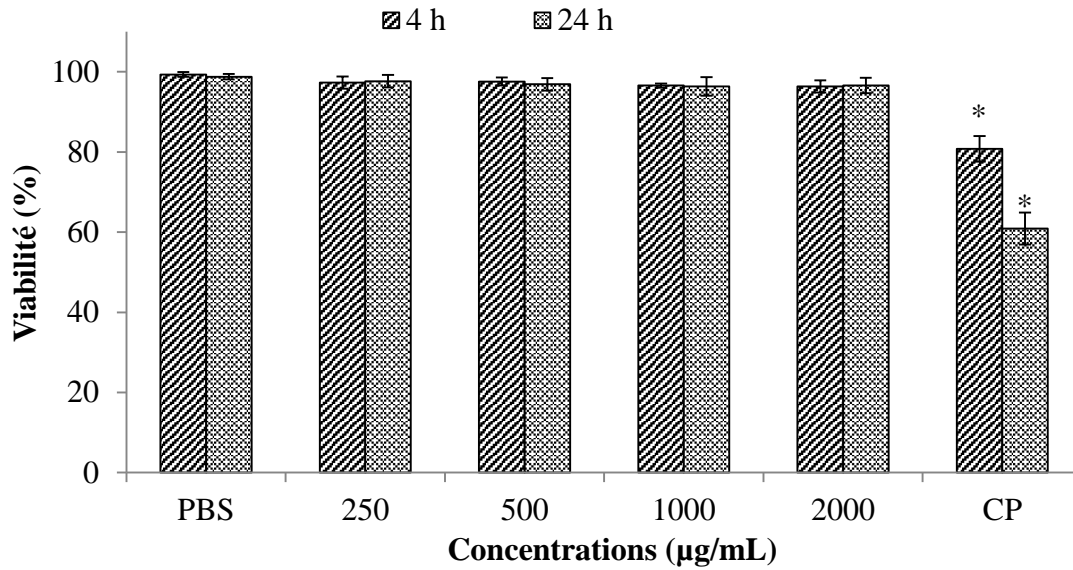
##### III.3.1.1.1. Cytotoxicité de l'extrait aqueux

Les figures 36, 37 et 38 ci-dessous décrivent l'effet cytotoxique de l'extrait aqueux après traitement respectivement des cellules *L5178Y*, *HepG2* et *Caco-2*.



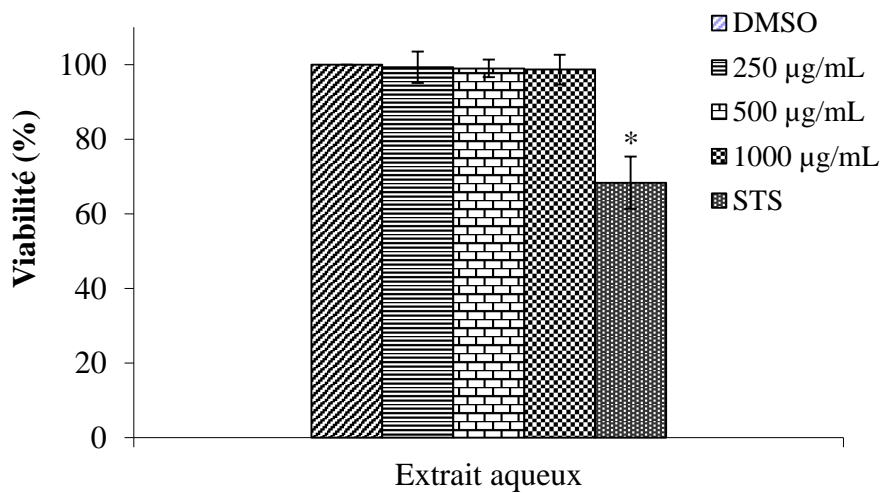
**Figure 36 :** Viabilité à la fluorescéine diacétate/gel red des cellules *L5178Y* après traitement à l'extrait aqueux pendant 4 et 24 heures

**Légende :** Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (PBS),  $p < 0,05$ . L'extrait aqueux a été testé aux concentrations de 250, 500, 1000 et 2000  $\mu\text{g/mL}$ . Le methyl methanesulfonate (MMS) à la concentration de 200  $\mu\text{M}$  a été utilisé comme témoin positif.



**Figure 37 :** Viabilité à la fluorescéine diacétate/gel red des cellules *HepG2* après traitement à l'extrait aqueux pendant 4 et 24 heures

**Légende :** Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (PBS),  $p < 0,05$ . L'extrait aqueux a été testé aux concentrations de 250, 500, 1000 et 2000  $\mu\text{g/mL}$ . Le cyclophosphamide (CP) à la concentration de 2,5 mM a été utilisé comme témoin positif.



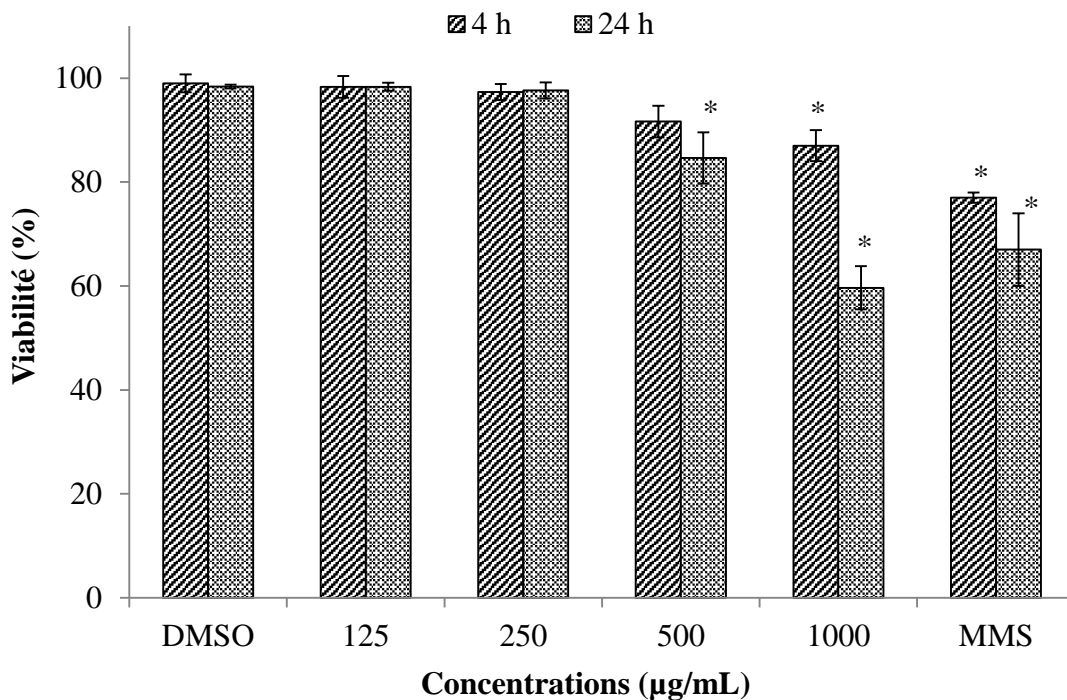
**Figure 38 :** Viabilité au bleu trypan des cellules *Caco-2* après traitement à l'extrait aqueux pendant 48 heures

**Légende :** Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (DMSO),  $p < 0,05$ . L'extrait aqueux a été testé aux concentrations de 250, 500 et 1000  $\mu\text{g/mL}$ . La staurosporine (STS) à la concentration de 0,1  $\mu\text{M}$  a été utilisé comme témoin positif.

Il en résulte que l'extrait aqueux des feuilles de *C. variegatum* n'a pas eu d'effet cytotoxique significatif sur les cellules *Caco-2* jusqu'à la concentration de 1000 µg/mL et 2000 µg/mL sur les cellules *L5178Y* et *HepG2*. Au-delà de ces concentrations, l'extrait aqueux devient insoluble dans les solvants respectifs utilisés pour la dissolution. Par contre, le méthyl methanesulfonate (MMS), la staurosporine et le cyclophosphamide (CP) ont causé une cytotoxicité significative ( $p < 0,05$ ) avec environ 20 à 40% des cellules mortes après 4 et 24 heures de traitement respectivement.

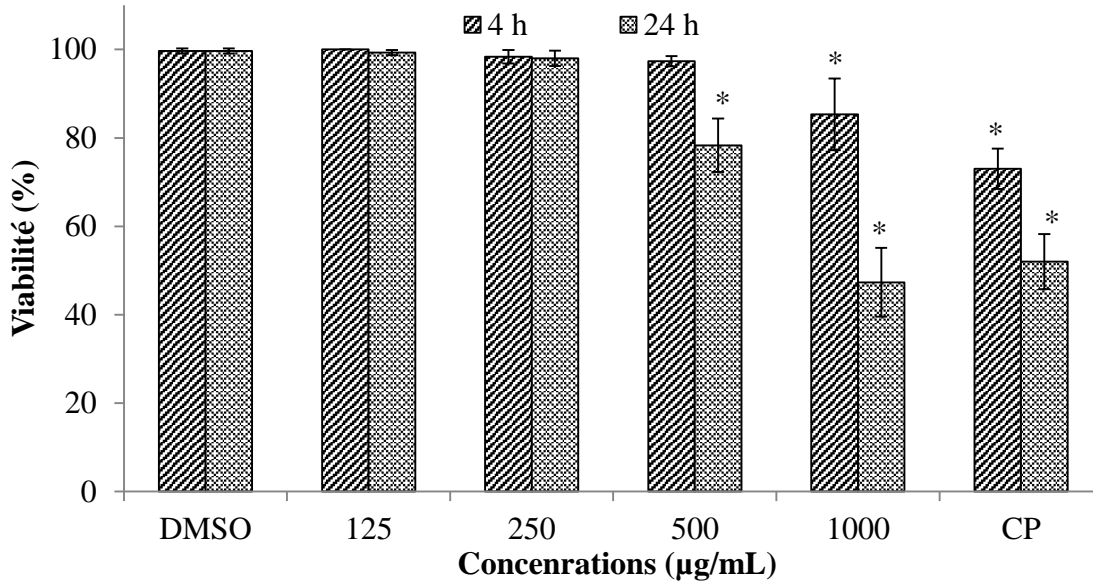
### III.3.1.1.2. Cytotoxicité de la sous-fraction active SF9B

Les figures 39, 40 et 41 ci-dessous décrivent respectivement la viabilité des cellules *L5178Y*, *HepG2* et *Caco-2* après traitement avec la sous-fraction active SF9B.



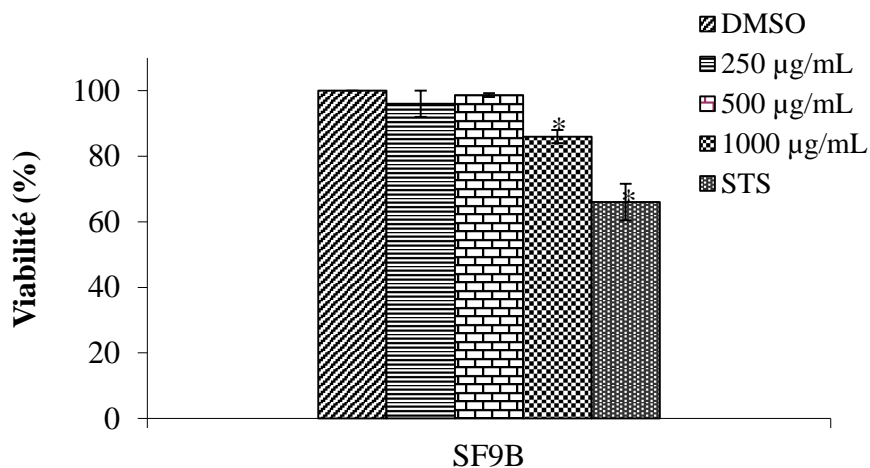
**Figure 39** : Viabilité à la fluorescéine diacétate/gel red des cellules *L5178Y* après 4 et 24 heures de traitement avec la sous-fraction active SF9B

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (DMSO),  $p < 0,05$ . La sous-fraction SF9B a été testée aux concentrations de 125, 250, 500 et 1000 µg/mL. Le méthyl methanesulfonate (MMS) à la concentration de 200 µM a été utilisé comme témoin positif.



**Figure 40** : Viabilité à la fluorescéine diacétate/gel red des cellules *HepG2* après 4 et 24 heures de traitement avec la sous-fraction active SF9B

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (DMSO),  $p < 0,05$ . La sous-fraction SF9B a été testée aux concentrations de 125, 250, 500 et 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Le cyclophosphamide (CP) à la concentration de 2,5 mM a été utilisé comme témoin positif.



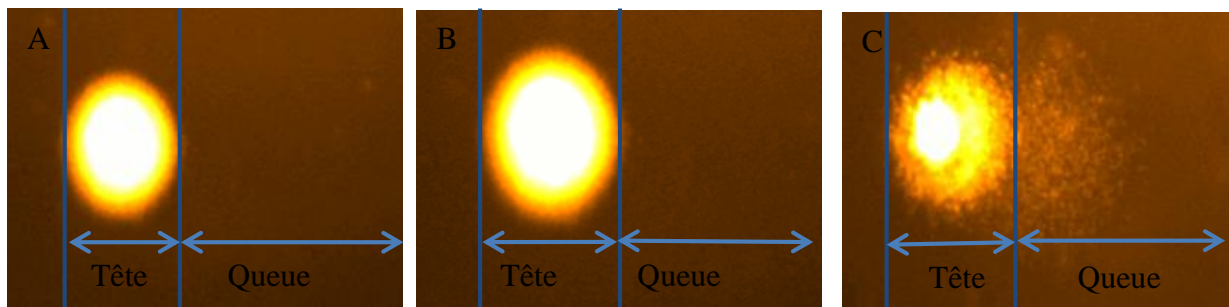
**Figure 41** : Viabilité au bleu trypan des cellules *Caco-2* après 48 heures de traitement avec la sous-fraction active SF9B

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (DMSO),  $p < 0,05$ . La sous-fraction SF9B a été testée aux concentrations de 250, 500 et 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Le méthyl staurosporine (STS) à la concentration de 0,1  $\mu\text{M}$  a été utilisé comme témoin positif.

La sous-fraction active SF9B n'a pas montré de différence significative sur la mortalité cellulaire par rapport au témoin négatif jusqu'à la concentration de 250 µg/mL chez les 3 lignées cellulaires. Au-delà de cette concentration, on a observé une baisse significative ( $p < 0,05$ ) de la viabilité par rapport au témoin négatif avec environ 10 à 55% de cellules non viables.

### III.3.1.2. Effet de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active SF9B sur l'ADN des cellules

Les résultats du test des comètes traduisent une réponse précoce ou immédiate qui survient sur l'ADN d'une cellule lorsqu'elle est traitée par un agent génotoxique. En effet, les dommages causés sur l'ADN sont généralement transitoires et sont susceptibles d'être réparés. Ainsi, l'effet obtenu lors de chaque essai représente l'interaction entre la génération des dommages sur l'ADN et leurs mécanismes de réparation. La figure 42 ci-dessous indique la variation des dommages causés sur l'ADN après traitement au DMSO, à la sous-fraction SF9B et au methyl methanesulfonate (MMS).



**Figure 42** : Quantification des cassures sur l'ADN lors du test des comètes

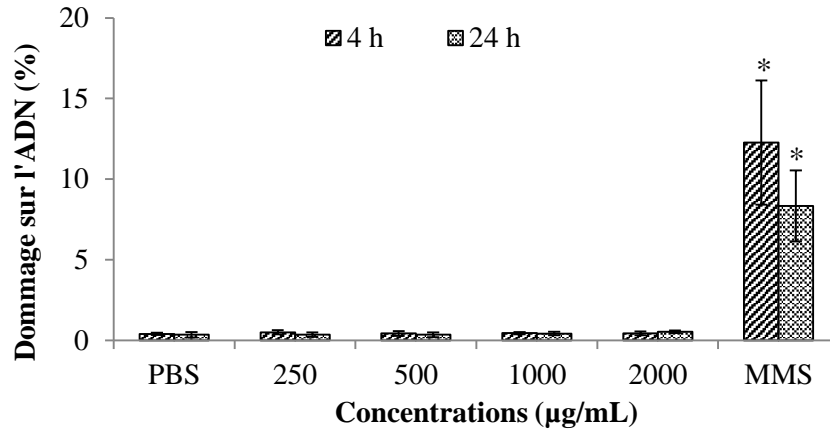
**Légende** : les images A et B représentent les noyaux intacts des cellules traitées respectivement au DMSO et à la sous-fraction active SF9B, l'image C indique le noyau endommagé des cellules traitées au methyl methanesulfonate (MMS).

On observe de cette figure que le témoin négatif (DMSO) et la sous-fraction SF9B n'ont pas causé des dommages sur l'ADN contenu dans les noyaux des cellules traitées, tandis que le témoin positif (MMS) a entraîné des cassures sur l'ADN des cellules traitées. Ceci est indiqué par la migration des fragments d'ADN du noyau à l'allure d'une comète.



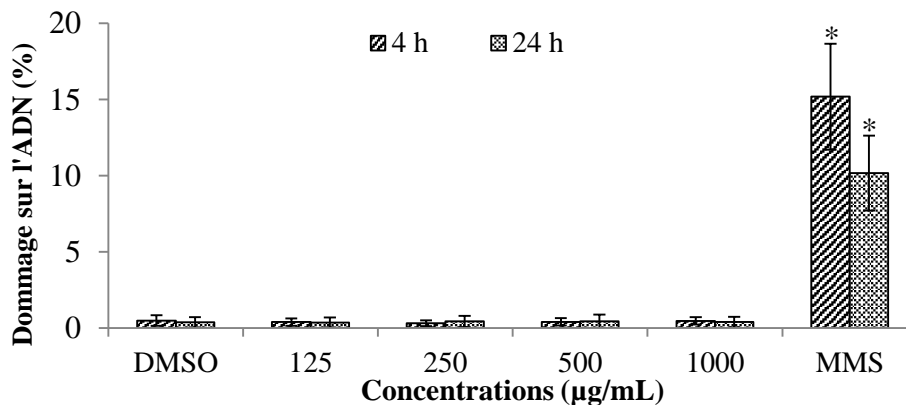
### III.3.1.2.1. Dommages sur l'ADN chez les cellules *L5178Y*

Les figures 43 et 44 représentent le pourcentage d'ADN endommagé chez les cellules *L5178Y* traitées aux concentrations croissantes de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active SF9B respectivement.



**Figure 43 :** Dommages sur l'ADN des cellules *L5178Y* en fonction des concentrations de l'extrait aqueux pendant 4 et 24 heures

**Légende :** Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (PBS),  $p < 0,05$ . L'extrait aqueux a été testé aux concentrations de 250, 500, 1000 et 2000 µg/mL. Le méthylmethanesulfonate (MMS) à la concentration de 150 µM a été utilisé comme témoin positif.



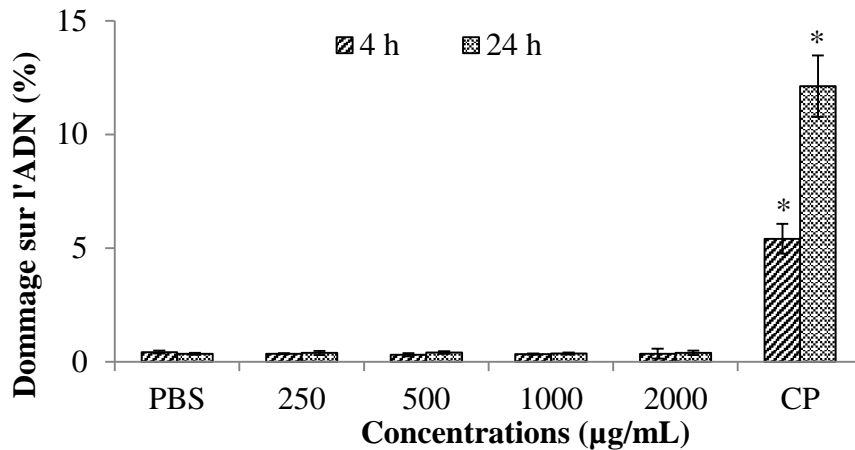
**Figure 44 :** Dommages sur l'ADN des cellules *L5178Y* en fonction des concentrations de la sous-fraction active SF9B pendant 4 et 24 heures

**Légende :** Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (DMSO),  $p < 0,05$ . La sous-fraction SF9B a été testée aux concentrations de 125, 250, 500 et 1000 µg/mL. Le méthylmethanesulfonate (MMS) à la concentration de 150 µM a été utilisé comme témoin positif.

On observe à partir des figures ci-dessus que tant l'extrait aqueux que la sous-fraction active SF9B n'a pas entraîné de dommage significatif sur l'ADN des cellules *L5178Y* traitées par rapport au témoin négatif après 4 et 24 heures. Par contre, le MMS a induit des dommages significatifs ( $p < 0,05$ ) sur l'ADN, malgré le fait qu'on n'ait pas observé une différence entre les temps de traitement.

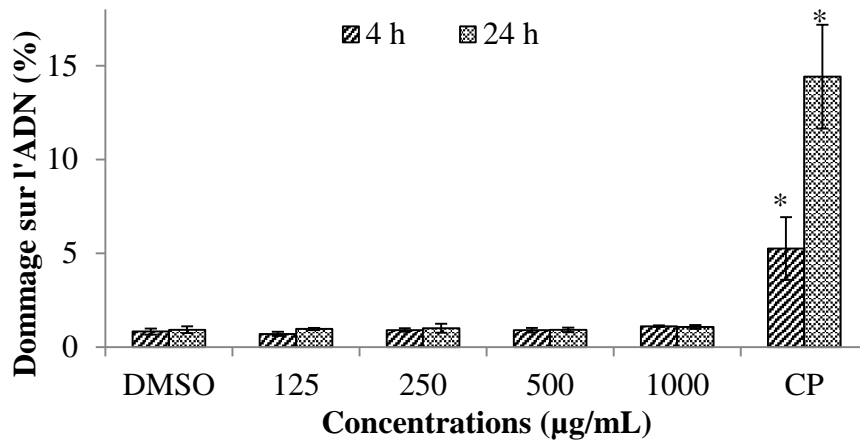
### III.3.1.2.2. Dommage sur l'ADN chez les cellules *HepG2*

Les figures 45 et 46 illustrent le pourcentage d'ADN endommagé sur les cellules *HepG2* traitées respectivement à l'extrait aqueux et à la sous-fraction active SF9B.



**Figure 45 :** Dommage sur l'ADN des cellules *HepG2* en fonction des concentrations de l'extrait aqueux pendant 4 et 24 heures

**Légende :** Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (PBS),  $p < 0,05$ . L'extrait aqueux a été testé aux concentrations de 250, 500, 1000 et 2000 µg/mL. Le cyclophosphamide (CP) à la concentration de 200 µM a été utilisé comme témoin positif.



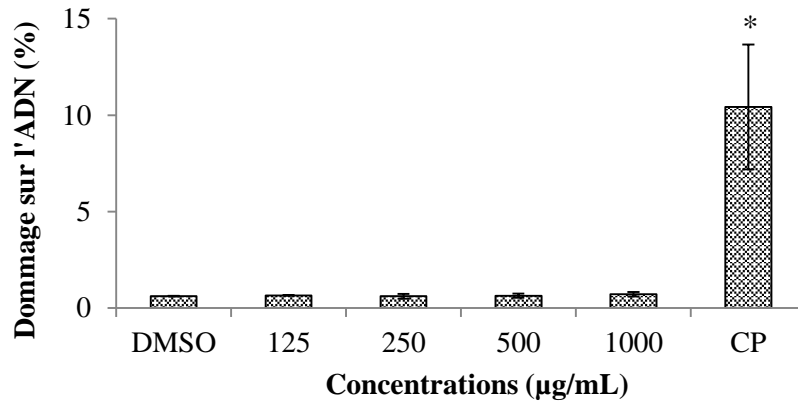
**Figure 46 :** Domage sur l'ADN des cellules *HepG2* en fonction des concentrations de la sous-fraction active SF9B pendant 4 et 24 heures

**Légende :** Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (DMSO),  $p < 0,05$ . La sous-fraction SF9B a été testée aux concentrations de 125, 250, 500 et 1000 µg/mL. Le cyclophosphamide (CP) à la concentration de 200 µM a été utilisé comme témoin positif.

