

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

*Paix - Travail - Patrie*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

\*\*\*\*\*

LABORATOIRE DE PHYTOBIOCHIMIE  
ET D'ETUDE DES PLANTES  
MEDICINALES



REPUBLIC OF CAMEROUN

*Peace - Work - Fatherland*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF  
BIOCHEMISTRY

\*\*\*\*\*

LABORATORY FOR  
PHYTOBIOCHEMISTRY AND  
MEDICINAL PLANTS STUDIES

**ACTIVITE ANTIPLASMODIALE ET ANTILEISHMANIALE  
DE TROIS PLANTES DU GENRE ANNONA (ANNONACEAE)  
DU CAMEROUN**

Thèse

Présentée et soutenue en vue de l'obtention du Doctorat/Ph.D en  
Biochimie

Par : TCHOKOUAHA YAMTHE Laue Rachel  
Master Biochimie

Sous la direction de  
**FEKAM BOYOM Fabrice,**  
Professor, University of Yaoundé I

Année Académique : 2016





UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DES SCIENCES

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE

TESTIMONY OF Ph.D. MANUSCRIPT CORRECTION

We, the undersigned, hereby certify that Dr. TCHOKOUAHA YAMTHE Lauve Rachel has edited her thesis manuscript according to the recommendations of the members of the defence jury held on June 03, 2016.

In witness whereof the present testimonial is given with the privileges thereunto pertaining.

The President of the Jury : .....

*[Signature]*  
Dr. Wilfred F. Mbacham  
MS, DS, ScD (Harvard), FASI, FCAS  
Public Health Biotechnologist

The Members : 1. ....

*[Signature]*  
Jude D. Bigoga, Ph.D  
Associate Professor,  
Molecular Parasitology / Medical Entomology

2. ....

*[Signature]*  
Pr. NEOUETA

12 3 MAI 2017



*[Signature]*  
Professor  
Enzymology-Toxicology



**LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS LIST OF PERMENENT TEACHING STAFF**

**ANNEE ACADEMIQUE 2015/2016**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION 05 Février 2016**

**ADMINISTRATION**

**DOYEN :** BILONG Paul, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DPSAA :** NJOPWOOU Daniel, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DSSE :** DONGO Etienne, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC :** ESSIMBI ZOBO Bernard, *Professeur*

**Chef Division Affaires Académiques, Scolarité et Recherche :** ABOSSOLO Monique,  
*Chargé de Cours*

**Chef Division Administrative et Financière :** NDOYE FOE Marie C. F., *Chargé de Cours*

**1- DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (41)**

<b>N°</b>	<b>NOMS ET PRENOMS</b>	<b>GRADE</b>	<b>OBSERVATIONS</b>
1	AMVAM ZOLLO Paul Henri	Professeur	<i>RECTEUR UN</i>
2	BENG née NINTCHOM PENLAP V.	Professeur	En poste
3	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
4	MBACHAM Wilfried	Professeur	En poste
5	<b>MOUNDIPA FEWOU Paul</b>	Professeur	<b>Chef de Département</b>
6	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
7	BIGOGA JUDE	Maître de Conférences	En poste
8	BOUDJEKO Thadée	Maître de Conférences	En poste
9	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste

10	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
11	MINKA Samuel	Maître de Conférences	En poste
12	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
13	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
14	WAKAM née NANA Louise	Maître de Conférences	En poste
15	ACHU Merci BIH	Chargé de Cours	En poste
16	ATOGHO Barbara Mma	Chargé de Cours	En poste
17	BELINGA née NDOYE FOE Marie C. F.	Chargé de Cours	<b>Chef DAF/FS</b>
18	DEMMANO Gustave	Chargé de Cours	En poste
19	DJOKAM TAMO Rosine	Chargé de Cours	En poste
20	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Chargé de Cours	En poste
21	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargé de Cours	En poste
22	EFFA ONOMO Pierre	Chargé de Cours	En poste
23	EVEHE BEBANDOUE Marie –Solange	Chargé de Cours	En poste
24	EWANE Cécile Anne	Chargé de Cours	En poste
25	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
26	MBONG ANGIE MOUGANDE Mary Ann	Chargé de Cours	En poste
27	MOFOR née TEUGWA Clautilde	Chargé de Cours	<i>IA4/MINESUP</i>
28	NJAYOU Frédéric Nico	Chargé de Cours	En poste
29	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
30	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargé de Cours	En poste
31	AKINDEH MBUH NJI	Assistant	En poste
32	BEBEE FADIMATOU	Assistant	En poste
33	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Assistant	En poste
34	DAKOLE DABOY Charles	Assistant	En poste
35	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Assistant	En poste
36	FONKOUA Martin Joséphine	Assistant	En poste
37	LUNGA Paul KAILAH	Assistant	En poste
38	MANANGA Marlyse	Assistant	En poste
39	MBOUCHE FANMOE Marcelline Joëlle	Assistant	En poste
40	PACHANGOU NSANGOU Sylvain	Assistant	En poste
41	TIENTCHEU DJOKAM Léopold	Assistant	En poste

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

1	<b>BILONG BILONG Charles Félix</b>	<b>Professeur</b>	<b>Chef de Département</b>
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
4	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
5	MIMPFOUNDI REMY	Professeur	En poste
6	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En Poste
7	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
8	NOLA Moïse	Professeur	En Poste
9	TAN Paul	Professeur	En poste
10	TCHUEM TCHUENTE Louis	Professeur	<i>Coord. Progr. MINSANTE</i>
11	AJEAGAH Gidéon AGHAINDOUM	Maître de Conférences	En poste
12	DJIETO Lordon Champlain	Maître de Conférences	En poste
13	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	<i>Chef Dépt. FMSB</i>

14	ESSOMBA née NTSAMA MBALLA	Maître de Conférences	<i>Chef dépt FMSB</i>
15	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	<i>CT2 MIN. ENERGIE</i>
16	KAMGANG René	Maître de Conférences	<i>C.E. MINRESI</i>
17	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
18	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
19	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste
20	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	En poste
21	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
22	BILANDA Danielle Claude	Chargé de Cours	En poste
23	DJIOGUE Séfirin	Chargé de Cours	En poste
24	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargé de Cours	En poste
25	JATSA MEGAPTCHE Hermine	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
26	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
27	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
28	MONY NTONE Ruth	Chargé de Cours	En poste
29	LEKEUFACK FOLEFACK Florence	Chargé de Cours	En poste
30	NGOULATEU KENFACK Omer BEBE	Chargé de Cours	En poste
31	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Chargé de Cours	En poste
32	NGUEMBOCK	Chargé de Cours	En poste
33	TOMBI Jeannette	Chargé de Cours	En poste
34	ATSAMO Albert Donatien	Assistant	En poste
35	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
36	KANDELA KAVAYE Antoine	Assistant	En poste
37	KOGA MANG'Dobara	Assistant	En poste
38	MECHI DONFACK Mireille Flore	Assistant	En poste
39	MOUNGANG NGAMENI Luciane	Assistant	En poste
40	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Assistant	En poste
41	NJUA Clarisse YAFI	Assistant	En poste
42	OBI OBEN Esther	Assistant	En poste
43	TADU Zéphirin	Assistant	En poste
44	YEDE	Assistant	En poste

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

1	<b>YOUMBI Emmanuel</b>	<b>Professeur</b>	<b>Chef de Département</b>
2	AMBANG Zachée	Maître de Conférences	<b>Vice-Doyen/FSE</b>
3	BELL Joseph Martin	Maître de Conférences	En poste
4	DJOCGOUE Pierre François	Maître de Conférences	En poste
5	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
6	MOSSEBO Dominique Claude	Maître de Conférences	En poste
7	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE/MINRESI</i>
8	ZAPFACK Louis	Maître de Conférences	En poste
9	ANGONI Hyacinthe	Chargé de Cours	En poste
10	BIYE Elvire Hortense	Chargé de Cours	En poste
11	MAHBOU SOMO TOUKAM Gabriel	Chargé de Cours	En poste
12	MALLA Armand William	Chargé de Cours	En poste
13	MBARGA BINDZI Marie Alain.	Chargé de Cours	<i>Insp. académ. N° 1 MINESUP</i>
14	MBOLO Marie.	Chargé de Cours	En poste
15	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Chargé de Cours	En poste

16	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Chargé de Cours	En poste
17	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
18	NSOM ZAMO Annie Claude ép. Pial	Chargé de Cours	<i>Expert national/UNESCO</i>
19	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste
20	TSOATA Esaïe	Chargé de Cours	En poste
21	DJEUANI Astride Carole	Assistant	En poste
22	GONMADGE Christelle	Assistant	En poste
23	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Assistant	En poste
24	NGALLE Hermine BILLE	Assistant	En poste
25	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistant	En poste
26	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Assistant	En poste
27	ONANA Jean Michel	Assistant	En poste

#### 4-DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (C.I.) (35)

1	<b>KETCHA MBADCAM Joseph</b>	<b>Maître de Conférences</b>	<b>Chef de Département</b>
2	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
3	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Doyen/UDS</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Directeur Cabinet PM</i>
5	LAMINSI Samuel	Professeur	En poste
6	MELO née CHINJE Uphie F.	Professeur	<i>Directeur Mipromalo</i>
7	NJOPWOUO Daniel	Professeur	<b><i>Vice-Doyen/DPSAA</i></b>
8	AGWARA ONDOH Moïse	Maître de Conférences	<i>Insp Génér. MINPMEA</i>
9	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée mission P.R.</i>
10	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
11	ELIMBI Antoine	Maître de Conférences	En poste
12	NANSEU Charles Péguy	Maître de Conférences	En poste
13	NENWA Justin	Maître de Conférences	En poste
14	NDIKONTAR Maurice KOR	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen/UBda</i>
15	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	<i>S.G. MINESUP</i>
16	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
17	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
18	BAIZOUMI ZOUA	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINTOUR</i>
19	CHEUMANI YONA Arnaud	Chargé de Cours	En poste
20	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
21	GWET Simon-Pierre	Chargé de Cours	En poste
22	KAMGANG YOUBI Georges	Chargé de Cours	En poste
23	KEUMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Chargé de Cours	En poste
24	KONG SAKEO	Chargé de Cours	<i>C. M. au P. M.</i>
25	NDI Julius NSAMI	Chargé de Cours	En poste
26	NJIOMOU Chantale épse DJANGANG	Chargé de Cours	En poste
27	NJOYA Dayirou	Chargé de Cours	En poste
28	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargé de Cours	En poste
29	PABOUDAM GBAMBIE Awaou	Chargé de Cours	En poste
30	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
31	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Assistant	En poste
32	KENNE DEDZO Gustave	Assistant	En poste
33	MBEY Jean Aimé	Assistant	En poste

34	NCHIMI NONO Katia	Assistant	En poste
35	NDOSIRI NDOYE Bridget	Assistant	En poste
<b>5-DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (C.O.) (33)</b>			
1	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/DSSE</i>
2	GHOGOMU TIH ROBERT RALPH	Professeur	En poste
3	MBAFOR Joseph	Professeur	En poste
4	NGADJUI TCHALEU B.	Professeur	<i>Chef de Dépt FMBS</i>
5	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Dépt UDs</i>
6	<b>NKENGFACK Augustin Ephraïm</b>	<b>Professeur</b>	<b>Chef de Département</b>
7	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Vice-Recteur UBda</i>
8	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur MINESUP</i>
9	WANDJI Jean	Professeur	En poste
10	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>CS Rectorat/UYI</i>
11	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	<i>VD/UB</i>
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
15	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
16	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>C.T./UYII</i>
17	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
18	TCHUENDEM KENMOGNE M.	Maître de Conférences	En poste
19	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
20	AMBASSA Pantaleon	Chargé de Cours	En poste
21	EYONG Kenneth OBEN	Chargé de Cours	En poste
22	FOTSO WABO Ghislain	Chargé de Cours	En poste
23	KAMTO Eutrophe Ledoux	Chargé de Cours	En poste
24	MKOUNGA Pierre	Chargé de Cours	En poste
25	NGO MBING Joséphine	Chargé de Cours	En poste
26	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Chargé de Cours	En poste
27	NOTE LOUGBOT Olivier	Chargé de Cours	En poste
28	OUAHOUE WACHE Blandine Marlyse	Chargé de Cours	En poste
29	TABOPDA KUATE Turibio	Chargé de Cours	En poste
30	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
31	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargé de Cours	En poste
32	NGINTEDO Dominique	Assistant	En poste
33	NGOMO Orléans	Assistant	En poste
<b>6-DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (28)</b>			
1	TCHUENTE Maurice	Professeur	<i>PCA UB</i>
2	FOTSO Pauline Laure	Professeur	<i>Vice-Recteur UDs</i>
3	FOUDA NDJODO Marcel	Professeur	<i>IAI MINESUP/Chef Dépt ENS</i>
4	ATSA ETOUNDI Roger	Maître de Conférences	<b>Chef de Département</b> <i>Chef Division MINFOPRA</i>
5	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
6	CHEDOM FOTSO Donatien	Chargé de Cours	En poste

7	KOUOKAM KOUOKAM Etienne A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
11	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
12	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
13	ABESSOLO ALO'O Gislain	Assistant	En poste
14	AMINOUE Halilou	Assistant	En poste
15	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
16	DJAM Xaviera Youth KIMBI	Assistant	En poste
17	DJOUWE MEFFEJA Merline Flore	Assistant	En poste
18	EBELE Serge	Assistant	En poste
19	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
20	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistant	En poste
21	KAMGUEU Patrick Olivier	Assistant	En poste
22	KENFACK DONGMO Clauvice V.	Assistant	En poste
23	DOMGA KOMGEUM Rodrigue	Assistant	En poste
24	MAKEMBE S. Fritz Oswald	Assistant	En poste
25	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistant	En poste
26	MONTHE DJIADEU Valery Martial	Assistant	En poste
27	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
28	TAPAMO KENFACK Hyppolite	Assistant	En poste

**7-DEPARTEMENT DE MATHEMATIQUES (MA) (35)**

1	BEKOLLE David	Professeur	<i>Vice-Recteur UN</i>
2	BITJONG NDOMBOL	Professeur	<i>DIPD UY II</i>
3	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste
4	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	En poste
5	EMVUDU WONO Yves S.	Maître de Conférences	<i>Chef Cellule MINESUP</i>
6	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
7	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
8	TCHAPNDA NJABO Sophonie Blaise	Maître de Conférences	En poste
9	TONGA Marcel	Maître de Conférences	En poste
10	<b>WAMON François</b>	<b>Maître de Conférences</b>	<b>Chef de Département</b>
11	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	En poste
12	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
14	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
15	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
16	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
17	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
18	MBEHOU Mohamed	Chargé de Cours	En poste
19	MBELE BEDINMA Martin	Chargé de Cours	En poste
20	MBIANDA Gilbert	Chargé de Cours	En poste
21	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
22	NGUEFACK Bertrand	Chargé de Cours	En poste
23	NGUIMTSA Charles	Chargé de Cours	En poste
24	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste

25	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
26	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
27	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
28	TIAYA TSAGUE N. Anne- Marie	Chargé de Cours	En poste
29	BOGSO Antoine M.	Assistant	En poste
30	DJIADEU NGAHA Michel	Assistant	En poste
31	DOUANLA YONTA Hermann	Assistant	En poste
32	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
33	NIMPA PEFOUKEU Romain	Assistant	En poste
34	TANG AHANDA Barnabé	Assistant	<i>Chef Serv. MINPLAMAT</i>
35	TETSADJIO TCHILEPECK Mesmin E.	Assistant	En poste

### 8-DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MB) (13)

1	<b>ETOA François-Xavier</b>	<b>Professeur</b>	<b>Chef de Département, CT / PM</b>
2	ESSIA NGANG Jean Justin	Maître de Conférences	<i>Chef de Division Recherche IMPM</i>
3	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
4	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
5	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
6	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
7	BOYOMO ONANA	Chargé de Cours	En poste
8	ENO Anna Arey	Chargé de Cours	En poste
9	ESSONO OBOUGOU Germain Gabriel	Chargé de Cours	En poste
10	RIWOM Sara Honorine	Chargé de Cours	En poste
11	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Assistant	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Assistant	En poste

### 9-DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PH) (40)

1	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
2	<b>KOFANE Timoléon Crépin</b>	<b>Professeur</b>	<b>Chef de Département</b>
3	NJOMO Donatien	Professeur	En poste
4	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen/Ubda</i>
5	WOAFO Paul	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	En poste
7	PEMHA Elkana	Professeur	
8	TCHAWOUA Clément	Professeur	
9	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>Dir. Gén. B. MEKIM</i>
10	BEN-BOLIE Germain Hubert	Maître de Conférences	En poste
11	DJUIDJE KENMOE G. épouse ALOYEM	Maître de Conférences	
12	EKOBENA FOUA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Dépt UN</i>
13	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	
14	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Maître de Conférences	<i>Chef Serv. MINRESI</i>
15	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
16	OUMAROU BOUBA	Maître de Conférences	<b>Recteur UY II</b>
17	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
18	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
19	BODO Bernard	Chargé de Cours	En poste

20	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
21	EYEBE FOU DA Jean Sire	Chargé de Cours	En poste
22	FEWO Serge Ibraïd	Chargé de Cours	En poste
23	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	En Poste
24	HONA Jacques	Chargé de Cours	En poste
25	MBANE BIOUELE	Chargé de Cours	En poste
26	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
27	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
28	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
29	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	En poste
30	SAIDOU	Chargé de Cours	En poste
31	SIMO Elie	Chargé de Cours	En poste
32	TABI Conrad Bertrand	Chargé de Cours	En poste
33	TCHOFFO Fidèle	Chargé de Cours	En poste
34	VONDOU DERBETINI Appolinaire	Chargé de Cours	En Poste
35	WAKATA née BEYA Annie	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. MINESUP</i>
36	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste
37	ABDOURAHIMI	Assistant	En Poste
38	CHAMANI Roméo	Assistant	En Poste
39	ENYEGUE A NYAM F. épouse BELINGA	Assistant	En Poste
40	MBOUSSI NKOMIDIO Aïssatou	Assistant	En Poste

#### 10- DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (S.T.) (43)

1	<b>BILONG PAUL</b>	<b>Professeur</b>	<b>Doyen /Chef de Département</b>
2	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
3	BITOM Dieudonné Lucien	Professeur	<i>Doyen/UN</i>
4	NDJIGUI Paul-Désiré	Maître de Conférences	<i>CSMM</i>
5	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Maître de Conférences	En poste
6	KAMGANG Pierre	Maître de Conférences	En poste
7	MEDJO EKO Robert	Maître de Conférences	<i>D.I.P.D. UYI</i>
8	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>Inspecteur 1 MINIMDT</i>
9	MVONDO ONDOA Joseph	Maître de Conférences	En poste
10	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
11	NGOS III Simon	Maître de Conférences	<i>D.A.A.C./UM</i>
12	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
13	NKOUMBOU Charles	Maître de Conférences	En poste
14	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
15	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. MINFOF</i>
16	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Chargé de Cours	<b>Chef DAASR</b>
17	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
18	BISSO Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Directeur Projet Barage Memve'ele</i>
19	EKOMANE Emile	Chargé de Cours	En poste
20	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>C.E.A. MINIMDT</i>
21	GANNO Sylvestre	Chargé de Cours	En poste
22	GHOGOMU Richard TANWI	Chargé de Cours	En poste
23	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
24	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste

25	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
26	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	En poste
27	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargé de Cours	En poste
28	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
29	NGUEUTCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	En poste
30	NJOM Bernard de Lattre	Chargé de Cours	En poste
31	NYECK Bruno	Chargé de Cours	<i>S/Directeur MINIMDT</i>
32	ONANA Vincent	Chargé de Cours	En poste
33	TCHAKOUNTE Jacqueline ép. NUMBEM	Chargé de cours	<i>C.E.A.MINRESI</i>
34	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Chargé de Cours	En poste
35	ZO'O ZAME Philémon	Chargé de Cours	<i>S.G. MINTP</i>
36	ANABA ONANA Achille Basile	Assistant	En Poste
37	BENELI BETSI Thierry Olivier	Assistant	En poste
38	FUH Calistus Gentry	Assistant	<i>Sec. d'Etat MINMIDT</i>
39	METANG Victor	Assistant	En poste
40	NOMO NEGUE Emmanuel	Assistant	En poste
41	TCHAPTCHET TCHATO De P. I	Assistant	En poste
42	TEHNA Nathanaël	Assistant	<i>CS/MINMIDT</i>
43	TEMGA Jean Pierre	Assistant	En poste

## Répartition chiffrée des enseignants permanents par Département (05 Février 2016)

Département	Nombre d'enseignants				Total
	Pr	MC	CC	ASS	
<b>BC</b>	6 (1)	8 (2)	16 (10)	14 (6)	<b>41 (19)</b>
<b>BPA</b>	10 (0)	9 (1)	15 (7)	11 (5)	<b>44 (12)</b>
<b>BPV</b>	1 (0)	7 (0)	11 (3)	7 (6)	<b>27 (9)</b>
<b>C.I.</b>	7 (1)	9 (1)	14 (3)	5 (2)	<b>35 (7)</b>
<b>C.O.</b>	9 (0)	10 (3)	12 (3)	2 (0)	<b>33 (8)</b>
<b>IN</b>	3 (1)	2 (0)	7 (0)	16 (4)	<b>28 (5)</b>
<b>MA</b>	3 (0)	7 (0)	18 (2)	7 (2)	<b>35 (2)</b>
<b>MB</b>	1 (0)	4 (1)	6 (2)	2 (0)	<b>13 (3)</b>
<b>PH</b>	8 (0)	10 (1)	18 (2)	4 (2)	<b>40 (5)</b>
<b>ST</b>	4 (0)	11 (1)	20 (4)	8 (0)	<b>43 (5)</b>
<b>Total</b>	<b>52 (3)</b>	<b>77 (11)</b>	<b>137 (33)</b>	<b>76 (25)</b>	<b>342 (72)</b>

Soit un total de : 346 (72) dont

- Professeurs 52 (3)
- Maîtres de Conférences 77 (11)
- Chargés de Cours 137 (33)
- Assistants 76 (25)

- ( ) = Nombre de femmes.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

Pr Paul BILONG

## DEDICACE

*Je dédie ce travail à :*

*L'éternel Dieu Tout Puissant*

*Mon feu papa TCHOKOUAHA André*

*Ma maman NGUELEUCHI TCHOKOUAHA Ivonne*

*Ma grand-mère SIEWE TCHOKOUAHA Pauline*

*Mon époux TSOUH FOKOU Patrick Valère*

*Mes frères, sœurs, nièces, neveux TCHOKOUAHA Einstein, TCHOKOUAHA Felix, TCHOKOUAHA Danauld, TCHOKOUAHA Anderson, TCHOKOUAHA Christelle, TCHOKOUAHA Reine, KAMO Vanelle, DJOKA TCHOKOUAHA Daida, LEUGOUE Ashley, TCHIDEU TCHOKOUAHA Lindsay, KOUEDJOU Yvan, KOUEDJOU Aaron*

*Mon mentor FEKAM BOYOM Fabrice*

# REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à remercier :

Le **Pr. AMVAM ZOLLO Paul Henri** pour l'accueil chaleureux au sein du laboratoire.

Mon directeur de thèse le **Pr. FEKAM BOYOM Fabrice** qui m'a accueilli dans son équipe avec la plus grande bienveillance, m'a confié le sujet, l'a dirigé et m'a donné la possibilité de mener à bien ce travail de thèse. Vous avez été pour moi une référence tout au long de mon cycle. Tant est immense votre amour du travail bien fait, votre disponibilité, votre amabilité, le tout couronné par votre intarissable dynamisme, causes de tant d'inspirations. Vos encouragements, votre confiance et votre rigueur scientifique m'ont guidé tout au long de ce travail. En témoignage de ma profonde gratitude, veuillez trouver ici mes remerciements les plus sincères.

Le **Pr. MOUNDIPA FEWOU Paul** et les **Enseignants du département de Biochimie** de L'Université de Yaoundé I pour la qualité de leurs enseignements et conseils.

Le **Laboratoire de Division des Maladies Infectieuses, Département de Médecine de l'Université de Californie San Francisco (USA)** du **Pr. ROSENTHAL Philip Jon** pour la réalisation des tests antiplasmodiaux.

Le **Laboratoire de Chimie Organique de l'Université de Bielefeld** en Allemagne pour la réalisation des différents spectres des composés isolés.

Le **Laboratoire de Parasitologie Moléculaire de l'Université de Granada** (Espagne) pour la réalisation des tests cytotoxiques et antileishmaniales. Les **Pr. Manuel SÁNCHEZ MORENO, Pr. Clotilde MARÍN SÁNCHEZ** et **Dr Inmaculada RAMÍREZ-MACÍAS** pour avoir supervisé mes travaux et m'avoir encadré durant mon séjour en Espagne.

Les **tradipraticiens** qui ont bien voulu nous aider lors l'étude ethnopharmacologique.

La Direction de l'**Institut de Recherche Médicale et d'Etudes des Plantes Médicinales (IMPM)** qui à travers le Directeur n'a ménagé aucun effort pour nous permettre chercheurs juniors de l'IMPM de mener à bien nos travaux de thèse.

Le **Dr. TSABANG Nole** pour m'avoir assisté lors de l'étude ethnopharmacologique, de la collecte et de l'identification des plantes et pour ses encouragements.

**Mr TOUKAM Paul** pour son assistance lors du fractionnement et de l'isolement des produits.

Le **Pr. LENTA Bruno** et les **Drs BANKEU KEZETAS Jean Jules, MBA'NING Brice** pour l'analyse et la détermination des structures des produits isolés.

Les **Pr. TCHOUMBOUGNANG François, JAZET DONGMO Pierre Michel, NGOUELA Silvère, NANA Louise**, les **Drs SAMEZA Modeste Lambert, GOUNOUE KAMKUMO Racéline, MADIESTE KEMGNE Eugénie Aimée** pour l'assistance, vos conseils et encouragements. Je vous exprime mon entière reconnaissance et ma profonde gratitude.

L'équipe de recherche antiplaludique : **Dr TSOUH FOKOU Patrick Valère, Mlle NGOUTANE MFOPA Alvine** pour tout le travail accompli ensemble.

Tous mes aînés de laboratoire pour leurs contributions et encouragements à la réalisation de ce travail.

Mon très cher ami et grand frère **Dr BAKARNGA-VIA Issakou** pour son inconditionnel soutien durant tout notre cycle de recherche.

Mes camarades du Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etudes des Plantes Médicinales pour leurs contributions à la réalisation de ce travail et pour l'ambiance chaleureuse qui a toujours régné entre nous.

Mes **Collègues de l'IMPM**. Je pense à la dynamique équipe du Centre de Recherche en Plantes Médicinales et Médecine Traditionnelle (CRPMT).

Toute ma grande famille pour l'encadrement, les conseils, la solidarité, le soutien et l'entraide.

## **APPUI FINANCIER**

Ce travail a été réalisé grâce à l'appui financier et matériel de certains organismes dont :

- Coimbra Scholarship for Sub Saharan Young African Researcher.
- Organisation Mondiale de la Santé à travers le programme MIM/TDR (A80689) accordé au Professeur Fabrice FEKAM BOYOM.
- National Institutes of Health (NIH), USA (AI35707) accordé au Professeur Philip Jon ROSENTHAL.
- Seeding Labs' 2012 Equipment Transfer grant (SL2012-2) accordé au Professeur Fabrice FEKAM BOYOM.
- Multilateral Malaria Venture Challenge grant (MMV-12/0087) accordé au Professeur Fabrice FEKAM BOYOM.

## TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS .....</b>	<b>i</b>
<b><i>DEDICACE</i>.....</b>	<b>xi</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>xii</b>
<b>APPUI FINANCIER.....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>xxi</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xxv</b>
<b>LISTE DES PHOTOGRAPHIES.....</b>	<b>xxvi</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xxvii</b>
<b>LISTE DES ANNEXES.....</b>	<b>xxviii</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>xxix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xxxii</b>
I-1- Généralités sur le paludisme .....	4
<i>i- Epidémiologie</i> .....	4
i-1-Contexte actuel.....	4
i-2- Impacts socio-économiques .....	5
i-3- Répartition géographique.....	5
<i>ii- L'agent pathogène et l'agent vecteur</i> .....	6
ii-1- L'agent pathogène : le Plasmodium.....	6
ii-1-1-Classification .....	6
ii-1-2- Cycle de reproduction.....	7
ii-2- L'agent vecteur et la transmission .....	9
<i>iii- Manifestations cliniques du paludisme chez l'Homme</i> .....	10
<i>iv- Diagnostic du paludisme</i> .....	11
<i>v- Antipaludiques et cibles thérapeutiques</i> .....	14
<i>vi- Les stratégies de contrôle du paludisme</i> .....	16

vi-1- Chimio-thérapie.....	16
vi-2-Lutte anti-vectorielle .....	18
vi-3-Chimio-prophylaxie .....	19
I-2- Généralités sur la leishmaniose.....	20
<i>i- Epidémiologie</i> .....	20
i-1- Contexte actuel.....	20
i-2- Répartition géographique.....	22
<i>ii- L'agent pathogène et l'agent vecteur</i> .....	23
ii-1-L'agent pathogène : Leishmania.....	23
ii-1-1- Classification .....	23
ii-1-2- Cycle de reproduction.....	25
ii-2- L'agent vecteur et la transmission .....	28
<i>iii- Manifestations cliniques de la leishmaniose chez l'homme</i> .....	30
<i>iv- Diagnostic des leishmanioses</i> .....	33
<i>v- Les médicaments antileishmanioses et cibles thérapeutiques</i> .....	34
<i>vi- Les stratégies de contrôle des leishmanioses</i> .....	36
vi-1- Chimio- thérapie.....	36
vi-2- Chimio-prophylaxie et lutte anti-vectorielle .....	38
I-3- La médecine traditionnelle : Une alternative .....	38
I-4- Généralités sur les Annonacées .....	39
<i>i- Le genre Annona</i> .....	39
i-1- Annona muricata L. (Photographie 1).....	39
i-1-1- Botanique.....	40

i-1-2- Ecologie .....	42
i-1-3- Usages ethnobotaniques.....	42
i-1-4- Travaux antérieurs .....	42
i-2- Annona reticulata L. (Photographie 2).....	44
i-2-1- Botanique .....	44
i-2-2- Ecologie .....	46
i-2-3- Usages ethnobotaniques.....	47
i-2-4- Travaux antérieurs .....	47
i-3- Annona senegalensis Pers. (Photographie 3) .....	48
i-3-1- Botanique .....	48
i-3-2- Ecologie .....	51
i-3-3- Usages ethnobotaniques.....	51
i-3-4- Travaux antérieurs .....	52
II-1- Matériel.....	55
<i>i- Matériel végétal.....</i>	55
<i>ii- Souches parasitaires.....</i>	55
ii-1- Souche plasmodiale.....	55
ii-2- Souches de Leishmania.....	55
<i>iii- Cellules.....</i>	56
iii-1- Cellules érythrocytaires saines et les macrophages J774.2.....	56
iii-2- Fibroblastes .....	56
II-2- Méthodes .....	56
<i>i- Sélection des plantes .....</i>	56

<i>ii- Préparation des extraits</i> .....	57
ii-1- Traitement de la plante et préparation de l'extrait brut.....	57
ii-2- Procédure d'extraction liquide-liquide.....	57
<i>iii- Fractionnement, isolement et caractérisation des composés de la fraction au chlorure de méthylène des écorces et racine d'A. muricata</i> .....	59
<i>iv- Evaluation de l'activité antiplasmodiale in vitro</i> .....	60
iv-1- Evaluation de la susceptibilité des érythrocytes aux extraits .....	60
iv-2- Evaluation de l'activité antiplasmodiale .....	61
iv-2-1- Culture in vitro des parasites .....	61
iv-2-1-1- Maintenance de la culture des parasites .....	61
iv-2-1-2- Synchronisation de la culture .....	62
iv-2-2- Préparation des solutions d'échantillons de plantes .....	62
iv-2- 3- Test d'activité antiplasmodiale .....	62
<i>v-Evaluation de la cytotoxicité sur les cellules HFF (Human Foreskin Fibroblasts)</i> .....	64
v-1- Culture des cellules HFF .....	64
v-2- Test de cytotoxicité sur les cellules HFF .....	65
<i>vi- Evaluation de l'activité antileishmaniale</i> .....	66
vi-1- Evaluation de l'activité antileishmaniale sur les promastigotes .....	66
vi-1-1- Culture in vitro des promastigotes de L. donovani et L. major .....	66
vi-1-1-1- Maintenance de la culture des parasites .....	67
vi-1-2-Préparation des solutions d'extraits et des produits.....	67
vi-1-3- Test d'activité sur les promastigotes.....	68
vi-2- Evaluation de l'activité antileishmaniale sur les amastigotes intracellulaires .....	69

vi-2-1- Evaluation de la susceptibilité des macrophages J774.2 sains aux extraits..	69
vi-2-1-1- Culture in vitro des macrophages J 774.2 .....	69
vi-2-1-2-Test de susceptibilité sur les macrophages J774.2 .....	70
vi-2-2-Transformations des promastigotes en formes métacycliques .....	71
vi-2-3- Infection des macrophages.....	71
vi-2-4- Test d'activité sur les amastigotes intracellulaires .....	72
vi-2-5-Caractérisation phénotypique des macrophages J774.2 infectés .....	72
III-1- Préparation des fractions au chlorure de méthylène et chromatographie flash.....	74
<i>i- Sélection des plantes Résultats</i> .....	74
i-1-Résultats .....	74
i-1-1- Répartition des informateurs.....	74
i-1-2- Répartition des plantes identifiées .....	75
i-2- Discussion .....	75
<i>ii-Extraction et partition</i> .....	76
ii-1- Résultats .....	76
ii-2- Discussion .....	78
<i>iii- Chromatographie flash</i> .....	79
iii-1-Résultats.....	79
iii-1-1- Rendements .....	79
iii-1-2- Structures des composés isolés des racines et des écorces de la fraction au chlorure de méthylène d'A. muricata.....	81
iii-1-2-1-Structure du composé AnMrP1 .....	81
iii-1-2-2- Structure du composé AnMecP1 .....	83

iii-1-2-3- Structure du composé AnMecP2.....	88
iii-1-2-4- Structure du composé.....	89
iii-2- Discussion.....	90
III-2- Activité antiplasmodiale.....	91
<i>i- Résultats</i> .....	91
i-1- Susceptibilité des érythrocytes sains vis-à-vis des extraits.....	91
i-2- Activité antiplasmodiale in vitro sur la souche W2 de P. falciparum et indice de sélectivité .....	92
i-2-1- Résultats.....	92
i-2-2- Discussion.....	101
III-3- Activité antileishmaniale.....	105
<i>i- Détermination des paramètres d'activité</i> .....	105
i-1- Résultats.....	105
i-2- Discussion.....	114
<i>ii- Caractérisation phénotypique des macrophages J774.2 infectés</i> .....	118
ii-1- Résultats.....	118
ii-2- Discussion.....	120
III-4- Corrélation entre l'activité antiplasmodiale et antileishmaniale.....	120
<i>i- Résultats</i> .....	120
<i>ii- Discussion</i> .....	122
<b>PUBLICATIONS</b> .....	

# LISTE DES ABREVIATIONS

<i>A. muricata</i>	<i>Annona muricata</i>
<i>A. reticulate</i>	<i>Annona reticulata</i>
<i>A. senegalensis</i>	<i>Annona senegalensis</i>
<i>A. cherimoya</i>	<i>Annona cherimoya</i>
<i>A. glabra</i>	<i>Annona glabra</i>
<b>A. m</b>	<i>Annona muricata</i>
<b>A. r</b>	<i>Annona reticulata</i>
<b>A. s</b>	<i>Annona senegalensis</i>
<i>A. squamosa</i>	<i>Annona squamosa</i>
<b>ACT</b>	<i>Artemisinin- based Combined Therapy</i>
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AE</b>	Acétate d'éthyl
<b>AnM</b>	<i>Annona muricata</i>
<b>AnMec</b>	<i>Annona muricata</i> écorce
<b>AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<i>Annona muricata</i> écorce fraction au chlorure de méthylène
<b>AnMecEthOH</b>	<i>Annona muricata</i> écorce extrait éthanolique
<b>AnMecH<sub>2</sub>O</b>	<i>Annona muricata</i> écorce fraction aqueuse
<b>AnMecP</b>	<i>Annona muricata</i> écorce produit
<b>AnMecSF</b>	<i>Annona muricata</i> écorce sous fraction
<b>AnMp</b>	<i>Annona muricata</i> péricarpe
<b>AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<i>Annona muricata</i> péricarpe fraction au chlorure de méthylène
<b>AnMpEthOH</b>	<i>Annona muricata</i> péricarpe extrait éthanolique
<b>AnMpH<sub>2</sub>O</b>	<i>Annona muricata</i> péricarpe fraction aqueuse
<b>AnMr</b>	<i>Annona muricata</i> racine
<b>AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<i>Annona muricata</i> racine fraction au chlorure de méthylène
<b>AnMrEthOH</b>	<i>Annona muricata</i> racine extrait éthanolique
<b>AnMrH<sub>2</sub>O</b>	<i>Annona muricata</i> racine fraction aqueuse
<b>AnMrP</b>	<i>Annona muricata</i> racine produit
<b>AnMrSF</b>	<i>Annona muricata</i> racine sous fraction
<b>AnR</b>	<i>Annona reticulata</i>
<b>AnRbr</b>	<i>Annona reticulata</i> brindilles
<b>AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<i>Annona reticulata</i> brindille fraction au chlorure de méthylène
<b>AnRbrEthOH</b>	<i>Annona reticulata</i> brindilles extrait éthanolique
<b>AnRbrH<sub>2</sub>O</b>	<i>Annona reticulata</i> brindille fraction aqueuse
<b>AnRec</b>	<i>Annona reticulata</i> écorces
<b>AnRecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<i>Annona reticulata</i> écorce fraction au chlorure de méthylène
<b>AnRecEthOH</b>	<i>Annona reticulata</i> écorce extrait éthanolique
<b>AnRecH<sub>2</sub>O</b>	<i>Annona reticulata</i> écorce fraction aqueuse
<b>AnRf</b>	<i>Annona reticulata</i> feuille
<b>AnRfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<i>Annona reticulata</i> feuille fraction au chlorure de méthylène
<b>AnRfEthOH</b>	<i>Annona reticulata</i> feuille extrait éthanolique

<b>AnRfH<sub>2</sub>O</b>	<i>Annona reticulata</i> feuille fraction aqueuse
<b>AnRfr</b>	<i>Annona reticulata</i> fruit
<b>AnRfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<i>Annona reticulata</i> fruit fraction au chlorure de méthylène
<b>AnRfrEthOH</b>	<i>Annona reticulata</i> fruit extrait éthanolique
<b>AnRfrH<sub>2</sub>O</b>	<i>Annona reticulata</i> fruit fraction aqueuse
<b>AnRr</b>	<i>Annona reticulata</i> racine
<b>AnRrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<i>Annona reticulata</i> racine fraction au chlorure de méthylène
<b>AnRrEthOH</b>	<i>Annona reticulata</i> racine extrait éthanolique
<b>AnRrH<sub>2</sub>O</b>	<i>Annona reticulata</i> racine fraction aqueuse
<b>AnS</b>	<i>Annona senegalensis</i>
<b>AnSbr</b>	<i>Annona senegalensis</i> brindille
<b>AnSbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<i>Annona senegalensis</i> brindille fraction au chlorure de méthylène
<b>AnSbrEthOH</b>	<i>Annona reticulata</i> brindille extrait éthanolique
<b>AnSbrH<sub>2</sub>O</b>	<i>Annona senegalensis</i> brindille fraction aqueuse
<b>AnSf</b>	<i>Annona senegalensis</i> feuille
<b>AnSfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<i>Annona senegalensis</i> feuille fraction au chlorure de méthylène
<b>AnSfEthOH</b>	<i>Annona senegalensis</i> feuille extrait éthanolique
<b>AnSfH<sub>2</sub>O</b>	<i>Annona senegalensis</i> feuille fraction aqueuse
<b>AnSti</b>	<i>Annona senegalensis</i> tige
<b>AnStiCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<i>Annona senegalensis</i> tige fraction au chlorure de méthylène
<b>AnStiEthOH</b>	<i>Annona senegalensis</i> tige extrait éthanolique
<b>AnStiH<sub>2</sub>O</b>	<i>Annona senegalensis</i> tige fraction aqueuse
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>Art</b>	Artémisinine
<b>ATP</b>	Adénosine Triphosphate
<b>CC</b>	Chromatographie sous colonne
<b>CC<sub>50</sub></b>	Concentration cytotoxique 50
<b>CCM</b>	Chromatographie sur Couche Mince
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentration Effective 50
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Chlorure de méthylène
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentration Inhibitrice 50
<b>COSY</b>	<i>Correlated spectroscopy</i>
<b>CQ</b>	Chloroquine
<b>DAPI</b>	4,6-diamidino-2-2 phénylindole
<b>DAT</b>	<i>Direct Agglutination Test</i>
<b>DDT</b>	Dichlorodiphényltrichloroéthane
<b>DE</b>	Dose Efficace
<b>DHFR</b>	Dihydrofolate Réductase
<b>DHPS</b>	Dihydroptéroate Synthase
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Diméthyl Sulfoxyde
<b>DNB</b>	Acide 3,5-dinitrobenzoïque
<b>ET</b>	Ecart-type
<b>EDTA</b>	<i>Ethylene diamine tetraacetic Acid</i>

<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EthOH</b>	Ethanol
<b>Ext</b>	Extrait
<b>FBS</b>	<i>Fœtal Bovine Serum</i>
<b>Fra</b>	Fraction
<b>GABA</b>	<i>Gamma Amino Butyric Acid</i>
<b>Glu</b>	Glucantime
<b>HCL</b>	Acide chlorydrique
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
<b>Hex</b>	Hexane
<b>HFF</b>	<i>Human Foreskin Fibroblast</i>
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<b>HRP-2</b>	<i>Histidine-Rich Protein-2</i>
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<b>IS</b>	Indice de sélectivité
<b>ISP</b>	Indice de spécificité
<b>J</b>	Constance de couplage
<b><i>L. aethiopica</i></b>	<i>Leishmania aethiopica</i>
<b><i>L. arachibuldi</i></b>	<i>Leishmania arachibuldi</i>
<b><i>L. aristidesi</i></b>	<i>Leishmania aristidesi</i>
<b><i>L. arubica</i></b>	<i>Leishmania arubica</i>
<b><i>L. brazilensis</i></b>	<i>Leishmania brazilensis</i>
<b><i>L. chagasi</i></b>	<i>Leishmania chagasi</i>
<b><i>L. deanei</i></b>	<i>Leishmania deanei</i>
<b><i>L. enrietti</i></b>	<i>Leishmania enrietti</i>
<b><i>L. garhami</i></b>	<i>Leishmania garhami</i>
<b><i>L. gerbili</i></b>	<i>Leishmania gerbili</i>
<b><i>L. guyanensis</i></b>	<i>Leishmania guyanensis</i>
<b><i>L. hertigi</i></b>	<i>Leishmania hertigi</i>
<b><i>L. infantum</i></b>	<i>Leishmania infantum</i>
<b><i>L. killicki</i></b>	<i>Leishmania killicki</i>
<b><i>L. lainsoni</i></b>	<i>Leishmania lainsoni</i>
<b><i>L. panamensis</i></b>	<i>Leishmania panamensis</i>
<b><i>L. peruviana</i></b>	<i>Leishmania peruviana</i>
<b><i>L. pifanoi</i></b>	<i>Leishmania pifanoi</i>
<b><i>L. tropica</i></b>	<i>Leishmania tropica</i>
<b><i>L. venezuelensis</i></b>	<i>Leishmania venezuelensis</i>
<b><i>L. amazonensis</i></b>	<i>Leishmania amazonensis</i>
<b><i>L. donovani</i></b>	<i>Leishmania donovani</i>
<b><i>L. major</i></b>	<i>Leishmania major</i>
<b><i>L. mexicana</i></b>	<i>Leishmania mexicana</i>
<b>LC</b>	Leishmaniose Cutanée
<b>LCD</b>	Leishmaniose Cutanée Diffuse
<b>LCL</b>	Leishmaniose Cutanée Localisée

<b>LCM</b>	Leishmaniose Cutané-Muqueuse
<b>LDH</b>	Lactase déshydrogénase
<b>LV</b>	Leishmaniose Viscérale
<b>m/z</b>	Rapport masse.charge atomique
<b>MEM</b>	<i>Minimum Essential Medium</i>
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>MGG</b>	<i>May- Grunwald- Giemsa</i>
<b>MTL</b>	<i>Trypanosomes Liquid Medium</i>
<b>MTS</b>	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt</i>
<b>MTT</b>	3, (4, 5- diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
<b>NAD</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
<b>NADH</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
<b>NanoESI</b>	<i>Nano Electrospray Ionization</i>
<b>ND</b>	Non déterminé
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>P</b>	Produit
<b><i>P. knowlesi</i></b>	<i>Plasmodium knowlsi</i>
<b><i>P.falciparum</i></b>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PfATP6</b>	<i>Plasmodium falciparum ATPase6</i>
<b>PIB</b>	Pouvoir Intérieur Brut
<b>PMS</b>	Phénazine Méthosulfate
<b>Ppm</b>	Partie par million
<b>QBC</b>	<i>Quantitative Buffy Coat</i>
<b>RAL</b>	<i>Reichsausshuß für Lieferbedingungen</i>
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
<b>RPM</b>	Rotation Par Minute
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>SF</b>	Sous fraction
<b>SIDA</b>	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
<b>SM</b>	Spectre de masse
<b><i>Spp</i></b>	Espèce
<b>THF</b>	Tétrahydrofurane
<b>THP</b>	Tétrahydropyrane
<b>TS</b>	Thymidylate Synthase
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéficience Humaine
<b>VP</b>	Vacuole Parasitophore
<b><math>\delta_H</math></b>	Déplacement chimique du proton

# LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Répartition mondiale du paludisme.....	6
Figure 2 :	Cycle biologique de <i>Plasmodium</i> .....	9
Figure 3 :	Le vecteur du paludisme.....	10
Figure 4 :	Répartition mondiale de la leishmaniose.....	24
Figure 5 :	Processus de différenciation au niveau du tube digestif chez le vecteur de la leishmaniose.....	28
Figure 6 :	Cycle biologique de <i>Leishmania</i> .....	29
Figure 7 :	Le vecteur de la leishmaniose.....	30
Figure 8 :	Cycle épidémiologique de la leishmaniose.....	31
Figure 9 :	Lésions ulcéraives de la leishmaniose viscérale.....	32
Figure 10 :	Lésions mucocutanées de la leishmaniose.....	32
Figure 11 :	Leishmaniose cutanée diffuse.....	33
Figure 12 :	Enfant atteint de la leishmaniose viscérale.....	33
Figure 13 :	Caractéristiques botaniques d' <i>A. muricata</i> L.....	42
Figure 14 :	Caractéristiques botaniques d' <i>A. reticulata</i> L.....	47
Figure 15 :	Caractéristiques botaniques d' <i>A. senegalensis</i> P.....	51
Figure 16 :	Procédure de préparation des fractions au chlorure de méthylène.....	58
Figure 17 :	Speetre RMN <sup>1</sup> H (pyridine) de AnMrP1.....	80
Figure 18 :	Structure de AnMrP1 : 3- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside de stigmastérol.....	81
Figure 19 :	Speetre de masse NanoESI de AnMecP1.....	82
Figure 20 :	Speetre de RMN <sup>1</sup> H (DCI <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> OD) de AnMecP1.....	83
Figure 21 :	Speetre de RMN <sup>13</sup> C (DCI <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> OD) de AnMecP1.....	84
Figure 22 :	Speetre HMBC de AnMecP1.....	85
Figure 23 :	Structure de AnMecP1 : Lichexanthone.....	85
Figure 24 :	Speetre RMN <sup>1</sup> H DMSO de AnMecP2.....	86
Figure 25 :	Structure de AnMecP2 : Acide gallique.....	87
Figure 26 :	Speetre de RMN <sup>1</sup> H (pyridine) de AnMecP3.....	87
Figure 27 :	Structure de AnMecP3 : 3- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside de β-sitostérol.....	88
Figure 28 :	Observation microscopique des cellules.....	117
Figure 29 :	Répartition de l'activité des échantillons en fonction des protozoaires.....	119

# LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 1 :	<i>Annona muricata</i> Linn.....	42
Photographie 2 :	<i>Annona reticulata</i> Linn.....	46
Photographie 3 :	<i>Annona senegalensis</i> Pers.....	51

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Quelques cibles chimio-thérapeutiques identifiées chez le <i>Plasmodium</i> et les antipaludiques existants .....	16
Tableau II :	Distribution géographique des différentes espèces de <i>Leishmania</i> .....	23
Tableau III :	Position systématique du genre <i>Leishmania</i> .....	25
Tableau IV :	Taxonomie des leishmanies.....	26
Tableau V :	Quelques cibles chimio-thérapeutiques identifiées chez <i>Leishmania</i> et les médicaments existants.....	36
Tableau VI :	Distribution des informateurs.....	74
Tableau VII :	Répartition des plantes identifiées.....	75
Tableau VIII :	Rendements d'extraction des différents organes d' <i>A. muricata</i> , <i>A. reticulata</i> et <i>A. senegalensis</i> .....	76
Tableau IX :	Rendements de la chromatographie flash des fractions au CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> des racines et des écorces d' <i>A. muricata</i> .....	78
Tableau X :	Activité inhibitrice des échantillons sur la souche W2 de <i>P. falciparum</i> et indice de sélectivité.....	91
Tableau XI :	Activité antileishmaniale des échantillons sur les promastigotes et amastigotes de <i>L. donovani</i> , <i>L. major</i> et indice de sélectivité.....	105

# LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Structures de quelques antipaludiques.....	a
Annexe 2 : Structures de quelques médicaments utilisés dans le traitement de la leishmaniose.....	c
Annexe 3 : Formulaire de consentement éclairé.....	d
Annexe 4 : Fiche de questionnaire.....	f
Annexe 5 : Préparation des milieux de cultures.....	i

# RESUME

Les infections causées par les protozoaires du genre *Plasmodium* et *Leishmania* constituent un problème majeur de santé dans le monde, principalement dans les pays endémiques en développement. L'incidence de ces maladies a augmenté depuis l'apparition du VIH /SIDA qui est un facteur d'immunodépression. L'absence d'un vaccin, et la résistance des parasites aux médicaments disponibles soulignent l'urgence de développer de nouveaux médicaments efficaces, non toxiques, et aux modes d'action différents. Le règne végétal est sans aucun doute la source la plus crédible de nouvelles molécules au profil recherché. Les plantes de la famille des Annonaceae constituent une source prometteuse pour la découverte de produits naturels à activité antipaludique et antileishmaniale. Dans cette optique, une enquête ethnopharmacologique sur ces dernières utilisées en médecine traditionnelle Camerounaise pour le traitement du paludisme et des symptômes a été réalisée dans quatre localités du Cameroun. L'évaluation des activités antiplasmodiale et antileishmaniale des trois plantes sélectionnées : *Annona muricata*, *Annona reticulata* et *Annona senegalensis* (Annonaceae) a été menée.

Pour atteindre cet objectif, une enquête ethnopharmacologique a été réalisée avec la collaboration des tradipraticiens sélectionnés après une brève enquête informative sur 4 sites [Yaoundé et ses environnements, Kon-Yambetta, Mbalmayo (Région de Centre) et Ngoyang (Région du Sud)], en utilisant une interview face à face. Les différents organes de plantes sélectionnées ont été collectés et soumis à l'extraction suivie de partition liquide-liquide aux solvants organiques. Compte tenu du profil de l'activité antiplasmodiale des fractions au chlorure de méthylène des racines (AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) et des écorces (AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) d'*Annona muricata*, elles ont été sélectionnées pour une étude phytochimique par chromatographie sur colonne. Les structures des composés isolés ont été élucidées à l'aide de techniques physiques et spectroscopiques (RMN proton, RMN carbone, SM, HMBC, HSQC et COSY). L'évaluation de la susceptibilité des érythrocytes sains, de la souche W2 de *Plasmodium falciparum* et des cellules Human Foreskin Fibroblast (HFF) vis-à-vis des extraits de plantes a été faite en culture et révélée respectivement par suivi spectrophotométrique au 3, (4, 5- diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphényle tétrazolium bromide (MTT), par cytométrie de flux et spectrophotométrie au 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tétrazolium, inner salt (MTS). En prélude à l'activité antileishmaniale, la susceptibilité des cellules hôtes (macrophages J774.2) aux extraits éthanoliques bruts, fractions au chlorure de méthylène, à la sous-fraction AnMecSF31 des écorces d'*Annona muricata* et au composé 3-O-β-D-

glucopyranoside de stigmastérol (AnMrP1) isolé des racines d'*Annona muricata* a été réalisée en culture et révélée par cytométrie de flux. L'étude de l'activité antileishmaniale *in vitro* et *ex vivo* respectivement sur les formes promastigotes, et amastigotes intracellulaires et la caractérisation phénotypique des cellules infectées après traitement ont été réalisées par la méthode microscopique.

Les résultats obtenus montrent que parmi les plantes du genre *Annona*, *Annona muricata*, *Annona reticulata*, *Annona senegalensis* et *Annona squamosa* sont utilisés en médecine traditionnelle au Cameroun pour leur effet thérapeutique contre le paludisme ou les symptômes associés. *Annona muricata* est la seule plante trouvée dans trois des quatre sites d'études. Les rendements d'extraction des plantes et de la partition des extraits varient de 0,41 à 11,58%. L'étude phytochimique des fractions au chlorure de méthylène des racines et écorces d'*Annona muricata* a globalement conduit à l'isolement de 4 produits connus (3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside de stigmastérol, lichexanthone, acide gallique, 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside de  $\beta$ -sitostérol) et 51 sous fractions. Les échantillons ont démontré une innocuité *in vitro* vis-à-vis des érythrocytes sains et des cellules Human Foreskin Fibroblasts. Les extraits de deux des trois plantes étudiées (*Annona muricata* et *Annona reticulata*) ont présenté une activité antiplasmodiale avec des  $CI_{50}$  variant de 0,07 à 3,46  $\mu$ g/ml. Les sous-fractions 30 des écorces (AnMecSF30) et 3 des racines (AnMrSF3) d'*Annona muricata* ont démontré l'activité la plus forte et la plus sélective ( $CI_{50} < 0,2$   $\mu$ g/ml et indice de sélectivité (IS)  $> 100$ ). *Annona senegalensis* n'a présenté aucune activité antiplasmodiale. D'autre part, les extraits testés ont montré une activité antileishmaniale sur les promastigotes et amastigotes intracellulaires de *Leishmania donovani* et de *Leishmania major* avec des  $CI_{50}$  variant de 0,12 à 85,25  $\mu$ g/ml et des indices de sélectivité  $\leq 6,20$ . La fraction au chlorure de méthylène des brindilles d'*Annona reticulata* (AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), ayant démontré la plus forte activité antileishmaniale n'a pas affecté de façon significative la croissance et la morphologie des cellules hôtes infectées (macrophages J774.2).

Les résultats obtenus dans ce travail apportent un appui scientifique à l'utilisation d'*Annona muricata* et *Annona reticulata* en médecine traditionnelle camerounaise pour soigner le paludisme et les symptômes apparentés. De plus, ces effets peuvent permettre d'anticiper sur une éventuelle présence de métabolites secondaires doués d'un fort potentiel antiplasmodiale et antileishmaniale dans ces extraits. Des investigations ultérieures devraient dès lors être

menées de façon détaillée pour permettre de clarifier cette assertion au travers de l'identification de tous les principes actifs et de la détermination de leur mécanisme d'action.

**Mots-clés** : Enquête ethnopharmacologique, étude phytochimique, activité antiplasmodiale, activité antileishmaniale, cytotoxicité, *Annona muricata*, *Annona reticulata*, *Annona senegalensis*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Leishmania major*.

# ABSTRACT

Infections caused by protozoa of the genus *Plasmodium* and *Leishmania* are a major worldwide health problems, with high endemicity in developing countries. The incidence of these diseases has increased since the emergence of HIV/AIDS which is a factor of immunodepression. The absence of a vaccine and the emergence of parasite resistance to available drugs underscore the urgent need to develop effective new drugs, non toxic with different modes of action. Annonaceae family plants are a promising source for the discovery of natural products that could be investigated, and further developed into antimalaria and antileishmanial drugs. To contribute in the achievement of this goal, an ethnopharmacological survey of plants from *Annona* genus used in Cameroonian traditional medicine to treat fever and malaria or related symptoms was conducted in four localities in Cameroon. We have evaluated the antiplasmodial and antileishmanial activities from extracts of three selected plants: *Annona muricata*, *Annona reticulata* and *Annona senegalensis* (Annonaceae).

The ethnopharmacological survey was achieved with the collaboration of traditional herbal practitioners selected through a brief information survey at 4 sites [Yaoundé and its surroundings, Kon-Yambetta, Mbalmayo (Centre region) and Ngoyang (South region)], and using a face-to-face interview strategy. Different parts from selected plants were collected and extracted, and thereafter partitioned using organic solvents. Given the antiplasmodial activity profile of the methylene chloride fractions from roots (AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and stem bark (AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) of *Annona muricata*, were selected for a phytochemical study using column chromatography. The structures of isolated compounds were elucidated using physical and spectroscopic techniques (NMR proton, carbon NMR, MS, HMBC, HSQC, and COSY). The susceptibility of healthy red blood cells, the W2 strain of *Plasmodium falciparum* and Human Foreskin Fibroblasts cells (HFF) were assessed in culture and respectively revealed by spectrophotometric monitoring at 3 (4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT), flow cytometry and spectrophotometry 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS). Before the antileishmanial test, the susceptibility of host cells (J774.2 macrophages) to crude ethanolic extracts, methylene chloride fractions, sub fraction AnMecSF31 from stem bark of *Annona muricata* and the purified compound [(Stigmasterol-3-O-β-D-glucopyranoside) (AnMrP1)] isolated from the roots of *Annona muricata* was carried out in culture and revealed by flow cytometry. The *in vitro* and *ex vivo* antileishmanial activity study respectively on promastigote

and intracellular amastigote forms of visceral and cutaneous leishmaniasis parasites (*Leishmania donovani* LCR-133 and *Leishmania major* MHOM/IL/81/Friedlin respectively) and the phenotypic characterization of cells infected after treatment were carried out by microscopy.

The results obtained indicated that among the *Annona* plants, *Annona muricata*, *Annona reticulata*, *Annona senegalensis* and *Annona squamosa* are used for the treatment of malaria or related symptoms in traditional medicine in Cameroon. Only *Annona muricata* is commonly found in three of the four studies sites. The extraction and partition yields varied from 0.41 to 11.58%. Phytochemical study of methylene chloride fractions from root and stem bark of *Annona muricata* led globally to the isolation of 4 compounds which are already known (stigmasterol 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, lichexanthone, gallic acid and  $\beta$ -sitosterol 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside) and 51 sub fractions. The extracts exhibited no toxicity *in vitro* on red blood cells and on Human Foreskin Fibroblasts cells. Two of the three tested plants, *Annona muricata* and *A. reticulata* showed antiplasmodial activity with IC<sub>50</sub> ranging from 0.07 to 3.46  $\mu$ g/ml. With IC<sub>50</sub> < 0.2  $\mu$ g/ml and selectivity index (SI) >100, subfraction 30 from stem bark (AnMsbSF30) and subfraction 3 from root (AnMrSF3) of *Annona muricata* were more active and more selective and could be considered as promising samples for antimalarial drug discovery. Antileishmanial assay showed that tested samples have activity on promastigote and amastigote forms of *Leishmania donovani* and *Leishmania major* with IC<sub>50</sub> ranging from 0.12 to 85.25  $\mu$ g/ml with selectivity indexes  $\leq$  6.20. Methylene chloride fraction from *Annona reticulata* twigs (AnRtwCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), which presented the best antileishmanial activity, did not remarkably affect the normal growth and morphology of the infected host cells (J774.2 macrophages).

From this investigation, the results provide a scientific support to the use of *Annona muricata* and *Annona reticulata* in Cameroonian traditional medicine to treat malaria and related symptoms. Moreover, these results highlight that *Annona muricata* and *Annona reticulata* contain secondary metabolite with antiplasmodial and antileishmanial potency. Further investigations on this subject should be carried out in detail to clarify this issue through the identification of all active principles and determination of their mechanism of action.

**Keywords:** Ethnopharmacological survey, phytochemical study, antiplasmodial activity, antileishmanial activity, cytotoxicity, *Annona muricata*, *Annona reticulata*, *Annona senegalensis*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Leishmania major*.



# **INTRODUCTION**

Le paludisme est un problème majeur de santé publique. On estime que 3,2 milliards de personnes sont à risque d'être infectés par le paludisme et 1,2 milliards sont à risque élevé. Selon les dernières estimations, 214 millions de cas de paludisme se sont produits dans le monde en 2015 et le nombre de décès dus au paludisme est estimé à 484 000 dont 90% en Afrique. A l'échelle mondiale, 70% des décès imputables au paludisme ont frappé des enfants de moins de 5 ans (**OMS, 2014a; OMS 2015**). Au Cameroun, le paludisme est responsable de 26% d'arrêt maladie ; 57% de journées d'hospitalisation et 40% de dépenses annuelles des ménages pour la santé. Sur le plan social, il constitue l'une des causes majeures d'absentéisme dans les écoles (**OMS-Cameroun, 2009**).

La leishmaniose fait partie des maladies tropicales négligées, ayant un taux de morbidité et de mortalité significatif en Afrique, en Asie et en Amérique latine (**OMS, 2002**). On estime qu'environ 12 millions de personnes sont infectées par le parasite *Leishmania*, et que 350 millions de personnes sont considérées comme pouvant être potentiellement infectées. Cette maladie peut présenter plusieurs formes symptomatiques allant de la forme cutanée la plus répandue à la forme viscérale mortelle. D'autre part, cette maladie est commune à l'homme et au chien, ce qui en fait également une cible vétérinaire importante. Peu de traitements existent à l'heure actuelle, et la recherche de nouvelles molécules actives sur le parasite permettrait de lutter contre cette maladie tropicale (**Ashford, 2000; Carvalho et al., 2000; OMS, 2014b**). Au Cameroun, la leishmaniose viscérale et la leishmaniose cutanée ont été signalées (**Donji et al., 2001**). Cependant, peu d'études ont porté sur la leishmaniose, Entre Octobre 1987 et Janvier 1988, une étude menée à Kousséri a révélé que sur 120 personnes qui ont été échantillonnées, 46 présentaient des symptômes de la leishmaniose et 9 ont été confirmées positifs à la leishmaniose viscérale (**Kaptue et al., 1992**). **Ngouateu et al. (2012)**, ont trouvé une prévalence de 4% de coinfection leishmaniose cutanée et VIH dans la région du Nord Cameroun.

Actuellement, malgré l'arsenal thérapeutique existant, peu de médicaments antipaludiques et antileishmaniales sont disponibles sur le marché et accessibles aux populations concernées. De plus, on note le développement des phénomènes de résistance du parasite aux traitements actuels tels que les ACT (Artemisinin-based Combined Therapy) pour ce qui est du paludisme (**Dondorp et al., 2009**). La chimiothérapie avec l'antimoniote de méglumine dont la Glucantime, est le premier choix pour traiter la leishmaniose. Cependant, le traitement est long, coûteux, peu efficace et avec des effets secondaires graves. Les médicaments de deuxième ligne, tels que l'amphotéricine B et la pentamidine, peuvent même être plus toxique. Outre les problèmes déjà mentionnés **Rijal et al. (2013), Rubi et al. (2014)**

ont rapporté l'augmentation des défaillances de miltefosine, actuellement utilisé pour traiter la leishmaniose viscérale, quelques-unes des causes possibles étant la résistance du parasite, la discontinuité du traitement, et la réinfection. Et qui plus est, face à l'absence des vaccins pour ces pathologies dont l'adversité est confirmée ; combiné à la résistance des vecteurs aux insecticides, il devient urgent d'intensifier la prospection de nouvelles molécules douées d'activités antiplasmodiale et antileishmaniale. Ces nouvelles molécules devraient avoir un mode d'action original, différentes de celles disponibles actuellement et surtout peu onéreux pour la bourse de la majorité des populations à risque.

Dans ce but, l'investigation de la biodiversité végétale et la connaissance des thérapeutiques traditionnelles représentent des potentiels inestimables pour la découverte de nouvelles molécules antipaludiques et antileishmaniales comme ce fut le cas pour la Quinine et l'Artémisinine pour le paludisme (**Napolitano et al., 2005**).

En effet, l'OMS estime que jusqu'à 80% de la population du globe utilise la médecine traditionnelle pour répondre à ses besoins de santé. Cet usage répandu de la médecine traditionnelle est attribuable à son accessibilité et à son coût réduit compte tenu de la précarité de la population des pays endémiques (**OMS, 2000a**).

Le Cameroun dispose d'une grande biodiversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition séculaire de la pharmacopée traditionnelle. Une étude ethnobotanique réalisée par **Tsabang et al. (2012)** a montré que plusieurs plantes de la famille des Annonacées sont utilisées seules ou en mélange pour le traitement du paludisme.

Le paludisme et la leishmaniose sont tous deux des maladies causées par des protozoaires *Plasmodium* et *Leishmania*. Ces protozoaires pathogènes partagent un certain nombre de voies métaboliques qui constituent leur faiblesse tout comme leur force. Par conséquent, la réorientation des plantes médicinales utilisées pour le traitement de l'infection à *P. falciparum* à la recherche de nouveaux inhibiteurs contre *Leishmania*, un agent pathogène lié est une approche crédible dans la découverte de médicaments.