Il ressort de ces figures que l'extrait aqueux et la sous-fraction active SF9B n'ont pas entraîné de domage significatif sur l'ADN des cellules *HepG2* traitées par rapport au témoin négatif après 4 et 24 heures.

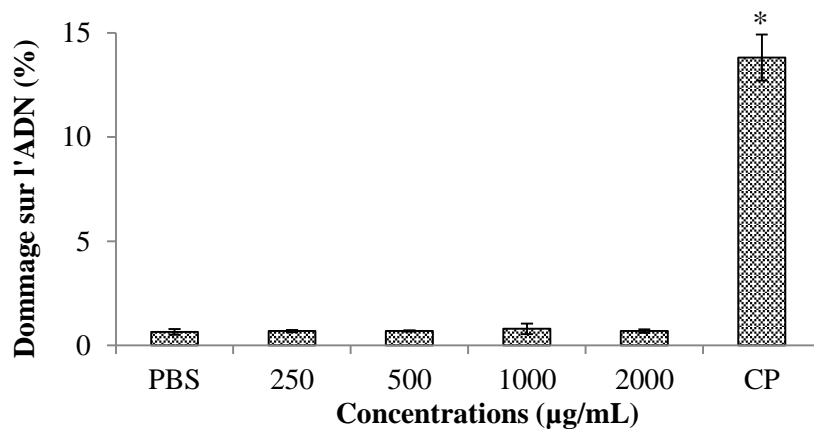
### III.3.1.2.3. Domage sur l'ADN chez les cellules primaires du foie de rat

Les figures 47 et 48 ci-dessous représentent les dommages sur l'ADN des cellules primaires hépatiques après 2 heures de traitement à la sous-fraction active SF9B et à l'extrait aqueux respectivement.



**Figure 47** : Dommage sur l'ADN des cellules primaires de foie de rat en fonction des concentrations de la sous-fraction active SF9B pendant 2 heures

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (DMSO),  $p < 0,05$ . La sous-fraction SF9B a été testée aux concentrations de 125, 250, 500 et 1000 µg/mL. Le cyclophosphamide (CP) à la concentration de 200 µM a été utilisé comme témoin positif.



**Figure 48** : Dommage sur l'ADN des cellules primaires de foie de rat en fonction des concentrations de l'extrait aqueux pendant 2 heures

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (PBS),  $p < 0,05$ . L'extrait aqueux a été testé aux concentrations de 250, 500, 1000 et 2000 µg/mL. Le cyclophosphamide (CP) à la concentration de 200 µM a été utilisé comme témoin positif.

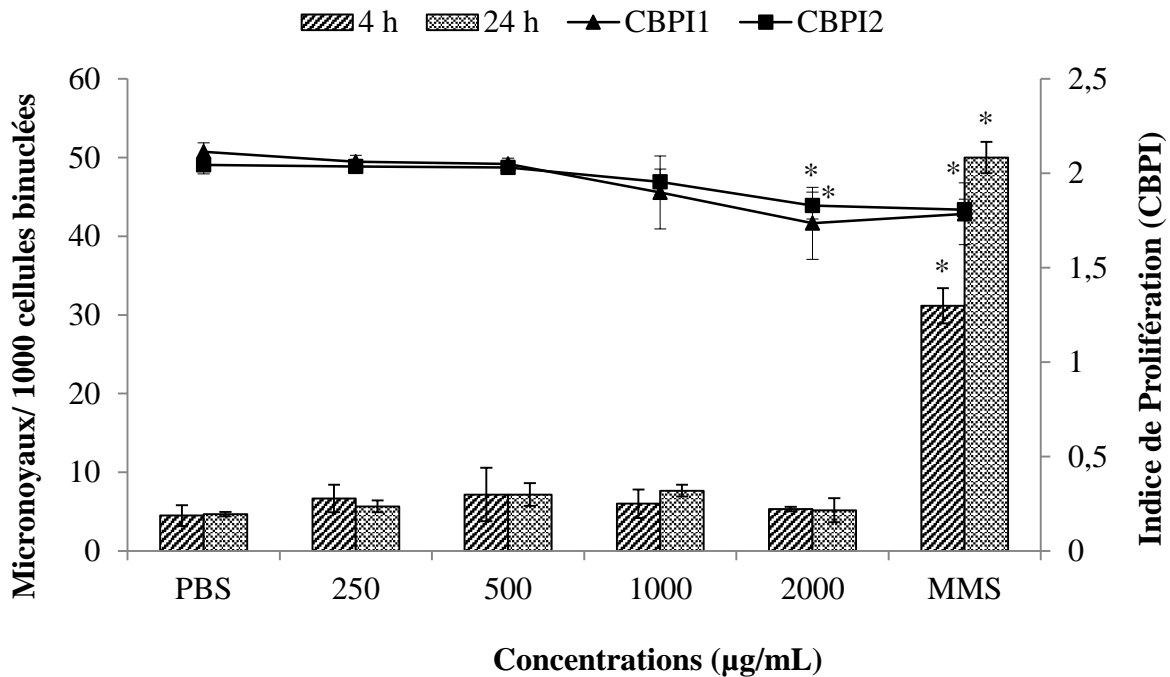
L'extrait aqueux et la sous-fraction active SF9B n'ont pas causé de dommage significatif sur l'ADN des cellules primaires hépatiques traitées par rapport au témoin négatif après 2 heures de traitement.

### III.3.1.3. Effet de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active sur la formation des micronoyaux

La formation d'un micronoyau suite à l'exposition d'une cellule à une substance génotoxique traduit un dommage plus grave et irréversible causé sur l'ADN. L'effet génotoxique est identifié par une augmentation significative du nombre de micronoyaux chez les cellules traitées.

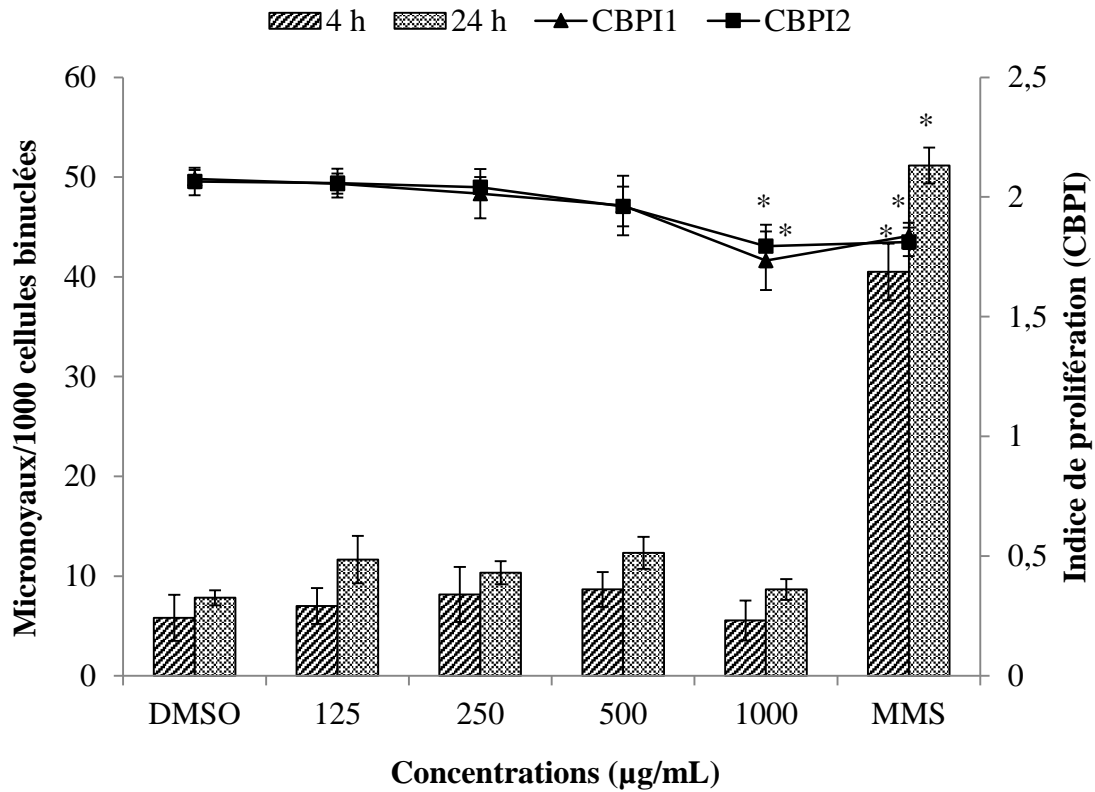
#### III.3.1.3.1. Formation des micronoyaux chez les cellules L5178Y

Les figures 49 et 50 ci-dessous représentent le nombre de micronoyaux obtenus aux différentes concentrations pour l'extrait aqueux et la sous-fraction SF9B respectivement.



**Figure 49** : Formation des micronoyaux et prolifération des cellules L5178Y après 4 et 24 heures de traitement avec l'extrait aqueux

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (PBS),  $p < 0,05$ . L'extrait aqueux a été testé aux concentrations de 250, 500, 1000 et 2000 µg/mL. Le méthyl methanesulfonate (MMS) à la concentration de 200 µM a été utilisé comme témoin positif. CBPI1 et CBPI2 sont les indices de prolifération à la cytochalasine B des cellules traitées à l'extrait aqueux pendant 4 et 24 h respectivement.



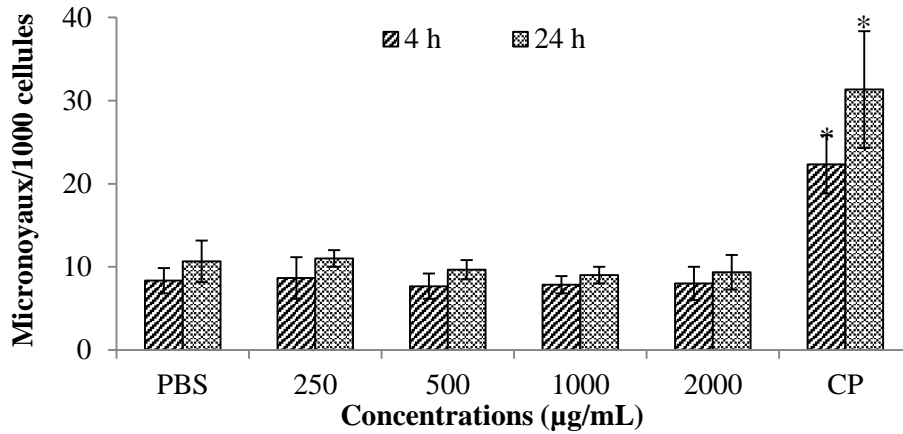
**Figure 50** : Formation des micronoyaux et prolifération des cellules *L5178Y* après 4 et 24 heures de traitement à la sous-fraction active SF9B

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (DMSO),  $p < 0,05$ . La sous-fraction SF9B a été testée aux concentrations de 125, 250, 500 et 1000 µg/mL. Le méthyl methanesulfonate (MMS) à la concentration de 200 µM a été utilisé comme témoin positif. CBPI1 et CBPI2 sont les indices de prolifération à la cytochalasine B des cellules traitées à la sous-fraction SF9B pendant 4 et 24 h respectivement.

L'extrait aqueux et la sous-fraction amoebicide SF9B n'ont entraîné aucune induction significative de la formation des micronoyaux sur les cellules *L5178Y* après 4 et 24 heures d'incubation par rapport au témoin négatif. Par ailleurs, le MMS, un composé qui induit la formation d'adduits sur l'ADN, a montré une induction significative ( $p < 0,05$ ) de la formation des micronoyaux variant avec le temps de traitement. On a noté une réduction significative ( $p < 0,05$ ) de la prolifération des cellules aux concentrations élevées de l'extrait aqueux (2000 µg/mL) et de la sous-fraction active SF9B (1000 µg/mL).

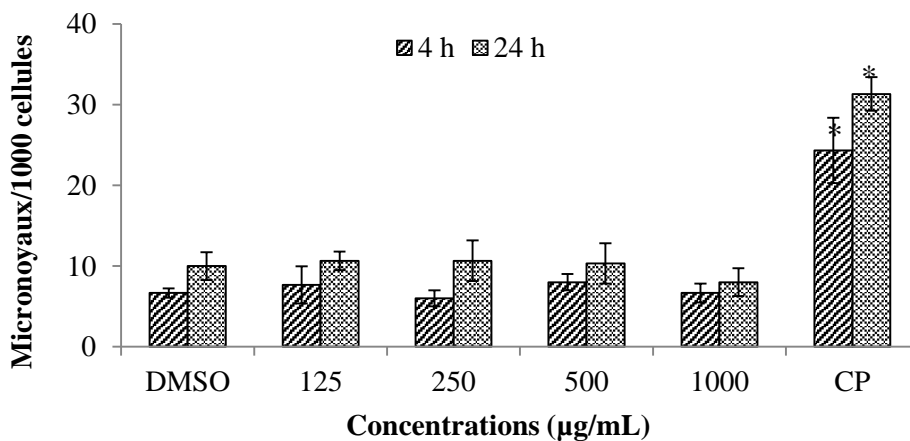
### III.3.1.3.2. Formation des micronoyaux chez les cellules *HepG2*

Les figures 51 et 52 ci-dessous représentent le nombre de micronoyaux obtenus aux différentes concentrations pour l'extrait aqueux et la sous-fraction SF9B respectivement.



**Figure 51** : Formation des micronoyaux des cellules *HepG2* après 4 et 24 heures de traitement avec l'extrait aqueux

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (PBS),  $p < 0,05$ . L'extrait aqueux a été testé aux concentrations de 250, 500, 1000 et 2000 µg/mL. Le cyclophosphamide (CP) à la concentration de 200 µM a été utilisé comme témoin positif.



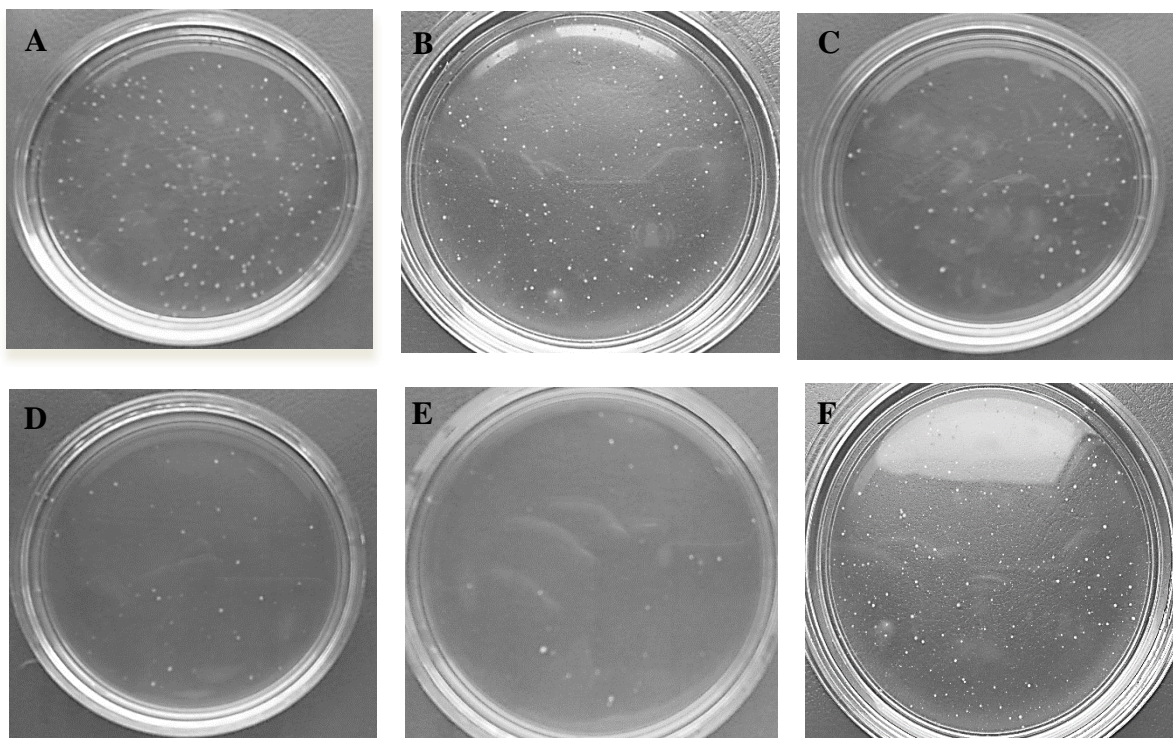
**Figure 52** : Formation des micronoyaux des cellules *HepG2* après 4 et 24 heures de traitement à la sous-fraction active SF9B

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de Student-Newman-Keuls : \* différence significative par rapport au témoin négatif (DMSO),  $p < 0,05$ . La sous-fraction SF9B a été testée aux concentrations de 125, 250, 500 et 1000 µg/mL. Le cyclophosphamide (CP) à la concentration de 200 µM a été utilisé comme témoin positif.

L'extrait aqueux et la sous-fraction amoebicide SF9B n'ont montré aucune induction significative de la formation des micronoyaux sur les cellules *HepG2* après 4 et 24 heures d'incubation comparativement au témoin négatif. Le cyclophosphamide, un pro-médicament qui nécessite l'activation métabolique des enzymes de la *mixed-function oxidase* (MFO) pour induire les dommages sur l'ADN, a montré une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la formation des micronoyaux.

#### III.3.1.4. Effet mutagène de l'extrait aqueux et de la sous-fraction SF9B

La figure 53 ci-dessous indique la formation des colonies survivantes et mutantes des cellules *L5178Y* sur le milieu agar normal ou sur milieu sélectif contenant la trifluorothymidine respectivement lors de l'évaluation de la cytotoxicité et de l'effet mutagène.



**Figure 53 :** Colonies des cellules *L5178Y* formées dans les boîtes de Pétri lors de l'évaluation de la mutagénicité

**Légende :** A, B et C représentent les colonies survivantes des cellules *L5178Y* sur milieu agar normal après traitement au DMSO (témoin négatif), à la sous-fraction SF9B et au methyl methanesulfonate (témoin positif) respectivement. D, E et F représentent les colonies mutantes des cellules *L5178Y* sur milieu sélectif après traitement au DMSO (témoin négatif), à la sous-fraction active SF9B et au methyl methanesulfonate (témoin positif) respectivement.



Il ressort de cette figure que le MMS est plus cytotoxique que la sous-fraction active SF9B. La cytotoxicité de chaque substance testée est obtenue à partir du nombre de colonies survivantes des cellules *L5178Y* comptées entre le témoin négatif et l'essai. Par ailleurs, le MMS a induit une augmentation des colonies mutantes des cellules *L5178Y* par rapport au témoin négatif. Il en résulte que l'effet mutagène de la substance testée est identifié par la formation des colonies mutantes qui se multiplient aisément sur le milieu sélectif contenant la trifluorothymidine.

#### III.3.1.4.1. Effet mutagène après un traitement à court terme des cellules *L5178Y*

Les tableaux IX et X ci-dessous résument le nombre de colonies des cellules *L5178Y* comptées avec ou sans addition du TFT après 4 heures de traitement à l'extrait aqueux de *C. variegatum* et à la sous-fraction active SF9B respectivement.

**Tableau IX** : Nombre de colonies et efficacité du clonage des cellules *L5178Y* après 4 heures de traitement à l'extrait aqueux

	Nombre de colonies survivantes	Nombre de colonies mutantes	Efficacité du Clonage (%)
PBS	530 ± 40	70 ± 4	88,0 ± 6,2
250 µg/mL	520 ± 44	71 ± 6	86,6 ± 7,3
500 µg/mL	506 ± 52	75 ± 5	84,1 ± 8,4
1000 µg/mL	471 ± 84	90 ± 20	78,4 ± 13,9
2000 µg/mL	463 ± 62	66 ± 19	77,1 ± 10,4
100 µM MMS	313 ± 52**	320 ± 80***	52,2 ± 8,6**

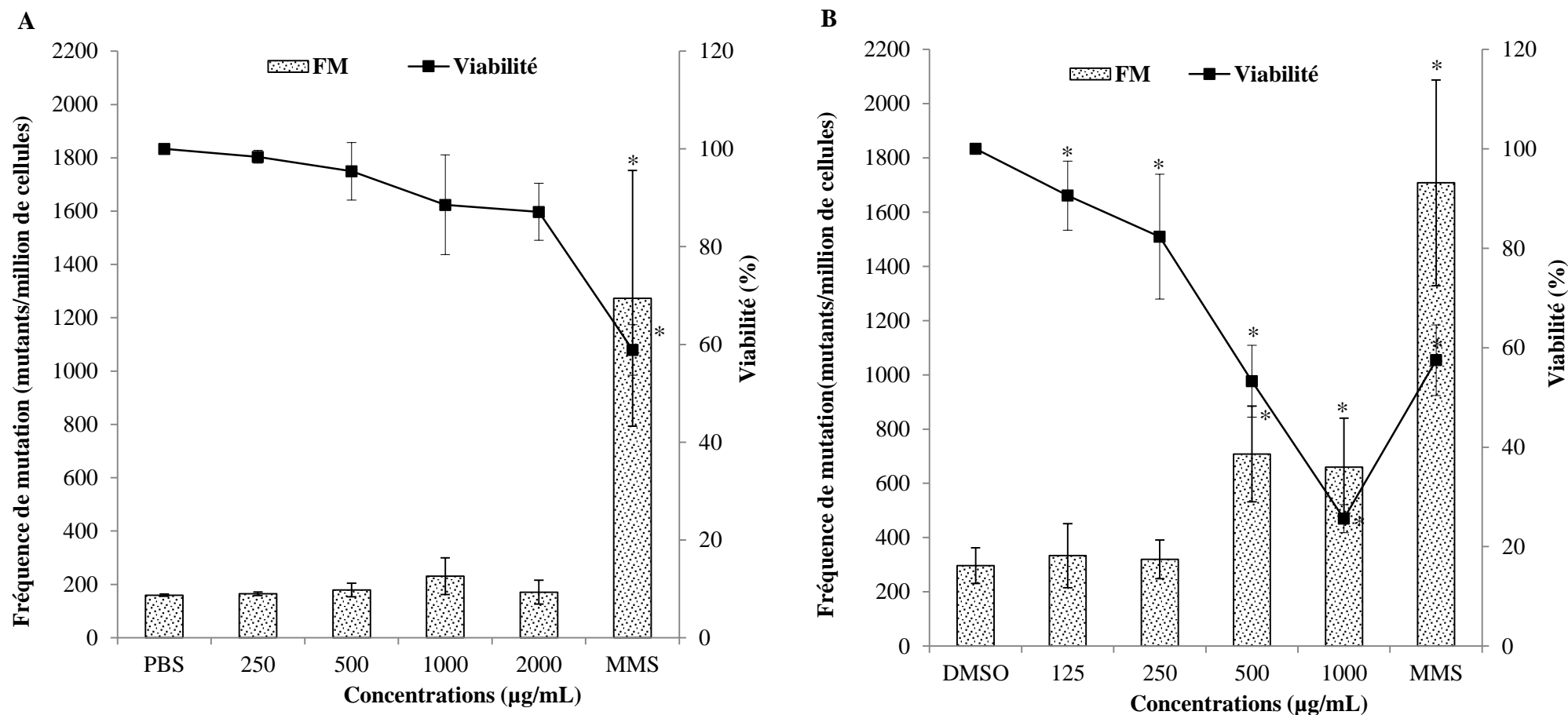
**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne ± écart-type entre 3 essais. Test *t*- de *Student-Newman-Keuls* : différence significative par rapport au témoin négatif (PBS), \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$ . L'extrait aqueux a été testé aux concentrations de 250, 500, 1000 et 2000 µg/mL. Le méthyl méthanesulfonate (MMS) à la concentration de 100 µM a été utilisé comme témoin positif.

**Tableau X** : Nombre de colonies et efficacité de clonage des cellules *L5178Y* après 4 heures de traitement à la sous-fraction active SF9B

	Nombre de colonies survivantes	Nombre de colonies mutantes	Efficacité de clonage (%)
DMSO	451 ± 27	112 ± 29	75,2 ± 4,5
125 µg/mL	407 ± 11	113 ± 42	67,9 ± 1,8
250 µg/mL	369 ± 40*	98 ± 23	61,6 ± 6,7
500 µg/mL	239 ± 27**	125 ± 25	39,9 ± 4,5**
1000 µg/mL	115 ± 10***	64 ± 20***	19,2 ± 1,6***
100 µM MMS	258 ± 16**	365 ± 69***	43,0 ± 2,7**

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne ± écart-type entre 3 essais. Test *t*- de *Student-Newman-Keuls* : différence significative par rapport au témoin négatif (PBS), \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$ . La sous-fraction SF9B a été testée aux concentrations de 125, 250, 500 et 1000 µg/mL. Le méthyl méthanesulfonate (MMS) à la concentration de 100 µM a été utilisé comme témoin positif.

On a observé une variation non significative du nombre de colonies survivantes et mutantes des cellules *L5178Y* entre le témoin négatif (PBS) et l'extrait aqueux aux concentrations testées. Il en est de même pour l'efficacité du clonage dont la différence est non significative. Par contre, le traitement des cellules *L5178Y* à la sous-fraction active SF9B a entraîné une baisse significative des colonies survivantes à partir de 250 µg/mL ( $p < 0,05$ ) et des colonies mutantes à 1000 µg/mL ( $p < 0,001$ ). Cet effet sur les colonies survivantes des cellules *L5178Y* est corrélée directement à une baisse d'efficacité du clonage. Le MMS a entraîné respectivement une baisse significative ( $p < 0,01$ ) des colonies survivantes et une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) des colonies mutantes par rapport au témoin négatif. Le comptage des colonies a permis également la détermination des paramètres tels que la fréquence de mutation et la viabilité qui sont représentées sur la figure 54 ci-dessous.



**Figure 54** : Fréquence de mutations (FM) et viabilité des cellules *L5178Y* en fonction de la concentration de l'extrait aqueux (A) et de la sous-fraction active SF9B (B) après un traitement à court terme (4 heures)

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de *Student-Newman-Keuls* : différence significative par rapport au témoin négatif (PBS ou DMSO), \*  $p < 0,05$ . L'extrait aqueux a été testé aux concentrations de 250, 500, 1000 et 2000  $\mu\text{g/mL}$ . La sous-fraction SF9B a été testée aux concentrations de 125, 250, 500 et 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Le methyl methanesulfonate (MMS) à la concentration de 100  $\mu\text{M}$  a été utilisé comme témoin positif.

Ce résultat a confirmé l'effet non cytotoxique de l'extrait aqueux sur les cellules de lymphome *L5178Y* de souris avec une viabilité qui reste au-dessus de 95% jusqu'à la concentration de 2000 µg/mL. La fréquence de mutations n'est pas significativement affectée lors du traitement pendant 4 heures à l'extrait aqueux par rapport au témoin négatif. Par contre, on a observé une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la fréquence de mutations à partir de 500 µg/mL de la sous-fraction active SF9B. Ceci n'est pas suivi par une augmentation du nombre de colonies mutantes qui demeure non significative jusqu'à 500 µg/mL et qui par la suite baisse significativement ( $p < 0,001$ ) à 1000 µg/mL par rapport au témoin négatif (voir tableau X). L'augmentation de la fréquence de mutations est due à une augmentation significative ( $p < 0,01$ ) de la cytotoxicité de la sous-fraction active SF9B avec moins de 50% de cellules viables à la concentration de 500 µg/mL et environ 20% à 1000 µg/mL. Le MMS a induit une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la fréquence de mutations en corrélation avec l'augmentation des colonies mutantes.

#### **III.3.1.4.2. Effet mutagène après un traitement à long terme des cellules *L5178Y***

Les tableaux XI et XII ci-dessous indiquent le nombre de colonies des cellules *L5178Y* comptées avec ou sans addition du TFT après 24 heures de traitement à l'extrait aqueux de *C. variegatum* et à la sous-fraction active SF9B respectivement. Il ressort de ces tableaux que l'extrait aqueux n'a pas causé une variation significative des nombre des colonies survivantes et mutantes après 24 heures d'incubation. Par contre, la sous-fraction active SF9B a entraîné une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de ces deux variables à partir de 500 µg/mL.

**Tableau XI** : Nombre de colonies et efficacité de clonage des cellules *L5178Y* après 24 heures de traitement à l'extrait aqueux

	Nombre de colonies survivantes	Nombre de colonies mutantes	Efficacité de clonage (%)
PBS	537 ± 61	92 ± 16	89,5 ± 9,9
250 µg/mL	520 ± 59	96 ± 15	86,6 ± 9,7
500 µg/mL	574 ± 20	107 ± 13	95,6 ± 3,2
1000 µg/mL	479 ± 55	91 ± 28	79,8 ± 9,1
2000 µg/mL	548 ± 100	102 ± 4	91,3 ± 16,7
50 µM MMS	336 ± 35**	300 ± 13***	55,8 ± 5,8**

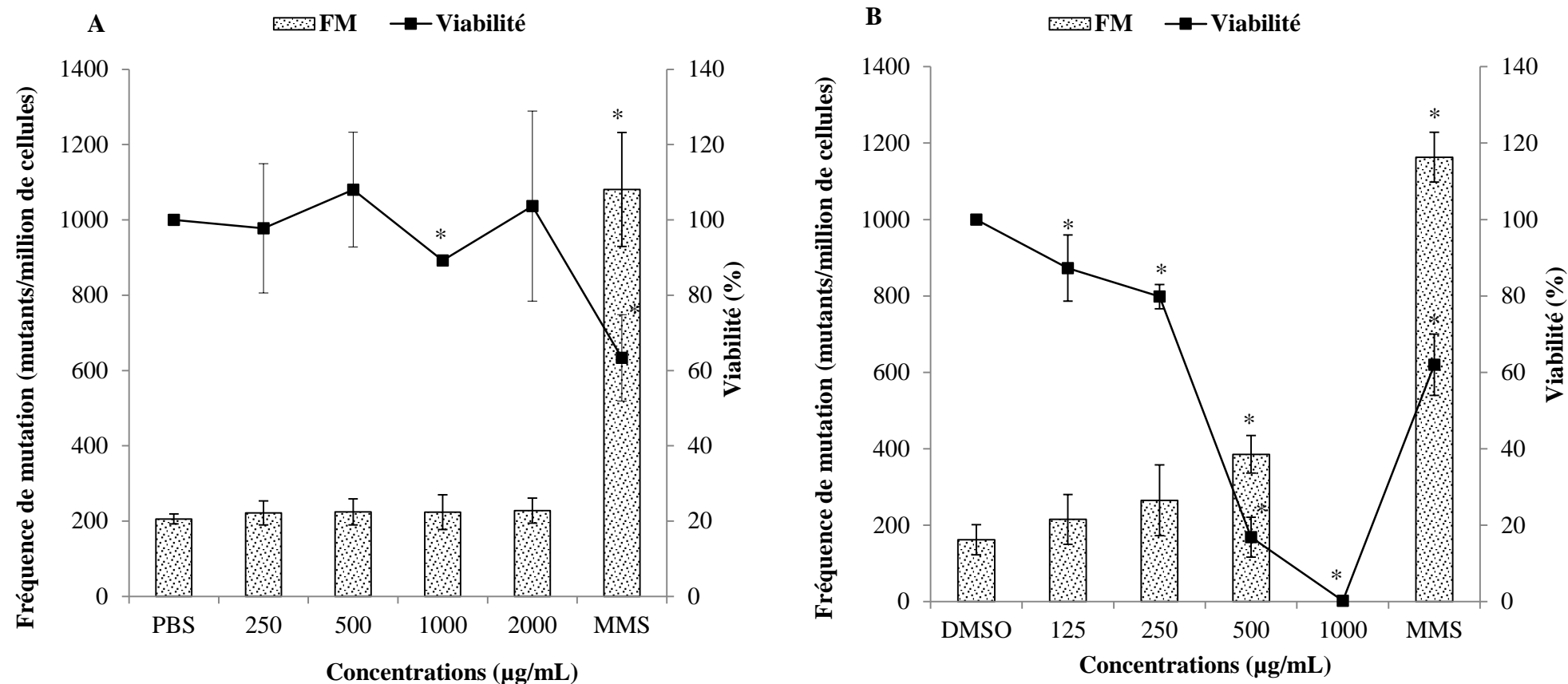
**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne ± écart-type entre 3 essais. Test *t*- de *Student-Newman-Keuls* : différence significative par rapport au témoin négatif (PBS), \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$ . L'extrait aqueux a été testé aux concentrations de 250, 500, 1000 et 2000 µg/mL. Le méthyl méthanesulfonate (MMS) à la concentration de 50 µM a été utilisé comme témoin positif.

**Tableau XII** : Nombre de colonies et efficacité de clonage des cellules *L5178Y* après 24 heures de traitement à la sous-fraction active SF9B

	Nombre de colonies survivantes	Nombre de colonies mutantes	Efficacité de clonage (%)
DMSO	473 ± 118	63 ± 18	78,8 ± 19,7
125 µg/mL	418 ± 139	71 ± 18	69,7 ± 23,2
250 µg/mL	375 ± 80	79 ± 16	62,5 ± 13,5
500 µg/mL	77 ± 19***	24 ± 7***	12,7 ± 3,3***
1000 µg/mL	1 ± 1***	1 ± 2***	0,1 ± 0,2***
50 µM MMS	287 ± 42**	277 ± 31**	47,8 ± 6,9**

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne ± écart-type entre 3 essais. Test *t*- de *Student-Newman-Keuls* : différence significative par rapport au témoin négatif (PBS), \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$ . La sous-fraction SF9B a été testée aux concentrations de 125, 250, 500 et 1000 µg/mL. Le méthyl méthanesulfonate (MMS) à la concentration de 50 µM a été utilisé comme témoin positif.

A partir des nombres des colonies indiqués dans ces tableaux, on a déterminé la fréquence de mutations et la viabilité qui sont représentées sur la figure 55 ci-dessous.



**Figure 55** : Fréquence de mutation (FM) et viabilité des cellules *L5178Y* en fonction de la concentration de l'extrait aqueux (A) et du produit actif SF9B (B) pendant un traitement à long terme (24 heures)

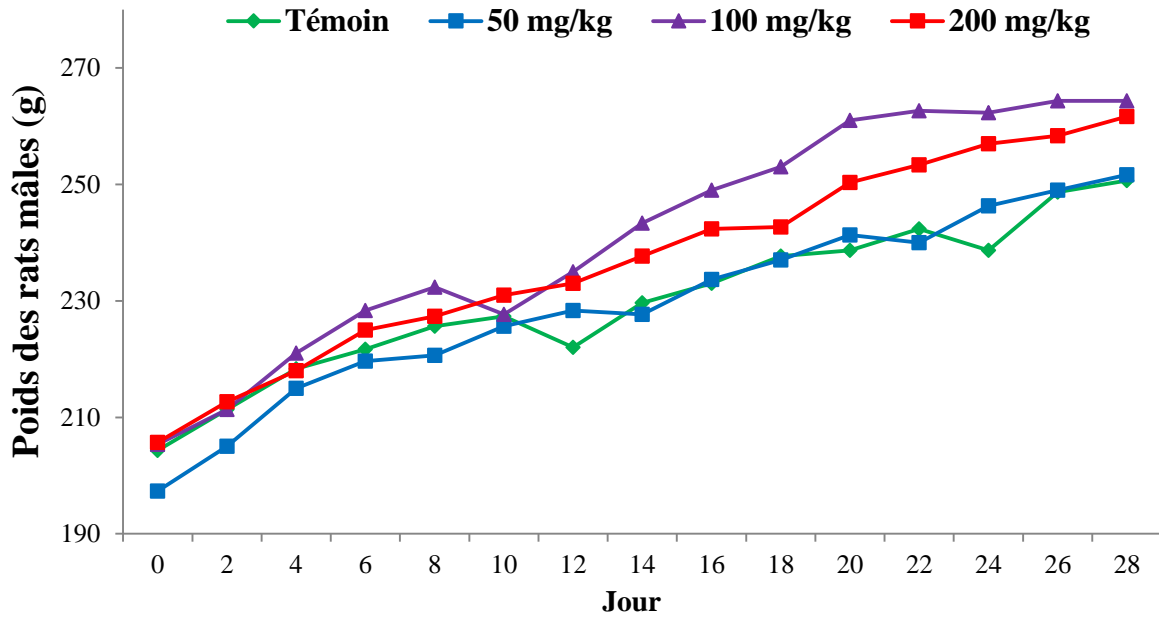
**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart-type entre 3 essais. Test *t*- de *Student-Newman-Keuls* : différence significative par rapport au témoin négatif (PBS ou DMSO), \*  $p < 0,05$ . L'extrait aqueux a été testé aux concentrations de 250, 500, 1000 et 2000 µg/mL. La sous-fraction SF9B a été testée aux concentrations de 125, 250, 500 et 1000 µg/mL. Le méthyl methanesulfonate (MMS) à la concentration de 50 µM a été utilisé comme témoin positif.

L'extrait aqueux n'a pas entraîné une augmentation significative de la fréquence de mutations et de la cytotoxicité jusqu'à 2000 µg/mL. Par contre, la sous-fraction active SF9B a été significativement ( $p < 0,05$ ) plus cytotoxique à partir de 500 µg/mL avec une viabilité de moins de 20% après 24 heures de traitement. On a observé également une augmentation significative de la fréquence de mutations malgré le fait que le nombre de colonies mutantes diminuait plutôt de manière significative (voir tableau XII). Il est à noter que le calcul de la fréquence de mutations qui intègre l'efficacité du clonage, peut être biaisé ou mal interprété en cas d'une cytotoxicité élevée (au-delà de 50% de cellules non viables). Ainsi, la possibilité de l'effet mutagène de la sous-fraction SF9B aux concentrations supérieures à 500 µg/mL ne peut pas être considéré au vu de nos résultats. En effet, il est important de rappeler que ces concentrations de la sous-fraction SF9B ( $\geq 500$  µg/mL) sont au moins 200 fois supérieures à la  $CE_{50}$  (2,75 µg/mL) pour l'activité antiamebique, ce qui exclut ces concentrations à un usage en thérapie chez l'homme.

### **III.3.2. Toxicité subchronique *in vivo* de l'extrait aqueux des feuilles de *Codiaeum variegatum***

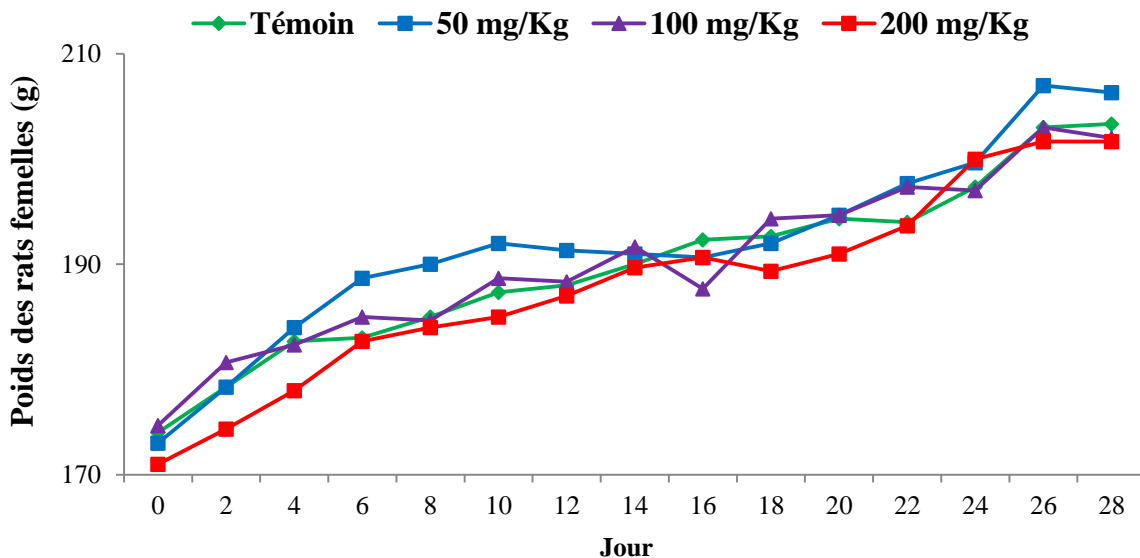
#### **III.3.2.1. Effet de l'extrait aqueux des feuilles de *Codiaeum variegatum* sur la croissance pondérale des animaux**

La pesée des animaux tous les 2 jours pendant la période d'étude a permis de tracer les courbes évolutives du poids corporel en fonction de la dose de l'extrait aqueux administrée et du sexe (figures 56 et 57).



**Figure 56** : Evolution du poids corporel chez les rats mâles au cours de l'étude.

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart type entre 6 animaux. Test *t*- de *Student-Newman-Keuls*, \* différence significative par rapport au groupe témoin, ( $p < 0,05$ ). Les rats repartis en groupes ont reçu au quotidien l'extrait aqueux aux doses de 0, 50, 100 et 200 mg/Kg pendant 4 semaines.



**Figure 57** : Evolution du poids corporel chez les rats femelles au cours de l'étude.

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart type entre 6 animaux. Test *t*- de *Student-Newman-Keuls*, \* différence significative par rapport au groupe témoin, ( $p < 0,05$ ). Les rats repartis en groupe ont reçu au quotidien l'extrait aqueux aux doses de 0, 50, 100 et 200 mg/Kg pendant 4 semaines.



Selon ces deux figures ci-dessus rendues, on a observé de manière générale une augmentation relative du poids des animaux au cours de l'étude. En comparaison au groupe témoin, on a noté un gain de poids chez les rats mâles des groupes essais qui augmente avec la dose de l'extrait bien que l'analyse statistique n'ait montré aucune différence significative entre les différents groupes. Par contre, chez les rats femelles, le gain de poids est presque identique et statistiquement non significatif entre les animaux des groupes essais et témoin.

### III.3.2.2. Effet de l'extrait aqueux des feuilles de *Codiaeum variegatum* sur le poids relatif de quelques organes

A l'issue du sacrifice des animaux, les différents organes vitaux ont été prélevés et pesés. Les tableaux XIII et XIV ci-dessous résumant l'effet de l'extrait sur le poids relatif de ces organes.

**Tableau XIII** : Poids relatifs de quelques organes vitaux (g/Kg de poids corporel) des rats en fonction du sexe et de la dose de l'extrait aqueux

Sexe	Dose (mg/kg)	Poids relatifs des organes (g/Kg de poids corporel)				
		Foie	Reins	Cœur	Poumons	Rate
Mâle	0	28,70 ± 1,94	6,61 ± 0,52	3,27 ± 0,27	5,89 ± 1,10	4,09 ± 1,35
	50	28,94 ± 0,80	6,54 ± 0,52	3,35 ± 0,35	5,81 ± 1,07	4,19 ± 0,77
	100	29,53 ± 1,21	6,48 ± 0,46	3,45 ± 0,20	5,90 ± 0,60	3,89 ± 0,66
	200	28,85 ± 1,52	6,51 ± 0,43	3,28 ± 0,36	5,95 ± 1,24	3,47 ± 0,73
Femelle	0	28,68 ± 0,90	6,25 ± 0,48	3,93 ± 0,13	5,87 ± 0,76	4,17 ± 0,91
	50	28,46 ± 1,63	6,34 ± 0,11	3,78 ± 0,22	5,54 ± 0,75	3,79 ± 0,94
	100	28,68 ± 1,31	6,37 ± 0,25	3,37 ± 0,28*	6,15 ± 0,34	4,52 ± 0,99
	200	29,78 ± 1,65	6,52 ± 0,29	3,53 ± 0,15	6,13 ± 1,16	4,90 ± 1,17

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne ± écart type entre 6 animaux. Test *t*- de *Student-Newman-Keuls*, \* différence significative par rapport au groupe témoin, ( $p < 0,05$ ). Les rats repartis en groupe ont reçu au quotidien l'extrait aqueux aux doses de 0, 50, 100 et 200 mg/Kg pendant 4 semaines.

**Tableau XIV** : Poids relatifs des organes génitaux (g/Kg de poids corporel) des rats en fonction du sexe et de la dose de l'extrait aqueux

Sexe	Organes génitaux	Doses (mg/Kg)			
		0	50	100	200
Mâle	Prostate	1,51 ± 0,50	1,39 ± 0,18	1,72 ± 0,49	1,48 ± 0,60
	Vésicules Séminales	3,79 ± 1,29	3,82 ± 1,06	3,63 ± 1,25	4,77 ± 1,30
	Testicules	11,23 ± 1,03	12,02 ± 1,79	11,25 ± 1,14	10,78 ± 1,15
	Epididyme	4,27 ± 0,60	4,34 ± 0,91	3,97 ± 0,32	3,79 ± 0,46
Femelle	Ovaires	0,69 ± 0,20	0,71 ± 0,17	0,86 ± 0,15	0,72 ± 0,12
	Utérus	2,88 ± 1,43	2,99 ± 0,84	2,41 ± 0,31	2,47 ± 0,56

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne ± écart type entre 6 animaux. Test *t*- de *Student-Newman-Keuls*, \* différence significative par rapport au groupe témoin, ( $p < 0,05$ ). Les rats repartis en groupe ont reçu au quotidien l'extrait aqueux aux doses de 0, 50, 100 et 200 mg/Kg pendant 4 semaines.

Le traitement des animaux par l'extrait aqueux de *C. variegatum* n'a pas affecté le poids relatif des différents organes par rapport aux animaux du groupe témoin.

### III.3.2.3. Effet de l'extrait aqueux des feuilles de *Codiaeum variegatum* sur les paramètres biochimiques

Le dosage de quelques marqueurs biochimiques de la toxicité a permis la détermination des quantités de protéines sériques et hépatiques, de l'activité des transaminases (ALAT et ASAT) sériques et de la créatinine sérique. Ces valeurs moyennes sont présentées en fonction de la dose et du sexe dans le tableau XV ci-dessous.

**Tableau XV:** Paramètres biochimiques de toxicité rénale et hépatique en fonction de la dose de l'extrait aqueux

Sexe	Doses (mg/Kg)	Protéines sériques (mg/mL)	Protéines hépatiques (mg/100 g)	ALAT (UI/L)	ASAT (UI/L)	Créatinine (mg/L)
Mâle	0	94,96 ± 4,95	3382 ± 286	56,25 ± 5,77	111,75 ± 7,07	8,35 ± 0,92
	50	91,88 ± 4,10	3393 ± 425	66,35 ± 11,83	120,08 ± 5,64	8,06 ± 0,90
	100	97,44 ± 15,21	3456 ± 221	68,65 ± 12,55	120,92 ± 7,28	8,63 ± 0,47
	200	115,48 ± 12,56	3461 ± 291	70,63 ± 10,29	139,15 ± 11,41	9,15 ± 0,49
Femelle	0	106,97 ± 10,27	3267 ± 382	42,81 ± 11,31	86,13 ± 9,15	9,23 ± 0,90
	50	99,79 ± 7,41	3276 ± 459	45,52 ± 10,50	83,52 ± 5,72	8,99 ± 1,74
	100	92,82 ± 10,53	3345 ± 170	53,96 ± 14,30	101,23 ± 9,15	10,32 ± 1,24
	200	107,38 ± 11,65	3317 ± 265	52,81 ± 12,79	115,50 ± 12,43	9,31 ± 0,82

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne ± écart type entre 6 animaux. Test *t*- de Student-Newman-Keuls, \* différence significative par rapport au groupe témoin, ( $p < 0,05$ ). Les rats repartis en groupe ont reçu au quotidien l'extrait aqueux aux doses de 0, 50, 100 et 200 mg/Kg pendant 4 semaines.