Les Annonacées sont l'une des familles de plantes qui peuplent de façon endémique les forêts et les savanes tropicales, et particulièrement Camerounaises (**Boyom, 2004**). Parmi ces plantes, figurent celles du genre *Annona*. Elles sont utilisées au Cameroun ainsi que dans les pays tropicaux et sub-tropicaux pour le traitement du paludisme (**Willcox et Bodeker, 2004; Tsabang et al., 2012; Chavan et al., 2014**). D'où l'hypothèse selon laquelle les plantes du

genre *Annona* contiendraient des molécules à activité antiprotozoaires dont, antiplasmodiale et antileishmaniale.

Dans le souci de contribuer à la promotion et la valorisation des plantes médicinales camerounaises, nous avons envisagé dans le cadre de ce travail, d'évaluer les propriétés antiplasmodiale et antileishmaniale *in vitro* et *ex vivo* de quelques organes des plantes du genre *Annona*.

Spécifiquement, il s'est agit :

- De sélectionner sur la base d'une enquête ethnobotanique et d'un criblage d'activité antiplasmodiale les plantes du genre *Annona* disponibles. Puis d'obtenir respectivement par extraction, partition liquide-liquide et chromatographie flash les extraits bruts, les fractions, sous fractions et les composés de différents organes des plantes sélectionnées.
- D'évaluer l'activité antiplasmodiale des extraits sur la souche W2 de *Plasmodium falciparum* et de déterminer leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules Human Foreskin Fibroblasts.
- D'évaluer l'activité antileishmaniale *in vitro* et *ex vivo* des extraits, fractions, sous fraction et composé sur les promastigotes et amastigotes intracellulaires de *Leishmania donovani* (LCR-133) et *Leishmania major* (MHOM/IL/81/Friedlin) respectivement agent responsable de la leishmaniose viscérale et de la leishmaniose cutanée, de déterminer la susceptibilité des cellules hôtes (macrophages J774.2) vis-à-vis des extraits ainsi que les modifications phénotypiques après traitement.



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

# I-1- Généralités sur le paludisme

## *i- Epidémiologie*

### *i-1-Contexte actuel*

Le paludisme est une maladie infectieuse provoquée par des protozoaires, parasites du sang, appartenant au genre *Plasmodium* (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi* et *Plasmodium vivax*). Cette maladie est transmise par un moustique, l'anophèle femelle, et se manifeste par des accès de fièvre intermittents (Singh *et al.*, 2004).

Depuis 2004, une cinquième espèce de *Plasmodium*, *P. knowlesi*, connue pour être responsable du paludisme simien, a été reconnue responsable d'infections humaines (OMS, 2011).

Selon le dernier rapport de l'OMS de 2013, le paludisme est présent dans toutes les 6 régions de l'OMS. Globalement, on estime que 3,2 milliards de personnes sont à risque d'être infectées par le paludisme et 1,2 milliards sont à risque élevé. Selon les dernières estimations, 198 millions de cas de paludisme se sont produits dans le monde en 2013 et le nombre de décès dû au paludisme est estimé à 584000 dont 90% en Afrique. A l'échelle mondiale, 78% des décès imputables au paludisme ont frappé des enfants de moins de 5 ans (OMS, 2014a).

Dans les années 60, l'apparition des premières molécules antipaludiques efficaces et bon marché, associée à une lutte antivectorielle à grande échelle (principalement par l'épandage massif de dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT) a permis de réduire considérablement la morbidité due à cette maladie.

Cependant, l'emploi massif et systématique de ces produits a conduit en quelques années à l'apparition de résistances du vecteur au DDT et à l'émergence de parasites résistants aux antipaludiques utilisés à l'époque. On observe depuis, une nette recrudescence de la maladie, principalement dans les pays du sud (Benidir, 2012).

Plusieurs facteurs expliquent la situation actuelle. Tout d'abord, le manque d'infrastructures dans les pays les plus touchés limite l'efficacité des programmes de prévention et de distribution des médicaments. Par ailleurs, la recherche et le développement de thérapies efficaces sont peu profitables pour les grandes industries pharmaceutiques, au regard de la

solvabilité limitée des populations à risque. Dans les pays endémiques africains, 25% à 35% des consultations, 20% à 45% des hospitalisations et 15% à 35% des décès en milieu hospitalier sont dus au paludisme, ce qui constitue une charge considérable pour des systèmes de soins déjà précaires **(OMS, 2008)**.

L'exposition plus fréquente de populations non immunisées, l'émergence du VIH expliquent l'augmentation de la mortalité imputable au paludisme ces dernières années en Afrique. De plus, les personnes VIH-positives sont plus sensibles au parasite et les symptômes sont plus graves **(Roll Back Malaria, 2004)**.

Enfin, les changements environnementaux tels que le réchauffement climatique, l'exploitation de sites autrefois préservés, ou encore le déplacement des populations lors de conflits ou de problèmes économiques contribuent à la forte extension de cette maladie dans la plupart des pays de la zone intertropicale **(Smol, 2012)**.

### ***i-2- Impacts socio-économiques***

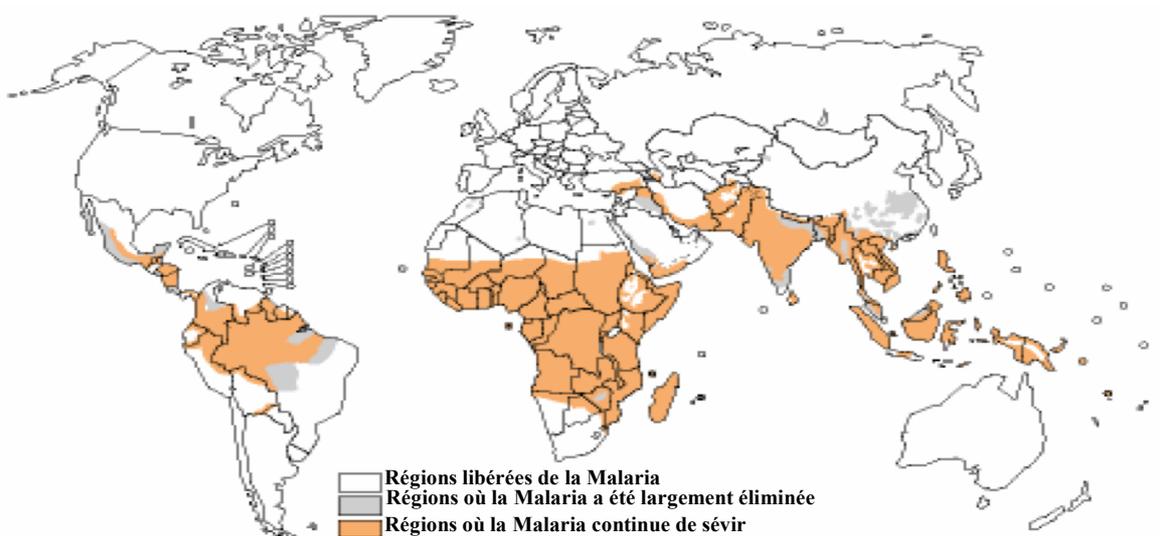
En dehors des pertes humaines, le paludisme fait des ravages sur le plan économique dans les zones de prévalence élevée, en entraînant une baisse du Produit Intérieur Brut (PIB) allant jusqu'à 1,3% dans les pays à forte transmission. A terme, les pertes annuelles cumulées ont abouti à des différences substantielles de PIB entre les pays avec ou sans paludisme, notamment en Afrique **(OMS, 2009a)**.

Au niveau individuel, l'impact économique inclut les frais de soins et d'hospitalisation, les jours de travail et de présence à l'école perdus, la baisse de productivité due aux dommages cérébraux créés par la maladie. A ces impacts s'ajoute la baisse d'investissement et du tourisme **(Greenwood et al., 2005)**.

Au Cameroun, le paludisme est responsable de 26% d'arrêt maladie ; 57% de journées d'hospitalisation et 40% de dépenses annuelles des ménages pour la santé. Sur le plan social, il constitue l'une des causes majeures d'absentéisme dans les écoles **(OMS-Cameroun, 2009)**.

### ***i-3- Répartition géographique***

Le paludisme est un sérieux problème de santé publique pour plus de 109 pays et territoires dans le monde. Ces pays sont essentiellement en développement, et situés en Afrique, en Asie et en Amérique latine (Figure 1). Quarante pourcent de la population atteinte vit en Afrique sub-saharienne, où la maladie est la première cause de mortalité (OMS, 2009a).



**Figure 1 : Répartition mondiale du paludisme** (Source : [www.rbm.who.int](http://www.rbm.who.int), 2001-2010 United Nations Decade to Roll Back Malaria)

Outre ces zones à risques, le paludisme peut se propager de différentes manières (OMS, 2005; Bassandja *et al.*, 2014) :

- Par importation à travers les voyageurs ;
- Par le phénomène du paludisme des aéroports où la transmission par des anophèles voyageurs peut se faire lors d'étés chauds autour des grands aéroports internationaux ;
- Par transfusion sanguine.

## ***ii- L'agent pathogène et l'agent vecteur***

### ***ii-1- L'agent pathogène : le Plasmodium***

#### ***ii-1-1-Classification***

Selon la dernière classification (Levine, 1988), amendée par Cox (1991), le genre *Plasmodium* appartient à l'embranchement des *Apicomplexa* (Sporozoaires), classe des *Haemosporida*, ordre des *Haemosporidie* et à la famille des *Plasmodiidae*. Les *Plasmodium* sont des parasites des hématies, et sont parfois nommés hématozoaires.

Cinq espèces sont responsables de la maladie chez l'Homme :

➤ ***Plasmodium vivax* Grassi et Feletti**

C'est la deuxième espèce rencontrée en Afrique et surtout en Asie, en Amérique latine. Environ 10 à 20% des cas d'infection par *P. vivax* dans le monde se produisent en Afrique subsaharienne (**Mendis et al., 2001**).

➤ ***Plasmodium malariae* Grassi et Feletti**

Cette espèce a une distribution mondiale très inégale. Elle n'est pas meurtrière mais peut entraîner des rechutes jusqu'à 20 ans après la primo-infection (**Mendis et al., 2001**).

➤ ***Plasmodium ovale* Stephens**

Principalement rencontrée en Afrique de l'Ouest, cette espèce n'est pas mortelle mais peut cependant entraîner des rechutes 4 à 5 ans après la primo-infection. Elle infecte préférentiellement les globules rouges non matures, ce qui limite la parasitémie (**Mendis et al., 2001**).

➤ ***Plasmodium knowlesi***

Notons que récemment des études effectuées en Malaisie ont montré que *P. knowlesi* infectant les singes est susceptible d'infecter l'Homme (**Daneshvar et al., 2009**).

➤ ***Plasmodium falciparum* Welch**

Essentiellement rencontré en Afrique tropicale, en Amérique centrale et du sud et en Asie du sud-est, *P. falciparum* est l'espèce la plus pathogène car responsable de cas mortels. De plus, il développe aujourd'hui une résistance contre les ACT en Asie du sud-est (Cambodge) (**Mendis et al., 2001**).

Nous avons dans le cadre de ce travail, accordé plus d'attention à la littérature sur *P. falciparum* à l'origine des cas graves de paludisme en Afrique, et en particulier au Cameroun.

## ***ii-1-2- Cycle de reproduction***

Le cycle de reproduction des *Plasmodium* est complexe et comporte deux étapes essentielles : une phase asexuée qui se déroule chez l'Homme et une phase sexuée qui débute chez l'Homme et se termine chez le moustique, l'*Anopheles* femelle (Figure 2).

### ➤ Phase asexuée chez l'Homme

Le cycle du *Plasmodium* chez l'Homme débute par l'inoculation. Lors de la piqûre du moustique, le parasite sous forme de sporozoïte passe dans le foie en une heure *via* la circulation sanguine. Après une phase de division dans les hépatocytes, il produit des schizontes hépatiques : c'est la phase pré-érythrocytaire (avant l'invasion du globule rouge) ou exo-érythrocytaire (hors globule rouge). Arrivé à maturité, après cinq à six jours, le schizonte éclate, libérant plusieurs milliers de mérozoïtes (40 000 pour *P. falciparum*). Ces mérozoïtes pénètrent dans les hématies où ils se transforment en trophozoïtes puis en schizontes érythrocytaires dont chacun comporte seize ou trente-deux noyaux fils. Chaque noyau donne un mérozoïte lorsque le globule rouge éclate. Ce mérozoïte va ensuite parasiter une hématie saine et le cycle schizogonique recommence. C'est la phase érythrocytaire du cycle (**Silvie *et al.*, 2003; Mouchet, 2004**).

### ❖ Spécificités de *P. falciparum*

Dans le cas de *P. falciparum*, seul le début du cycle se déroule dans le sang périphérique : la phase de division du schizonte érythrocytaire se produit dans les organes profonds. Le développement de tous les parasites est synchrone chez un même sujet et ce cycle érythrocytaire dure 48 heures, d'où le nom de fièvre tierce maligne qui lui était donné bien avant que ne fut découvert le parasite. L'éclatement des globules rouges correspond à l'épisode fébrile qui caractérise le paroxysme de l'accès. Après plusieurs cycles asexués de *P. falciparum*, le malade, s'il a survécu, guérit spontanément (**Mouchet, 2004**).

Après neuf à onze jours, apparaissent dans le sang des formes sexuées non pathogènes, les gamétocytes mâles et femelles. Ces gamétocytes n'évoluent pas chez l'Homme et ne peuvent poursuivre leur évolution que lorsqu'ils sont ingérés par des *Anopheles*, assurant ainsi la pérennisation de l'espèce (**Silvie *et al.*, 2003; Mouchet, 2004; Ménard, 2005**).

### ➤ Phase sexuée chez l'anophèle femelle

Lors de son repas sanguin, l'anophèle femelle avale des gamétocytes mâles et femelles. Dans son estomac, ils se transforment en gamètes. Leur fécondation engendre un œuf (ookinète)

qui se différencie en sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique. Lorsque le moustique ira piquer une personne pour prendre un repas de sang, les sporozoïtes seront introduits *via* la salive. Un nouveau cycle peut alors commencer (Mouchet, 2004).

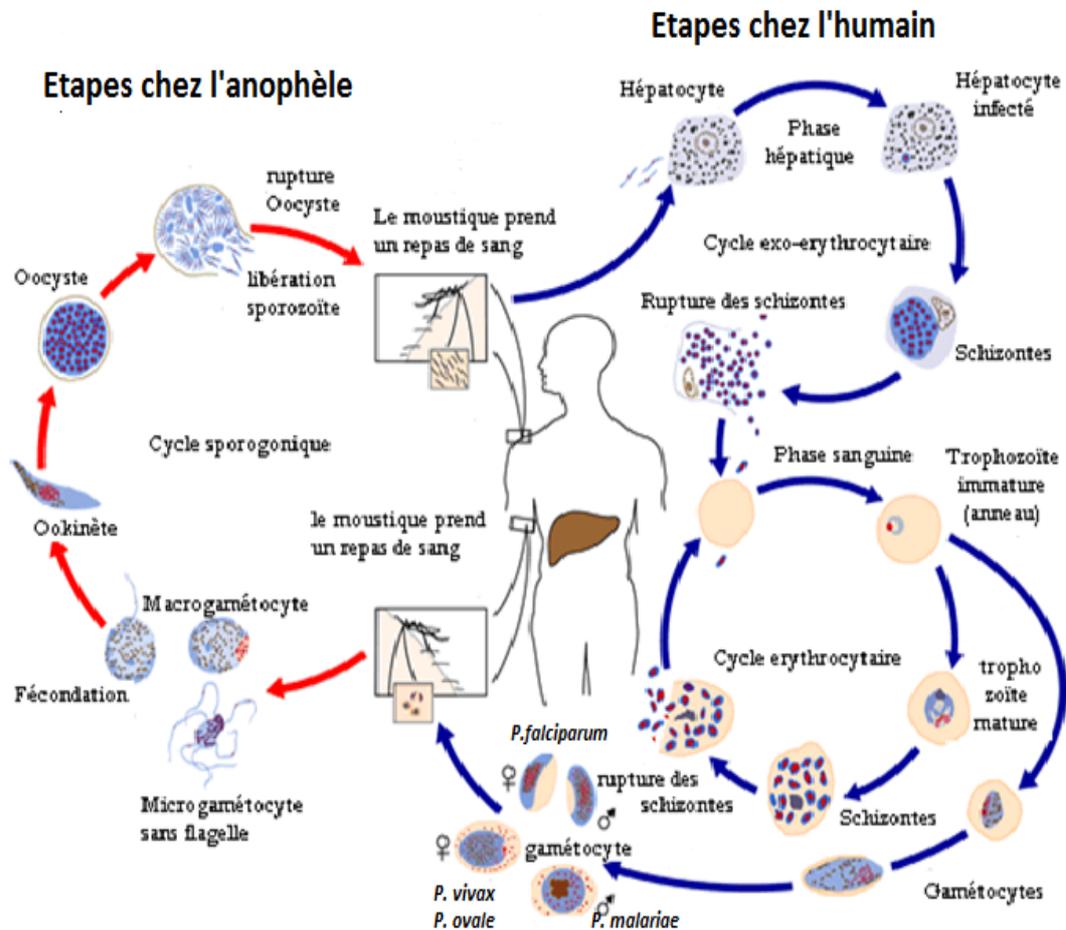


Figure 2 : Cycle biologique de *Plasmodium* (Source: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>, 02/07/2015)

## ii-2- L'agent vecteur et la transmission

Les vecteurs du *Plasmodium* sont des insectes du genre *Anopheles*. Les mâles ne se nourrissent pas de sang. Ces insectes diptères appartiennent à la famille des *Culicidae* et à la sous famille des *Anophelinae*. Il existe environ 484 espèces d'anophèles, mais une soixantaine seulement est vectrice du paludisme. Il y a en Afrique sub-saharienne environ 150 espèces d'anophèles dont une trentaine est vectrice de *Plasmodium*. Parmi ces espèces, on retrouve *Anopheles gambiae* (Figure 3) et *Anopheles funestus* (Afrique, au Sud du Sahara, Madagascar). La survie de ces moustiques nécessite de l'humidité et une température ambiante supérieure à

16°C. C'est pourquoi on ne retrouve généralement pas de paludisme au-dessus de 1500 m d'altitude en Afrique et 2500 m en Asie ou en Amérique. Les larves d'anophèles se multiplient dans les eaux dormantes, qui en constituent un réservoir (Salery, 2007).



**Figure 3 : Le vecteur du paludisme : *Anopheles gambiae* lors d'un repas sanguin.** Source : [entomology.ucdavis.edu/faculty/lanzaro/index.htm](http://entomology.ucdavis.edu/faculty/lanzaro/index.htm), 27/01/2010.

La piqûre indolore est nocturne, le plus souvent à la tombée de la nuit.

L'Homme représente l'unique réservoir de la maladie. La transmission se fait à partir d'un sujet malade, par l'intermédiaire de l'anophèle (Gilles et Warrel, 1993). Il existe également une contamination inter-humaine directe qui s'effectue dans le cadre de la transmission transplacentaire. De même, une contamination lors d'une greffe d'organe reste possible (Fischer *et al.*, 1999).

### ***iii- Manifestations cliniques du paludisme chez l'Homme***

Les manifestations cliniques du paludisme sont liées à l'espèce plasmodiale en cause mais aussi à l'immunité de l'hôte, à la parasitémie et à divers phénomènes peu ou mal connus.

Ils se caractérisent par :

#### **➤ L'accès palustre simple**

Il est commun à toutes les espèces plasmodiales, avec cependant quelques différences liées au parasite. Ces accès comprennent une primo-invasion et des accès intermittentes (Malvy *et al.*, 2000). La primo-invasion est cliniquement caractérisée par la fièvre supérieure à 37°C, un malaise général des céphalées, myalgies, anorexie, des douleurs abdominales (Aubry, 2015;

**Malvy et al., 2000**). Les accès intermittents ou accès palustres à fièvre périodique sont caractérisés par des frissons, la montée en température, la transpiration, cytopénie. Ces signes sont souvent précédés de céphalées et de nausées (**Malvy et al., 2000; Aubry, 2015**).

➤ **Le paludisme viscéral évolutif**

La symptomatologie du paludisme viscéral associe pâleur, asthénie, anorexie et œdèmes des membres inférieurs (**Malvy et al., 2000**).

➤ **La fièvre bilieuse hémoglobinurique**

Elle se traduit par une fièvre élevée, un état de choc avec prostration, qui se caractérise par une élévation importante de la température (40°C), des convulsions et parfois le coma. On note une anémie sévère, une insuffisance rénale et une hypoglycémie surtout chez les enfants et les femmes enceintes (**OMS, 2006**).

➤ **Le paludisme cérébral**

Le paludisme cérébral est caractérisé par les convulsions, les hallucinations et la perte de la mémoire (**OMS, 2006**).

➤ **Le paludisme chez la femme enceinte**

Les femmes enceintes représentent le principal groupe d'adultes à risque car présentant une diminution de l'immunité en cours de grossesse. Chez elles, le paludisme peut entraîner une anémie, un œdème pulmonaire, des contractions prématurées ou des avortements spontanés, ce qui accroît le risque de décès maternel, de fausse couche et de décès néonatal (**OMS, 2006**).

#### ***iv- Diagnostic du paludisme***

Le diagnostic du paludisme repose sur plusieurs critères tels que l'examen clinique, la mise en évidence du parasite dans le sang, l'analyse moléculaire (**Kortepeter et Brown, 1998**).

➤ **Examen clinique**

Il consiste à utiliser un ensemble donné de critères cliniques pour le diagnostic. Ces critères reposent sur l'identification des symptômes liés au paludisme (**Marsh, 1996; Redd, 1996; Olaleye, 1998**). Ce diagnostic est cependant peu fiable car beaucoup d'autres pathologies

présentent les mêmes symptômes.

➤ **Mise en évidence du parasite dans le sang**

La mise en évidence des plasmodies dans le sang peut être faite par examen microscopique. Cette pratique implique les techniques suivantes (**Wéry, 1999**) :

- **Le frottis sanguin**

C'est la technique la plus couramment utilisée, car elle est à la fois simple et rapide. Le frottis doit être coloré au May Grunwald Giemsa, Giemsa rapide ou Giemsa ral. Il est ensuite observé au microscope optique à l'objectif x100 à immersion. Il est possible de faire la diagnose d'espèce en fonction de la taille du parasite, sa forme ou la présence éventuelle de granulations.

La sensibilité de cette technique est de 200 parasites par  $\mu\text{l}$  de sang et l'on compte le nombre de globules rouges parasités pour 1000. Les résultats sont rendus en pourcentage d'hématies parasitées. Au-dessus de 5%, le paludisme est grave (**Berry, 2006**). Cependant, cette technique pose un réel problème de diagnostic différentiel entre les espèces plasmodiales (**Aubry, 2015**).

- **La goutte épaisse**

C'est la technique de référence de l'OMS. Une goutte de sang est déposée sur une lame puis étalée sur  $1\text{ cm}^2$  et séchée. Une coloration au GIEMSA permet la déglobulisation des hématies. Les parasites exo-érythrocytaires sont observés, ainsi que les modifications morphologiques par rapport à un frottis mince.

Le seuil de détection de cette méthode est de 10 à 20 parasites par  $\mu\text{l}$  de sang, 10 fois plus élevé que celui du frottis mince. Elle est par ailleurs semi-quantitative, c'est-à-dire que la parasitémie est obtenue avec le nombre de globules rouges parasités en fonction des leucocytes dans 1 ml de sang (**Berry, 2006**). L'inconvénient majeur de la goutte épaisse est la destruction des érythrocytes, ce qui rend le diagnostic de l'espèce difficile (**Amos, 2005**).

- **La centrifugation en tube capillaire**

La centrifugation en tube capillaire, ou «Quantitative Buffy Coat (QBC)», est une méthode d'immunofluorescence directe. Cette technique se base sur l'affinité de l'acridine orange pour les acides nucléiques, la densité spécifique des différentes cellules sanguines et sur les différents stades évolutifs de *Plasmodium*. Les noyaux et les éléments parasitaires du sang deviennent fluorescents après excitation aux ultra-violets. C'est un bon test de dépistage, mais il ne permet ni le calcul de la parasitémie, ni la diagnose de l'espèce. De plus, il nécessite un équipement coûteux (Berry, 2006).

➤ **Détection d'antigènes parasitaires**

- **Parasight® -F et Malaquick®**

Les tests Parasight®-F et Malaquick® sont fondés sur la capture d'une protéine plasmatique spécifique à *P. falciparum*: HRP-2 (Wéry, 1999).

Au cours du développement schizogonique, la protéine hydrosoluble riche en histidine HRP-2 est la seule parmi les produits cataboliques excrétés par *P. falciparum* à être excrétée à travers la paroi de l'érythrocyte. Cette protéine est donc un témoin privilégié de la présence des parasites dans le sang (Howard *et al.*, 1986). Un inconvénient de ce test est la persistance de l'antigène dans le sang après un traitement (Humar *et al.*, 1997).

- **Test Optimal® (Lactate déshydrogénase)**

Il est basé sur l'immunocapture des déshydrogénases lactiques commune à toutes les espèces plasmodiales (Wéry, 1999; Trudel, 2005). Le principe du dosage de cet enzyme parasite spécifique a été repris pour l'appliquer au diagnostic des parasitémies par Makler et Hinrichs (Maker et Hinrichs, 1993). Le dosage peut être pratiqué et lu comme un test ELISA, dans une plaque de microtitration (Jelinek *et al.*, 1996). Ces tests de diagnostic basés sur la détection d'antigènes parasitaires sont rapides et peuvent avoir de nombreux avantages, notamment la rapidité et la facilité d'obtention des résultats. Ils présentent également des inconvénients, à savoir l'incapacité d'identifier les infections mixtes (Moody, 2002; OMS, 2006).

- **La réaction de polymérisation en chaîne ou technique d'amplification génique**

Elle repère dans un prélèvement, à l'aide d'amorces synthétiques, une séquence nucléotidique sélectionnée et la multiplie au moyen de cycle de polymérisation. C'est une technique très coûteuse. Elle est extrêmement sensible et très utile pour dépister les infestations mixtes, en particulier lorsque les densités parasitaires sont faibles (**Lagnika, 2005**).

- **Détection du matériel génomique**

Le but est de reconnaître des fragments du génome du parasite dans un prélèvement de sang, à l'aide des sondes radioactives ou colorées (**Wéry, 1999**). Elle consiste à transférer, puis immobiliser l'acide nucléique sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon. La révélation se fait par autoradiographie et la présence des hybrides est déterminée par des spots noirs sur le négatif (**Sambrook et al., 1989**). Sa sensibilité a été estimée à 67%, avec une spécificité de 100% (**Holmbery et al., 1987**).

Un diagnostic précoce du paludisme suivie d'un traitement par prise des antipaludiques recommandés permet une bonne prise en charge de cette pathologie.

### ***v- Antipaludiques et cibles thérapeutiques***

Le *Plasmodium* dispose pour son développement intra-érythrocytaire d'un métabolisme et de moyens de défense spécifiques qui constituent autant de cibles aux antipaludiques. On distingue ainsi (**Touze et al., 2002; Rosenthal, 2003; Genton, 2007**) :

- La vacuole nutritive du parasite qui est le siège de la digestion de l'hémoglobine, de la cristallisation de l'hème, et de la défense contre le stress oxydatif.
- Le cytoplasme qui comporte deux organites essentiels, le système mitochondrial où se déroulent le transfert d'électrons et les processus enzymatiques indispensables à la glycolyse et à la production d'énergie et l'apicoplaste qui est le siège de la néo-synthèse des acides gras essentiels à la construction des membranes parasitaires.
- La membrane constituée de phospholipides, de canaux calciques et parasitophores. Elle est le siège d'un trafic nutritionnel et dispose de protéines kinases intervenant dans la transduction du signal.

C'est sur cette base de la connaissance du métabolisme parasitaire et des interactions avec le système hôte qu'un certain nombre de cibles thérapeutiques ont été validées (Tableau I), et constituent de nos jours le socle de la recherche de nouvelles thérapies.

**Tableau I : Les antipaludiques et quelques cibles thérapeutiques identifiées.**

Classe de médicaments	Membres	Localisation de la cible	Molécules cibles
<b>Antifolates</b>	PYR, PG, SDX, DAP	Cytosol	DHFR, DHPS, LDH, TS
<b>Quinolines</b>	CQ, AQ, QUIN, MEF, HAL, LUM, PRIM	Vacuole digestive	Hémozoïne, Protéases cystéiniques (Falcipaine I, II), Protéases aspartiques (Plasmepsines I, II, III, IV)
<b>Artémisinines</b>	Dihydroartémisinines et dérivés	Vacuole digestive Et Cytosol	PfATP6, Hémozoïne, Protéases cystéiniques (Falcipaine I, II), Protéases aspartiques (Plasmepsines I, II, III et IV)
<b>Naphtoquinone</b>	ATQ	Mitochondrie	Cytochrome bc
<b>Antibiotiques</b>			Apicoplaste,
<b>Risedronate</b>	DOX, TET	Apicoplaste	Ribosome, Farnésyl transférase, FabH, FabI

*PYR=Pyriméthamin; PG=Proguanil; SDX=Sulphadoxine; DAP=Dapsone; DHFR=Dihydrofolate réductase; DHPS=Dihydroptéroate synthase; LDH=Lactase déshydrogénase; TS=Thymidylate synthase; CQ=Chloroquine; AQ=Amodiaquine; QUIN=Quinine; MEF=Méfloquine; HAL=Halofantrine; LUM=Luméfántrine; PRIM=Primaquine; PfATP6=P. falciparum ATPase6; ATQ=Atovaquone; DOX=Doxycycline; TE =Tétracycline. (Source : Rosenthal, 2003; Genton, 2007).*

## ***vi- Les stratégies de contrôle du paludisme***

Le paludisme demeure un problème crucial de santé publique dans les zones endémiques. Des programmes de contrôle ou d'éradication ont été mis sur pied dans plusieurs régions du monde avec des résultats variés.

### ***vi-1- Chimio-thérapie***

Le traitement du paludisme dépend de plusieurs facteurs, notamment de l'espèce du parasite en cause, de la gravité de l'infection, de l'âge de la personne atteinte et du profil de résistance aux médicaments antipaludéens dans la région où la maladie est contractée (OMS, 2006). La chimiothérapie est la stratégie la plus aboutie pour lutter contre le paludisme, et cette dernière s'est grandement inspirée de trois produits naturels (Wells, 2011): la quinine, le lapachol et l'artémisinine. Les principaux antipaludiques (Annexe 1) peuvent être classés selon leur mode d'action (Touze *et al.*, 2002; Daily, 2006; OMS, 2006) :

#### **a- Les quinoléines**

La première molécule antimalarique employée est la quinine, un alcaloïde extrait des écorces de *Cinchona calisaya*, (Wells et Gutteridge, 2012). Elle cause la mort du parasite en bloquant le mécanisme de détoxification (Weissbuch et Leiserowitz, 2008) de l'hème (Fe<sup>2+</sup>-protoporphyrine IX) en hémozoïne (Fe<sup>3+</sup>-protoporphyrine IX), toxique pour le parasite. Le fait que le mécanisme d'action de la quinine et de ses dérivés ne dépende pas d'une cible génétiquement codée, explique la raison pour laquelle les résistances ont mis du temps avant d'apparaître. De plus il faut noter qu'à l'heure actuelle, seules les amino-8-quinoléines, telles que la primaquine sont efficaces sur les phases hépatiques et sur les gamétocytes.

#### **b- Les naphthoquinones**

Le lapachol, est un dérivé de la naphthoquinone, naturellement présent dans l'arbre lapacho, utilisé pour traiter le paludisme en Amérique du sud (Carvalho *et al.*, 1988). Les chercheurs se sont inspirés du motif hydroxynaphthoquinone pour synthétiser des dérivés plus actifs pouvant être utilisés *per os*, et surtout possédant une meilleure stabilité métabolique. Cela les a conduit à concevoir l'atovaquone (Hudson, 1993) un des principes actifs du Malarone<sup>®</sup> (association atovaquone-proguanil). Cette famille chimique de composés, analogues de l'ubiquinone, agit en inhibant le transport des électrons au niveau du cytochrome mitochondrial bc1 (complexe III). L'utilisation en monothérapie de l'atovaquone engendre très rapidement des phénomènes de résistance.

### c- L'artémisinine et ses dérivés

L'artémisinine (*Qing hao su*), est une lactone sesquiterpénique découverte en 1972 par des scientifiques chinois. Ce composé, isolé des feuilles de l'armoise annuelle (*Artemisia annua*), possède un groupement endopéroxyde essentiel à son activité biologique. Les pharmacomodulations opérées sur l'artémisinine ont conduit à des analogues plus actifs tels que la dihydroartémisinine et l'artemether. Les dérivés de l'artémisinine ont la particularité d'agir sur les souches résistantes du *P. falciparum*. Contrairement aux autres antimalariques, ils sont les seuls à être efficaces sur toutes les formes parasitaires du cycle intraérythrocytaire, empêchant ainsi les transmissions de l'homme au moustique (**Klayman, 1985**).

Le mécanisme d'action de l'artémisinine reste controversé. En effet, certains (**Sullivan, 1996**) pensent que le groupement endopéroxyde serait capable d'alkyler les protéines riches en histidine, bloquant ainsi la production d'hémozoïne, tandis que d'autres (**Robert et al., 2005**) penchent plutôt pour un mécanisme d'alkylation de l'hème à l'origine de radicaux libres hautement réactifs (**Robert et al., 2002**).

### d- Les combinaisons thérapeutiques antipaludiques

Face à une résistance plasmodiale en progression constante, le traitement antipaludique doit comme dans la plupart des maladies infectieuses recourir à l'association de plusieurs molécules ayant des cibles cellulaires différentes et une synergie d'action. C'est dans cet esprit que des associations d'antipaludiques ont pu être mises en œuvre pour développer de nouvelles thérapies comprenant des combinaisons (**White, 1999; OMS, 2001; Touze et al., 2002**).

Dans cette optique, les associations médicamenteuses actuellement recommandées par l'OMS sont celles à base d'Artémisinine (ACT), ceci à cause de leur potentiel à pouvoir réduire de façon sensible et rapide de la biomasse parasitaire, les symptômes cliniques, et surtout de leur efficacité contre les formes multi-résistantes de *P. falciparum* (**OMS, 2001**).

Comme exemples de combinaisons médicamenteuses à base d'Artémisinine, on peut citer les associations Artémether-Luméfantine (Coartem), Artésunate-Amodiaquine (Artemiam), Artésunate-Méfloquine (Artequin), et Artésunate-Sulfaméthoxypyrazine-Pyriméthamine (Co-artinate) (**OMS, 2001; Beniddir, 2012**).

Cependant, les travaux de **Dondorp *et al.* (2009)** menés au nord du Cambodge ont révélé une diminution de l'efficacité des ATCs vis-à-vis de *P. falciparum*. Ceci indique qu'à terme, ces combinaisons sur lesquelles l'espoir de millions de patients repose pourraient subir le destin de la chloroquine. Cette alerte, souligne par conséquent l'urgente nécessité de développer de nouvelles thérapies, avec un mode d'action et une spécificité différents.

#### **e- Les antifoliques**

Il est clair que les antimalariques n'ont pas tous une origine naturelle. En effet, certains d'entre eux proviennent de ce qu'on appelle la conception rationnelle de molécules bioactives, issue de l'étude des voies métaboliques du *Plasmodium*. A titre d'exemple, le métabolisme de l'acide folique est connu pour être particulier chez les *Apicomplexa*, car ce dernier est synthétisé à partir de l'acide *para*-aminobenzoïque et de la ptérine. La dihydroptéroate synthase, spécifique de ces parasites, permet la synthèse d'ADN, à partir du cycle de l'acide folique. De ce fait, le sulfadoxine, et la dihydrofolate réductase, comme la pyriméthamine, sont de puissants antimalariques, particulièrement lorsqu'ils sont administrés en association (Fansidar®) (**Beniddir, 2012**).

#### **f- Les antibiotiques**

Les antibiotiques inhibant les étapes précoces de la synthèse des protéines procaryotiques, tels que la Doxycycline et la Clindamycine, ont trouvé une application non négligeable en chimiothérapie antipaludique. Cependant, leur utilisation reste limitée en Afrique, du fait qu'ils soient contre-indiqués chez l'enfant de moins de 8 ans (**Ridley, 2002**).

### ***vi-2-Lutte anti-vectorielle***

La prévention est l'un des piliers de la stratégie mondiale contre le paludisme. Le principal objectif de la lutte anti-vectorielle consiste à réduire d'une part le nombre et la fréquence d'infections et d'autre part les épisodes cliniques, en luttant contre le moustique vecteur par réduction et/ou interruption de la transmission. L'apparition de souches d'anophèles résistantes au DDT, en 1969, a conduit à l'abandon de l'utilisation de ce dernier. Dès lors, des mesures multi-échelles adaptées aux conditions locales ont été privilégiées. Les principales interventions opérationnelles consistent à pulvériser les insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations ainsi qu'à l'utilisation de moustiquaires à imprégnation durable et la distribution des crèmes répulsives. Ces interventions essentielles peuvent être complétées

localement par d'autres méthodes (lutte larvaire ou aménagement de l'environnement, par exemple) dans le contexte de la gestion intégrée des vecteurs **(OMS, 2005; Benidir, 2012)**.

### ***vi-3-Chimio-prophylaxie***

Il s'agit d'un traitement préventif qui a pour but d'empêcher le développement de la maladie en cas d'infection. La prophylaxie n'empêche pas l'infection en cas de piqûre par un moustique porteur. Ce traitement préventif est surtout prescrit lors des voyages dans les régions où le paludisme est endémique **(OMS, 2005)**. Cependant, l'expansion de la résistance des agents vecteurs aux insecticides d'une part, et des agents pathogènes aux antipaludiques de synthèse d'autre part rend cette forme de contrôle difficile, d'où l'urgence d'un vaccin. A ce propos, depuis 1992, un vaccin antimérozoite prometteur appelé RTS, S/AS02A est en développement chez GlaxoSmithKline Biologicals. En effet, une étude récente montre que des injections expérimentales à de jeunes enfants divisent par deux le risque de développer la maladie, il s'agit d'une réduction significativement inférieure à celui obtenu avec d'autres vaccins, mais une amélioration importante pour certains experts, en comparaison avec la situation actuelle **(Hill, 2012)**.

En plus du paludisme, des maladies tropicales négligées sont parties des fléaux de santé publique dans les régions tropicales et subtropicales. Parmi ces pathologies dites tropicales négligées, figurent, la schistosomiase, l'onchocercose, la filariose, la lèpre, la maladie de Chagas, la trypanosomiase africaine, la tuberculose, la dengue et la leishmaniose **(OMS, 2012)**. Cette dernière est une maladie causée par un protozoaire et constitue également tout comme le paludisme un problème majeur de santé publique.

## I-2- Généralités sur la leishmaniose

### *i- Epidémiologie*

#### *i-1- Contexte actuel*

Les leishmanioses sont des affections causées par différentes espèces de protozoaires flagellés (Kinetoplastidae) du genre *Leishmania*. Elles sont viscérales (LV), cutanées localisées (LCL), cutanées diffuses (LCD), cutanéomuqueuses (LCM). La transmission en est assurée par de petits diptères hématophages, les phlébotomes (**Burton et al., 2012**).

Actuellement, 20 espèces du genre *Leishmania* sont responsables de cette maladie et sont distribuées le long des régions tropicales et subtropicales sur 88 pays des cinq continents (**Burton et al., 2012**).

Selon les données statistiques de l'OMS, dans les régions endémiques 350 millions d'individus sont en risque d'infection, 12 millions de personnes sont atteintes et l'on recense entre 1,5 à 2 millions de nouveaux cas par an.

Les formes cutanées de cette maladie touchent environ 1 à 1,5 millions de personnes chaque année. Elles sont les formes les plus répandues et représentent 50 à 70% de tous les nouveaux cas (**Burton et al., 2012, OMS, 2014b**).

*Leishmania donovani* est l'agent causal de la leishmaniose viscérale, aussi connu comme la fièvre dumdum ou kala-azar. C'est la forme la plus grave et souvent mortelle de la leishmaniose. Par an, elle touche 0,5 millions d'individus. Si elle n'est pas traitée, la leishmaniose viscérale a un taux de près de 100 % de mortalité. Chez l'hôte mammifère, les cellules infectées appelées amastigotes se trouvent de nombreux sites (par exemple au niveau de la rate, du foie, de la moelle osseuse, des ganglions lymphatiques et la muqueuse intestinale) (**Desjeux, 2001; Vannier - Santos et al., 2002; OMS, 2002; Burton et al., 2012; OMS, 2014b**).

Au Cameroun, la leishmaniose viscérale et la leishmaniose cutanée ont été signalées (**Donji et al., 2001**).

Cependant, peu d'études ont porté sur la leishmaniose, et la maladie est encore très peu connue, même par le personnel médical et le diagnostic final est établi que tardivement et parfois les patients meurent sans traitement spécifique.

Entre Octobre 1987 et Janvier 1988, une étude menée à Kousséri a révélé que sur 120 personnes qui ont été échantillonnées, 46 d'entre eux présentaient des symptômes de la leishmaniose et 9 ont été confirmés positifs à la leishmaniose viscérale sur le diagnostic parasitologique et sérologique (**Kaptue et al., 1992**).

Dans différentes régions, l'augmentation des cas de leishmaniose a pris une ampleur importante, comme par exemple pour les cas de leishmaniose cutanée (LC) au Brésil où 21800 individus étaient atteints en 1998, ce chiffre a augmenté en 2002 jusqu'à 40000. La même pathologie à Kaboul en Afghanistan a touché 14200 personnes en 1994 et en 2002, on a recensé 65000 cas. De même à Ouagadougou au Burkina Faso en 1995, 28 cas ont été déclarés et en 2000 le chiffre a augmenté pour atteindre 2375. Pour la leishmaniose viscérale (LV) au Nord du Brésil en 1998 il y a eu 1840 cas et en 2002, 6 000 (**Desjeux, 2004**).

La leishmaniose tend à s'étendre avec une augmentation de l'incidence associée à un développement urbain (migration des populations des zones rurales vers les centres urbains), la déforestation, les changements environnementaux, la malnutrition et surtout la migration croissante des peuples, en particulier dans les zones où les leishmanioses sont endémiques (**Salem et Werbovetz, 2006**). Cette maladie, en abaissant les défenses immunitaires, est souvent accompagnée de co-infections (malaria, pneumonie, tuberculose), ce qui augmente le taux de mortalité (**Rocha et al., 2005**).

Récemment l'apparition d'un chevauchement entre les régions d'infection par *Leishmania spp.* (surtout la forme viscérale), et celle d'infection par VIH (**Alvar et al., 1997; Desjeux, 2001**) permet d'observer une augmentation des cas de co-infection dans 35 pays parmi lequel le Cameroun (**Cruz et al., 2006**). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 2 000 cas de co-infections ont été rapportés sur le bassin Méditerranéen avec 90% se retrouvant en Espagne, en Italie, en France et au Portugal (**Cruz et al., 2006; Desjeux, 2001**). Le cas des co-infections avec le VIH sont en nette augmentation dans les pays industrialisés et en voies de développement (**Alvar et al., 1997**).

## ***i-2- Répartition géographique***

Les différents types de leishmanioses sont retrouvés dans les régions tropicales et subtropicales du globe. On distingue deux grandes situations géographiques, l’Ancien monde (Sud de l’Europe, Afrique, Proche-Orient, Moyen-Orient et Asie) et le Nouveau monde (Amériques du Sud et Centrale) (Tableau II).

**Tableau II : Distribution géographique des différentes espèces de *Leishmania*.**

<b>Espèces</b>	<b>Distribution géographique</b>
<b>Leishmaniose cutanée</b>	
<i>L. aethiopica</i>	Ethiopie et Kenya
<i>L. major</i>	Afrique et Asie
<i>L. mexicana</i>	Amérique Centrale et du Sud
<i>L. tropica</i>	Europe, Asie, et Afrique du Sud
<b>Leishmaniose mucocutanée</b>	
<i>L. braziliensis</i>	Amérique Centrale et du Sud
<i>L. peruviana</i>	Amérique du Sud
<b>Leishmaniose viscérale</b>	
<i>L. chagasi</i>	Amérique du Sud
<i>L. donovani</i>	Afrique et Asie
<i>L. infantum</i>	Bassin Méditerranéen

**Sources : Desjeux, 1996, 2004; OMS, 2000a**

Les pays les plus touchés par la leishmaniose viscérale, représentant 90% des cas mondiaux, sont le Bangladesh, le Brésil, l’Inde, le Népal et le Soudan. De même, 90% des cas mondiaux de leishmaniose cutanée sont recensés en Afghanistan, en Algérie, au Brésil, en Iran, au Pérou, en Arabie Saoudite et en Syrie. En ce qui concerne la leishmaniose mucocutanée, 90% des cas se trouvent au Pérou, en Bolivie et au Brésil (Figure 4) (**Desjeux, 1996, 2004; OMS, 2000a**).

Au Cameroun, la leishmaniose cutanée prévaut en grande partie dans la partie Nord du pays, Mokolo étant la ville la plus touchée et dans les zones frontalières avec le Tchad. La leishmaniose viscérale quant à elle est fréquente dans la ville de Koussérie et dans les parties orientales du pays (**Donji et al., 2001; Ngouteu et al., 2012**). La leishmaniose cutanée a été répandue au Cameroun depuis 1930 (**Hervé, 1937**).

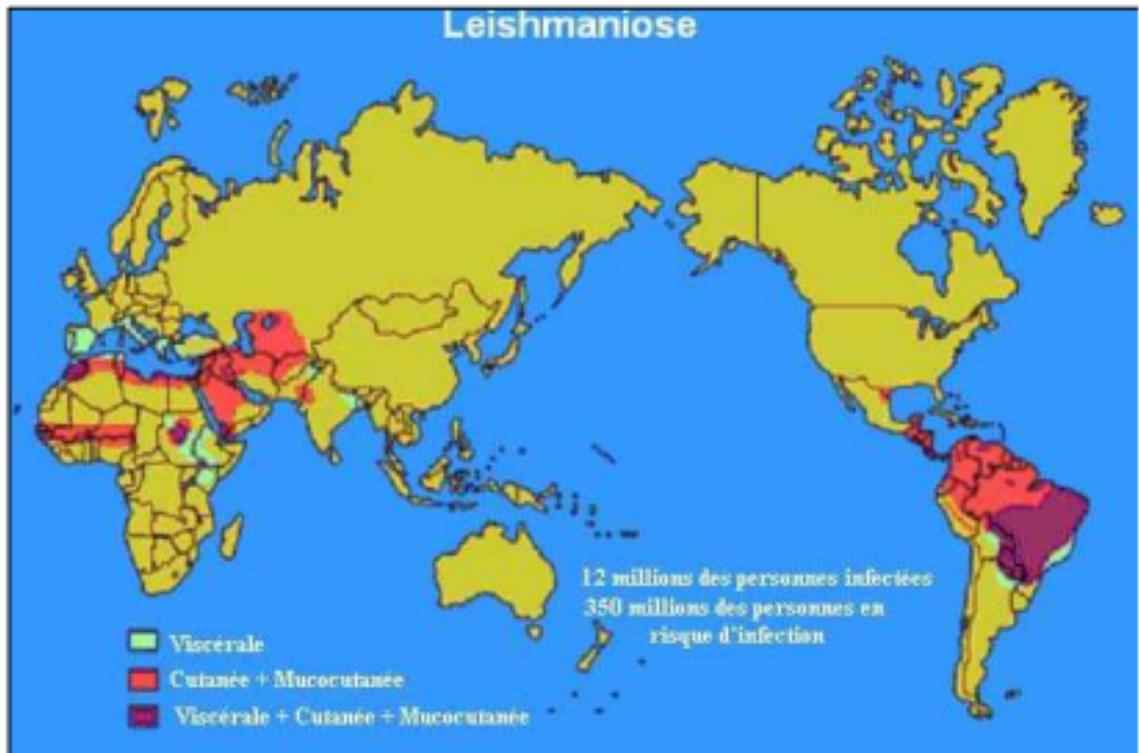


Figure 4 : Répartition mondiale de la leishmaniose (Handman, 2001).

## *ii- L'agent pathogène et l'agent vecteur*

### *ii-1-L'agent pathogène : Leishmania*

#### *ii-1-1- Classification*

Les agents responsables de cette maladie parasitaire appartiennent à la famille des Trypanosomatidae et à l'ordre des Kinetoplastida. Depuis la description du genre *Leishmania* par Ross, en 1903, différentes classifications ont été proposées, dont celle ci-dessous proposée par Levine et coll en 1980 (Botero, 2006; Dedet, 1999; Roberts *et al.*, 2000) (Tableau III).

**Tableau III : Position systématique du genre *Leishmania*.**

---

**Classification du genre *Leishmania***

<b>Règne</b>	Protista
<b>Sous-règne</b>	Protozoa
<b>Embranchement</b>	Sarcomastigophora
<b>Classe</b>	Zoomastigophorea
<b>Ordre</b>	Kinetoplastida
<b>Sous-Ordre</b>	Trypanosomatina
<b>Famille</b>	Trypanosomatidae
<b>Genre</b>	<i>Leishmania</i>
<b>Sous genre</b>	<i>Leishmania (L.)</i> et <i>Viannia (V.)</i>

---

**Sources : Dedet, 1999; Botero, 2006**

Le développement du parasite dans le tube digestif du vecteur, au niveau du pylore est le critère qui a permis de diviser le genre *Leishmania* en deux sous-genres. D'une part, la section Suprapylaria, caractérisée par la multiplication dans l'intestin moyen et antérieur, devient le sous-genre *Leishmania*. D'autre part, la section Peripylaria, caractérisée par la multiplication dans la partie postérieure suivie d'une migration antérieure, devient le sous-genre *Vannia* (Dedet, 1999; Botero, 2006).

Le genre *Leishmania* est composé de plusieurs espèces qui, bien qu'elles soient toutes de morphologie similaire, causent une panoplie de manifestations cliniques allant d'affections cutanées qui se résorbent d'elles-mêmes à des infections viscérales fatales en passant par des exacerbations inflammatoires causant de graves défigurations. On regroupe habituellement les espèces de *Leishmania* en « complexes » selon les similarités biochimiques (Tableau IV).

**Tableau IV : Taxonomie des leishmanies.**

<b>Sous genre <i>Leishmania</i></b>		
		<b>Espèces</b>
Complexe	<i>L. donovani</i>	<i>L. archibaldi, L. donovani, L. infantum, L. chagasi</i>
Complexe	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica, L. killicki</i>
Complexe	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
Complexe	<i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i>
Complexe	<i>L. mexicana</i>	<i>L. Mexicana, L. amazonensis, L. pifanoi, L. garhami, L. venezuelensis</i>
Ancien monde	<i>L. gerbil, L. arabica</i>	
Nouveau monde	<i>L. aristidesi, L. enrietti, L. hertigi, L. deanei</i>	
<b>Sous genre <i>Vianna</i></b>		
Complexe	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis, L. peruviana</i>
Complexe	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis, L. panamensis</i>
Classement non définitif		
		<i>L. lainsoni</i>

**Source : Roberts *et al.*, 2000**

Dans le cadre de notre recherche, nous travaillerons sur *L. major* et *L. donovani*, responsable respectivement des leishmanioses cutanée et viscérale au Cameroun.

### ***ii-1-2- Cycle de reproduction***

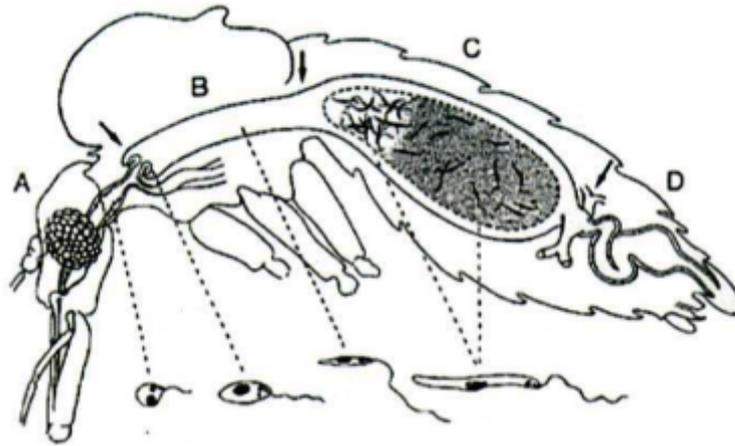
Les leishmanies sont des parasites hétéroxènes et dimorphiques c'est-à-dire possédant deux formes morphologiques différentes au cours de leur cycle de vie : tout d'abord la forme promastigote lorsqu'il se développe chez l'insecte vecteur puis sous forme amastigote qui se développe à l'intérieur des macrophages chez l'hôte mammifère (**Ouellette *et al.*, 2003; Vannier-Santos *et al.*, 2002**).

➤ **Phase extracellulaire : développement chez l'insecte**

Les parasites sous cette forme sont mobiles, extracellulaires et fusiformes de 5 à 20  $\mu\text{m}$  de longueur et de 1 à 4  $\mu\text{m}$  de largeur, prolongés par un flagelle qui peut atteindre jusqu'à 20  $\mu\text{m}$  de longueur et qui émerge de leur pôle antérieur (**Dedet, 1999; Vannier-Santos et al., 2002**). Selon l'espèce, la durée du cycle chez l'insecte varie entre 4 et 18 jours.

Au cours du repas sanguin sur un mammifère infecté, l'insecte vecteur femelle ingère des macrophages contenant des amastigotes qui se différencieront en promastigotes au bout de 24 heures. Ceux-ci se divisent activement sous une forme dite procyclique non infectieuse (24-48 heures après l'infection) puis ils deviennent très fuselés et sont alors connus sous le nom de nectomonades. Vers le troisième jour après l'infection, les nectomonades vont se fixer aux microvillosités de l'intestin médian abdominal, et puis migrent vers l'intestin médian thoracique (4-5 jours).

A ce stade, deux voies de différenciation semblent empruntées. Certains nectomonades deviennent haptomonades ovalaires lesquels donnent origine aux paramastigotes dont le rôle exact n'est pas encore connu. D'autres nectomonades se transforment en promastigotes métacycliques, très infectieux, de forme allongée, flagellées et très mobiles, qui ne sont plus capables de se diviser. Ces derniers migrant vers l'œsophage, le pharynx et le proboscis. Ils vont être injectés par l'insecte lors de son prochain repas sanguin (**Dedet, 1999; Ouellette et al., 2003; Sacks et Kamhawi, 2001; Sacks, 1989**) (Figure 5).



**Figure 5 : Processus de différenciation au niveau du tube digestif chez le vecteur de la leishmaniose (Schlein, 1993)**

*Processus par lequel les formes non infectieuses (procyclique) du stade promastigote de Leishmania se différencient en formes hautement infectieuses (métacycliques). Cette différenciation dure entre cinq et sept jours. Les formes métacycliques migrent vers le pharynx de l'insecte. Tête et pharynx (A), intestin médian thoracique (B), intestin médian abdominal (C), intestin postérieur (D). Le sang (zone grise en C) est entouré par la membrane péritrophique.*

#### ➤ **Phase intracellulaire : développement chez l'hôte mammifère**

L'introduction des promastigotes est effectuée par l'insecte vecteur lors son repas sanguin (Figure 6). Dans un premier temps, un signal émis par les promastigotes métacycliques permet aux macrophages dermiques de phagocyter les parasites. Le compartiment abritant ces derniers va subir des modifications jusqu'à aboutir à la formation d'organites connus comme vacuoles parasitophores (VP) ou phagolysosome. A ce stade, les promastigotes vont se différencier en amastigotes adaptés à la vie intracellulaire, l'achèvement de ce processus requiert entre 3 à 7 jours. Le changement de température de 25°C à 37°C (Garlapati *et al.*, 1999) et le changement de pH, (d'un pH physiologique à un pH aux environs de 5,0) induisent la différenciation en amastigotes. Les amastigotes sont des parasites intracellulaires de forme ronde ou ovale d'environ 4 µm de long et 2 µm de large, possédant un flagelle très court (Dedet, 1999). Les amastigotes après différenciation se divisent par fission binaire, et l'infection chez les hôtes mammifères se répand par relargage et internalisation de macrophage à macrophage (Botero, 2006; Ouellette *et al.*, 2003).

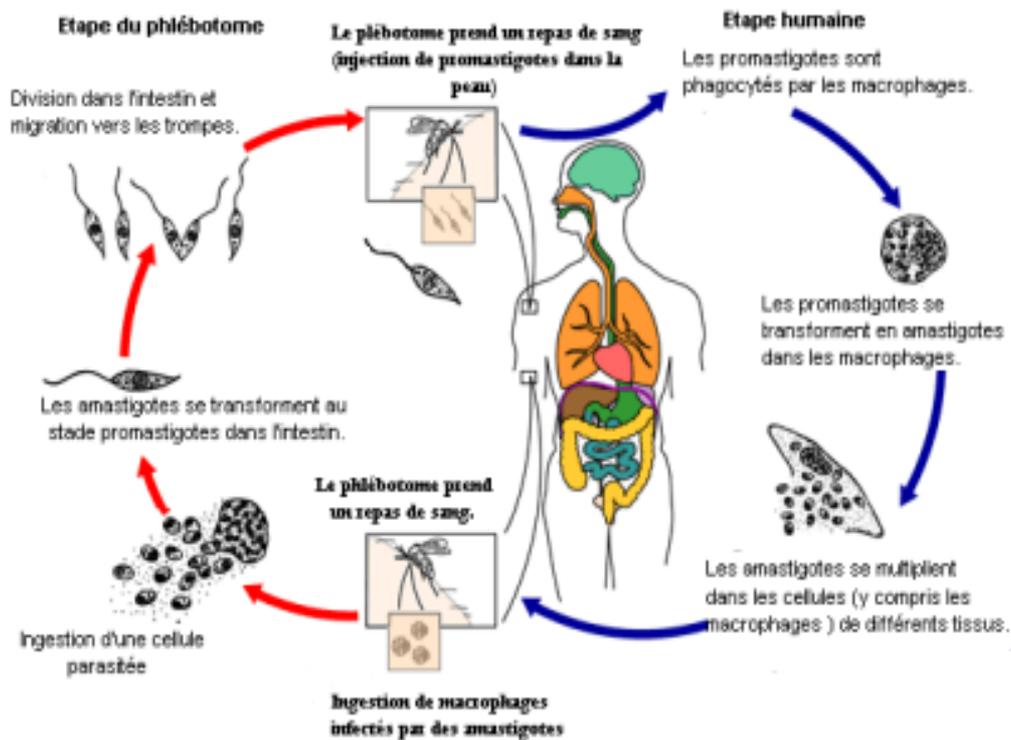


Figure 6 : Cycle biologique de *Leishmania* (Centre of Disease Control and Pfevention, 2009).

Le cycle est complété une fois qu'un phlébotome, en se nourrissant du sang d'un vertébré infecté, ingère des amastigotes qui vont se différencier en promastigotes, puis se multiplier à l'intérieur de l'intestin de l'insecte pour finalement migrer vers les trompes.

### *ii-2- L'agent vecteur et la transmission*

Les vecteurs de transmission de la leishmaniose sont des insectes qui appartiennent à l'ordre Diptera, à la famille des Psychodidae et à la sous-famille des Phlebotominae, comportant environ 700 espèces. Seuls les genres *Lutzomyia* et *Phlebotomus* se trouvent impliqués dans l'épidémiologie des leishmanioses. Le premier se subdivise en 16 sous-genres et le second en 8 (Dedet, 1999). Les insectes du genre *Phlebotomus* se situent dans les régions sub tropicales, arides et semi-arides de l'Asie, de l'Afrique et du sud de l'Europe. Ceux du

genre *Lutzomyia* sont présents dans les régions tropicales et sub tropicales de l'Amérique **(Killick-Kendrick, 1990)**.

Ces insectes sont petits, n'excèdent pas 3 mm de long, possèdent un corps grêle et allongé. Leurs couleurs s'étendent du blanc au noir. Seules les femelles (Figure 7) sont hématophages (nécessaire à la ponte des œufs) et responsables de la transmission de la leishmaniose **(Pinto *et al.*, 2001)**. Leur durée de vie est fonction de la température et de l'humidité. Elles vivent en moyenne entre deux semaines et deux mois **(Dedet, 1999)**.



**Figure 7 : Le vecteur de la leishmaniose (OMS, 2009b).**

La propagation des cas de leishmaniose est basée sur deux formes éco-épidémiologiques. Dans la première forme ou forme zoonotique, les mammifères sauvages ou domestiques (surtout le chien) interviennent en tant que réservoirs naturels, où l'être humain joue le rôle d'hôte facultatif lorsqu'il s'expose accidentellement au cycle de transmission.

La deuxième forme ou forme anthroponotique tel que illustré par la figure 8 ci-contre est caractérisée par la présence d'un seul réservoir qui est aussi source d'infection: l'homme **(Dedet, 1999; Desjeux, 2001, 2004; Ouellette *et al.*, 2003)**.

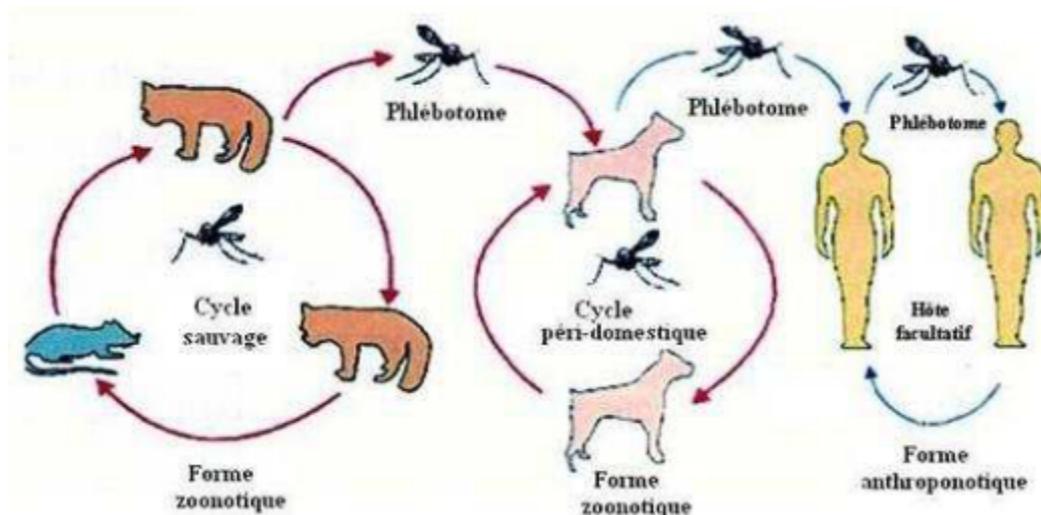


Figure 8 : Cycle épidémiologique de la leishmaniose (Unanleon)

### iii- Manifestations cliniques de la leishmaniose chez l'homme

Le parasite du genre *Leishmania* est, selon les espèces, responsable de différentes pathologies et représente une cause importante de morbidité et mortalité en médecine humaine et vétérinaire (Ouellette *et al.*, 2003). Les manifestations symptomatiques peuvent être classées en quatre groupes (Desjeux, 1996, 2004).

#### ➤ La leishmaniose cutanée (LC)

Cette manifestation clinique était autrefois appelée bouton d'Orient. Elle se caractérise par la formation d'une petite papule prurigineuse rouge sombre qui apparaît au site de piqûre. Puis, elle s'ulcère, s'infiltré en profondeur et se recouvre d'une mince croûte évoluant très lentement sous forme sèche ou forme humide. Le tout se résorbe généralement après quelques mois voire un an, en laissant, malheureusement, de profondes cicatrices non pigmentées. Dans le cas de *L. mexicana*, les lésions guérissent spontanément sauf lors d'une infection au niveau du pavillon de l'oreille qui peut durer plusieurs années (certaines datent de 40 ans) connu comme «ulcéra del chiclero» (Figure 9) (Dedet, 1999; Desjeux, 1996; Roberts *et al.*, 2000).



**Figure 9 : Lésions ulcérationes de la leishmaniose viscérale (Castellon, 2007)**

➤ **La leishmaniose cutanéomuqueuse ou mucocutanée (LCM)**

Connue sous le nom d'espundia, il s'agit d'une zoonose dont les manifestations cliniques, de façon générale, évoluent en deux temps : d'une part, l'apparition d'ulcères cutanés initiaux, similaires à la leishmaniose cutanée, qui finissent par se résorber spontanément entre six mois et un an. D'autre part, une deuxième infection peut s'installer avant la guérison de la première ou apparaître plusieurs années plus tard. Elle provoque des lésions pouvant conduire à une destruction étendue et mutilante des muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge. Ces lésions nécrosées peuvent entraîner des infections bactériennes et le tout peut engendrer une grande difformité due à la perte des lèvres, nez, palais et pharynx (Figure 10). La mort du patient peut également survenir à cause d'infections secondaires ou de problèmes de respiration (Desjeux, 1996; Roberts *et al.*, 2000).



**Figure 10 : Lésions mucocutanées de la leishmaniose (Castellon, 2007)**

➤ **La leishmaniose cutanée diffuse (LCD)**

Elle est caractérisée par la dissémination des lésions nodulaires ou en plaque qui ressemblent fortement à des formes lèproïdes, souvent présentes au niveau de visage ou des membres. Ces lésions ne guérissent pas de façon spontanée et sont plus fréquentes chez des individus ayant un système immunitaire déficient (Figure 11) (Roberts *et al.*, 2000).



**Figure 11 : Leishmaniose cutanée diffuse (Castellon, 2007)**

➤ **La leishmaniose viscérale (LV)**

Egalement appelée kala-azar, un mot indien signifiant fièvre noire. Elle représente la forme la plus grave de la maladie, avec une mortalité d'environ 100% en l'absence de traitement. Les parasites ne restent pas au site de piqûre, ils migrent vers les organes lymphoïdes (le foie, la rate et la moelle osseuse), via les systèmes sanguin et lymphatique. Elle se caractérise par des poussées de fièvre irrégulières, une perte de poids, une hépato-splénomégalie, une lymphoadénopathie et une anémie. La mort survient chez les patients non-traités de 6 mois à quelques années suivant l'infection (Figure 12) (Roberts *et al.*, 2000).



**Figure 12 : Enfant atteint de leishmaniose viscérale (Castellon, 2007)**

#### ***iv- Diagnostic des leishmanioses***

Le diagnostic des leishmanioses repose sur deux méthodes différentes, la première méthode, dite directe et la deuxième, la méthode indirecte.

##### ➤ **Méthodes directes**

- **Microscopie**

Deux cas de figure sont envisageables : le cas des leishmanioses cutanées et mucocutanées et le cas des leishmanioses viscérales. Dans le premier cas, on effectue un frottis provenant des lésions ulcéreuses ; dans le second cas, on a recours à un frottis à partir d'une ponction du foie, de la rate, de la moelle osseuse ou des ganglions lymphatiques (**Guerin *et al.*, 2002**).

- **Culture**

Cette méthode est utilisée pour révéler la présence des parasites et augmenter leur nombre, car l'identification des amastigotes au microscope n'est pas toujours possible. Le prélèvement des échantillons se réalise soit au niveau des lésions cutanées, soit par ponctions des organes lymphoïdes, et peuvent être mis en culture dans des milieux riches tel que le NNN (Novy-McNeal-Nicolle) (**Roberts *et al.*, 2000**).

##### ➤ **Méthodes indirectes**

D'autres méthodes sont utilisées telles que les méthodes sérologiques et moléculaires.

- **Méthodes sérologiques :**

Elles sont basées sur l'identification des anticorps sériques. On utilise principalement trois tests : le test ELISA et le test d'Immunofluorescence (IFAT), qui sont les plus sensibles et spécifiques surtout en ce qui concerne la leishmaniose viscérale (**Guerin *et al.*, 2002**). Le test d'agglutination directe (DAT), quant à lui, est bien adapté aux situations de terrain (**Boelaert *et al.*, 1999a**); malheureusement, l'antigène utilisé n'est pas très stable ce qui affecte la reproductibilité (**Boelaert *et al.*, 1999b**). Une dernière méthode sérologique expérimentale mise au point récemment et utilisée en Inde est l'immuno-chromatographie avec un antigène recombinant (rK39) (**Bern, 2000**). C'est une méthode très sensible et spécifique (**Sundar *et al.*, 1998**).

Toutes les méthodes sérologiques ne sont pas très utiles à la détection de la leishmaniose cutanée à cause du faible taux d'anticorps produits mais conviennent à la leishmaniose viscérale et muco-cutanée (**Desjeux, 2004**).

- **Méthodes moléculaires :**

L'identification d'ADN de parasite par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est basée sur l'amplification de séquences d'ADN ou ARN. Cette méthode est généralement plus sensible que les méthodes sérologiques, pouvant détecter la présence d'un seul parasite (**Salotra et al., 2001**).

### ***v- Les médicaments antileishmanioses et cibles thérapeutiques***

La connaissance du métabolisme parasitaire et des interactions avec le système hôte ont permis l'identification d'un certain nombre de cibles thérapeutiques dont le tableau V ci-dessous ressort quelque unes.

**Tableau V : Les médicaments antileishmanioses et quelques cibles chimio-thérapeutiques identifiées chez *Leishmania* et les médicaments existants.**

<b>Classe de médicaments</b>	<b>Membres</b>	<b>Localisation de la cible</b>	<b>Molécules/processus cibles</b>
<b>Antimoine pentavalents</b>	Glucantime Pentostam	Cytosol	ADN ; inhibition de la synthèse des acides gras et de l'ADN.
	Amphotéricine B	Cytosol	
<b>Diamidine aromatique</b>	Pentamidine	Cytosol	Inhibition de la synthèse de l'ADN parasitaire par blocage de la thymidine synthase et par fixation sur l'ARN de transfert.
<b>Hexadécylphosphocholine</b>	Miltéfosine		Agit sur la biosynthèse de la phosphatidylcholine, les signaux de transduction et l'homéostasie du calcium.
<b>Amino glycosides</b>	Paromomycine	Mitochondrie et Apicoplaste	Inhibition des fonctions de la mitochondrie et des ribosomes.
<b>Imidazoquinoline</b>	Imiquimod		Induction de la production de l'oxyde nitrique.

**Sources : Dedet, 1999; Berman, 2003.**

## *vi- Les stratégies de contrôle des leishmanioses*

### *vi-1- Chimio- thérapie*

Une dizaine de médicaments sont utilisés pour le traitement de la leishmaniose. Les différentes structures sont représentées en annexe 2.

L'antimoine trivalent fût la première molécule utilisée mais elle a été vite abandonnée à cause de sa toxicité. Depuis 1940, les médicaments de première ligne les plus utilisés sont des antimoines pentavalents, le N-méthyl glucamine (Glucantime®) avec une teneur d'antimoine de 8,5% (85 mg/ml) et le stibogluconate de sodium (Pentostam®) dont la teneur en antimoine est de 10% (100 mg/ml) (**Dedet, 1999; OMS, 2002**).

Ces traitements ont plusieurs désavantages, d'une part le patient doit être hospitalisé car l'administration intraveineuse ou intramusculaire est échelonnée entre 20 à 28 jours (**Berman, 2003**). D'autre part, ces médicaments montrent plusieurs effets secondaires qui peuvent être regroupées en deux catégories : des signes de stibio-intolérance et/ou des signes de stibio-intoxication. Les premiers se manifestent dès les premières injections et sont de type anaphylactique comme des douleurs musculaires, des éruptions cutanées, des vomissements, de l'hyperthermie, tachycardie et des hémorragies. Les autres surviennent en fin de cure et se traduisent par des signes généraux, des troubles cardiaques, hépatiques, pancréatiques, rénaux et hématologiques (**Dedet, 1999**). De plus, le problème majeur est la résistance qui commence à émerger chez les parasites. En effet, dans la province du Bihar en Inde, où la leishmaniose viscérale est endémique, 65% des nouveaux cas sont dus à des souches résistantes (**Lira et al., 1999; Sundar, 2001**). Sur le continent américain, certaines souches responsables de la leishmaniose cutanée et mucocutanée montrent également des résistances à ces médicaments (**Grogl et al., 1992**).

Les traitements de deuxième intention sont l'Amphotéricine B et la pentamidine. L'Amphotericine B est un antibiotique, un polyénique, puissant antifongique utilisé dans le traitement des mycoses systémiques. Cette molécule est utilisée surtout dans le cas de la leishmaniose viscérale (**Dedet, 1999**). Malheureusement elle montre des effets toxiques rénaux et hématologiques non négligeables.

Pour diminuer cette toxicité, certaines formulations lipidiques d'Amphotéricine B ont été élaborées, comme par exemple des liposomes, des dispersions colloïdales ou des complexes lipidiques. Les liposomes (AmBisome®) sont les plus efficaces (une dose de 15 mg/kg permet

un taux de guérison de 95% sur des patients atteints de LV, (**Berman, 2003**) et les moins toxiques mais les coûts extrêmement élevés de l'ensemble de ces produits ne permettent pas leur usage dans les pays en voie de développement (**Guerin et al., 2002**).

La pentamidine, est une diamine aromatique synthétisée. L'administration se fait par perfusion lente, et les effets toxiques dépendants de la dose, apparaissent au cours du traitement atteignant le rein, le pancréas ou les lignées sanguines (**Dedet, 1999**).

Récemment, de nouveaux produits ont montré des résultats très intéressants. Tout d'abord la Miltéfosine, un hexadécylphosphocholine (**Croft et Coombs, 2003**). Cette molécule qui est un agent antinéoplasique vient d'être approuvée en Inde. Son grand avantage, est qu'elle est administrée oralement à une dose de 2,5 mg/kg/jours pendant 28 jours avec 98% de succès. De plus elle montre des effets secondaires négligeables (**Berman, 2003**). Après des essais cliniques en Phase IV, le gouvernement indien a décidé de l'utiliser comme traitement de première ligne depuis 2002 pour traiter surtout la leishmaniose viscérale (**Carvalho et Ferreira, 2001; Carvalho et al., 2000; Croft et al., 2005; Ganguly, 2002**). La miltéfosine a été utilisée en Colombie, avec un taux de guérison de 94% (**Berman, 2003**). Cette même molécule a fait l'objet d'une étude en Bolivie avec un taux de guérison de 71% sur des patients atteints de LV (**Soto et al., 2007**).

La Paromomycine, quant à elle, est un antibiotique aminoglycosidique. Elle est administrée par voie parentérale dans des régions où la résistance aux antimoniés est très forte. De plus, des études sur l'efficacité des combinaisons entre la paromomycine et des antimoniés, ont été effectuées en Inde avec 94% de réussite (la dose testée était de 18 mg paromomycine/kg/jour et 20 mg antimoine/kg/jour pendant un période de 21 jours) (**Berman, 2003**). Des formulations conditionnées sous forme de crème ont été testées (15% de Paromomycin et 0,5% de gentamicine) en Colombie sur des patients ayant des lésions cutanées avec un taux de succès de 64% (**Croft et Coombs, 2003**).

## ***vi-2- Chimio-prophylaxie et lutte anti-vectorielle***

Il n'existe pour le moment aucun vaccin ni médicament prophylactique. Les seules mesures prophylactiques individuelles efficaces consistent aujourd'hui en l'utilisation de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes rémanents, les seules qui ne laissent pas passer les phlébotomes (OMS, 2012).

Depuis la plus haute antiquité, les êtres humains se sont appuyés sur la nature pour subvenir à leurs besoins de base. Pour des raisons pratiques d'accessibilité, les plantes ont constitué le socle de toutes les médecines traditionnelles connues. Aujourd'hui, plus de 60% des médicaments commercialisés sont d'origine naturelle. Seulement 10 à 20 % de la flore mondiale ont été étudiés d'un point de vue phytochimique et le potentiel de cette ressource naturelle reste très important (Beniddir, 2012).

## **I-3- La médecine traditionnelle : Une alternative**

La médecine traditionnelle reste le socle des soins de santé dans plusieurs régions du monde, et essentiellement en Afrique. En effet, pour plus de 80% de la population des zones concernées, cette forme de thérapie reste le premier recours, ou tout simplement le recours (OMS, 2000b). Les plantes médicinales qui constituent l'essentiel des potions administrées aux malades ont fait la preuve de leur efficacité. En effet, de multiples substances naturelles qui en ont été extraites sont les principes actifs de plusieurs médicaments.

Dans le cas spécifique du paludisme, deux exemples ont fait date, la quinine extraite des écorces de *Cinchona sp*, et l'artémisinine obtenue d' *Artemisia annua*, qui sont la base de la chloroquine d'une part, et des ACTs d'autre part. Ces exemples confirment que les plantes médicinales demeurent la principale source crédible de substances au pouvoir antipaludique.

De plus, les produits naturels nous offrent la possibilité de découvrir des structures nouvelles et originales qui sont à la fois actives et sélectives, pouvant jouer le rôle de tête de série dans un processus d'optimisation.

Compte tenu du constat qui précède, et de l'urgente nécessité de développer de nouvelles thérapies contre le paludisme, la leishmaniose cutanée et la viscérale nous avons trouvé opportun de contribuer à cette mouvance en entreprenant l'étude des plantes du genre *Annona* (Annonacées) de la flore Camerounaise.

## I-4- Généralités sur les Annonacées

Les Annonacées constituent une grande famille végétale formée de 130 genres et de plus de 2300 espèces. On les retrouve en grande partie dans les régions tropicales et subtropicales (Lebœuf *et al.*, 1982). Elles appartiennent à l'embranchement des Spermaphytes, sous embranchement des Angiospermes, classe des Dicotylédones, l'ordre des Annonales (magnoliales). Les plantes de cette famille sont ligneuses et on les retrouve sous formes variées : arbres, arbustes, arbrisseaux, buissons sarmenteux ou lianes. Les formes biologiques les plus abondantes sont les arbres de taille moyenne (15 à 20m) et les arbustes (7 à 10 m) (Le Thomas, 1969). Leurs écorces, feuilles et fruits dégagent une odeur aromatique caractéristique (Walker *et al.*, 1961). Le fruit est très important dans la séparation des genres et plus rarement dans celle des espèces (Le Thomas, 1969).

### *i- Le genre Annona*

Ce genre regroupe des petits arbres, des arbustes ou des arbrisseaux rhizomateux, glabres ou à indument de poils simples. *Annona* est un genre tropical groupant une centaine d'espèces pour la plupart américaines. On retrouve en Afrique et à Madagascar, seulement 4 espèces avec plusieurs sous-espèces et variétés. Les fruits des *Annona sp.* sont syncarpiques, charnus, ovoïdes ou globuleux à cylindriques. Les graines sont nombreuses et noyées dans la pulpe (LeThomas, 1969; Burkill, 1985).

Les données obtenues par la revue de la littérature, l'étude préliminaire d'activité actiplasmodiale et l'enquête ethnobotanique nous a abouti à la sélectionner trois plantes du genre *Annona* à savoir *Annona muricata*, *Annona reticulata* et *Annona senegalensis*.

#### *i-1- Annona muricata L. (Photographie 1)*

**Synonymes** : *Annona bamplandiana* Kunth, *Annona cedrensis* Barb. Rodr, *Annona macracarpa* Werckle, *Guanabanus muricata* Gomez, *Annona muricata* var. *borinquensis* Morales (Pinto *et al.*, 2005).

**Noms communs** : Corossolier, Corossol épineux, Annone, Soursop (par les anglophones) (Pinto *et al.*, 2005).

**Noms vernaculaires** : Saba Saba (Douala), Ebom beti (Ewondo), Kwopchonkwop (Bamoun), Falo (Bamenda).

### ***i-1-1- Botanique***

*A. muricata* dont la figure 13 présente les caractéristiques botaniques est un petit arbre ou arbuste à fleurs persistantes, ayant 4 à 8 m de hauteur lorsqu'il est complètement mature. Il a une croissance érigée, les tiges sont arrondies, rugueuses et non pubescentes ; avec une couleur brun-sombre. Les feuilles ont des pétioles courtes de 5 à 6 mm, un limbe papyracé, obové-oblong, courtement et obtusément acuminé au sommet, aigu à la base, long de 14 à 16 cm, large de 5 à 7 cm, glabre et luisant à la face supérieure, glabrescent à la face inférieure. Les nervures latérales, au nombre de 9 à 11 paires, sont planes et peu visibles au-dessus, peu saillantes en-dessous. Les fleurs du corossolier sont plus larges que celles des autres espèces du genre *Annona*. Elles ont une longueur de 3,2 à 3,8 cm. Elles sont blanchâtres, solitaires, terminales ou oppositifoliées, à pédicelle épais, long de 1,5 à 2,5 cm (**Pinto et al., 2005**). Les sépales sont largement ovés, long de 3 à 5 mm, aigus au sommet. Les pétales externes sont épais, ovés-arrondis, cordés à la base, acuminés au sommet, long de 2,5 à 3,5 cm, larges de 1,8 à 2,5 cm; les internes sont plus courts, légèrement ongiculés à la base. Les étamines sont linéaires, longues de 6 mm. Les carpelles sont à ovaires velus, longs de 2 mm environ (**Le Thomas, 1969; Keraudren, 1980**).

*A. muricata* produit un fruit de forme ovoïde à ovoïde-oblong, ou en forme de cœur. Il est brun vert quand il est immature et devient légèrement vert clair après maturité. Il est long de 15 à 20 cm et son poids varie de 0,9 à 10 kg. Son péricarpe est recouvert de nombreuses protubérances pointues, charnues, courtes et flexibles non piquantes. La pulpe de fruit est fibreuse, blanche, agréablement parfumée et de goût acide. Les fruits renferment de nombreuses graines (127 à 150 graines) oblongues, aplaties, longues de 1 à 2 cm, pesant 0,33 à 0,5 g, à texture lisse. Elles ont une coloration brun sombre avant maturation du fruit, mais deviennent noir après maturation (**Pinto et al., 2005**).



Photographie 1 : *Annona muricata* L. (Tchokouaha, 2009)

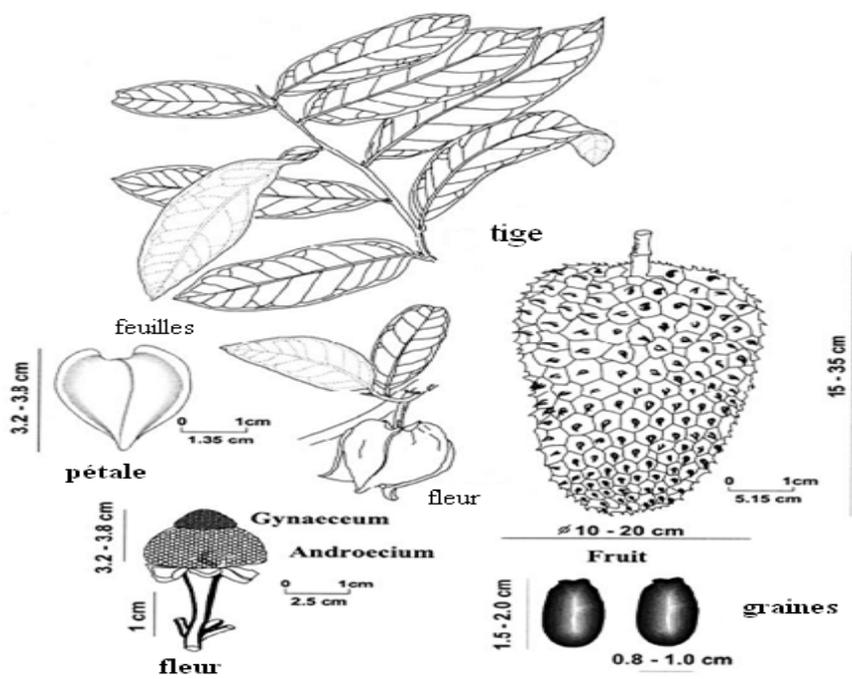


Figure 13 : Caractéristiques botaniques d'*A. muricata* L. (Pinto *et al.*, 2005)

### ***i-1-2- Ecologie***

*A. muricata* est originaire d'Amérique Centrale, des Antilles ou du Nord de l'Amérique du Sud et de l'Ouest des Indes. Actuellement, *A. muricata* est répandue dans toutes les régions tropicales du monde (**Pinto et al., 2005**).

### ***i-1-3- Usages ethnobotaniques***

Tout comme les feuilles de la plante, la pulpe et les graines du corossol sont utilisées en médecine traditionnelle, dans de nombreuses traditions médicales. La décoction des feuilles est utilisée pour le traitement de la diarrhée, de la dysenterie, du diabète, et de l'hypertension (**Adjanohoun et al., 1996**).

Les feuilles du corossolier sont utilisées pour le traitement des maladies intestinales (**Noumi et Yomia, 2001**). Le fruit immature, les feuilles sont utilisés comme fébrifuge et pour traiter le paludisme (**Khan et al., 1997; Willcox et Bodeker, 2004**). La macération des jeunes fruits et jeunes feuilles est utilisée pour le traitement des amibiases (**Mbita, 1998**). Les fleurs et les bourgeons sont utilisés contre la toux. Les feuilles mélangées à celles du citronnier seraient calmantes et efficaces contre la fièvre. Les feuilles fraîches réduites en poudre sont appliquées comme cicatrisant sur les blessures sous forme d'infusion. Certaines tribus de basse Casamance utilisent des emplâtres de feuilles pilées pour les plaies de la circoncision (**Le Thomas, 1969**). Les graines du corossol sont utilisées au Guatemala pour l'artisanat local (**Pinto et al., 2005**). La pulpe de fruit mûr, est comestible et utilisée pour préparer un vin appelé Champola (**Pinto et al., 2005**).

### ***i-1-4- Travaux antérieurs***

*A. muricata* est l'une des espèces les plus étudiées de la famille des Annonacées. Elle a en effet été l'objet de plusieurs types d'investigations.

Des études phytochimiques ont été réalisées par plusieurs auteurs. En effet, **Carbajall et al. (1991)** ont montré que 1 ml/l d'extrait aqueux des feuilles administré par voie intraveineuse chez le rat entraîne une baisse de plus de 30% de la pression artérielle ayant ainsi une activité cardiopressive et hypotensive. **Boyom** a analysé en **1992** les huiles essentielles des feuilles. Il a montré que les constituants majoritaires des huiles essentielles sont pour la plupart des sesquiterpènes tels que le  $\beta$ -caryophyllène (40%), l' $\alpha$ -santalène (9,5%),  $\alpha$ -élémane

(14,4%), le  $\delta$ -cardinène (4,8%) et l' -humulène (4,6%). Les graines sont riches en acides gras insaturés que sont l'acide oléique (41%), l'acide linoléique (33%), l'acide palmitoléique (19%), les acides gras saturés sont l'acide palmitique (19%), et l'acide stéarique (5%) (**Pinto et Silva, 1994**). **Melot et al. (2009)** ont isolé 103 acétogénines (Annonacine, Gigantacine, Xylomatenine, Corossoline, Corossolone, Annonacinone ...) des écorces, feuilles, fruits, racines et graines. Environ 75% de ces acétogénines ont 35 atomes de carbones, et environ 65% sont des acétogénines de type A1 (mono THF, fonction lactone insaturée). **Champy et al. (2009)** ont également caractérisé les acétogénines isolés de cette plante. Par contre, **Vimala et al. (2012)** ont quant-à-eux déterminé la composition phytochimique d'*A. muricata*.

Outre ces études phytochimiques, les activités biologiques de différents organes d'*A. muricata* ont été évaluées. **Gbeassor et al. (1990)**, **Antoun et al. (1993)** et **Leaman et al. (1995)**, ont montré *in vitro* l'activité antiplasmodiale des extraits éthanoliques des feuilles d'*A. muricata* du Togo et du Pérou sur les souches D-6 et W2 de *P. falciparum*, avec des  $CI_{50}$  variant de 20 à 63  $\mu\text{g/ml}$ . **Joyeux et al. (1995)** ont montré que 1mg/plaque de décoction de feuilles a une activité antiradicalaire, antilipoperoxydante, et antihépatotoxique. **N'Gouemo et al. (1997)** ont montré que 100 mg/kg d'extrait éthanolique des feuilles administré par voie intrapéritonéale chez la souris a une activité anticonvulsivante. L'activité antibactérienne *in vitro* des extraits acétoniques, méthanoliques, éthanoliques et aqueux des feuilles, tiges et écorces a été démontrée par **Khan et al. (1997)** sur *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigelle flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus albus*, *Serratia marcescens* et *Salmonella newport* à des concentrations de 2-3  $\mu\text{g/plaque}$ . L'extrait aqueux des tiges a des effets cytotoxique et antiproliférative *in vitro* sur des cellules infectées par le VIH ceci avec une  $CI_{50} < 2 \mu\text{g/ml}$  (**Antoun et al., 1999**). L'étude menée par **Betancur et al. (1999)** a montré que les extraits éthanoliques des tiges et écorces présentent *in vitro* une activité contre l'herpès simplex I et l'extrait éthanolique des racines quant à lui a une activité contre l'herpès simplex 2 avec une  $CC_{50}$  et  $CE_{50}$  de 0,05 2  $\mu\text{g/ml}$  respectivement. Les extraits au méthanol, à l'hexane, et à l'acétate d'éthyle des graines, tiges, écorces et péricarpe ont montré *in vitro* une activité antiparasitaire contre *Leishmania trypanosoma*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *Entamoeba histolytica*, *Nocardia brasiliensi*, *Molinema dessetae*, *Artemia salina* (**Jaramiko et al., 2000**; **Wang et al., 2002**). **Lannuzel et al. (2002)** ont montré que les alcaloïdes extraits des écorces, racines, et graines d'*A. muricata* ayant une activité anti-inflammatoire (**Philipov et al., 1995**) entraînent à 18  $\mu\text{g/ml}$  des dommages de l'ADN et l'apoptose des cellules dopaminergiques et GABA énergiques *in vitro*. L'étude effectuée par **Yuan et al. (2003)** a montré que l'acétogénine

majoritaire des feuilles d'*A. muricata*: l'annonacine tue les cellules cancéreuses, avec une  $CI_{50}$  de 4 $\mu$ g/ml. Cet acétogénine a également montré une toxicité au niveau des neurones mésencéphaliques dopaminergiques avec une dose efficace de 0,018  $\mu$ M d'où son implication dans l'apparition des syndromes de Parkinson en Guadeloupe (**Lannuzel et al., 2003**). **Padma et al. (2005)** ont montré que 100 mg/kg d'extrait alcoolique des brindilles ont une activité neurologique antidépressive.

### ***i-2- Annona reticulata L. (Photographie 2)***

**Synonymes** : *Annona humboldtiana* Kunth, *Annona humboldtii* Dunal, *Annona excelsa* Kunth, *Annona laevis* Kunth, *Annona longifolia* Sessé & Moc., *Annona riparia* Kunth, *Annona mucosa* Jacq., (**Pinto et al., 2005**).

**Noms commun** : Cœur de bœuf, cachinman, cachiment

**Noms vernaculaires** : Kedahan (Yambetta)

#### ***i-2-1- Botanique***

*A. reticulata* peut atteindre 6,0 à 7,5 m de hauteur, avec de nombreuses branches latérales. Il peut être distingué d'*A. cherimoya* par ses longues feuilles moelles et glabres ; d'*A. squamosa* par son fruit compact solide et ses feuilles larges et d'*A. glabra* par ses petites graines brun foncées.

Les feuilles d'*A. reticulata* sont oblongues-lancéolées et vert foncées, mesurant 25 à 30 cm de longueur et 7 cm de large, avec 10 à 20 paires de nervures et d'un pétiole pubescent (**Pinto et al., 2005**).

Les fleurs sont de forme semblable à ceux d'*A. squamosa*, sauf qu'elles sont regroupées dans une courte inflorescence de 2 à 10 fleurs, avec des pédicelles mesurant 1,5 à 3,0 cm de longueur (**Pinto et al., 2005**).

Le fruit pèse 0,1 à 1,0 kg, et est couramment en forme de cœur, mais peut être conique, ovale ou irrégulière et mesurant 10 à 12 cm de longueur (Figure 14). Ces fruits sont coriaces et ont une couleur de surface jaune-rougeâtre. La chair d'aspect blanc laiteux est douce, bien fade au goût, étant considérée comme le moins savoureux des anones cultivées. Chaque fruit contient souvent plus de 40 graines de forme oblongue et de couleur sombres (**Pinto et al., 2005**).



**Photographie 2 : *Annona reticulata* L. (Tchokouaha, 2013)**

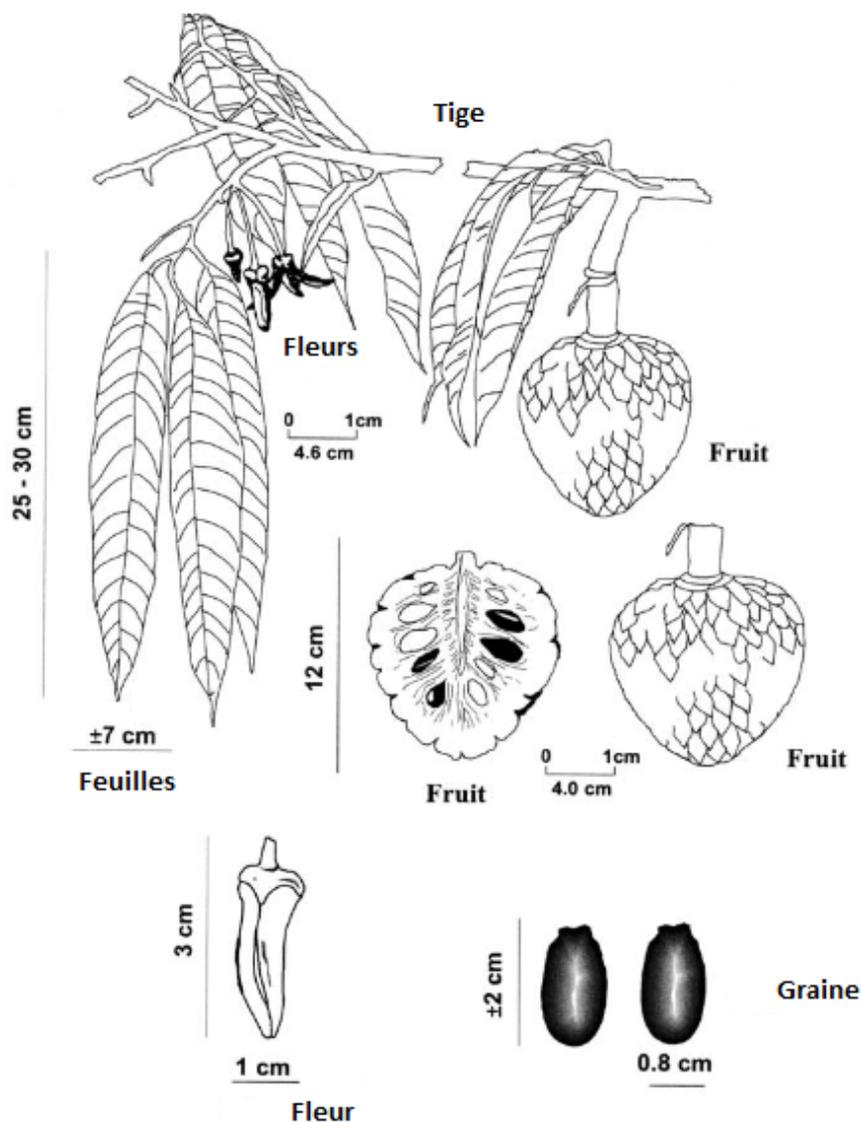


Figure 14 : Caractéristiques botaniques d'*A. reticulata* L. (Pinto *et al.*, 2005)

### *i-2-2- Ecologie*

Natif de la Caraïbe et en Amérique Centrale, *A. reticulata* est maintenant pantropical. Il peut être trouvé de plus en plus entre les altitudes de 0 mètres (0 pieds) à 1500 mètres (4900 pieds) dans les régions de l'Amérique Centrale qui ont une alternance des saisons. Il est cultivé dans de nombreux pays tropicaux, notamment en Asie du Sud-Est, Taiwan, Inde, Bangladesh, Pakistan, Australie et en Afrique (Pinto *et al.*, 2005).

### ***i-2-3- Usages ethnobotaniques***

Les graines sont si dures qu'elles peuvent être avalées entières sans aucune séquelle, mais les grains sont très toxiques. Les graines, les feuilles et les jeunes fruits sont utilisés comme insecticide.

La décoction des feuilles est utilisée comme vermifuge. Les feuilles écrasées ou une pâte de feuilles peuvent être cataplasme sur les furoncles, les abcès et les ulcères.

Le fruit vert est utilisé contre la diarrhée et la dysenterie. L'écorce est très astringente et sa décoction est considérée comme un tonique et aussi comme un remède contre la diarrhée et la dysenterie. Dans les cas graves, les feuilles, l'écorce et les fruits verts sont tous bouillis ensemble pendant 5 minutes dans un litre d'eau pour faire une décoction extrêmement puissante. Les morceaux d'écorces de racine sont emballés autour des gencives pour soulager les maux de dents. La décoction de racine se prend comme fébrifuge (**Le Thomas, 1969**).

### ***i-2-4- Travaux antérieurs***

L'étude phytochimique d'*A. reticulata* a été effectuée par divers auteurs. L'annonine, un acétogénine a été isolé en 1990 et 1994 des graines (**Nonfon et al., 1990; Pinto et Silva, 1994**). Les travaux menés par **Chang et al.** en **1993** et **1998** ont permis l'isolement et l'identification des acétogénine des graines et des feuilles : l'annoreticuline, l'annomonocine, l'annoreticuline 9. **Tran et al. (2013)**, ont étudié la composition chimique des feuilles d'*A. reticulata* et ont isolé plusieurs molécules dont le  $\beta$ -sitotérol, le taraxerol, l'annonaretine.

Les propriétés biologiques évaluées d'*A. reticulata* ne sont pas autant nombreuses que celles d'*A. muricata*. En **1990**, **Cassady et al.** ont montré l'activité chemopréventive des flavonoïdes isolés des feuilles, brindilles, fruits, racines et graines d'*A. reticulata*. L'extrait éthanolique des feuilles d'*A. reticulata* a montré une bonne activité antioxydante sur le DPPH et sur le radical superoxide respectivement de 89,37% et 80,88% (**Baskar et al., 2007**). **De Lima et al. 2012** ont évalué *in vitro* l'activité antileishmaniale et cytotoxique des feuilles et graines d'*A. reticulata*. L'extrait au dichloromethane des feuilles a été la plus active sur les *Leishmania* avec des  $CI_{50}$  inférieurs à 30  $\mu$ g/ml, tandis que les extraits des graines ont été les moins cytotoxiques avec des indices de sélectivité comprises entre 1,54 et 5,93. Deux alcaloïdes oxoaporphines ont été isolés : l'athérospermidine et la liriodenine. Cette dernière molécule s'est révélée être actif. Les travaux de **Kalyani et Kamuruz** en **2013** ont permis de mettre en

évidence une forte activité antidiabétique des extraits éthanolique et aqueux des feuilles et écorces d'*A. reticulata*.

### ***i-3- Annona senegalensis Pers. (Photographie 3)***

**Synonymes** : *Annona arenaria* Thonn.ex Schum., *Annona chrysophylla* Boj., *Annona chrysophylla* Boj.var. porpetac caution, *Annona chrysophylla* var. Sillans Robyns & Chesq., *Annona porpetac* caution., *Annona senegalensis* Pers. var. *chrysophylla* Boj., *Annona senegalensis* Pers. var. *latifolia* Olive, *Annona senegalensis* var. porpetac (Bail.) Diels (**Aké et Guinko, 1991; Pinto et al., 2005** ).

**Noms communs** : Pomme cannelle du Sénégal, Annone de savane, Annone du Sénégal.

**Noms vernaculaires** : Doukoudjé (Foulbé), Falo (Bamenda), Sore, Souli (Baya), Gonokoy (Baya), Doukwi (Bororo), Gwadar dadjji (Haoussa), Nkowkelok (Bagangté), Sabasaba (Yambetta).

#### ***i-3-1- Botanique***

*A. senegalensis* Persoon est un arbuste ou sous arbrisseau de 1,5 à 11 m (habituellement 3,5 m environ) de hauteur avec un diamètre de tige allant jusqu'à 28 cm.

Ses rameaux sont glabres, ses ramilles tomenteuses roux ferrugineux. L'écorce est grisâtre noir, souvent rugueuse et ondulée. La ramification est près du sol, avec les jeunes tiges principalement ferrugineux, velouté de tomentose grisâtre ou brun-rouge, devenant plus tard glabres. Les feuilles sont à pétiole long de 0,5 à 2 cm. Elles sont ovales, oblongues-elliptiques ou oblongues-ovales plus ou moins tomenteux-ferrugineux.

Le limbe est papyracé à coriace, orbiculaire, largement ovale, oblong-ovale à elliptique long de 6 à 20 cm, large de 5 à 12 cm, obtus, arrondi ou légèrement émarginé au sommet, cordé, subcordé, à arrondi à la base; la face supérieure est finement pubérulente, la face inférieure étant couverte sur toute la surface d'un tomentum épais de poils très courts et crépus, gris argenté (**Aké et Guinko, 1991; Malgras, 1992; Pinto et al., 2005**).

Les nervures latérales sont au nombre de 8 à 15 paires imprimées au-dessus, proéminentes en-dessous.

Les fleurs, de couleur verte sont solitaires ou groupées sur des tiges, on en rencontre 2 à 4 fasciculées, à pédicelle long de 1 à 2,5 cm. Les sépales sont triangulaires-ovés, concaves, obtus au sommet longs de 10 à 15 mm, larges de 8 à 10 mm, tomenteux à l'extérieur ; les internes sont étroitement oblongs, presque triquètres, longs de 8 à 10 mm, larges de 3 mm environ, et glabres (Aké et Guinko, 1991; Malgras, 1992; Pinto *et al.*, 2005).

Les étamines sont linéaires étroites, longues de 2 à 2,5 mm. Les carpelles sont cylindriques, longs de 1 à 1,5 mm, pubescents.

Les fruits à pédicelle long de 1,5 à 3 cm sont pubescents; le syncarpe est jaune orangé à maturité (Figure 15). Ils sont ovoïdes ou globuleux ou subglobose mesurant 2,5 à 5 cm de longueur et 2,5 à 4 cm de largeur auréole, légèrement tuberculé, de 3 à 5 cm de diamètre, tomentelleux-ferrugineux à glabrescent. Il contient de nombreuses graines oblongues, aplaties, longues de 6 à 11 mm, larges de 4 à 5 mm, à texture lisse, brun clair et pesant environ 40 g (Aké et Guinko, 1991; Malgras, 1992; Pinto *et al.*, 2005).



Photographie 3 : *Annona senegalensis* Pers. (Tchokouaha, 2010)

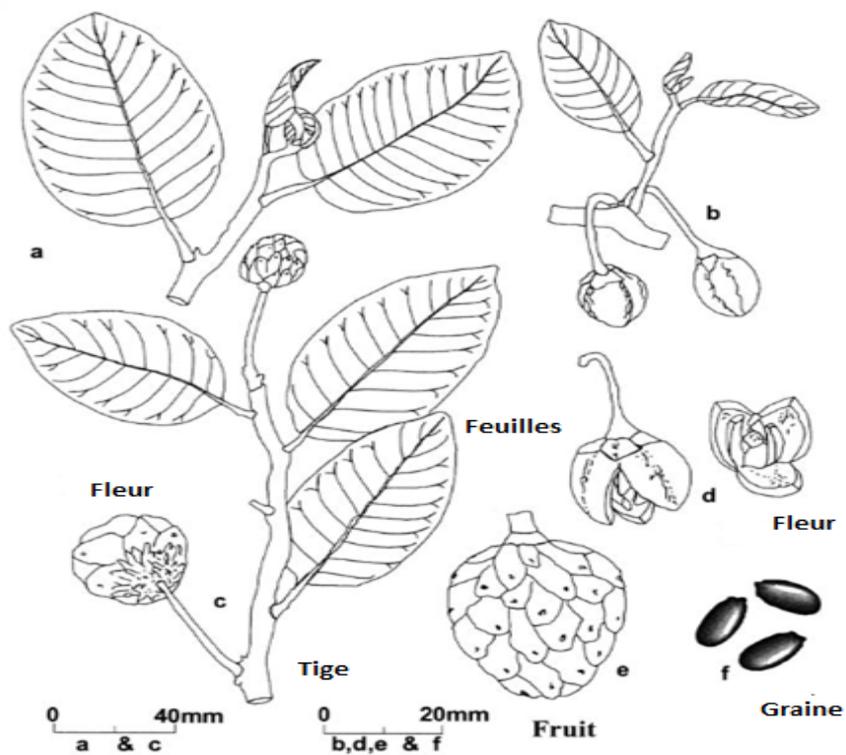


Figure 15 : Caractéristiques botaniques d'*A. senegalensis* Pers. (Pinto *et al.*, 2005)

### ***i-3-2- Ecologie***

*A. senegalensis* tend à se développer dans les régions semi-aride à subhumide adjacente à la côte, souvent, mais pas exclusivement, sur des roches coralliennes avec principalement de sable, les sols limoneux, à partir du niveau de la mer jusqu'à 2400 mètres, à des températures moyennes entre 17 et 30° C, et les précipitations moyennes comprises entre 700 et 2500 mm. C'est une plante solitaire au sein de la savane boisée sous-étage, on la rencontre également dans les forêts marécageuses ou des berges, ou sur l'ancien terres agricoles laissées en jachère pendant une période prolongée. La sous-espèce type *senegalensis* est très largement répandue dans les savanes soudano-guinéennes, et s'étend du Sénégal au Soudan vers l'Est, et tout le long de la Côte Orientale jusqu'à Madagascar au Sud. La sous espèce *oulotricha* envahit les savanes à la limite de la forêt dense humide. Elle s'étend de la Sierra Leone à la Guinée Conakry et en Côte-d'Ivoire, avec une zone de prédilection autour du massif forestier Camerouno-congolais, au Sud du Cameroun. On la rencontre également en République Centrafricaine et dans les savanes gabonaises (**Adjanouhoun et al., 1996; Aké et Guinko, 1991; Malgras, 1992; Vogt, 1985**).

### ***i-3-3- Usages ethnobotaniques***

La plupart des thérapeutes utilisent les écorces pour le traitement du cancer, des convulsions, des maladies vénériennes, de la diarrhée, de la dysenterie, de la fièvre, de la filariose, et de l'impuissance sexuelle chez l'homme (**Falope et al., 1996**).

Les décoctés et les infusées des feuilles et des racines sont considérés comme étant dotés de propriétés fébrifuges, antitussives, sédatives, décontracturantes, décongestionnantes, antiseptiques, diurétiques, anti-infectieuses, cicatrisantes. La plante est utilisée pour le traitement du paludisme, des maladies respiratoires (du coryza à la pneumonie), des oreillons, des maladies oculaires, des dermatoses, des ulcères, des rhumatismes, de la blennorrhagie, la dysenterie, la diarrhée, des abcès et de la syphilis (**Philipov et al., 1995; You et al., 1995; Adjanouhoun et al., 1996; Aké et Guinko, 1991; Malgras, 1992**).

Le tronc est utilisé comme vermifuge et pour le traitement des piqûres de serpents (**Philipov et al., 1995**).

### ***i-3-4- Travaux antérieurs***

Tout comme *A. muricata*, *A. senegalensis* est l'une des plantes médicinales suggestive à de nombreuses études.

L'étude phytochimique réalisée par **Kerharo et Adam** en **1974** a permis d'isoler des feuilles d'*A. senegalensis* la rutine, la quercétine et la querectrine. Deux nouveaux mono et tétra acétogénines cytotoxiques (Annosenegaline et annogalène) ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique d'*A. senegalensis* (**Sahpaz et al., 1996**).

Des composés isolés d'*A. senegalensis* ont montré des effets biologiques. En effet, cinq diterpènes (kauranes) ont été isolés des extraits d'écorces de racine d'*A. senegalensis* **Kayodé et Durodola, (1976)**. Ces composés ont montré des activités antitumorales et antibactériennes. Des souris infectées avec des souches de *Trypanosoma brucei brucei* 8/18 ont été traitées (voies orale et intramusculaire) avec les extraits aqueux de racines aux doses de 27,8 mg/kg et 9,5 mg/kg respectivement pour quatre jours consécutifs, en commençant à partir des 72 heures après l'infection des souris. A ces doses l'extrait d'*A. senegalensis* a présenté un effet thérapeutique effectif contre *Trypanosoma brucei brucei* chez les souris (**Igweh et Onabanjo, 1989**). Des extraits des graines d'*A. senegalensis* ont été testés pour leurs activités antiparasitaires contre *L. major*, *L. donovani*, *Trypanosoma brucei brucei* et leur activité cytotoxique contre les lignes cellulaires de KB et VERO. La (-)-roemerine, un alcaloïde connu isolé des feuilles d'*A. senegalensis*, permet d'intensifier la réponse cytotoxique provoquée par la vinblastine sur les cellules KB-V1 multirésistantes (**You et al., 1995**). Les extraits d'éther de pétrole de dichlorométhane, méthanolique et aqueux d'*A. senegalensis* ont présenté une très bonne activité trypanocide avec une concentration inhibitrice inférieure à 1mg/ml (**Freiburghaus et al., 1996**). Les travaux de **Fall et al. (2003)**, ont permis de mettre en évidence une activité antiparasitaire des extraits des racines d'*A. senegalensis* sur une souche résistante de *P. falciparum*. Les mêmes auteurs ont isolé et identifié des acétogénines dans les racines de plantes, ce qui pourrait expliquer l'activité antiparasitaire observée. Les études effectuées sur l'extrait méthanolique des écorces de racines d'*A. senegalensis* ont permis de démontrer une réduction de l'hyperthermie provoquée par le venin de serpent chez les rats (**Adzu et al., 2005**). Dans la même expérimentation l'extrait n'a pas pu restaurer les valeurs normales de GOP et de GPT. La concentration létale 50 (CL<sub>50</sub>) du même extrait est de 232,7 mg/ml selon le test effectué sur *Artemia salina* (**Adzu et al., 2005**).

Les plantes de la famille des Annonaceae sont très étudiées pour une éventuelle application en chimiothérapie en vue du traitement du cancer (**Eparvier *et al.*, 2006**) de par leur richesses en acétogénines molécules douées d'activités anticancéreuse. Cependant, peu d'études visant à démontrer leur activité antiplasmodiale et antileishmaniale sont menées (**Rakotomanga *et al.*, 2004; Osario *et al.*, 2007a; Osario *et al.*, 2007b**).



**CHAPITRE II:**  
**MATERIEL ET METHODES**

## **II-1- Matériel**

### ***i- Matériel végétal***

Les différents organes d'*A. muricata*, *A. senegalensis* et *A. reticulata* utilisés pour ce travail ont été respectivement récoltés le 19 Mai 2011, le 29 Octobre 2012 et le 16 Juillet 2013 entre 13 et 14 heures 30 minutes. *A. muricata* a été récolté aux alentours du Campus de l'Université de Yaoundé I. *A. reticulata* à Shell Nsimeyong (Yaoundé) et *A. senegalensis* à Nkon Yambetta dans le Mbam Inoubou. L'identité des plantes a été confirmée à l'Herbier National du Cameroun où des spécimens ont été conservés sous le nom scientifique *Annona muricata* Linn., *Annona reticulata* Linn. et *Annona senegalensis* Pers., et respectivement de numéro de référence 32879/HNC, 66886/HNC et 40060/HNC. Les organes ainsi récoltés inclus, les feuilles, les brindilles, les tiges, les fruits, les racines et les écorces.

### ***ii- Souches parasitaires***

#### ***ii-1- Souche plasmodiale***

L'évaluation de l'activité antiplasmodiale des extraits de plantes a été faite vis-à-vis de la souche W2 de *P. falciparum* découverte en Indochine, et qui est résistante à la chloroquine. Cette souche est maintenue en culture continue au sein du Laboratoire de Division des Maladies Infectieuses, Département de Médecine de l'Université de Californie San Francisco (USA). C'est d'ailleurs au sein de ce laboratoire que les tests d'activités antiplasmodiales ont été réalisés.

#### ***ii-2- Souches de Leishmania***

Les activités antileishmaniales ont été réalisées sous les promastigotes de *L. donovani* (LCR-133) et *L. major* (MHOM/IL/81/Friedlin). Ces souches sont maintenues en culture au Laboratoire de Parasitologie Moléculaire, Département de Parasitologie de l'Université de Granada en Espagne. L'évaluation des effets des échantillons sur la croissance des souches de *Leishmania* a été réalisée dans ce laboratoire.

### ***iii- Cellules***

#### ***iii-1- Cellules érythrocytaires saines et les macrophages J774.2***

Les tests de susceptibilités des cellules hôtes vis-à-vis des extraits ont été réalisés sur les érythrocytes et les macrophages J774.2. Les érythrocytes provenaient d'un sang de groupe AB<sup>+</sup> prélevé d'un donneur sain. La lignée cellulaire des macrophages J774.2 (ECACC, numéro 91051511) a été isolée d'une tumeur présente chez un rat femelle de souche BALB/c en 1968. Les macrophages sont maintenus par repiquages successifs au Laboratoire de Parasitologie Moléculaire de la Faculté des Science de l'Université de Granada, Espagne.

#### ***iii-2- Fibroblastes***

La lignée cellulaire Human Foreskin Fibroblasts HFF (ATCC-HS68) maintenue en culture au Laboratoire de Phytobiochimie, Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé 1 a été utilisée pour les tests de cytotoxicité en vue de la détermination des indices de sélectivité.

## **II-2- Méthodes**

### ***i- Sélection des plantes***

La sélection des plantes s'est faite d'après une enquête ethnopharmacologique des plantes du genre *Annona* utilisées traditionnellement pour le traitement du paludisme ou d'un symptôme associé et d'une étude préliminaire d'activité antiplasmodiale de l'une des plantes identifiées.

L'enquête ethnopharmacologique a été menée dans 4 sites donc trois dans la région du Centre (Yaoundé et ses environnements, Kon-Yambetta, Mbalmayo) et un dans la région du Sud (Ngoyang) du Cameroun. Le choix des sites a été principalement basé sur les facteurs environnementaux permettant la reproduction des moustiques, des zones cosmopolites regroupant des personnes de différentes origines culturelles, les zones ayant un accès limité aux centres de santé, et les zones avec des personnes se fondant exclusivement sur les pratiques médicales traditionnelles. L'enquête s'est faite dans le strict respect des règlements de protection de la biodiversité et les droits coutumiers des populations rurales. En prélude à l'enquête, les autorités juridiques de chaque site d'étude ont été contactées pour demander l'autorisation d'enquêter au sein de leurs communautés. Lors d'une interaction en face -à-face, le but et la procédure du travail, ainsi que les bénéfices attendus et les droits ont été expliqués

à la tête des villages. Les herboristes traditionnels disposés à collaborer à l'étude (ou leurs interprètes) avaient signé le formulaire de consentement éclairé (Annexe 3) avant d'autres interactions. Les données ont été recueillies suite à un questionnaire (Annexe 4) élaboré pour l'étude par le Dr Nole Tsabang, ethnobotaniste à l'Institut de Recherche Médicale et d'Etude des Plantes Médicinales, Yaoundé, Cameroun. Les spécimens de chaque plante ont été séchés et déposés à l'Herbier national du Cameroun, Yaoundé pour identification.

L'étude préliminaire d'évaluation de l'activité antiplasmodiale *in vitro* a été réalisée pour la plante la plus citée en vue de la validation de l'effet thérapeutique contre le paludisme.

## ***ii- Préparation des extraits***

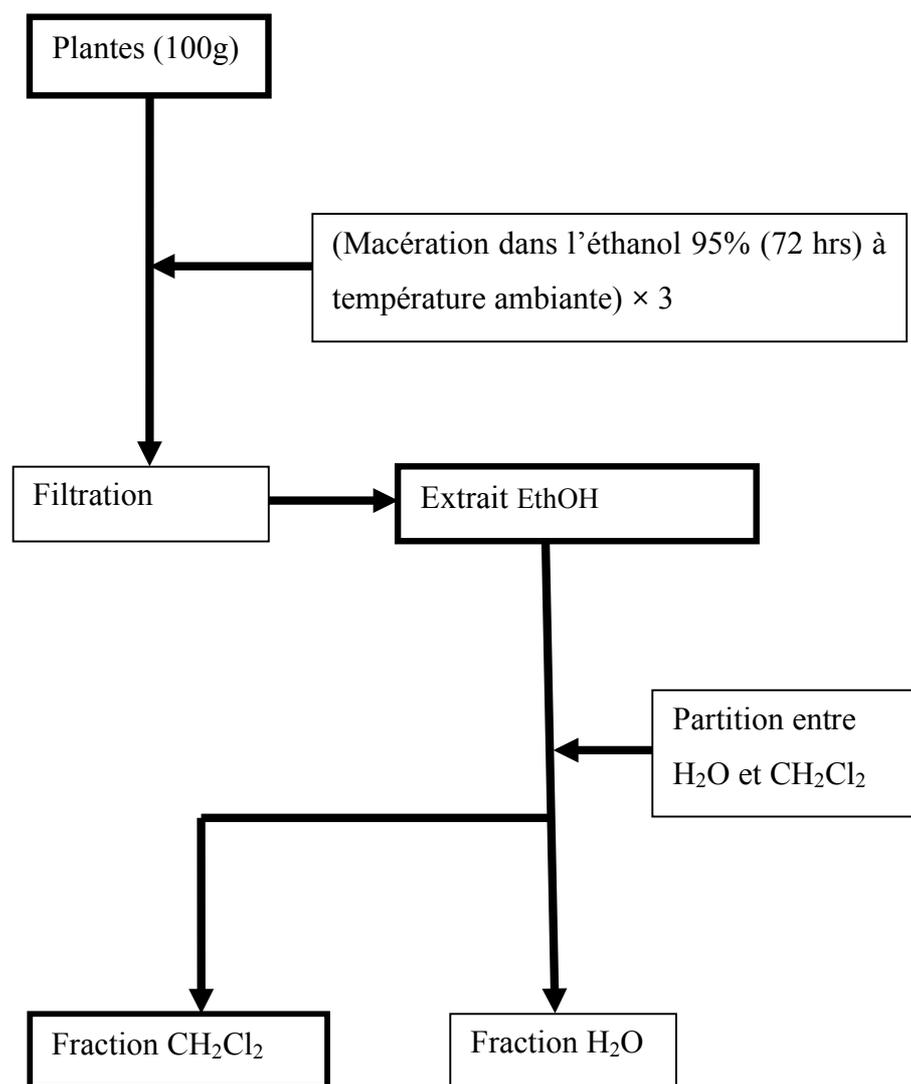
### ***ii-1- Traitement de la plante et préparation de l'extrait brut***

Les feuilles, les brindilles, les tiges, le péricarpe de fruit, les racines et les écorces des plantes sélectionnées ont été séchés à température ambiante pendant une semaine. Par la suite, ces organes ont été broyés à l'aide d'un broyeur jusqu'à obtention d'une poudre fine. Les poudres fines des différents échantillons ont été ensuite soumises à une extraction à l'éthanol 95%.

### ***ii-2- Procédure d'extraction liquide-liquide***

Au cours de ce travail, la procédure de préparation des fractions au chlorure de méthylène décrite par **Alali et al. (1999)** (Figure 16) a été utilisée suivie de quelques modifications.

Cent grammes de poudre sèche de chaque échantillon du matériel végétal ont été macérés à température ambiante dans de l'éthanol 95% pendant 72 heures. Le mélange est remué deux fois par jour (matin et soir). Au bout de 72 heures, le mélange a été décanté et filtré à pression normale à l'aide du papier filtre Wattman No 1. Le filtrat a été concentré à l'évaporateur rotatif (BÜCHI 011) à 80°C. Afin d'optimiser le rendement d'extraction, les résidus de plante ont été de nouveau macérés deux fois de suite avec le solvant récupéré. Les extraits éthanoliques obtenus après évaporation de l'éthanol ont été réunis et soumis à l'extraction liquide-liquide. L'extrait éthanolique a été partitionné entre l'H<sub>2</sub>O et le chlorure de méthylène (50 ml v/v) aboutissant ainsi à l'obtention de la fraction aqueuse et la fraction au chlorure de méthylène. Cette dernière part la suite a été évaporée à 40°C. Les échantillons ainsi obtenus ont été conservés à 4°C pour utilisation ultérieure.



**Figure 16 : Procédure de préparation des fractions au chlorure de méthylène (Alali *et al.*, 1999).**

Les rendements d'extraction ont été calculés par rapport à la masse du matériel végétal de départ en utilisant la formule suivante:

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de la fraction (g)}}{\text{Masse de la matière végétale (g)}} \times 100$$

### ***iii- Fractionnement, isolement et caractérisation des composés de la fraction au chlorure de méthylène des écorces et racine d'*A. muricata****

Sur la base de l'activité antiplasmodiale, les fractions au chlorure de méthylène des écorces et racines d'*A. muricata* qui se sont avérées être de façon globale très actives ont été soumises à une chromatographie sur colonne (CC) en vue d'isoler le composé majoritaire.

Ainsi, les fractions ont été pesées et fixées sous silice. Pour cela, elles ont été dissoutes dans du méthanol à raison de trois fois le volume de silice pour un volume donné de chaque fraction. Après homogénéisation complète du mélange, le solvant a été évaporé, la fraction alors fixée sur silice a été séchée et la colonne de chromatographie a été montée. Les CC ont été réalisés dans des colonnes en verre de différents diamètres en utilisant de la silice de granulométrie fine (6-35 µm).

Les fractions au chlorure de méthylène des écorces (51,75 g) et racines (31,67 g) d'*Annona muricata* ont été respectivement fractionnées sur une colonne ouverte de silice (CC) utilisant tout d'abord l'hexane (Hex) 100%, puis respectivement suivant un gradient Hex/AE, AE/MeOH de polarité croissante (Hex 100%, Hex/AE 95:5, Hex/AE 90:10, Hex/AE 85:15, Hex/AE 80:20, Hex/AE 70:30, Hex/AE 60:40, Hex/AE 50:50, Hex/AE 30:70, AE 100%, AE/MeOH 95:5, AE/MeOH 90:10, AE/MeOH 85:15, AE/MeOH 75:25, AE/MeOH 65:35, AE/MeOH 50:50, MeOH 100%).

Après fractionnement et rassemblement des sous fractions de profils chromatographiques similaires, huit sous fractions (AnMrSF1-AnMrSF8) et un composé (AnMrP1) ont été obtenus pour la fraction au chlorure de méthylène des racines. Quant aux écorces, quarante trois sous fractions (AnMecSF1-AnMecSF43) et trois produits (AnMecP1-AnMecP3) ont été obtenus. Les profils chromatographiques ont été analysés par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de gel de silice 60 F254 de 0,2 mm d'épaisseur sur support d'aluminium. Les plaques ont été visualisées sous UV avant d'être révélées par pulvérisation d'un révélateur, l'acide sulfurique (50% v/v dans de l'eau) avec chauffage.

La caractérisation de quelques composés a été réalisée au Laboratoire de Chimie Organique de l'Université de Bielefeld en Allemagne. Les structures des composés isolés ont été déterminées par l'analyse des données spectroscopiques à savoir la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectrométrie de masse (SM), la "correlated spectrometry" (COSY), la

"heteronuclear single quantum coherence" (HSQC) et la "heteronuclear multiple bond correlation" (HMBC).

Les extraits éthanoliques, les fractions au chlorure de méthylène, les fractions aqueuses, les sous fractions et les composés isolés ont été évalués pour leur potentialité à inhiber la croissance des érythrocytes sains, des cellules HFF, de *P. falciparum* et des promastigotes et amastigotes intracellulaires de *L. donovani* et de *L. major* en culture.

#### ***iv- Evaluation de l'activité antiplasmodiale in vitro***

En vue d'éviter toutes contaminations, les tests d'activité antiplasmodiale ont été effectués sous une hotte à flux laminaire. Les parasites ont été maintenus en culture dans le RPMI 1640 10 % de sérum dont la préparation est en annexe 5.

##### ***iv-1- Evaluation de la susceptibilité des érythrocytes aux extraits***

Une étude préliminaire de la susceptibilité des érythrocytes sains vis-à-vis des extraits a été réalisée dans le but de déterminer la plus grande concentration d'extrait pouvant être incubée avec les érythrocytes sans dommages significatifs.

La méthode employée est celle décrite par **Cedillo-Rivera et al. (1992)**, avec quelques modifications. C'est un test colorimétrique au 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl] bromure de 2,5-diphényltétrazolium/méthosulfate de phénazine (MTT/PMS). La méthode est basée sur la réduction du MTT (teinte jaune) en formazan (teinte bleue) par les enzymes (déshydrogénases) des cellules viables. Les échantillons de plantes dilués à différentes concentrations (1 mg/ml ; 0,5mg/ml ; 0,25mg/ml ; 0,125mg/ml ; 0,0625mg/ml ; 0,0312mg/ml ; 0,0156mg/ml et 0,0078mg/ml) ont été incubés à 37°C, pH 7,5 avec les érythrocytes (à 2% d'hématocrite) dans un volume de culture final de 100 µl, sous atmosphère constitué de 3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, et 91% N<sub>2</sub> en présence du RPMI 1640, 25mM HEPES. Après 48 heures d'incubation, les cultures ont été centrifugées à 1500 trs/min. pendant 5 minutes, et le surnageant éliminé. Par la suite, 1,5 ml de solution de MTT et 250 µg de PMS ont été ajoutés au culot. Les tubes témoins ne contenaient pas d'extraits. Les tubes ont été par la suite incubés pendant 40 minutes à 37°C, puis centrifugés et le surnageant éliminé.

Les culots ont été ré-suspendus dans 0,75 ml de HCl, 0,04 M dans l'isopropanol en vue d'extraire et de dissoudre le colorant (formazan) des cellules. Après 5 minutes, les tubes ont été vigoureusement homogénéisés et centrifugés, et l'absorbance du surnageant déterminée à 570 nm. Les tubes contenant le plus d'érythrocytes viables produisent plus de formazan (densité optique la plus élevée). Les essais ont été faits en triplicate. Sur la base des résultats de ce test de susceptibilité, la gamme de concentration d'extraits à incuber avec *P. falciparum* est déterminée.

## ***iv-2- Evaluation de l'activité antiplasmodiale***

L'évaluation de l'activité antiplasmodiale a été effectuée sur la souche W2 de *P. falciparum* par cytométrie de flux suivant le protocole décrit par **Boyom et al. (2011)**.

### ***iv-2-1- Culture in vitro des parasites***

Toutes les manipulations ont été effectuées sous une hotte à flux laminaire afin d'éviter la contamination des cultures par des germes exogènes (bactéries, champignons) qui pourraient envahir le milieu, inhiber ou perturber la croissance du parasite.

La souche W2 de *P. falciparum* a été maintenue en culture continue dans les érythrocytes humains (vieux de moins de 2 à 3 semaines) à un hématoците de 2% (rapport du volume cellulaire dans le milieu). Cette culture est réalisée dans une boîte de culture cellulaire sous une atmosphère contenant 91% d'azote, 5% de dioxyde de carbone et 3% d'oxygène. Le milieu de culture est changé quotidiennement et du gaz frais ajouté dans le flacon. L'incubation se fait à 37°C.

#### ***iv-2-1-1- Maintenance de la culture des parasites***

Les parasites ont été maintenus en culture dans des conditions stériles. La culture parasitaire est réensemencée tous les 4 à 5 jours tout en évitant de trop baisser la parasitémie; considérant le fait que les parasites pourraient mourir si la parasitémie est au-delà de 10%.

Le test a été effectué sur les parasites au stade de développement en anneau (trophozoïtes jeunes). Pour cela, la culture a été soumise à une synchronisation lorsque ce stade est prédominant dans la culture.

#### ***iv-2-1-2- Synchronisation de la culture***

L'intérêt de la synchronisation est de pouvoir mesurer l'influence des extraits sur les parasites au même stade de développement. Elle consiste dans ce cas à tuer par traitement chimique les trophozoïtes âgés et les schizontes pour ne laisser dans la culture que des parasites au stade en anneau (**Lambros et Vanderberg, 1979**).

Dans cette optique, la culture a été centrifugée à 1500 trs/min. pendant 5 minutes pour sédimenter les érythrocytes. Le milieu de culture a été ensuite délicatement aspiré et remplacé par une solution de sorbitol à 5% dans de l'eau bi-distillée. La quantité de sorbitol à 5% ajoutée doit correspondre à 10 fois le volume cellulaire. Le mélange a été ensuite bien homogénéisé et incubé à 37°C pendant 15 minutes, puis centrifugé à 1500 trs/min. pendant 5 minutes. La solution de sorbitol a été par la suite délicatement aspirée et les cellules re-suspendues dans du milieu de culture frais à un hématoците de 2%.

#### ***iv-2-2- Préparation des solutions d'échantillons de plantes***

Les solutions stocks d'échantillons de plantes de concentration de 1 mg/ml ont été préparées en dissolvant chaque échantillon dans du DMSO 10% pour un volume final de 1ml. Les solutions préparées ont été stérilisées par filtration à l'aide d'un filtre de 0,22 µm. Ensuite la gamme de 8 concentrations (20 µg/ml à 0,256.10<sup>10</sup> µg/ml ) a été réalisée en diluant chaque solution stock fraîchement préparée dans du RPMI 1640 supplémentée de façon à avoir une concentration maximale de 0,2 % (v/v) en DMSO dans le milieu final. Le contrôle positif constitué d'Artémisinine à 1 µM a été dilué suivant le même procédé.

#### ***iv-2- 3- Test d'activité antiplasmodiale***

Des volumes égaux (100µl) de solution d'échantillon de plante et de culture à une parasitémie de 1% et un hématoците de 4% ont été ajoutés et bien homogénéisés dans une plaque de culture à fond plat. Le témoin négatif était constitué de la culture et d'un volume égal de DMSO (0,2%), alors que les témoins positifs contenaient 1 µM d'Artémisinine (Sigma). Ces plaques ont été ensuite incubées à 37°C pendant 48 heures correspondant à un cycle intra-érythrocytaire de *P. falciparum*.

A la fin de la période d'incubation, les parasites à leur stade d'évolution en anneau ont été fixés en remplaçant le milieu sérique par un volume égal de formaldéhyde à 1% dans du PBS pendant 48 heures, dans le but de stopper tout métabolisme et toute évolution du cycle évolutif. Des aliquotes (50µl) de ces dernières solutions ont été distribués dans des tubes en polystyrène de 5 ml contenant 0,5 ml de Triton X-100 à 0,1% (v/v) et 1 nM de colorant nucléaire YOYO (Molecular Probes) dans du PBS qui se fixe sur l'ADN des parasites. Les parasitémies des cultures ainsi traitées ont été déterminées par cytométrie de flux à l'aide d'un appareillage de type Becton-Dickinson FACSort flow cytometer. Le principe de cette méthode repose sur le comptage des érythrocytes, ceux infectés émettant une fluorescence qui résulte de l'ADN du parasite marqué par le colorant. Cette méthode peut permettre une vitesse de comptage aussi importante que 25000 cellules par seconde. Pour chacun de nos essais, 10.000 cellules étaient comptées et la proportion parasitée automatiquement déterminée par l'appareil.