D'après les résultats présentés dans le tableau ci-dessus, aucun des marqueurs biochimiques évalués ne varie significativement entre les animaux traités aux différentes doses d'extrait aqueux et ceux du groupe témoin. Par ailleurs, on a noté une légère augmentation statistiquement non significative des taux des transaminases sériques chez les animaux traités mais l'estimation du rapport ASAT/ALAT chez ces derniers est autour de 2, ce qui reste très proche de la valeur normale de ce rapport en cas d'administration d'un médicament.

### III.3.3. Discussion partielle

#### III.3.3.1. Effet toxique *in vitro* de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active SF9B

L'exposition des cellules aux agents chimiques ou aux médicaments peut générer directement ou indirectement des dommages sur l'ADN. En général, de tels dommages participent à la mutagenèse et à l'initiation de la cancérogenèse, justifiant ainsi un impact potentiel sur le génome de l'homme. Ceci est une préoccupation dans la procédure visant

l'acceptation et la validation des substances à usage pharmaceutique. Dans l'évaluation de la génotoxicité de l'extrait aqueux et de la sous-fraction amoebicide SF9B, les lignées cellulaires suivantes ont été utilisées : les cellules de lymphome *L5178Y* de souris visant à tester la toxicité directe de la substance et les cellules *HepG2* ayant pour objectif de tester la toxicité indirecte de la substance. D'une part, les cellules *L5178Y* sont fréquemment utilisées en routine dans les tests de génotoxicité (**Stopper et al., 2000**). D'autre part, les cellules *HepG2* et les cellules primaires d'origine hépatique sont utilisées dans l'évaluation de la toxicité des xénobiotiques à cause de la présence des enzymes du cytochrome P450 et de la phase II douées d'activité métabolique (**Westerink and Schoonen, 2007, Guo et al., 2011**). L'évaluation de la génotoxicité a été réalisée à travers le test des comètes, le test de micronoyaux. Le test des comètes traduit une réponse immédiate et transitoire des dommages sur l'ADN susceptibles d'être réparés (**Collins, 2004 ; Shaposhnikov et al., 2008**). Il est régulièrement associé au test des micronoyaux indiquant un dommage génotoxique plus grave, irréversible et non soumis à tout mécanisme de réparation (**Kirsch-Volders et al., 2003**). L'association de ces deux marqueurs de génotoxicité se justifie parce qu'ils traduisent des niveaux d'étude et d'intégration de la génotoxicité et des conséquences différents. La fréquence de formation des micronoyaux est plus rare que les dommages primaires sur l'ADN. De plus, leur apparition peut être également consécutive à l'exposition aux substances aneugènes qui induisent des anomalies dans le nombre des chromosomes mais qui ne produisent pas de dommages détectables par le test des comètes (**Rosefort et al., 2004**). En outre, les micronoyaux représentent un fragment chromosomique ou de chromosomes entiers, ressemblant au noyau principal et facilement observable dans les cellules interphasiques. Ce marqueur indirect de la génotoxicité traduit aussi un dommage génomique issu de l'action d'une substance clastogène ou de l'altération du fuseau mitotique (**Fenech et al., 2011**).

Nous n'avons noté aucune cytotoxicité importante avec l'extrait aqueux, tandis que la sous-fraction active SF9B s'est montré cytotoxique aux concentrations élevées (500 et 1000 µg/mL). De plus, aucun dommage immédiat ou permanent n'a été observé sur l'ADN même aux concentrations des substances ayant montré une cytotoxicité significative sur les cellules. Ce qui implique que la cytotoxicité d'une substance n'entraîne pas forcément que cette dernière soit génotoxique. En effet, une substance génotoxique induit des dommages sur le matériel génétique des cellules, à travers des interactions directe ou indirecte avec l'ADN modifiant ainsi sa structure. La cytotoxicité d'une substance quant à elle peut aboutir aux réponses diverses chez les cellules avec en outre une inhibition de la croissance avec pour conséquence un arrêt de la division cellulaire, ou une nécrose au cours de laquelle les cellules perdent leur intégrité membranaire et meurent rapidement à la suite d'une lyse cellulaire, ou enfin une apoptose avec des cellules qui activent une mort programmée par un retrécissement cytoplasmique, une condensation nucléaire et un clivage de l'ADN en fragments (**Kroemer et al., 2009**).

Dans le but d'approfondir la toxicité *in vitro* de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active SF9B, nous avons procédé à l'évaluation de la mutation génétique chez les cellules de lymphome *L5178Y* de souris dont l'objectif vise à détecter l'effet mutagène sur le locus de la thymidine kinase des cellules *L5178Y* de souris, à travers la mesure de la résistance des colonies mutantes en présence de la trifluorothymidine (**Lloyd and Kidd, 2012**). Cet essai implique d'une part d'exposer les cellules pour un traitement à court et à long terme car la division cellulaire est au cœur de toute perturbation pouvant conduire à une mutation. D'autre part, il nécessite l'utilisation d'un système d'action métabolique ('*S9 mix*') lors d'un traitement à court terme (**Cole et al., 1999**). Pour ce faire, l'essai *in vitro* de la génotoxicité sur les cellules métaboliquement compétentes *HepG2* et les cellules primaires hépatiques nous a permis de conclure que même les métabolites des substances testées sont sans effet génotoxique. De ce fait, même en présence d'une activation métabolique, l'extrait aqueux ou la sous-fraction active

SF9B ne pourrait pas causer une induction d'un effet mutagène car tout composé mutagène est tout d'abord génotoxique (**Bajpayee et al., 2005**).

### III.3.3.2. Effet toxique *in vivo* de l'extrait aqueux de *Codiaeum variegatum*

Dans nos études antérieures, l'évaluation de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux de *C. variegatum* a révélé une  $DL_{50} > 5\text{g/Kg}$  et aucun effet toxique significatif n'a été identifié sur les paramètres comportementaux et biochimiques chez les souris *Swiss albino* (**Kamini, 2005**). Etant donné que l'importance de l'effet pharmacologique d'un extrait de plante ou d'un médicament doit être soutenue par celle de son profil toxicologique, nous avons avancé vers l'étude de la toxicité subchronique. Après 4 semaines de traitement, nous avons noté une augmentation relative du poids des animaux et aucun effet néfaste sévère sur les paramètres biochimiques de la toxicité tels que les transaminases sériques (ALAT, ASAT), la créatinine, les protéines sériques et hépatiques. Le foie et les reins sont les organes majeurs impliqués dans diverses fonctions vitales (**Meena et al., 2013**). En effet, les transaminases (ASAT et ALAT) sont des enzymes importantes dans l'évaluation de la fonction hépatique. L'ALAT est spécifique au foie tandis l'ASAT est lié au foie et au cœur et toutes ces deux enzymes sont principalement retrouvées dans le cytoplasme des cellules animales (**Wasan et al., 2001 ; Ogonnia et al., 2013**). Une augmentation de ces enzymes dans le sérum indique tout simplement une perméabilité ou une rupture cellulaire résultant à leur sécrétion dans la circulation sanguine (**Pieme et al., 2006 ; Iodigwe et al., 2010**). La différence non significative dans les taux de ces deux enzymes dans notre étude indique donc l'absence de toxicité de l'extrait aqueux des feuilles de *C. variegatum* sur la fonction hépatique. La créatinine est un paramètre biochimique indiquant tout impact sur la fonction rénale (**Rhiouani et al., 2008 ; Atsamo et al., 2011**). Une augmentation de la créatinine dans la circulation sanguine ou dans les urines est un indicateur d'un dysfonctionnement rénal ou des dommages sur les néphrons des reins (**Lameire et al., 2005 ; Meena et al., 2013**). Dans notre étude, nous avons observé une

différence non significative du taux de créatinine entre les animaux des différents groupes suggérant ainsi l'innocuité de l'extrait aqueux de *C. variegatum* sur la fonction rénale des rats des deux sexes. Un autre paramètre important est le taux des protéines sériques ou hépatiques. Une augmentation de ce paramètre est un signe des dommages tissulaires non spécifiques ou plus particulièrement une toxicité hépatique (Emerson *et al.*, 1993 ; Atsamo *et al.*, 2011). En effet, les protéines endogènes assurent non seulement le transport des xénobiotiques dans la circulation sanguine à travers les organes mais aussi leur biotransformation dans le foie en vue de leur activation, excretion ou détoxification (Koolman and Röhm, 2004 ; Nana *et al.*, 2011). Aucune variation significative n'a été notée dans les taux des protéines hépatiques et sériques suggérant l'effet non toxique de l'extrait aqueux sur divers organes des animaux traités.

### III.3.4. Conclusion partielle

Au terme de cette partie du travail dont le but visait l'évaluation toxicologique *in vitro* et *in vivo* de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active SF9B, nous pouvons conclure que :

- l'extrait aqueux a été non-cytotoxique sur les cellules *L5178Y*, *HepG2* et *Caco-2*, tandis que la sous-fraction active SF9B a induit une cytotoxicité significative sur ces trois lignées cellulaires à partir de 500 µg/mL,
- les deux substances n'ont causé aucun dommage immédiat ou permanent sur l'ADN et n'ont pas induit significativement la formation des micronoyaux,
- ces substances ont été sans aucun effet mutagène à court et à long termes sur les cellules de lymphome *L5178Y* de souris lorsqu'elles sont testées aux concentrations non-toxiques ou modérément cytotoxiques,
- l'extrait aqueux n'a pas causé de signe de toxicité ni sur le poids des animaux, ni sur le poids relatif des organes pendant 4 semaines de traitement,
- l'extrait aqueux a été sans effet toxique significatif sur les fonctions rénales et hépatiques des animaux selon les marqueurs biochimiques évalués.

### III.4. Discussion générale

L'utilisation de la médecine traditionnelle et des plantes médicinales dans la plupart des pays en voie de développement, comme une base pour le maintien de la bonne santé, a été largement observée à travers le monde (**Sapna and Ravi, 2007**). La médecine traditionnelle, considérée comme le patrimoine socio-culturel et existant depuis plusieurs centaines d'années, a été mise en évidence pour une couverture plus large des soins de santé primaire en Afrique mais aussi, à des degrés divers, dans tous les pays du monde. La médecine traditionnelle est le traitement de premier choix pour au moins 80% des africains qui souffrent de forte fièvre et d'autres maladies courantes (**Elujoba et al., 2005**). La valorisation des plantes médicinales, par l'extraction des principes actifs et leur application dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques, est de nos jours une base d'innovations pour la mise sur pieds des nouveaux médicaments. En effet, la démarche utilisée dans cette thèse, visant à utiliser les connaissances de la pharmacopée traditionnelle à travers des enquêtes ethnopharmacologiques, est une source de gain de temps dans le processus de recherche et de développement de médicament. Cette démarche passe par l'exploration pharmacologique, chimique et toxicologique d'une banque d'échantillons, qui pourra servir de base de référence pour le choix des composés actifs pour une application en pharmacie (**Barbosa et al., 2011 ; Cechinel-Filho et al., 2012**).

La recherche des composés antiamebiotiques reste d'actualité au vu de la mortalité causée par cette infection. Un screening des médicaments approuvés par la FDA (*US Food and Drug Administration*) a conduit à la découverte de l'efficacité de l'auranofin sur les trophozoïtes d'*E. histolytica* en culture ( $CE_{50} = 0,5 \mu M$ ) et sur les modèles de colite amibienne chez les souris ou d'amibiase hépatique chez les hamsters (**Debnath et al., 2012**). Malheureusement, l'un des effets secondaires de l'auranofin est la diarrhée persistante rapportée chez 50% des patients, un effet qui exclut son utilisation pour le traitement de l'amibiase (**Van Beusekom et al., 1997**). Un galacto-glycérolipide isolé de la plante *Oxalis corniculata* a montré une activité



antiamoebique significative ( $CE_{50} = 15 \mu\text{g/mL}$ ) et sans effet toxique sur la flore microbienne intestinale ou sur la lignée cellulaire de mammifère HEK-293 (Manna *et al.*, 2010), malgré le fait que son mécanisme d'action ne soit pas encore connu. L'extrait aqueux de *Codiaeum variegatum* a été sélectionné lors d'un screening des plantes utilisées dans le traitement des infections intestinales et hépatiques sur une culture polyxénique d'*E. histolytica* (Moundipa *et al.*, 2005). *Codiaeum variegatum*, cultivé en de nombreuses variétés, est largement utilisé comme une plante ornementale grâce à son feuillage décoratif. En outre, la variété « *mollucanum* » de cette plante a été utilisée pendant longtemps contre la diarrhée sanguinolante par la population Bamoun de l'Ouest Cameroun. L'évaluation de l'activité antiamoebique de l'extrait aqueux de *C. variegatum* sur une culture axénique d'*E. histolytica* a confirmé l'efficacité de cet extrait dans la destruction de ce parasite. A travers un fractionnement bioguidé, la sous-fraction SF9B dont l'analyse chimique montre qu'elle est constituée de plusieurs composés a démontré une efficacité assez significative ( $CE_{50} = 2,75 \mu\text{g/mL}$ ) proche au métronidazole ( $CE_{50} = 1,38 \mu\text{g/mL}$ ). Ce résultat a ainsi renforcé la possibilité de son application dans le traitement de l'amibiase intestinale. Pour comprendre le mécanisme par lequel cette sous-fraction cause la mortalité des trophozoites d'*E. histolytica*, nous avons initié la recherche de son effet sur la morphologie et les voies biochimiques du parasite. En utilisant un immunomarquage de la Gal/GalNAc (une protéine abondante à la surface du parasite) et une nouvelle technologie de séquençage des gènes (RNA-Seq), nous avons observé que la sous-fraction SF9B agit sur différentes cibles moléculaires visant une déstabilisation de l'architecture cellulaire et induisant la mort du parasite à travers l'activation de la production de la céramide. A partir de ce mode d'action de la sous-fraction SF9B, la céramide pourrait être utilisée dans le futur comme une molécule cible dans le criblage de médicaments antiamoebiques. En effet, plusieurs cibles moléculaires ont été suggérées dans le criblage des composés antiamoebiques avec d'une part l'alcool deshydrogénase 2 (EhADH2), une molécule nécessaire dans la

croissance et la survie des trophozoïtes d'*E. histolytica* (**Espinosa et al., 2004**). D'autre part, la thiorédoxine réductase a été également suggérée comme une enzyme qui est inhibée par l'aurofin chez *E. histolytica* (**Debnath et al., 2012**). Ces deux enzymes sont particulièrement impliquées dans les voies métaboliques pour la survie du parasite. Par contre, à travers cette étude où nous avons identifié une augmentation significative des gènes dits d'assurance de la longévité « *Longevity Assurance Genes : LAG* » encore renommés céramide synthase, nous avons défini la réelle capacité d'utiliser la céramide comme une nouvelle cible impliquée dans la mort des trophozoïtes d'*E. histolytica*. Il est à noter que la céramide synthase n'est pas impliquée dans le métabolisme d'*E. histolytica* et la stimulation de sa production ne peut être causée que par l'action des agents extracellulaires (**Hannun and Luberto, 2000**).

Dans l'optique de la valorisation de l'extrait aqueux ou de la sous-fraction SF9B dans le traitement des patients souffrant de l'amibiase intestinale, une évaluation toxicologique *in vitro* sur des cellules de mammifères et *in vivo* chez des rats a été réalisée. L'étude des dommages ou lésions sur l'ADN au niveau des chromosomes est une partie essentielle de la toxicologie génétique car la mutation chromosomique est un événement important dans la carcinogénèse (**Fenech et al., 2011**). Pour ce faire, l'essai *in vitro* a été réalisé en utilisant une série de tests standards tels que recommandés par l'OCDE et la FDA pour les médicaments et suppléments alimentaires. L'extrait aqueux et la sous-fraction SF9B n'ont montré aucun effet génotoxique significatif tant sur les dommages immédiats que sur les dommages permanents sur l'ADN. Par ailleurs, une cytotoxicité significative des substances testées a été observée aux fortes concentrations, ce qui pourrait être dû à la faible solubilité entraînant une saturation en composés dans le milieu. De plus, la cytotoxicité observée à ces concentrations n'a montré aucun dommage significatif sur l'ADN et aussi sur l'effet mutagène, car même testées aux fortes concentrations, l'extrait aqueux et la sous-fraction active SF9B n'ont pas causé une augmentation significative des colonies mutantes des cellules *L5178Y*. Il faut noter aussi que

les concentrations testées dans les essais *in vitro* de la toxicité sont de très loin plus élevées que celles qui ont été actives sur les trophozoïtes d'*E. histolytica* en culture axénique. Ce qui permet d'évoquer la notion de la toxicité sélective dont le principe de base repose sur la capacité d'un médicament de cibler de manière spécifique les agents pathogènes sans causer de dommage important à d'autres cellules de l'hôte (Wink, 2012). L'essai *in vivo* de la toxicité subchronique chez les rats indique d'après les paramètres biochimiques évalués que l'extrait aqueux est non toxique. Ces études toxicologiques *in vitro* et *in vivo* sont en accord avec les recommandations de la FDA pour l'autorisation de mener des essais cliniques sur les humains dans l'évaluation de la validité des produits traditionnels à usage médicinal (Muller *et al.*, 1999 ; ICH, 2011). Ainsi, les résultats de la toxicité génétique *in vitro* et de la toxicité subchronique pourront servir de preuve d'innocuité pour la formulation d'un phytomédicament à base des feuilles de *C. variegatum*.

**Conclusion Générale  
&  
Perspectives**

## Conclusion générale

Au terme de ce travail dont l'objectif principal était de rechercher les preuves d'efficacité et d'innocuité pour la valorisation des feuilles de *C. variegatum* dans le traitement de l'amibiase intestinale, il en ressort que :

- l'extrait aqueux obtenu vieilles feuilles de *C. variegatum* et celui des feuilles récoltées à minuit ont été les plus efficaces sur les trophozoïtes d'*E. histolytica* et le fractionnement bio-guidé de l'extrait aqueux a conduit à une augmentation significative de l'activité antiamoebique suite à l'isolement de la sous-fraction (SF9B) aussi active que le métronidazole,
- l'étude du mécanisme d'action a permis d'identifier que les composés de la sous-fraction SF9B agit sur plusieurs cibles moléculaires importantes pour la survie du parasite et le profil d'expression des gènes est largement différent de celui du métronidazole, suggérant que la céramide pourrait être utilisée dans le futur comme une cible dans le développement de médicaments antiamoebiques,
- l'évaluation toxicologique *in vitro* et *in vivo* a montré que l'extrait aqueux et la sous-fraction active SF9B n'ont pas causé d'effet génotoxique et mutagène significatif sur les cellules de mammifères et que l'extrait aqueux n'a pas entraîné un effet toxique significatif chez les rats après 4 semaines de traitement.

## Perspectives

La réalisation de ce travail définit les bases solides d'une efficacité de l'extrait aqueux et de la sous-fraction active SF9B sur les trophozoïtes d'*E. histolytica* en culture axénique. Dans un futur proche, nous envisageons de:

- approfondir l'évaluation toxicologique par une étude de toxicité chronique, l'effet sur les fonctions de reproduction et l'effet tératogène,
- formuler à partir de l'extrait aqueux des feuilles de *C. variegatum*, un médicament traditionnel amélioré qui pourrait être soumis aux évaluations de pharmaco-vigilance et de pharmacocinétique,
- procéder à une étude clinique de phase I du médicament traditionnel amélioré chez les sujets sains,
- caractériser les structures chimiques des composés de la sous-fraction active SF9B et étudier l'effet des substitutions des groupements fonctionnels sur l'activité antiamebique,
- rechercher les voies de synthèse chimique des composés actifs pour la soumission d'un brevet.

Par ailleurs, l'étude du mécanisme d'action de la sous-fraction active SF9B suggère l'implication de la céramide comme molécule pouvant être utilisée dans l'avenir pour le criblage de médicaments antiamebiques. Ainsi, nous proposons de :

- évaluer le trafic ou la translocation des lipides chez les trophozoïtes traités à la sous-fraction active SF9B,
- quantifier le taux de céramide cytoplasmique et membranaire lors du traitement des trophozoïtes par la sous-fraction active SF9B.

**Bibliographie**

---

**Bibliographie**

- Abd Alla Mohamed D. , White Gary L. , Rogers Tyson B. , Cary Max E. , Carey David W. and Ravdin Jonathan I. (2007).** Adherence-Inhibitory Intestinal Immunoglobulin A Antibody Response in Baboons Elicited by Use of a Synthetic Intranasal Lectin-Based Amebiasis Subunit Vaccine. *Infection and Immunity*; **75** (8): 3812-3822.
- Abd Alla Mohamed D., Wolf Roman, White Gary L., Kosanke Stanley D., Cary David, Verweij Jaco J., Zhang Mie-Jie and Ravdin Jonathan I., (2012).** Efficacy of a Gallectin subunit vaccine against experimental *Entamoeba histolytica* infection and colitis in baboons (*Papio sp.*). *Vaccine*; **30**: 3068– 3075.
- Adjanohoun E.J., Ake Assi L., Floret J.J., Guinko S., Koumare M., Ahyi A.M.R., and Raynal J., (1979).** Médecine traditionnelle et pharmacopée: Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali. ACCT, Paris.
- Aguilera P., Barry T., and Tovar J., (2008).** *Entamoeba histolytica* mitosomes: organelles in search of a function. *Experimental Parasitology* ; **118** (1): 10-16.
- Aharoni A. and Galili G., (2011).** Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology*, **22**:239–244
- Akaneme, F. I. and Amaefule, C. C. (2012).** Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of aqueous leaf extracts of *Azadirachta indica* A. Juss using the Allium test. *Journal of Medicinal Plants Research* **6**(22): 3898-3907.
- Alferah Mosaid A. Z., (2012).** Toxicity Induced Histological Changes in Selected Organs of Male (Wistar) Rats by *Lawsonia inermis* Leaf Extract. *European Journal of Medicinal Plants* **2**(2): 151-158.
- Ali I.K, Mondal U, Roy S, Haque R, Petri W.A. and Clark C.G. (2007).** Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with *E. histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology*; **45**: 285-289.
- Anaya-Velázquez F. and Padilla-Vaca F. (1992).** Effect of intestinal bacteria on the virulence of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research* ; **23**(2):183-1855.
- Anaya-Velázquez F., Padilla-Vaca F., Barrios-Rodiles M., Vaca-Chavez A. and Gonzalez-Robles A., (1997).** Selective Interaction of *Entamoeba histolytica* with Lactobacilli and Other Intestinal Bacteria. *Archives of Medical Research*; **28**:195-196



- Andra J. and Leippe M., (1994).** Pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*: Significance of positively charged amino acid residues for its mode of action. *FEBS Letters* **354**: 97-102
- Ankri S., Stolarsky T., Bracha R., Padilla-Vaca F. and Mirelman D. (1999).** Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infection and immunity* ; **67**(1): 421-422.
- Arhets P., Olivo J-C. , Gounon P., Sansonetti P. and Guillén N. (1998).** Virulence and Functions of Myosin II Are Inhibited by Overexpression of Light Meromyosin in *Entamoeba histolytica*. *Molecular Biology of the Cell*; **9**(6): 1537–1547.
- Arya R., Mallik M. and Lakhotia S. C (2007).** Heat shock genes – integrating cell survival and death. *Journal of Biosciences*; **32**(3): 595–610
- Atsamo A. D., Nguielefack T. B., Datté J. Y. and Kamanyi A. (2011).** Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*; **134**: 697–702.
- Avron B. and Chayen A. (1988).** Biochemistry of *Entamoeba*: A Review. *Cell Biochemistry and Function*; **6**: 71-86.
- Bajpayee M., Pandey A. K., Parmar D. and Dhawan A. (2005).** Current Status of Short-Term Tests for Evaluation of Genotoxicity, Mutagenicity, and Carcinogenicity of Environmental Chemicals and NCEs. *Toxicology Mechanisms and Methods*; **15**: 155–180.
- Bansal D., Ave P., Kerneis S., Frileux P., Boché O., Baglin A.C., Dubost G., Leguern A.S., Prevost M.C., Bracha R., Mirelman D., Guillén N. and Labruyère E. (2009).** An *ex-vivo* human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; **3**(11): e551.
- Barbosa W. L. R., Soares do Nascimento M., Lucianna do Nascimento P., Costa Maia F. L., Sousa A. J. A., Silva J. O. C. Jr, Monteiro M. M. and Ribeiro de Oliveira D., (2011).** Chapter 1: Selecting Medicinal Plants for Development of Phytomedicine and Use in Primary Health Care; in Bioactive compounds in Phytomedicine, *Edited by Iraj Rasooli, Published by Intech, Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, ISBN 978-953-307-805-2.*
- Bartels H., Bohmer M. and Heierli (1972).** Serum creatinine without protein precipitation. *Clinica Chimica Acta*; **37**: 193-197.