Le traitement des données a été fait grâce au logiciel CellQuest. Ces dernières étaient normalisées en pourcentage d'activité par rapport au témoin négatif. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Parasitémie du puits témoin} - \text{Parasitémie du puits test}}{\text{Parasitémie du puits témoin}} \times 100$$

Les CI<sub>50</sub> ont ensuite été évaluées à l'aide du logiciel Prism 5.0 (GraphPad), avec les données normalisées suivant une régression non linéaire selon la formule suivante :

$$Y = 100 / [1 + 10^{(\log \text{CI}_{50} - X) H}]$$

Où  $H$  est le coefficient de pente (**Singh et Rosenthal, 2001**).

## ***v-Evaluation de la cytotoxicité sur les cellules HFF (Human Foreskin Fibroblasts)***

Le test de cytotoxicité a été effectué au sein de l'Unité des Agents Antimicrobiens du Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes Médicinales du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé 1, Cameroun. Il a été effectué tel que décrit par **Boyom et al. (2014)**. Les cellules HFF sont maintenues en culture continue au sein du dit laboratoire et les essais ont été effectués sous hotte microbiologique dans les conditions aseptiques.

### ***v-1- Culture des cellules HFF***

Les cellules HFF (ATCC-HS68) ont été cultivées dans des flacons de culture de 25 et 75 cm<sup>2</sup> dans du "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM), supplémenté à 10% de sérum bovin fœtal (FBS) inactivé (Annexe 5).

La culture des cellules HFF a été réalisée en continue. Cette culture a été réalisée dans une boîte de culture cellulaire de 75 cm<sup>2</sup>. Dans 1 ml culture déjà existante, 9 ml de milieu ont été introduit et le mélange a été incubé pendant 72 heures à 28°C. Le milieu de culture est renouvelé tous les 72 heures. Afin d'éviter toute contamination, la vérification de la culture se faisait tous les trois jours au microscope optique.

Le test a été effectué sur les cellules en phase exponentielle ; moment où les cellules sont au meilleur de leur forme. De ce fait, lorsque la culture atteignait la charge de 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> cellules/ml, on la repiquait afin de diminuer la concentration. Ainsi, le contrôle de la charge cellulaire s'est fait par comptage sur cellule de Neubauer.

Le comptage des cellules a été effectué par microscopique en utilisant la cellule de Neubauer.

Tout d'abord, la viabilité des macrophages doit être confirmée. Pour y parvenir, 10 µl de la suspension cellulaire après détachement des cellules ont été ajoutés à 10 µl de 0,4% de solution de trypan bleu. Le mélange a été par la suite incubé pendant quelques minutes à la température ambiante. Après incubation, la numération cellulaire a été effectuée.

Seules les cellules viables ont été comptées. Les cellules ayant un cytoplasme de coloration bleue sont des cellules mortes.

### ***v-2- Test de cytotoxicité sur les cellules HFF***

Le test a été réalisé suivant le protocole décrit par **Boyom *et al.* (2014)**. C'est un test colorimétrique au 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium/méthosulfate de phénazine, inner salt (MTS/PMS). La méthode est basée sur la réduction du MTS (teinte jaune) en formazan (teinte marrone) par les enzymes mitochondriales des cellules viables.

Les cellules HFF ont été introduites dans des microplaques de 96 puits (Costar, USA) à la charge de  $1 \times 10^4$  cellules/ml. Vingt-quatre heures après incubation à 37°C, atmosphère humidifiée CO<sub>2</sub>, le milieu a été retiré et 100µl des différentes concentrations (10µg/ml à 0,03907µg/ml) d'échantillon de plante préparées dans du DMSO 2% ont été introduites. Les puits n'ayant que les cellules sans inhibiteurs constituaient les contrôles négatifs. Les cultures ont été par la suite incubées pour 24h à 37°C, atmosphère humidifiée CO<sub>2</sub>. Après incubation, 20 µl de MTS/PMS (Promega) (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium/méthosulfate de phénazine, inner salt) ont été ajoutés dans chaque puits et les plaques ont été une fois de plus incubées pendant 1 h 30 min. L'absorbance a été lue pour chaque puits à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Biotek EL800, USA). Le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire a été calculé à partir des densités optiques par rapport au contrôle négatif et les concentrations cytotoxiques 50 (CC<sub>50</sub>) ont été déterminées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0. Les tests ont été réalisés en triplicité.

Les indices de sélectivité ont été déterminés suivant la formule :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Concentration cytotoxique 50 (CC50)}}{\text{Concentration inhibitrice 50 (CI50)}} \times 100$$

La leishmaniose est l'une maladie les plus meurtrières maladies tropicales négligées dans le monde. Les *Leishmania* sont de plus en plus résistantes aux médicaments disponibles, soulignant ainsi le besoin urgent de nouveaux médicaments avec une efficacité améliorée et des modes d'action innovants. *Leishmania* et *Plasmodium* sont des protozoaires pathogènes qui partagent un certain nombre de voies métaboliques qui constituent leur faiblesse tout comme leur force. Par conséquent, le criblage des extraits actifs contre *P. falciparum* sur *Leishmania*,

un agent pathogène lié est une approche crédible dans la découverte de médicaments. Dans ce cadre, les extraits bruts éthanoliques, les fractions au chlorure de méthylène des différents organes d'*A. muricata*, *A. reticulata* et *A. senegalensis* ainsi que les composés majoritaires obtenus respectivement des racines et écorces d'*A. muricata* ont été testés contre les promastigotes et amastigotes intracellulaires de *L. major* et *L. donovani* en culture.

### ***vi- Evaluation de l'activité antileishmaniale***

L'évaluation des activités antileishmanioses a été effectuée au Laboratoire de Parasitologie Moléculaire, Département de Parasitologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Granada en Espagne. Cette étude a été réalisée suivant le protocole décrit par **Gonzalez *et al.* (2005)**. Toutes les manipulations ont été effectuées sous une hotte à flux laminaire dans les strictes conditions de stérilité.

#### ***vi-1- Evaluation de l'activité antileishmaniale sur les promastigotes***

L'activité antileishmaniale sur les promastigotes de *L. donovani* et *L. major* a porté sur les extraits bruts éthanoliques, les fractions au chlorure de méthylène des trois plantes, la sous fraction 31 des écorces (AnMecSF31) d'*A. muricata* et sur le composé (AnMrP1) isolé des racines d'*A. muricata*.

##### ***vi-1-1- Culture in vitro des promastigotes de L. donovani et L. major***

Les promastigotes de *L. donovani* et *L. major* ont été respectivement cultivés dans les Trypanosomes Liquid Medium (MTL) 10% de FBS et le RPMI 1640 10% de FBS.

### ***vi-1-1-1- Maintenance de la culture des parasites***

Les promastigotes de *L. donovani* (LCR-133) et *L. major* (MHOM/IL/81/Friedlin) ont été maintenue en culture continue. Cette culture a été réalisée dans une boîte de culture cellulaire de 75 cm<sup>2</sup>. Dans 3 ml de solution parasitaire déjà existante, 15 ml de milieux respectifs ont été introduit et le mélange a été incubé pendant 72 heures à 28°C. Le milieu de culture est changé tous les 72 heures. Afin de vérifier toute contamination, le contrôle de la culture se faisait tous les jours au microscope à inversion.

Le test a été effectué sur les promastigotes en phase exponentielle ; moment où les parasites sont au meilleur de leur forme. De ce fait, lorsque la culture atteignait la charge de 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> parasites/ml, on la repiquait afin de diminuer la concentration.

La détermination de la concentration parasitaire s'est faite par comptage sur cellules de Neubauer.

### ***vi-1-2-Préparation des solutions d'extraits et des produits***

Les solutions stocks d'extraits et de produits de concentration 20 mg/ml ont été préparées en dissolvant chaque échantillon dans du DMSO 100%. Dans le but d'avoir une concentration finale de 1% de DMSO, concentration à laquelle le DMSO n'est pas toxique et ne modifie pas la croissance parasitaire, 50 µl de la solution stock précédemment préparée ont été prélevés et introduits dans un flacon contenant 4950 µl de milieu de culture sans sérum. Ainsi une solution de travail de concentration 200 µg/ml a été obtenue.

Les solutions préparées ont été stérilisées par filtration à l'aide d'un filtre de 0,22 µm. Après préparation, ces solutions ont été conservées à 4°C pour usage ultérieure.

### ***vi-1-3- Test d'activité sur les promastigotes***

Les formes promastigotes de *L. donovani* et *L. major* cultivées sous la forme précédemment décrite ont été récoltées en phase exponentielle de croissance grâce à une centrifugation à 1500 rotation par minute (RPM) durant 10 minutes. Le nombre de parasite a été compté grâce à la cellule de Neubauer.

Les tests ont été réalisés en plaques de 24 puits dont le volume final par puits était de 500µl. Les échantillons des plantes précédemment préparés (200 µg/ml; DMSO 1%) ont été directement dilués dans chaque puits avec le milieu de culture pour une concentration finale de 50, 25, 10, et 1 µg/ml pour une charge parasitaire de  $5 \times 10^5$  parasites/ml. Le témoin négatif est constitué de la culture et d'un volume égal de solution de DMSO. Le témoin positif, le Glucantime a été testé aux mêmes concentrations. Les tests ont été réalisés en triplicité. Les plaques ont été ensuite incubées à 28°C pendant 48 heures.

A la fin de la période d'incubation, les parasites ont été comptés en utilisant la cellule de Neubauer au microscope optique et les pourcentages d'inhibition déterminés par rapport au témoin négatif selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Nbre de parasites du puits témoin} - \text{Nbre de parasite du puits test}}{\text{Nbre de parasite du puits témoin}} \times 100$$

Les  $CI_{50}$  ont été calculées en utilisant une analyse de régression linéaire à partir des valeurs de Kc aux concentrations utilisées.

Les formes promastigotes étant les formes du parasite que l'on retrouve chez l'agent vecteur et pas responsable de la maladie chez l'homme, nous nous sommes proposé d'évaluer également l'activité des plantes sur les amastigotes intracellulaires. Ceci permettra de tenir compte des aspects cruciaux de sa biologie, en donnant la possibilité d'identifier les facteurs critiques pour la mise en place de l'infection de l'hôte. Ainsi, l'indice de spécificité qui se définit comme étant la valeur obtenue après division de la  $CI_{50}$  obtenue sur les formes promastigotes par la  $CI_{50}$  obtenue sur les formes amastigotes intracellulaires sera déterminé.

## ***vi-2- Evaluation de l'activité antileishmaniale sur les amastigotes intracellulaires***

Les amastigotes étant intracellulaires, une étude préliminaire de susceptibilité des macrophages J774.2 vis-à-vis des extraits a été réalisée dans le but de déterminer la plus grande concentration d'extrait pouvant être incubée avec les macrophages sans dommages significatifs et de déterminer les indices de sélectivité.

### ***vi-2-1- Evaluation de la susceptibilité des macrophages J774.2 sains aux extraits***

L'étude a été réalisée suivant le protocole décrit par **Ramirez *et al.* (2012)** et **Gonzalez *et al.* (2005)**.

#### ***vi-2-1-1- Culture in vitro des macrophages J 774.2***

Les macrophages ont été cultivés dans des flacons de culture de 25 et 75 cm<sup>2</sup> dans du "Minimum Essential Medium" (MEM) avec de la glutamine (2 mM), supplémenté à 20% de FBS.

Les macrophages J774.2 ont été maintenus en culture continue. Cette culture a été réalisée dans une boîte de culture cellulaire de 75 cm<sup>2</sup>. La culture a été maintenue dans l'incubateur à 37°C, 95% oxygène et 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu a été renouvelé tous les trois jours. Les tests ont été effectués sur les macrophages en phase exponentielle.

Les macrophages étant des cellules adhérentes, leur détachement s'est fait par utilisation de la trypsine/EDTA 0,4%. Ainsi, la monocouche cellulaire des macrophages a été recouverte d'environ 3 ml de trypsin/EDTA 0,4% et l'ensemble incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite le flacon de culture est agité et le mélange centrifugé à 1500 RPM pendant 10 minutes. Après élimination du surnageant, le milieu frais est ajouté au culot.

Le comptage des cellules a été effectué par microscopique en utilisant la cellule de Neubauer. La viabilité a été effectuée grâce au trypan bleu tel que décrit précédemment.

### ***vi-2-1-2-Test de susceptibilité sur les macrophages J774.2***

Le test a été réalisé utilisant la méthode de cytométrie de flux tel que décrite par **Gonzalez *et al.* (2005)**. Les essais ont été effectués dans des microplaques de 24 puits (Costar, Cambridge, MA, USA).

La densité cellulaire de  $1 \times 10^4$  cellules/puits a été utilisée. Après 24 heures d'incubation à 37°C, atmosphère 5% CO<sub>2</sub>, (après que les cellules ont adhéré et formé une monocouche), le milieu a été retiré et remplacé par un milieu de culture frais. Les puits ont été ensuite traités avec les différents extraits/composés à des concentrations de 50 µg/ml ; 25 µg/ml ; 10 µg/ml et 0,1 µg/ml. Le témoin négatif était la solution de DMSO 0,5%. Le témoin positif, le Glucantime a été testé aux mêmes concentrations.

Après 72 heures d'incubation à atmosphère humidifiée de 95% d'air et 5 % de CO<sub>2</sub> à 37°C, le milieu de chaque puits a été retiré et 500µl de solution de Trypsin/EDTA 0,4% ont été ajoutés puis les plaques ont été incubées à température ambiante pendant 5 minutes. La solution de trypsin/EDTA 0,4% a été retirée par la suite et le milieu retiré précédemment réintroduit et le contenu homogénéisé à l'aide de micropipette en vue du détachement des cellules. Le contenu de chaque puits a été introduit dans un embout.

Par la suite, 100 µl/puits de solution d'iodure de propidium (100 mg/ml) ont été ajoutés et les plaques incubées pendant 10 min à 28°C dans l'obscurité. Ensuite, 100 µl/puits de diacétate de fluorescéine (100 ng/ml) ont été ajoutés et les plaques incubées dans les mêmes conditions.

Enfin, les cellules ont été récupérées par centrifugation à 400 g pendant 10 min et le précipité lavé avec du tampon phosphate salin (PBS).

Analyse a été réalisée avec un cytomètre de flux FACSVantage (Becton Dickinson). Les tests ont été réalisés en duplicate pour chaque concentration. Le pourcentage de viabilité a été calculé par comparaison avec la culture témoin. La CI<sub>50</sub> a été calculée en utilisant une analyse de régression linéaire à partir des valeurs de Kc aux concentrations utilisées.

Les indices de sélectivité des extraits de plantes ont été déterminés en fonction de leur activité antileishmaniale (CI<sub>50</sub>) et la cytotoxicité sur les macrophages (CC<sub>50</sub>).

Seules les fractions au chlorure de méthylène des trois plantes, la sous fraction 31 des écorces (AnMecSF31) d'*A. muricata* et le composé (AnMrP1) isolé des racines d'*A. muricata* ont été sélectionnés pour l'évaluation de l'activité antileishmaniale sur les amastigotes intracellulaires. Cependant compte tenu des CC<sub>50</sub> obtenues sur les macrophages, les fractions au chlorure de méthylène et le produit isolé des écorces d'*A. muricata* ont été testées aux concentrations de 1,5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml et 0,1 µg/ml, tandis que le produit isolé des racines d'*A. muricata* a été testé aux concentrations de 35 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml et 0,1 µg/ml.

### ***vi-2-2-Transformations des promastigotes en formes métacycliques***

En vue de permettre une infectivité des macrophages par les parasites, la métacyclogenèse a été induite suivant le protocole décrit par **Osuna *et al.* (1990)**. Ainsi, les formes promastigotes de *L. donovani* et de *L. major* ont été incubées à 28 °C pendant 11 jours respectivement dans le MTL 10% et le RPMI 1640 10% tous deux modifiés par diminution du pH (de 7 à 6,5). Après incubation, les formes métacycliques ont été utilisées afin d'infecter des cellules J774.2.

### ***vi-2-3- Infection des macrophages***

Les macrophages ont été mis en culture à une densité de  $1 \times 10^4$  cellules par puits dans des microplaques. Chaque puits a été au préalable recouvert d'une lamelle couvre-objet en borosilicate. Les plaques ont été incubées à 37°C, 95% Oxygène et 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 24 heures pour permettre aux cellules d'adhérer sur la lamelle sous forme d'une monocouche. Après, le milieu a été retiré et les formes promastigotes métacycliques de parasites ( $1 \times 10^6$  parasites/ml) ont été ajoutées et les plaques incubées pendant 24 heures pour permettre aux parasites d'infecter les macrophages.

Après incubation, la culture infectée par les parasites a été lavée au moins trois fois avec 500 µl de milieu MTL sans sérum dans chaque puits afin d'assurer l'élimination complète de promastigotes non internalisés.

#### ***vi-2-4- Test d'activité sur les amastigotes intracellulaires***

Après le processus d'infection, les extraits/produit ont été ajoutés aux concentrations de 0,01 à 35µg/ml et les plaques ont été incubées pendant 72 heures à 37°C, 95% Oxygène et 5 % de CO<sub>2</sub>.

Les tests ont été effectués en triplicité. La solution du DMSO a été utilisée comme témoin négatif et le Glucantime utilisé comme témoin positif.

Après incubation, le milieu a été enlevé et les macrophages, adhérents aux lamelles de verre, ont été fixés durant 30 secondes avec du méthanol absolu. Une fois séchés dans un biocapot sous flux d'air pour le séchage pendant 5 minutes, les lamelles ont été collées sur des lames porte-objet en verre à l'aide d'Entellan (Merck). Elles ont ensuite été colorées durant 20 minutes à température ambiante par une solution de Giemsa (G S1L-1L, Sigma) diluée à 1/10 dans de l'eau distillée puis filtrée à 0,45 µm. Par la suite, elles ont été lavées une fois avec de l'eau et laissées sous l'écoulement de l'air pour le séchage.

L'observation microscopique s'est faite à l'objectif 100x avec l'huile à immersion.

L'activité a été déterminée à partir du pourcentage d'inhibition. Le pourcentage des cellules infectées et le nombre moyen d'amastigotes par cellules a été déterminé par l'analyse de 200 cellules hôtes distribuées dans des champs microscopiques choisis au hasard suivant la formule ci-contre.

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Nbre de parasites du puits témoin} - \text{Nbre de parasite du puits test}}{\text{Nbre de parasite du puits témoin}} \times 100$$

Les CI<sub>50</sub> ont été calculées en utilisant une analyse de régression linéaire à partir des valeurs de Kc aux concentrations utilisées. Les tests ont été réalisés en triplicate.

#### ***vi-2-5- Caractérisation phénotypique des macrophages J774.2 infectés***

Dans le but d'élucider les possibles modifications phénotypiques qu'exerceraient les extraits de plantes sur les amastigotes à l'intérieur des macrophages J774.2, une observation

microscopique a été réalisée. Pour ce fait, les lamelles colorées au Giemsa précédemment obtenues ont été observées à l'objectif 100x avec l'huile à immersion et les images ont été capturées à l'aide d'une caméra incorporée au microscope tel que décrit par **Sheng-Xia *et al.* (2008)**.

Les données ont été comparées à celles obtenues pour le témoin négatif.



**CHAPITRE III:  
RESULTATS ET DISCUSSION**

## III-1- Préparation des fractions au chlorure de méthylène et chromatographie flash

### *i- Sélection des plantes Résultats*

#### *i-1-Résultats*

##### *i-1-1- Répartition des informateurs*

Le tableau VI suivant présente la distribution des personnes interrogées au cours de l'enquête ethnopharmacologique.

**Tableau VI : Distribution des informateurs**

Site d'étude	Nombre d'informateur	Sex (%)		Classe d'âge
		Male	Femele	
Yaoundé et ses environnements	4	1(25%)	3(75%)	40-65
Kon-Yambeta	4	3(75%)	1(25%)	40-65
Mbalmayo	5	2(40%)	3(60%)	40-54
Ngoyang	6	6(100%)	0(0%)	30-50
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>12(63,16%)</b>	<b>7(36,84%)</b>	<b>30-65</b>

Trente informateurs ont été sélectionnés sur la base d'une enquête préliminaire menée en vue de leur participation à l'étude. Cependant, seulement 19 informateurs ont accepté de collaborer et par conséquent ont été inclus dans l'étude après avoir signé le formulaire de consentement éclairé. Sept d'entre eux étaient des tradipraticiens herboristes.

### *i-1-2- Répartition des plantes identifiées*

Les plantes du genre *Annona* recensées et leur écologie sont représentées dans le tableau VII suivant.

**Tableau VII : Plantes recensées et écologie**

Plantes identifiées	Localité d'identification			
	Yaoundé et ses environnements	Ngoyang	Kon- Yambeta	Mbalmayo
<i>A. muricata</i> L.	1	0	1	1
<i>A. reticulata</i> L.	1	0	0	0
<i>A. senegalensis</i> P.	0	0	1	0
<i>A. squamosa</i> L.	1	0	1	0

1= Espèce recensée ; 0= Non recensé

Quatre espèces du genre *Annona* (*A. muricata*, *A. reticulata*, *A. senegalensis* et *A. squamosa*) ont été identifiées comme étant utilisées dans la préparation de remèdes à base de plantes contre le paludisme et de ses symptômes dans les quatre sites d'étude. *A. muricata* est la seule plante trouvée dans trois des quatre sites d'études.

Le criblage d'activité préliminaire a confirmé l'activité biologique d'*A. muricata* (Boyom *et al.*, 2011).

Au terme de l'enquête ethnopharmacologique et du criblage d'activité préliminaire, trois des quatre plantes identifiées ont été sélectionnées pour la suite du travail à savoir *A. muricata*, *A. reticulata* et *A. senegalensis*.

### *i-2- Discussion*

Les résultats de l'enquête ethnopharmacologique corroborent ceux obtenus par d'autres auteurs. En effet ces derniers ont mis en exergue l'utilisation traditionnelle des plantes du genre *Annona* dans le traitement du paludisme ou de ses symptômes dans les pays de la région amazonienne, en Afrique, Amérique centrale, Inde et Malaisie. *Annona muricata* étant la plus utilisée (Longuefosse, 2003; Willcox *et al.*, 2004; Gómez-Estrada *et al.*, 2011; Koudouvo *et al.*, 2011; Bruschi *et al.*, 2011; Chavan *et al.*, 2014).

## ***ii-Extraction et partition***

### ***ii-1- Résultats***

Sur la base des résultats de l'enquête ethnopharmacologique et de l'accessibilité, trois plantes du genre *Annona* ont été sélectionnées pour notre étude à savoir *Annona muricata*, *Annona reticulata* et *Annona senegalensis* et différents organes de chaque plante ont été collectés pour extraction.

Les rendements d'extraction à partir des différents organes de la plante sont consignés dans le tableau VIII.

**Tableau VIII : Rendements d'extraction des différents organes d'*A. muricata*, *A. reticulata* et *A. senegalensis*.**

Plantes	Organes	Nature	Codes	<sup>a</sup> Rendement (%)
<i>A. muricata</i>	Péricarpe	Extrait éthanolique	AnMpEthOH	5,68
		Fraction au chlorure de méthylène	AnMpCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3,54
		Fraction aqueuse	AnMpH <sub>2</sub> O	1,02
	Racines	Extrait éthanolique	AnMrEthOH	6,23
		Fraction au chlorure de méthylène	AnMrCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4,18
		Fraction aqueuse	AnMrH <sub>2</sub> O	0,98
	Ecorces	Extrait éthanolique	AnMecEthOH	5,91
		Fraction au chlorure de méthylène	AnMecCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4,32
		Fraction aqueuse	AnMecH <sub>2</sub> O	0,87
<i>A. reticulata</i>	Feuilles	Extrait éthanolique	AnRfEthOH	10,46
		Fraction au chlorure de méthylène	AnRfCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	9,93
		Fraction aqueuse	AnRfH <sub>2</sub> O	1,71
	Brindilles	Extrait éthanolique	AnRbrEthOH	4,96
		Fraction au chlorure de méthylène	AnRbrCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1,78
		Fraction aqueuse	AnRbrH <sub>2</sub> O	0,53
	Ecorces	Extrait éthanolique	AnRecEthOH	6,02
		Fraction au chlorure de méthylène	AnRecCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3,71
		Fraction aqueuse	AnRecH <sub>2</sub> O	1,04
	Racines	Extrait éthanolique	AnRrEthOH	5,12
		Fraction au chlorure de méthylène	AnRrCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4,54
		Fraction aqueuse	AnRrH <sub>2</sub> O	0,71
	Fruits	Extrait éthanolique	AnRfrEthOH	5,14
		Fraction au chlorure de méthylène	AnRfrCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2,12
		Fraction aqueuse	AnRfrH <sub>2</sub> O	0,48
<i>A. senegalensis</i>	Feuilles	Extrait éthanolique	AnSfEtOH	11,58
		Fraction au chlorure de méthylène	AnSfCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7,61
		Fraction aqueuse	AnSfH <sub>2</sub> O	1,17
	Brindilles	Extrait éthanolique	AnSbrEtOH	1,79
		Fraction au chlorure de méthylène	AnSbrCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0,78
		Fraction aqueuse	AnSbrH <sub>2</sub> O	0,42
	Tiges	Extrait éthanolique	AnStiEthOH	2,51
		Fraction au chlorure de méthylène	AnStiCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1,04
		Fraction aqueuse	AnStiH <sub>2</sub> O	0,91

*A*=*Annona*; *AnMec*=*Annona muricata* écorce; *AnMr*=*Annona muricata* racine; *AnMp*=*Annona muricata* péricarpe; *AnRf*=*Annona reticulata* feuilles; *AnRfr*=*Annona reticulata* fruit; *AnRbr*=*Annona reticulata* brindilles; *AnRec*=*Annona reticulata* écorce; *AnRr*=*Annona reticulata* racine; *AnSf*=*Annona senegalensis* feuilles; *AnSbr*=*Annona senegalensis* brindilles; *AnSti*=*Annona senegalensis* tiges; EthOH=Ethanol; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=chlorure de méthylène; H<sub>2</sub>O=Eau

De l'analyse du tableau VIII, il ressort que les rendements d'extraction par rapport au poids de matière végétale sèche varient de 0,41 à 11,58 % respectivement pour la fraction aqueuse des brindilles d'*A. senegalensis* (AnSbrH<sub>2</sub>O) et l'extrait éthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* (AnSfEthOH).

Les résultats démontrent qu'ils varient selon l'espèce, l'organe, le solvant de partition. Ceci met en exergue la variabilité de l'intensité des voies biosynthétiques dans la plante, en fonction de l'organe considéré. De même que l'affinité des métabolites secondaires par rapport à un solvant ou un système solvant.

## ***ii-2- Discussion***

Les feuilles ont les rendements les plus élevés pour *A. reticulata* et *A. senegalensis*. **Boyom et al. (2011)** ont également obtenu pour *A. muricata* le rendement le plus élevé avec les feuilles. En effet, d'après **Pinto et al. (2005)**, de tous les organes des plantes du genre *Annona*, les feuilles seraient les plus concentrées en divers métabolites secondaires. En effet, c'est à ce niveau que l'essentiel des métabolites des plantes sont usinés à travers les artères de la photosynthèse.

Le rendement obtenu pour l'extrait éthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* (11,85 %) est de loin supérieur aux 7,34% et 8,4% obtenus respectivement par **Fatoumata (2005)** au Mali et par **Magadula et al. (2009)** en Tanzanie. Cette variation de rendement au sein de la même espèce peut être attribuée aux facteurs intrinsèques ou extrinsèques (polymorphisme, sol, climat, etc.). La variation pourrait aussi s'expliquer par la différence du protocole d'obtention de l'extrait. En effet, **Fatoumata (2005)** ont utilisé l'extraction au Soxhlet et **Magadula et al. (2009)** ont macéré pendant 48 heures et le résidu de la plante a été de nouveau macéré qu'une fois de plus. Contrairement à notre protocole, la macération a été faite pendant 72 heures, et afin d'optimiser le rendement d'extraction, le résidu de plante a été de nouveau macéré deux fois de suite avec le solvant récupéré.

### ***iii- Chromatographie flash***

Afin de concentrer et d'isoler un des principes actifs, il a été choisi de procéder à la chromatographie flash des fractions au chlorure de méthylène de certains organes de plante.

#### ***iii-1-Résultats***

##### ***iii-1-1- Rendements***

Deux organes d'*A. muricata* ont été sélectionnés pour leurs activités *in vitro*, leur utilisation traditionnelle contre les maladies parasitaires et leur intérêt d'après la bibliographie. Il s'agit des racines et des écorces d'*A. muricata*. Les rendements d'extraction sont consignés dans le tableau suivant IX suivant.

**Tableau IX : Rendements de la chromatographie flash des fractions CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> des racines et des écorces d'*A. muricata***

Plantes	Organes	Nature	Codes	Rendement (%)
<i>A. muricata</i>	Racines	Sous fractions	AnMrSF1	0,56
			AnMrSF2	0,33
			AnMrSF3	1,07
			AnMrSF4	0,38
			AnMrSF5	1,15
			AnMrSF6	0,47
			AnMrSF7	0,31
			AnMrSF8	0,009
		Composé	AnMrP1	0,016
	Ecorces	Sous fractions	AnMecSF1	0,43
			AnMecSF2	0,11
			AnMecSF3	0,22
			AnMecSF4	0,62
			AnMecSF5	0,016
			AnMecSF6	0,02
			AnMecSF7	0,13
			AnMecSF8	0,53
			AnMecSF9	0,04
			AnMecSF10	1,26
			AnMecSF11	0,03
			AnMecSF12	0,09
			AnMecSF13	0,06
			AnMecSF14	0,055
			AnMecSF15	0,08
			AnMecSF16	0,16
			AnMecSF17	0,04
			AnMecSF18	0,02
			AnMecSF19	0,73
			AnMecSF20	0,03
			AnMecSF21	0,03
			AnMecSF22	0,02
			AnMecSF23	0,36
			AnMecSF24	0,41
			AnMecSF25	0,10
			AnMecSF26	0,05
			AnMecSF27	0,02
			AnMecSF28	0,62
			AnMecSF29	0,07
			AnMecSF30	0,31
			AnMecSF31	0,19
			AnMecSF32	0,017
			AnMecSF33	0,05
		AnMecSF34	0,09	
AnMecSF35	0,019			
AnMecSF36	0,22			
AnMecSF37	0,026			
AnMecSF38	0,08			
AnMecSF39	0,05			
AnMecSF40	0,021			
AnMecSF41	0,09			
AnMecSF42	0,07			
AnMecSF43	0,017			
Composés	AnMecP1	0,014		
	AnMecP2	0,052		
	AnMecP3	0,012		

*AnMr*=*Annona muricata* racine; *AnMec*=*Annona muricata* écorce; *SF*=sous fractions; *P*=Produit.

### ***iii-1-2- Structures des composés isolés des racines et des écorces de la fraction au chlorure de méthylène d'*A. muricata****

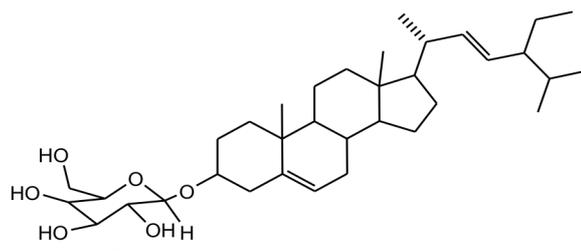
Quatre composés connus ont été isolés des racines (AnMrP1) et des écorces (AnMecP1, AnMecP2 et AnMecP3) d'*A. muricata*. L'élucidation de la structure a été basée sur l'interprétation des spectres de RMN, SM, HMBC, HSQC et COSY.

#### ***iii-1-2-1-Structure du composé AnMrP1***

Le composé AnMrP1 se présente sous forme de poudre blanchâtre et a été obtenu dans le système solvant AE/MeOH 5%. Il est soluble dans la pyridine.

Son spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Figure 17) montre à  $\delta_{\text{H}}$  5,35 ppm ; 5,15 ppm et 5,05 ppm des signaux attribuables aux protons H-6, H-22 et H-23 du phytostérol le stigmastérol respectivement. On note également la présence d'un sucre dont les protons apparaissent entre  $\delta_{\text{H}}$  2,9 ppm et 4,22 ppm avec le proton anomérique apparaissant à  $\delta_{\text{H}}$  4,21 ppm.

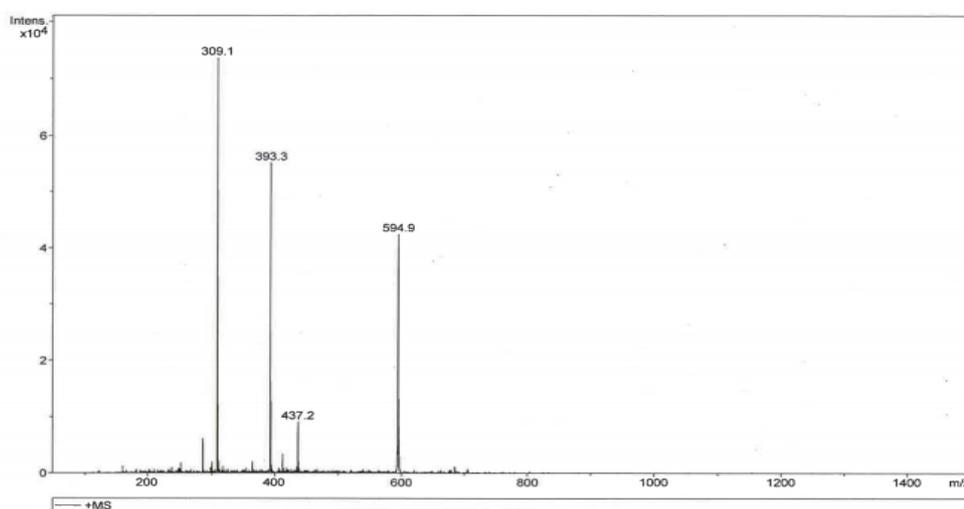
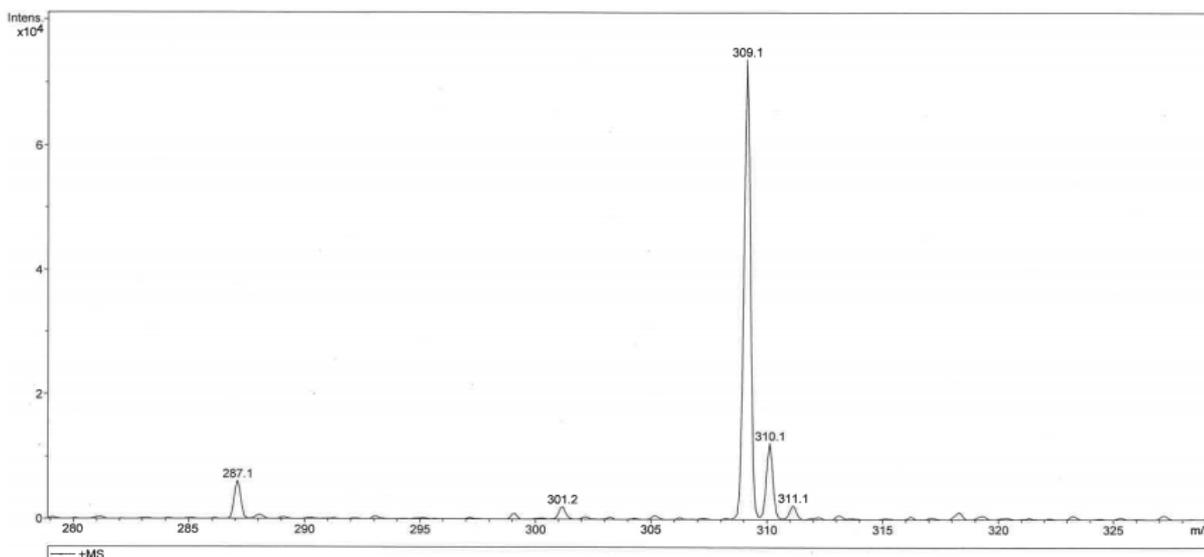




**Figure 18 : Structure de AnMrP1 : 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de stigmasterol**

### *iii-1-2-2- Structure du composé AnMecP1*

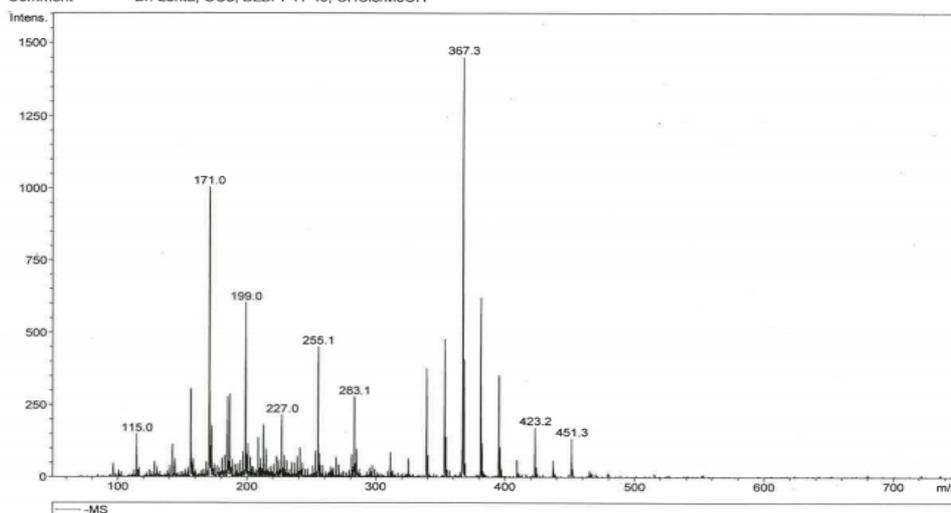
Le composé AnMecP1 a été isolé dans le système solvant 5% Hex/AE. Il est soluble dans le chloroforme/méthanol et se présente sous la forme d'une poudre jaune. Son spectre de masse haute résolution NanoESI (Figure 19), en mode positif, présente un pic pseudomoléculaire à  $m/z$   $[M-H]=287,1$  correspondant à la formule brute  $C_{16}H_{14}O_5$  (masse théorique calculée : 286). Cette formule brute est confirmée par la présence des pics ;  $m/z$   $[M-Na]=309,1$  ;  $m/z$   $[2M-H]^+=594,9$ . On observe également des fragments significatifs à  $m/z$  255,1 (-CHO), 227 (-CH<sub>2</sub>O) et 199 (-CO).



**Acquisition Parameter**

Mode	
Ion Source Type	NanoESI, of
Ion Polarity	Positive
Mass Range Mode	Std/Normal
Scan Begin	50 m/z
Scan End	1500 m/z
Averages	30 Spectra
Rolling	on
Rolling, Averages	3 cts
Tune SPS	
Target Mass	400 m/z
Compound Stability	40 %
Smart Parameter Setting	active
Tune Instrument	
Trap Drive	40.8
Octopole RF Amplitude	120.0 Vpp
Lens 2	-60.0 Volt
Capillary Exit	91.8 Volt
Skim 1	22.9 Volt
Skim 2	6.0 Volt
Lens 1	-5.0 Volt
Cap Exit Offset	69.9 Volt
Octopole	2.54 Volt
Octopole Delta	2.40 Volt
Dry Temp (Set)	100 °C
Nebulizer (Set)	2.00 psi
Dry Gas (Set)	2.00 l/min
Accumulation Time	3681 µs
ICC Target	5000
Charge Control	on

Comment Br. Lenta, OC3, BLBPF41-49, CHCl<sub>3</sub>/MeOH



**Acquisition Parameter**

Mode	
Ion Source Type	NanoESI, off-li
Ion Polarity	Negative
Mass Range Mode	Std/Normal
Scan Begin	50 m/z
Scan End	1500 m/z
Averages	25 Spectra
Rolling	on
Rolling, Averages	2 cts
Tune SPS	
Target Mass	400 m/z
Compound Stability	40 %
Smart Parameter Setting	active
Tune Instrument	
Trap Drive	28.3
Octopole RF Amplitude	120.0 Vpp
Lens 2	60.0 Volt
Capillary Exit	-91.8 Volt
Skim 1	-22.9 Volt
Skim 2	-6.0 Volt
Lens 1	5.0 Volt
Cap Exit Offset	-69.9 Volt
Octopole	-2.54 Volt
Octopole Delta	-2.40 Volt
Dry Temp (Set)	100 °C
Nebulizer (Set)	2.00 psi
Dry Gas (Set)	2.00 l/min
Accumulation Time	73652 µs
ICC Target	5000
Charge Control	on

Figure 19 : Spectre de masse NanoESI de AnMecP1

Le spectre proton (Figure 20), montre la présence d'un composé aromatique à deux singlets à 3,89 ppm (3H, OCH) et 3,91 ppm (3H, OCH), un méthyl singulet à 2,87 ppm (3H, CH). Quatre doublets de protons sont observés à 6,32 ppm (1 H,  $J=2,15$  Hz), 6,35 ppm (1 H,  $J=2,18$  Hz), 6,68 ppm (1 H,  $J=2,18$  Hz) et 6,70 ppm (1 H,  $J=2,18$  Hz), tout ceci correspondant à deux noyaux insaturés, l'un portant un hydroxyl dont la présence est matérialisée par le singlet observé à 13,50 ppm (1 H, OH).

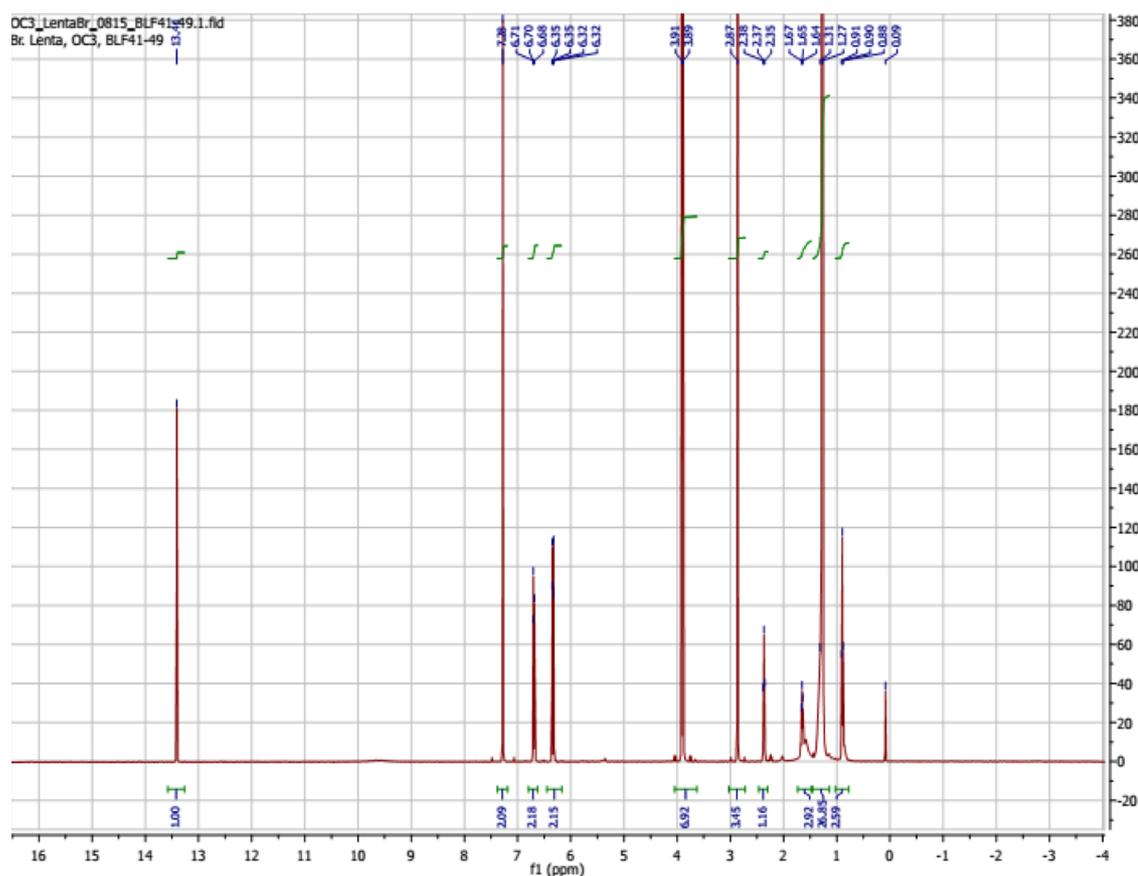


Figure 20 : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) de AnMecP1

Le spectre carbone (Figure 21) montre un total de 16 signaux de carbones entre 30,2 ppm et 180,3 ppm indicatifs des xanthones.

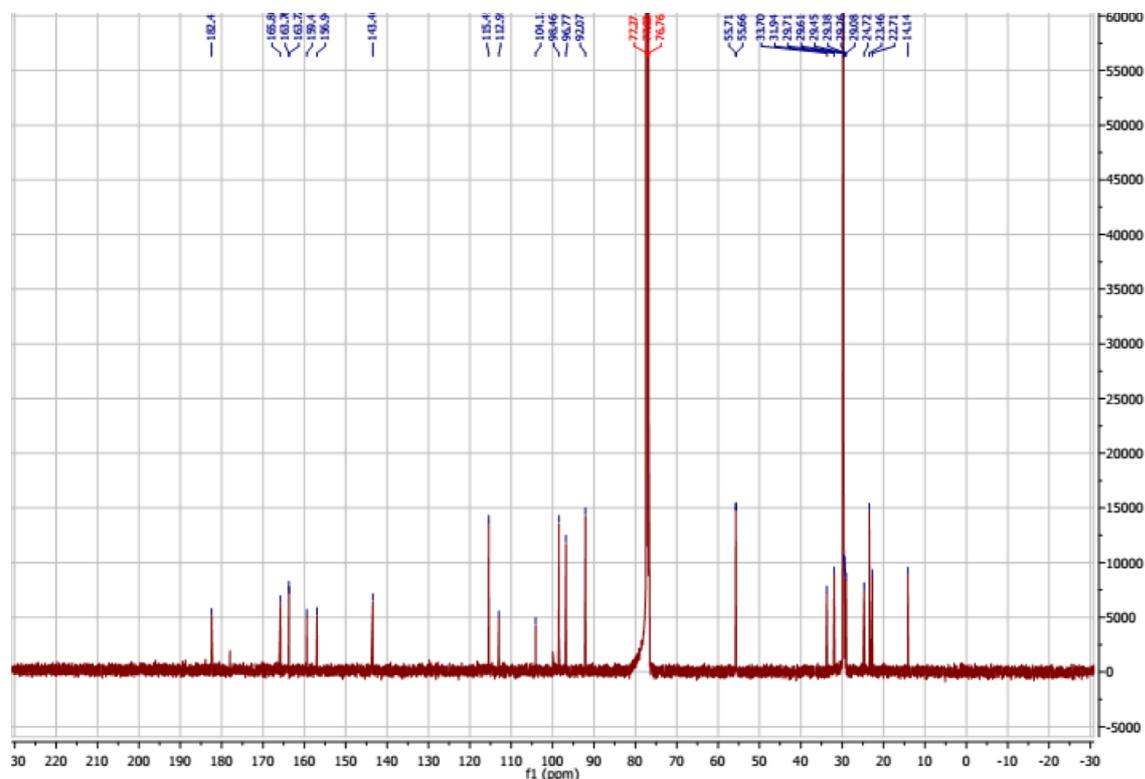
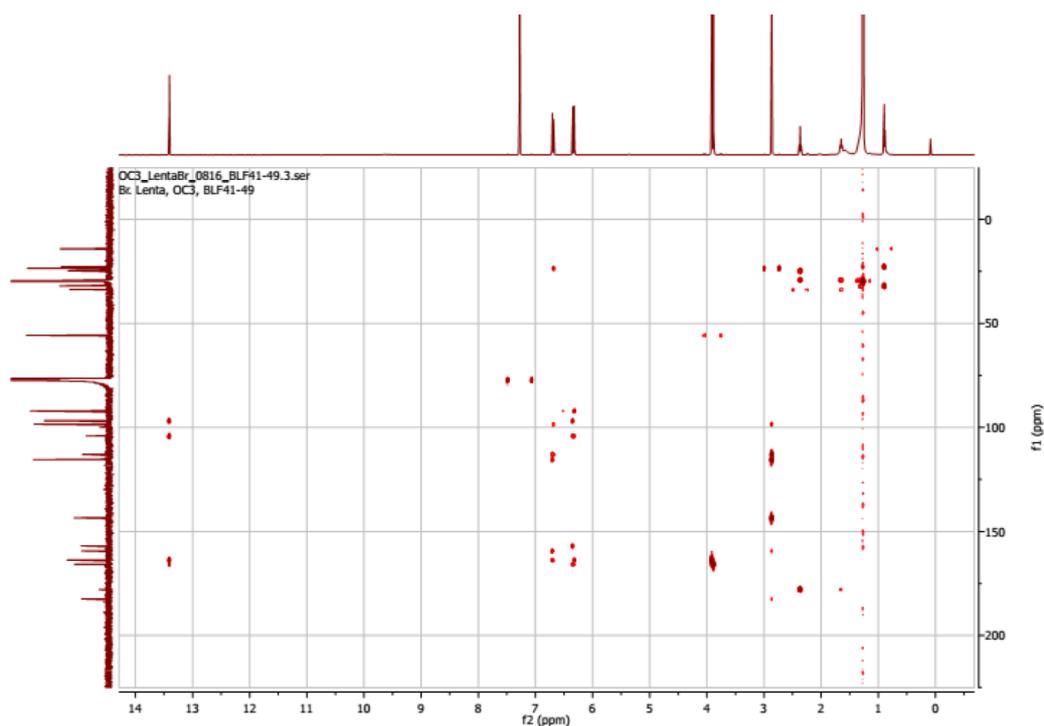


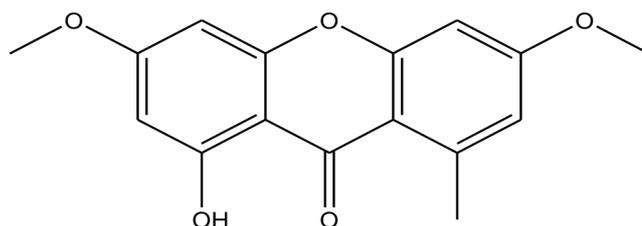
Figure 21 : Spectre de <sup>13</sup>C de AnMecP1

Les spectres protons, carbones et COSY montrent la présence d'un acide gras à longue chaîne aliphatique. Cependant, l'analyse du spectre HMBC (Figure 22) montre que les protons de la chaîne aliphatique de l'acide gras ne voient pas les carbones de la xanthone, ce qui signifie que nous sommes en présence d'un mélange de la lichexanthone et d'une impureté correspondant à l'acide gras qui est en trace. Par rapport à l'acide gras, les spectres dont nous disposons ne nous permettent pas de déterminer la structure entière de l'acide.



**Figure 22 : Spectre HMBC de AnMecP1**

D'après toutes ces données spectrales, et par comparaison avec les données de littérature (**Letcher *et al.*, 1968; Carvalho *et al.*, 2009; Buitrago *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011**), cette xanthone a été identifiée au 1-hydroxy 3,6-diméthoxy-8-méthylxanthone connu sous le nom de lichexanthone dont la structure est illustrée par la figure 23 ci-contre.

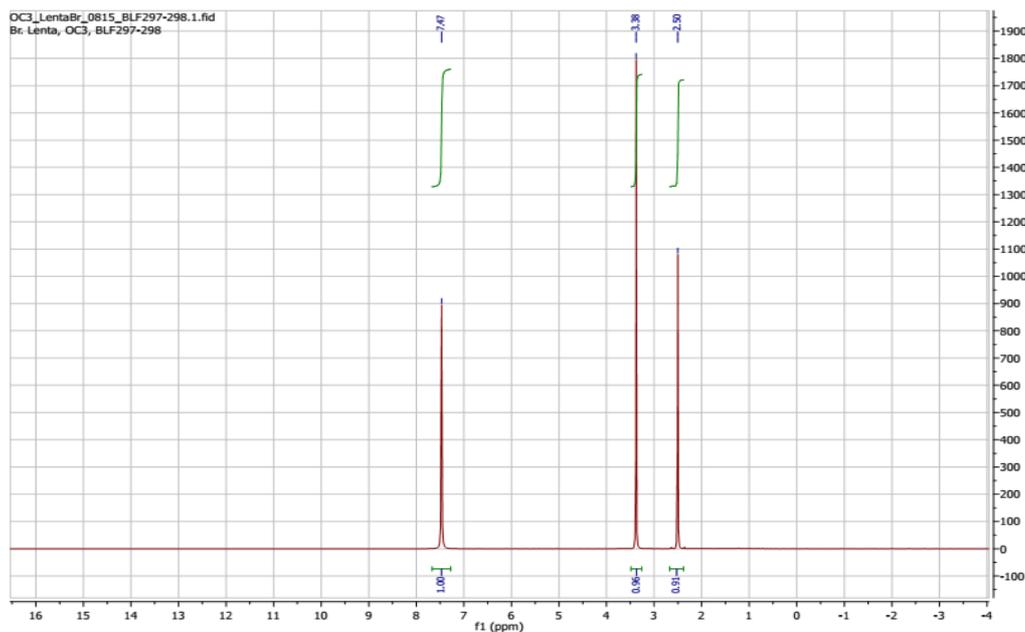


**Figure 23 : Structure de AnMecP1: Lichexanthone**

### *iii-1-2-3- Structure du composé AnMecP2*

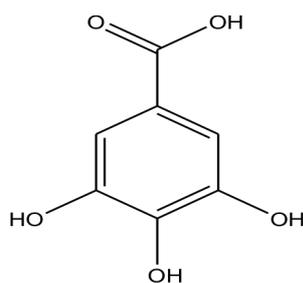
AnMecP2 se présente sous forme de poudre amorphe blanche. Il a été obtenu dans le système solvant AE/MeOH 5%.

Il est soluble dans le DMSO. Son spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Figure 24) fait ressortir un singulet caractéristique des protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}$  de 7,47 ppm.



**Figure 24 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO) de AnMecP2**

Le nombre de protons de ce signal fait penser à l'existence d'élément de symétrie dans la structure de AnMecP2. Compte tenu donc de toutes ces données et de la littérature (Eldahshan, 2010; Zhang *et al.*, 2012), la structure ci-dessous (Figure 25) qui est celle de l'acide 3,4,5-trihydroxy-benzoïque, connu sous le nom d'acide gallique a été attribuée au composé AnMecP2.

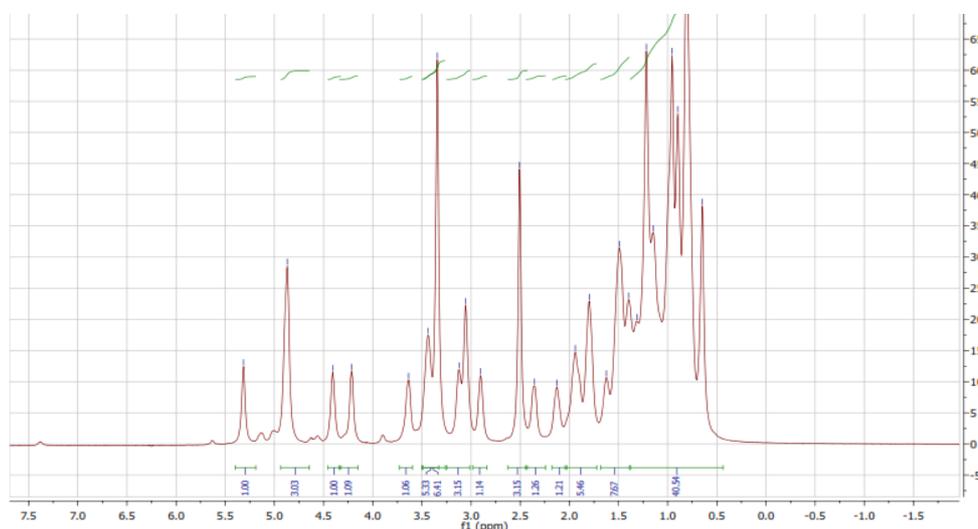


**Figure 25 : Structure de AnMecP2 : Acide gallique**

### *iii-1-2-4- Structure du composé*

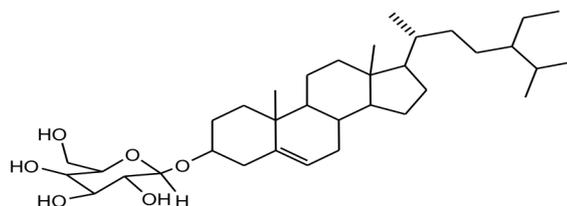
Le composé AnMecP3 se présente sous forme de poudre blanchâtre et a été isolé dans le système solvant AE/MeOH 10%. Il est soluble dans la pyridine.

Son spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure 26), comparé à celui de AnMrP1 montre entre  $\delta_{\text{H}}$  3 et 4,41ppm un ensemble de signaux caractéristiques d'un sucre dont le proton anomérique résonne à  $\delta_{\text{H}}$  4,21ppm. On note également la disparition des signaux précédemment attribués aux protons H-22 et H-23 du stigmatérol dans AnMrP1.



**Figure 26 : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Pyridine) de AnMecP3**

D'après la littérature (**Mba'ning, 2012; Ngouela, 1990**) et le spectre carbone, HMBC, HMQC (Annexe 3), le composé AnMecP3 a été identifié au 2-[17-(4-éthyl-1,5-diméthylhexyl)-10,13-diméthyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tétradécahydro-1H-cyclopenta[ $\alpha$ ]phénanthren-3-yloxy]-6-hydroxyméthyl-tétrahydro-pyran-3,4,5-triol, connu sous le nom du 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside de  $\beta$ -sitostérol dont la figure 27 ci-contre représente la structure.



**Figure 27 : Structure de AnMecP3 : 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside de  $\beta$ -sitostérol**

### ***iii-2- Discussion***

La chromatographie flash des racines et écorces des fractions au chlorure de méthylène d'*A. muricata* a conduit à l'obtention des sous fractions et des composés.

Un composé a été isolé des racines (AnMrP1) et identifié comme étant le 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside de stigmastérol. Ce produit a été isolé en 1962 par **Wright et al. (1962)**. Il a été isolé des racines d'une plante de la famille des Annonacées à savoir *Polyalthia longifolia* var *pendula* (**Faizi et al., 2003**). En 2006, **Azebaze et al. (2006)** ont isolé ce composé des écorces d'*Allanblackia monticola* (Clusiaceae). De même, en 2012, ce composé a été isolé des bulbes de *Crinum natans* (Amaryllidaceae) (**Mba'ning, 2012**).

L'un des composés isolés des écorces d'*A. muricata* est la lichexanthone (AnMecP1). Ce composé a été isolé des écorces d'*Aspidosperma formosanum* (Apocynaceae) en 1976 par **Ruben et al. (1976)**. **Pettit et al. (2003)**, **Micheletti et al. (2009)** et **Buitrago et al. (2010)** ont respectivement isolé la lichexanthone de *Ruprechtia tangarana* (Polygonaceae), du lichen *Parmotrema spp* (Parmeliaceae) et des feuilles de *Vismia baccifera* (Guttiferae). A notre connaissance, c'est la première fois que la lichexanthone est isolée d'une espèce du genre *Annona* plus particulièrement d'*A. muricata*. Cependant c'est le troisième rapport de l'isolement de la lichexanthone d'une plante de la famille des Annonaceae. En effet, la

lichexanthone a été isolé des racines de *Rollinia leptopetala* (Arriaga *et al.*, 2008) et des écorces de *Guatteria blepharophylla* (Costa *et al.*, 2011).

L'acide gallique (AnMecP2) isolé des écorces d'*A. muricata* est l'un des produits très présents dans de nombreuses espèces de plantes (Magdalena *et al.*, 2006; Faried *et al.*, 2007; Anil et Nandini, 2010; Eldahshan, 2011; Ndjonka *et al.*, 2012; Nabavi *et al.*, 2013; Giri *et al.*, 2013).

Le 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de  $\beta$ -sitostérol isolé également des écorces d'*A. muricata* a été isolé récemment des brindilles d'une plante du genre *Annona*, *Annona squamosa* par Dinesh *et al.* (2011). Il a été également obtenu respectivement des feuilles de *Ravenala madagascariensis* (Musaceae) par Ramiarantsoa *et al.* (2008), du tronc de *Salacia camerunensis* (Celastraceae) par Mba'ning, (2012) et des écorces *Dacryodes edulis* (Burseraceae) par Zofou *et al.* (2013).

L'activité biologique de l'ensemble des échantillons a été évaluée *in vitro* vis-à-vis de *P. falciparum*, *L. donovani* et *L. major*. En parallèle, la cytotoxicité de chaque échantillons a été évaluée sur la lignée cellulaire de Human Foreskin Fibroblasts cells (HFF) et celle macrophagique J774.2 en vue de la détermination de l'indice de sélectivité respectivement pour l'activité antiplasmodiale et antileishmaniale.

## III-2- Activité antiplasmodiale

### *i- Résultats*

L'évaluation de l'activité antiplasmodiale a été réalisée sur la souche chloroquino résistante W2 de *P. falciparum*. Les extraits éthanoliques, les fractions au chlorure de méthylène, les fractions aqueuses, les sous fractions et produits isolés ont été testés.

#### *i-1- Susceptibilité des érythrocytes sains vis-à-vis des extraits*

En prélude à l'évaluation de l'activité antiplasmodiale, une évaluation de la susceptibilité des érythrocytes vis-à-vis des extraits/fractions/sous fractions/composés a été effectuée. Ce test a consisté à mettre les érythrocytes sains au contact de différentes concentrations d'extraits et de déterminer la dose pour laquelle il n'y a pas de lyse de celles-ci après 48 heures d'incubation. Au terme de cette expérience, tous les extraits testés ont démontré

une innocuité vis-à-vis des érythrocytes sains, la toxicité ne s'observant qu'à une concentration supérieure à 1mg/ml. Ainsi, les dilutions subséquentes d'extraits ont été réalisées à partir de cette concentration pour l'évaluation des activités antiplasmodiales.

## ***i-2- Activité antiplasmodiale in vitro sur la souche W2 de P. falciparum et indice de sélectivité***

### ***i-2-1- Résultats***

Les résultats d'activité antiplasmodiale bruts obtenus traduisent les pourcentages d'inhibition de la croissance parasitaire par rapport au contrôle négatif. Les activités proprement dites des différents extraits sont exprimées en  $CI_{50}$ , représentant la concentration d'extrait qui inhibe 50% de parasites en culture.

Dans le but de donner une base à l'analyse de nos résultats, les activités antiplasmodiales (concernant les extraits) en fonction de la valeur de la  $CI_{50}$  ont été classées selon les critères établis par **Muñoz et al. (2000)**. Selon lequel avec une :

- $CI_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$ , l'extrait présente une très bonne activité;
- $5 < CI_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ , l'extrait a une bonne activité (modérée);
- $CI_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$ , l'extrait est considéré comme étant inactif.

Les indices de sélectivité des échantillons ont été également déterminés. L'indice de sélectivité a été classé selon le critère établi par **Weniger et al. (2001)**, selon lequel avec un  $IS > 10$ , l'efficacité pharmacologique des extraits est considérée comme sélective.

Les résultats de l'activité antiplasmodiale et des indices de sélectivité des échantillons contre la souche W2 de *P. falciparum* sont présentés dans le tableau X.

**Tableau X : Activité inhibitrice des échantillons sur la souche W2 de *P. falciparum* et indice de sélectivité.**

Plantes	Organes	Nature	Codes	<sup>a</sup> CC <sub>50</sub> (µg/ml)	<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml)±ET	<sup>c</sup> IS
<i>A. muricata</i>	Péricarpe	Extrait éthanolique	AnMpEthOH	>10	1,01±0,07	> 9,90
		Fraction au chlorure de méthylène	AnMpCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	>10	0,94±0,03	>10,63
		Fraction aqueuse	AnMpH <sub>2</sub> O	>10	>10	ND
	Racines	Extrait éthanolique	AnMrEthOH	>10	0,79±0,14	>12,65
		Fraction au chlorure de méthylène	AnMrCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	>10	0,19±0,03	>52,63
		Sous fractions	AnMrSF1	>10	0,61±0,04	> 16,39
			AnMrSF2	>10	0,22±0,06	> 45,45
			AnMrSF3	>10	0,09±0,003	>111,11
			AnMrSF4	>10	>10	ND
			AnMrSF5	>10	>10	ND
			AnMrSF6	>10	>10	ND
			AnMrSF7	>10	>10	ND
			AnMrSF8	>10	>10	ND
		Composé	AnMrP1 (3- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside de stigmastérol)	>10	>10	ND
Fraction aqueuse	AnMrH <sub>2</sub> O	>10	>10	ND		

**Tableau X (Suite)**

Plantes	Organes	Nature	Codes	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml)±ET	°IS
<i>A. muricata</i>	Ecorces	Extrait éthanolique	AnMecEthOH	>10	1,45±0,20	> 6,45
		Fraction au chlorure de méthylène	AnMecCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	>10	1,50±0,07	> 6,66
	Sous fractions	AnMecSF1	>10	> 10	ND	
		AnMecSF2	>10	1,65±1,58	> 6,06	
		AnMecSF3	>10	> 10	ND	
		AnMecSF4	>10	> 10	ND	
		AnMecSF5	>10	> 10	ND	
		AnMecSF6	>10	> 10	ND	
		AnMecSF7	>10	> 10	ND	
		AnMecSF8	>10	> 10	ND	
		AnMecSF9	>10	> 10	ND	
		AnMecSF10	>10	> 10	ND	
		AnMecSF11	>10	> 10	ND	
		AnMecSF12	>10	> 10	ND	
		AnMecSF13	>10	> 10	ND	
		AnMecSF14	>10	> 10	ND	
		AnMecSF15	>10	2,52±1,41	> 3,96	
AnMecSF16	>10	3,46±0,98	> 2,89			
AnMecSF17	>10	2,45±1,77	> 3,92			

**Tableau X (suite)**

Plantes	Organes	Nature	Codes	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	°IS
<i>A. muricata</i>	Ecorces	Sous fractions	AnMecSF18	>10	2,75±1,86	> 3,63
			AnMecSF19	>10	2,89±0,55	> 3,46
			AnMecSF20	>10	1,14±0,22	> 8,77
			AnMecSF21	>10	1,11±0,34	> 9,00
			AnMecSF22	>10	0,12±0,03	> 83,33
			AnMecSF23	>10	> 10	ND
			AnMecSF24	>10	0,46±0,04	> 21,73
			AnMecSF25	>10	> 10	ND
			AnMecSF26	>10	> 10	ND
			AnMecSF27	>10	1,17±0,16	> 8,54
			AnMecSF28	>10	0,72±0,07	> 13,88
			AnMecSF29	>10	0,75±0,13	> 13,33
			AnMecSF30	>10	0,07±0,009	> 142,28
			AnMecSF31	>10	0,28±0,05	> 35,71
			AnMecSF32	>10	0,78±0,43	> 12,8
AnMecSF33	>10	1,31±0,19	> 7,63			

**Tableau X (Suite)**

Plantes	Organes	Nature	Codes	<sup>a</sup> CC <sub>50</sub> (µg/ml)	<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	<sup>c</sup> IS
<i>A. muricata</i>	Ecorces	Sous fractions	AnMecSF34	>10	1,07±0,36	> 9,34
			AnMecSF35	>10	2,19±0,47	> 4,56
			AnMecSF36	>10	1,39±0,33	> 7,19
			AnMecSF37	>10	>10	ND
			AnMecSF38	>10	> 10	ND
			AnMecSF39	>10	> 10	ND
			AnMecSF40	>10	> 10	ND
			AnMecSF41	>10	>10	ND
			AnMecSF42	>10	>10	ND
			AnMecSF43	>10	>10	ND
		Composés	AnMecP1 (Lichexanthone + impureté)	>10	> 10	ND
			AnMecP2 (Acide gallique)	>10	3,32±1,49	> 3,01
			AnMecP3 (3- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside de β-sitostérol)	>10	> 10	ND
		Fraction aqueuse	AnMecH <sub>2</sub> O	>10	> 10	ND

**Tableau X (suite)**

Plantes	Organes	Nature	Codes	<sup>a</sup> CC <sub>50</sub> (µg/ml)	<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	<sup>c</sup> IS
<i>A. reticulata</i>	Feuilles	Extrait éthanolique	AnRfEthOH	>10	> 10	ND
		Fraction au chlorure de méthylène	AnRfCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	>10	> 10	ND
		Fraction aqueuse	AnRfH <sub>2</sub> O	>10	>10	ND
	Brindilles	Extrait éthanolique	AnRbrEthOH	>10	> 10	ND
		Fraction au chlorure de méthylène	AnRbrCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	>10	0,88±0,34	> 11,36
		Fraction aqueuse	AnRbrH <sub>2</sub> O	>10	>10	ND
	Racines	Extrait éthanolique	AnRrEthOH	>10	1,90±0,008	> 5,26
		Fraction au chlorure de méthylène	AnRrCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	>10	0,38±0,23	> 26,31
		Fraction aqueuse	AnRrH <sub>2</sub> O	>10	>10	ND
	Ecorces	Extrait éthanolique	AnRecEthOH	>10	0,29±0,02	> 34,48
		Fraction au chlorure de méthylène	AnRecCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	>10	0,82±0,25	> 12,19
		Fraction aqueuse	AnRecH <sub>2</sub> O	>10	>10	ND
	Fruit	Extrait éthanolique	AnRfrEthOH	>10	0,67±0,02	> 14,92
		Fraction au chlorure de méthylène	AnRfrCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	>10	0,42±0,009	> 23,80
		Fraction aqueuse	AnRfrH <sub>2</sub> O	>10	>10	ND

**Tableau X (Suite et fin)**

Plantes	Organes	Nature	Codes	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	<sup>c</sup> IS
<i>A. senegalensis</i>	Feuilles	Extrait éthanolique	AnSfEthOH	>10	>10	ND
		Fraction au chlorure de méthylène	AnSfCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	>10	>10	ND
		Fraction aqueuse	AnSfH <sub>2</sub> O	>10	>10	ND
	Brindilles	Extrait éthanolique	AnSbrEthOH	>10	>10	ND
		Fraction au chlorure de méthylène	AnSbrCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	>10	>10	ND
		Fraction aqueuse	AnSbrH <sub>2</sub> O	>10	>10	ND
	Tiges	Extrait éthanolique	AnStiEthOH	>10	>10	ND
		Fraction au chlorure de méthylène	AnStiCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	>10	>10	ND
		Fraction aqueuse	AnStiH <sub>2</sub> O	>10	>10	ND
<b>Artémisinine</b>			Art	>10	0,005±0,0008	>2000

<sup>a</sup>=Concentration qui inhibe 50% la croissance des cellules HFF ; (CC<sub>50</sub>); <sup>b</sup>=Concentration qui inhibe 50% la croissance de *P. falciparum* en culture (CI<sub>50</sub>); <sup>c</sup>=Indice de sélectivité (IS); AnMec=*Annona muricata* écorce; AnMr=*Annona muricata* racine; AnMp=*Annona muricata* péricarpe; AnRf=*Annona reticulata* feuilles; AnRfr=*Annona reticulata* fruit; AnRbr=*Annona reticulata* brindilles; AnRec=*Annona reticulata* écorce ; AnRr=*Annona reticulata* racine ; AnSf = *Annona senegalensis* feuilles; AnSbr = *Annona senegalensis* brindilles; AnSti=*Annona senegalensis* tiges; EthOH=Ethanol; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=chlorure de méthylène; SF=sous fractions; P=Produit; ND=Non déterminé; Art=Artémisinine. Les résultats sont exprimés en termes de moyenne ± écarts types (ET), les tests ont été faits en trois exemplaires.

Quatre vingt-huit échantillons dont 11 extraits bruts, 22 fractions, 51 sous fractions et 4 produits ont été obtenus à partir des sept organes des trois plantes sélectionnées.

D'après les critères de **Muñoz *et al.* (2000)**, aucun échantillon d'*A. senegalensis* et aucune fractions aqueuses n'a montré une activité antiplasmodiale ( $CI_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$ ). Par contre, certains extraits d'*A. muricata* et *A. reticulata* ont montré de très bonnes activités antiplasmodiales avec les  $CI_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ .

Six des 11 extraits éthanoliques testés ont montré des effets inhibiteurs sur croissance de *P. falciparum* en culture avec des  $CI_{50}$  allant de 0,29 à 1,90  $\mu\text{g/ml}$  (tableau X). Globalement suivant les critères ci-dessus, les extraits bruts éthanoliques des racines (AnMrEthOH;  $CI_{50} = 0,79 \mu\text{g/ml}$ ), du péricarpe (AnMpEthOH;  $CI_{50} = 1,01 \mu\text{g/ml}$ ) et des écorces (AnMecEthOH;  $CI_{50} = 1,45 \mu\text{g/ml}$ ) d' *A. muricata*, des écorces (AnRecEthOH;  $CI_{50} = 0,29 \mu\text{g/ml}$ ), des fruits (AnRfrEthOH;  $CI_{50} = 0,67 \mu\text{g/ml}$ ) et des racines (AnRrEthOH;  $CI_{50} = 1,90 \mu\text{g/ml}$ ) d' *A. reticulata* ont de très bonnes activités ( $CI_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$ ). Le plus actif de tous étant l'extrait éthanolique des écorces d'*A. reticulata* (AnRecEthOH;  $CI_{50} = 0,29 \mu\text{g/ml}$ ) avec un IS  $> 34,48$ .

Des extraits éthanoliques, les fractions au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ont été obtenues par partition liquide-liquide avec  $\text{H}_2\text{O}$  et le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Les  $CI_{50}$  de ces fractions varient de 0,19 à 1,50  $\mu\text{g/ml}$  respectivement pour la fraction au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  des racines (AnMr $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) et des écorces (AnMec $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) d'*A. muricata*. Parmi les fractions au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  testées, sept (AnMp $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AnMr $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AnMec $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AnRbr $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AnRec $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AnRr $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et AnRfr $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) présentent une très bonne activité avec des valeurs de  $CI_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$ . De ces sept fractions, AnMr $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a le meilleur indice de sélectivité (IS  $> 52,63$ ).

Etant donné que les fractions au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  des racines et des écorces d'*A. muricata* ont montré très bonne activité antiplasmodiale ( $CI_{50} > 5 \mu\text{g/ml}$ ) et en tenant compte de la quantité de matériel végétal récoltée, ces deux fractions ont été retenues et considérées pour la chromatographie flash. Les sous fractions et les produits résultant de la chromatographie flash ont été évalués pour leur potentialité à inhiber la croissance de la souche W2 de *P. falciparum* en culture.

Les sous fractions obtenues suite à la chromatographie flash des racines et écorces d'*A. muricata* présentent de très bonne activité antiplasmodiale avec des  $CI_{50}$  variant de 0,07 à 3,46  $\mu\text{g/ml}$ . La sous fraction 30 des écorces d'*A. muricata* (AnMecSF30) étant la plus active des

sous fractions et également la plus active des 88 échantillons testés. Cette sous fraction a également le meilleur indice de sélectivité avec un IS > 142,28.

Des 8 sous fractions obtenues après chromatographie flash de la fraction au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> des racines d'*A. muricata* (AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), seules 3 à savoir AnMrSF1, AnMrSF2 et AnMrSF3 s'avèrent actives contre la souche W2 de *P. falciparum* avec des CI<sub>50</sub> de 0,61 µg/ml, 0,22 µg/ml et 0,09 µg/ml, respectivement. Ces dernières sont plus actives que l'extrait éthanolique de départ (AnMrEthOH; CI<sub>50</sub> = 0,79 µg/ml), et seule la sous-fraction 3 (AnMrSF3; CI<sub>50</sub> = 0,09 µg/ml) est également plus active que la fraction au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> des racines d'*A. muricata* (AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; CI<sub>50</sub> = 0,19 µg/ml). Ces trois sous fractions actives, AnMrSF1, AnMrSF2 et AnMrSF3 ont été obtenues respectivement avec l'Hexane 100%, le système solvant Hex/AE 95:5 et le système Hex/AE 90:10. Le produit (3-*O*-β-D-glucopyranoside de stigmastérol) isolé de cet organe n'a pas présenté l'activité antiplasmodiale.

Quarante trois (43) sous fractions et 3 produits ont été obtenues par chromatographie flash de la fraction au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> des écorces d'*A. muricata* (AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Vingt sous fractions (AnMecSF2, AnMecSF15, AnMecSF16, AnMecSF17, AnMecSF18, AnMecSF19, AnMecSF20, AnMecSF21, AnMecSF22, AnMecSF24, AnMecSF27, AnMecSF28, AnMecSF29, AnMecSF30, AnMecSF31, AnMecSF32, AnMecSF33, AnMecSF34, AnMecSF35 et AnMecSF36) ont montré une très bonne activité antiplasmodiale (CI<sub>50</sub> < 5 µg/ml) avec des CI<sub>50</sub> allant de 0,07 µg/ml (AnMecSF30) à 3,46 µg/ml (AnMecSF16). Tout comme la sous fraction 30 (AnMecSF30) qui a montré un bon indice de sélectivité (IS > 142,28), la sous fraction 22 (AnMecSF22) a également présenté un bon indice de sélectivité (IS > 83,33). La sous fraction 2 (AnMecSF2) a été obtenu avec le système solvant Hex/AE 95:5, les sous fractions 15 à 21 ont été obtenues avec le système solvant Hex/AE70:30, les sous fractions 22 à 30 avec le système solvant Hex/AE50:50 à 30:70 et les sous fractions 31,32,33, 34, 35 et 36 ont été obtenues avec le système solvant AE/MeOH 80:20.

Des 3 composés isolés des écorces d'*A. muricata*, 1 [AnMecP2 (Acide gallique)] d'entre eux est très actif avec une CI<sub>50</sub> de 3,32 µg/ml. Comparées à l'extrait éthanolique (AnMecEthOH; CI<sub>50</sub> = 1,45 µg/ml) et à la fraction au chlorure de méthylène (AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; CI<sub>50</sub> = 1,50 µg/ml) des écorces d'*A. muricata*, les sous fractions actives obtenues à partir de cet organe sont plus actives, sauf les sous fractions 2-19, la sous fraction 35. .

Aucun échantillons n'a été plus actif que le médicament de référence, artémisinine (CI<sub>50</sub> = 0,005 µg/ml).

Selon **Weniger et al. (2001)**, avec un IS > 10, l'efficacité pharmacologique des extraits est considérée comme sélective et non cytotoxique. Par conséquent, 19 échantillons de notre étude ont montré une sélectivité spécifique (IS > 10) avec les IS variant de > 10,63 (AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) à > 142,28 (AnMecSF30).

### ***i-2-2- Discussion***

L'émergence des souches plasmodiales résistantes aux antipaludiques même les plus récents souligne la nécessité de découverte de nouveaux médicaments. Les plantes médicinales sont utilisées depuis des milliers d'années pour le traitement du paludisme et sont sources de deux médicaments antipaludiques qui sont la quinine et l'artémisinine (**Willcox et al., 2004**). Les plantes de la famille des Annonacées, parmi lesquelles celles du genre *Annona* dont *A. muricata* et *A. senegalensis* ont été utilisées au Cameroun pour le traitement du paludisme et/ou de ses symptômes (**Tsabang et al., 2012**). En outre, **Chavan et al. (2014)** ont rapporté l'utilisation d'*A. reticulata* dans la cure traditionnelle du paludisme. Dans la présente étude, *A. muricata* et *A. reticulata* ont montré une activité antiplasmodiale avec des CI<sub>50</sub> sur la souche W2 de *P. falciparum* < 10 µg/ml et des concentrations cytotoxiques 50 (CC<sub>50</sub>) sur les cellules HFF > 10 µg/ml. Ces activités varient selon la plante, l'organe, le solvant de partition et le système solvant. L'exploitation des connaissances ethnobotaniques représente par conséquent l'une des stratégies pour le développement de nouveaux médicaments antipaludiques efficaces pour lutter contre la résistance aux médicaments et les effets secondaires.

Le péricarpe, les racines et les écorces d'*A. muricata* ont montré une très bonne activité antiplasmodiale sur la souche chloroquino résistante W2 de *P. falciparum* avec des CI<sub>50</sub> comprises entre 0,07 et 3,46 µg/ml. La très bonne activité antiplasmodiale (CI<sub>50</sub> < 5 µg/ml) des extraits éthanoliques du péricarpe (AnMpEthOH; CI<sub>50</sub> = 1,01 µg/ml), des racines (AnMrEthOH; CI<sub>50</sub> = 0,79 µg/ml) et des écorces (AnMecEthOH; CI<sub>50</sub> = 1,45 µg/ml) d'*A. muricata* et de leurs fractions au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> respectives (AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; CI<sub>50</sub> = 0,94 µg/ml; AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; CI<sub>50</sub> = 0,19 µg/ml et AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; CI<sub>50</sub> = 1,50 µg/ml) est similaire à celle obtenue par **Razak et al. (2014)**. En effet, ces derniers ont montré que les extraits au chlorure de méthylène, au méthanol et à l'eau déminéralisée stérile des feuilles d'*A. muricata* de Malaisie sont très actives sur la souche chloroquino résistante K1 de *P. falciparum* en culture. Les CI<sub>50</sub> étant de 0,61; 0,26 et 0,27 µg/ml respectivement. De plus, un effet cytotoxique négligeable (CC<sub>50</sub> = 40,48; CC<sub>50</sub> > 100 et CC<sub>50</sub> > 200 µg/ml respectivement) a été observé sur les cellules de Madin-Darby bovine

kidney (MDBK) avec respectivement des IS de 66,47; > 387,60 et > 756,14. De même, **Boyom et al. (2011)** ont obtenu une très bonne activité antiplasmodiale avec une  $CI_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$  pour l'extrait éthanolique des graines, les fractions méthanoliques des feuilles, des brindilles, des fleurs et la fraction hexanique de feuilles d'*A. muricata* du Cameroun. Par contre, une bonne activité antiplasmodiale a été obtenue avec les extraits à l'hexane, à l'acétate d'éthyle et au méthanol des feuilles d'*A. muricata* de Malaisie sur la souche chloroquino sensible F32 ( $CI_{50}$  variant de 7,2 à 9,2  $\mu\text{g/ml}$ ) et sur la souche chloroquino résistante W2 ( $CI_{50}$  variant de 10,4 à 38,6  $\mu\text{g/ml}$ ). Cependant, l'extrait le plus actif à savoir celui à l'acétate d'éthyle s'est avéré toxique pour les cellules U-937 (monocytes humains) (IS = 1,1 et 0,2 pour les souches F32 et W2 de *P. falciparum* respectivement) (**Osario et al., 2007**). De même, d'après les travaux de **Menan et al. (2006)**, les extraits aqueux, éthanolique et pentanique des feuilles d'*A. muricata* testés sur la souche chloroquino résistante FcM29-Cameroun ont montré de bonnes activités ( $CI_{50}$  variant de 8 à 335  $\mu\text{g/ml}$ ), l'extrait pentanique le plus actif a également révélé un IS favorable (> 10). De plus, d'après les travaux de **Bidla et al. (2004)**, à la concentration de 20  $\mu\text{g/ml}$ , l'extrait méthanol/chloroforme (v/v) des feuilles d'*A. muricata* du Cameroun a inhibé à 60% la croissance de la souche chloroquino sensible F32 de *P. falciparum*. Par contre, **Nguyen et al. (2007)** ont étudié l'effet des fractions au chlorure de méthylène, au méthanol, au cyclohexane et de l'extrait éthanolique des feuilles d'*A. muricata* du Vietnam vis-à-vis de la souche FcB1 et ont montré une absence d'activité.

L'acide gallique isolé des écorces d'*A. muricata* dans notre étude a montré une activité antiplasmodiale sur la souche W2 de *P. falciparum* avec une  $CI_{50}$  de 3,32  $\mu\text{g/ml}$ . L'activité obtenue est largement supérieure à celle obtenue de l'acide gallique isolé des branches d'*Anogeissus leiocarpus* (Combretaceae) par **Ndjonka et al. (2012)**. En effet, ces auteurs ont obtenu une  $CI_{50}$  de 12,13  $\mu\text{g/ml}$  sur la souche 3D7 de *P. falciparum*. L'activité de l'acide gallique serait liée à son très fort pouvoir antioxydant. L'absence d'activité du 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de  $\beta$ -sitostérol isolé des écorces d'*A. muricata* est contradictoire aux résultats de **Zofou et al. (2013)**. Ces auteurs, ont évalué l'activité antiplasmodiale du 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de  $\beta$ -sitostérol isolé des écorces de *Dacryodes edulis* (Burseraceae) et ont obtenu des  $CI_{50}$  de 1,90 et 5,34  $\mu\text{g/ml}$  respectivement sur les souches 3D7 et Dd2 de *P. falciparum*.

Au regard des résultats obtenus par les auteurs suscités, il ressort que l'origine géographique de la plante aurait une influence majeure sur l'activité biologique des extraits. Ceci serait attribué à la variation des facteurs intrinsèques et ou extrinsèques en fonction de la

localisation géographique. De même, les protocoles d'extraction et la différence de sensibilité des souches expliqueraient également ces différences ou ces similitudes.

La phytochimie et l'analyse des constituants d'*A. muricata* ont fait l'objet de plusieurs études (**Champy et al., 2004, Gleye et al., 2001, Hasrat et al., 1997, Kim et al., 1998**). Celles portant sur l'activité antiplasmodiale des constituants isolés, principalement les acétogénines sont rares (**Menan et al., 2006**). La (-) -anonaine, un alcaloïde aporphine isolée des fruits d'*A. muricata* est reconnue pour son activité antiplasmodiale. En effet, **Levrier et al. (2013)** ont rapporté l'activité antiplasmodiale de la (-) -anonaine sur *P. falciparum* en culture avec une  $CI_{50}$  de 7  $\mu$ M. De même, **Graziose et al. (2011)** ont également rapporté l'activité antiplasmodiale de la (-) -anonaine sur la souche chloroquino sensible D10 de *P. falciparum* avec une  $CI_{50}$  de 25,9  $\mu$ M et sur la souche chloroquino résistante D12 de *P. falciparum* avec une  $CI_{50}$  de 19,6  $\mu$ M et ceci avec une faible cytotoxicité sur la lignée cellulaire ovarienne de hamster chinois (CHO).

Selon **Nwaka et al. (2009)**, avec  $CI_{50} < 0,2 \mu\text{g/ml}$  et  $IS > 100$ , la sous fraction 3 des racines d'*A. muricata* (AnMrSF3) et la sous fraction 30 des écorces d'*A. muricata* (AnMecSF30) pourraient être considérées comme candidats pour la découverte de nouveaux antipaludiques.

Les feuilles, les brindilles, les racines et les fruits d'*A. reticulata* ont montré une activité intéressante contre la souche W2 de *P. falciparum* avec des  $CI_{50}$  variant de 0,29 à 1,90  $\mu\text{g/ml}$ . A notre connaissance, c'est la première étude portant sur l'évaluation de l'activité antiplasmodiale d'*A. reticulata*. Divers organes d'*A. reticulata* sont utilisés en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses pathologies dont le paludisme (**Chavan et al., 2014**). Une étude phytochimique a révélé la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des stéroïdes, des triterpénoïdes, des glycosides, des glucides, des tanins et des acétogénines (**Saad et al., 1991; Suresh et al., 2012**), ce qui souligne la richesse d'*A. reticulata* en métabolites secondaires. Les alcaloïdes aporphines dont la liriodenine, la norushinsunine, la réticuline et un acétogénine, la neoannonine ont été isolés des racines d'*A. reticulata* (**Suresh et al., 2012**). L'asimilobine, le norushinsunine, le norglaucine, la liriodenine, l'anonaine et l'oxoglaucine tous des alcaloïdes aporphines ont montré d'après les travaux de **Graziose et al. (2011)** une activité antiplasmodiale avec des  $CI_{50}$  comprises entre 1,2 et 29,6  $\mu\text{g/ml}$ .

Dans nos conditions expérimentales, tous les extraits éthanoliques et les fractions au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  des feuilles, des brindilles et tiges d'*A. senegalensis* n'ont montré aucune activité sur la souche W2 de *P. falciparum*. Cependant, ce résultat n'indique en aucun cas une absence

d'activité biologique sur une cible métabolique particulière du parasite et dans des conditions expérimentales différentes. Il existe peu d'études antérieures publiées sur les activités antiplasmodiales de cette plante. **Ndjonka et al. (2012)** ont évalué l'activité antiplasmodiale de l'extrait éthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* sur la souche 3D7 de *P. falciparum* et ont obtenu une très faible activité avec une  $CI_{50}$  de 94,8  $\mu\text{g/ml}$ . L'activité antiplasmodiale *in vivo* de l'extrait méthanolique des feuilles d'*A. senegalensis* a été évaluée par **Ajaiyeoba et al. (2006)**. En effet, ces derniers ont obtenu un effet chemosuppresseur significatif de la parasitemie chez les souris infectées après administration de l'extrait.

La partition liquide-liquide et la chromatographie flash ont eu une influence sur l'activité. D'une part, elles ont conduit à la perte ou à la réduction d'activité tel que observé avec les extraits éthanoliques des écorces d'*A. muricata* (AnMecEthOH) et d'*A. reticulata* (AnRecEthOH) dont les activités des fractions au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et des sous fractions résultantes ont été réduites. Ceci pourrait s'expliquer par une action synergique ou additive entre les métabolites secondaires présents (**Nwodo et al., 2010**).

D'autre part, on note une amélioration de l'activité tel que observé avec les extraits éthanoliques du pécarpe (AnMpEthOH) et des racines (AnMrEthOH) d'*A. muricata*, des brindilles (AnRbrEthOH), des racines (AnRrEthOH) et des fruits (AnRfrEthOH) d'*A. reiculata* dont les fractions au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  correspondantes ont été plus actives que ces différents extraits éthanoliques. Ce constat pourrait se justifier par le fait que, la partition et la chromatographie flash auraient concentré les principes actifs d'où l'amélioration de l'activité (**Nwodo et al., 2010**).

Le protocole d'extraction que nous avons utilisé a été celui décrit par **Alali et al. (1999)** avec quelques modifications. D'après ce protocole, nos extraits, fractions et sous fractions sont riches en acétogénines. L'activité antiplasmodiale observée pourrait être due à la richesse en acétogénines. En effet, les plantes de la famille des Annonacées plus particulièrement celles du genre *Annona* sont reconnues pour leur richesse en acétogénine (**Kojima et Tanaka, 2009**), métabolites secondaires reconnus pour leur activité antiplasmodiale. En effet, leur activité sur *P. falciparum* a déjà été démontrée. Ils agiraient sur ce parasite en inhibant l'activité de deux des principales enzymes nécessaires au cycle biologique du parasite, à savoir l'adénylate translocase (**Ratokomanga et al., 2004**) qui catalyse la synthèse des nucléotides parasitaires et la cystéine protéase, falcipaine-2 (**Boyom et al., 2009**) qui est en grande partie responsable de la dégradation de l'hémoglobine de l'hôte en faveur de la synthèse des protéines du parasite.

Ces composés ont montré un grand potentiel inhibiteur de certaines cibles métaboliques d'importance vitale chez les cellules cancéreuses présentes également chez le parasite, telles que l'ubiquinone-NADH oxydoréductase (complexe I : protéine membranaire mitochondriale du système de transport des électrons) et la NADH oxydase des membranes plasmiques. L'inhibition de ces deux cibles entraîne une baisse de la production d'ATP cytosolique, conduisant à la mort cellulaire par apoptose (**Miyoshi et al., 2005**).

### **III-3- Activité antileishmaniale**

#### ***i- Détermination des paramètres d'activité***

##### ***i-1- Résultats***

L'activité antileishmaniale a été réalisée avec les extraits éthanoliques, les fractions au chlorure de méthylène des différents organes d'*A. muricata*, *A. reticulata* et *A. senegalensis* ainsi que le produit (AnMrP1) et la sous fraction AnMecSF31) obtenus respectivement des racines et écorces d'*A. muricata*. Les différents échantillons ont été testés contre les promastigotes et amastigotes intracellulaires de l'agent responsable de la leishmaniose viscérale, *L. donovani* et de la leishmaniose cutanée, *L. major* en culture.

L'activité a été classée suivant les critères de classement des activités antileishmaniennes en fonction des  $CI_{50}$  mesurées tel que établi par (**Camacho et al., 2003**) :

- Avec une  $CI_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ , l'extrait a une très bonne activité;
- $10 < CI_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$ , l'extrait possède une bonne activité;
- $50 < CI_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ , l'extrait a une activité modérée;
- $CI_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$ , l'extrait est inactif.

Les indices de sélectivité (IS) et de spécificité (ISP) des échantillons ont été également déterminés.

Etant donné que le test de susceptibilité a été réalisé sur les cellules hôtes du parasites et que les résultats ont montré des effets plus ou moins cytotoxiques sur ces dernières, l'indice de sélectivité a été par conséquent classé selon les critères de **De Lima et al. (2012)** :

- Avec un indice de sélectivité supérieur à 1, l'extrait est qualifié de sélectif, de ce fait, l'extrait est plus toxique pour le parasite que pour la cellule hôte.

- Avec un indice de sélectivité inférieur à 1 l'extrait est qualifié de non sélectif, l'extrait est par conséquent plus toxique pour la cellule hôte que pour le parasite.

L'indice de spécificité étant le rapport entre la  $CI_{50}$  de l'extrait sur le promastigote et la  $CI_{50}$  de l'extrait sur l'amastigote a été également déterminé. Cette donnée permet d'identifier sur quelle forme du parasite un composé est plus actif. Cet indice a été classé suivant les critères définis par **De Muylder *et al.* (2011)**.

- Lorsque l'indice de spécificité est supérieur à 2, l'échantillon est plus actif sur l'amastigote.
- Lorsqu'il est inférieur à 0,4 l'échantillon est plus actif sur le promastigote.
- Avec un indice de spécificité compris entre 0,4 et 2, l'échantillon est considéré comme étant autant actif sur les deux formes du parasite.

L'ensemble des résultats de l'activité antileishmaniale est présenté dans le tableau XI ci-dessous.

**Tableau XI : Activité antileishmaniale des échantillons sur les promastigotes et amastigotes de *L. donovani* et *L. major* et indice de sélectivité**

Plantes	Organes	Nature	Codes	<sup>a</sup> CC <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	Activité sur <i>L. donovani</i>					Activité sur <i>L. major</i>				
					Promastigote		Amastigotes		<sup>d</sup> ISP	Promastigotes		Amastigotes		<sup>d</sup> ISP
					<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	<sup>c</sup> IS	<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	<sup>c</sup> IS		<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	<sup>c</sup> IS	<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	<sup>c</sup> IS	
<i>A.m</i>	Péricarpe	Ext EthOH	AnMp EthOH	2,34±0,12	5,27±0,63	0,44	ND	ND	ND	56,60±0,17	0,04	ND	ND	ND
		Fra CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AnMp CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4,88±0,07	2,03±0,11	2,40	8,86±1,04	0,55	0,22	4,72±0,19	1,03	12,24±0,97	0,39	0,38
	Racines	Ext EthOH	AnMr EthOH	0,65±0,02	0,12±0,02	5,41	ND	ND	ND	26,05±1,03	0,02	ND	ND	ND
		Fra CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AnMr CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10,67±0,04	1,72±0,03	6,20	3,44±0,72	3,10	0,5	20,25±0,87	0,52	3,08±0,16	3,46	6,57
		Prdt P1	AnMr P1	40,89±1,45	47,97±0,98	0,85	28,58±1,17	1,43	1,67	105,26±1,49	0,38	25,79±1,71	1,58	4,08
	Ecorces	Ext EthOH	AnMec EthOH	0,64±0,03	1,84±0,15	0,34	ND	ND	ND	22,22±3,42	0,02	ND	ND	ND
		Fra CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AnMec CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4,29±0,5	3,51±0,89	1,22	5,43±0,23	0,79	0,64	25,29±1,34	0,16	1,78±0,18	2,41	14,20
		Sous Fra	AnMec SF31	15,78±0,73	46,58±0,87	0,33	24,72±0,76	0,63	1,88	67,81±1,32	0,23	3,69±0,95	4,04	18,37

Tableau XI (suite)

Plantes	Organes	Nature	Codes	<sup>a</sup> CC <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	Activité sur <i>L. donovani</i>					Activité sur <i>L. major</i>				
					Promastigote		Amastigotes		<sup>d</sup> ISP	Promastigotes		Amastigotes		<sup>d</sup> ISP
					<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	<sup>c</sup> IS	<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	<sup>c</sup> IS		<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	<sup>c</sup> IS	<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	<sup>c</sup> IS	
<i>A.r</i>	Feuilles	Ext EthOH	AnRf EthOH	23,14±0,82	31,92±1,21	0,72	ND	ND	ND	126,61±0,95	0,18	ND	ND	ND
		Fra CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AnRf CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0,44±0,07	1,68±0,03	0,26	1,46±0,27	0,30	1,15	34,67±1,34	0,01	5,62±0,84	0,08	6,16
	Brindilles	Ext EthOH	AnRbr EthOH	8,73±0,61	20,14±0,43	0,43	ND	ND	ND	34,28±0,59	0,25	ND	ND	ND
		Fra CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AnRbr CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	13,01±0,11	2,32±0,62	5,60	4,32±0,93	3,01	0,53	22,35±0,67	0,58	3,00±0,56	4,33	7,45
	Racines	Ext EthOH	AnRr EthOH	1,99±0,45	17,60±0,51	0,11	ND	ND	ND	33,29±0,78	0,05	ND	ND	ND
		Fra CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AnRr CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	< 0,1±0,02	3,29±0,89	0,03	1,60±0,65	0,06	2,05	23,17±0,93	0,004	2,58±0,41	0,03	8,98
	Ecorces	Ext EthOH	AnRec EthOH	0,36 ± 0,08	29,40±1,07	0,01	ND	ND	ND	39,60 ± 0,19	0,009	ND	ND	ND
		Fra CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AnRec CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	< 0,1±0,01	5,61±1,07	0,02	1,42±0,74	0,07	3,95	21,48±1,31	0,004	1,57±0,76	0,06	13,68
	Fruit	Ext EthOH	AnRfr EthOH	33,2±0,56	23,01±1,12	1,44	ND	ND	ND	133,59±1,74	0,24	ND	ND	ND
		Fra CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AnRfr CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1,38±0,37	1,45±0,10	0,95	7,04±0,48	0,19	0,20	85,25±0,95	0,02	16,52±0,78	0,08	5,16

Tableau XI (suite et fin)

Plantes	Organes	Nature	Codes	<sup>a</sup> CC <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	Activité sur <i>L. donovani</i>					Activité sur <i>L. major</i>				
					Promastigote		Amastigotes		<sup>d</sup> ISP	Promastigotes		Amastigotes		<sup>d</sup> ISP
					<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	<sup>c</sup> IS	<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	<sup>c</sup> IS		<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	<sup>c</sup> IS	<sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml) ±ET	<sup>c</sup> IS	
A.s	Feuilles	Ext EthOH	AnSf EthOH	1,12±0,09	62,06±1,43	0,01	ND	ND	ND	160,34±1,24	0,006	ND	ND	ND
		Fra CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AnSf CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	< 0,1±0,01	109,51±1,71	0,0009	3,37±0,91	0,03	32,49	33,75±0,76	0,003	134,01±0,79	0,0007	0,25
	Brindilles	Ext EthOH	AnSbr EthOH	0,31±0,08	42,38±0,75	0,007	ND	ND	ND	199,32±1,41	0,002	ND	ND	ND
		Fra CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AnSbr CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4,57±0,83	16,3±1,32	0,28	0,93±0,04	4,91	17,52	60,93±2,76	0,07	272,32±1,48	0,02	0,22
	Tiges	Ext EthOH	AnSti EthOH	1,64±0,67	83,36±1,04	0,02	ND	ND	ND	173,65±2,42	0,009	ND	ND	ND
		Fra CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AnSti CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	< 0,1±0,01	45,29±1,56	0,002	13,17±1,27	0,008	3,43	17,56±0,99	0,005	25,60±2,31	0,004	0,68
Glu	Glu			5,56±0,47	17,34±0,45	0,32	12,18±0,92	0,45	1,42	14,22±1,17	0,39	19,37±0,96	0,28	0,73

<sup>a</sup>=Concentration qui inhibe 50% la croissance des cellules HFF (CC<sub>50</sub>); <sup>b</sup>=Concentration qui inhibe 50% la croissance de *P. falciparum* en culture (CI<sub>50</sub>); <sup>c</sup>=Indice de sélectivité (IS); A.m=Annona muricata; A.r=Annona reticulata; A.s=Annona senegalensis; Ext=Extrait; Fra=Fraction; AnMec=Annona muricata écorce; AnMrPI=Annona muricata racine produit; AnMr=Annona muricata racine; AnMrPI=Annona muricata racine produit 1; AnMp=Annona muricata pericarpe; AnRf=Annona reticulata feuilles; AnRfr=Annona reticulata fruit; AnRbr=Annona reticulata brindilles; AnRec=Annona reticulata écorce; AnRr=Annona reticulata racine; AnSf=Annona senegalensis feuilles; AnSbr=Annona senegalensis brindilles; AnSti=Annona senegalensis tiges; EthOH=Ethanol; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=chlorure de méthylène; Glu=Glucantime. Les résultats sont exprimés en termes de moyenne ± écarts types (ET).

Le tableau XI présente l'activité antileishmaniale de 24 échantillons (les extraits éthanoliques bruts, les fractions au chlorure de méthylène, le produit AnMrP1 (3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside de stigmastérol) et la sous fraction AnMecSF31) sur les formes promastigotes et amastigotes intracellulaires du pathogène responsable de la leishmaniose viscérale, *L. donovani* et celui responsable de la leishmaniose cutanée, *L. major*.

Il ressort du tableau XI que les extraits bruts, fractions et composés présentent des activités qui varient de 0,12 à 85,25  $\mu\text{g/ml}$ . L'activité varie en fonction de la plante, de l'organe, du solvant, du parasite, de la forme du pathogène.

L'agent responsable de la leishmaniose viscérale, *L. donovani* est plus sensible que *L. major*, responsable de la leishmaniose cutanée.

Pour ce qui est d'*A. muricata*, les extraits bruts éthanoliques du péricarpe (AnMp EthOH), des racines (AnMrEthOH) et des écorces (AnMecEthOH) présentent de très bonnes activités ( $CI_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ ) sur les formes promastigotes de *L. donovani*. Cependant, avec des  $IS < 1$ , ils sont non sélectifs à l'exception de l'extrait brut des racines (AnMrEthOH) qui s'avère être sélectif. Par contre, sur les promastigotes de *L. major*, deux de ces extraits à savoir celui des racines (AnMrEthOH) et des écorces (AnMecEthOH) présentent une bonne activité avec des  $CI_{50}$  comprises entre 10 et 50  $\mu\text{g/ml}$ , AnMpEtOH étant lui modérément actif ( $50 < CI_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ ). Les trois extraits sont tous non sélectifs.

Les fractions au chlorure de méthylène d'*A. muricata* (AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, et AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) présentent toutes comme les extraits bruts éthanoliques une très bonne activité ( $CI_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ ) sur les promastigotes de *L. donovani*. Cependant, contrairement à ces derniers, elles sont toutes sélectives ( $IS > 1$ ). Sur la forme promastigote de *L. major*, seul le péricarpe a vu son activité considérablement augmentée allant de modérément actif ( $CI_{50} = 56,60 \mu\text{g/ml}$ ) pour l'extrait brut éthanolique (AnMpEthOH) à très actif ( $CI_{50} = 4,72 \mu\text{g/ml}$ ) pour la fraction au chlorure de méthylène (AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). La fraction (AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) étant également sélective ( $IS = 1,03$ ) comparée à l'extrait brut éthanolique (AnMpEtOH) de l'organe ( $IS = 0,04$ ).

Sur les amastigotes de *L. donovani*, les fractions d'*A. muricata* présentent des très bonnes activités ( $CI_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ ). La plus active et la seule sélective étant la fraction des racines (AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) avec une  $CI_{50}$  de 3,44  $\mu\text{g/ml}$  et un indice de sélectivité de 3,10. A

l'exception de la fraction du péricarpe (AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), les deux autres fractions (AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) présentent également une très bonne activité sur les amastigotes de *L. major* et sont sélectives.

Le composé AnMrP1 (3-*O*-β-D-glucopyranoside de stigmastérol) et la sous fraction AnMecSF31 obtenus respectivement des racines et des écorces d'*A. muricata* présentent tous deux de bonnes activités sur les promastigotes de *L. donovani* avec des CI<sub>50</sub> respectifs de 47,97 et 46,58 µg/ml. Tous deux étant non sélectifs (IS < 1). Sur les amastigotes de *L. donovani*, on note également des bonnes activités. Le composé AnMrP1 (3-*O*-β-D-glucopyranoside de stigmastérol) est sélectif (IS > 1). La sous fraction 31(AnMecSF31) est active sur les promastigotes de *L. major* (CI<sub>50</sub> = 67,81 µg/ml), cependant, elle est non sélective. Par contre, le 3-*O*-β-D-glucopyranoside de stigmastérol et la sous fraction 31 des écorces (AnMecSF31) sont actifs sur les amastigotes de *L. major* et sélectifs. La sous fraction AnMecSF31 est la plus active (3,69 µg/ml) et la plus sélective (IS = 4,04).

Cinq organes d'*A. reticulata* ont été utilisés pour les tests : les feuilles, fruits, les brindilles, les écorces et les racines. Avec des CI<sub>50</sub> comprises entre 10 et 50 µg/ml, les extraits bruts éthanoliques de ces cinq organes présentent de bonnes activités sur la forme promastigote de *L. donovani* et sont tous non sélectifs à l'exception de l'extraits des fruits (AnRfrEthOH) étant lui sélectif (IS = 1,44). Les extraits bruts éthanoliques des feuilles (AnRfEthOH) et fruits (AnRfrEthOH) d'*A. reticulata* sont non actifs sur la forme promastigote de *L. major* (CI<sub>50</sub> > 100 µg/ml). Tandis que les extraits bruts des trois autres organes à savoir celui des brindilles (AnRbrEthOH), des racines (AnRrEthOH) et des écorces (AnRecEthOH) présentent de bonnes activités sur les promastigotes de *L. major* mais cependant sont tous non sélectifs.

Contrairement à ce qui a été observé pour les échantillons d'*A. muricata*, on note pour *A. reticulata*, une amélioration de l'activité sur les formes promastigotes de *L. donovani* et *L. major* après la partition liquide-liquide par rapport aux extraits bruts de départ. Cependant, cette augmentation de l'activité des fractions des organes d'*A. reticulata* sur les formes promastigotes des deux parasites s'accompagne d'une diminution des indices de sélectivités à l'exception de la fraction au chlorure de méthylène des brindilles (AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) dont les indices de sélectivités ont augmentés dans les deux cas.

Le test sur les formes amastigotes de *L. donovani* et *L. major* montre que seule la fraction des brindilles d'*A. reticulata* (AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) est sélective avec respectivement des IS de 3,01

et 4,33. Sur la forme amastigote de *L. donovani*, les fractions d'*A. reticulata* s'avèrent toutes être très actives avec des  $CI_{50}$  variant de 1,42 (AnRecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) à 7,04 µg/ml (AnRfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Par contre sur la forme amastigote de *L. major*, ces fractions présentent des activités variant de très bonne (AnRfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AnRecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) à bonne (AnRfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

Des trois plantes testées, *A. senegalensis* est la moins active et la moins sélective. Trois organes de cette plante ont été testés : les feuilles, les brindilles et les tiges. Les extraits bruts éthanoliques de ces organes ne présentent aucune activité sur la forme promastigotes de *L. major* ( $CI_{50} > 100$  µg/ml). Toutefois, sur la forme promastigote de *L. donovani*, ils présentent des activités avec des  $CI_{50}$  comprises entre 42,38 et 83,36 µg/ml. Les extraits éthanoliques d'*A. senegalensis* sont tous dans les deux cas hautement non sélectifs avec des IS allant de 0,007 à 0,02 pour les promastigotes de *L. donovani* et de 0,002 à 0,009 pour ceux de *L. major*. On note également suite à la partition, une augmentation considérable de l'activité sur la forme promastigote de *L. donovani* et de *L. major* à l'exception des feuilles d'*A. senegalensis* (AnSf) où l'on note une diminution de l'activité sur les promastigotes de *L. donovani*. Cependant, cette augmentation de l'activité n'est pas suivie d'une augmentation de la sélectivité. La fraction des brindilles (AnSbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) présente une très bonne activité ( $CI_{50} = 0,93$  µg/ml) sur les amastigotes de *L. donovani*. Elle est également sélective avec un IS de 4,91. Seule la fraction des tiges (AnStiCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) s'est montrée active ( $CI_{50} = 25,60$  µg/ml) sur les amastigotes de *L. major*, cependant elle est non sélective (IS = 0,004).

La molécule de référence, la Glucantime présente de bonne activité ( $10 < CI_{50} < 50$  µg/ml) sur toutes les formes de *L. donovani* (forme promastigote :  $CI_{50} = 17,34$  µg/ml; forme amastigote :  $CI_{50} = 12,18$  µg/ml) et sur les formes de *L. major* (forme promastigote :  $CI_{50} = 14,22$  µg/ml; forme amastigote :  $CI_{50} = 19,97$  µg/ml). De plus la Glucantime est non sélective sur tous les parasites (IS < 1).

Comparativement aux données de la référence (la Glucantime), avec des  $CI_{50} < 10$  µg/ml et des IS > 1 :

- Cinq de nos échantillons à savoir AnMrEthOH, AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> s'avèrent être des échantillons d'un intérêt majeur contre la forme promastigote de *L. donovani*. AnMrEtOH étant d'un intérêt majeur ( $CI_{50} = 0,12$  µg/ml et IS = 5,41). Par contre, trois échantillons sont d'intérêts sur la forme

amastigote de *L. donovani* à savoir AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AnSbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ce dernier étant le plus prometteur (CI<sub>50</sub> = 0,93 µg/ml et SI = 4, 91).

- Un échantillon s'avère prometteur sur la forme promastigote de *L. major* : AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Quatre échantillons sont par contre d'un intérêt sur la forme amastigote de *L. major* : AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMecSF31 (CI<sub>50</sub> = 3,69 µg/ml et IS = 4,04) et AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (CI<sub>50</sub> = 3,00 µg/ml et IS = 4,33). Ces deux derniers au vue de leur CI<sub>50</sub> et de leur SI sont d'un intérêt majeur.

Seules les fractions au chlorure de méthylène, la sous fraction 31 des écorces (AnMecSF31) et le 3-*O*-β-D-glucopyranoside de stigmastérol ont été testés à la fois sur les deux formes de chaque parasite. L'indice de spécificité (ISP) étant le rapport entre de la CI<sub>50</sub> de l'extrait sur le promastigote et de la CI<sub>50</sub> de l'extrait sur l'amastigote a été de ce fait déterminé. Cette donnée permet d'identifier sur quelle forme du parasite un échantillon est plus actif. D'après les critères énoncés par **De Muylder et al. (2011)**, nous constatons que :

- Concernant l'activité antileishmanial viscérale, AnRrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnSfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnSbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AnStiCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont plus actifs sur les amastigotes de *L. donovani* car ont tous des ISP > 2. Par contre, AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AnRfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> avec des ISP < 0,4 sont plus actifs sur les promastigotes de ce parasite. Avec des ISP compris entre 0,4 et 2, AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ainsi que la molécule de référence la Glucantime sont autant actifs sur les promastigotes que sur les amastigotes de *L. donovani*.
- Pour ce qui est de l'activité antileishmaniale cutanée sur *L. major*, AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, le composé AnMrP1 (3-*O*-β-D-glucopyranoside de stigmastérol), AnMecSF31, AnRfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AnRecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> avec des ISP > 2 sont plus actifs sur les amastigotes. AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnSfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AnSbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> étant eux plus actifs sur les promastigotes (ISP < 0,4). Avec des ISP compris entre 0,4 et 2, AnStiCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et la Glucantime sont autant actifs sur les deux formes de *L. major*.

## ***i-2- Discussion***

Il ressort de cette investigation que la souche de *L. donovani* est la plus sensible que celle de *L. major*. Cette différence de sensibilité serait due d'après **Charest et al. (1996)** à des propriétés intrinsèques des différentes souches de *Leishmania* et aux interactions entre les facteurs du parasite et les facteurs de la cellule hôte. **Croft et Coombs, (2003)** ont également suggéré que la différence de sensibilité des amastigotes intracellulaires s'expliquerait par la différence d'adaptation qui facilite la survie intracellulaire.

Les résultats obtenus ont montré que *A. muricata*, *A. reticulata* et *A. senegalensis* possèdent des activités plus ou moins intéressantes *in vitro* contre les formes promastigotes et amastigotes intracellulaires de *L. donovani* et *L. major*. De nombreuses études ont reporté des activités antileishmaniales des plantes de la famille des Annonaceae en général (**De Mesquita et al., 2005**) et du genre *Annona* en particulier (**Sahpaz et al., 1994; Jaramillo et al., 2000; Tempone et al., 2005 et Osario et al., 2007b**).

De ces plantes, *A. muricata* a fait l'objet de nombreuses investigations. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par **Jaramillo et al. en 2000** qui ont obtenu de très bonnes activités antileishmaniales avec les extraits hexanique, éthyl acétique et méthanolique du péricarpe d'*A. muricata* *in vitro* sur les promastigotes de *L. braziliensis* et *L. panamensis* avec des  $CI_{50}$  variant de 0,1 à > 1 mg/ml.

Peu d'investigations sur l'activité antileishmaniale d'*A. reticulata* ont été rapportées. Les résultats obtenus dans cette étude sur *L. donovani* et *L. major* vont en commun accord avec ceux obtenus par **De Lima et al. (2012)** sur *L. amazonensis*, *L. guyanensis* et *L. braziliensis*. En effet, ces auteurs ont mis en exergue l'activité antileishmaniale des extraits hexanique, méthanolique et dichlorométhanique des feuilles et graines d'*A. reticulata*, obtenant des  $CI_{50}$  comprises entre 9,32 et 170,15 µg/ml sur les promastigotes. A 25 µg/ml, ces extraits étaient tous actifs sur les formes amastigotes réduisant 80% des amastigotes intracellulaires.

Bien que de nombreuses études sur les activités antiparasitaires aient été menées par divers auteurs sur *A. senegalensis*, l'étude de l'activité antileishmaniale de cette dernière est moindre. **Sahpaz et al. en 1994** ont évalué l'activité antileishmaniale viscérale et cutanée des extraits hexanique, méthanolique et dichlorométhanique des graines d'*A. senegalensis* sur les formes promastigotes de *L. donovani* et *L. major*. Les activités des extraits variaient de 50 à >

200 µg/ml sur *L. donovani* et de 50 à 200 µg/ml sur *L. major*. Cette très faible activité corrobore avec nos résultats.

Bien que de nombreux auteurs mentionnés ci-dessus présentent des activités antileishmaniales d'*A. muricata*, *A. reticulata* et *A. senegalensis*, il convient cependant de noter que nos extraits/fractions sont dans l'ensemble plus actifs que les spécimens des autres auteurs. Cette différence d'activité trouverait son explication au niveau de l'origine des plantes, des solvants d'extractions, des organes de plante testés et surtout au niveau du processus de partition. En effet, ces auteurs ont pour la plus part effectué des extractions brutes au méthanol, à l'hexane et au dichlorométhane. Or dans notre étude, nous avons fait une extraction brute à l'éthanol et ensuite chaque extrait éthanolique obtenu a été partitionné entre le chlorure de méthylène et l'eau. Cette partition expliquerait également dans notre étude l'augmentation considérable de l'activité sur la forme promastigote de *L. donovani* et *L. major* à l'exception des feuilles d'*A. senegalensis* (AnSf) où l'on note une diminution de l'activité sur les promastigotes de *L. donovani*. Nous pouvons donc dire que la partition aurait concentré le ou les groupes de métabolites secondaires responsables de l'activité.

Les métabolites secondaires présents dans les extraits/fractions pourraient expliquer les activités antileishmaniales observées. En effet, les plantes de la famille des Annonacées et plus spécifiquement ceux du genre *Annona* sont reconnues pour leur activité antileishmaniale de par leur richesse plusieurs classes de métabolites secondaires (**Rocha et al., 2005**).

L'une des classes de métabolites secondaires qui seraient responsables des activités antileishmaniales obtenues des plantes étudiées sont les acétogénines. En effet, les acétogénines isolés d'*A. muricata*, d'*A. reticulata* et *A. senegalensis* ont montré de très bonne activités antileishmaniales. Plus de 160 types d'acétogénines différents ont été identifiés dans la famille Annonacées. A partir des différentes espèces d'Annonacées, 12 acétogénines contenant des mono-et bis-THF cycliques ont été isolés et testés contre promastigotes et amastigotes de *L. donovani* avec des CI<sub>50</sub> comprises entre 2,5 et 47,3 µM. La Rollinistatine était le plus efficace contre les amastigotes, avec une CI<sub>50</sub> de 2,5 µM. Certains acétogénines avec un anneau THF, comme la Senegalene, ou deux noyaux THF tels que la Squamocine, l'Asimicine, et la Molvizarine, isolés à partir de graines d'*A. senegalensis* ont montré une activité antileishmaniale contre les promastigotes de *L. major* et *L. donovani* avec des CI<sub>50</sub> comprises entre 25-100 µg/ml (**Sahpaz et al., 1994**). De même, **Nadja et al.** en **2011** et **2013** ont mis en exergue l'activité antileishmaniale sur les promastigotes et amastigotes de *L. chagasi*, *L.*

*donovani*, *L. major* et *L. mexicana* des acétogénines isolés des feuilles d'*A. muricata* et *A. squamosa*. Ces dernières ont présenté de bonne activité avec des  $CI_{50}$  variant de 6,72 à 37,6  $\mu\text{g/ml}$ .

Les alcaloïdes, également très abandonnant dans la famille des Annonacées pourraient également justifier les activités antileishmaniales obtenues dans cette étude. En effet, en 2011, **Nadja et al.** ont isolé un alcaloïde des feuilles d'*A. muricata* et d'*A. squamosa* dont la  $CI_{50}$  sur les promastigotes et les amastigotes intracellulaires de *L. chagasi* était respectivement de 23,3  $\mu\text{g/ml}$  et 25,4  $\mu\text{g/ml}$ . De plus, de nombreux auteurs, **Queiroz et al. (1996)**, **Waechter et al. (1999)**, **Costa et al. (2006)** et **De Lima et al. (2012)** ont mis en exergue l'activité antileishmaniale de la liriodenine, un alcaloïde oxoaporphine isolé des feuilles d'*A. reticulata* sur les promastigotes et les amastigotes intracellulaires de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* et *L. guyanensis*. D'après **Lauvaud et al. (1995)**, les alcaloïdes agiraient par inhibition de la topoisomérase I sur *L. donovani* et entraîneraient également la lyse des promastigotes. **Fournet et al.** en 2000 ont montré que les alcaloïdes agiraient aussi par inhibition des enzymes essentiels dans le mécanisme de lutte contre le mécanisme antioxydant mis en place par les *Leishmania*. Les alcaloïdes et les acétogénines sont bien connus en raison de leur activités antiprotozoaires mais surtout combinées avec des niveaux élevés de toxicité pour les cellules de mammifères (**Lauvaud et al., 1995; Alali et al., 1999**). Ce qui expliquerait la non sélectivité de AnMpEthOH, AnMecEthOH, AnRfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AnRecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sur les promastigotes de *L. donovani*, de AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et de AnRecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sur les amastigotes de *L. donovani* et de AnRfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AnRecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et sur les amastigotes de *L. major* bien qu'ils possèdent de forte activité antileishmaniale ( $CI_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ ).

L'évaluation de l'activité antileishmaniale des 24 échantillons d'*A. muricata*, *A. reticulata* et *A. senegalensis* sur les souches de *L. donovani* et *L. major* (Tableau XI) révèle qu'avec des  $CI_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ , et un IS > 1 :

AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, et AnRfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont parmi les échantillons qui sont des sources potentiels de principes actifs sur les promastigotes de *L. donovani* et AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sur ceux de *L. major*. Cependant aucun n'est également une source potentielle de principes actifs sur les amastigotes intracellulaires des différents parasites de *Leishmania*. Ce résultat indique que l'évaluation de l'activité antileishmaniale sur les promastigotes ne permet pas d'identifier de façon exhaustive toutes les sources potentielles de principes actifs à activité antileishmaniale

sur la forme infectieuse, entraînant généralement l'identification des sources potentiellement non crédibles sur la forme infectieuse. Seulement 60% des extraits actifs sur la forme promastigotes de *L. donovani* ont été également actifs sur la forme infectieuse. Ceci corrobore avec les conclusions de **Siqueira-Neto et al. (2012)** qui ont révélé dans leur étude que des produits testés et identifiés comme principes actifs potentiels sur les promastigotes de *L. donovani* tous n'étaient pas actifs sur les amastigotes intracellulaires du parasite. De même, dans notre étude, 100% des extraits actifs sur la forme infectieuse de *L. major*, n'ont présenté aucune activité sur la forme promastigote du parasite. Ainsi, la découverte de molécules antileishmaniales pose un réel défi, du fait que le stade parasitaire responsable de la maladie réside dans une vacuole acide (la vacuole parasitophore) à l'intérieur des macrophages de l'hôte. Or, les promastigotes de plusieurs espèces de *Leishmania* sont couramment utilisés en recherche pour le criblage des composés à activité antileishmaniale, du fait de leur culture *in vitro* facile et rapide. Cependant, la forme promastigote du parasite est la forme retrouvée chez l'agent vecteur de la maladie. Elle n'est donc pas appropriée pour la recherche d'un médicament à activité antileishmaniale. De plus, le criblage sur le stade promastigote, bien plus réalisable, ne parvient pas à identifier tous les composés actifs et conduit à de nombreux résultats faussement positifs (**Manu et al., 2013**).

En vue de relever à ce défi, les conditions de culture des amastigotes axéniques ont été développées afin de faciliter l'étude comparativement à la culture des amastigotes intracellulaires. Toutefois, la comparaison de la culture des amastigotes axéniques et amastigotes intracellulaires a montré des différences dans plusieurs processus cellulaires, dont le métabolisme, le transport intracellulaire et la réponse au stress oxydatif (**Rochette et al., 2009**). Ces observations soulignent l'importance du macrophage hôte pour le développement et l'adaptation du parasite. Le modèle d'amastigotes axéniques a donc des limites, car il ne prend pas en compte de nombreux aspects de développement du parasite intracellulaire (**De Muylder et al., 2011**). Les composés actifs sur les amastigotes axéniques pourraient être inactifs sur les amastigotes intracellulaires en raison de leur incapacité à traverser les membranes cellulaires de l'hôte ou de se maintenir stable dans des conditions de faible pH. D'autres composés pour être actifs, peuvent avoir besoin d'être métabolisés par les macrophages (**Vermeersch et al., 2009**). D'où la nécessité des essais sur amastigotes intracellulaires tel que réalisé dans notre étude dans le processus de découverte des médicaments antileishmaniaux.

Nous notons que nos extraits/fractions et produits présentent des activités qui varient en fonction de la forme (promastigotes et amastigotes) du parasite. Cette variabilité s'expliquerait

selon **Manu et al. (2013)** par la différence de site d'action de chaque extraits/fractions/produits. En effet, d'après ces auteurs, les échantillons tels que AnMrEtOH, AnMecEthOH, AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, et AnRfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> préférentiellement actifs sur les promastigotes de *L. donovani* et AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> préférentiellement actif sur ceux de *L. major*. agiraient par perturbation de la membrane du promastigote, tandis que d'autres échantillons tels que AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AnSbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, préférentiellement actif sur les amastigotes intracellulaires de *L. donovani* et AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMecSF31 et AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> qui sont préférentiellement actifs sur les amastigotes intracellulaires de *L. major* agiraient en se liant à la protéine G couplée aux récepteurs (récepteurs opioïdes, la sérotonine ou les récepteurs de dopamine et des récepteurs adrénergiques) des amastigotes de *Leishmania*.

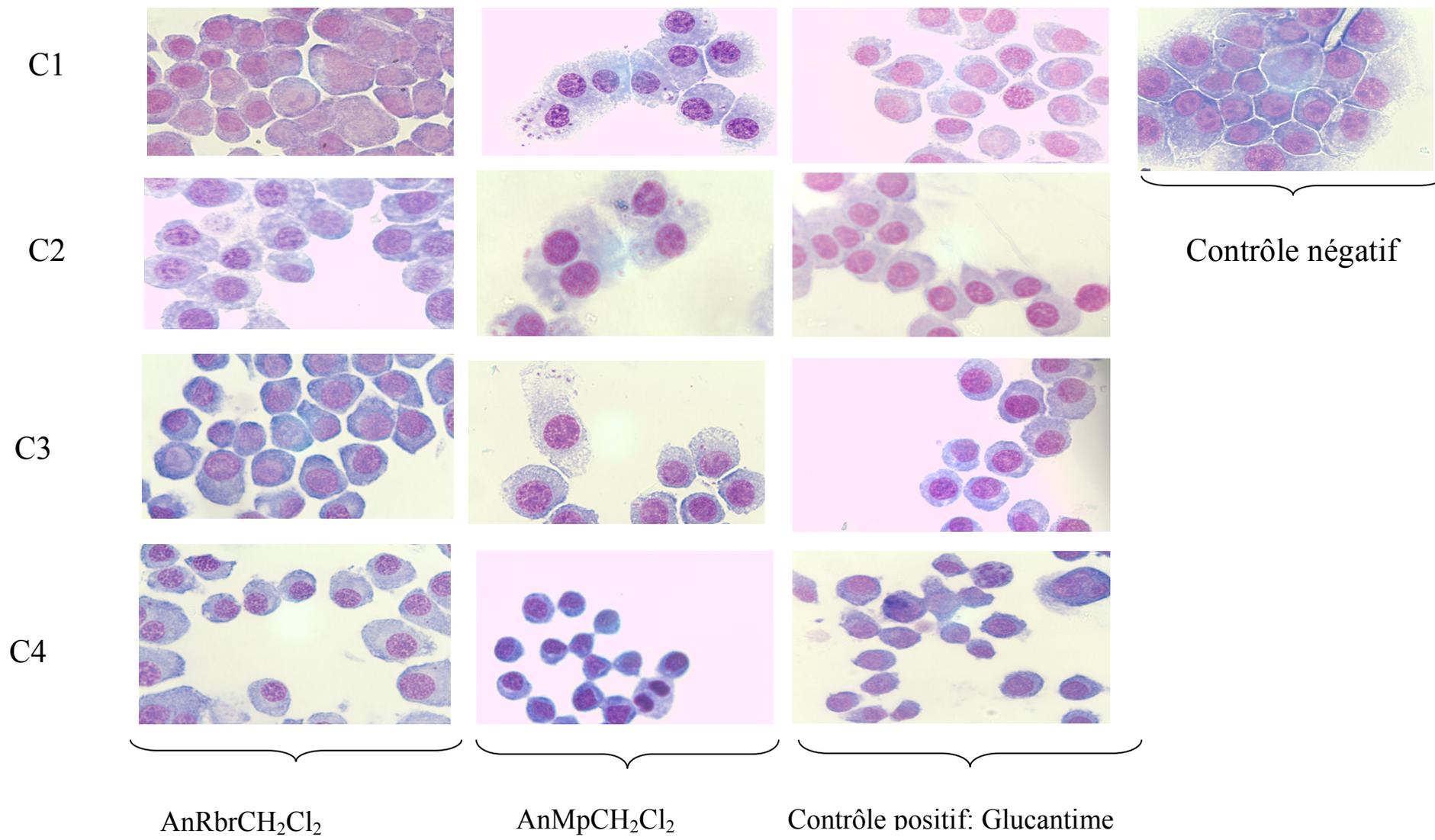
## ***ii- Caractérisation phénotypique des macrophages J774.2 infectés***

### ***ii-1- Résultats***

La figure 28 présente les effets des échantillons AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et de la molécule de référence la Glucantime par rapport au contrôle négatif et aux cellules non infectées sur les amastigotes intracellulaires de *L. donovani* et sur les macrophages J774.2 après observation microscopique à l'huile d'immersion sous l'objectif 100x.

L'observation microscopique a été réalisée avec pour objectif d'observer l'inhibition de la croissance des amastigotes et les différentes modifications morphologiques de la cellule hôte dues à la présence des différents inhibiteurs. Comme prévu, le nombre d'amastigote observé en présence des inhibiteurs a diminué en fonction de la concentration testée.

Nous avons observé une modification de la morphologie et du degré de confluence des macrophages avec certains échantillons tels que AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnSfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnStiCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ainsi que la molécule de référence la Glucantime lors des tests d'activités contre les amastigotes intracellulaires de *L. donovani* et *L. major*. Par contre d'autres échantillons tels que AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMrP1 (3-O-β-D-glucopyranoside de stigmastérol) et AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> n'ont pas eu d'effet néfaste remarquable sur la morphologie et sur le degré de confluence des macrophages.



**Figure 28: Observation microscopique des cellules**

*C1 = Concentration 1; C2 = Concentration 2; C3 = Concentration 3; C4 = Concentration 4*

## ***ii-2- Discussion***

L'observation des modifications phénotypiques a permis de mettre en exergue les effets de nos échantillons sur la croissance des amastigotes et des cellules hôtes. La méthode de microscopie permet des observations *in situ* de l'effet des agents anti-parasitaires sur les organismes (Sasidharan *et al.*, 2010).

La modification de la morphologie et du degré de confluence des macrophages observée avec certains échantillons tels que AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnSfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnStiCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ainsi que la molécule de référence, la Glucantime lors des tests d'activités sur les amastigotes intracellulaires de *L. donovani* et *L. major* justifierait la forte activité couplée à la non sélectivité de ces échantillons, suggérant ainsi leur effet cytotoxique qu' antileishmanial.

Cependant, l'observation de l'absence d'effet néfaste remarquable sur les macrophages pour certains échantillons dont AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMrP1 (3-*O*-β-D-glucopyranoside de stigmastérol) et AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> suggérerait que ces échantillons agissent sur le parasite mais pas sur les macrophages. Ceci se traduit par une diminution des parasites dans les macrophages, ces derniers étant viables et en activité métabolique.