- 
- Baxt Leigh A., Rastew E., Bracha R., Mirelman D. and Singh U. (2010).** Downregulation of an *Entamoeba histolytica* Rhomboid Protease reveals roles in regulating parasite adhesion and phagocytosis. *Eukaryotic Cell*, **9**(8): 1283–1293.
- Beer J.Z., Budzicka E., Niepokojczycka E., Rosiek O., Szumiel I. and Walicka M. (1983).** Loss of tumorigenicity with simultaneous changes in radiosensitivity and photosensitivity during *in vitro* growth of L5178Y murine lymphoma cells. *Cancer Research* **43**(10):4736-42.
- Beere H. M. (2004).** The stress of dying: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science* **117**: 2641-2651.
- Behnia M., Haghghi A., Komeilizadeh H., Seyyed Tabaei S. J. and Abadi A. (2008).** *In Vitro* Antiamoebic Activity of Iranian *Allium sativum* in Comparison With Metronidazole against *Entamoeba histolytica*. *Iranian Journal of Parasitology*; **3**(4): 32-38.
- Bello A. (1992).** Etude coprologique des helminthes et des protozoaires intestinaux dans trois villages du Sud et Est du Cameroun. *Mémoire DIS (Biologie médicale) Bordeaux II*; **33** : p 12-413.
- Bendesky A., Menendez D. and Ostrosky-Wegman P. (2002).** Is metronidazole carcinogenic? *Mutation Research*; **511**: 133-144.
- Beyls N. (2011).** Diagnostic sérologique de l'amibiase viscérale à *Entamoeba histolytica*: Validation d'un nouveau test ELISA au CHU de Grenoble. Thèse présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de Docteur en Pharmacie à la Faculté de Pharmacie de Grenoble, le 1<sup>er</sup> décembre 2011.
- Bracha R. and Mirelman D. (1984).** Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. *Journal of Experimental Medicine*; **160**(2):353-368.
- Bracha R., Nuchamowitz Y. and Mirelman D. (2002).** Amoebapore is an important virulence factor of *Entamoeba histolytica*; *Journal of Biosciences (Suppl. 3)*; **27**: 579–587.
- Bradford M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein - dye binding; *Analytical chemistry* **72**: 248-254.
- Braga L. L., Ninomiya H., McCoy J. J., Eacker S., Wiedmer T., Pham C., Wood S., Sims P. J. and Petri W. A. Jr (1992).** Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*; *Journal of Clinical Investigation*; **90**: 1131–1137
-

- Briskin D.P. (2000).** Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. Update on Phytomedicines, *Plant Physiology*, 124: 507–514.
- Bruce R.D. (1985).** An up-and-down procedure for acute toxicity testing. *Fundamental and Applied Toxicology*; **5**(1): 151–157
- Bruchhaus I., Loftus B.J., Hall N., Tannich E., (2003).** The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during *in vitro* cultivation. *Eukaryotic Cell* ; **2**(3): 501-509.
- Bruchhaus I, Richter S, Tannich E. (1998).** Recombinant expression and biochemical characterization of an NADPH: flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. *Biochemistry Journal*; **330**:1217–1221.
- Bruchhaus I. and Tannich E. (1994).** Induction of the iron-containing superoxide dismutase in *Entamoeba histolytica* by a superoxide anion-generating system or by iron chelation. *Molecular and Biochemical Parasitology*; **67**: 281–288.
- CDER: Center for Drug Evaluation and Research.Guidance for industry (1996).** Single dose acute toxicity testing for pharmaceuticals. Aug, Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm079270.pdf> .
- Chen S. and Vieira A. (2010).** A meta-analysis of medicinal plants to assess the evidence for toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*; **3**(2): 82–85.
- Cheng X.J., Hughes M.A., Huston C.D., Loftus B., Gilchrist C.A., Lockhart L.A., Ghosh S., Miller-Sims V., Mann B.J., Petri WA Jr and Tachibana H. (2001).** Intermediate subunit of the Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* is a member of a gene family containing multiple CXXC sequence motifs. *Infection and Immunity*; **69**(9): 5892-5898.
- Choi M.H., Sajed D., Poole L., Hirata K., Herdman S., Torian B.E. and Reed S.L. (2003).** An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack. *Molecular and Biochemical Parasitology* ; 143(1):80-89.
- Cimanga R.K., Kambu K., Tona L., Hermans N., Apers S., Totté J., Pieters L. and Vlietinck A.J., (2006).** Cytotoxicity and *in vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents. *Journal of Ethnopharmacology*; **107**: 83–90.
- Clark G. C. (2000).** The evolution of *Entamoeba*, a cautionary tale. *Research in Microbiology*; **151**: 599-603.

- Clark C. G., Alsmark U. C., Tazreiter M., Saito-Nakano Y., Ali V., Marion S., Weber C., Mukherjee C., Bruchhaus I., Tannich E., Leippe M., Sicheritz-Ponten T., Foster P. G., Samuelson J., Noël C. J., Hirt R. P., Embley T. M., Gilchrist C. A., Mann B. J., Singh U., Ackers J. P., Bhattacharya S., Bhattacharya A., Lohia A., Guillén N., Duchêne M., Nozaki T., Hall N. (2007).** Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Advances in Parasitology* ; **65**: 51-190.
- Clark C. G. and Diamond L. S., (2002).** Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. *Clinical Microbiology Reviews*; **15(3)**: 329–341
- Clive, D., Spector, J.F., (1975).** Laboratory procedure for assessing specific locus mutations at the TK locus in L5178Y cultured mouse lymphoma cells. *Mutation Research*; **31**: 17-29.
- Cole J., Harrington-Brock K. and Moore M. M. (1999).** The mouse lymphoma assay in the wake of ICH4—where are we now? *Mutagenesis*; **14(3)**: 265–270.
- Collins A. R. (2004).** The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* ; **26(3)**:249-61.
- Damtew Z., Tesfaye B. and Bisrat D. (2011).** Leaf, Essential Oil and Artemisinin Yield of Artemisia (*Artemisia annua L.*) as Influenced by Harvesting Age and Plant Population Density. *World Journal of Agricultural Sciences*; **7(4)**: 404-412.
- Debnath A., Parsonage D., Andrade R.M., He C., Cobo E.R., Hirata K., Chen S., García-Rivera G., Orozco E., Martínez M.B., Gunatilleke S.S., Barrios A. M., Arkin M.R., Poole L.B. , McKerrow J.H. and Reed S.L. (2012).** A high-throughput drug screen for *Entamoeba histolytica* identifies a new lead and target. *Nature Medicine*; **18**: 956-960.
- Denny K. H. and Stewart C. W., (2013).** A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development; Chapter 5: Acute, Sub-Acute, Sub-Chronic and Chronic General Toxicity Testing for Preclinical Drug Development: 87-105. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387815-1.00005-8>
- Diallo A., Eklü-Gadegkeku K., Agbonon A., Aklikokou K., Creppy E.E. and Gbeassor M. (2010).** Acute and sub-chronic (28-day) oral toxicity studies of hydroalcohol leaf extract of *Ageratum conyzoides L* (Asteraceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*; **9**: 463–467.
- Diallo D., Paulsen B.S. and Hveem B. (2005).** Products of malian traditional medicine.
- Diamond, L. S. (1968).** Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae. *Journal of Parasitology*; **54**: 1047–1056.

- Diamond, L.S. and Clark, C.G. (1993).** A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *Journal of Eukaryotic Microbiology*; **40**: 340-344.
- Diamond, L. S., Harlow, D. R. and Cunnick C. C. (1978).** A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; **72**: 431-432.
- Diamond, L. S., Phillips, B. P. and Bartgis I. L., (1974).** A comparison of the virulence of nine strains of axenically cultivated *Entamoeba histolytica* in hamster liver. *Archives of Investigation and Medicine*; **5**:423.
- Diener W., Siccha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (2004).** The biometric evaluation of the acute-toxic-class method (oral). *Archives of Toxicology*; **68**: 599-610.
- Dorato M.A., and Engelhardt A..J., (2005).** The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: Use, issues, and definition(s). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*; **42**: 265-274.
- Dos Santos J.R., Fleurentin J. (1990).** L'ethnopharmacologie, une approche pluridisciplinaire dans Ethnopharmacologie : sources, méthodes, objectifs. Actes du 1<sup>er</sup> Colloque Européen d'Ethnopharmacologie, Metz, 22-25 mai. *Ed. ORSTOM*: 26-39.
- Elaine M.S., Ana B.Q., Olindo A.M., Giovanni G., Rodrigo C., Tânia M.A. and Carlos L.Z. (2002).** Screening and Fractionation of Plant Extracts with antiproliferative Activity on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**(8): 1207-1212
- Elujoba A. A., Odeleye O. M. and Ogunyemi C. M. (2005).** Traditional medicine development for medical and dental primary health care delivery system in Africa. *African Journal of Traditional and Complementary Alternative Medicine*; **2**(1):46- 61.
- Emerson, F.S., Shadara, A.C., Devi, P.U., (1993).** Toxic effects of crude extract of *Plumbago rosea* (Rokta chitraka). *Journal of Ethnopharmacology*; **38**:79–84.
- Espinosa A., Clark D. and Stanley S. L. Jr (2004).** *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2) as a target for anti-amoebic agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; **54**: 56–59.
- Fahey, R.C., Newton, G.L., Arrick, B., Overdank-Bogart, T. and Aley, S.B. (1984).** *Entamoeba histolytica*: a eukaryote without glutathione metabolism. *Science*; **224**: 70–72.
- Faust M. D., and Guillen N. (2012).** Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes and Infection*; **14**: 1428-1441.

- Fenech M., (2000).** The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*; **455**: 81-95.
- Fenech M., (2008).** The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. *Methods in Molecular Biology*; **410**:185-216.
- Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A.T., Surralles J., Crott J.W., Parry J., Norppa H., Eastmond D.A., Tucker J.D. and Thomas P. (2011).** Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*; **26**(1):125-132.
- Fleurentin J. et Balansard G. (2002).** L'intérêt de l'ethnopharmacologie dans le domaine des plantes médicinales. *Médecine Tropicale*, **62**: 23-28.
- Fotedar R., Stark D., Beebe N., Marriott D., Ellis J. and Harkness J. (2007).** Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species. *Clinical Microbiology Reviews*; **20**(3): 511–532
- Galvez J., Crespo M.E., Jimenez J., Suárez A. and Zarzuelo A. (1993).** Antidiarrhoeic activity of quercitrin in mice and rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; **45**(2): 157-159.
- García-Zepeda E. A., Rojas-López A., Esquivel-Velázquez M., and Ostoa-Saloma P. (2007).** Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. *Parasite Immunology*; **29**: 679–684.
- Gennari A., van den Berghe C., Casati S., Castell J., Clemenson C., Coecke S., Colombo A., Curren R., Dal Negro G., Goldberg A., Gosmore C., Hartung T., Langezaal I., Lessigiarska I., Maas W., Mangelsdorf I., Parchment R., Prieto P., Sintes J.R., Ryan M., Schmuck G., Stitzel K., Stokes W., Vericat J.A. and Gribaldo L. (2004).** Strategies to replace in vivo acute systemic toxicity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 50. *Alternatives to Laboratory Animals*; **32**(4):437-459.
- Ghosh P.K., Ventura G.J., Gupta S., Serrano J., Tsutsumi V. and Ortiz-Ortiz L. (2000).** Experimental amebiasis: immunohistochemical study of immune cell populations. *Journal of Eukaryotic Microbiology*; **47**(4):395-399.
- Gilchrist C.A., Houpt E., Trapaidze N., Fei Z., Crasta O., Asgharpour A., Evans C., Martino-Catt S., Baba D.J., Stroup S., Hamano S., Ehrenkauffer G., Okada M., Singh U., Nozaki T., Mann B.J. and Petri W.A. Jr. (2006).** Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Molecular and Biochemical Parasitology*; **147**(2):163-176

- Gillin F. D., Reiner D. S. and Suffness M. (1982).** Bruceantin, a potent amoebicide from a plant, *Brucea antidysenterica*. *Anti-microbial Agents and Chemotherapy*; **22**: 342-345.
- Girard-Misguich F., Cognie J., Delgado-Ortega M., Berthon P., Rossignol C., Larcher T., Melo S., Bruel T., Guibon R., Cherel Y., Sarradin P., Salmon H., Guillen N. and Meurens F. (2011).** Towards the establishment of a porcine model to study human amebiasis, *PLoS One*; **6**(12): e28795.
- Girard-Misguich F., Sachse M., Santi-Rocca J. and Guillén N. (2008).** The endoplasmicreticulumchaperone calreticulin is recruited to the uropod during capping of surface receptors in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*; **157**(2): 236–240.
- Gonzalez-Garza M. T. and Said-Fernandez S., (1988).** *Entamoeba histolytica*: potent *in vitro* antiamoebic effect of gossypol. *Experimental Parasitology*; **66**: 253- 255.
- Gonzalez Ruiz A. and Wright S. G. (1998).** Disparate amoebae. *Lancet* **351**: 1672-1673.
- Gordon M. C., Newman D. J. and Snader K. M. (1997).** Natural Products in Drug Discovery and Development. *Journal of Natural Products*, **60**: 52-60.
- Gorlich, D., Hartmann, E., Prehn, S., and Rapoport, T. A. (1992).** A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature*; **357**: 47–52.
- Gornall A. G., Bardawill C. J and Maxima D. 1949.** Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*; **177**: 151-166.
- Grundmann O. (2010).** The Gut Microbiome and Pre-systemic Metabolism: Current State and Evolving Research. *Journal of Drug Metabolism and Toxicology*; **1**:104.
- Gulbins E., Dreschers S., Wilker B. and Grassmé H. (2004).** Ceramide, membrane rafts and infections. *Journal of Molecular Medicine*; **82**:357–363.
- Guo L., Dial S., Shi L., Branham W., Liu J., Fang Jia-Long, Green B., Deng H., Kaput J., and Ning B. (2011).** Similarities and Differences in the Expression of Drug-Metabolizing Enzymes between Human Hepatic Cell Lines and Primary Human Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*; **39**(3): 528–538.
- Gurib-Fakim . (2006)** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* **27**: 4-5.
- Hannun, Y.A. (1996).** Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*; **274**: 1855–1859.
- Hannun YA. and Luberto C., (2000).** Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends in Cell Biology*; **10**: 73-80.

- Haque R., Ibnekarim A. M., Bradley S. R., Barry F. M., Ramakrishnan G. and William P. A. Jr. (2001).** Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *Journal of Infectious Diseases*; **183**: 1787-1793.
- Haque R., Mondal D., Duggal P., Kabir M., Shantanu R., Barry M. F., Bradley R. S. and William A. P. Jr. (2006).** *Entamoeba histolytica* Infection in Children and Protection from Subsequent Amebiasis. *Infection and Immunity*; **74**(2): 904–909.
- Hellberg A, Nowak N, Leippe M, Tannich E and Bruchhaus I. (2002).** Recombinant expression and purification of an enzymatically active cysteine proteinase of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Protein Expression and Purification*; **24**(1): 131-137.
- Hou Y., Mortimer L. and Chadee K. (2010).** *Entamoeba histolytica* Cysteine Proteinase 5 Binds Integrin on Colonic Cells and Stimulates NFκB-mediated Pro-inflammatory Responses. *The Journal of Biological Chemistry*; **285**(46): 35497–35504.
- Haupt E.R., Glembocki D.J., Obrig T.G., Moskaluk C.A., Lockhart L.A., Wright R.L., Seaner R.M., Keepers T.R., Wilkins T.D. and William P. A. Jr. (2002).** The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4+ T cells. *Journal of Immunology*; **169**(8): 4496-4503.
- Hrdy I., Cammack R., Stopka P., Kulda J. and Tachezy J. (2005).** Alternative Pathway of Metronidazole Activation in *Trichomonas vaginalis* Hydrogenosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; **49**(12): 5033–5036.
- Hughes M. A., Lee C. W., Holm C. F., Ghosh S., Mills A., Lockhart L. A., Reed S. L. and Mann B. J. (2003).** Identification of *Entamoeba histolytica* thiol-specific antioxidant as a GalNAc lectin-associated protein. *Molecular & Biochemical Parasitology* **127**: 113–120.
- Ilodigwe E.E., Akah P.A., and Nworu, C.S. (2010).** Evaluation of the Acute and Subchronic Toxicities of Ethanol Leaf Extract of *Spathodea campanulata* P. Beauv. *International Journal of Applied Research in Natural Products* **3**(2): 17-21.
- International Conference on Harmonization (ICH) (2010).** Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals.
- International Conference on Harmonization (ICH) Tripartite Guideline, (2011).** Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human



use. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Safety/S2\\_R1/Step4/S2R1\\_Step4.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf).

- Iqbal, P. F.; Bhat, A. R. and Azam A. (2009).** Antiamoebic coumarins from the root bark of *Adina cordifolia* and their new thiosemicarbazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*; **44**(5): 2252-2259
- Ivory C.P.A. and Chadee K. (2007).** Activation of dendritic cells by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica* drives Th1 responses *in vitro* and *in vivo*. *European Journal of Immunology*; **37**(2): 385–394.
- Jarnagin J.L. and Luchsinger D.W. (1980).** The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Technology* **55**(4):253-8.
- Kamini Gondam Melanie Flore (2005).** Etude *in vitro* de l'effet des extraits de quelques plantes médicinales de la région Bamoun (Cameroun) sur les trophozoites d'*Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903) et évaluation de leur toxicité chez le rat *Albinos wistar*. Thèse de Doctorat 3<sup>e</sup> cycle en Biochimie sous la direction de Pr Moundipa Fewou Paul, la co-direction de Pr Bilong Bilong Charles Felix et la supervision de Pr Mbiapo Tchouanguép Félicité. ; Année académique 2004-2005.
- Kapoor K., Chandra M., Nag D., Paliwal J.K., Gupta R.C. and Saxena R.C. (1999).** Evaluation of metronidazole toxicity: a prospective study. *International Journal of Clinical Pharmacology Research*; **19**(3): 83-88.
- Kaufman P.B., Cseke L.J., Warber S., Duke J.A. and Brielmann H.L. (1999).** Natural Products from Plants. *CRC Press*, Boca Raton, FL.
- Keene W.E., Pettitt M.G., Allen S. and McKerrow J.H. (1986).** The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Experimental Medicine*; **163**(3): 536-549.
- Kelsall B.L. and Ravdin J.I. (1993).** Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Infectious Diseases*; **168**(5): 1319-1322.
- Kirsch-Volders M., Decordier I., Elhajouji A., Plas G., Aardema M. J. and Fenech M. (2011).** In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis*; **26** (1): 177–184.
- Kirsch-Volders M., Elhajouji A., Cundari E. and Van Hummelen P. (1997).** The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosomal breakage, chromosome loss and non disjunction; *Mutation Research*; **392**: 19-30.

- Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M Jr, Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surrallés J, Vanhauwaert A., Wakata A. (2003)** Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*; **540**(2):153-63.
- Klokouzas A., Shahi S., Hladky S.B., Barrand M.A. and van Veen H.W. (2003).** ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa. *International Journal of Antimicrobial Agents*; **22**(3): 301-317.
- Knowles B.B., Howe C.C. and Aden D.P. (1980).** Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**: 497-499.
- Konan N.A., Bacchia E.M., Lincopan N., Varelac S.D. and Varandac E.A. (2007).** Acute, subacute toxicity and genotoxic effects of a hydroethanolic extract of the Cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, **110**: 30-38.
- Koolman, J. and Röhm, K.H. (2004).** Atlas de poche de Biochimie, 3ème ed. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 480 p.
- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., El-Deiry W.S., Golstein P., Green D.R., Hengartner M., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Nuñez G., Peter M.E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B. and Melino G. (2009).** Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differentiation*; **16**(1): 3–11.
- Kulda J. (1999).** Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology*; **29**(2):199-212.
- Kumar S., Raj I., Nagpal I., Subbarao N., Gourinath S. (2011).** Structural and biochemical studies of serine acetyltransferase reveal why the parasite *Entamoeba histolytica* cannot form a cysteine synthase complex. *The Journal of Biological Chemistry*; **286**(14): 12533-12541.
- Kummalue T. (2012).** Difficulties of Drug Development from Thai Herbal Medicine, *Pharmaceutica Analytica Acta*, **S15**.
- Lameire N., Van Biesen W. and Vanholder R. (2005).** Acute renal failure. *The lancet*, **365**: 417.
- Leippe M., Andrä J., Nickel R., Tannich E. and Müller-Eberhard H.J. (1994).** Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of

- Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Molecular Microbiology*; **14**(5): 895-904.
- Leippe M., Bruhn H., Hecht O. and Grotzinger J. (2005).** Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. *Trends in Parasitology*; **21**:5-7.
- Leippe M., Sievertsen H.J., Tannich E. and Horstmann R.D. (1995).** Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. *Parasitology*; **111** (Pt 5): 569-574.
- Leitsch D., Kolarich D., Wilson I.B., Altmann F. and Duchene M. (2007).** Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. *PLoS Biol* **5**: e211.
- Lidell M. E., Moncada D. M., Chadee K., Hansson G. C. (2006).** *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(24): 9298-9303
- Lloyd M. and Kidd D. (2012).** The mouse lymphoma assay. *Methods in Molecular Biology*; **817**:35-54
- Lofmark S., Edlund C. and Nord C.E. (2010).** Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clinical Infectious Diseases*; **50 Suppl 1**: S16-23.
- Loftus B., Anderson I., Davies R., Alsmark U. C. M., Samuelson J., Amedeo P., Roncaglia P., Berriman M., Hirt R. P., Mann B. J., Nozaki T., Suh B., Pop M., Duchene M., Ackers J., Tannich E., Leippe M., Hofer M., Bruchhaus I., Willhoeft U., Bhattacharya A., Chillingworth T., Churcher C., Hance Z., Harris B., Harris D., Jagels K., Moule S., Mungall K., Ormond D., Squares R., Whitehead S., Quail M. A., Rabbinowitsch E., Norbertczak H. , Price C., Wang Z., N. Guillén, Gilchrist C., Stroup S. E., Bhattacharya S., Lohia A., Foster P. G., Sicheritz-Ponten T., Weber C., Singh U., Mukherjee C., El-Sayed N. M., Petri W. A. Jr, Clark C. G., Embley T. M., Barrell B., Fraser C. M. and Hall N. (2005).** The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*; **433**: 865-868.
- Lotter H., Rüssmann H., Heesemann J. and Tannich E. (2008).** Attenuated recombinant *Yersinia* as live oral vaccine carrier to protect against amoebiasis. *International Journal of Medical Microbiology*; **298**(1-2): 79-86.
- Lotter H. and Tannich E. (2006).** The Current Status of an Amebiasis Vaccine. *Archives of Medical Research*; **37**: 292-296.