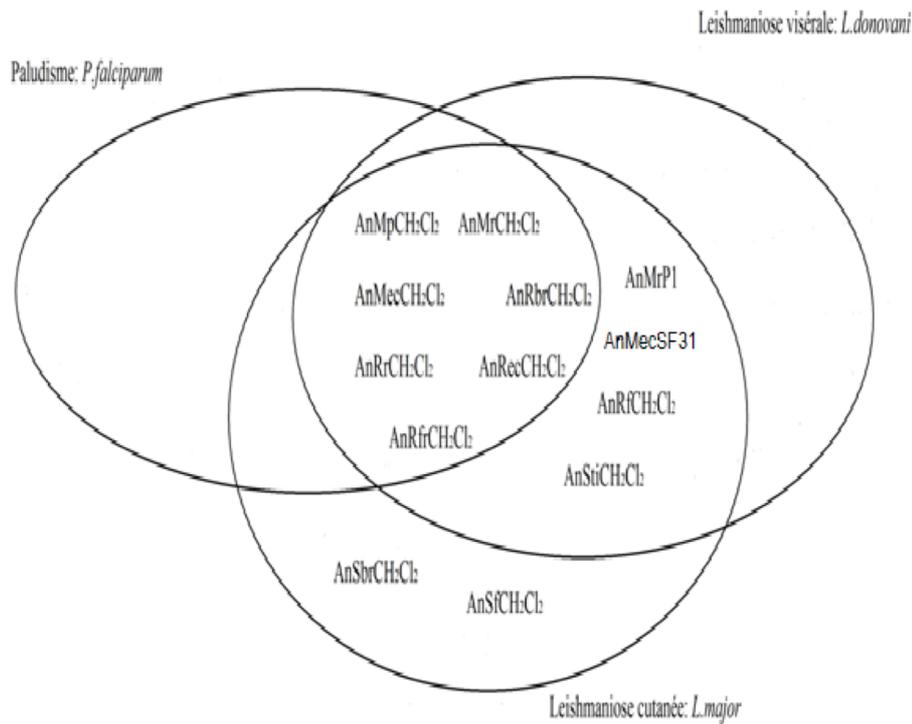
## **III-4- Corrélation entre l'activité antiplasmodiale et antileishmaniale**

### ***i- Résultats***

En vue de trouver une corrélation entre l'activité antiplasmodiale et antileishmaniale, nous nous sommes proposé de ressortir les échantillons qui ont été testés à la fois sur *P. falciparum* et sur les formes amastigotes intracellulaires des différents parasites de *Leishmania* à savoir toutes les fractions au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnSfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnSbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AnStiCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), le produit AnMrP1 (3-*O*-β-D-glucopyranoside de stigmastérol) et la sous fraction AnMecSF31 obtenus respectivement des racines et des écorces d'*A. muricata*.

D'après la figure 29 ci- dessous, de ces 13 échantillons, 7 à savoir AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, et AnRfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

sont actifs sur les amastigotes intracellulaires de *L. donovani*, sur ceux de *L. major* et sur *P. falciparum*. Quatre, à savoir AnMrP1 (3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside de stigmastérol), AnMecSF31, AnRfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AnStiCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont actifs sur les amastigotes intracellulaires de *L. donovani*, et sur ceux de *L. major*, tandis que deux, AnSbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AnSfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont spécifiquement actifs sur les amastigotes intracellulaires de *L. major*. Des trois pathogènes, *L. donovani* est plus sensible aux extraits, suivi de *L. major* et enfin *P. falciparum*.



**Figure 29 : Répartition de l'activité des échantillons en fonction des protozoaires**

## ***ii- Discussion***

Le paludisme et la leishmaniose sont des problèmes de santé public dans les pays en voie de développement où ils ont un taux de mortalité très élevé et affectent des centaines de millions de personne dans le monde (**Bharate et al., 2007**).

Treize échantillons ont été évalués pour leur capacité à inhiber la croissance des pathogènes responsables du paludisme, de la leishmaniose viscérale et cutanée. Sept (AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, et AnRfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) se sont avérés être actifs sur les trois parasites. Cette observation pourrait s'expliquer du fait que *P. falciparum*, *L. donovani* et *L. major* sont tous des protozoaires et par conséquent auraient certaines cibles pharmacologiques communes. Ils agiraient par inhibition des cystéines protéases. En effet, les cystéines protéases, sont présentes chez les trois parasites et sont essentiels dans l'infectivité des trois parasites **McKerrow et al. (1999)**. Les cystéines protéases sont essentiels dans le développement des protozoaires. Ils modulent les mécanismes de défense de l'hôte tel que la production des cytokines de façon à favoriser la prolifération des parasites. Elles sont également impliquées dans la dégradation des protéines intracellulaires. Elles constituent une cible potentielle de lutte contre les protozoaires. Ils agiraient également d'après **Bell et al. (2012)** par inhibition de la protéine N-myristoyltransférase, qui est une enzyme essentielle pour la survie des protozoaires.

AnMrP1 (3-*O*-β-D-glucopyranoside de stigmastérol), AnMecSF31, AnRfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et AnStiCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ont été actifs à la fois sur les amastigotes intracellulaires de *L. donovani*, et sur ceux de *L. major*. Ces échantillons agiraient d'une part d'après **Peltier et al. (2008)** sur les galactofurnosyl hydrolases et transférases qui sont des enzymes qui catalysent respectivement l'hydrolyse et la formation de la liaison entre le galactofuranose (Galf) un oligosaccharide. En effet, d'après ces auteurs, la paroi cellulaire des *Leishmania* est recouverte d'une variété de glycoconjugués, qui jouent un rôle critique dans la survie et la virulence des *Leishmania* lors de l'infection. Un des constituants central de ces composés est le Galf et les enzymes impliquées dans sa biosynthèse ou son métabolisme sont donc des cibles de choix pour l'élaboration de nouvelles molécules anti-parasitaires. D'autre part, ils agiraient par inhibition de la nicotinamidase, une enzyme qui joue un rôle clé dans le développement cellulaire des *Leishmania*. Cette enzyme permet aux *Leishmania* d'assimiler la vitamine B3 essentielle pour la synthèse d'un élément vital du parasite, le NAD<sup>+</sup> (**Michels et Avilán, 2011**).

Les protozoaires de l'ordre des Kinetoplastida tel que les *Leishmania* sont reconnus pour leur spécificité en base J, le  $\beta$ -D-glucosyl-hydroxyméthyluracile qui est une modification épigénétique de la thymine de l'ADN des Kinetoplastida (**Reynolds et al., 2014**). Les 4 échantillons actifs sur les amastigotes intracellulaires des *Leishmania* agiraient par un mécanisme de réduction de la base J. En effet, la base J est riche en de nombreux sites impliqués dans l'initiation et la terminaison de l'ARN polymérase (ARNP) II. La réduction de cette base entraîne une mort de l'amastigote (**Reynolds et al., 2014**).

L'activité spécifique des fractions au chlorure de méthylène des feuilles (AnSfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) et brindilles (AnSbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) d'*A. senegalensis* sur les amastigotes intracellulaires de *L. major* se justifierait par le fait que ces derniers agiraient sur le protéasome LmHslVU localisé au niveau de la mitochondrie de *L. major*. En effet, la présence d'un protéasome de type procaryote (HslVU) a été signalée chez *L. major*, *Trypanosoma brucei* et *Trypanosoma cruzi* par **Couvreur et al. (2002)**. Ce complexe LmHslVU est nécessaire à la multiplication du parasite. L'inactivation du LmHslVU par interférence avec ARN conduit à l'arrêt de la division cellulaire et à la mort du parasite. Puisqu'elle est absente chez l'homme, HslVU constitue donc une cible thérapeutique potentielle intéressante pour lutter contre *L. major*.



## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Le présent travail a porté sur l'évaluation de l'activité antiplasmodiale et antileishmaniale des espèces du genre *Annona* (Annonaceae).

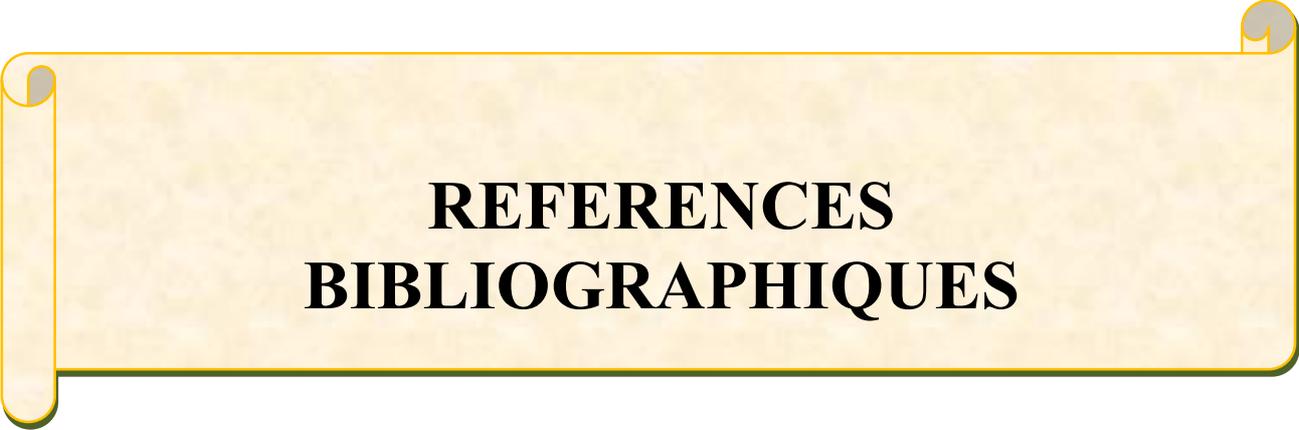
Les conclusions suivantes découlent de cette investigation :

- *Annona muricata*, *Annona reticulata*, *Annona senegalensis* et *Annona squamosa* sont utilisés au Cameroun en médecine traditionnelle pour leur effet thérapeutique contre le paludisme ou les symptômes associés. *Annona muricata* est la seule plante trouvée dans trois des quatre sites d'études. Les rendements d'extraction et de partition varient de 0,41 à 11,58%. La chromatographie flash des fractions au chlorure de méthylène des racines et écorces d'*A. muricata* a abouti à l'obtention de 8 sous fractions et 1 composé pour les racines identifié comme étant le 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside de stigmastérol. Quarante trois sous fractions et 3 composés (la lichexanthone, l'acide gallique et le 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside de  $\beta$ -sitostérol) ont été obtenus des écorces.
- Des trois plantes testées à savoir *A. muricata*, *A. reticulata* et *A. senegalensis* sur la souche W2 de *P. falciparum*, deux à savoir *A. muricata* et *A. reticulata* ont présenté des activités antiplasmodiales vis-à-vis de la souche W2 de *P. falciparum* avec des  $CI_{50}$  variant de 0,07 à 3,46  $\mu$ g/ml. Les différents échantillons ont démontré une innocuité *in vitro* vis-à-vis des cellules HFF, la toxicité ne s'observant qu'à des concentrations supérieures à 10  $\mu$ g/ml. Avec des  $CI_{50} < 0,2$  et des  $IS > 100$ , la sous fraction 3 (AnMrSF3) des racines et la sous fraction 30 (AnMecSF30) des écorces d'*A. muricata* sont des candidats pour la découverte de nouveaux antipaludiques.
- Les extraits éthanoliques, les fractions au chlorure de méthylène, la sous fraction AnMecSF31 et le 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside de stigmastérol testés contre *L. donovani* et *L. major* ont montré des activités antileishmaniales avec des  $CI_{50}$  variant de 0,12 à 85,25  $\mu$ g/ml. Cependant des effets cytotoxiques ont été observés sur les cellules hôtes, pour certains échantillons. Avec une  $CI_{50} < 10$   $\mu$ g/ml et un  $IS > 1$ , et n'entraînant pas de façon significative des modifications morphologiques des cellules hôtes, AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> est d'un intérêt majeur pour la lutte contre la leishmaniose viscérale et cutanée.

AnMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnMecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRbrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AnRecCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, et AnRfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont tous actifs sur les trois protozoaires et constitueraient par conséquent un socle dans la lutte contre les maladies causées par les protozoaires. Dans leur globalité, les résultats obtenus dans ce travail concourent à justifier l'utilisation traditionnelle

d'*A. muricata* et *A. reticulata* dans le traitement des maladies à protozoaires. Ces résultats supportent en conséquence une investigation plus accentuée et plus approfondie de ces deux espèces dans la recherche de substances naturelles développables en médicaments contre le paludisme et la leishmaniose. Ces activités impliqueront entre autres :

- Poursuivre l'étude phytochimique des espèces d'intérêts *A. muricata* et *A. reticulata* afin d'isoler d'autres métabolites secondaires contenus dans les extraits.
- Etudier l'activité antipaludique et antileishmaniale de ces métabolites afin de confirmer ou d'infirmier les activités attribuées à ces plantes.
- Déterminer le profil toxicologique des dérivés actifs.
- Réaliser l'étude *in vivo* et les études relation structure-activité des molécules actives.



**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- Adjanohoun J.E., Aboubakar N., Dramane K., Ebot M.E., Ekpere J. A., Enoworock E. G., Focho D., Gbile Z.O., Kamanyi A., Kamsu K.J., Keita A., Mbenkum T., Mbi C.N., Mbiele A.C., Mbome J.C., Muberu N.K., Nancy W.L., Kongmeneck B., Satabie B., Sofowor A., Tamze V. et Wirmum C.K. (1996).** *Traditional Medicine and Pharmamacopoeia: Contribution to Ethnobotanical and Floristic Studies in Cameroon.* Organisation of African Unity; Scientific Technical and Research Comity, Addis Ababa, PP 194-201.
- Adzu B., Abubakar M.S., Izebe K.S., Akumka D.D., Gamaniel K.S. (2005).** Effect of *Annona senegalensis* rootbark extracts on *Naja nigricotlis nigricotlis* venom in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **96** (3):507-13.
- Ajaiyeoba E., Falade M., Ogbole O., Okpako L., Akinboye D. (2006).** *In vivo* antimalarial and cytotoxic properties of *Annonasenegalensis* extract. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicine*, **3** (1): 137-141.
- Aké Assi L., Guindo S. (1991).** *Plantes utilisées dans la médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest.* Edition Roche, Basel, Switzerland, 147 p.
- Alali F.Q., Liu X.X., McLaughlin J.L. (1999).** Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Journal of Natural Products*, **62**: 504-540.
- Alvar J., Canavate C., Gutierrez-Solar B., Jimenez M., Laguna F., Lopez-Velez R., Molina R., Moreno J. (1997).** *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *American Society of Microbiology*, **101**: 23-30.
- Amos F. (2005).** *Performances diagnostiques du test rapide Optimal-IT: Place de la Biologie moléculaire dans l'évaluation du polymorphisme génétique de la lactate déshydrogénase (LDH) de P. falciparum.* Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Bamako, Mali. 144p.
- Anil M., Nandini P. (2010).** Simultaneous isolation and identification of phytoconstituants from *Terminalia chebula* by preparative chromatographie. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2** (5):97-103.
- Antoun M.D., Gerend L., Milhous W.K. (1993).** Screening of the Flora of Puerto Rico for Potential Antimalarial Bioactives. *International Journal of Pharmacognosy*, **31** (4): 255-25.

- Antoun M.D., Martinez E., Caballero R., Quendo I., Proctor G.R., Weislow O.S., McCloud T.G., Kiser R., Staley P., Clanton D. (1999).** Evaluation of the Flora of Puerto Rico for *In Vitro* Cytotoxic and Anti-HIV Activities. *Pharmaceutical Biology*, **37** (4): 277-280.
- Arriaga A.M.C., Feitosa E.M.A., Lemos T.L.G., Santiago G.M.P., Lima J.Q., De Oliveira M.C.F., Vasconcelos J.N.E., Rodrigues F.E.A., Gomes T.B.M., Braz-Filho R. (2008).** Chemical constituents and insecticidal activity of *Rollinia leptopetala*. *Natural Product Communications*, **3**: 1565-1688.
- Ashford R.W. (2000).** The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal of Parasitology*, **30**: 1269-1281.
- Aubry (2015).** Paludisme Actualités. *Médecine Tropicale*, mis à jour le 11/01/2015.
- Azebaze A.G.B., Meyer M., Valentin A., Nguemfo L.E., Tanee F.Z., Nkengfack A.E. (2006).** Prenylated Xanthone Derivatives with Antiplasmodial Activity from *Allanblackia monticola* STANER L.C. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **54** (1):111-113.
- Baskar R., Rajeswari, Sathish Kumar S. (2007).** *In vitro* and antioxidant activities in leaves of *Annona* species. *India Journal of Experimental Biology*, **45**: 480-485.
- Bassandja J., Ajasa B., Likwela J.K. (2014).** Prévalence du portage asymptomatique du paludisme chez les donneurs bénévoles de sang à Kisangani, République Démocratique du Congo. *The Pan African Medical Journal*, **17**: 320.
- Bell A.S., Mills J.E., Williams G.P., Brannigan J., Wilkinson A.J., Parkinson T., Leatherbarrow R.J., Tate E.W., Holder A.A., Smith D.F. (2012).** Selective Inhibitors of Protozoan Protein *N*-myristoyltransferases as Starting Points for Tropical Disease Medicinal Chemistry Programs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **6** (4): 1625.
- Beniddir A.M. (2012).** *Recherche de composés à activité antiplasmodiale à partir de la biodiversité malgache*. Thèse de Doctorat, Université de Paris Sud. Série N<sup>o</sup> 1184. Pp315.
- Berman J. (2003).** Current treatment approaches to leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **16**: 397-401.

- Bern C. (2000).** Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed-net use is strongly protective. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **63**: 184-188.
- Berry A. (2006).** *Rôle de PPAR-? Dans la Modulation de l'Expression du Récepteur CD36 à la Surface des Monocytes Humains par l'IL-13, Implication dans la Physiopathologie du Paludisme à Plasmodium falciparum.* Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, France. PP 64-66.
- Betancur-Galvis L., Saez J., Granados H., Salazar A., Ossa J. (1999).** Antitumor and Antiviral Activity of Colombian Medicinal Plant Extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **94** (4): 531-5.
- Bharate S.B., Khan S.I., Yunus N.A., Chauthe S.K., Jacob M.R., Tekwani B.L., Khan I.A., Singh I.P. (2007).** Antiprotozoal and antimicrobial activities of O-alkylated and formylated acylphloroglucinols. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **15**: 87-96.
- Bidla G., Titanji V.P.K., Joko B., Ghazali G.E., Bolad A. et Berzins K. (2004).** Antiplasmodial Activity of Seven Plants Used in African Folk Medicine. *Indian Journal of Pharmacology*, **36** (4): 245-246.
- Boelaert M., El-Safi S.H., Jacquet D., de Muynck A., van der Stuyft P., Le Ray D. (1999a).** Operational validation of the direct agglutination test (DAT) for diagnosis of visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **60**: 129-134.
- Boelaert M., El-Safi S.H., Mousa H., Githure J., Mbatia P.A., Gurubacharya V.L., Shrestha J., Jacquet D., de Muynck A., Le Ray D., van der Stuyft P. (1999b).** Multi-centre evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine and International Health*, **4**: 31-37.
- Botero D. (2006).** *Parasitosis humanas.* Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Boyom F.F. (1992).** *Huiles Esentielles de Quelques Annonaceae du Cameroun: Teneur, Caractéristiques Chimiques et Propriétés Pharmacodynamiques.* Thèse de Doctorat 3<sup>e</sup> Cycle en Biochimie, Université de Yaoundé, Cameroun. PP 136-148.

- Boyom F.F. (2004).** *Huiles Essentielles de Quelques Annonacées du Cameroun: Analyse Chimique, Activités Antioxydantes et Antiplasmodiales.* Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Yaoundé I, Cameroun. PP 77-123.
- Boyom F.F., Madiesse K.E., Tepongning R., Mbacham F.W., Tsamo E., Amvam Z. P.H., Gut J. et Rosenthal P.J. (2009).** Antiplasmodial Activity of Extracts from Seven Medicinal Plants Used in Malaria Treatment in Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*, **123**: 483-488.
- Boyom F.F, Tsouh F.P.V., Tchokouaha Y.L.R, Ngoutane M.A, Madiesse K.A.E, Mbacham F.W., Tsamo E., Amvam Z.P.H., Jiri G., Rosenthal P.J. (2011).** Potent antiplasmodial extracts from Cameroonian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, **134**: 717-724 (2011).
- Boyom F.F., Fokou T.P.V., Tchokouaha Y.L.R., Spangenberg T., Mfopa N.A., Kouipou T.R.M., Mbouna J.C., Donkeng D.F.V., Zollo A.P.H. (2014).** Repurposing the open access malaria box to discovery potent inhibitors of *Toxoplasma gondii* and *Entamoeba histolytica*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **58** (10): 5848.
- Bruschi P., Morganti M., Mancini M., Signorini M.A. (2011).** Traditional healers and lay people: A qualitative and quantitative approach to local knowledge on medicinal plants in Muda (Mozambique). *Journal of Ethnopharmacology*, **138**: 543-563.
- Buitrago D. A., Rojas V.J., Cote V., Bruno-Colmenárez, Díaz de Delgado G. (2010).** NMR elucidation and crystal structure analysis of 1-hydroxy-3,6-dimethoxy-8-methyl-9*h*-xanthen-9-one (lichexanthone) isolated from *Vismia baccifera* (Guttiferae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **9** (6): 470- 474.
- Burkill H.M. (1985).** *The Useful Plants of West Tropical Africa*, 2<sup>nd</sup> Ed., Royal Botanic Gardens Kew, London, UK. PP 98-135.
- Burton J.B., Clint E.C., Thomas N.O. (2012).** *Human parasitology*. Four edition. Elsevier, 430p.
- Camacho M.D.R., Phillipson J.D., Croft S.L., Solis P.N., Marshall S.J., Ghazanfar S.A. (2003).** Screening of Plant Extracts for Antiprotozoal and Cytotoxic Activities. *Journal of Ethnopharmacology*, **89**: 185-191.

- Carbajall D., Casaco A., Arruzazabaca L., Conzalez R., Fuentes V. (1991).** Pharmacological Screening of Plant Decoctions Commonly Used in Cuban Folk Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **33** (1/2): 21-24.
- Carvalho L. H., Rocha E. M., Raslan D. S., Oliveira A. B., Krettli A. U., Antoniana U. (1988).** *In vitro* activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research*, **21** (3): 485-487.
- Carvalho P.B., Arribas M.A.G., Ferreira E.I. (2000).** Leishmaniasis. What know about its chemotherapy? *Revista Brasileira Ciencias Farmacêuticas*, **36**: 69-96.
- Carvalho P.B., Ferreira E.I. (2001).** Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease-Review. *Fitoterapia*, **72**: 599-618.
- Carvalho A., Alcantara G., Oliveira S., Micheletti A., Honda N., Maia G. (2009).** Electroreduction of lichexanthone. *Electrochim Acta*, **54**: 2290-2297.
- Cassady J.M. (1990).** Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Journal of Natural Products*, **53** (1): 23-41.
- Castellon I., L., A. (2007).** *Caractérisation de terpènes antileishmaniens isolés par bioguidage d'une plante bolivienne Hedyosmum angustifolium (Ruiz & Pavon) Solms.* Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse, Sciences de la Matière, Spécialité : Chimie – Biologie – Santé. Pp 255.
- Cedillo-Rivera R., Ramfrez A., Munoz O. (1992).** A Rapid Colorimetric Assay with the Tetrazolium Salt MTT and Phenazine Methosulfate (PMS) for Viability of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research*, **23**: 59-61.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2009).** *Cycle parasitaire de Leishmaniose.* [en ligne] accès internet: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/> (page consultée le 12 Février 2009).
- Champy P., Hoglinger G.U., Feger J., Gleye C., Hocquemiller R., Laurens A., Guerineau V., Laprevote O., Medja F., Lombes A., Michel P.P., Lannuzel A., Hirsh E.C., Ruberg M. (2004).** Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I,

induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Journal of Neurochemistry*, **88**: 63-69.

**Champy P., Guérineau V. et Laprèvote O. (2009).** MALDI-TOF MS Profiling of Annonaceous Acetogenins in *Annona muricata* Products for Human Consumption. *Molecules*, **14**: 5235-5246.

**Chang F.R., Wu Y.C. and Duh C.Y. (1993).** Studies on the acetogenins of Formosan Annonaceae plants, II. Cytotoxic acetogenins from *Annona reticulata*. *Journal of Natural Products*, **56** (10): 1688-1694.

**Chang F.R., Chen J.L., Chiu H.F., Wu M.J. and Wu Y.C. (1998).** Acetogenins from seeds of *Annona reticulata* L. *Phytochemistry*, **47** (6): 1057-1061.

**Charest H, Zhang WW, Matlashewski G. (1996).** The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region. *Journal of Biological Chemistry*, **271**: 17081-17090.

**Chavan Prashant B., Shamkuwar Manoj G., Damale Shital S., Deepak P.P. (2014).** A comprehensive review on *Annona reticulata*. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, **5** (1): 45-50.

**Costa E.V., Pinheiro M.L.B., Xavier C.M., Silva J.R.A., Amaral A.C., Souza A.D.L., Barison A., Campos F.R., Ferreira A.G., Machado G.M.C., Leon L.L.P.J. (2006).** A pyrimidine- $\beta$ -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. *Journal of Natural Products*, **69**: 292-294.

**Costa E.V., Assis M.F., Lucia B.M.P., Broga R.M., Delarmelina C., Duarte T.C.M., Ruiz T.G.L.A., Carvalho J.E., Maia B.H. (2011).** Chemical constituents isolated from the bark of *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) and their antiproliferative and antimicrobial activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **22**(6).

**Couvreur B., Wattiez R., Bollen A., Falmagne P., Le Ray D., Dujardin J. C.(2002).** Eubacterial HslV and HslU subunits homologs in primordial eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, **19**: 2110-2117.

**Cox E. (1991).** EG 1991. Systematics of Parasitic Protozoa. *Journal of Immunology*, 55-80.

- Croft S.L., Coombs G.H. (2003).** Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, **19**: 502-508.
- Croft S.L., Barrett M.P., Urbina J.A. (2005).** Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, **21**: 508-512.
- Cruz I., Nieto J., Moreno J., Cañavate C., Desjeux P., Alvar J. (2006).** *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *India Journal of Medical Research*, **123** (3): 357-388.
- Daily J.P. (2006).** Antimalarial Drug Therapy: The Role of Parasite Biology and Drug Resistance. *Journal of Clinical Pharmacology*, **46**: 1487-1497.
- Daneshvar C., Davis T.M.E., Cox S.J., Rafa'ee M.Z., Zakaria S.K., Devis P.C.S. et Sing B. (2009).** Clinical and Laboratory Features of Human *Plasmodium knowlesi* Infections. *Clinical Infectious Diseases*, **49** (6): 852-860.
- Dedet J. P. (1999).** *Les Leishmanioses*. Ellipses Paris, France.
- De Lima J.P.S., Pinheira M.L.B., Santos A.M.G., Peeri J.L.S., Santos D.M.F., Barison A., Silva Jardim I., Costa E.V. (2012).** *In vitro* antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Revista Virtual de Quimica*, **4** (6): 692-702.
- De Mesquita M.L., Desrivot J., Bories C., Fournet A., de Paula J.E., Grellier P., Espindola L.S. (2005).** Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**: 783-787.
- De Muylder G., Ang K.K.H., Chen S., Arkin M.R., Engel C.J., Mckerrow J.H. (2011).** A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **5** (7): 1-9.
- Desjeux P. (1996).** Leishmaniasis Public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, **14**: 417-423.
- Desjeux P. (2001).** Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*, **190**: 77-79.

- Desjeux P. (2004).** Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **27**: 305-318.
- Dinesh K.Y., Neetu S., Shaima R., Mahendra S., Gautam P., Rakesh M. (2011).** Anti-ulcer constituents of *Annona squamosa* twigs. *Fitoterapia*, **82**: 666-675.
- Dondorp A.M., Nostern F., Yi P., Das D., Phyto Aung P., Tarning J., Lwin Khin M., Arie F., Hanpithakpong W., Lee Sue J., Ringwald P., Silamut K., Imwong M., Chotivanich K., Lim P., Herdman T., An Sen S., Yeung S., Singhasivann P., Day Nicholas P.J., Lindergardh N., Socheat D. et White N.J. (2009).** Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria. *New England Journal of Medicine*, **361**: 455-467.
- Dondji B., Dereure J., Poste B., Same Ekobo A., Dedet J.P. (2001).** Leishmaniose viscérale au Cameroun. Enquete sério-épidémiologique dans la région de Kousseri, Nord-Cameroun. *Santé publique* (2317): 418-420.
- Eldahshan (2011).** Isolation and structure elucidatio of phenolic compounds of Carob leaves grown in Egypt. *Current Research Journal of Biological Science*, **3**(1): 52-55.
- Eparvier V., Nguyen V.H., Thoison O., Martin M.T., Sévenet T., Guerille F. (2006).** Cytotoxic Monotetrahydrofuran Acetogenins from *Disepalum plagioneurum*. *Journal of Natural Products*, **69**: 1289-1294.
- Faizi S., Khan R.A., Azher S., Khan S.A., Tauseef S., Ahmad A. (2003).** New antimicrobial alkaloids from the roots of *Polyalthia longifolia* var *pendula*. *Planta Medica*, **69**: 350-355.
- Fall D., Badiane M., Ba D., Loiseau P, Bories C., Gleye, Laurens A., Hocquemiller R. (2003).** Activité antiparasitaire d'Annonaceae du Sénégal utilisées en médecine traditionnelle. *Dakar Médical*, **48** (2) : 112-116.
- Faried A., Kuania D., Faried C.S., Usman N., Miyazaki T., Kato H., Kuwano H. (2007).** Anticancer effets of gallic acid isolated from Indonosian herbal medicine *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl on human cancer cell lines. *International Journal of Oncology*, **30** (3): 603-613.

- Fatope M.O, Audu O.T, Takeda Y, Zeng L, Shi G, Shimada H, McLaughlin JL. (1996).** Bioactive ent-kaurene diterpenoids from *Annona senegalensis*. *Journal of Natural Product*, **59** (3): 301-303.
- Fatouma Oumar Ouattara (2005).** *Traitement traditionnel des infections sexuellement transmissibles au Mali: Etude de la phytochimie et des activités biologiques de Annona senegalensis (Annonaceae) et de Stachytarpheta angustifolia VALH. (Verbenaceae).* Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Bamako, Mali PP 163-168.
- Fischer L., Sterneck M., Claus M., Costard-Jackle A., Fleischer B., Herbst H., Rogiers X. et Broelsch C.E. (1999).** Transmission of Malaria Tertiana by Multi-organ Donation. *Clinical Transplantation*, **13**: 491-495.
- Fournet A., Rojas de Arias A., Ferreira M.E., Nakayama H., Torres de Ortiz S., Schinini A., Samudio M., Vera de Bilbao N., Lavault, M., Bonte F. (2000).** Efficacy of the bisbenzylisoquinoline alkaloids in acute and chronic *Trypanosoma cruzi* murine model. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **13** (3): 189-195.
- Freiburghaus F., Kaminsky R., Nkunya M.H., Brun R. (1996).** Evaluation of African medicinal plants for their *in vitro* trypanocidal activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **55**(1): 1-11.
- Ganguly N.K. (2002).** Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral leishmaniasis. *TDR News W. H. O.* **68**: 2.
- Garlapati S., Dahan E., Shapira M. (1999).** Effect of acidic pH on heat shock gene expression in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **100**: 95-101.
- Gbeassor M., Kedjagni A.Y., Koumaglo K., De Souza C., Agbo K., Aklikokou K., Amegbo K.A. (1990).** *In vitro* Antimalarial Activity of Six Medicinal Plants. *Phytotherapy Research*, **4** (3): 115-117.
- Genton B. (2007).** Malaria : Nouvelles Stratégies de Traitement. *Forum Médical en Suisse*, **7**: 386-392.
- Gilles H.M. et Warrel D.A. (1993).** Bruce-Chwatt's Essential. *Malariology*, **2**: 12-34.

- Giri R.G., Padom P.A., Meena R. (2013).** Isolation of gallic acid and estimation of total phenolic content in some medicine plants and their antioxidant activity. *Nepal Journal of Science and Technology*, **14** (1): 95-102.
- Gleye C., Akendengue B., Laurens A., Hocquemiller R. (2001).** Coronin from roots of *Annona muricata*, a putative intermediate in acetogenin biosynthesis (1). *Planta Medica*, **67**: 570-572.
- Gómez-Estrada H., Díaz-Castillo F., Franco-Ospina L., Mercado-Camargo J., Guzmán-Ledezma J., Medina J., Gaitán-Ibarra R. (2011).** Folk medicine in the northern coast of Colombia: an overview. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, **7** (27): 2011.
- González P., Marín C., Rodríguez-González I., Hitos A.B., Rosales M.J., Reina M., Diaz J.G., Gonzalez-Coloma A., Sanchez-Moreno M. (2005).** *In vitro* activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **25**: 136-141.
- Greenwood B.M., Bojank, Whilly C.J. et Targett G.A. (2005).** Malaria. *Lancet*, **365**: 1487-1498.
- Grogl M., Thomason T.N., Franke E.D. (1992).** Drug Resistance in Leishmaniasis: Its Implication in Systemic Chemotherapy of Cutaneous and Mucocutaneous Disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **47**: 117.
- Graziose R., Rathinasabapathy T., Lategan C., Poulev A., Smith P.J., Grace M., Lila M.A., Raskin I. (2011).** Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera* L. *Journal of Ethnopharmacology*, **133** (1): 26-30.
- Guerin P.J., Olliaro P., Sundar S., Boelaert M., Croft S.L., Desjeux P., Wasunna M.K., Bryceson A.D.M. (2002).** Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infectious Diseases*, **2**: 494-501.
- Handman E. (2001).** Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Clinical Microbiology Review*, **14** (2): 229-243.

- Hasrat J.A, De Bruyne T., De Bakcer J.P, Vauquelin G., Vlietnick A.J. (1997).** Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonist in rats: unexploited antidepressive (lead) products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **49** (11): 1145-1149
- Hervé (1937).** Note sur la leishmaniose cutanée au Cameroun. *Annales de Médecine et de Pharmacie Coloniale*, **35**: 928-934.
- Hill .A. (2012).** RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children. *New England Journal of Medicine*, **366** (8): 764-766.
- Holmberg M., Shenton F.C., Franger L., Janneh K., Snow R.W., Petterson U., Wigzell H., Greenwood B.M. (1987).** Use of DNA Hybridization Assay for the Detection of *Plasmodium falciparum* in Field Trials. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **37**: 230-234.
- Howard R.J., Uni M., Aikawa S.B., Aley J.H., Leech A.M., Lew T.W., Wellems J.R., Reuer J., Taylor D.W. (1986).** Excretion of a Malaria Histidine-rich Protein (PfHRP-II) from Infected Erythrocytes. *Journal of Cellular Biology*, **103**: 1269-1277.
- Hudson A. T. (1993).** Atovaquone - a novel broad-spectrum anti-infective drug, *Parasitology Today*, **9** (2): 66-68.
- Humar A., Ohrt C., Harrington M.A., Pillai D., Kain K.C. (1997).** Parasight F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. *American Journal of Medicine Tropical and Hygiene*, **56** (1): 44-48.
- Ignatushchenko M., Winter R., Riscoe M. (2000).** Xanthenes as antimalarial agents: stagespecificity. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, **62**: 77-81.
- Igweh A.C., Onabanjo A.O. (1989).** Chemotherapeutic effects of *Annona senegalensis* in *Trypanosoma brucei brucei*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **83** (5): 527-534.
- Jaramillo M.C., Arango G.J., Gonzalez M.C., Robledo S.M., Velez I.D. (2000).** Cytotoxicity and Antileishmanial Activity of *Annona muricata* Pericarp. *Fitoterapia*, **71** (2): 183-186.

- Jelinet T., Kilian A.H., Mughusu E.B., Lischer T., Knobloch J., Sonnenburg F.V. (1996).** Parasite-Specific Lactate Dehydrogenase for the Diagnosis of *Plasmodium falciparum* Infection in an Endemic Area in West Uganda. *Tropical Medicine and International Health*, **1**: 227-230.
- Joyeux M., Mortier F., Fleurentin J. (1995).** Screening of Antiradical, Antilipoperoxidant and Hepatoprotective Effects of Nine Plant Extracts Used in Caribbean Folk Medicine. *Journal of Phytotherapy Research*, **9** (3): 228-230.
- Kalyani P., Kamuruz Z. (2013).** Comparative pharmacological evaluation of the leaf and stem bark of *Annona reticulata* L. for antidiabetic activity. *International Journal of Traditional and Herbal Medicine*, **1** (3): 65-60.
- Kaptue L., Zekeng L., Fomekong E., Nsangou A., Tagu J.P., Tchuela J. (1992).** La leishmaniose viscérale au Cameroun. A propos de quelques observations et d'une prospection clinique dans la région de Kousseri, extrême-nord Camerounais. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **85**: 156-158.
- Kayode Adesogan E., Durodola J.I. (1976).** Antitumor and antibiotic principles of *Annona senegalensis*. *Phytochemistry*, **15**: 1311-1312.
- Keraudren-Aymonin M. (1980).** *Flore des Mascareignes; Les Annonacées; The Sugar Industry Research Institute; O.R.S.T.O.M.* The Royal Botanic Gardens Kew. PP 1- 4.
- Kerharo J. and Adams J.G. (1974).** *La pharmacopée sénégalaise traditionnelle, plantes médicinales et toxiques.* Vigot et frères, Paris, 1011 p.
- Khan M.R., Kornine K., Omoloso A.D. (1997).** Antibacterial Activity of Some *Annonaceae* Part I. *Fitoterapia*, **69** (4): 367-369.
- Killick-Kendrick R. (1990).** Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, **4**: 1-24.
- Kim G.S., Zeng L., Alali F., Rogers L.L., Wu F.E., Sastrodihardjo S., McLaughlin J.L. (1998).** Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry*, **49**: 565-571.

- Klayman D.L. (1985).** Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, **228** (4703): 1049-1055.
- Kojima N, Tanaka T. (2009).** Medicinal chemistry of Annonaceous acetogenin: design, synthesis, and biological evaluation of novel analogues. *Molecules*, **14**: 3621-3661.
- Kortepeter M., Brown J. (1998).** A Review of 79 Patients with Malaria Seen at a Military Hospital in Hawaii from 1970 to 1995. *Military Medicine*, **163** (26): 84-89.
- Koudouvo K., Karou D.S., Kokou K., Essien K. Aklikokou I.A., Glitho, Simpore J., Sanogo R., Souza J., Gbeassor M. (2011).** An ethnobotanical study of antimalarial plants in Togo Maritime Region. *Journal of Ethnopharmacology*, **134**:183-190.
- Kyambadde J.W., Enyaru J.C.K., Matovu E., Odiit M., Carasco J.F. (2000).** Detection of trypanosomes in suspected sleeping sickness patients in Uganda using polymerase chain reaction (PCR). *Bulletin Of the World Health Organization*, **78**: 119-124.
- Lagnika L. (2005).** *Etude Phytochimique et Activité Biologique de Substances Naturelles Isolées de Plantes Béninoises.* Thèse de Doctorat en Pharmacognosie, Université Louis Pasteur, France. PP 7- 44.
- Lambros C., Vanderberg J.P. (1979).** Synchronization of *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stages in Culture. *Journal of Parasitology*, **65**: 418-420.
- Lannuzel A., Michel P.P., Caparros-Lefebvre D., Abaul J., Hocquemiller R., Ruberg M. (2002).** Toxicity of Annonaceae for Dopaminergic Neurons: Potential Role in Atypical Parkinsonism in Guadeloupe. *Movement Disorder*, **17** (1): 84-90.
- Lannuzel A., Michel P.P., Höglinger G.U., Champy P., Jousset A., Medja F., Lombès A., Darios F., Gleye C., Laurens A., Hocquemiller R., Hirsch E.C., Ruberg M. (2003).** The Mitochondrial Complex I Inhibitor Annonacin is Toxic to Mesencephalic Dopaminergic Neurons by Impairment of Energy Metabolism. *Neuroscience*, **121**: 287-296.
- Lavaud C., Massiot G., Vasquez C., Moretti C., Sauvain M., Balderrama L. (1995).** 4-quinolinone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*. *Phytochemistry*, **40**: 317-320.
- Le Thomas A. (1969).** *Flore du Gabon, Muséum National d'histoire naturelle.* Laboratoire de Phanérogamie, Paris, **16**: 22-343.

- Leaman D.J., Arnason J.T., Yusul R., Sangat-Roemantyo H., Soedjito H., Angerhofer C.K., Pezzuto J.M. (1995).** Malaria Remedies of the Kenyah of the Apo Kayan, East Kalimantan, Indonesian Borneo: A Quantitative Assessment of Local Consensus as an Indicator of Biological Efficacy. *Journal of Ethnopharmacology*, **49** (1): 1-16.
- Lebœuf M., Cave A., Bhaumik B.K., Muker R. (1982).** The Phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, **21**: 2783-2793.
- Letcher R. (1968).** Chemistry of lichen constituents-VI mass spectra of usnic acid, lichexanthone, and their derivatives. *Oms*, **1**: 551-562.
- Levine N.D. (1988).** *The Protozoan Phylum Apicomplexa*. CRC Press Boca Raton. Flammarion.
- Levrier C., Balastrier M., Beattie K.D., Carroll A.R., Martin F., Choomuenwai V., Davis R.A. (2013).** Pyridocoumarin, aristolactam and aporphine alkaloids from the Australian rainforest plant *Goniothalamus australis*. *Phytochemistry*, **8**: 121-126.
- Lira R., Sundar S., Makharia A., Kenney R., Gam A., Saraiva E., Sacks D. (1999).** Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *Journal of Infectious Diseases*, **180**: 564-567.
- Longuefosse J. L. (2003).** Plantes médicinales de la Caraïbe. *Trinité: Gondwana Editions*, **2**.
- Maker M.T., Hinrichs D. (1993).** Measurement of the Lactate Dehydrogenase Activity of *Plasmodium falciparum* as an Assessment of Parasitemia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **48**: 205-210.
- Magadula Joseph J., Ester Innocent and Otieno Joseph N. (2009).** Mosquito larvicidal and cytotoxic activities of 3 *Annona* species and isolation of active principles. *Journal of Medicinal Plants Research*, **3** (9): 674-680.
- Magdalena K., Agnieszka K., Ronald B.P. (2006).** Content of gallic acid in selected plant extracts. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **15/56** (1): 55-58.
- Malgras D. (1992).** *Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes*. Éditions Karthala et ACCT, 479P.

- Malvy D., Djossou F., Thiebaut R., Le Bras M. (2000).** Plasmodies-Malaria. Formes Cliniques et Diagnostic. *Elsevier*, **8**: 504-520.
- Manu D.R., Irene Hallyburton I., John T., Lorna Campbell L., Susan Wyllie S., Dhananjay J., Scott Cameron S., Ian H., Gilbert H.I., Watt G.P., Frearson A.J., Fairlamb A.H., Gray .W.G. (2013).** Comparison of a High-Throughput High-Content Intracellular *Leishmania donovani* Assay with an Axenic Amastigote Assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57** (7): 2913-2922.
- Marsh K. (1996).** Clinical Algorithm for Malaria in Africa. *Lancet*, **347**: 1327-1329.
- Mba'ning B.M. (2012).** *Etude Phytochimique et Pharmacologique de Salacia camerunensis Loes., Salacia dimidia Hall. (Celastraceae) et Crinum natans Baker (Amaryllidaceae).* Thèse de Doctorat Ph.D, Université de Yaoundé I, Cameroun. 237 p.
- Mbita M. H.J. (1998).** *Contribution à l'Etude des Plantes Médicinales du Cameroun: Le Cas des Plantes Utilisées en Médecine Traditionnelle pour le Traitement des Maladies Parasitaires.* Thèse de Doctorat 3<sup>e</sup> Cycle, Université de Yaoundé I, Cameroun. 178 p.
- McKerrow J.H., Engel J.C., Caffrey C.R. (1999).** Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **7**: 639-644.
- Médard R. (2005).** Médecine: Knockout malaria vaccine? *Nature*, **443** (7022): 113-114.
- Melot A., Fall D., Gleye C., Champy P. (2009).** Apolar Annonaceous Acetogenins from the Fruit Pulp of *Annona muricata*. *Molecules*, **14**: 4387-4395.
- Menan H., Banzouzi J.T., Hocquette A., Pelissier Y.Y., Blache Y., Kone M., Mallie M., Ake A.L., Valentin A. (2006).** Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in West African traditional medicine for the treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology*, **105**: 131-136.
- Mendis K., Sina B. J., Marchesini P., Carter R. (2001).** The Neglected Burden of *Plasmodium vivax* Malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **64**: 97-106.
- Micheletti A.C., Beatriz A., de Lima D.P, Honda N.K. (2009).** Constituintes químicos de *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler-Isolamento, Modificacões estruturais e avaliação das atividades antibiótica e citotóxica. *Química Nova*, **32**: 12-20.

- Michels P.A. Avilán L. (2011).** The NAD<sup>+</sup> metabolism of *Leishmania*, notably the enzyme nicotinamidase involved in NAD<sup>+</sup> salvage, offers prospects for development of anti-parasite chemotherapy. *Molecular Microbiology*, doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07810.x.
- Miyoshi H., Abe M., Murai M., Ichimaru N. (2005).** Dynamic Function of the Alkyl Spacer of Acetogenins in their Inhibitory Action with Mitochondrial Complex I (NADH-Ubiquinone Oxidoreductase). *Biochemistry*, **44**: 4898-4906.
- Muñoz V., Sauvain M., Boudy G., Callapa J., Bergeron S., Rojas I., Bravo J.A., Ortiz B., Gimenez A., Deharo E. (2000).** A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, **69**: 127-137.
- Moody A. (2002).** Rapid Diagnostic Test for malaria Parasites. *Journal of Clinical Microbiology*, **1**: 66-68.
- Mouchet J. (2004).** *Biodiversité du Paludisme dans le Monde*. John Libbey Eurotext.
- Nadja S.V., Maia M.S., Falcão M.J.V., Machado A.L.K., Beviláqua C.M.L., Costa I.R.S., Pompeu de Sousa Brasil N.V.G., Franco de Andrade J.H. (2011).** Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **44** (5). doi.org/10.1590/S0037-86822011000500007.
- Nabavi S.F., Habtemariam S., Hajizadeh A., Daglia M., Nabavi S.M. (2013).** *In vivo* protective effects of gallic acid isolated from *Peltiphyllum peltatum* against sodium fluoride-induced oxidative stress in rat erythrocytes. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, **63**: 553-559.
- Nadja S.V., Selene M., Maria J.C., Terezinha T. N.A., Pablito A.T., Barreira C.E.S., Vieira I.G.P., Campello C.C., Mary Wilson M. (2013).** Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corosolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. *Experimental Parasitology*, **133** (3): 334-338.

- Nantulya V.M. (1997).** A Tryp Tect CIATT card indirect agglutination trypanosomiasis test for diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei rhodensiense* infection. *Transaction Royal of the Society of Tropical Medecine and Hygiene*, **91**: 551-553.
- Napolitano D.R., Mineo J.R., de Souza M.A., de Paula J.E., Espindola L.S., Espindola F.S. (2005).** Down-Modulation of Nitric Oxide Production in Murine Macrophages Treated with Crude Plant Extracts from the Brazilian Cerrado. *Journal of Ethnopharmacology*, **99**: 37-41.
- Ndjonka D., Bärbel B., Agyare C., Zimbres F.M., Lüersen K., Hensel A., Carsten W., Liebau E. (2012).** *In vitro* activity of extracts and isolated polyphenols from West African medicinal plants against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Research*, **111**: 827-834.
- Ngouateu O.B., Kollo P., Ravel C., Dereure J., Kamtchouing P., Same-Ekobo A., von Stebut E., Maurer M., Dondji B. (2012).** Clinical features and epidemiology of cutaneous leishmaniasis and *Leishmania major*/HIV co-infection in Cameroon: results of a large cross-sectional study. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **106** (3): 137-142.
- Ngouela S.A. (1990).** *Contribution à l'étude chimique des plantes médicinales du Cameroun, Spathodea campanulata (Bignoniaceae)*. Thèse de Doctorat de 3<sup>ème</sup> Cycle, Université de Yaoundé, Cameroun, pp 45-48.
- N'Gouemo P., Koudogbo B., Tchivounda H.P., Akono-Nguema C., Etoua MM. (1997).** Effects of Ethanol Extract of *Annona muricata* on Pentylentetrazol-Induced Convulsive Seizures in Mice. *Phytotherapy Research*, **11** (3): 243-245.
- Nguyen-Pouplin J., Tran Hop, Tran Hung, Phan T., Dolecek C., Farrar J., Tran T.H., Caron P., Bodo B., Grellier P. (2007).** Antimalarial and Cytotoxic Activities of Ethnopharmacologically Selected Medicinal Plants from South-Vietnam. *Journal of Ethnopharmacology*, **109**: 417-427.
- Nonfon M., Lieb F., Moescher H., Wendisch D. (1990).** Four annonins from *Annona squamosa*. *Phytochemistry*, **29** (6): 1951-1954.

- Noumi E., Yomi A. (2001).** Medicinal Plants Used for Intestinal Diseases in Mbalmayo Region Province, Cameroon. *Fitoterapia*, **72** (3): 246-254.
- Nwaka S., Ramirez B., Reto B., Maes L., Douglas F., Ridley R. (2009).** Advancing drug innovation for neglected diseases. Criteria for lead progression. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **3** (8): 1-13.
- Nwodo, U.U., Ngene, A.A., Iroegbu, C.U., Obiiyeke, G.C. (2010).** Effects of fractionation on antibacterial activity of crude extracts of *Tamarindus indica*. *African Journal of Biotechnology*, **9** (42): 7108-7113.
- Olaleye B.O. (1998).** Clinical Predictors of Malaria in Gambian Children with Fever or a History of Fever. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **92**: 300-304.
- OMS. (2000a).** Rapport sur la santé dans le monde Archives. 1995-2000, Genève.
- OMS. (2000b).** Severe *falciparum* Malaria. *Transactions of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, **94** (1): 57-67.
- OMS. (2001).** Rapport d'une Consultation Technique de l'OMS. Les Combinaisons Thérapeutiques Antipaludiques. 4-5 Avril 2001. WHO/CDS/RBM/2001.35.
- OMS. (2002).** Programme for the surveillance and control of leishmaniasis. Available at <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>.
- OMS. (2005).** *World Malaria Report 2005*. Geneva. Available at: [http://www.who.int/wmr/2005/wmr2005\\_en.pdf](http://www.who.int/wmr/2005/wmr2005_en.pdf).
- OMS. (2006).** *Guidelines for the Treatment of Malaria*. Geneva: WHO.
- OMS. (2008).** *World Malaria Report 2008*. World Health Organization: Geneva, Switzerland. <http://apps.who.int/malaria/wmr2008/>.
- OMS. (2009a).** *Paludisme*. Aide-mémoire n°44. Révisée en Janvier 2009. Genève.
- OMS. (2009b).** *Leishmaniasis Control*. Dossier complet réalisé par l'organisation mondiale de la santé, division de surveillance des maladies tropicales (2009).

- OMS-Cameroon (2009).** (On ligne)<http://www.afro.who.int/omscam/palud.html> 04<sup>th</sup> June 2009.
- OMS. (2011).** Rapport 2011 sur le paludisme dans le monde, 2011.
- OMS. (2012).** Research priorities for Chagas disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. WHO Technical Report. Serie N° 975.
- OMS. (2014a).** *Malaria Report.* Aide Mémoire, N° 94. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/fr/>.
- OMS. (2014b).** Leishmaniasis report. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Serie N°375.
- OMS. (2015).** *Malaria Report 2015.* OMS 2015, 25 April 2016: End malaria for good.
- Osuna A., Adroher F.J., Lupiañez J.A. (1990).** Influence of electrolytes and non-electrolytes on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Differentiation and Development*, **30**: 89-95.
- Osorio L., Gonzalez I., Olliaro P. et Taykor W.R. (2007a).** Artemisinin-based Combination Therapy for Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Colombia. *Malaria Journal*, **6** (25). <http://www.malariajournal.com/content/6/1/25>, 18/March/2010.
- Osorio E., Arango G.J.A., Jimenez N., Alzate F., Ruiz G., Gutierrez D., Paco M.A., Gimenez A., Robledo S. (2007b).** *Journal of Ethnopharmacology*, **111**: 630.
- Ouellette M., Olivier M., Sato S., Papadopoulou B. (2003).** Le parasite *Leishmania* à l'ère de la post-génomique. *M/S: médecine sciences*, **19**: 900-909.
- Padma P., Chansauria JPN., Khoso RL., Ray AR. (2005).** Effect of *Annona muricata* and *Polyalthia cerasoides* on Brain Neurotransmitters and Enzyme Monoamine oxidase Following Cold Immobilization Stress. *Journal of Natural Remedies*, **1** (2): 144-146.
- Peltier P., Euzen R., Daniellou R., Nugier-Chauvin C., Ferrie V. (2008).** Recent knowledge and innovations related to hexofuranosides: structure, synthesis and applications. *Carbohydrate research*, **343** (12):1897-1923.
- Pettit G., Meng Y., Herald D., Graham K., Pettit R., Doubek D. (2003).** Isolation and structure of Ruprechstyril from *Ruprechtia tangarana*. *Journal of Natural Products*, **66**: 1065-1069.

- Philipov S., Kandé K.M., Machev K.K. (1995).** Alkaloids of *Annona senegalensis*. *Fitoterapia*, **66** (3): 275-276.
- Pinto A.C., Silva E.M. (1994).** *Graviola para Exportação: Aspectos Técnico da Produção* [Portuguese] FRUPEX, Min. Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Sec. de Desenvolvimento Rural SDR, Prog. De Apoio à Prod. E Export. De Frutas, Hortaliças, Flores e Plantas Ornamentais. 41p.
- Pinto M.C., Campbell-Lendrum D.H. Lozovei A.L. Teodoro U., Davies C.R. (2001).** Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**: 132-139.
- Pinto A.C., Andrade S.R., Ferreira F.R., Kinpara D.I. (2005).** *Annona* species. International Center for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton, SO171BJ, UK. PP 1-281.
- Pontius A., Krick A., Brun R., Köning G.M. (2008).** Antiprotozoal activities of heterocyclic substituted xanthenes from the marine derived fungus *Chaetomium* sp. *Journal of Natural Products*, **71** (9): 1579-1584.
- Queiroz E.F., Roblot F., Cavé A., Paulo M.Q., Fournet A. (1996).** Pseudoephedrine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. *Journal of Natural Products*, **59**: 438-440.
- Rakotomanga M., Razakantoanina V., Raynaud S., Loiseau P.M., Hocquemiller R., Jaureguiberry G. (2004).** Antiplasmodial Activity of Acetogenins and Inhibitory Effect on *Plasmodium falciparum* Adenylate Translocase. *Journal of Chemotherapy*, **16**: 350-356.
- Ramiarantsoa H., Koffi B.A., Kouamé M.A., Djakouré L.A. (2008).** Le *O*- $\beta$ -D-glucoside du  $\beta$ -sitostérol Isolé des Feuilles de *Ravenala madagascariensis*. *Journal de la société Ouest-Africaine de Chimie*, **026**: 99-103.
- Ramírez-Macías I., Clotilde Marín, S., Díaz Jesús G., Rosales María J., Gutiérrez-Sánchez R., Sánchez-Moreno M. (2012).** Leishmanicidal Activity of Nine Novel Flavonoids from *Delphinium staphisagria*. *The Scientific World Journal*, **2012**, Article ID 203646, 10 pages, 2012. doi:10.1100/2012/203646.

- Razak M.A.R., Adlin A., Rosnani A.N.F.A., Mohd I.W., Siti H.S.Z., Noor R.A., Zakiah I. (2014).** Effect of selected local medicinal plants on the asexual blood stage of chloroquine resistant *Plasmodium falciparum*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **14**: 492.
- Redd S.C. (1996).** Clinical Algorithm for Treatment of *Plasmodium falciparum* Malaria in Children. *Lancet*, **347**: 223-227.
- Reynolds D., Cliffe L., Konrad U.F., Chung-Chau H., Siegel N.T., Sabatini N. (2014).** Regulation of transcription termination by glucosylated hydroxymethyluracil, base J, in *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Research*, **42** (15): 9717-9729.
- Ridley R.G. (2002).** Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, **415** (6872): 686-693.
- Rijal S., Ostyn B., Uranw S., Rai K., Bhattarai N.R., Dorlo T.P., Beijnen J.H., Vanaerschot M., Decuypere S., Dhakal S.S., Das M.L., Karki P., Singh R., Boelaert M., Dujardin J.C. (2013).** Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. *Clinical Infectious Diseases*, **56** (11): 1530-1538.
- Robert A., Dechy C., Odile C. J., Meunier B. (2002).** Mechanistic Studies on Artemisinin Derivatives to New Modular Antimalarial Drugs. *Accounts of Chemical Research*, **35** (3): 167-174.
- Robert A., Benoit Vical F., Claparols C., Meunier B. (2005).** The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102** (38): 13676-13680.
- Roberts L.S., Janovy J., Schmidt G.D. (2000).** Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology. McGraw-Hill.
- Rocha L. G., Almeida J. R. G. S., Macêdo R. O., Barbosa-Filho J. M. (2005).** A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, **12**: 514-535.
- Rochette A., Raymond F., Corbeil J., Ouellette M., Papadopoulou B. (2009).** Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote

forms of *Leishmania infantum*. *Molecular and Biochemical Parasitology Journal*, **165**: 32-47.

**Rool Back Malaria (2004)**. *Un Avenir Prometteur*. Genève. www.rbm.who.int, United Nations Decade to Roll Back Malaria.

**Rosenthal P.J. (2003)**. Antimalarial Drug Discovery: Old and News Approachs. *Journal of Experimental Biology*, **206**: 3735-3744.

**Ruben F.G., Keith S.B.Jr. (1976)**. Alkaloids of three *Aspidosperma* species. *Phytochemistry*, **15** (6): 1093-1095.

**Rubi G.L., Vera-Ku M., Peraza-Sanchez S.R., Ku-Chulim K., Horta-Baas A., Rosado-Vallado M. (2014)**. Antileishmanial activity of a mixture of *Tridax procumbens* and *Allium sativum* in mice. *Parasite*, **21**: 15.

**Saad J.M., Huri Y., Rupprecht J.K., Anderson J.E., Kozlowski J.F., Zhao G., et al. (1991)**. Reticulatacin: a new bioactive acetogenin from *Annona reticulata* (Annonaceae). *Tetrahedron*, **47**: 2751-2756.

**Sacks D.L. (1989)**. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology*, **69**: 100- 103.

**Sacks D., Kamhawi S. (2001)**. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology*, **55**: 453-483.

**Sahpaz S., Bories Ch., Loiseau P.M., Cortès D., Hocquemiller R., Laurens A., Cavé A. (1994)**. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis*. *Planta Medica*, **60**: 538-540.

**Salem M.M., Werbovets K.A. (2006)**. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Current Medical Chemistry*, **13**: 2571-2598.

**Salery M.R. (2007)**. *Activité Antipaludique de la Girolline*. Etude *In Vitro* et *In Vivo*. Thèse de Doctorat d'Etat en Médecine Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France. PP 19-38.

- Salotra P., Sreenivas G., Pogue GP et al. (2001).** Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post kala-azar dermal leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**: 849-854.
- Sambrook M.J., Fritch E.F., Maniatis T. (1989).** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sasidharan S., Yoga Latha L., Angeline T., Méndez-Vilas A., Díaz J. (2010).** Imaging *In vitro* anti-biofilm activity to visualize the ultrastructural changes. In *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. Badajoz, Spain: Formatex*, **622**: 622-626.
- Schlein Y. (1993).** *Leishmania* and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. *Parasitology Today*, **9**: 255-258.
- Sheng-Xia C., Liang W., Xu-Gan J., Yao-Yu F., Jian-Ping C. (2008).** Anti-*Toxoplasma gondii* activity of GAS *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, **118**: 503-507.
- Silvie O., Mazier D., Rubistein E., Boucheux C. (2003).** Cd81 : une tetraspanine impliquée dans l'infection par *Plasmodium*. *Medecine Sciences*, **19** (2):169-171.
- Singh A., Rosenthal P.J. (2001).** Comparison of Efficacies of Cysteine Protease Inhibitors Against Five Strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 949-951.
- Singh B. Sung L.K., Matusop A., Radhakrishnan A., Shamsul S.S.G., Cox-Singh J., Thomas A.W. and Conway D.A (2004).** Large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*, **363**: 1017-1024.
- Siqueira-Neto J.L., Moon S., Jang J., Yang G., Changbok L. Moo H.K., Chatelain E., Genovesio A., Cechetto J., Lucio Freitas-Junior H. (2012).** An Image-Based High-Content Screening Assay for Compounds Targeting Intracellular *Leishmania donovani* Amastigotes in Human Macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **6** (6): 1671.
- Smol John P. (2012).** Climate Change: A planet in flux. *Nature*, **483** (7387): 12-15.

- Soto J., Toledo J., Valda L., Balderrama M., Rea I., Parra R., Ardiles J., Soto P., Gómez, A., Molleda F. (2007).** Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clinical Infectious Diseases*, **44**: 350-356.
- Sullivan D. J. (1996).** *Plasmodium* Hemozoin Formation Mediated by Histidine-Rich Proteins. *Science*, **271**.
- Sundar S., Reed S.G. Singh V.P. Kumar P.C., Murray H.W. (1998).** Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet*, **351**: 563-565.
- Sundar S. (2001).** Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine and International Health*, **6**: 849-854.
- Suresh H.M., Shivakumar B., Shivakumar S.I. (2012).** Phytochemical potential of *Annona reticulata* roots for antiproliferative activity on human cancer cell lines. *Advances in Life Sciences*, **2** (2): 1-4.
- Tempone A.G., Treiger Borborema S.E., de Andrade Jr., de Amorim Gualda N.C., Yogi A., Salerno Carvalho C., Bachiega D., Lupo F.N., Bonotto S.V., Fischer D.C.H. (2005).** Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine*, **12**: 382-390.
- Touze J.E., Fourcade L., Pradines B., Hovette P., Paule P., Heno Ph. (2002).** Les Modes d'Action des Antipaludiques. Intérêt de l'Association Atovaquone-Proguanil. *Medécine Tropicale*, **62**: 219-224.
- Tran D., Ping-Chung K., Guan-Jhong H., Nguyen H., Bow-Shin H., Mei-Lin Y., Ngo X., Tian-Shung W. (2013).** Chemical constituents from the leaves of *Annona reticulata* and their inhibitory effects on NO production. *Molecules*, **18**: 4477-4486.
- Trudel L. (2005).** *Identification Morphologique des Parasites de la Malaria*. Institut National de la Santé Publique du Québec, Canada. PP 13-28.
- Tsabang N., Tsouh F.P.V., Yamthe T.L.R., Noguem B., Bakarnga-Via I., Dongmo N.M.S., Boyom F.F. (2012).** Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*, **139**: 171-180.

- Vannier-Santos, M. A., Martiny, A., de Souza, W. (2002).** Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Current Pharmaceutical Design*, **8**: 297-318.
- Vermeersch M., da Luz R.I., Tote K., Timmermans J.P., Cos P., Maes L. (2009).** *In vitro* susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**: 3855-3859.
- Vimala J.R., A. Leema A. R. and S. Raja S. (2012).** A study on the phytochemical analysis and corrosion inhibition on mild steel by *Annona muricata* L. leaves extract in 1 N hydrochloric acid. *Der Chemica Sinica*, **3** (3): 582-588.
- Waechter A.I., Cave A., Hocquemiller R., Bories C., Munõz V., Fournet A. (1999).** Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae). *Phytotherapy Research*, **13**: 175-177.
- Walker A., Sillams (1961).** *Les Plantes Utiles du Gabon*, Paris.16 p.
- Wang L.Q., Min B.S., Li Y., Nakamura N., Qin G.W., Li C.J., Hattori M. (2002).** Annonaceous Acetogenins from the Leaves of *Annona montana*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **10** (3): 561-565.
- Weissbuch I., Leiserowitz L. (2008).** Interplay Between Malaria, Crystalline Hemozoin Formation, and Antimalarial Drug Action and Design. *Chemical Reviews*, **108** (11): 4899-4914.
- Wells T. (2011).** Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots? *Malaria Journal*, **10** (1): 3.
- Wells T.N., Gutteridge W.E. (2012).** Malaria: New Medicines for its Control and Eradication, (Ed.: M. J. P. a. T. N. C. Wells), RSC, Geneva, 1-31.
- Weniger B., Robledo S., Arango G.J., Deharo E., Aragon R., Munoz V., Callapa J., Lobstein A., Anton R. (2001).** Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **78** (2- 3): 193-200.
- Wéry M. (1999).** Revue des Méthodes de Diagnostic du Paludisme au Laboratoire. *Immunoanalyses Biologiques Spéciales*, **14**: 318-327.

- White N. (1999).** Antimalarial Drug Resistance and Combination Therapy. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, **354**: 739-749.
- Willcox M.L., Burford G., Bodeker G. (2004).** Traditional Herbal Medicines for Malaria. *British Medical Journal*, **329**: 1156-1159.
- Wright H.E., Burton Jr.W.W., Berry R.C. (1962).** Identification of stigmasteryl D-glucoiside in aged burley tobacco. *Journal of Organic Chemistry*, **27**: 918-920.
- You M., Wickramaratne D.B. M., Silva G.L., Chai H., Chagwedera T.E., Farnsworth J.M. (1995).** (-) Roemerine an aporphine alkaloid from *Annona senegalensis* that reverses the multidrug resistance phenotype. With cultured cells. *Journal of Natural Products*, **58** (4): 598-604.
- Yuan, S.S., Chang H.L., Chen H.W., Yeh Y.T., Kao Y.H., Lin K.H., Wu Y.C., Su J.H. (2003).** Annonacin, a Mono-tetrahydrofuran Acetogenin, Arrests Cancer Cells at the G Phase and Causes Cytotoxicity in a Bax- and Caspase-3 Related Pathway. *Life Sciences*, **72**: 2853-2861.
- Zhang H.M., Cheng-Fang W., Sheng-Min S., Gang-Li W., Zi-Mu L., Yong-Yan W., Shu-Shan D., Zhi-Long L., Peng L., Zhi-Wei D. (2012).** Antioxidant Phenolic Compounds from Pu-erh Tea. *Molecules*, **17**: 14037-14045.
- Zofou D., Tematio E.L., Ntie-Kang F., Tene M., Ngemenya M.N., Tane P., Titanji V.P.K. (2013).** New Antimalarial Hits from *Dacryodes edulis* (Burseraceae) - Part I: Isolation, *In Vitro* Activity, *In Silico* "drug-likeness" and Pharmacokinetic Profiles. *PLOS ONE*, **8** (11): e79544.