- Lucas R. and Upcroft J. A. (2001).** Clinical significance of the redefinition of the agent of amoebiasis. *Revista Latinoamericana de Microbiología*; **43**(4): 183-187.
- Maiga Z. and Toure O. (2005).** Ministerial Order of 20th September 2005, Determining Ways of Applying for Marketing Authorization of Human and Veterinary Medicines [05-2203/MS-MEP-SG, in French]. Bamako, Mali: Ministry of Health, Ministry of Farming and Fishing.
- Manna D., Dutta P. K., Achari B. and Lohia A. (2010).** A Novel Galacto-Glycerolipid from *Oxalis corniculata* Kills *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; **54**(11): 4825–4832.
- Marion S., Wilhelm C., Voigt H., Bacri J.C., and Guillen N. (2005).** Signilization and cytoskeleton activity through Myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell Microbiology*; **7**: 1504-1518.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983).** Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*; **113**, 173-215.
- Mattern C.F.T., Keister D.B. and Natovitz P.C. (1982).** Virulence of *Entamoeba histolytica* upon continuous axenic cultivation. *Archives-clinical and Investigative Medicine*; **13**:185.
- Mazzuco A., Benchimol M. and De Souza W. (1997).** Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. *Micron* ; **28**(3): 241–247.
- Meena H., Singh P. K., Negi P.S. and Ahmed Z. (2013).** Subacute toxicity of cultured mycelia of Himalayan entomogenous fungus *Cordiceps sinensis* (Berk.) Sacc. in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*; **51**: 381-387.
- Menendez D., Rojas E., Herrera L.A., Lopez M.C., Sordo M. (2001).** DNA breakage due to metronidazole treatment. *Mutation Research*; **478**: 153-158.
- Mi-ichi F., Yousuf M. A., Nakada-Tsukui K. and Nozaki T. (2009).** Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proceedings of Nature Academy of Science; USA*; **106** (51): 21731–21736
- Mirelman D. (1988).** Ameba-bacterial relationship in amebiasis, p. 351–369. In J. I. Ravdin (ed.), Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. *John Wiley and Sons*, New York, N.Y.
- Mirelman D., Monheit D. and Varon S. (1987).** Inhibition of growth of *Entamoeba histolytica* by allicin, the active principle of garlic extract (*Allium sativum*). *Journal of Infectious Diseases*; **156**: 493-500.

- Mitchell A.D., Auletta A.E., Clive D., Kirby P.E., Moore M.M. and Myhi B.C. (1997).** The L5178Y/tk<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma specific gene and chromosomal mutation assay A phase III report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*; **394**: 177-303.
- Moncada D., Keller K., Ankri S., Mirelman D. and Chadee K. (2006).** Antisense inhibition of *Entamoeba histolytica* cysteine proteases inhibits colonic mucus degradation. *Gastroenterology*; **130**(3): 721-730.
- Mortelmans K. and Zeiger E. (2000).** The Ames Salmonella /microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*; **455**: 29–60.
- Moundipa P. F., Kamini G. M. F., Bilong Bilong F .C. and Bruchhaus I. (2005).** *In vitro* amoebicidal activity of some medicinal plants of the Bamun Region (Cameroon). *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine*; **2** (2): 113 - 121.
- Muller L., Kikuchi Y., Probst G., Schechtman L., Shimada H., Sofuni T. and Tweats D. (1999).** ICH-Harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutation Research*; **436**: 195–225.
- Munford R.S., Sheppard P.O. and O'Hara P.J. (1995).** Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *Journal of Lipid Research*; **36**(8): 1653-1663.
- Nana H. M., Ngono Ngane R.A., Kuate J.R., Koanga Mogtomo L.M., Tamokou J.D., Ndifor F., Mouokeu R.S., Ebelle Etame R.M., Biyiti L. and Amvam Zollo P.H. (2011).** Acute and sub-acute toxicity of the methanolic extract of *Pteleopsis hyloidendron* stem bark. *Journal of Ethnopharmacology* ; **137**: 70-76.
- Oberly T., Yount D. and Garriott M. (1997).** A comparison of the soft agar and microtitre methodologies for the L5178Y TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma assay; *Mutation Research*; **388**: 59-66.
- Ogbonnia S. O., Mbaka G. O., Nwozor A. M., Igbokwe H. N., Usman A. and Odusanya P. A., (2013).** Evaluation of Microbial Purity and Acute and Sub-acute Toxicities of a Nigerian Commercial Polyherbal Formulation used in the Treatment of Diabetes Mellitus. *British Journal of Pharmaceutical Research* **3**(4): 948-962.
- Ogbulie J.N., Ogueke C.C., Okoli I.C., Anyanwu B.N. (2007).** Anti-bacterial activities and toxicological potentials of crude ethanolic extracts of *Euphorbia hirta*. *African Journal of Biotechnology*; **6**(13): 1544–1548.

- 
- Olive P.L. and Banáth J.P. (2006).** The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*; **1**(1): 23-29.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 1998).** OECD Guidelines for the Testing Of Chemical No 408. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents (*Adopted 21st September 1998*).
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2001a).** OECD guideline for testing of chemicals No 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method (*Adopted: 17th December 2001*).
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2001b).** OECD guideline for testing of chemicals No 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure (*Adopted: 17th December 2001*).
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2008a).** Guidance document on mammalian reproductive toxicity testing and assessment. OECD Environment, Health and safety Publications. *Series on Testing and Assessment N° 43*. Paris, 88 pages.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2008b).** OECD Guideline for testing of chemicals No 425: Acute Oral Toxicity-Up-and-Down-Procedure (UDP) (*Adopted: 3rd October 2008*).
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2008c).** OECD Guidelines for the Testing Of Chemicals No 407. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents (*Adopted 3rd October 2008*).
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2009).** OECD Guidelines for the Testing Of Chemical No 452. Chronic Toxicity Studies (*Adopted 7th September 2009*).
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS), (1998).** Réglementation des médicaments à base des plantes : la situation dans le monde, Programme de Médecine Traditionnelle.
- Padilla-Vaca F. and Anaya-Velázquez F. (2010).** Insights into *Entamoeba histolytica* virulence modulation. *Infectious Disorders Drug Targets*; **10**(4): 242-250.
- Padilla-Vaca F., Ankri S., Bracha R., Anna Koole L. and Mirelman D. (1999).** Down Regulation of *Entamoeba histolytica* Virulence by Monoxenic Cultivation with *Escherichia coli* O55 Is Related to a Decrease in Expression of the Light (35-Kilodalton) Subunit of the Gal/GalNAc Lectin. *Infection and Immunity*; **67**(5): 2096–2102.
-

- Pan H., Qin W.-X., Ke-Ke H., Da-Fang W., Yao Y., Zhi-Gang X., Qian-De H., Kerong T. G., Xiao-Mei Z., Hui-Qiu J., Ping-Ping Z., Yi H., Yu-Yang L. and Jian-Ren G. (2001).** Cloning, Mapping, and Characterization of a Human Homologue of the Yeast Longevity Assurance Gene *LAG1*. *Genomics*; **77**(1–2): 58-64.
- Parija S. C. (2010).** Progress in the research on diagnosis and vaccines in amoebiasis. *Tropical Parasitology*; **1**:4-8.
- Parkinson C., Thomas K.E. and Umley L.C. (1996).** The Timing of Preclinical Toxicological Studies: Pharmaceutical Company Approaches to Toxicity Testing in Support of Initial Clinical Investigations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*; **23**: 162-172.
- Parsons M. (2004).** Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose, *Molecular Microbiology*; **53**(3): 717–724.
- Pavarini D. P., Pavarini S. P., Niehues M. and Lopes N. P. (2012).** Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology*: 12 pages.
- Perdomo D., Baron B., Rojo-Domínguez A., Raynal B., England P. and Guillén N. (2013).** The  $\alpha$ -helical regions of KERP1 are important in *Entamoeba histolytica* adherence to human cells. *Science Reports*; **3**: 1171.
- Petri W. A., Haque R. and Mann B. J. (2002).** The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annual Review Microbiology*; **56**: 39–64.
- Pewzner-Jung Y., Ben-Dor S. and Futerman A.H. (2006).** When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)?: Insights into the regulation of ceramide synthesis. *Journal of Biological Chemistry*; **281**: 25001-25005.
- Phillipson D.W., Milgram K.E., Yanovsky A.I., Rusnak L.S., Haggerty D.A., Farrell W.P., Greig M.J., Xiong X. and Proefke M.L. (2002).** High-throughput bioassay-guided fractionation: a technique for rapidly assigning observed activity to individual components of combinatorial libraries, screened in HTS bioassays. *Journal of Combinatorial Chemistry*; **4**(6): 591-599.
- Pieme C.A., Penlap V. N., Nkegoum B., Taziebou C. L., Tekwu E.M., Etoa F. X. and Ngongang J. (2006).** Evaluation of acute and subacute toxicities of aqueous ethanolic extract of leaves of *Senna alata* (L.) Roxb (Cesalpiniaceae). *African Journal of Biotechnology*, **5**(3): 283-289.
- Pinilla A.E., López M.C. and Viasus D.F. (2008).** History of the *Entamoeba histolytica* protozoan [Abstract in English]. *Revista Medica de Chile*; **136**(1): 118-124.

- Poole L.B., Chae H.Z., Flores B.M., Reed S.L., Rhee S.G. and Torian B.E. (1997).** Peroxidase activity of a TSA-like antioxidant protein from a pathogenic amoeba. *Free Radical Biology and Medicine*; **23**: 955–959.
- Ralston K. S. and Petri W.A. (2011).** Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends in Parasitology*; **27**(6): 253-262.
- Ramakrishnan G., Lee S., Mann B.J. and Petri WA Jr. (2000).** *Entamoeba histolytica*: deletion of the GPI anchor signal sequence on the Gal/GalNAc lectin light subunit prevents its assembly into the lectin heterodimer. *Experimental Parasitology*; **96**(1): 57-60.
- Rates S.M.K. (2001).** Plants as source of drugs. *Toxicon* **39**: 603-613.
- Ravdin J.I. (1995).** Amebiasis. *Clinical and Infectious Diseases*, **20**: 1453-1466.
- Ravdin J.I., Abd-Alla M.D., Welles S.L., Reddy S. and Jackson T.F. (2003).** Intestinal antilectin immunoglobulin A antibody response and immunity to *Entamoeba dispar* infection following cure of amebic liver abscess. *Infection and Immunity*; **71**(12): 6899-6905.
- Reed S.L., Ember J.A., Herdman D.S., DiScipio R.G., Hugli T.E. and Gigli I. (1995).** The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *Journal of Immunology*; **155**(1): 266-274.
- Reed S.L., Keene W.E. and McKerrow J.H. (1989).** Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology*; **27**(12): 2772-2777.
- Reeves, R.E. (1984).** Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. *Advances in Parasitology*; **23**: 105-142.
- Reeves, R. E., Meleney H. E. and Frye W. W. (1957).** A modified Shaffer-Frye technique for the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some observations on its carbohydrate requirements. *American Journal of Hygiene*; **66**: 56–62.
- Reeves, R. E., South, D. J., Blytt, H. J. and Warren, L. G. (1974).** Pyrophosphate D-fructose 6-phosphate I-phosphotransferase. A new enzyme with the glycolytic function of 6-phosphofructokinase. *The Journal of Biological Chemistry*; **249**: 7737-7741.
- Reitman S. and Frankel S. (1947).** A colorimetric method for the determination of serum oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*; **28** (1): 56-63.



- Rhiouani, H., El-Hilaly, J., Israili, H.Z. and Lyoussi, B. (2008).** Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*; **118**: 378–386.
- Ridet J. and Chartol A. (1964).** Les proprietes antidysenteriques de l'*Euphorbia hirta*. *Medécine Tropicale*; **24**:119–143.
- Ripert A., Numont G., Guy M., Tribouleyduret J. E.T. and Same E. A. (1995).** Le portage des kystes protozoaires intestinaux parasites de l'homme à Ngaoundéré. *Bulletin of the Exotic Pathology Society*; **88**.
- Rosefort C., Fauth E. and Zankl H. (2004).** Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis*; **19**(4): 277-284.
- Ryan C. M. and Upinder S. (2007).** Identification of an *Entamoeba histolytica* serine-, threonine-, and isoleucine-rich Protein with Roles in Adhesion and Cytotoxicity. *Eukaryotic Cell*; **6**(11): 2139–2146.
- Saad B., Azaizeh H., Abu-Hijleh G.N and Said O. (2006)a.** Safety of Traditional Arab Herbal Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* ; **3**(4): 433–439.
- Saad B., Da Kwar S., Said O. R., Abu-Hijleh G., Al Batta F. H., Kmeel A. and Aziازه H. (2006)b.** Evaluation of Medicinal Plant Hepatotoxicity in Co-cultures of Hepatocytes and Monocytes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **3**(1): 93–98.
- Saavedra E., Encalada R., Pineda E., Jasso-Chavez R. and Moreno-Sanchez R. (2005).** Glycolysis in *Entamoeba histolytica*: Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. *FEBS Journal*, **272**: 1767–1783.
- Sacher M., Jiang Yu, Barrowman J., Al Scarpa, Burston J., Zhang Li, Schieltz D., Yates III J. R., Abeliovich H. and Ferro-Novick S. (1998).** TRAPP, a highly conserved novel complex on the cis-Golgi that mediates vesicle docking and fusion. *The EMBO Journal*; **17**(9): 2494–2503.
- Saffer L. D. and Petri, Jr W. A. (1991).** Role of the Galactose Lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. *Infection and Immunity*, **59**(12): 4681-4683.
- Saffoon, N., Alam Ashraful, M. and Uddin, G.M., (2010).** Phytochemical and cytotoxicity investigation of *Codiaeum variegatum* Linn. Leaf. *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences*; **3**: 51-53.

- Said-Fernández S., Vargas-Villarreal J., Castro-Garza J., Mata-Cárdenas B.D., Navarro-Marmolejo L., Lozano-Garza G. and Martínez-Rodríguez H. (1988).** PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; **82**(2): 249-53.
- Sandeep B. P., Nilofar S. N. and Chandrakant S. M. (2009).** Review on phytochemistry and pharmacological aspects of *Euphorbia hirta* Linn. *Journal of Pharmaceutical Research Health Care*; **1**(1): 113-133.
- Santi-Rocca J., Weber C., Guigon G., Sismeiro O., Coppée J-Y. and Guillén N. (2008).** The lysine- and glutamic acid-rich protein KERP1 plays a role in *Entamoeba histolytica* liver abscess pathogenesis. *Cellular Microbiology*; **10**(1): 202–217
- Sargeant P.G. (1992).** *Entamoeba histolytica* is a complex of two species. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; **86**: 348.
- Sauvage V., Aubert D., Escotte-Binet S. and Villena I. (2009).** The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*; **167**(2): 81-94.
- Schlosser S., Leitsch D. and Duchene M. (2013).** *Entamoeba histolytica*: identification of thioredoxin-targeted proteins and analysis of serine acetyltransferase-1 as a prototype example. *Biochemistry Journal*; **451**: 277-288.
- Schuchman E.H. (2010).** Acid sphingomyelinase, cell membranes and human disease: lessons from Niemann-Pick disease. *FEBS Letters*; **584**(9):1895-900.
- Seigneur M., Mounier J., Prevost M.C. and Guillén N. (2005).** A lysine- and glutamic acid-rich protein, KERP1, from *Entamoeba histolytica* binds to human enterocytes. *Cellular Microbiology*; **7**(4): 569-579.
- Shaposhnikov S.A., Salenko V.B., Brunborg G., Nygren J. and Collins A.R. (2008).** Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments? *Electrophoresis*; **29**(14): 3005-3012.
- Sharma P. and Sharma J. D. (2001).** A Review of Plant Species Assessed *in vitro* for Antiamoebic Activity or both Antiamoebic and Antiplasmodial Properties. *Phytotherapy Research*; **15** (1): 1–17.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. and Schneider E.L. (1988).** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*; **175**(1):184-191.

- Snow M. J. and Stanley S. L. Jr. (2006).** Recent Progress in Vaccines for Amebiasis. *Archives of Medical Research*; **37**:280–287
- Soliman M. I. (2001).** Genotoxicity testing of Neem Plant (*Azadirachta indica* A. Juss.) using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Journal of Biological Sciences*, **1**(11): 1021- 1027.
- Sousa T., Paterson R., Moore V., Carlsson A., Abrahamsson B. and Basit A. W. (2008).** The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*; **363** (1-2): 1-25.
- Sowemimo A. A., Fakoya F. A., Awopetu I., Omobuwajo O. R. and Adesanya S. A. (2007).** Toxicity and mutagenic activity of some selected Nigerian plants. *Journal of Ethnopharmacology*; **113**: 427-432.
- Stanley S. L. (2003).** Amoebiasis. *The Lancet*, **361**(9362): 1025 – 1034.
- Stanley S.L., Tian K., Koester J.P. and Li E. (1995).** The serine-rich *Entamoeba histolytica* protein is a phosphorylated membrane protein containing *O*-linked *N*-acetyl glucosamine residues. *Journal of Biological Chemistry*; **270**: 4121–4126.
- Stiban J., Tidhar R. and Futerman A. H. (2009).** Ceramide Synthases: Roles in Cell Physiology and Signaling. *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules*, edited by Charles Chalfant and Maurizio Del Poeta ©2009 Landes Bioscience. Pages 1-11.
- Stopper H., Mueller S.O. and Lutz W.K. (2000).** Supra-additive genotoxicity of a combination of  $\gamma$ -irradiation and ethyl methanesulfonate in mouse lymphoma L5178Y cells. *Mutagenesis*; **15**(3): 235-238.
- Sudhakar M., Rao C. V., Rao P. M., Raju D. B. and Venkateswarlu Y. (2006).** Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. *Fitoterapia*; **77**(5):378–380.
- Sutovská M., Franová S., Príseznáková L., Nosálová G., Togola A., Diallo D., Paulsen B. S. and Capek P. (2009).** Antitussive activity of polysaccharides isolated from the Malian medicinal plants. *Internatioanl Journal of Biological Macromolecules*; **44**(3):236–239.
- Tejs S. (2008).** The Ames test: a methodological short review. *Environmental Biotechnology*; **4** (1): 7-14.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C. and Sasaki Y.F. (2000).** Single cell gel/comet assay:

- guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*; **35**(3): 206-221.
- Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Cimanga, K. and Vlietinck A.J. (1998).** Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*; **6**: 57–65.
- Tovar J., Fischer A. and Clark C. G. (1999).** The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology*; **32**(5):1013-1021.
- Trainer D.L., Kline T., McCabe F.L., Faucette L.F., Feild J., Chaikin M., Anzano M., Rieman D., Hoffstein S., Li D.J., Gennaro D., Buscarino C., Lynch M., Poste G. and Greig R. (1980).** Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *International Journal of Cancerology* **41**: 287-296.
- Tsutsumi V., Mena-Lopez R., Anaya-Velazquez F. and Martínez-Palomo A. (1984).** Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *American Journal of Pathology*; **117**, 81–91.
- Turner J.C., Green R.S. and Kelly W.J. (1977).** The metabolism of foreign compounds by the sheep gastrointestinal tract in vitro. *General Pharmacology*; **8**: 239-241.
- Ulrich-Merzenich G., Zeitler H., Jobst D., Panek D., Vetter H. and Wagner H. (2007).** Application of the “-Omic-” technologies in phytomedicine. *Phytomedicine* **14**: 70–82.
- United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO, 1996).** Culture and Health, Orientation Texts-World Decade for Cultural Development 1988 – 1997, Document CLT/DEC/PRO – 1996, Paris, France, page 129.
- Van Beusekom H.J., Van De Laar M.A.F.J., Franssen M.J.A.M., Van Valburg J.A.A., Gijzel W.P. and Couvée J.E. (1997).** The moderate intestinal side effects of auranofin do not require prophylactic therapy with a buikforming agent. *Clinical Rheumatology*, **16**(5): 471-476.
- Van den Heuvel M.J., Clark D.G., Fielder R.J., Koundakjian P.P., Oliver G.J.A., Pelling D., Tomlinson N.J. and Walker A.P. (1990).** The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD<sub>50</sub> test. *Food and Chemical Toxicology*; **28**(7): 469–482.

- Varughese G., Sabulal B. and Anil J. J. (2010).** Ethnomedicine: A Source of Complementary Therapeutics: Chapter 3: Ethnomedicinal plants in parasitic infections. ISBN: 978-81-308-0390-6 Editor: Debprasad Chattopadhyay: 53-116.
- Vayssie, L., Vargas, M., Weber, C. and Guillén, N. (2004).** Double-stranded RNA mediates homology-dependent gene silencing of gamma-tubulin in the human parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Biochemical Parasitology*; **138**: 21–28.
- Verma A.K., Verma R., Ahuja V. and Jaishree P. (2012).** Real-time analysis of gut flora in *Entamoeba histolytica* infected patients of Northern India. *BMC Microbiology*; **12**:183.
- Vidic D, Maksimovic M., Cavar S. and Siljak-Yakovlev S. (2010).** Influence of the continental climatic conditions on the essential-oil composition of *Salvia brachyodon* vandas transferred from Adriatic Coast. *Chemistry and Biodiversity*; **7**: 1208-1216.
- Villalba J.D., Gómez C., Medel O., Sánchez V., Carrero J.C., Shibayama M. and Ishiwara D.G. (2007).** Programmed cell death in *Entamoeba histolytica* induced by the aminoglycoside G418. *Microbiology*; **153**: 3852–3863.
- Vivanco-Cid H, Alpuche-Aranda C, Wong-Baeza I, Rocha-Ramírez LM, Rios-Sarabia N, Estrada-Garcia I, Villasis-Keever MA, Lopez-Macias C and Isibasi A. (2007).** Lipopeptidephosphoglycan from *Entamoeba histolytica* activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late endosomes. *Parasite Immunology*; **29**(9): 467-474.
- Vlietinck A.J., Van Hoof L., Totté J., Lasure A., Vanden Berghe D., Rwangabo P.C. and Mvukiyumwami J. (1995).** Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. *Journal of Ethnopharmacology*; **46**(1):31–47.
- Voigt H., Olivo J-C., Sansonetti P. and Guillén N. (1999).** Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. *Journal of Cell Science*; **112**: 1191–1201.
- Wagner H. and Ulrich-Merzenich G. (2009).** Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*; **16**(2-3): 97-110.
- Wang Z., Gerstein M. and Snyder M. (2009).** RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*; **10**(1): 57-63.
- Wasan K.M., Najafi S., Wong J. and Kwong M. (2001).** Assessing plasma lipid levels, body weight, and hepatic and renal toxicity following chronic oral administration of a water soluble phytostanol compound FM-VP4 to gerbils. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; **4**(3): 228-234.

- Wassmann C., Hellberg A., Tannich E. and Bruchhaus I. (1999).** Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *Journal of Biological Chemistry*; **274**: 26051-26056.
- Welter B. H., Goldston A. M., and Temesvari L. A. (2011).** Localization to lipid rafts correlates with increased function of the Gal/GalNAc lectin in the human protozoan parasite, *Entamoeba histolytica*. *International Journal of Parasitology*; **41**(13-14): 1409–1419.
- Westerink W.M. and Schoonen W.G. (2007).** Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*; **21**(8):1581-91.
- Willcox M., Sanogo R., Diakite C., Giani S., Smestad P. B. and Diallo D. (2012).** Improved Traditional Medicines in Mali. *The Journal of Alternative And Complementary Medicine*; **18**(3): 212–220.
- Wilson I. W., Weedall G. D. and Hall N. (2012).** Host–Parasite interactions in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: what have we learned from their genomes? *Parasite Immunology* ; **34**: 90–99
- Wilson I.D. and Nicholson J.K. (2009).** The role of gut microbiota in drug response. *Current Pharmaceutical Design*; **15**: 1519-1523.
- Wink, M. (2012).** Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **17**(11): 12771–91.
- Wittner, M. and Rosenbaum R.M. (1970).** Role of bacteria in modifying virulence of *Entamoeba histolytica*: Studies of amoeba from axenic culture. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; **19**: 755.
- Wong-Baeza I., Alcántara-Hernández M., Mancilla-Herrera I., Ramírez-Saldívar I., Arriaga-Pizano L., Ferat-Osorio E., López-Macías C. and Isibasi A. (2010).** The role of lipopeptidophosphoglycan in the immune response to *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* : **Article ID 254521**, 12 pages.
- World Health Organisation (W.H.O., 1993).** Regional Office for Western Pacific, Manila. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicine.
- World Health Organization (W.H.O., 2008).** Traditional medicine. WHO Media Centre. Retrieved July 29, 2013, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>

- Wright C. W., Kane S. R., O'Neill M. J., Phillipson J. D. and Warhurst D. C. (1989).** *In vitro* antiamebic activity of some plants used in traditional medicine. In *Biochemistry and Molecular Biology of Anaerobic Protozoa*, Lloyd D, Coombs GH, Page TAP (eds). Harwood: London: 242-253.
- Ximénez C., Morán P., Rojas L., Valadez A., Gómez A., Ramiro M., Cerritos R., González E., Hernández E. and Oswaldo P. (2011).** Novelty on amoebiasis: A neglected tropical disease. *Journal of Global Infectious Diseases*; **3**(2): 166–174.
- Zhang T., Cieslak P.R., Foster L., Kunz-Jenkins C. and Stanley S.L. (1994).** Antibodies to the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevent amebic liver abscess in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Parasite Immunology*; **16**: 225–230.
- Zhang T., Cieslak P.R. and Stanley S.L., (1994).** Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infection and Immunity*; **62**:1166–1170.

**Annexes**



---

**Annexes:****Annexe 1 : Préparation du milieu et culture axénique d'*Entamoeba histolytica*****a) Préparation du milieu TYI-S-33**

Dans un Erlen-meyer de 5 litres, introduire 1 litre d'eau distillée, puis :

- Biosate peptone (*BD company*): 150 g
- Glucose (*Merck*) : 50 g
- L-cystéine (*Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France*) : 5 g
- Acide ascorbique (*Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France*) : 1 g
- Chlorure de sodium (*Merck*) : 10 g
- Monohydrogénophosphate dipotassique ( $K_2HPO_4$ ) (*Sigma-Aldrich, France*) : 5 g
- Dihydrogénophosphate de potassium ( $KH_2PO_4$ ) (*Sigma-Aldrich, France*) : 3 g
- Citrate d'ammonium ferrique (*Sigma-Aldrich, France*): 118 mg.... qsp à 4,5 litres.
- Laisser dissoudre complètement sous agitateur magnétique
- Ajuster le pH à 6,8 avec 2 à 3 ml de NaOH 7,5N
- Aliquoter dans des flacons de 500 et 1000 mL
- Fermer les bouchons mais pas complètement
- Autoclaver à 110°C pendant 15 minutes
- Laisser refroidir une nuit à 4°C avant de congeler à -20°C

**b) Préparation du milieu complet :**

- Milieu TYI-S-33 : 410 mL
- Pénicilline/streptomycine (*Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France*): 5 mL
- Vitamine Diamond Tween 80 (*Sigma-Aldrich, France*) : 15 mL
- Sérum de bœuf (*PAA laboratories GmbH, Austria*) : 75 mL (le sérum est d'abord décomplémenté à 56°C pendant 40 minutes)
- Filtrer le mélange sur une unité de filtration (0,22 µm) de 500 mL
- Marquer le milieu complet en indiquant la date de préparation

**c) Passage des parasites**

- Remplir les tubes à essai avec des volumes de 13-14 mL de milieu
- Vider le milieu des tubes en culture
- Rincer délicatement les parasites avec 2 mL de milieu
- Ajouter 5 mL de milieu complet et incubé dans un bain de glace pendant 5 minutes pour décoller les parasites

- Reprendre 200-300  $\mu\text{L}$  d'inoculum pour remettre dans les tubes contenant 13-14 mL du milieu complet (adapter l'inoculum avec la concentration des parasites que l'on désire avoir)
- Compléter le volume des anciens tubes poussés à 13 mL avec le milieu complet, fermer correctement les tubes et les marquer
- Incuber à 37°C et reprendre la même procédure 3 jours plus tard

### **Annexe 2 : Protocole de préparation des échantillons**

- Peser l'extrait, la fraction, la sous-fraction ou le composé
- Dissoudre dans un volume approprié de DMSO (*Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France*) ou tampon phosphate salin
- Filtrer chaque mélange en utilisant une seringue fixée à un filtre stérilisant (0,22  $\mu\text{m}$ )
- Procéder à des dilutions en série au  $\frac{1}{2}$ .

### **Annexe 3 : Matériel utilisé pour le fractionnement**

- Silice
- Plaque de silice
- Acétate d'éthyle (AcOEt)
- Methanol (MeOH)
- Chlorure de méthylène ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )
- Ethanol (EtOH)
- Colonne en verre
- Evaporateur rotatif
- Appareil à HPLC

### **Annexe 4 : Evaluation de l'activité antiamebique**

- Métronidazole (*Sigma-Ultra, CA, USA*; PM : 171,15 g/mol)
- Bleu trypan 0,4% (*Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France*; PM : 960,81 g/mol)
- Diluer au 20<sup>ème</sup> lors de l'évaluation de la viabilité cellulaire
- Microplaques (48 puits)
- Tubes de cultures (screw cap culture tubes with phenolic caps 16×125 mm) (*Corning*)
- *Labtek*® Chamber slide system (8 puits) *Permanox*®
- Genbag anaer (*Biomerieux, Marcy l'Etoile, France*)
- Incubateur
- Microscope à phase inverse

---

**Annexe 5 : Immunofluorescence indirecte de la Gal/GalNAc lectine**

- Anticorps primaire Gal/GalNAc lectine de lapin
- Anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin marqué Alexa Fluor 546
- Formaldehyde (*Thermo-scientific*)
- Tampon phosphate salin (*Phosphate Buffered Saline : PBS*)
  - NaCl (*Sigma-Aldrich* ; PM : 58,44 g/mol) : 8 g
  - KCl (*Sigma-Aldrich* ; PM : 74,55 g/mol) : 0,2 g
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (*Sigma-Aldrich* ; PM : 141,96 g/mol) : 1,44 g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma-Aldrich* ; PM : 136,09 g/mol) : 0,24 g
  - Dissoudre dans environ 800 mL d'eau distillée
  - Ajuster le pH à 7,4 avec le HCl concentré. Compléter le volume à 1 litre et autoclaver.
- Solution de blocage : BSA/PBS 3% (à préparer le jour de la manipulation)
  - Pésier 3 g de BSA (*Sigma-Aldrich*)
  - Dissoudre dans 100 mL de tampon PBS
  - Homogénéiser et conserver à 4°C
- Solution de lavage : BSA/PBS 1% (à préparer le jour de la manipulation)
  - Pésier 10 g de BSA (*Sigma-Aldrich*)
  - Dissoudre dans 1 litre de tampon PBS
  - Homogénéiser et conserver à 4°C
- Vectaschield avec DAPI (*Vector-ABCYS*)
- Venis à ongles
- Lames et lamelles
- Microscope à fluorescence (*Olympus Optica*)

**Annexe 6 : Analyse transcriptomique des trophozoites d'*Entamoeba histolytica*****a) Extraction des ARN totaux**

- Trizol (*Invitrogen, Saint Aubin, France*)
- Chloroforme (*Sigma-Aldrich, France*)
- Isopropanol
- Acétate d'ammonium
- Ethanol absolu
- Bleu de migration : *Gel loading dye 6X*
- Marqueur : *DNA 1 kb ladder*

- Tampon Tris-Borate-EDTA (TBE)
- Bromure d'éthidium (BET)
- Agarose 0,8%
- Pésér 0,4 g d'agarose (*Invitrogen*)
- Dissoudre dans 50 mL de TBE
- Chauffer au four à micro-onde jusqu'à dissolution complète de l'agarose
- Centrifugeuse
- Biophotomètre (*Eppendorf*)
- Cuve électrophorétique
- Générateur (*APELEX*)
- Bain chauffant
- Lampe UV

**b) Construction et séquençage des bibliothèques**

- Oligo(dT) coated Sera-Mag Magnetic Particles (*Thermo Scientific, Fremont, USA*)
- Kit RNeasy MinElute (*Qiagen, Venlo, Netherlands*)
- Kit TruSeq Small RNA Sample Prep (*Illumina*)
- Thermocycleur HiSeq 2000 (*Illumina*)
- Kit TruSeq SR Cluster v3 cBot HS (*Illumina*)
- Kit TruSeq SBS v3 HS (*Illumina*)

Annexe 7 (a) : Expression différentielle des gènes chez les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* après 12 heures de traitement à SF9B

Information sur le gène		Analyse au logiciel DESeq				Analyse au logiciel Cuffdiff			
Identité du gène	Description	Nombre moyen de "reads" [SF9B]	Nombre moyen de "reads" [DMSO]	Taux d'expression	p-value [ <b>&lt;0.05 en gras</b> ]	Abondance moyenne de "reads" (en RPKM) [SF9B]	Abondance moyenne de "reads" (en RPKM) [DMSO]	Taux d'expression	p-value [ <b>&lt;0.05 en gras</b> ]
EHI_130860	longevity-assurance family protein	131,72	23,97	5,50	<b>1,5E-02</b>	14,11	2,50	5,63	7,6E-02
EHI_178050	ATP-binding cassette protein putative	57,79	299,60	-5,18	<b>1,5E-02</b>	1,41	7,11	-5,05	<b>1,2E-02</b>
EHI_095820	ATP-binding cassette protein putative	205,17	1106,36	-5,39	<b>1,5E-02</b>	5,03	26,39	-5,25	<b>4,1E-03</b>
EHI_079300	long-chain-fatty-acid--CoA ligase putative	75,60	444,23	-5,88	<b>2,3E-02</b>	3,85	22,05	-5,73	<b>8,8E-03</b>
EHI_031640	hypothetical protein	29,29	195,55	-6,68	1,0E+00	2,22	14,49	-6,53	<b>2,9E-02</b>
EHI_073450	hypothetical protein	59,50	399,13	-6,71	<b>1,5E-02</b>	9,50	62,11	-6,54	<b>3,8E-03</b>
EHI_131560	hypothetical protein	30,61	237,56	-7,76	1,0E+00	10,67	79,62	-7,46	<b>3,8E-03</b>
EHI_092490	hypothetical protein	242,04	2137,88	-8,83	<b>8,8E-07</b>	18,51	159,73	-8,63	<b>4,3E-06</b>
EHI_090430	hypothetical protein	39,85	749,64	-18,81	1,0E+00	3,05	56,38	-18,46	<b>1,3E-07</b>

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne sur 3 essais biologiques indépendants. Les gènes différentiellement exprimés chez les trophozoïtes traités ont été définis lorsque ( $p < 0,05$ ) par les logiciels DESeq ou Cuffdiff respectivement. L'abondance moyenne en RPKM (Reads Per Kilobase per Million) désigne le nombre moyen de "reads" par Kilobase par million aligné sur 3 essais biologiques indépendants. La valeur positive du taux d'expression indique une surexpression du gène, tandis que la valeur négative représente une répression du gène.

Annexe 7 (b) : Expression différentielle des gènes chez les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* après 24 heures de traitement à SF9B

Information sur le gène		Analyse au logiciel DESeq				Analyse au logiciel Cuffdiff			
Identité du gène	Description	Nombre moyen de "reads" [SF9B]	Nombre moyen de "reads" [DMSO]	Taux d'expression	p-value [ <b>&lt;0.05 en gras</b> ]	Abondance moyenne de "reads" (en RPKM) [SF9B]	Abondance moyenne de "reads" (en RPKM) [DMSO]	Taux d'expression	p-value [ <b>&lt;0.05 en gras</b> ]
EHI_139080	longevity-assurance family protein	136,42	16,75	8,15	<b>2,4E-03</b>	15,02	1,82	8,23	<b>3,7E-04</b>
EHI_130860	longevity-assurance family protein	99,70	21,99	4,53	<b>9,2E-04</b>	10,94	2,38	4,60	<b>3,5E-02</b>
EHI_182520	DNAJ homolog subfamily A member 1 putative	549,44	1067,28	-1,94	<b>1,8E-02</b>	57,33	109,47	-1,91	1,0E+00
EHI_071590	protein disulfide isomerase putative	12367,21	24363,61	-1,97	<b>1,8E-02</b>	1204,91	2336,31	-1,94	5,0E-01
EHI_060340	cysteine synthase A putative	252,89	513,28	-2,03	<b>9,2E-03</b>	27,25	54,33	-1,99	1,0E+00
EHI_040600	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase putative	272,25	587,13	-2,16	<b>1,0E-02</b>	22,88	48,51	-2,12	5,0E-01
EHI_010850	cysteine proteinase putative	750,27	1648,25	-2,20	<b>3,6E-02</b>	86,89	188,44	-2,17	4,0E-01
EHI_039610	cysteine proteinase putative	601,49	1358,98	-2,26	<b>1,2E-02</b>	69,61	155,17	-2,23	2,9E-01
EHI_161070	hypothetical protein	2134,33	5354,94	-2,51	<b>3,5E-02</b>	390,41	963,73	-2,47	5,7E-02
EHI_170940	hypothetical protein	71,96	195,11	-2,71	<b>2,0E-02</b>	7,97	21,21	-2,66	3,6E-01
EHI_022950	DnaJ family protein	565,12	1663,66	-2,94	<b>1,9E-06</b>	55,18	159,77	-2,90	<b>6,4E-03</b>
EHI_189960	ADP-ribosylation factor 1 putative	257,21	784,86	-3,05	1,0E+00	58,33	174,69	-2,99	<b>3,5E-02</b>
EHI_021560	thioredoxin putative	2411,30	7649,43	-3,17	<b>9,2E-03</b>	227,32	710,00	-3,12	<b>9,8E-04</b>
EHI_140740	hypothetical protein	1133,03	3746,66	-3,31	<b>1,9E-06</b>	89,40	291,55	-3,26	<b>8,2E-04</b>
EHI_163480	90 kDa heat shock protein putative	2086,82	7020,92	-3,36	<b>4,1E-08</b>	100,58	332,05	-3,30	<b>4,4E-04</b>

EHI_119510	hypothetical protein	61,44	211,90	-3,45	1,0E-01	10,46	35,51	-3,39	<b>1,9E-02</b>
EHI_019630	hypothetical protein	64,29	233,96	-3,64	1,0E+00	11,84	42,37	-3,58	<b>2,1E-02</b>
EHI_073480	ADP-ribosylation factor putative	71,99	263,61	-3,66	2,0E-01	16,37	59,01	-3,61	<b>5,4E-03</b>
EHI_013340	hypothetical protein	28,27	105,66	-3,74	<b>2,4E-03</b>	9,29	34,13	-3,68	6,0E-02
EHI_178050	ATP-binding cassette protein putative	95,05	371,54	-3,91	<b>1,9E-06</b>	2,37	9,13	-3,85	<b>9,0E-04</b>
EHI_095820	ATP-binding cassette protein putative	344,85	1419,92	-4,12	<b>9,6E-09</b>	8,64	35,01	-4,05	<b>3,0E-05</b>
EHI_131560	hypothetical protein	51,54	215,20	-4,18	1,0E+00	18,27	75,01	-4,10	<b>4,4E-03</b>
EHI_131880	acyl-coA synthetase putative	52,54	224,92	-4,28	1,3E-01	1,74	7,34	-4,21	<b>1,5E-03</b>
EHI_199590	70 kDa heat shock protein putative	1828,00	8012,26	-4,38	<b>7,5E-08</b>	95,03	408,92	-4,30	<b>1,1E-06</b>
EHI_117580	hypothetical protein	48,44	225,19	-4,65	<b>4,0E-02</b>	10,98	50,40	-4,59	<b>9,1E-04</b>
EHI_073450	hypothetical protein	92,40	566,18	-6,13	<b>3,5E-03</b>	15,08	91,07	-6,04	<b>3,0E-07</b>
EHI_090430	hypothetical protein	103,57	636,54	-6,15	<b>2,0E-06</b>	8,15	49,39	-6,06	<b>2,3E-07</b>
EHI_092490	hypothetical protein	406,50	2958,59	-7,28	<b>1,6E-20</b>	31,92	228,20	-7,15	<b>1,3E-11</b>
EHI_031640	hypothetical protein	16,83	152,30	-9,05	7,5E-01	1,30	11,59	-8,89	<b>3,0E-05</b>
EHI_079300	long-chain-fatty-acid--CoA ligase putative	76,52	757,77	-9,90	1,0E+00	3,98	38,63	-9,72	<b>6,9E-10</b>

**Légende** : Chaque valeur représente la moyenne sur 3 essais biologiques indépendants. Les gènes différentiellement exprimés chez les trophozoïtes traités ont été définis lorsque ( $p < 0,05$ ) par les logiciels DESeq ou Cuffdiff respectivement. L'abondance moyenne en RPKM (Reads Per Kilobase per Million) désigne le nombre moyen de "reads" par Kilobase par million aligné sur 3 essais biologiques indépendants. La valeur positive du taux d'expression indique une surexpression du gène, tandis que la valeur négative représente une répression du gène.

Annexe 8 : Gènes modulés chez *Entamoeba histolytica* après traitement au métronidazole en comparaison à la sous-fraction active SF9B

<b>Gènes surexprimés</b>						
	<b>Métronidazole</b>				<b>SFB9 RNA-Seq DESeq</b>	
<b>Description</b>	<b>ID Gène</b>	<b>TE</b>	<b>BY</b>	<b>p</b>	<b>12 heures TE</b>	<b>24 heures TE</b>
Monooxygenase domain-containing protein	EHI_009840	4,6	4,77E-05	5,58E-09	-1,6	-1,6
Hypothetical protein	EHI_004550	2,9	5,43E-03	1,57E-06	-1,5	-1,2
Nucleoside diphosphate kinase	EHI_104360	2,5	2,35E-02	1,41E-05	1,4	1,1
Gal/GalNAc lectin subunit Igl1	EHI_006980	2,4	1,29E-03	2,57E-07	1,2	1,2
TolA-like protein	EHI_052780	2,3	2,77E-03	6,27E-07	1,1	1,2
Hypothetical protein	EHI_159670	2,1	5,31E-03	1,49E-06	-1,6	-1,1
Purine nucleoside phosphorylase	EHI_200080	2,1	5,84E-03	1,73E-06	1,0	1,2
Tryptophanase	EHI_111610	2,1	7,02E-03	2,20E-06	<b>N/D</b>	<b>N/D</b>
Gal/GalNAc lectin subunit Igl1	EHI_065330	2,0	7,23E-03	2,36E-06	1,1	1,1
Adenylyl cyclase-associated protein	EHI_136150	2,0	7,98E-03	2,65E-06	1,0	1,1
Hypothetical protein	EHI_189930	2,0	9,36E-03	3,31E-06	-1,2	-1,1
<b>Gènes reprimés</b>						
	<b>Métronidazole</b>				<b>SFB9 RNA-Seq DESeq</b>	
<b>Description</b>	<b>Gene ID</b>	<b>FC</b>	<b>BY</b>	<b>p</b>	<b>12 heures TE</b>	<b>24 heures TE</b>
Iron-sulfur flavoprotein	EHI_138480	-7,5	8,16E-11	4,44E-16	-1,8	-1,8
Helix-turn-helix protein	EHI_093330	-7,2	2,17E-10	1,78E-15	-1,2	-1,1
Leucine rich repeat protein, BspA family	EHI_148460	-6,7	1,14E-09	1,24E-14	1,3	1,0
Hypothetical protein	EHI_136430	-6,4	4,77E-08	1,17E-12	-1,2	-1,9
Hypothetical protein	EHI_028940	-5,4	1,66E-07	4,52E-12	1,4	-1,9
Transporter, major facilitator family	EHI_173950	-5,2	3,23E-07	9,67E-12	1,4	-1,4
Eukaryotic translation initiation factor 6	EHI_006170	-5,2	3,38E-07	1,20E-11	-1,2	-1,0



Alcohol dehydrogenase	EHI_107560	-5,1	4,70E-07	2,05E-11	<b>N/D</b>	<b>N/D</b>
acetyltransferase	EHI_096770	-4,9	1,14E-06	5,58E-11	-1,2	-1,8
Hypothetical protein	EHI_008420	-4,8	1,27E-06	6,89E-11	1,0	-1,5
Hypothetical protein	EHI_010260	-4,7	3,66E-05	3,98E-09	-1,0	-1,4
Alcohol dehydrogenase	EHI_157010	-4,6	2,73E-06	1,82E-10	N/A	N/A
20 kDa antigen	EHI_056490	-4,5	4,27E-06	3,02E-10	-1,9	-1,4
aldose reductase	EHI_039190	-4,5	5,05E-06	3,72E-10	1,0	1,1
Hypothetical protein	EHI_014340	-4,4	6,50E-06	5,13E-10	-1,5	-1,2
iron-sulfur flavoprotein	EHI_025710	-4,2	2,58E-04	3,44E-08	-1,6	-1,6
Hypothetical protein	EHI_051040	-4,1	4,16E-04	6,01E-08	-2,3	-1,3
Metallo-beta-lactamase domain-containing protein	EHI_136340	-4,1	3,09E-05	3,12E-09	1,0	-1,3
Hypothetical protein	EHI_009500	-4,0	4,41E-05	5,04E-09	1,2	-1,0
Hypothetical protein	EHI_184560	-4,0	8,91E-04	1,48E-07	-1,1	-1,1
Alcohol dehydrogenase	EHI_088020	-3,8	2,62E-06	1,64E-10	-1,3	-1,0
DEAD/DEAH box helicase	EHI_131080	-3,7	1,75E-04	2,19E-08	1,3	1,2
Hypothetical protein	EHI_167470	-3,7	3,08E-03	7,29E-07	1,2	-1,3
Iron-sulfur flavoprotein	EHI_134740	-3,6	2,22E-04	2,90E-08	1,0	1,0
Acetyltransferase, GNAT family	EHI_151490	-3,5	4,15E-04	5,88E-08	1,1	1,1
Acetyltransferase	EHI_122100	-3,5	5,51E-04	8,10E-08	<b>N/D</b>	<b>N/D</b>
Alcohol dehydrogenase 3	EHI_160670	-3,4	1,28E-05	1,19E-09	<b>N/D</b>	<b>N/D</b>
Ubiquitin	EHI_083410	-3,3	9,13E-04	1,59E-07	1,5	-1,4
Hypothetical protein	EHI_031210	-3,3	1,00E-03	1,78E-07	1,4	1,2
Hypothetical protein	EHI_187190	-3,3	1,01E-03	1,81E-07	1,5	1,1
Acetyltransferase	EHI_039180	-3,3	1,28E-03	2,46E-07	1,1	-1,1
Ras family GTPase	EHI_093760	-3,3	1,28E-03	2,48E-07	1,2	-1,1
Maltose O-acetyltransferase	EHI_157020	-3,2	1,29E-03	2,56E-07	<b>N/D</b>	<b>N/D</b>
Hypothetical protein	EHI_124540	-3,1	4,19E-05	4,68E-09	1,4	-1,4