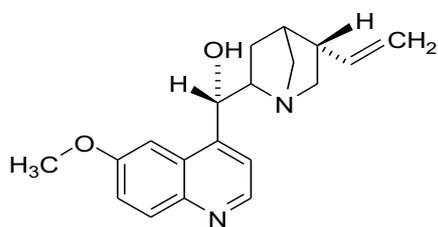
#### Sites Web consultés

- [entomology.ucdavis.edu/faculty/lanzaro/index.htm](http://entomology.ucdavis.edu/faculty/lanzaro/index.htm), 27/01/2010
- <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>, 02/07/2015
- <http://www.rbm.who.int>, 2001-2010 United Nations Decade to Roll Back Malaria

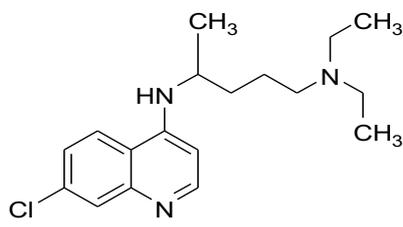


# **ANNEXES**

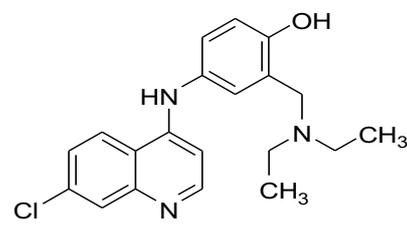
## Annexe 1 : Structures de quelques antipaludiques



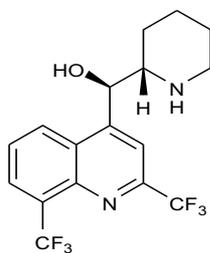
**Quinine**



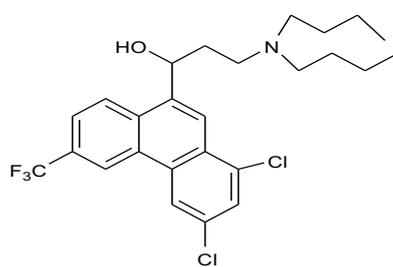
**Chloroquine**



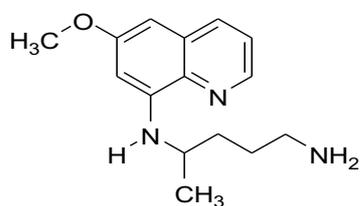
**Amodiaquine**



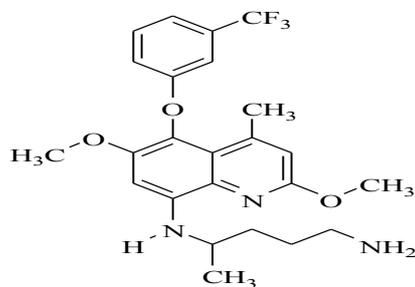
**Méfloquine**



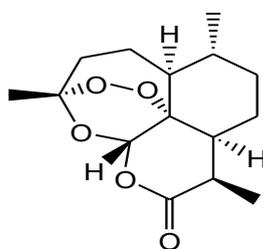
**Halofantrine**



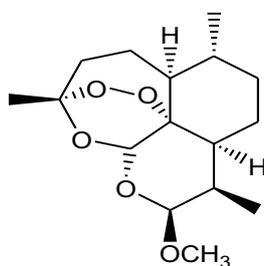
**Primaquine**



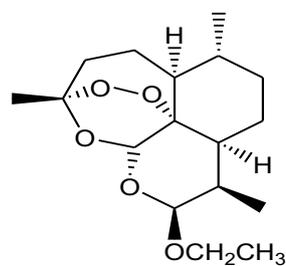
**Talénoquine**



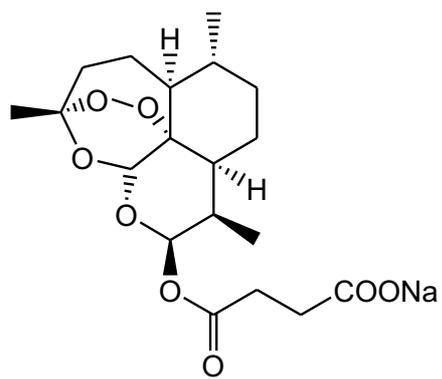
**Artémisinine**



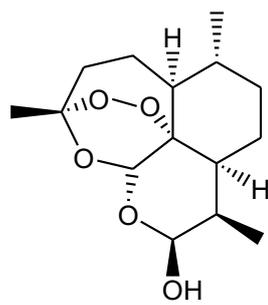
**Artémeter**



**Artéether**

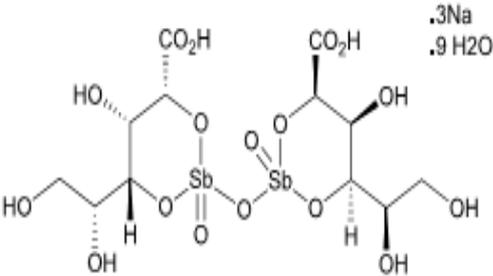


**Artésunate**

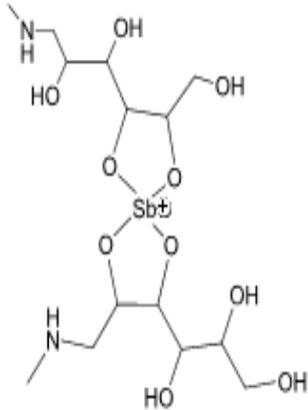


**Dihydroartémisinine**

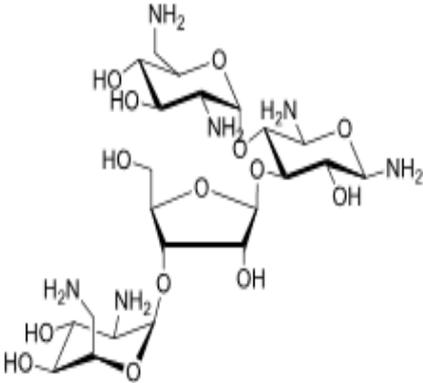
**Annexe 2 : Structures de quelques médicaments utilisés dans le traitement de la leishmaniose**



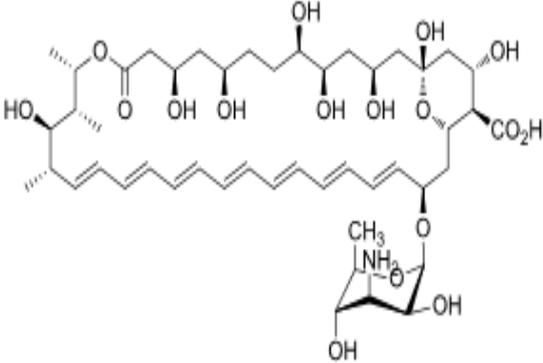
**Stibogluconate de sodium  
Pentostam®**



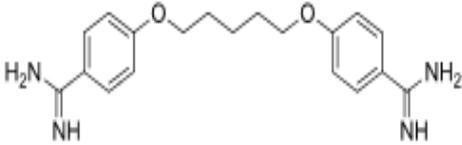
**Antimoniate de méglumine  
Glucantime®**



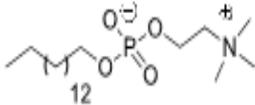
**Paramomycine  
Gabbroral®**



**Amphotéricine B  
Fungizone®**



**Pentamidine  
Pentacarinat®**



**Miltefosine  
Impavido®**

## Annexe 3 : Formulaire de consentement éclairé

### Identification of herbal practitioners and selection to the Ethnopharmacological survey

#### Informed Consent and Questionnaire Forms

The Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Box 812  
Yaoundé  
Cameroon. [fabrice.boyom@fulbrightmail.org](mailto:fabrice.boyom@fulbrightmail.org)  
Tel.: +237-7727-6585

Project Title: **Discovery of anti-malarial Annonaceae from Cameroonian**

#### A- Informed Consent

Principal Investigator: **Prof. Fabrice Fekam Boyom**

Date:

Information provider's (family head) Name:

Questionnaire Number:

Provider (family head) is illiterate, then Interpreter/Representative Name:

Name of the village/city:

Name of the ethnobotanist:

#### **1/. Purpose of the study**

Thousands of people continue to die from malaria each year in our country and we are all at risk. Cameroon is amongst the countries where most deaths from this disease occur. Good drugs have come from medicinal plants and some no longer work. Traditional doctors are the guardian of our indigenous knowledge relating mainly to the use of medicinal plants. Many of these traditional doctors are renowned for their ability of using medicinal plants to treat diseases. So we need to find with your help, the most consulted and efficacious traditional healers for malaria problems in your village (city).

#### **2/. Mutual agreement and Procedure**

You can choose to answer this survey or not, or opt out at any time. If you agree to help, then we would like you to sign this form and answer the attached questionnaire. It is very important that you answer all the questions, but you are free to choose questions from the list according to your feeling. You may also be requested to guide us to the traditional healers, or to act as interpreter if the doctors are illiterate.

#### **3/. Benefits**

Benefits from your collaboration include acknowledgement of your contribution to the registry of traditional uses of plants to treat malaria, and preparation of new and cheap treatments against it. Your collaboration will also benefit your community and all those suffering from malaria around the World.

#### **4/. Information Handling and Confidentiality**

Neither your identity, nor the outcome of your interaction with investigators will be disclosed to herbal practitioners or anyone that is not involved in the study. What we require of you is to help us identify herbal practitioners that effectively treat malaria and/or symptoms. If you feel you have not been properly told as to the objectives of the study, benefits or your rights, please feel free to contact *Prof. Fabrice Fekam Boyom (7727-6585)*, or the Institutional Review Board, Biotechnology Centre, University of Yaoundé I (77 44 13 12 / 94 39 62 07). All information collected will be exclusively used for the project. If you do not want specific information to be disclosed to anyone, it will be kept confidential.

**5/. Acceptance**

My questions concerning this study have been answered by -----, I have read the information sheet concerning this study [or have understood the verbal explanation] and I understand what will be required of me. **I agree to help on this study and answer the following questions.**

**Name and Signature or thumbs print** -----Tel. -----

Name of Interpreter-----Tel. -----Date -----

*Researcher Recognizance*

The information provider (family head) has been fully informed of the nature and purpose of the procedures described above. He has been asked if any questions have arisen regarding the procedures and these questions have been answered to the best of the investigator’s ability.

**Name and Signature of Investigator**

**Tel.:**

---

**B- Questionnaire**

Please give accurate answers to all the following questions

- a. How frequently do you or a relative suffer from malaria?  
 Never (0 pt)      Sometimes (0.5 pt)      Often (1 pt)  
 -----Do
- you rely on traditional doctors for your treatment?  
 No (0 pt)      Yes sometimes (0.5 pt)      Always (1 pt)  
 -----If
- yes, who is your doctor for treatment? (give name and contact)  
 -----
- Does he/she use exclusively herbs?  
 No (0.5 pt)      Yes (1 pt)  
 -----
- Have you visited another traditional doctor for the same problem?  
 No (0.5 pt)      Yes (1 pt)  
 -----If
- yes, give name and contact. Which one has treated you better?  
 -----
- When was your last visit for one of these illnesses?  
 -----
- How fast did you recover from illness?  
 -----In
- addition to herbal medicines, have you taken modern drugs?  
 Yes (0.5 pt)      No (1 pt)

## Annexe 4 : Fiche de questionnaire

### Ethnopharmacological survey: Informed consent and Questionnaire forms

#### A- Informed consent form

The Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Box 812  
Yaoundé  
Cameroon. fabrice.boyom@fulbrightmail.org  
Tel.: + 237-7727-6585

Project Title: **Discovery of antimalarial Annonaceae from Cameroonian**

Principal Investigator: **Prof. Fabrice Fekam Boyom**

Date:

---

Information provider's Name: Number:	Plant name/code:	Questionnaire
Provider is illiterate, then Interpreter/Representative Name:		
Name of the village/city:	Name of the ethnobotanist:	

#### **1/. Purpose of the study**

Thousands of people continue to die from malaria each year in our country and we are all at risk. Cameroon is amongst the countries where most deaths from malaria occur. Good drugs have come from medicinal plants and some no longer work. People that you usually treat have recommended that we should seek your help to find more plants that can cure malaria. More than 80% of our people rely on your knowledge of traditional medicine to treat their illnesses. We are trying to disseminate your knowledge and reputation by collecting information on your use of these plants to treat malaria. This information will help us to find out if new compounds could be taken out from our medicinal plants and developed to fight this disease. Some plants will be presented to you and we will ask you to tell us how you use them against malaria. We will also ask you to help us collect them.

#### **2/. Mutual agreement and Procedure**

You can choose to answer this survey or not, or opt out at any time. If you agree to help, then we would like you to sign this form and answer the attached questionnaire about plants that we will present to you. We will also ask your assistance in collecting samples from the plants exactly as you do to treat your patients. Rare or endangered plants will not be collected. Only what is needed will be collected, in strict respect of the biodiversity preservation guidelines. Voucher specimens will be deposited in the National Herbarium in Yaoundé.

#### **3/. Benefits, Protection of Intellectual Property Rights and Indigenous Knowledge**

Benefits from your help include addition of your name as co-author of the registry of traditional use of these plants to treat malaria, the acknowledgement of your contribution in any scientific publication resulting from this work. By helping us seeking new and cheap treatment against malaria, your assistance will benefit your community and all those suffering from malaria around the World. You will not be provided any incentive for the information you provide, however, you will receive a modest allowance sum of 5,000 FCFA for each day you spend with the research team as compensation for your lost time. Concerning the biodiversity and indigenous knowledge, the results will give an indication on the potential plants to be preserved through conservation and cultivation

**4/ Information Handling and Confidentiality**

If you feel you have not been properly told as to the objectives of the study, benefits or your rights, please feel free to contact *Prof. Fabrice Fekam Boyom (7727-6585)*, or the Institutional Review Board, Biotechnology Centre, University of Yaoundé 1 (77 44 13 12 / 94 39 62 07). All information and plant samples collected will be exclusively used for the project. If you do not want specific information to be disclosed to anyone, it will be kept confidential. Otherwise, it will be published in the ethnopharmacological registry.

**5/ Acceptance**

My questions concerning this study have been answered by -----, I have read the information sheet concerning this study [or have understood the verbal explanation] and I understand what will be required of me. **I agree to help on this study and describe my use of these plants.**

**Name and Signature or thumbs print** -----Tel. -----

Name of Interpreter-----Tel. -----Date -----

*Researcher Recognizance*

The traditional medicine man has been fully informed of the nature and purpose of the procedures described above. He has been asked if any questions have arisen regarding the procedures and these questions have been answered to the best of the investigator’s ability.

**Name and Signature of Investigator**

**Tel.:**

---

**B- Questionnaire**

This information survey is mainly focussed on plants of the Annonaceae family (One form should be completed for each plant or preparation).

- \*\*1. Family name of plant.....
- \*\*2. Genus & species.....
- 3. Common name(s).....
- 4. Local name(s) (specify which dialect/language).....
- .....
- 5. Location of plant (i.e. which part of town, village, etc.).....
- .....
- 6. Disease(s) for which plant is used (Be as specific as possible).....
- .....
- .....
- 7. Plant parts used.....
- 8. Method(s) of preparation for use (Provide details about amount of plant part required, whether fresh or dried, ratio of plant to mixture, solvent, etc.).....
- .....

.....  
.....  
9. Can the preparation be made any other way e.g. using another solvent (e.g. palm wine, local gin instead of water)?  
.....  
.....

10. Mode of administration (including dosage).....

11. Are there any incantations needed? (Yes or No). If yes, write down the incantation at the back of this sheet.

12. Other plants or ingredients with which the plant is used for preparation:

*Name (Genus, Specie and Family) Local name Part used*

a. b.

c. d.

13. Of the plants presented to you, which one(s) give you more satisfaction in treating malaria?  
.....  
.....

14. Are these plants easily found in the neighbourhood?.....

\*15. Any other remarks (please indicate special information indicated by information provider e.g. plant to be collected at specific time of the day or young part of plant to be used, season, etc.).....  
.....

16. Name and address of person giving this information about medicinal value of this plant:  
.....

Does he/she belong to a registered practitioners association? Yes/No. If yes, which one?.....

**Provider's signature:**..... **Tel: :**.....

\*\*17. Brief description of plant (including habitat or location where collection was made).....  
.....

\*\*18. Has a specimen of this plant been deposited at the National Herbarium? .....If yes, Number given to the specimen in herbarium.....

\*\*19. Name and address of collector/recorder of this information.....

**Tel: .....**

\*\*20. Name and address of botanist who identified the plant.....  
.....

\*\*21. Name and address of taxonomist who confirmed identity of plant.....  
.....

---

*Note: \* Environmental factors, season and degree of tissue maturity influence plant metabolism. Therefore, levels of availability of bioactive metabolites in plants depend on those factors and may constitute a guide for plant selection and collection.*

*\*\*Questions 1-2; 17-21 should be answered afterwards by ethnobotanist.*

## **Annexe 5 : Préparation des milieux de cultures**

### ***1. Préparation du milieu de culture au sérum pour le test d'activité antiplasmodiale***

#### **➤ *Le sérum***

Pour obtenir du sérum, 200 ml de sang AB<sup>+</sup> ont été prélevés d'un donneur dans des tubes de culture et laissé à température ambiante pendant 3 à 4 heures jusqu'à ce que les globules rouges sédimentent. Ils ont été ensuite centrifugés à 2500 trs/min., pendant 10 minutes. Le sérum surnageant a été délicatement prélevé et introduit dans des tubes coniques de 50 ml et centrifugé de nouveau à 2500 trs/min. pendant 10 minutes. Il a été ensuite transvasé dans de nouveaux tubes coniques et autoclavé à 56°C pendant 30 minutes pour inactiver les agents coagulants. Le sérum ainsi préparé a été aliquoté en fractions de 50 ml et conservé à 20°C. Les érythrocytes ont été également obtenus suite à cette procédure.

#### **➤ *Préparation du RPMI 1640 10% de sérum***

Dans une bouteille stérilisée en verre d'un litre, les constituants suivants ont été additionnés :

- 100 ml de RPMI 1640 contenant l'HEPES 25 Mm;
- 5 ml de tampon HEPES 1M;
- 0,5 ml de gentamycine (50 mg/ml);
- 10 ml de glutamine (100x);
- 100 ml de sérum inactivé préparé précédemment.

Ce mélange a été bien homogénéisé, filtré à 0,45µm et ensuite à 0,22µm et conservé à 4°C.

## **2. Préparation du DMEM 10%**

Le DMEM 10% est obtenu en mélangeant pour un litre :

- 89 ml de DMEM;
- 1 ml d'antibiotique Penicillin/Treptomycin (100X);
- 10 ml de FBS 10% inactivé.

Le mélange est bien homogénéisé puis filtré à 0,22  $\mu\text{m}$  et conservé à 4°C.

## **3. Préparation du MTL 10%**

Le MTL 10% a été préparé pour un litre en mélangeant :

- 9,91 g de HANKS (HBSS) ;
- 0,350 g de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ ;
- 5 g de Lactoalbumine hydrolysée;
- 0,1 g d'extrait de levure;
- 0,2 g d'hémoglobine bovine;
- 0,056 g de pénicilline;
- 0,1 g de streptomycine;
- 0,048 g de kanamicine;
- 900 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  distillée;
- 100 ml de FBS 10% inactivé.

Ce mélange a été bien homogénéisé; le pH a été ajusté à 7,4. Le mélange a été filtré à 0,22  $\mu\text{m}$  et conservé à 4°C.

## **4. Préparation du RPMI 10% pour test sur *L. major***

Dans une bouteille stérilisée en verre d'un litre, les constituants suivants ont été additionnés

:

- 16,4 g de RPMI-1640;
- 0,350 g de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ ;
- 0,048 g de kanamicine;
- 900 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  distillée;
- 100 ml de FBS 10% inactivé.

Le mélange a été bien homogénéisé; le pH a été ajusté à 7,4. Le mélange a été filtré à 0,22  $\mu\text{m}$  et conservé à 4°C.

### **5. Préparation du MEM 10 %**

Dans une bouteille stérilisée en verre d'un litre, les constituants suivants ont été additionnés :

- 9,53 g de MEM;
- 2,2 g de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ ;
- 4,0 g d'HEPES;
- 0,056 g de pénicilline;
- 0,1 g de streptomycine;
- 0,048 g de kanamicine;
- 900 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  distillée;
- 100 ml de FBS 20% inactivé.

Ce mélange a été bien homogénéisé; le pH a été ajusté à 7,4. Le mélange a été filtré à 0,22  $\mu\text{m}$  et conservé à 4°C.



**PUBLICATIONS**

## **PUBLICATIONS**

Filename: CCORRECTED 16 JUNE 2016 final tomorrow MeBoP Application  
THESIS 4 MAI 2016.docx  
Folder: /Users/PatrickTsouh/Library/Containers/com.microsoft.Word/Data/Docu-  
ments  
Template: /Users/PatrickTsouh/Library/Group Containers/UBF8T346G9.Office/User  
Content.localized/Templates.localized/Normal.dotm  
Title:  
Subject:  
Author: HP  
Keywords:  
Comments:  
Creation Date: 9/16/18 7:12:00 PM  
Change Number: 2  
Last Saved On: 9/16/18 7:12:00 PM  
Last Saved By: Patrick Valere TSOUH FOKOU  
Total Editing Time: 1 Minute  
Last Printed On: 9/16/18 7:12:00 PM  
As of Last Complete Printing  
Number of Pages: 204  
Number of Words: 49,243 (approx.)  
Number of Characters: 280,687 (approx.)

Article

## Extracts from *Annona Muricata* L. and *Annona Reticulata* L. (Annonaceae) Potently and Selectively Inhibit *Plasmodium Falciparum*

Lauve Rachel Tchokouaha Yamthe <sup>1,2</sup>, Patrick Valere Tsouh Fokou <sup>1</sup>, Cedric Derick Jiatsa Mbouna <sup>1</sup>, Rodrigue Keumoe <sup>1</sup>, Bruno Lenta Ndjakou <sup>3</sup>, Paul Toukam Djouonzo <sup>2,4</sup>, Alvine Ngoutane Mfopa <sup>1</sup>, Jennifer Legac <sup>5</sup>, Nole Tsabang <sup>2</sup>, Jiri Gut <sup>5</sup>, Philip J. Rosenthal <sup>5</sup> and Fabrice Fekam Boyom <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal Plants Studies, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon;

E-Mails: yamthe\_lauve@yahoo.fr (L.R.T.Y.); Tsouh80@yahoo.fr (P.V.T.F.); cedrickjiatsa@yahoo.com (C.D.J.M.); rkeumoe@yahoo.fr (R.K.); ngmfalvine@yahoo.fr (A.N.M.)

<sup>2</sup> Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies (IMPM), P.O. Box 6163, Yaoundé, Cameroon; E-Mails: touks241@yahoo.fr (P.T.D.); tsabang@hotmail.com (N.T.)

<sup>3</sup> Department of Chemistry, Higher Teacher Training College, University of Yaoundé 1. P.O. Box 47, Yaoundé, Cameroon; E-Mail: lentabruno@yahoo.fr

<sup>4</sup> Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

<sup>5</sup> Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, University of California, San Francisco, CA 94943, USA; E-Mails: jlegac@medsfgh.ucsf.edu (J.L.); jiri.gut@ucsf.edu (J.G.); prosenthal@medsfgh.ucsf.edu (P.J.R.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: fabrice.boyom@fulbrightmail.org; Tel.: +237-67727-6585.

Academic Editor: Ronan Batista

Received: 2 April 2015 / Accepted: 20 April 2015 / Published: 30 April 2015

---

**Abstract:** The aim of this work was to screen extracts from *Annona muricata* and *Annona reticulata* *in vitro* against *Plasmodium falciparum*. Crude ethanolic extracts, methylene chloride fractions, aqueous fractions, subfractions and isolated compounds (stigmasterol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, lichexanthone, gallic acid and  $\beta$ -sitosterol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside) were tested for cytotoxicity on erythrocytes and Human Foreskin Fibroblasts cells and against the W2 strain of *P. falciparum* in culture.

Results indicated that none of the extracts was cytotoxic at concentrations up to 10 µg/mL. Most of the extracts, fractions and subfractions inhibited the growth of *P. falciparum* with IC<sub>50</sub> values ranging from 0.07 to 3.46 µg/mL. The most potent was the subfraction 30 from *A. muricata* stem bark (IC<sub>50</sub> = 0.07 µg/mL) with a selectivity index of > 142. Subfraction 3 from *A. muricata* root also exhibited very good activity (IC<sub>50</sub> = 0.09 µg/mL) with a high selectivity index (SI > 111). Amongst the isolated compounds, only gallic acid showed activity with IC<sub>50</sub> of 3.32 µg/mL and SI > 10. These results support traditional claims for *A. muricata* and *A. reticulata* in the treatment of malaria. Given their limited cytotoxicity profile, their extracts qualify as promising starting points for antimalarial drug discovery.

**Keywords:** *Annona muricata*; *Annona reticulata*; cytotoxicity; *Plasmodium falciparum*; antiplasmodial activity

---

## 1. Introduction

Malaria is a life-threatening disease caused by parasites that are transmitted through the bites of infected mosquitoes. According to the latest estimates, there were about 198 million cases of malaria and an estimated 584,000 deaths from malaria in 2013 [1]. Most deaths occur among children living in sub-Saharan Africa, where a child dies from malaria every minute. Malaria mortality rates among children in Africa have been reduced by an estimated 54% since 2000, though it remains one of the most devastating infectious killers [1].

Artemisinin-based combination therapies are now recommended therapies for falciparum malaria in nearly all countries [2]. The recent emergence of artemisinin-resistant parasites in Southeast Asia [3] has highlighted the need for new treatments for malaria.

For centuries, plants have served as a rich source of novel compounds for the treatment of various human diseases. Antimalarial drugs developed from plants include quinine from *Cinchona* tree bark and artemisinin from *Artemisia annua* [4]. Ethnobotanical surveys play an important role in the identification, selection and development of therapeutic agents from medicinal plants. In Cameroon and most parts of Africa, plant extracts are still widely used in the treatment of malaria and several other diseases, in particular in areas where access to standard treatments is limited. However, the potential of many of these plants as sources of antimalarial drugs has yet to be fully explored [5]. A systematic search for Cameroonian plant species with antimalarial activity is underway in our laboratory. Many medicinal plants used for traditional treatment of malaria have been identified, including *Annona muricata* and *Annona reticulata* [5]. *Annona muricata* L., commonly known as graviola or soursop, is a small, upright tropical evergreen tree, 5–6 m high, with large glossy, dark green leaves. It produces a large, heart-shaped, edible fruit that is 15–23 cm in diameter, is yellow–green in color and has flesh inside. All parts of the *A. muricata* tree have been used medicinally in traditional herbal medicine in South America with the following properties and actions: anthelmintic, antiplasmodial, antiparasitic, antimicrobial, antipyretic, sedative, antispasmodic, nervine, hypotensive, anticonvulsant, digestive, antitumor and anticancer [6]. Moreover, aqueous and organic extracts of various organs of *A. muricata* have been previously investigated for antiplasmodial

activity [7–10]. *Annona reticulata* L., commonly known as bullock's heart, is a low, erect tree with a spreading or rounded crown, and a trunk up to 25–35 cm in diameter. It grows up to 10 m high. The leaves are narrow-lanceolate, alternating, oblong and deciduous, measuring up to 10–20 cm in length and 2–5 cm in width, with conspicuous veins and a bad smell. The fruit measures 8–16 cm in diameter and may be irregular, symmetrically heart-shaped, nearly round, or lopsided, with a depression at the base [11]. In traditional medicines, this plant has various pharmacological activities such as antioxidant, anticancer, analgesic, nervous system depressant, antimalarial, anthelmintic, and anti-syphilitic [11].

This report describes the *in vitro* antiplasmodial activity of extracts from two Annonaceae, *A. muricata* and *A. reticulata*, which are traditionally used to treat malaria in Cameroon and elsewhere.

## 2. Experimental Section

### 2.1. Plant Collection and Authentication

Plants were selected based on the results of an ethnopharmacological survey on Annonaceae species used traditionally to control malaria and fever in Cameroon [5].

Plants were collected at the University of Yaoundé 1 Campus and Shell Nsimeyong in Yaoundé, Cameroon in May 2011 and July 2013 for *A. muricata* and *A. reticulata*, respectively. Voucher specimens of plant samples were deposited under the respective reference numbers 32879/HNC and 66886/HNC. Collected samples were air dried and ground before extraction.

### 2.2. Preparation of Extracts and Fractionation

The extracts were prepared following the method previously described [12] that was designed to prepare acetogenin-rich fractions, with slight modifications. The materials were submitted to a 95% ethanol extraction for 48 h to yield the ethanolic crude extracts. The ethanolic extracts were partitioned between H<sub>2</sub>O and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> layers were submitted to vacuum evaporation using a rotating evaporator (BUCHI 011). H<sub>2</sub>O layers were dried under ventilation at room temperature. Crude ethanolic extracts, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fractions and H<sub>2</sub>O fractions were tested for antiplasmodial activity.

Further fractionation and antiplasmodial screening were performed on the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fractions of root and stem bark extracts of *A. muricata*.

The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction of the root extract of *A. muricata* (31.67 g) was subjected to column chromatography over silica gel (Merck, 230–400 mesh) and eluted with hexane, hexane/EtOAc, EtOAc, EtOAc/MeOH and MeOH, in increasing polarity. One hundred and forty four fractions of 250 mL each were collected and subsequently combined according to their TLC profiles on a pre-coated silica gel 60 F plate developed with n-hexane/EtOAc and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH mixtures, to give eight subfractions (AMrSF1–AMrSF8) and one compound (AMrP1).

Similarly, column chromatography of 51.75 g of the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction of the stem bark extract of *A. muricata* led to 388 fractions subsequently combined into 43 subfractions (AMsbSF1–AMsbSF43) and three products, codified AMsbP1, AMsbP2 and AMsbP3.

The structures of isolated products were elucidated using spectroscopic analysis (proton- and carbon 13-NMR, mass spectra (MS), COSY, HSQC and HMBC) and confirmed by comparison with published results.

### 2.3. Evaluation of Biological Activities

#### 2.3.1. Erythrocyte Susceptibility to Plant Extracts

A preliminary toxicological assessment was carried out to determine the highest drug concentrations that could be incubated with erythrocytes without apparent toxicity. This was done according to the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide/phenazine methosulfate (MTT/PMS, Promega) colorimetric assay [13], with some modifications [14]. This method is based on the reduction of MTT to formazan by enzymes of viable cells, especially the dehydrogenases such as glucose-6-phosphate dehydrogenase of the pentose phosphate pathway of erythrocytes. The extract stock solutions in 10% DMSO (1 mg/mL) were serially diluted in 96 well culture plates using RPMI 1640 and tested at the highest concentration of 20 µg/mL in triplicate against erythrocytes (2% hematocrit) (at 37 °C, in a 3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 91% N<sub>2</sub> atmosphere, in the presence of RPMI 1640, 25 mM HEPES, pH 7.4 for 48 h). At the end of the incubation period, the cultures were transferred into polypropylene microcentrifuge tubes and centrifuged at 1500 rpm for 5 min, and the supernatant was discarded. A total of 1.5 mL MTT solution with 250 µL g PMS was added to the pellets. Controls contained no erythrocytes. The tubes were thereafter incubated for 45 min at 37 °C, and then centrifuged, and the supernatant was discarded. The pellets were re-suspended in 0.75 mL of HCl 0.04 M in isopropanol to extract and dissolve the dye (formazan) from the cells. After 5 min, the tubes were vigorously mixed and centrifuged, and the absorbance of the supernatant was determined at 570 nm, with absorbance representing healthy cells. The highest drug concentrations producing minimal damage to the cells were considered starting points for drug dilutions.

#### 2.3.2. Human Foreskin Fibroblast (HFF) Susceptibility to Plant Extracts

To determine selectivity indices of active extracts, a toxicological assessment was carried out with human foreskin fibroblast (HFFs), essentially as previously described [15]. Briefly, serially diluted extracts in 2% DMSO were incubated with HFF cells (ATCC-HS68) in culture using a 96-well plate format (Costar). Negative controls consisted of cells without inhibitor. Cultures were incubated for 24 h at 37 °C in humidified CO<sub>2</sub>, and 20 µL of MTS/PMS (Promega, Madison, USA) was added to each well and incubated for 1.5 h at 37 °C. Absorbance was then recorded at 490 nm using a 96-well plate reader (Biotek EL800, Vermont, NE, USA). The percent growth inhibition was calculated from the optical densities relative to the negative control, and 50% cell cytotoxicity (CC<sub>50</sub>) values were determined using GraphPad Prism 5.0. Selectivity indices of plants extracts, defined as the ratio CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> parasites, were determined.

#### 2.3.3. Antiplasmodial Activity

*Plasmodium falciparum* strain W2 was maintained in culture in sealed flasks at 37 °C, in a 3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 91% N<sub>2</sub> atmosphere in RPMI 1640, 25 mM HEPES, pH 7.4, supplemented with heat inactivated 10% human serum and human erythrocytes to achieve a 2% hematocrit. Parasites were synchronized at the ring stage by serial treatment with 5% sorbitol (Sigma, Taufkirchen, Germany) [16] and studied at 1% parasitemia. Plant extracts were prepared as 1 mg/mL stock solutions in dimethyl sulfoxide (DMSO), further diluted as needed for individual experiments, and tested in triplicate.

The stock solutions were diluted in supplemented RPMI 1640 medium so as to have at most 0.1% DMSO in the final reaction medium. An equal volume of 1% parasitemia, 4% hematocrit culture was thereafter added and gently mixed thoroughly. Negative controls contained equal concentrations of DMSO. Positive controls contained artemisinin (Sigma, Taufkirchen, Germany). Cultures were incubated at 37 °C for 48 h. Parasites at the ring stage were thereafter fixed by replacing the serum medium by an equal volume of 1% formaldehyde in PBS. Aliquots (50 µL) of each culture were then added to 5 mL round-bottom polystyrene tubes containing 0.5 mL 0.1% Triton X-100 and 1 nM YOYO nuclear dye (Molecular Probes) in PBS, and parasitemias of treated and control cultures were compared using a Becton-Dickinson FACSsort flow cytometer to count nucleated (parasitized) erythrocytes. Data acquisition was performed using CellQuest software. These data were normalized to percent control activity and IC<sub>50</sub>s were calculated using Prism 5.0 software (GraphPad, CA, USA) with data fitted by non-linear regression to the variable slope sigmoidal dose–response formula,  $y = 100 / (1 + 10^{(\log IC_{50} - x)H})$ , where H is the hill coefficient or slope factor [17].

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Plant Extraction and Fractionation

From each investigated plant organ, an ethanolic crude extract was prepared and subsequently partitioned into H<sub>2</sub>O and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fractions. They were all tested for biological activity, and the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fractions of *A. muricata* root and stem bark (AMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AMsbCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) were selected as promising (Table 1) and subjected to flash chromatography as described in the materials and methods section to afford the chemically known constituents AMrP1, AMsbP1, AMsbP2 and AMsbP3 (Figure 1).

Isolated compounds were identified by comparison of their spectroscopic data with those reported in the literature as stigmaterol-3-*O*-β-D-glucopyranoside (AMrP1) [18,19], lichexanthone (AMsbP1) [20,21], gallic acid (AMsbP2) [22,23] and β-sitosterol 3-*O*-β-D-glucopyranoside (AMsbP3) [24]. Stigmaterol-3-*O*-β-D-glucopyranoside (AMrP1) was reported in the root of *Polyalthia longifolia* var *pendula* [25]. Lichexanthone (AMsbP1) had previously been isolated from the root of *Rollinia leptopetala* [26] and from the bark of *Guatteria blepharophylla* [27]. Gallic acid (AMsbP2) and β-sitosterol 3-*O*-β-D-glucopyranoside (AMsbP3) were recently found in the leaf of *Polyalthia longifolia* [28] and twig of *Annona squamosa* [29] respectively, all plants belonging to the Annonaceae family.

The 79 extract samples prepared from the two investigated plants were screened for antiplasmodial activity.

Crude extracts from the pericarp, root, and stem bark of *A. muricata* and stem bark, root, and fruit of *A. reticulata* showed antiplasmodial activity, with IC<sub>50</sub> values ranging from 0.29 to 1.90 µg/mL (Table 1). Crude ethanolic extracts from the leaf and twig of *A. reticulata* were inactive (IC<sub>50</sub> > 10 µg/mL).

From the crude ethanolic extracts, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O fractions were prepared by liquid-liquid partitions. Overall, none of the H<sub>2</sub>O fractions showed activity. On the other hand, apart from the ARICH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction from *A. reticulata* leaf, the seven other CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fractions from both plants exhibited potent activity, with IC<sub>50</sub> values ranging from 0.19–1.50 µg/mL (Table 1). The most potent was from the root extract (AMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-IC<sub>50</sub> = 0.19 µg/mL). Overall, the fractions AMpCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AMsbCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ARtwCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ARsbCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ARrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and ARfrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> were promising, with IC<sub>50</sub> values below 5 µg/mL. Fraction AMrCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> showed the best selectivity (SI > 52.6).

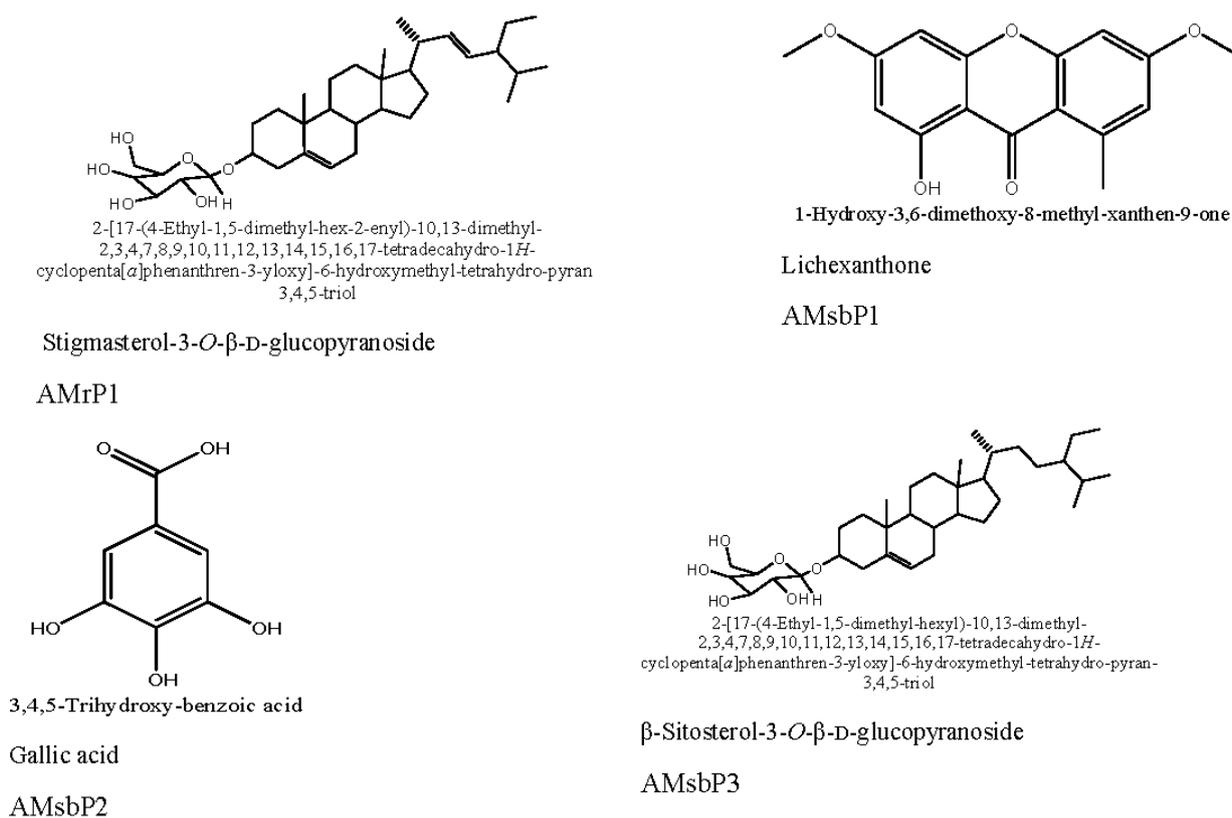
**Table 1.** Susceptibility of human foreskin fibroblast (HFF) and *P. falciparum* to plant extracts.

Plant Species	Organ	Nature of Extract	Code	<sup>a</sup> Yield (%)	<sup>b</sup> IC <sub>50</sub> (µg/mL) ± S.D.	<sup>c</sup> SI
<i>Annona muricata</i>	Pericarp	Crude ethanol extract	AMpEthOH	5.68	1.01 ± 0.07	>9.90
		H <sub>2</sub> O fraction	AMpH <sub>2</sub> O	1.02	>10	ND
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fraction	AMpCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3.54	0.94 ± 0.03	>10.63
	Root	Crude ethanolic extract	AMrEthOH	6.23	0.79 ± 0.14	>12.65
		H <sub>2</sub> O fraction	AMrH <sub>2</sub> O	0.98	>10	ND
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fraction	AMrCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4.18	0.19 ± 0.03	>52.63
		Subfractions	AMrSF1	0.56	0.61 ± 0.04	>16.39
			AMrSF2	0.33	0.22 ± 0.06	>45.45
			AMrSF3	1.07	0.09 ± 0.003	>111.11
		Purified compound	Stigmasterol-3- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside (AMrP1)	0.016	>10	ND
	Stem bark	Crude ethanolic extract	AMsb-EthOH	5.91	1.45 ± 0.20	>6.45
		H <sub>2</sub> O fraction	AMsbH <sub>2</sub> O	0.87	>10	ND
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fraction	AMsbCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4.32	1.50 ± 0.07	>6.66
		Subfractions	AMsbSF2	0.11	1.65 ± 1.58	>6.06
			AMsbSF15	0.08	2.52 ± 1.41	>3.96
			AMsbSF16	0.16	3.46 ± 0.98	>2.89
			AMsbSF17	0.04	2.45 ± 1.77	>3.92
			AMsbSF18	0.02	2.75 ± 1.86	>3.63
			AMsbSF19	0.73	2.89 ± 0.55	>3.46
			AMsbSF20	0.03	1.14 ± 0.22	>8.77
			AMsbSF21	0.03	1.11 ± 0.34	>9.00
			AMsbSF22	0.02	0.12 ± 0.03	>83.3
			AMsbSF24	0.41	0.46 ± 0.04	>21.7
			AMsbSF27	0.02	1.17 ± 0.16	>8.54
			AMsbSF28	0.62	0.72 ± 0.07	>13.88
			AMsbSF29	0.07	0.75 ± 0.13	>13.33
			AMsbSF30	0.31	0.07 ± 0.009	>142.3
			AMsbSF31	0.19	0.28 ± 0.05	>35.7

Table 1. Cont.

Plant Species	Organ	Nature of Extract	Code	<sup>a</sup> Yield (%)	<sup>b</sup> IC <sub>50</sub> (µg/mL) ± S.D.	<sup>c</sup> SI	
<i>Annona reticulata</i>	Leaf	Crude ethanolic extract	AMsbSF32	0.017	0.78 ± 0.43	>12.8	
			AMsbSF33	0.05	1.31 ± 0.19	>7.63	
			AMsbSF34	0.09	1.07 ± 0.36	>9.34	
			AMsbSF35	0.019	2.19 ± 0.47	>4.56	
			AMsbSF36	0.22	1.39 ± 0.33	>7.19	
			Lichexanthone (AMsbP1)	0.014	>10	ND	
			Purified compounds	Gallic acid (AMsbP2)	0.052	3.32 ± 1.49	>3.01
				β-Sitosterol-3-O-β-D-glucopyranoside (AMsbP3)	0.012	>10	ND
			Twig	Crude ethanolic extract	ARIEthOH	10.46	> 10
	H <sub>2</sub> O fraction	ARIH <sub>2</sub> O			1.71	>10	ND
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fractions	ARICH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>			9.93	> 10	ND
	Stem bark	Crude ethanolic extract	ARtwEthOH	4.96	> 10	ND	
			H <sub>2</sub> O fraction	ARtwH <sub>2</sub> O	0.53	>10	ND
			CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fraction	ARtwCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.78	0.88 ± 0.34	>11.4
	Root	Crude ethanolic extract	ARsbEthOH	6.02	0.29 ± 0.02	>34.5	
			H <sub>2</sub> O fraction	ARsbH <sub>2</sub> O	1.04	>10	ND
			CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fraction	ARsbCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3.71	0.82 ± 0.25	>12.2
	Fruit	Crude ethanolic extract	ARrEthOH	5.12	1.90 ± 0.008	>5.26	
			H <sub>2</sub> O fraction	ARrH <sub>2</sub> O	0.71	>10	ND
			CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fraction	ARrCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4.54	0.38 ± 0.23	>26.3
	Positive control		Crude ethanolic extract	ARfrEthOH	5.14	0.67 ± 0.02	>14.9
H <sub>2</sub> O fraction				ARfrH <sub>2</sub> O	0.48	>10	ND
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fraction				ARfrCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2.12	0.42 ± 0.009	>23.8
			Artemisinin		0.005 ± 0.0008	ND	

<sup>a</sup> The percent extraction yields were calculated in percentages (w/w); The susceptibility of HFF cells to plant samples was evaluated in culture; <sup>b</sup> The susceptibility of the W2 strain of *P. falciparum* to plant extracts was evaluated in culture; <sup>c</sup> SI = Selectivity index; AM = *Annona muricata*; AR = *Annona reticulata*; CC<sub>50</sub> = concentration of extract that killed 50% of HFF cells, relative to negative control; IC<sub>50</sub> = concentration of extract that killed 50% of parasites, relative to negative control; S.D. = standard deviation; ND = not determined.



**Figure 1.** Chemical structures of compounds isolated from *A. muricata*.

### 3.2. Susceptibility of Erythrocytes, HFF Cells, and *P. Falciparum* to Plant Extracts

All the tested extracts showed no toxicity to erythrocytes and HFF cells at concentrations up to 10  $\mu\text{g/mL}$ , indicating  $\text{IC}_{50}$  values greater than 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Further fractionation coupled with biological screening was performed on the two  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fractions of root (AMr $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) and stem bark (AMsb $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) of *A. muricata*. They were submitted to flash chromatography eluting with solvent systems of increasing polarity (Hex-EtOAc 100:0:0:100, and EtOAc-MeOH 95:5–0:100) to afford subfractions and four pure compounds (stigmasterol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (AMrP1), lichexanthone (AMsbP1), gallic acid (AMsbP2) and  $\beta$ -sitosterol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (AMsbP3)) that were assessed for antiplasmodial activity. Three of eight subfractions (AMrSF1, AMrSF2 and AMrSF3) obtained from the root extract of *A. muricata* possessed activity, with  $\text{IC}_{50}$  values of 0.61  $\mu\text{g/mL}$ , 0.22  $\mu\text{g/mL}$  and 0.09  $\mu\text{g/mL}$ , respectively (Table 1), with improved activity compared to the initial crude ethanolic extract (AMrEthOH- $\text{IC}_{50}$  = 0.79  $\mu\text{g/mL}$ ). The isolated compound from the root of *A. muricata*, stigmasterol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, did not show activity at concentrations up to 10  $\mu\text{g/mL}$ .

The  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fraction of *A. muricata* stem bark extract yielded 43 subfractions among which 18 (AMsbSF2, AMsbSF15, AMsbSF16, AMsbSF17, AMsbSF18, AMsbSF19, AMsbSF20, AMsbSF21, AMsbSF22, AMsbSF24, AMsbSF27, AMsbSF28, AMsbSF29, AMsbSF30, AMsbSF31, AMsbSF32, AMsbSF33, AMsbSF34, AMsbSF35 and AMsbSF36) showed antiplasmodial activity ( $\text{IC}_{50}$  < 5  $\mu\text{g/mL}$ ), with  $\text{IC}_{50}$  values ranging from 0.07  $\mu\text{g/mL}$  (AMsbSF30) to 3.46  $\mu\text{g/mL}$  (AMsbSF16). Among the three isolated compounds from this  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fraction (lichexanthone, gallic acid and  $\beta$ -sitosterol

3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside), only gallic acid showed activity, with  $IC_{50}$  3.32  $\mu$ g/mL. Subfraction AMsbSF30 exerted the best activity ( $IC_{50}$  = 0.07  $\mu$ g/mL) and also showed the highest selectivity (SI = 142.3).

Moreover, according to previously agreed criteria [30], Subfraction 3 of the root extract (AMrSF3) and Subfraction 29 of the stem bark extract (AMsbSF30) from *A. muricata* that showed  $IC_{50}$  values below 0.2  $\mu$ g/mL and SI > 100 could be considered as promising starting points for drug development. Furthermore, SI > 10 indicates appropriate pharmacological efficacy and safety of plant extracts [31]. Based on these criteria, 19 samples out of the 79 extracts, fractions, and subfractions tested showed acceptable selectivity (SI > 10.6–142.3).

In our previous report [5], Annonaceae used to treat malaria, including *A. muricata*, were described. The use of *A. reticulata* in the traditional cure of malaria was reported [11]. In the present study, extracts from *A. muricata* and *A. reticulata* showed antiplasmodial activity, with  $IC_{50}$  values < 10  $\mu$ g/mL, and did not demonstrate cytotoxicity.

Extracts from *A. muricata* pericarp, root and stem bark showed potent antiplasmodial activity. Results obtained with *A. muricata* crude ethanolic extracts from pericarp, root and stem bark and their respective  $CH_2Cl_2$  fractions corroborated the findings of other authors [7]. Twenty micrograms per milliliter of soaked leaves of *A. muricata* in a 1:1 chloroform/methanol mixture caused 67% inhibition of *P. falciparum* [8]. Moreover, hexane, ethyl acetate and methanol extracts of *A. muricata* leaf exhibited moderate activities against chloroquine sensitive but not chloroquine resistant strains of *P. falciparum*. However, in their study the most potent ethyl acetate extract was toxic to human monocytes. In a similar approach, *A. muricata* leaf powder (from Malaysia) defatted with hexane and sequentially extracted with dichloromethane, methanol and water showed promising activity against *P. falciparum*, with negligible toxicity against bovine cells [9]. In another study, *A. muricata* leaf aqueous, ethanol and pentane extracts showed moderate antiplasmodial activity [10]. Few results have been reported for the antiplasmodial activity of isolated constituents from *A. muricata*, mainly acetogenins [10]. Anonaine isolated from the fruit of *A. muricata* showed antiplasmodial activity [32] with low cytotoxicity.

Moderate antiplasmodial activity of gallic acid was reported [33], and authors concluded that the activity was linked to its very strong antioxidant capacity [33]. In our study,  $\beta$ -sitosterol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside showed no activity, contrary to the reports of other authors who claimed appreciable potency for the same compound isolated from the bark of *Dacryodes edulis* (Burseraceae) [34].

Also, extracts and fractions from leaf, twig, root, stem bark and fruit of *A. reticulata* showed activities against *P. falciparum*. As far as we know, this is the first report on the antiplasmodial activity of extracts from *A. reticulata*. However, *A. reticulata* has been investigated for activity against other protozoan parasites. The *in vitro* anti-leishmanial activity of extracts from the leaf and seed of the plant was studied [35], and results showed that the oxoaporphine alkaloid liriodenine isolated from the leaf dichloromethane extract was active against promastigote forms of *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. guyanensis* and against the intracellular amastigote forms of *L. amazonensis* [35].

#### 4. Conclusions

Our results highlight the antiplasmodial activity and lack of cytotoxicity of extracts from *A. muricata* and *A. reticulata*. Detailed studies are ongoing to characterize the active principles and further structure-activity-relationships.

#### Acknowledgments

This study was partly supported by materials obtained from the Seeding Labs' 2012 Equipment Transfer grant (SL2012-2) and MMV Challenge grant (MMV-12/0087) to Fabrice Boyom. The authors are thankful to the staff of the Cameroon National Herbarium for assistance in plant identification and specimen archiving.

#### Author Contributions

F.F.B. conceived, designed and supervised the work and revised the manuscript; P.J.R. supervised the antiplasmodial activity testing and revised the manuscript; N.T. identified the collected plants and archived the specimens; L.R.T.Y., P.V.T.F., C.D.J.M., R.K., A.N.M. collected and extracted the plants and performed the cytotoxicity tests; B.L.N., P.T.D. performed the extracts fractionation, compounds isolation and structure determination; J.G. and J.L. performed the antiplasmodial activity testing.

#### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. World Health Organization. *Malaria Report*; WHO: Geneva, Switzerland, 2014.
2. World Health Organization. *World Health Organization Treatment Recommendation*; WHO: Geneva, Switzerland, 2010.
3. Dondorp, A.M.; Nostern, F.; Yi, P.; Das, D.; Phyo, A.P.; Tarning, J.; Lwin, K.M.; Ariey, F.; Hanpithakpong, W.; Lee, S.J.; *et al.* Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 455–467.
4. Meshnick, S.R.; Taylor, T.E.; Kamchonwongpaisan, S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 301–315.
5. Tsabang, N.; Tsouh, F.P.V.; Yamthe, T.L.R.; Noguem, B.; Bakarnga-Via, I.; Dongmo, N.M.S.; Boyom, F.F. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *139*, 171–180.
6. Pinto, A.C.; Andrade, S.R.; Ferreira, F.R.; Kinpara, D.I. *Annona species*. In *International Center for under Utilised Crops*; University of Southampton: Southampton, UK, 2005; pp. 1–281.
7. Boyom, F.F.; Tsouh, F.P.V.; Tchokouaha, Y.L.R.; Ngoutane, M.A.; Madiesse, K.A.E.; Mbacham, F.W.; Tsamo, E.; Amvam, Z.P.H.; Jiri, G.; Rosenthal, P.J. Potent antiplasmodial extracts from Cameroonian Annonaceae. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *134*, 717–724.

8. Bidla, G.; Titanji, V.P.K.; Joko, B.; Ghazali, G.E.; Bolad, A.; Berzins, K. Antiplasmodial activity of seven plants used in african folk medicine. *Indian J. Pharmacol.* **2004**, *36*, 245–246.
9. Razak, M.A.; Adlin, A.; Rosnani, A.N.; Mohd, I.W.; Siti, H.S.; Noor, R.A.; Zakiah, I. Effect of selected local medicinal plants on the asexual blood stage of chloroquine resistant *Plasmodium falciparum*. *BMC Comp. Altern. Med.* **2014**, *14*, 492.
10. Menan, H.; Banzouzi, J.T.; Hocquette, A.; Pelissier, Y.Y.; Blache, Y.; Kone, M.; Mallie, M.; Ake, A.L.; Valentin, A. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in West African traditional medicine for the treatment of malaria. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *105*, 131–136.
11. Chavan, S.S.; Shamkuwar, P.B.; Damale, M.G.; Pawar, D.P. A comprehensive review on *Annona reticulata*. *Int. J. Pharm. Sc. Res.* **2014**, *5*, 45–50.
12. Alali, F.Q.; Liu, X.X.; McLaughlin, J.L. Annonaceous acetogenins: Recent progress. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 504–540.
13. Cedillo-Rivera, R.; Ramfrez, A.; Munoz, O. A rapid colorimetric assay with the Tetrazolium salt MTT and Phenazine Methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **1992**, *23*, 59–61.
14. Boyom, F.F.; Madiesse, K.E.; Tepongning, R.; Ngouana, V.; Mbacham, W.F.; Tsamo, E.; Amvam Zollo, P.H.; Gut, J.; Rosenthal, P.J. Antiplasmodial activity of extracts from seven medicinal plants used in malaria treatment in Cameroon. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *123*, 483–488.
15. Boyom, F.F.; Tsouh, F.P.V.; Tchokouaha, Y.L.R.; Spangenberg, T.; Mfopa, N.A.; Kouipou, T.R.M.; Mbouna, J.C.; Donkeng, D.F.V.; Zollo, A.P.H. Repurposing the open access malaria box to discovery potent inhibitors of *Toxoplasma gondii* and *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 5848.
16. Lambros, C.; Vanderberg, J.P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.* **1979**, *65*, 418–420.
17. Singh, A.; Rosenthal, P.J. Comparison of efficacies of cysteine protease inhibitors against five strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 949–951.
18. Wright, H.E.; Burton, W., Jr.; Berry, R.C. Identification of stigmasteryl D-glucoiside in aged burley tobacco. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 918–920.
19. Mba'ning, B.M. Etude Phytochimique et Pharmacologique de *Salaciacamerunensis* Loes., *Salaciadimidia* Hall. (Celastraceae) et *Crinumnatans* Baker (Amaryllidaceae). Ph.D. Thesis, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon, 2012.
20. Ruben, F.G.; Keith, S.B. Alkaloids of three *Aspidosperma* species. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1093–1095.
21. Buitrago, D.A.; Rojas, V.J.; Cote, V.; Bruno-Colmenárez, J.; de Delgado, G.D. NMR elucidation and crystal structure analysis of 1-hydroxy-3,6-dimethoxy-8-methyl-9*h*-xanthen-9-one (lichexanthone) isolated from *Vismia baccifera* (Guttiferae). *Bol. Lat. Am. Caribe Plantas Med. Aromát.* **2010**, *9*, 470–474.
22. Eldahshan, O.A. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds of Carob leaves grown in Egypt. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* **2010**, *3*, 52–55.
23. Zhang, H.M.; Wang, C.F.; Shen, S.M.; Wang, G.L.; Liu, Z.M.; Wang, Y.Y.; Du, S.S.; Liu, Z.L.; Liu, P.; Deng, Z.W. Antioxidant phenolic compounds from Pu-erh tea. *Molecules* **2012**, *17*, 14037–14045.

24. Ramiarantsoa, H.; Koffi, B.A.; Kouamé, M.A.; Djakouré, L.A. Le *O*- $\beta$ -D-glucoside du  $\beta$ -sitostérol Isolé des feuilles de *Ravenala madagascariensis*. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.* **2008**, *026*, 99–103.
25. Faizi, S.; Khan, R.A.; Azher, S.; Khan, S.A.; Tauseef, S.; Ahmad, A. New antimicrobial alkaloids from the roots of *Polyalthia longifolia* var *pendula*. *Planta Medica* **2003**, *69*, 350–355.
26. Arriaga, A.M.; Feitosa, E.M.; Lemos, T.L.; Santiago, G.M.; Lima, J.Q.; de Oliveira, M.C.; Vasconcelos, J.N.; Rodrigues, F.E.; Gomes, T.B.; Braz-Filho, R. Chemical constituents and insecticidal activity of *Rollina leptopetala*. *Nat. Prod. Commun.* **2008**, *3*, 1565–1688.
27. Costa, E.V.; Assis, M.F.; Lucia, B.M.P.; Broga, R.M.; Delarmelina, C.; Duarte, T.C.M.; Ruiz, T.G.L.A.; Carvalho, J.E.; Maia, B.H. Chemical constituents isolated from the bark of *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) and their antiproliferative and antimicrobial activities. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, S1–S15.
28. Sampath, M. Isolation and identification of gallic acid from *Polyalthia longifolia* (Sonn.) Thawaites. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* **2013**, *4*, 966–972.
29. Dinesh, K.Y.; Neetu, S.; Shaima, R.; Mahendra, S.; Gautam, P.; Rakesh, M. Anti-ulcer constituents of *Annona squamosa* twigs. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 666–675.
30. Nwaka, S.; Ramirez, B.; Reto, B.; Maes, L.; Douglas, F.; Ridley, R. Advancing drug innovation for neglected diseases. Criteria for lead progression. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3*, e440.
31. Weniger, B.; Robledo, S.; Arango, G.J.; Deharo, E.; Aragon, R.; Munoz, V.; Callapa, J.; Lobstein, A.; Anton, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *78*, 193–200.
32. Graziöse, R.; Rathinasabapathy, T.; Lategan, C.; Poulev, A.; Smith, P.J.; Grace, M.; Lila, M.A.; Raskin, I. Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera* L. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *133*, 26–30.
33. Ndjonka, D.; Bärbel, B.; Agyare, C.; Zimbres, F.M.; Lüersen, K.; Hensel, A.; Carsten, W.; Liebau, E. *In vitro* activity of extracts and isolated polyphenols from West African medicinal plants against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.* **2012**, *111*, 827–834.
34. Zofou, D.; Tematio, E.L.; Ntie-Kang, F.; Tene, M.; Ngemenya, M.N.; Tane, P.; Titanji, V.P.K. New Antimalarial Hits from *Dacryodes edulis* (Burseraceae)—Part I: Isolation, *In Vitro* Activity, *In Silico* “drug-likeness” and Pharmacokinetic Profiles. *PLoS One* **2013**, *8*, e79544.
35. De Lima, J.P.S.; Pinheiro, M.L.B.; Santos, A.M.G.; Pereira, J.L.S.; Santos, D.M.F.; Barison, A.; Silva-Jardim, I.; Costa, E.V. *In Vitro* Atileishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Rev. Virtual Quim.* **2012**, *4*, 692–702.

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

## Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

## Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon

Nolé Tsabang<sup>a</sup>, Patrick Valère Tsouh Fokou<sup>b</sup>, Lauve Rachel Yamthe Tchokouaha<sup>b</sup>, Béatrice Noguem<sup>a</sup>, Issakou Bakarnga-Via<sup>b</sup>, Mireille Sylviane Dongmo Nguépi<sup>b</sup>, Bernard Aloys Nkongmeneck<sup>c</sup>, Fabrice Fekam Boyom<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies (IMPM), Yaoundé, Cameroon

<sup>b</sup> Laboratory of Phytochemistry and Medicinal Plants Studies, Department of Biochemistry, University of Yaoundé I, P.O. Box 812 Yaoundé, Cameroon

<sup>c</sup> Department of Plant Biology and Physiology, University of Yaoundé I, P.O. Box 812 Yaoundé, Cameroon

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 1 June 2011

Received in revised form 26 October 2011

Accepted 28 October 2011

Available online 4 November 2011

## Keywords:

Antimalarial

Annonaceae

Ethnopharmacological survey

Ethnopharmacological preparation

Cameroon

Traditional medicine

## ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** Malaria endemic countries have vital resources that are medicinal plants on which their traditional medicines depend. In some Cameroonian settings, in addition to the commonly used potions from plants like *Alstonia boonei*, *Zanthoxylum macrophylla* and *Mangifera indica*, other herbal species are being increasingly used to treat malaria. So, specialized traditional healers have developed alternative reasonably priced therapies, relying on the signs and/or symptoms of malaria. Within this framework, Annonaceae plants were found to be increasingly utilized and therefore, highlighting the need to document this traditional knowledge for better malaria control.

**Materials and methods:** Interview approach was used to document indigenous knowledge, usage customs and practices of Annonaceae species in the treatment of malaria in four Cameroonian areas (Yaoundé and its surroundings, Ngoyang, Kon-Yambetta and Mbalmayo).

**Results:** A total of 19/30 users of plants accepted to share their experiences during a semi-structured survey. Twelve of the respondents were men and seven were women. Thirty recipes based on twenty-one plants were recorded.

**Conclusion:** *Annickia chlorantha* was the only plant commonly found in the four study sites. Seven species of Annonaceae were found to be used to treat malaria, while 14 were used to treat symptoms that might be related to malaria.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Malaria is the major pathology in the tropics. So despite the benefits of modern medicine, malaria remains a serious public health problem for one of the main reasons: anti-malarial drugs are generally expensive for people in endemic countries, in addition to drug resistant *Plasmodium falciparum*, which extends even to the latest drugs (Dondorp et al., 2009).

Overall, 3 billion people are at risk of malaria infection in 109 countries and territories, with infections causing disease in 300–500 million people and killing about 1 million people annually (Hay et al., 2010). Pregnant women and children less than five years are at the greatest risk of serious morbidity.

This disease is a major obstruction to socioeconomic development in endemic countries especially in Sub-Saharan Africa. It

constitutes about 10% of Africa's total disease burden; 40% of its health expenditure and 30–50% of inpatient cases (World Malaria Report, 2010). Consequently, thousands of people continue to die from malaria each year and people living in endemic areas are all at risk.

Cameroon is amongst the top 18 countries where 90% of recorded deaths due to malaria occur (World Malaria Report, 2010). In daily practice, the huge majority of the Cameroonian people recognizes and utilizes the properties of several plants to combat malaria and other diseases (Tsabang, 2008). Amongst these, current trends indicate that the Annonaceae are increasingly used and have been proved to be promising source of antimalarial agents (Boyom et al., 2003, 2009, 2011a,b; Boyom, 2004).

The aim of the present study was to collect and document information on the traditional use of medicinal plants for the treatment of malaria by Bakola pygmies, Yambetta and cosmopolitan populations of Yaoundé and Mbalmayo in Cameroon. The outcome of interactions with information providers indicated Annonaceae as a promising plant family. Therefore, we have decided to report on this family. Specifically, the study sought to document the species

\* Corresponding author at: Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812 Yaoundé, Cameroon. Tel.: +237 7727 6585.

E-mail address: [ffefe@yahoo.com](mailto:ffefe@yahoo.com) (F.F. Boyom).



Fig. 1. Study sites.

of Annonaceae used, methods of preparation and administration of the herbal remedies by the traditional herbal practitioners to treat malaria. It is hoped that the results of this study will provide the basis for further pharmacological studies that are critical for the development of alternative antimalarial drugs.

## 2. Methodology

### 2.1. Sites of study and justification

In the framework of this study, four sites were chosen in the centre and South regions of Cameroon (Fig. 1): Yaoundé and its surroundings, Kon-Yambetta, Mbalmayo (Centre region) and Ngoyang (South). The following reasons have motivated the choice of these areas.