Hypothetical protein	EHI_009900	-3,1	2,21E-03	4,76E-07	-1,0	-1,4
RNA 3'-terminal phosphate cyclase	EHI_177570	-3,0	4,83E-03	1,28E-06	-1,3	-1,3
Hypothetical protein	EHI_151930	-2,9	7,08E-03	2,25E-06	-1,0	-1,7
Hypothetical protein	EHI_067230	-2,9	7,19E-03	2,33E-06	-1,1	-1,8
Hypothetical protein	EHI_198580	-2,8	9,73E-03	3,47E-06	1,1	1,0
Hypothetical protein	EHI_050500	-2,8	1,05E-02	3,93E-06	-1,0	1,0
Myb family DNA-binding protein, SHAQKYF family	EHI_008130	-2,7	1,27E-02	5,17E-06	1,0	-1,3
Phosphoesterase	EHI_178710	-2,7	1,32E-02	5,44E-06	-1,1	-1,4
Leucine-rich repeat containing protein	EHI_124470	-2,6	1,61E-02	7,58E-06	-1,1	-1,1
S-phase kinase-associated protein 1A	EHI_134960	-2,6	1,62E-02	7,70E-06	1,3	1,1
Hypothetical protein	EHI_147230	-2,6	2,06E-02	1,08E-05	1,1	-1,1
Hypothetical protein	EHI_028560	-2,6	7,79E-04	1,23E-07	1,1	-1,0
Bacterial transferase hexapeptide family protein	EHI_107550	-2,5	2,35E-02	1,38E-05	<b>N/D</b>	<b>N/D</b>
Ribosomal protein S30	EHI_023400	-2,5	2,35E-02	1,39E-05	1,8	0,0
Ubiquitin	EHI_178340	-2,5	2,37E-02	1,45E-05	1,1	-1,2
Steroid 5-alpha reductase	EHI_197070	-2,5	2,50E-02	1,57E-05	-1,1	1,1
Short chain dehydrogenase family protein	EHI_086500	-2,5	1,16E-03	2,16E-07	1,5	-1,6
Cell division control protein 42	EHI_154270	-2,5	2,99E-02	2,11E-05	1,6	-2,3
Hypothetical protein	EHI_023150	-2,5	2,99E-02	2,12E-05	2,4	-1,1
Hypothetical protein	EHI_012280	-2,4	3,05E-02	2,27E-05	1,1	1,4
Cysteine synthase A (cysK)	EHI_160930	-2,4	3,16E-02	2,58E-05	1,2	1,3
Hypothetical protein	EHI_152520	-2,4	3,16E-02	2,59E-05	1,3	-1,3
RNA modification enzymes, MiaB-family	EHI_141830	-2,4	3,25E-02	2,69E-05	-1,1	-1,0
Cysteine desulfurase (NifS)	EHI_136380	-2,4	3,37E-02	2,90E-05	-1,2	1,0
Rubrerythrin	EHI_134810	-2,4	3,47E-02	3,05E-05	1,1	-1,0
Hypothetical protein	EHI_118420	-2,4	3,51E-02	3,12E-05	2,2	-1,3
Riboflavin kinase / FAD synthetase	EHI_033240	-2,4	3,57E-02	3,21E-05	-1,4	-1,3

Hypothetical protein	EHI_160210	-2,4	3,57E-02	3,22E-05	1,1	-1,2
Hypothetical protein	EHI_127460	-2,3	2,21E-03	4,81E-07	1,0	-1,4
Hypothetical protein	EHI_166380	-2,3	5,00E-02	5,20E-05	1,1	-1,2
Enhancer binding protein-1	EHI_121780	-2,1	4,90E-03	1,34E-06	1,1	1,1
Peroxioredoxin	EHI_121620	-2,1	5,59E-03	1,63E-06	<b>N/D</b>	<b>N/D</b>
Hypothetical protein	EHI_019860	-2,1	6,37E-03	1,93E-06	-1,2	-1,3
Peroxioredoxin	EHI_122310	-2,1	6,75E-03	2,08E-06	1,0	1,2
Ubiquitin-conjugating enzyme family protein	EHI_160740	-2,1	6,95E-03	2,16E-06	1,2	1,1
Asparaginyl-tRNA synthetase (asnS)	EHI_126920	-2,0	7,60E-03	2,51E-06	-1,2	1,1
5'-3' exonuclease domain containing protein	EHI_080270	-2,0	8,40E-03	2,81E-06	1,1	1,0
Hypothetical protein	EHI_006180	-2,0	8,68E-03	2,93E-06	-1,0	-1,0
P-glycoprotein 5	EHI_125030	-2,0	8,75E-03	3,00E-06	-1,1	1,0
D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase	EHI_118150	-2,0	8,90E-03	3,10E-06	1,2	1,0
Alcohol dehydrogenase 3	EHI_198760	-2,0	7,41E-04	1,15E-07	-1,1	1,0

**Légende** : L'expression différentielle des gènes a été évaluée par la technique de micro-puce après une heure de traitement des trophozoïtes au métronidazole (50 µM). ID Gène ou identité du gène représente le numéro d'accèsion du gène dans la banque AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/>). TE est le taux d'expression du gène; BY: seuil de probabilité déterminé par le test multiple de Benjamini and Yekutieli; *p*: seuil de probabilité déterminé par le test *t*- de Student. La comparaison a été effectuée par le logiciel DESeq entre le taux d'expression des trophozoïtes traités au métronidazole et celui des trophozoïtes traités à la sous-fraction SF9B après 12 heures et 24 heures respectivement. La valeur positive du taux d'expression indique une surexpression du gène, tandis que la valeur négative représente une répression du gène. N/D représente les gènes qui n'ont pas été analysés par la méthode RNA-Seq due aux conflits entre les modèles.

---

**Annexe 9 : Evaluation génotoxique des échantillons****a) Viabilité cellulaire**

- Solution stock de coloration
- 12 µL de fluoresceine diacétate
- 2 µL de Gel Red (*Biotium*)
- 2 mL Tampon PBS

**b) Test des micronoyaux**

- Cytochalasine B (500 µg/mL)
- Methylmethanesulfonate (MMS) (*Sigma* ; PM : 110,13 g/mol)
- Gel Green Nucleic Acid Stain (*Biotium*) Cat 41005
- DABCO
- Cytocentrifugeuse (*CytoSpin 3*)
- Microscope (Filtre FITC)
- Incubateur CO<sub>2</sub>

**c) Test des comètes**

- Tampon de lyse :
  - NaCl 2,5 M (*Roth* ; PM : 58,44 g/mol)
  - EDTA 100 mM (*Roth* ; PM : 372,24 g/mol)
  - Tris 10 mM (*Roth* ; PM : 121,14 g/mol)
  - Na-N-Laurylsarcosine (*Applichem*) 1% (*Roth* ; PM : 293,39 g/mol)  
Dissoudre dans 1 litre d'eau distillé et ajuster le pH à 10 avec le NaOH 5 M.
- Solution de lyse (à préparer le jour de la manipulation)
  - Tampon de lyse : 66,75 mL
  - DMSO (*Roth* ; PM : 78,13 g/mol) : 7,5 mL
  - Triton X-100 (*Sigma*) : 0,75 mLHomogénéiser et refroidir à 4°C dans une cuvette couverte de papier aluminium
- Solution de NaOH 5M
  - Peser 200 g des cristaux de NaOH (*Roth* ; PM : 40 g/mol)
  - Dissoudre dans 1 litre d'eau distillée
- Solution EDTA (Titriplex III)
  - Peser 14,889 g d'EDTA (Titriplex)
  - Dissoudre dans 200 mL d'eau distillée

- 
- Ajuster le pH à 10 avec le NaOH 5 M
  - Autoclaver
  - Tampon d'électrophorèse (à préparer le jour de la manipulation)
  - NaOH 5 M : 120 mL
  - EDTA 0,2 M : 10 mL
  - Compléter le volume à 2 litres avec de l'eau distillée
  - Refroidir à 4°C
  - Tampon Tris 0,4 M
  - Peser 48,452 g de Tris (*Roth* ; PM : 121,14 g/mol)
  - Dissoudre dans l'eau distillée
  - Ajuster le pH à 7,5 avec le HCl concentré
  - Autoclaver
  - Agarose High Melting Point (HMP) 1,5%
  - Peser 1,5 g d'agarose HMP (*MEEO-Ultra quality*)
  - Dissoudre dans 100 mL de tampon PBS
  - Chauffer la solution dans un four à micro-onde jusqu'à obtention d'une solution homogène
  - Introduire verticalement les lames « Superfrost » dans la solution d'agarose, puis nettoyer la face arrière de chaque lame et sécher les lames horizontalement pour fixer l'agarose sur les lames.
  - Agarose Low Melting Point (LMP) 0,5%
  - Peser 0,05 g d'agarose LMP (*Sigma*)
  - Dissoudre dans 10 mL de tampon PBS
  - Chauffer la solution dans un four à micro-onde jusqu'à obtention d'une solution homogène
  - Solution de Gel Red Nucleic Acid Stain (*Biotium*) Cat 41003
  - Pipetter 10 µL de Gel Red et 990 µl d'eau distillée
  - Ajouter 3 mL de la solution de DABCO
  - Générateur (*Biorad*)
  - Microscope à fluorescence liée à une caméra HDD et un ordinateur
  - Centrifugeuse

**d) Préparation des milieux de culture**

- Eagle's Minimum Essential Medium (*MEM*; *GIBCO 31885*): 1 g/l glucose
- Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) medium (*PAA*)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- L-Glutamine
- Pyruvate de sodium 1 mM.
- Sérum de veau foetal (FBS)
- Sérum de cheval
- Solution antibiotiques (penicilline/streptomycine)
- Acides aminés non essentiels (*GIBCO 2183*)
- Trypsine

**Annexe 10 : Test *in vitro* de la mutagenicité**

- Milieu de culture R10
  - RPMI 1640 : 500 mL
  - L-Glutamine : 5 mL
  - Pyruvate de Sodium : 5 mL
  - Serum de Cheval : **58 mL**
  - Pénicilline-streptomycine : 2 mL
- Milieu R5
  - RPMI 1640 : 500 mL
  - L-Glutamine : 5 mL
  - Pyruvate de Sodium : 5 mL
  - Serum de Cheval : **28 mL**
  - Pénicilline-streptomycine : 2 mL
- Solution de Methotrexate
  - Methotrexate : 20 mg
  - NaOH (4 g/l) : 10 mL
  - Eau-HPLC : 10 mL
  - Stériliser, puis aliquoter en flacons de 1 mL et conserver à -20°C
- Milieu THG
  - Thymidine : 0,15 g

- Hypoxanthine : 0,25 g
- Glycine : 0,375 g
- Dissoudre dans 500 mL de milieu RPMI
- Stériliser, puis aliquoter en flacons de 1 mL et conserver à -20°C
- Milieu THMG
  - Milieu THG : 100 mL
  - Solution de methotrexate : 1 mL
  - Stériliser, puis aliquoter en flacons de 1 mL et conserver à -20°C
- Solution de Trifluorothymidine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
  - TFT : 25 mg
  - RPMI 1640 : 83 mL
  - Stériliser puis aliquoter en flacons de 10 mL et conserver à -20°C
- Solution d'agarose 3,5%
  - Agarose sélectif (*Gibcon BRL, Life Technologies, Scotland*) : 3,5 g
  - Tampon phosphate salin : 100 mL
  - Chauffer la solution au four à micro-onde jusqu'à dissolution complète et puis autoclaver la solution à 121°C pendant 30 min
- Milieu sélectif TFT
  - Milieu R10 : 26 mL
  - Solution TFT : 3,2 mL
  - Solution d'agarose 3,5% : 2,9 mL

**Annexe 11 : Composition de l'aliment des rats**

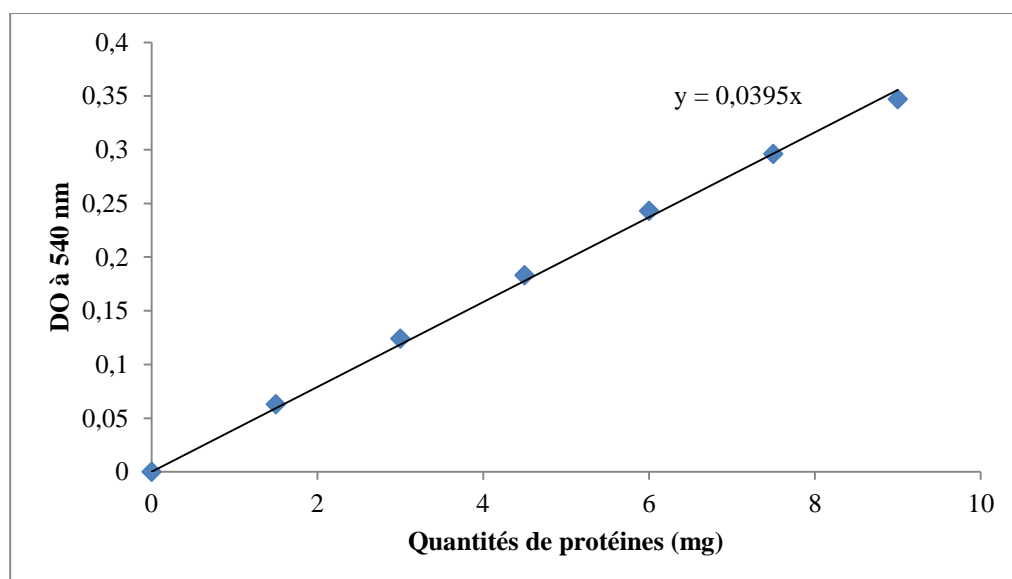
- Farine de maïs.....478 g
- Son de blé.....300 g
- Tourteau de soja.....100 g
- Farine de poisson.....100 g
- Os calcinés.....10 g
- Sel de cuisine.....10 g
- Vitamines.....1 g
- Huile raffinée.....1 g

**Annexe 12 : Dosage des protéines sériques (méthode de Biuret)**

- Etalonnage d'une solution de SAB (3 mg/mL)

Tube n°	0	1	2	3	4	5	6
SAB 3 mg/mL (mL)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3
Tris 50 mM, KCl 150 mM (pH 7,4) (mL)	4	3,5	3	2,5	2	1,5	1
Réactif du Biuret (mL)	3	3	3	3	3	3	3

- Courbe d'étalonnage des protéines sériques



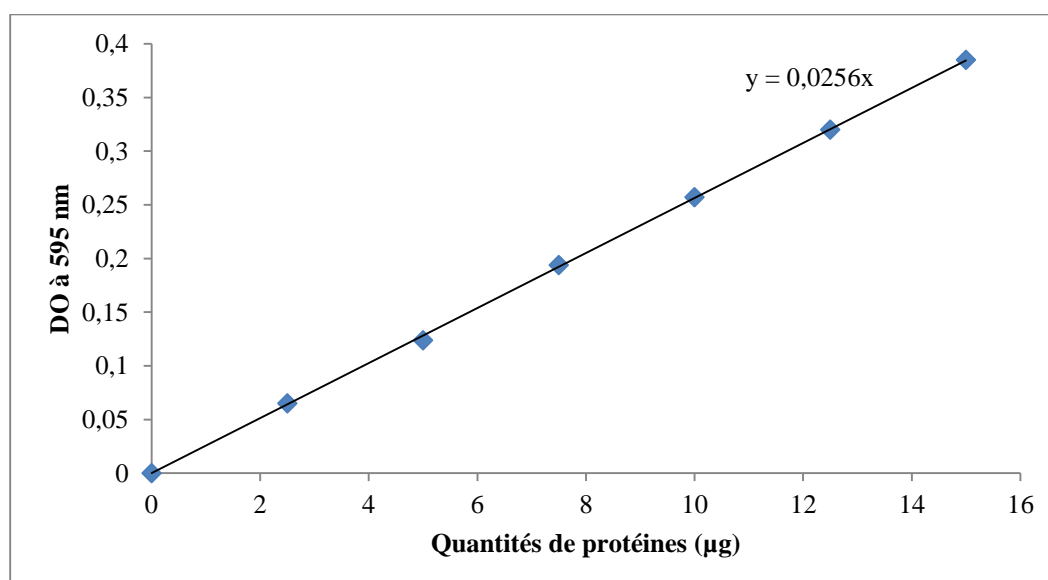


### Annexe 13 : Dosage des protéines hépatiques (méthode de Bradford)

- Etalonnage d'une solution de SAB (50 µg/mL)

Tube n°	0	1	2	3	4	5	6
SAB 50 µg/mL (mL)	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
Tris 50 mM, KCl 150 mM (pH 7,4) (mL)	2	1,95	1,9	1,85	1,8	1,75	1,7
Réactif de Bradford (mL)	2	2	2	2	2	2	2

- Courbe d'étalonnage des protéines hépatiques



### Annexe 14 : Dosage ASAT et ALAT (Reitman et Frankel ; 1957)

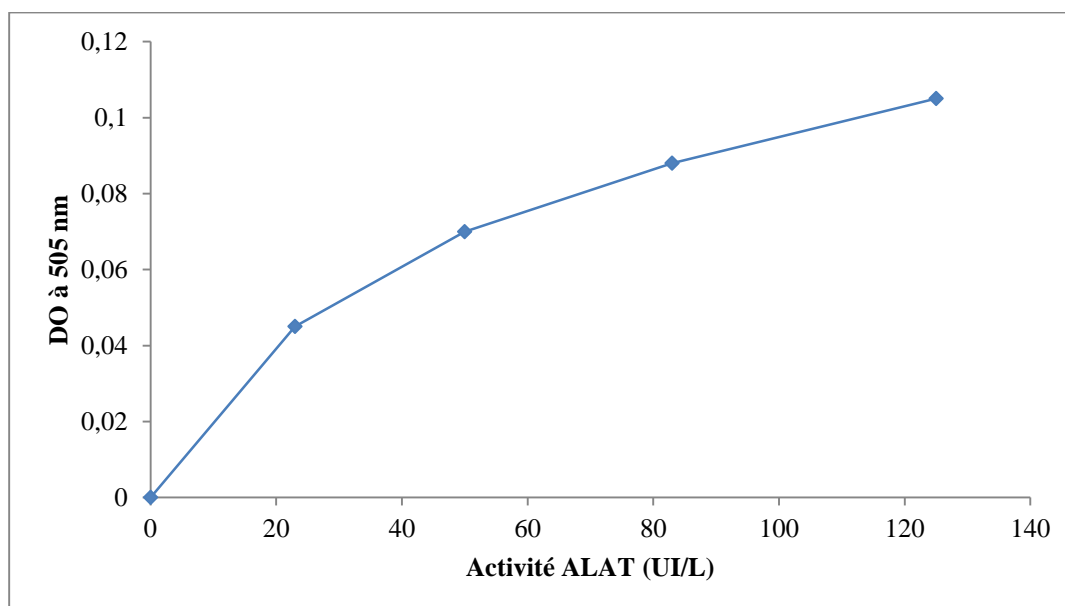
- Substrat ASAT (50 mL)
  - Peser 0,015 g de  $\alpha$ -cétoglutarate
  - Peser 1,33 g d'acide aspartique
  - Ajouter 12,5 mL de NaOH 1 N
  - Dissoudre et ajuster le pH à 7,4 avec l'acide phosphorique 8,5%
  - Ajouter le tampon phosphate pH 7,4 ; 0,1 M qsp 50 mL
- Substrat ALAT (50 mL)
  - Peser 0,89 g d'alanine
  - Peser 0,015 g de  $\alpha$ -cétoglutarate

- Dissoudre dans le tampon phosphate pH 7,4 ; 0,1 M qsp 50 mL
- Solution de 2,4- dinitrophénylhydrazine 0,2% (100 mL)
- Peser 0,02 g de 2,4- DNPH
- Dissoudre en chauffant à une température inférieure à 70°C dans 8 mL de HCl 37%
- Compléter le volume à 100 mL avec l'eau distillée
- NaOH 0,4 M (1L)
- Peser 16 g de NaOH
- Dissoudre dans quelques millilitres d'eau distillée
- Compléter le volume avec de l'eau distillée qsp 1L
- NaOH 1 M (50 mL)
- Peser 2 g de NaOH
- Dissoudre dans quelques millilitres d'eau distillée
- Compléter le volume avec de l'eau distillée qsp 50 mL
- Solution d'acide phosphorique 8,5% (10 mL)
- Pipeter 1 mL d'acide phosphorique 85%
- Ajouter 9 mL d'eau distillée
- Etalon pyruvate (solution mère à 2,20 g/L) : 10 mL
- Peser 0,022 g de pyruvate de sodium
- Dissoudre dans le tampon phosphate qsp 10 mL
- Solution étalon de pyruvate 0,22 g/L (à préparer le jour de la manipulation) : 20 mL
- Pipeter 2 mL de solution mère d'étalon pyruvate
- Ajouter 18 mL de tampon phosphate

- **Étalonnage du pyruvate de sodium pour le dosage ALAT**

<b>Tubes</b> <b>Solutions</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Pyruvate de sodium ( $\mu\text{L}$ )	0	20	40	60	80
Substrat ALAT ( $\mu\text{L}$ )	40	40	40	40	40
Tampon phosphate ( $\mu\text{L}$ )	80	60	40	20	0
2,4- DNP ( $\mu\text{L}$ )	200	200	200	200	200
Mélanger et attendre 20 minutes à la température ambiante					
NaOH 0,4M ( $\mu\text{L}$ )	2000	2000	2000	2000	2000
Mélanger et attendre 30 minutes à la température ambiante et lire la densité optique contre le blanc (tube 0) à 505nm					
<b>Activité ALAT (UI/L)</b>	<b>0</b>	<b>23</b>	<b>50</b>	<b>83</b>	<b>125</b>

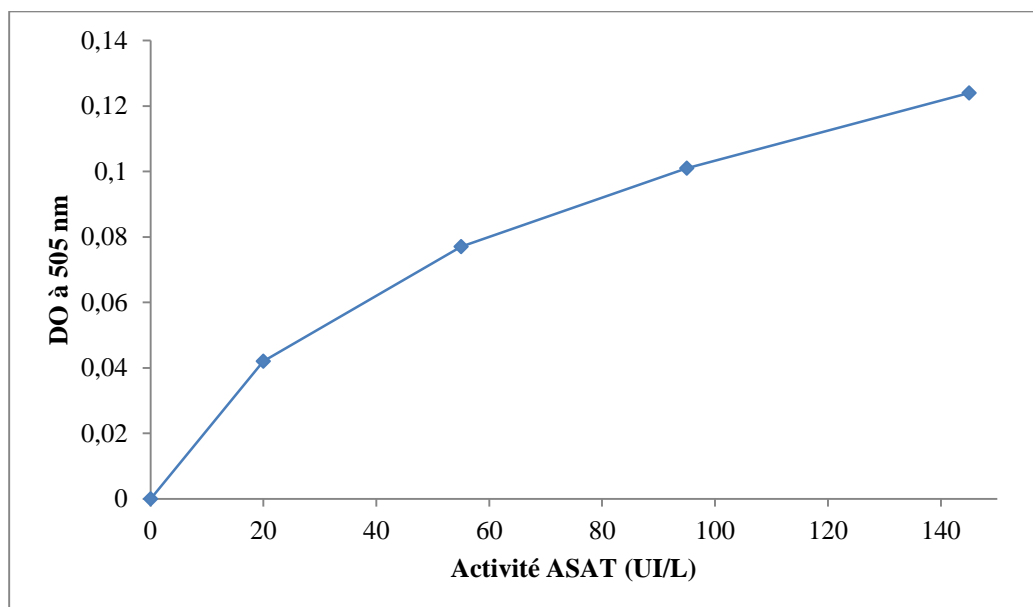
- **Courbe d'étalonnage (ALAT)**



- **Étalonnage du pyruvate de sodium pour le dosage ASAT**

<b>Tubes</b> <b>Solutions</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Pyruvate de sodium ( $\mu\text{L}$ )	0	20	40	60	80
Substrat ASAT ( $\mu\text{L}$ )	40	40	40	40	40
Tampon phosphate ( $\mu\text{L}$ )	80	60	40	20	0
2,4- DNP ( $\mu\text{L}$ )	200	200	200	200	200
Mélanger et attendre 20 minutes à la température ambiante					
NaOH 0,4M ( $\mu\text{L}$ )	2000	2000	2000	2000	2000
Mélanger et attendre 30 minutes à la température ambiante et lire la densité optique contre le blanc (tube 0) à 505nm					
<b>Activité ASAT (UI/L)</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>55</b>	<b>95</b>	<b>145</b>

- **Courbe d'étalonnage (ASAT)**



**Annexe 15 : Dosage de la créatinine (Bartels *et al.*, 1972)**

- Solution étalon de créatinine 150 mg/L (10 mL)
  - Peser 1,5 mg de créatinine
  - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 10 mL
- Solution étalon de créatinine 15 mg/L (10 mL)
  - Pipeter 1 ml de solution créatinine 150 mg/L
  - Ajouter 9 mL d'eau distillée
- Solution de dosage
  - (1) Peser 0,1 g d'acide picrique et dissoudre dans quelques millilitres d'eau distillée.  
Ajuster le volume à 50 mL avec l'eau distillée.
  - (2) Peser 0,8 g de NaOH 0,4 M et dissoudre dans quelques millilitres d'eau distillée.  
Compléter ce volume à 50 mL avec de l'eau distillée.Mélanger (1) et (2) et conserver à 4°C

**Publications issues de la Thèse**