Yaoundé area and its surroundings (1): This is an area of semi-deciduous forest strongly degraded by the population burden. It is a cosmopolitan site where people from various areas and cultures cohabit. Environmental degradation and mismanagement foster the development of malaria vectors (mosquitoes), thereby fostering the level of parasite transmission. Due to the high level of malaria transmission in this area, practicing herbal medicine is a valid source of income.

Ngoyang area (2): Ngoyang is situated at around 15 km from Lolodorf on the Eséka-Lolodorf highway. Bakola pygmies who

reputedly rely on herbal medications live in this area. The vegetation consists mainly of evergreen littoral humid rain forest with *Lophira alata*.

Kon-Yambetta area (3): This site is situated at around 150 km (northwest) from Yaoundé. This area has Guinea savannah-type flora and is inhabited by yambetta, and bamoun people to a lesser extent, who principally rely on herbs to treat their ailments.

Mbalmayo area (4): Mbalmayo is located at around 55 km (southern) from Yaoundé, and is the entering gate to the South region. It is a cosmopolitan area. In addition, the National School of Water and Forestry is in Mbalmayo, and has favoured the preservation of a forest where we conducted the survey.

The survey was preliminarily based on the selection of herbal practitioners for their ability to treat malaria and/or related symptoms using herbs. Subsequently, the identification of antimalarial plants with associated recipes was achieved through face-to-face interaction with practitioners.

### 2.2. Identification of herbal practitioners and selection to the survey

Patients identified through a brief information survey and villages' heads were interviewed to select herbal practitioners who treat malaria successfully within their communities and to include them in the study.

In the four study sites, authorization to investigate within their community was sought from administrative authorities and/or village chiefs. They contributed in the identification of the most efficacious healers in treating malaria. To this end, small gatherings of people around the heads were organized during which the study purpose and potential benefits for the community were explained and herbal practitioners selected to the survey. All the participants to this survey have signed a memorandum of understanding to answer questions related to herbal practitioners and use of plants to treat malaria.

### 2.3. Identification of antimalarial Annonaceae plants

Subsequent interaction with the herbal practitioners included interviews and field collection of some samples. Healers were asked to provide information on herbs they use to treat malaria, emphasizing on plant parts used, modes of preparation and administration, and other plants or ingredients used in association. Specimens of plants identified through literature survey were also presented to herbal practitioners and their uses to treat malaria sought. When no specimen was available, vernacular and/or common names of plants were used. Further questions were asked on the use of plants to treat malaria-like symptoms. In the Water and Forestry School Mbalmayo, the survey was conducted with the head of the arboretum and forest schedule. Upon completion of the survey in each site, the ethnobotanist has signed the visitors' book in which he mentioned the subject of the visit.

This survey was conducted in strict respect of the Cameroonian current regulations of biodiversity protection and rural population's customary rights. During face-to-face interactions, the purpose and the procedure of the survey, as well as the expected benefits and rights were explained to villages' heads. The traditional herbal practitioners willing to collaborate on the study (or their interpreters) had signed the memorandum of understanding before further interactions. Interviews were conducted by Dr. Nole Tsabang, an ethnobotanist at the Institute for Medical Research and Medicinal Plants Study, Yaoundé, Cameroon, following a questionnaire purposely prepared. Interpreters were contracted when healers could not communicate in English or French. Voucher specimens of each plant were dried and deposited at the Cameroon National Herbarium and the Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies, Yaoundé.

Plants were collected with the aid of informants and identified first on the field of collection. This determination was later confirmed at the National Herbarium of Cameroon, Yaoundé. One ethnobotanical data sheet was completed for each recipe.

Plants that are used to treat malaria (diagnosed through simultaneous observation of fevers, headaches, chills, joint pains, and sweating) or at least two of these symptoms were searched. The approach adopted in this survey was previously used by Tsabang et al. in identifying Cameroonian plants with antidiabetic and antihypertensive properties (Tsabang et al., 2001, 2005; Tsabang, 2008).

## 3. Results

### 3.1. Repartition of informants

During the ethnopharmacological investigation we met 19/30 users of plants who agreed to work with us by providing information on plants that are used to treat malaria. Seven of them were traditional healers (Table 1). Inclusion of informants in this study depended on the signature of the MoU. Those who refused to sign the MoU were firstly, claiming that scientists were trying to

steal their knowledge, and therefore could not cooperate; secondly, others rejected the offer claiming the allowance unsubstantial.

### 3.2. Knowledge about malaria

Malaria is known respectively in Ewondo and Bamileke tribes as "Titmeki" and "Nnect". Herbal practitioners who were interviewed identified malaria based on signs and symptoms that included fevers (100%), headaches (100%), chills (100%), joint pains (100%), sweating (90%), vomiting (55%), bitter taste in the mouth (50%), loss of appetite (45%) and spleen pains in children (40%) that are diagnosed by examinations of patients with upper left sided abdominal pain. The mode of transmission of the disease was well known and indicated as being via the bites of mosquitoes. Thus the people in the study areas had very good knowledge about how to identify malaria.

### 3.3. Botanical characteristics of Annonaceae plants

A total of 21 Annonaceae species belonging to 12 genera were reported being used in the preparation of herbal remedies against malaria and its symptoms in the four study sites. Of all the plants, 16/21 represented trees and 5/21 were shrubs; no herbaceous plants and no grasses were reported. Only 2 of the reported species were cultivated and 19 were wild. This indicates that the majority of plants being used in the study areas to treat malaria don't have some form of protection through cultivation (Table 2).

From Table 2, 11 species of Annonaceae plants were identified in Ngoyang (all wild), 10 in Mbalmayo (with 1 cultivated), 9 in Kon-Yambetta (with 2 cultivated), and 3 in Yaoundé and surroundings with 2 cultivated. *Annickia chlorantha* was identified in all the four sites. Ngoyang evergreen forest is undisturbed, and contains the majority of Annonaceae plants that have been identified. Indeed pygmies preserve more vegetation than the Bantu. The Arboretum of the Water and Forestry School of Mbalmayo is disturbed from high human pressure, though it still contains valuable plants species.

### 3.4. Place and frequency of collection of Annonaceae species

The majority (16/21) of the Annonaceae species used were collected in the forests (Atlantic evergreen rain forest and semi-deciduous rain forest), in home gardens (2/21), in cacao agroforests (1/21), and in savannah (1/21).

### 3.5. Ethnopharmacological recipes from plants studied

The ethnopharmacological characteristics of plants, parts used for the preparation of recipes, methods of preparation and administration are reported in Table 3.

From Table 3, 30 herbal recipes were identified to treat malaria and related symptoms in the four study sites. Two of these recipes were polyspecific.

The most used pharmaceutical form of recipe was decoction (74%). Only Pygmies were found to practice a form of sampling (scraping). The oral route of administration (97%) was found to be the most used. The stem bark was the most regularly used plant part (63%).

### 3.6. Routes of administration and dosage prescription of herbal remedies: description of recipes

94% of the herbal remedies used in the study areas were administered orally. Dosage prescriptions were adapted accordingly with age, where approximately a glassful (equivalent to 250 ml) or half a glassful (125 ml) were respectively prescribed three times daily

**Table 1**  
Distribution of informants.

Site	Traditional healers and other users	Sex (%)		Age range
		Men	Women	
Ngoyang	6	6 (100%)	0 (0%)	30–60
Yaoundé and surroundings	4	1 (25%)	3 (75%)	40–65
Kon-Yambetta	4	3 (75%)	1 (25%)	40–65
Mbalmayo	5	2 (40%)	3 (60%)	40–54
Total	19	12 (63.16%)	7 (36.84%)	30–65

for adults and children. The treatments were supposed to be 3–10 days or continued until recovery.

The results obtained revealed two types of recipes: recipes reported to treat malaria and recipes treating one or two individual symptoms which can be caused by malaria. All these recipes are presented in Table 3.

### 3.6.1. Recipes reported to treat malaria

These recipes were clearly indicated by herbal practitioners as used to tackle malaria. Malaria was diagnosed via simultaneous observation of the more relevant clinical symptoms that are fevers, headaches, chills, joint pains, and sweating. Indeed, in much of malaria endemic Africa, these signs are closely related to malaria. The plants used for the preparation of recipes reported to treat malaria were *Annickia chlorantha*, *Annona muricata*, *Annona senegalensis*, *Annona squamosa*, *Polyalthia suaveolens*, *Uvaria* sp. and *Polyceratocarpus* sp. The description of these recipes is given in Table 3.

### 3.6.2. Recipes suspected to have antimalarial properties

These recipes were described as those used to treat individual symptoms that might be due to malaria. In this category, healers treat individual symptoms, which may or may not be caused by malaria. We therefore labeled them as recipes with possible antimalarial properties. These recipes are based on *Anonidium mannii*, *Duguetia staudtii* syn. *Pachypodanthium mannii*, *Isolona hexaloba*, *Cleistopholis glauca*, *Cleistopholis patens*, *Cleistopholis staudtii*, *Hexalobus crispiflorus*, *Monodora brevipes*, *Monodora myristica*, *Monodora tenuifolia*, *Xylopi aethiopica*, *Xylopi hypolampra*, *Xylopi parviflora* and *Xylopi staudtii*.

**Table 2**  
Distribution of identified Annonaceae plants.

Annonaceae species	Locality				Nature of plant	Place of collection
	Ydé & surr.	Ngo.	Kon-Y.	Mbal.		
1. <i>Annickia chlorantha</i> (Oliv.) Setten & Maas	1	1	1	1	Tree	Forest
2. <i>Annona muricata</i> Linn.	1	0	1	1	Shrub	Cultivated
3. <i>Annona senegalensis</i> Pers.	0	0	1	0	Shrub	Savannah
4. <i>Annona squamosa</i> Linn.	1	0	1	0	Shrub	Cultivated
5. <i>Anonidium mannii</i> (Oliv.) Engl. & Diels	0	1	0	1	Tree	Forest
6. <i>Cleistopholis glauca</i> Pierre ex Engl. & Diels	0	1	1	0	Tree	Forest
7. <i>Cleistopholis patens</i> (Benth.) Engler & Diels	0	1	0	0	Tree	Forest
8. <i>Cleistopholis staudtii</i> Engler & Diels	0	1	1	0	Tree	Forest
9. <i>Duguetia staudtii</i> (Engl. & Diels) Chatrou	0	1	0	1	Tree	Forest
10. <i>Hexalobus crispiflorus</i> A. Rich.	0	1	0	0	Tree	Forest
11. <i>Isolona hexaloba</i> (Pierre) Engler & Diels	0	1	0	0	Tree	Forest
12. <i>Monodora brevipes</i> Benth.	0	1	0	0	Tree	Forest
13. <i>Monodora myristica</i> (Gaertn.) Dunal.)	0	0	1	0	Tree	Agroforest
14. <i>Monodora tenuifolia</i> Benth.	0	0	0	1	Tree	Forest
15. <i>Polyalthia suaveolens</i> Engl. & Diels.	0	1	0	1	Tree	Forest
16. <i>Uvaria</i> sp.	0	0	1	0	Shrub	Forest
17. <i>Polyceratocarpus</i> sp.	0	0	1	0	Shrub	Forest
18. <i>Xylopi aethiopica</i> (Dunal) A. Rich	0	0	0	1	Tree	Forest
19. <i>Xylopi hypolampra</i> Mildbr. & Diels	0	1	0	1	Tree	Forest
20. <i>Xylopi parviflora</i> (A. Rich.) Benth.	0	0	0	1	Tree	Forest
21. <i>Xylopi staudtii</i> Engl. & Diels	0	0	0	1	Tree	Arboretum

Ydé & surr. = Yaoundé and its surroundings; Ngo. = Ngoyang; Kon-Y. = Kon-Yambetta; Mbal. = Mbalmayo; 1 = species recorded in the site; 0 = unrecorded species in the site.

## 4. Discussion

The present survey has provided information about 21 species of Annonaceae plants used in the treatment of malaria in four areas of Cameroon. Malaria is a serious health issue in these four areas and *Annickia chlorantha* was found to be the main plant used all across the four sites. The two polyspecific recipes based on this species were said to show more potency. In fact they consisted of several plants, indicating that at least one of these plants contains compounds with potent antimalarial activity. The efficiency of this species underlies its potential as source of antimalarial agents, and should be subjected to further scientific investigations (Heinrich et al., 2009).

The Annonaceae plants described in this study were mostly collected in forests whereas in Ghana, the majority of the plants used against malaria are collected from neighborhood of habitations and in forest reserve areas (Asase et al., 2005). In Msambweni and Kwale Districts in Kenya, plants were collected from community lands (Muthaura et al., 2007; Nguta et al., 2010). Whether plants are collected near homesteads, in forest reserves or elsewhere in the bush, it is important to develop strategies to ensure their sustainable use and conservation. Of note, the bark of *Annickia chlorantha* is sold in local, regional and national markets. Therefore, accurate information is hardly available on the time of the year and/or day as well as place of plant collection. Plant parts should therefore be harvested when needed using simple tools such as knives or machetes without rending the bark. Axes and saws are not recommended for this practice. In the Bakola pygmies area, only the required amount of plant materials was usually collected for treatment and therefore the probability of overharvesting plant materials was insignificant in that group. From studies in Ethiopia, it is shown that harvesting

**Table 3**  
Methods of preparation and administration of herbal recipes.

Species, common name, vernacular name and (dialect)	Parts used and recipes	Methods of preparation	Route of administration	Posology and duration of treatment	Frequency	Major symptoms and other diseases treated
Recipes reported to treat malaria						
1. <i>Annickia chlorantha</i> (Oliv.); yellow Moambe; MPOL (Pygmies Bakola)	1. Stem bark	Decoction of 500 g of stem bark removed by scraping with a machete in 3 l of water for 20 min	Orally	Take 250 ml decoction 3 times daily for 15 days	3	Aches, wounds, boils, vomiting yellow bitter, fever, chills, sore spleen in children, and hepatitis
	a2. Stem bark + other plants	Decoction of a mixture of 300 g of stem bark of each of these plants: <i>Annickia chlorantha</i> , <i>Rauvolfia vomitoria</i> , <i>Fagara macrophylla</i> in 4 l of water for 20 min	Orally	Take 250 ml of decoction 3 times a day for 10 days	1	
		Decoction of a mixture of 300 g of stem bark of each of these plants: <i>Annickia chlorantha</i> , <i>Rauvolfia vomitoria</i> , <i>Fagara macrophylla</i> and <i>Nauclea latifolia</i> in 4 l of water for 20 min	Orally	Take 250 ml of decoction 3 times a day for 10 days	1	
2. <i>Ammona muricata</i> Linn.; Soursoop (English); Sabasaba (Yambetta)	3. Leaves	Decoction of a handful of leaves in 3 l of water for 20 min	Orally	Take 250 ml of decoction once a day for 7 days	1	Aches, backpains
3. <i>Ammona senegalensis</i> Pers.; Wild soursoop (English); Kedahan (Yambetta)	4. Stem bark	Decoction of 500 g of roots stem bark in 3 l of water for 20 min	Orally	Drink 250 ml of a decoction once a day for 15 days	1	Vomiting, muscle aches, tiredness, jaundice, fever, convulsions, respiratory infections, snake bites
	a5. Young leafy stems	Decoction of 100 g of young leaves of <i>Ammona senegalensis</i> , with 100 g young leaves of <i>Piptostigma thoningii</i> , 100 g of leaves of <i>Senna alata</i> , 100 g of <i>Chrysanthellum americana</i> , 100 g of <i>Lippia multiflora</i> , 300 g of <i>Terminalia glaucescens</i> , 300 g root stem of <i>Nauclea latifolia</i> , 100 g of <i>Ocimum gratissimum</i> in 5 l of water. Reduce by boiling the decoction to 3 l. The roots of <i>Nauclea latifolia</i> should be harvested at sunrise or sunset	Orally	Drink one glass (250 ml) morning and evening	1	
4. <i>Ammona squamosa</i> Linn.; Sugar apple (English); Kedahan (Yambetta)	6. Leaves	Decoction of 150 g of leaves in 3 l of water for 20 min	Orally	Drink 250 ml of decoction 2 times daily for 10 days	1	Vomiting, muscle aches, tiredness, abscesses, fever, convulsions, digestive disorders and skin diseases
5. <i>Polyalthia suaveolens</i> Engl. & Diels; Otungui; Ntounga (Pygmies Bakola)	7. Stem bark	Decoction of 500 g of stem bark removed by scraping with a machete in 3 l of water for 20 min	Orally	Drink 250 ml of decoction 3 times daily for 15 days	1	Fever, jaundice, epilepsy, joint pains, headache
	8. Fruits	Decoction of one serrated fruit in 2 l of water for 15 min	Orally	Drink 250 ml of decoction 3 times daily for 7 days	1	
	9. Stem bark	Decoction of 500 g of stem bark collected from scraping with machete in 3 l of water, evaporating the water to 1/2	Orally	Drink 250 ml of decoction 3 times a day	1	Typhoid and yellow fever, headache, epilepsy

Table 3 (Continued)

Species, common name, vernacular name and (dialect)	Parts used and recipes	Methods of preparation	Route of administration	Posology and duration of treatment	Frequency	Major symptoms and other diseases treated
7. <i>Polyacratocarpus</i> sp.; Nsonaback (Yambetta)	10. Stem bark	Decoction of 500 g of stem bark collected from scraping with machete in 3 l of water, evaporating the water to 1/2	Orally	Drink 250 ml of decoction 3 times a day	1	Typhoid and yellow fever, headache, epilepsy
Recipes used to treat at least two symptoms which may be caused by malaria						
8. <i>Anonidium mannii</i> Gaertn (D. Oliver) Engl.& Diels; Ebome; Npole Wapo'o (Pygmies Bakola), Ebome Afan (Ewondo and Bulu)	11. Stem bark	Decoction of 500 g of stem bark from scraping with machete in 3 l of water, evaporating the decoction to 2/3	Orally	Drink 250 ml of decoction 3 times a day for 10 days	3	Childhood illness (diaper rash, measles, diarrhea, enlarged spleen), fever, amoeba (STD, candidiasis, gonorrhoea, etc.), promotion of breast-milk production
9. <i>Cleistopholis glauca</i> Pierre ex Engl.& Diels; Sobu; Wombo (Pygmies Bakola), Avom (Ewondo and Bulu)	12. Stem bark	Decoction of 500 g of stem bark obtained from scraping with machete in 2 l of water for 24 h, or 100 g of leaves in 3 l of water for 20 min	Vaginally	Use the decoction to the personal hygiene	1	
10. <i>Cleistopholis patens</i> (Benth.) Engl.& Diels; Salt-and-oil tree (English); Wombo (Pygmies Bakola), Avom (Ewondo and Bulu)	13. Stem bark	Decoction of 500 g of stem bark obtained from scraping with machete in 2 l of water for 24 h, or 100 g of leaves in 3 l of water for 20 min	Orally	Drink 250 ml of decoction once a day for 7 days	3	Fever, muscle ache, arthritis, wounds, boils
11. <i>Cleistopholis staudtii</i> (Engl.& Diels) Engl.& Diels; Sobu; Wombo (Pygmies Bakola), Avom (Ewondo and Bulu)	14. Stem bark	Decoction of 500 g of stem bark obtained from scraping with machete in 2 l of water for 24 h, or 100 g of leaves in 3 l of water for 20 min	Orally	Drink 250 ml of decoction once a day for 7 days	3	Fever, muscle ache, arthritis, wounds, boils
12. <i>Diguettia staudtii</i> (Engl.& Diels) Chatrou syn. <i>Pachypodanthium mannii</i> ; Ntom; Ntoma (Pygmies Bakola), Ntom (Ewondo and Bulu)	15. Stem bark	Maceration of 500 g of stem bark in 3 l of water under sunlight for 6 h	Orally	Drink 250 ml every 12 h for 3 days	1	Vomiting, asthenia, arthritis, headache, cough, stiffness, skinache
13. <i>Hexalobus crispiflorus</i> A. Rich; Owe; Lefondja (Pygmies Bakola), Avom (Ewondo and Bulu)	16. Stem bark	Decoction of 500 g of stem bark obtained from scraping with machete, or 100 g of leaves in 3 l of water for 20 min	Head bath	Drink 250 ml of decoction twice a day for 15 days	3	
14. <i>Isolona hexaloba</i> Pierre (Engl. & Diels); Nding; Lesondje (Pygmies Bakola), Nding or Nom Ntom (Ewondo)	17. Stem bark	Infusion of 500 g of stem bark obtained from scraping with machete in 2 l of water for 24 h	Orally	Drink 250 ml of infusion once every 2 days during 2 consecutive weeks	1	Convulsion, fever, muscle ache and arthritis, wounds, boils
						Wounds, boils, fever

Table 3 (Continued)

Species, common name, vernacular name and (dialect)	Parts used and recipes	Methods of preparation	Route of administration	Posology and duration of treatment	Frequency	Major symptoms and other diseases treated
15. <i>Monodora brevipes</i> Benth.; yellow-flowered; Pio (Pygmies Bakola), Nom Akwi grandes feuilles (Ewondo)	18. Stem bark	Decoction of one tea spoonful of stem bark and or the same amount of stem bark powder in 250 ml of water	Orally	Drink 250 ml of decoction twice a day for 10 days	2	Fever, cough
	19. Fruits (powder)	Infusion of one tea spoonful of ground dry seeds powder in 250 ml of water	Orally	Drink 250 ml of infusion twice a day for 10 days	2	
16. <i>Monodora myristica</i> (Gaertn.) Dunal; Calabash nutmeg; Bongo (Yambetta), Akwi (Ewondo)	20. Stem bark	Decoction of 1000 g of stem bark in 4 l of water for 20 min	Orally	Take a purge every 2 days	1	Sore groin in women, joint pains, headache
	21. Fruits (powder)	Infusion of 1000 g of seed powder in 4 l of water	Orally	Take a purge every two days	1	
17. <i>Monodora tenuifolia</i> Benth.; <i>Monodora</i> with thin leaves; Ebome osso (Ewondo)	22. Stem bark	Decoction of 500 g of stem bark powder in 3 l of water for 20 min	Orally	Drink 250 ml of decoction 3 times a day for 7 days	1	Joint and muscle pain, headache and promotion of breast milk production
	23. Fruits (powder)	Infusion of 500 g of dry seed powder in 3 l of water	Orally	Drink 250 ml of infusion 3 times a day for 7 days	1	
18. <i>Xylophia aethiopica</i> (Dunal) A. Rich; Ethiopian pepper; Akwi (Ewondo)	24. Stem bark	Decoction of one teaspoon of crushed dried stem bark in 1 l of water	Orally	Drink 250 ml 2 times daily for 7 days	1	Fruits are used against aches, fever and as spice
	25. Fruits	Maceration of one teaspoon of crushed dried fruits in 1 l of water	Orally	Drink 250 ml 2 times daily for 7 days	1	
19. <i>Xylophia hypolampyra</i> Mildbr. & Diels; Sedhiou pepper; Nkanla (Pygmies Bakola), Nom Akwi (Ewondo)	26. Stem bark	Decoction of one teaspoon of crushed dried stem bark in 500 ml of water	Orally	Drink 250 ml of the resulting sauce 2 times daily for 15 days	1	Fever, chills
	27. Fruits	Maceration of one teaspoon of crushed dried fruits in 500 ml of water	Orally	Drink 250 ml of the resulting sauce 2 times daily for 15 days	1	
20. <i>Xylophia parviflora</i> (A. Rich) Benth.; Ashako; Odjobi (Ewondo)	28. Stem bark	Decoction of 1000 g of stem bark in 3 l of water for 20 min	Orally	Drink 250 ml of decoction 3 times daily for 7 days	1	Sore groin in women, abscesses, lung infections, body aches, headache, fever
	29. Fruits (powder)	Infusion of one teaspoon of crushed dried fruits in 250 ml of water	Orally	Take 2 times daily for 10 days	1	
21. <i>Xylophia standtii</i> Engl. & Diels; Odjwe; Nkanla (Pygmies Bakola), Nom Akwi (Ewondo)	30. Fruits	Maceration of one teaspoon of crushed dried fruits in 500 ml water	Orally	Drink 250 ml of the mixture 2 times daily for 15 days	2	Fever, chills
Total: 21 plants	30 Recipes	31 modes of preparation	32 routes of administration			

<sup>a</sup> Polyspecific recipes.

time can be an important issue and some plants only exhibit their full therapeutic effect if they are collected early in the morning or during a certain season (Abebe, 1984). Also, according to Prance (1994), the potency of vegetal remedies could differ according to the method of extraction, place and time of harvesting plant materials as well as other environmental factors like soil, climate, use of chemical fertilizers, altitude, etc.

This indicates that the potency of antimalarial Annonaceae remedies used in the study areas could greatly vary depending on the time and place where the plant materials were harvested for use. This was confirmed by a study of time factor by Tsabang in the Phytotherapy of diabetes and/or hypertension (unpublished results).

The majority of the herbal preparations identified in this study involved decoction and oral administration. Accordingly, in a similar study in the Far-North region of Cameroon, the pharmaceutical form and route of administration were found to be the same (Soatoing et al., 2011).

The fact that stem bark represented 63% of the parts used may be related to its availability and accessibility to people, and to its high content of antimalarial agents. In the contrary, fresh leaves were found to be the most commonly plant part used in herbal remedies for the treatment of malaria in the Wechiau Community Hippopotamus Sanctuary in Ghana (Asase et al., 2005) and the Msambweni District in Kenya (Nguta et al., 2010). Overall, plant parts were similarly used in fresh state in all these studies.

The problems associated with dosage prescription in the use of herbal remedies for the treatment of malaria have been highlighted by a number of authors (Asase et al., 2005; Muthaura et al., 2007; Tabuti, 2008; Nguta et al., 2010). The interviewees reported that their herbal remedies had no side effects but this was anticipated as most traditional healers do not, broadly speaking, know of the specific side effects of their herbal remedies. Similar observations have been made in the Budiope County in Uganda (Tabuti, 2008), some districts in Tanzania (Gessler et al., 1995) and the Dangme West District of Ghana (Asase et al., 2010).

To elaborate some medicinal preparations, a mixture of different plants was used in some few cases. A similar approach was described for antimalarial preparations in Cuba (Hernandez and Volpato, 2004), Trinidad (Clement et al., 2005) and Dominican Republic (Vandebroek et al., 2010) where the inhabitants also use mixture of plants, purposely to increase the bioactivity.

Literature sources in Cameroon and Africa show that *Anonidium mannii*, *Annickia chlorantha* and *Duguetia staudtii* are used for the treatment of malaria by Bulu of Western Dja Reserve (Betti, 2006), pygmies Baka and Badjoue of East region (Tsabang Nole, personal communication) and the ethnic groups (Ejegham, Bulu, Oroko) in Korup (Duncan et al., 1989). Another recent study has revealed that many of the species of the Annonaceae growing in the Mount Cameroon region are of significant ethnobotanical importance (Focho et al., 2010). According to these authors, many species described in this work (*Annickia chlorantha*, *Annona senegalensis*, *Monodora myristica*, *Monodora tenuifolia*, *Uvaria* sp., *Xylopia staudtii*, *Polyacanthus* sp.) are used to treat many symptoms that might be related to malaria, including fevers, vomiting, fatigue, joint pains, headache, and stomach ache. But no direct indication was made concerning their use against malaria.

In the Democratic Republic of Congo, some Annonaceae plants described in this study are used to treat malaria or associated symptoms. These plants are: *Annickia chlorantha*, *Polyalthia suaveolens*, *Monodora myristica* and *Duguetia staudtii* (Bouquet, 1969; Adjanohoun et al., 1996). Overall, *Anonidium mannii*, *Annickia chlorantha*, *Duguetia staudtii*, *Polyalthia suaveolens*, and *Monodora myristica* investigated in this work were found to be used to treat malaria in other parts of Africa.

Furthermore, complementary information was documented through this investigation on the ethnopharmacological use of Annonaceae plants to treat malaria and/or symptoms in Cameroon, including but not limited to *Annona muricata*, *Annona senegalensis*, *Annona squamosa*, *Annonidium mannii*, *Hexalobus crispiflorus*, *Isolona hexaloba*, *Monodora myristica*, *Monodora brevipes*, *Monodora tenuifolia*, *Polyacanthus* sp., *Xylopia aethiopica*, *Xylopia hypolampra*, *Xylopia parviflora*, *Xylopia staudtii*, *Uvaria* sp. Meanwhile, some of these species are reported to be traditionally used elsewhere to treat malaria, including *Annona muricata* (Di Stasi et al., 1994; Leaman et al., 1995; Coe and Anderson, 1996; Pinto et al., 2005), *Annona senegalensis* (Chhabra et al., 1987; Bugmann, 2000), *Annona squamosa* (Comerford, 1996), *Xylopia aethiopica* (Mulangu Binzambal, 1999).

Laboratory studies have previously reported the antiplasmodial activity of extracts from many of these plants growing in Cameroon. Amongst the extracts with activity, many were volatile extracts from *Cleistopholis patens* (Boyom et al., 2011b), *Xylopia aethiopica*, *Hexalobus crispiflorus*, (Boyom et al., 2003), *Xylopia staudtii*, *Xylopia aethiopica*, *Xylopia parviflora*, *Monodora brevipes*, *Monodora myristica*, *Polyalthia suaveolens*, *Annickia chlorantha*, *Annona senegalensis* (Boyom, 2004). Non-volatile extracts from *Annickia chlorantha*, *Annona muricata*, *Anonidium mannii*, *Monodora myristica*, *Polyalthia suaveolens*, *Uvaria banmanni*, *Xylopia aethiopica*, and *Xylopia parviflora* also showed potency against *Plasmodium falciparum* in vitro (Boyom et al., 2009, 2011a). Some of these Annonaceae species from different origins were also investigated for antimalarial activity, including *Annona muricata* (Leaman et al., 1995; Bidla et al., 2004), *Annona squamosa* (Bagavan et al., 2011; Johns et al., 2011), *Xylopia* sp. (Jenett-Siems et al., 1999; Akam et al., 2005). Thus, ethnobotanical and pharmacological data support the relevance of Annonaceae plants as a promising source of potent antimalarial agents. Further detailed studies are therefore required to determine the phytochemical and pharmacological properties of these plants. These studies if promising will be the starting point of further development of alternative drugs that will help tackle the developing resistance of *Plasmodium falciparum* to currently used Artemisinin-based Combination Therapies (ACTs) (Dondorp et al., 2009).

Moreover, in the framework of the improvement and promotion of the local traditional knowledge in using herbs against malaria, the pharmacological, phytochemical and toxicological profile of the herbal remedies used need to be investigated in order to ensure the effective treatment for malaria as well as the safety of people.

Overall, this survey underlines that seven of the identified species of Annonaceae were effectively used to treat malaria, while 14 were used to treat symptoms that might be related to malaria. In most of the tropical malaria-endemic countries, the symptoms described are mostly associated with malaria. Therefore, there is a realistic potential that these effective plants contain compounds with antimalarial potency.

## 5. Concluding remarks

The present study has revealed that people in the four study sites have a very good knowledge of using Annonaceae species to treat malaria. Herbal remedies commonly used for the treatment of malaria were affordable and easily accessible in their settings.

The plant harvesting technique used by Bakola pygmies that consisted to scrape superficially the stem bark of the tree downwards with a knife or machete was found to be apparently the best practice. Indeed, scraping gives more ability to the plant to quickly regenerate the bark that is one of the critical organs for plant survival.

Previous studies have allowed us to highlight some similarities in the use of certain anti-malaria plants species. Thus *Annickia*

*chlorantha* is the most sought Annonaceae plant identified in this study.

On another hand, a study on the characterization of Annonaceae using phylogeny techniques have shown that the species that has been called *Annickia chlorantha* for a long time, in fact represents two species. In this study *Annickia chlorantha* and *Annickia affinis* are distinguished as two different species, *Annickia chlorantha* being the rarer species (Couvreur et al., 2009). Thus, plants described in the four study sites as *Annickia chlorantha* most likely represent the two species.

This study has documented significant information on Annonaceae species that are used in the preparation of herbal remedies for the treatment of malaria and/or symptoms that might be related to malaria in the study sites. Over 5 of the species encountered in the study areas have been previously documented elsewhere in Africa for their use in the treatment of malaria. This highlights their wide range recognition in African traditional knowledge as credible sources of therapy against malaria. The pharmacological, phytochemical and toxicological properties of the herbal remedies used should be investigated in detail with respect to their origins and modes of preparation. Furthermore, information gathered from traditional knowledge on plant collection and extraction should subsequently guide the designing of laboratory procedures. This information will be also useful in the proper selection of active plants for cultivation and subsequent conservation in the study area.

The treatment of malaria symptoms was also highlighted in this study as an important approach for the identification of antimalarial plants. This documentation will contribute to the development of effective management strategies for malaria control, especially in Sub-Saharan Africa where the burden of the disease is very high.

## Acknowledgements

The successful completion of this study was a summary of contributions from the Bakola Pygmies, Yambetta, and Yaoundé people and healers, and the staff of the School for Water and Forests, Mbalmayo, Cameroon. The authors are very grateful for their hospitality during fieldwork and permission to publish the data. We are mostly grateful to Chief Nkoro of Pygmies Bakola community, Chief Youkoulouk of Bamoko community, Deputy sub-prefect of Kon-Yambetta, Badje Badje of Water and Forests School of Mbalmayo, and Jean Paul Ghogue of the National Herbarium of Cameroon.

This work was made possible by funding from the World Health Organization, through the Initiative for Research on Tropical Diseases and the Multilateral Initiative against Malaria (MIM/TDR) (A80689). Thanks to the anonymous reviewers for a critical review of this paper.

## References

- Abebe, W., 1984. Traditional pharmaceutical practice in Gondar region, Northwest Ethiopia. *Journal of Ethnopharmacology* 11, 33–47.
- Adjanohoun, J.E., Aboubakar, N., Dramane, K., Ebot, M.E., Ekper, J.A., Enoworock, E.G., Focho, D., Gbile, Z.O., Kamanyi, A., Kamsu, K.J., Keita, A., Mbenkum, T., Mbi, C.N., Mbiele, A.C., Mbome, J.C., Muberu, N.K., Nancy, W.L., Kongmeneck, B., Satabie, B., Sofowor, A., Tamze, V., Wirmum, C.K., 1996. Traditional medicine and pharmacopoeia: contribution to ethnobotanical and floristic studies in Cameroon. In: Organisation of African Unity (Ed.), Scientific Technical and Research Comity, Addis Ababa.
- Akam, T., Yong, J., Fanso-Free, S., 2005. Antiplasmodial agents from *Xylopia parviflora* seeds. *MIM Proceedings, Acta Tropica* 95 (Suppl. 1), 197–198.
- Asase, A., Akwetey, G.A., Achel, D.G., 2010. Ethnopharmacological use of herbal remedies for the treatment of malaria in the Dangme West District of Ghana. *Journal of Ethnopharmacology* 129, 367–376.
- Asase, A., Oteng, Y.A.A., Odamten, G.T., Simmonds, M.S.J., 2005. Ethnobotanical study of some Ghanaian antimalarial plants. *Journal of Ethnopharmacology* 99, 273–279.
- Bagavan, A., Rahuman, A.A., Kaushik, N.K., Sahal, D., 2011. In vitro antimalarial activity of medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Research* 108, 15–22.
- Betti, J.L., 2006. Usages populaires des plantes médicinales chez les Bulu à l'Ouest de la réserve du Dja Cameroun. *Revue Médicale de la Pharmacopée Africaine* 19, 93–106.
- Bidla, G., Titanji, V.P.K., Joko, B., Ghazali, G.E., Bolad, A., Berzins, K., 2004. Antiplasmodial activity of seven plants used in African folk medicine. *Indian Journal of Pharmacology* 36, 245–246.
- Bouquet, A., 1969. Féticheurs et Médecines Traditionnelles du Congo (Brazzaville). O.R.S.T.O.M., 250 pp.
- Boyom, F.F., Tsouh, F.P.V., Tchokouaha, Y.L.R., Ngoutane, M.A., Madiesse, K.E., Mbacham, F.W., Tsamo, E., Amvam, Z.P.H., Gut, J., Rosenthal, P.J., 2011a. Potent antiplasmodial extracts from Cameroonian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 134, 717–724.
- Boyom, F.F., Ngouana, V., Madiesse, K.E.A., Amvam, Z.P.H., Menut, C., Bessiere, J.M., Gut, J., Rosenthal, P.J., 2011b. Antiplasmodial volatile extracts from *Cleistopholis patens* Engl and Diels and *Uvariastrum pierreanum* Engl. (Engl. and Diels). *Parasitology Research* 108, 1211–1217.
- Boyom, F.F., Madiesse, K.E., Tepongning, R., Ngouana, V., Mbacham, W.F., Tsamo, E., Amvam Zollo, P.H., Gut, J., Rosenthal, P.J., 2009. Antiplasmodial activity of extracts from seven medicinal plants used in malaria treatment in Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology* 123, 483–488.
- Boyom, F.F., 2004. Huiles essentielles d'Annonacées Camerounaises: Analyses chimiques, Activité antioxydantes et Antiplasmodiales. Doctorat d'Etat Thesis in Biochemistry, University of Yaoundé I, p. 164.
- Boyom, F.F., Ngouana, V., Amvam Zollo, P.H., Menut, C., Bessiere, J.M., Gut, J., Rosenthal, P.J., 2003. Composition and antiplasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. *Phytochemistry* 64, 1269–1275.
- Bugmann, N., 2000. Le concept du paludisme, l'usage et l'efficacité *in vivo* de trois traitements traditionnels antipalustres dans la région de Dori, Burkina Faso. Doctoral Thesis, Faculty of Medicine, University of Basel.
- Chhabra, S.C., Mahunnah, R.L.A., Mshiu, E.N., 1987. Plants used in traditional medicine in eastern Tanzania. I. Pteridophytes and Angiosperms (Acanthaceae to Canellaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 21, 253–277.
- Clement, N., Williams, A., Aranda, D., Chase, R., Watson, N., Mohamed, R., Stubbs, O., Williamson, D., 2005. Medicinal herbs used among asthmatic patients attending a specialty care facility in Trinidad, BMC. *Complementary and Alternative Medicine* 5, 3.
- Coe, F.G., Anderson, G.J., 1996. Ethnobotany of the Garifuna of Eastern Nicaragua. *Economic Botany* 50, 71–107.
- Comerford, S.C., 1996. Medicinal plants of two Mayan healers from San Andrés, Petén, Guatemala. *Economic Botany* 50, 327–336.
- Couvreur, T.L.P., Van der Ham, R.W.J.M., Mbele, Y.M., Mbago, F.M., Johnson, D.M., 2009. Molecular and morphological characterization of a new monotypic genus of Annonaceae, *Mwasumbia*, from Tanzania. *Systematic Botany* 34, 266–276.
- Di Stasi, L.C., Hiruma, C.A., Guimaraes, E.M., Santos, C.M., 1994. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. *Fitoterapia* 65, 529–540.
- Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A.P., Tarning, J., Lwin, K.M., et al., 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *New England Journal of Medicine* 361, 455–467.
- Duncan, W.T., Jane, M.T., Wendy, A.B., Funki, T.M., 1989. Korup Ethnobotany Survey. The World Wide Fund for Nature. Panda House Weyside Park Godalming, Surrey, UK, 154 pp.
- Focho, D.A., Egbe, E.A., Chuyong, G.B., Fongod, A.G.N., Fonge, B.A., Ndam, W.T., Yousoufa, B.M., 2010. An ethnobotanical investigation of the Annonaceae on Mount Cameroon. *Journal of Medicinal Plants Research* 4, 2148–2158.
- Gessler, M.C., Msuya, D.E., Nkunya, M.H.H., Mwasumbi, L.B., Schär, A., Heinrich, M., Tanner, M., 1995. Traditional healers in Tanzania: the treatment of malaria with plant remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 48, 131–144.
- Hay, S.I., Okiro, E.A., Gething, P.W., Patil, A.P., Tatem, A.J., Guerra, C.A., Snow, R.W., 2010. Estimating the global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007. *PLoS Medicine* 7, e1000290, doi:10.1371/journal.pmed.1000290.
- Heinrich, M., Edwards, S., Moerman, D.E., Leonti, M., 2009. Ethnopharmacological field studies; a critical assessment of their conceptual basis and methods. *Journal of Ethnopharmacology* 124, 1–17.
- Hernandez, C., Volpato, G., 2004. Herbal mixture in the traditional medicine of Eastern Cuba. *Journal of Ethnopharmacology* 90, 293–316.
- Jenett-Siems, K., Mockenhaupt, F.P., Bienzle, U., Gupta, M.P., Eich, E., 1999. *In vitro* antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. *Tropical Medicine and International Health* 4, 611–615.
- Johns, T., Windust, A., Jurgens, T., Mansor, S.M., 2011. Antimalarial alkaloids isolated from *Annona squamosa*. *Phytopharmacology* 1, 49–53.
- Leaman, D.J., Arnason, J.T., Yusul, R., Sangat-Roemantyo, H., Soedjito, H., Angerhofer, C.K., Pezzuto, J.M., 1995. Malaria remedies of the Kenyah of the Apo Kayan, East Kalimantan, Indonesian Borneo: a quantitative assessment of local consensus as an indicator of biological efficacy. *Journal of Ethnopharmacology* 49, 1–16.
- Mulangu Binzambal, O., 1999. Antimalarial plants used in the Democratic Republic of Congo. Poster: First International Meeting of the Research Initiative on Traditional Antimalarials. <http://mim.nih.gov/english/partnerships/ritam.program.pdf>.
- Muthaura, C.N., Rukunga, G.M., Chhabra, S.C., Mungai, G.M., Njagi, E.N.M., 2007. Traditional antimalarial phytotherapy remedies used by the Kwale community of the Keyan Coast. *Journal of Ethnopharmacology* 144, 377–386.

- Nguta, J.M., Mbaria, J.M., Gakuya, D.W., Gathumbi, P.K., Kiama, S.G., 2010. Antimalarial herbal remedies of Msambweni, Kenya. *Journal of Ethnopharmacology* 128, 424–432.
- Pinto, A.C., Andrade, S.R., Ferreira, F.R., Kinpara, D.I., 2005. *Annona* Species. International Center for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton SO171BJ, UK, pp. 1–281.
- Prance, G.T., 1994. Introduction. In: Prance, G.T., Chadwick, D.J., Marsh, J. (Eds.), *Ethnobotany and the Search for New Drugs*. Ciba Foundation Symposium 185. John Wiley and Sons, Chichester, England, pp. 57–90.
- Soatoing, P., Vroumsia, T., Tchobsala, T.F., Njan, N.A., Messi, J., 2011. Medicinal plants used in traditional treatment of malaria in Cameroon. *Journal of Ecology and Natural Environment* 3, 104–117.
- Tabuti, J.R.S., 2008. Herbal medicines used in the treatment of malaria in Budiope County, Uganda. *Journal of Ethnopharmacology* 116, 33–42.
- Tsabang N., 2008. Etude ethnobotanique des plantes à vertus antidiabétiques et/ou antihypertensives au Cameroun. PhD Thesis in Ethnobotany, University of Yaoundé 1, Cameroon, 318 pp.
- Tsabang, N., Nkongmeneck, B.A., Lejoly, J., Nguenang, G.M., Fongnzossie, F.E., Koueke, P., Biyiti, T.V., Foko, J., Mbitta, M.J.C.H., Atangana, J., 2005. Médecine traditionnelle: une méthode d'identification des diabétiques et/ou des hypertendus et des plantes pouvant améliorer leur état de santé. *Cameroon Journal of Ethnobotany* 1, 53–59.
- Tsabang, N., Nkongmeneck, B.A., Zapfack, L., Nzooh, D., Nguenang, G.M., Lando, G., Carlson, T.J., Porter, P.L., 2001. Inventaire des plantes à vertus antidiabétiques dans la région de Yaoundé au Cameroun. *Revue Médicale de la Pharmacopée Africaine* 15, 87–94.
- Vandebroek, I., Balick, M.J., Ososki, A., Kronenberg, F., Yukes, J., Wade, C., Jimenez, F., Peguero, B., Castillo, D., 2010. The importance of *Botellas* and other plant mixture in Dominican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 128, 20–41.
- World Malaria Report, 2010. WHO Press Geneva, Switzerland 3, pp. 1084–1092.



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

## Potent antiplasmodial extracts from Cameroonian Annonaceae

Fabrice Fekam Boyom<sup>a,\*</sup>, Patrick Valere Tsouh Fokou<sup>a</sup>, Lauve Rachel Tchokouaha Yamthe<sup>a</sup>,  
Alvine Ngoutane Mfopa<sup>a</sup>, Eugénie Madiesse Kemgne<sup>a,b</sup>, Wilfred Fon Mbacham<sup>b</sup>,  
Etienne Tsamo<sup>c</sup>, Paul Henri Amvam Zollo<sup>a</sup>, Jiri Gut<sup>d</sup>, Philip J. Rosenthal<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Phytobiochemistry and Medicinal Plants Study, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

<sup>b</sup> Laboratory for Public Health Research Biotechnologies, Biotechnology Center, University of Yaoundé I, P.O. Box 8094, Yaoundé 8 Yaoundé, Cameroon

<sup>c</sup> Laboratory of Natural Products, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812 Yaoundé, Cameroon

<sup>d</sup> Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, University of California, San Francisco, CA 94943, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 November 2010

Received in revised form 9 January 2011

Accepted 14 January 2011

Available online 21 January 2011

## Keywords:

Malaria

Acetogenin

Annonaceae

*Annona muricata**Xylopiya africana*

Toxicity

*Plasmodium falciparum*

## ABSTRACT

**Aim of the study:** In a search for new antimalarial leads, we have carried out a preliminary ethnopharmacological study with the aim of evaluating the *in vitro* antiplasmodial activity of extracts from thirteen Annonaceae species growing in Cameroon, and of assessing the acute toxicity of promising fractions in Swiss albino mice.

**Materials and methods:** Plants were selected on the basis of an ethnobotanical survey carried out in four sites in centre and south regions of Cameroon (Yaoundé neighbourhoods, Kon-Yambetta, Ngobayang and Mbalmayo) on Annonaceae plants locally used to treat malaria and related symptoms. The choice of the sites was mainly based on environmental factors enabling mosquito breeding, cosmopolitan areas regrouping people from different cultural origins, areas with limited access to health centers, and areas with people relying exclusively on traditional medical practices. Collected materials were extracted by maceration in 95% ethanol. The crude extract was partitioned using organic solvents and the fractions afforded were evaluated for antiplasmodial activity in culture against the W2 strain of *Plasmodium falciparum*. Promising fractions (methanol fractions) were assessed for their acute toxicity in Swiss albino mice.

**Results:** From the results achieved, 37 (31.3%) out of 118 extracts tested exhibited antiplasmodial activity, with IC<sub>50</sub> values ranging from 1.07 µg/ml to 9.03 µg/ml. Of the active extracts, 29 (78.4%) were methanol fractions, 21 (72.4%) of which inhibited the parasites with IC<sub>50</sub> < 5 µg/ml. The promising fractions proved to be safe through oral administration in mice.

**Conclusions:** The activities and toxicity profiles of methanol fractions indicate that they deserve to be further investigated in detail for antimalarial lead discovery.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

People at risk of malaria breathed a sigh of relief when artemisinin-based combination therapies (ACTs) became widely available over the past decade. This relief tends to be short-lived because the efficacy of artesunate monotherapy has declined, and ACTs are showing signs of lower efficacy (Dondorp et al., 2009; Ronane et al., 2009). This situation indicates that the battle against malaria could be seriously impaired, until new and efficacious drugs are developed.

The greatest need for antimalarial drugs is in tropical nations, and most importantly in Africa where the highest burden is felt.

Nations in Africa also have vital resources, that is diversified and rich floras on which their traditional medicines mainly depend. Therefore, plants that are used in traditional medicines may offer a promising source for antimalarial lead compounds. A gap persists in the knowledge of pharmacological parameters of Annonaceae species that are locally used in Cameroon to combat malaria and/or related symptoms.

In this paper we report the results of an ethnopharmacological study in which *in vitro* susceptibility of the reference *Plasmodium falciparum* resistant strain (W2) to plant extracts and acute toxicity profiles of promising fractions in male and female Swiss albino mice were evaluated.

The extracts were prepared from thirteen Cameroonian Annonaceae plants, which are locally used in traditional medicine to cure many parasitic diseases including helminthiasis, dysentery, malaria and related symptoms, i.e. *Annona muricata*, *Anonidium mannii*, *Monodora myristica*, *Piptostigma calophyllum*, *Polyalthia*

\* Corresponding author at: University of Yaoundé I, Faculty of Science, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon. Tel.: +237 7727 6585.

E-mail address: [ffefe@yahoo.com](mailto:ffefe@yahoo.com) (F.F. Boyom).

oliveri, *Polyalthia suaveolens*, *Uvaria banmanni*, *Uvariastrum zenkeri*, *Uvariadendron calophyllum*, *Uvariadendron molundense*, *Xylopia aethiopica*, *Xylopia parviflora* and *Xylopia africana*. Ethnobotanical data were collected through face-to-face interactions with traditional healers in the Centre and South regions of Cameroon. Criteria of literature and chemotaxonomical surveys afterward guided the selection of the thirteen species.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant selection and collection

On the basis of an ethnobotanical survey conducted in April 2010, *Xylopia* species were collected in Lolodorf area, South region and the other species in Mt Kalla, Yaoundé area (Centre region) in May 2010. This survey was conducted in strict respect of the current regulations of biodiversity protection and rural population's customary rights. In prelude to the survey, legal authorities (villages' heads) from each study site were contacted to seek authorization to investigate within their communities. During a face-to-face interaction, the purpose and the procedure of the work, as well as the expected benefits and rights were explained to villages' heads. The traditional herbal practitioners willing to collaborate on the study (or their interpreters) had signed the informed consent form before further interactions. The data were collected following a questionnaire prepared for the study by Dr. Nole Tsabang, an ethnobotanist at the Institute for Medical Research and Medicinal Plants Study, Yaoundé, Cameroon. Voucher specimens of each plant were dried and deposited at the Cameroon National Herbarium, Yaoundé. The selected plants are listed in Table 1.

### 2.2. Plant extraction and partition

Air-dried and ground plant materials were extracted according to the method previously described by Alali et al. (1999). This method was chosen because it is designed to isolate acetogenins (or enriched fractions) from Annonaceae plants. Considering the potency of acetogenins against vital metabolic pathways found in *Plasmodia* we expected to identify new antimalarial acetogenin leads. Plant powders (500 g) were individually macerated in 95%

ethanol for 72 h. The dried ethanolic extracts obtained were further partitioned between water (H<sub>2</sub>O) and methylene chloride (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (1:1, v/v) to yield CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fractions and H<sub>2</sub>O fractions. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fractions were partitioned between hexane and 90% methanol (1:1, v/v) to yield hexane and methanolic fractions. The different resulting layers were evaporated to dry under reduced pressure using a Büchi R111 Rotavapor to obtain 37 methanol fractions, 11 hexane fractions from the relevant plant parts. The water layers were evaporated under ventilation at RT to afford 37 fractions.

In addition, 33 interface precipitates (I) were obtained during residues partition between CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O.

In addition to the 37 crude ethanolic extracts, all the 118 afforded fractions were evaluated for antiplasmodial activity.

The yields given in Table 2 were calculated in percentage relative to dried plant material weight (w/w).

### 2.3. Evaluation of the biological activities

#### 2.3.1. Evaluation of erythrocyte susceptibility to plant extracts

A preliminary toxicological assessment was carried out to determine the highest drug concentrations that can be incubated with erythrocytes without any significant damage. This was done according to the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide/phenazine methosulfate (MTT/PMS) colorimetric assay described by Cediillo-Rivera et al. (1992), with some modifications according to Boyom et al. (2009). This method is based on the reduction of MTT to formazan by enzymes of viable cells, especially the dehydrogenases such as glucose-6-phosphate dehydrogenase of the pentose phosphate pathway of erythrocytes. The extracts were serially diluted in 96 well culture plates, and each concentration incubated in triplicate with erythrocytes (2% hematocrit) in a final 100 µL culture volume (at 37 °C, in a 3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 91% N<sub>2</sub> atmosphere, in the presence of RPMI 1640, 25 mM HEPES, pH 7.4 for 48 h). The negative control consisted of DMSO at the same concentrations. At the end of the incubation period, the cultures were transferred into polypropylene microcentrifuge tubes and centrifuged at around 2200 × g for 5 min, and the supernatant was discarded. 1.5 mL MTT solution with 250 µg PMS were added to the pellets. Controls contained no erythrocytes. The tubes were thereafter incubated for 45 min at 37 °C, and then centrifuged, and the supernatant was discarded. The pellets were re-suspended in 0.75 mL of HCl 0.04 M in isopropanol to extract and dissolve the dye (formazan) from the cells. After 5 min, the tubes were vigorously mixed and centrifuged, and the absorbance of the supernatant was determined at 570 nm. The tubes containing the most viable erythrocytes produced more formazan (highest O.D.). From the results obtained, the highest drug concentrations producing minimal damage to the cells were considered as starting points for further drug dilutions.

#### 2.3.2. Evaluation of antiplasmodial activity

*Plasmodium falciparum* strain W2 was maintained in culture in sealed flasks at 37 °C, in a 3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 91% N<sub>2</sub> atmosphere in RPMI 1640, 25 mM HEPES, pH 7.4, supplemented with heat inactivated 10% human serum and human erythrocytes to achieve a 2% hematocrit. Parasites were synchronized in the ring stage by serial treatment with 5% sorbitol (Sigma) (Lambros and Vanderberg, 1979) and studied at 1% parasitemia.

Plant extracts were prepared as 1 mg/ml stock solutions in dimethyl sulfoxide (DMSO), further diluted as needed for individual experiments, and tested in triplicate. The stock solutions were diluted in supplemented RPMI 1640 medium so as to have at most 0.2% DMSO in the final reaction medium. An equal volume of 1% parasitemia, 4% hematocrit culture was thereafter added and gently mixed thoroughly. Negative controls contained equal concentrations of DMSO. Positive controls contained 1 µM artemisinin

**Table 1**  
List of plants and parts used in this study.

Scientific name: voucher specimen number	Parts used
<i>Annona muricata</i> Linn.: 32879/HNC	Leaves, twigs, flower, pericarp, pulp of fruit and seeds
<i>Anonidium manni</i> Gaertn (D. Oliver) Engl. & Diels: 45582HNC	Leaves, twigs
<i>Monodora myristica</i> (Gaertn.) Dunal: 27690/SFR/CAM	Leaves, twigs stem bark
<i>Piptostigma calophyllum</i> Mildbr. & Diels: 38333HNC	Leaves, twigs, stem bark
<i>Polyalthia oliveri</i> Engl.: 19416SRF/Cam, <i>Polyalthia suaveolens</i> Engl. & Diels: 1227/SRF/CAM.	Leaves, twigs, stem bark
<i>Uvaria banmanni</i> Engl. & Diels: 6427/SRF/Cam	Leaves, twigs
<i>Uvariastrum zenkeri</i> Engl. & Diels: 57355HNC	Leaves, twigs
<i>Uvariadendron calophyllum</i> R.E Fries: 28734/SFR/CAM	Leaves, twigs
<i>Uvariadendron molundense</i> (Engl. & Diels) R.E. Fries: 41685 HNC	Leaves, twigs
<i>Xylopia aethiopica</i> (Dunal) A Rich: 28725/SFR/Cam	Leaves, stem
<i>Xylopia africana</i> (Benth) Oliv: 38322/HNC	Leaves, twigs, roots, stem bark
<i>Xylopia parviflora</i> A Rich: 42351HNC	Leaves, stem, seeds

When applicable, every plant organ was investigated, including leaf, stem, twigs, stem bark, root, flowers, fruit, seeds, fruit pericarp and pulp.

**Table 2**Yields of plant extraction/partition; *in vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to fractions and LD<sub>50</sub> of promising methanol fractions.

Annonaceae species/solvent of extraction	Part	Codes	Yield <sup>a</sup> (%)	IC <sub>50</sub> ± S.D. <sup>b</sup> (µg/ml)	LD <sub>50</sub> <sup>c</sup> (g/kg)	
<i>Annona muricata</i>						
Ethanol	Leaves	AnMl (eth)	12.24	7.43 ± 0.48	ND	
Methanol		AnMl	4.85	3.55 ± 0.38	2.87	
Interface precipitate	Twigs	AnMl I	1.04	>10	ND	
Hexane		AnMl H	1.23	2.03 ± 0.06	ND	
Water		AnMl H <sub>2</sub> O	1.34	>10	ND	
Ethanol		AnMtw (eth)	4.78	8.56 ± 0.88	ND	
Methanol		AnMtw	1.77	4.11 ± 1.11	2.52	
Hexane		AnMtw H	0.06	>10	ND	
Water		AnMtw H <sub>2</sub> O	2.45	>10	ND	
Ethanol		Flower parts	AnMfp (eth)	3.98	5.12 ± 0.58	ND
Methanol			AnMfp	2.32	2.92 ± 0.10	4.14
Water		Pericarp	AnMfp H <sub>2</sub> O	0.15	>10	ND
Ethanol	AnMp (eth)		5.68	6.87 ± 0.33	ND	
Methanol	AnMp		2.29	4.30 ± 0.61	1.58	
Interface precipitate	AnMp I		0.98	>10	ND	
Water	AnMp H <sub>2</sub> O		0.42	>10	ND	
Ethanol	Pulp of fruit		AnMpf (eth)	4.02	6.01 ± 0.23	ND
Methanol			AnMpf	1.09	5.17 ± 0.72	1.09
Interface precipitate	Seeds		AnMpf I	0.07	4.42 ± 2.74	ND
Water			AnMpf H <sub>2</sub> O	2.35	>10	ND
Ethanol			AnMs (eth)	5.98	3.02 ± 0.36	ND
Methanol		AnMs	3.49	2.42 ± 0.14	0.85	
Interface precipitate		AnMs I	0.09	>10	ND	
Water		AnMs H <sub>2</sub> O	1.43	>10	ND	
<i>Anonidium mannii</i>						
Ethanol		Leaves	AMl (eth)	2.87	3.12 ± 0.45	ND
Methanol			AMl	1.65	2.84 ± 0.05	>5.00
Hexane			AMl H	0.05	>10	ND
Water	AMl H <sub>2</sub> O		0.74	>10	ND	
Ethanol	Twigs	AMtw (eth)	1.67	2.11 ± 0.21	ND	
Methanol		AMtw	0.55	2.04 ± 0.01	3.93	
Interface precipitate		AMtw I	0.31	>10	ND	
Water		AMtw H <sub>2</sub> O	0.10	>10	ND	
<i>Monodora myristica</i>						
Ethanol	Leaves	MMl (eth)	1.78	>10	ND	
Methanol		MMl	0.65	9.03 ± 0.38	>5.00	
Interface precipitate		MMl I	0.15	>10	ND	
Hexane		MMl H	0.04	>10	ND	
Water	Twigs	MMl H <sub>2</sub> O	0.37	>10	ND	
Ethanol		MMtw (eth)	1.14	8.73 ± 0.26	ND	
Methanol		MMtw	0.27	5.52 ± 0.03	>7.00	
Interface precipitate		MMtw I	0.30	>10	ND	
Water	Stem bark	MMtw H <sub>2</sub> O	0.36	>10	ND	
Ethanol		MMSb (eth)	1.98	>10	ND	
Methanol		MMSb	0.72	>10	ND	
Interface precipitate		MMSb I	0.56	>10	ND	
Water	MMSb H <sub>2</sub> O	0.02	>10	ND		
<i>Piptostigma calophyllum</i>						
Ethanol	Leaves	PCl (eth)	6.75	8.92 ± 0.18	ND	
Methanol		PCl	0.63	6.72 ± 0.08	>5.00	
Interface precipitate		PCl I	1.64	>10	ND	
Interface precipitate		PCl II	1.83	>10	ND	
Hexane	Twigs	PCl H	0.06	>10	ND	
Water		PCl H <sub>2</sub> O	0.48	>10	ND	
Ethanol		PCtw (eth)	3.46	6.83 ± 0.64	ND	
Methanol		PCtw	0.21	4.99 ± 0.29	>5.00	
Interface precipitate	Stem bark	PCtw I	0.79	>10	ND	
Water		PCtw H <sub>2</sub> O	0.96	>10	ND	
Ethanol		PCsb (eth)	3.45	9.53 ± 0.78	ND	
Methanol		PCsb	0.19	7.05 ± 0.42	4.77	
Interface precipitate	Water	PCsb I	2.58	>10	ND	
Water		PCsb H <sub>2</sub> O	0.08	>10	ND	
<i>Polyalthia oliveri</i>						
Ethanol	Leaves	POl (eth)	6.34	7.78 ± 0.62	ND	
Methanol		POl	2.57	4.28 ± 0.39	4.89	
Interface precipitate		POl I	0.34	>10	ND	
Hexane		POl H	0.90	>10	ND	
Water	Twigs	POl H <sub>2</sub> O	0.84	>10	ND	
Ethanol		POTw (eth)	2.65	6.78 ± 0.31	ND	
Methanol		POTw	0.64	4.22 ± 0.03	2.94	
Interface precipitate		POTw I	0.33	>10	ND	
Water	Stem bark	POTw H <sub>2</sub> O	0.42	>10	ND	
Ethanol		POsb (eth)	6.03	3.43 ± 0.67	ND	
Methanol		POsb	1.88	3.55 ± 0.48	3.54	

Table 2 (Continued)

Annonaceae species/solvent of extraction	Part	Codes	Yield <sup>a</sup> (%)	IC <sub>50</sub> ± S.D. <sup>b</sup> (μg/ml)	LD <sub>50</sub> <sup>c</sup> (g/kg)
Interface precipitate		POsb I	2.59	>10	ND
Water		POsb H <sub>2</sub> O	0.23	>10	ND
<i>Polyalthia suaveolens</i>					
Ethanol	Leaves	PSI (eth)	7.86	>10	ND
Methanol		PSI	3.73	>10	ND
Interface precipitate		PSI I	0.54	>10	ND
Water		PSI H <sub>2</sub> O	0.90	>10	ND
Ethanol	Twigs	PStw (eth)	2.04	4.23 ± 0.13	ND
Methanol		PStw	0.73	3.23 ± 0.01	3.97
Water		PStw H <sub>2</sub> O	0.34	>10	ND
Ethanol	Stem bark	PSsb (eth)	3.96	5.66 ± 0.08	ND
Methanol		PSsb	1.05	5.52 ± 0.03	>5.00
Interface precipitate		PSsb I	1.70	5.95 ± 1.47	ND
water		PSsb H <sub>2</sub> O	0.46	>10	ND
<i>Uvaria banmanni</i>					
Ethanol	Leaves	UBI (eth)	2.77	>10	ND
Methanol		UBI	1.30	>10	ND
Interface precipitate		UBI I	0.71	>10	ND
Hexane		UBI H	0.06	>10	ND
Water		UBtw H <sub>2</sub> O	0.03	>10	ND
Ethanol	Twigs	UBtw (eth)	2.89	>10	ND
Methanol		UBtw	0.97	>10	ND
Interface precipitate		UBtw I	1.60	>10	ND
Hexane		UBtw H	0.02	>10	ND
water		UBtw H <sub>2</sub> O	0.03	>10	ND
<i>Uvariastrum zenkeri</i>					
Ethanol	Leaves	UZI (eth)	7.03	6.97 ± 0.48	ND
Methanol		UZI	3.77	5.03 ± 0.23	>7.00
Water		UZI H <sub>2</sub> O	2.05	>10	ND
Ethanol	Twigs	UZtw (eth)	1.78	1.89 ± 0.05	ND
Methanol		UZtw	0.24	2.09 ± 0.36	4.97
Interface precipitate		UZtw I	0.59	2.69 ± 0.85	ND
Water		UZtw H <sub>2</sub> O	0.10	>10	ND
<i>Uvariadendron calophyllum</i>					
Ethanol	Leaves	UCI (eth)	3.04	>10	ND
Methanol		UCI	1.05	>10	ND
Interface precipitate		UCI I	0.91	>10	ND
Water		UCI H <sub>2</sub> O	0.08	>10	ND
Ethanol	Twigs	UCtw (eth)	1.78	>10	ND
Methanol		UCtw	0.42	>10	ND
Interface precipitate		UCtw I	0.50	>10	ND
Water		UCtw H <sub>2</sub> O	0.30	>10	ND
<i>Uvariadendron molundense</i>					
Ethanol	Leaves	UMI (eth)	5.21	>10	ND
Methanol		UMI	1.28	>10	ND
Interface precipitate		UMI I	1.44	>10	ND
Water		UMI H <sub>2</sub> O	1.19	>10	ND
Ethanol	Twigs	UMtw (eth)	1.97	8.22 ± 0.68	ND
Methanol		UMtw	0.20	4.79 ± 0.60	3.21
Interface precipitate		UMtw I	0.84	>10	ND
Water		UMtw H <sub>2</sub> O	0.79	>10	ND
<i>Xylopiya africana</i>					
Ethanol	Leaves	XAI (eth)	8.54	6.87 ± 0.43	ND
Methanol		XAI	1.83	5.83 ± 0.89	>7.00
Interface precipitate		XAI I	3.99	>10	ND
Hexane		XAI H	0.07	>10	ND
Water		XAI H <sub>2</sub> O	0.94	>10	ND
Ethanol	Twigs	XAtw (eth)	1.89	3.86 ± 0.24	ND
Methanol		XAtw	0.75	3.56 ± 0.27	2.56
Interface precipitate		XAtw I	0.75	4.41 ± 0.02	ND
Water		XAtw H <sub>2</sub> O	0.05	>10	ND
Ethanol	Stem bark	XAsb (eth)	4.67	2.86 ± 0.26	ND
Methanol		XAsb	1.57	1.07 ± 0.07	>7.00
Interface precipitate		XAsb I	2.02	4.29 ± 0.75	ND
Water		XAsb H <sub>2</sub> O	0.23	>10	ND
Ethanol	roots	XAr (eth)	2.78	3.22 ± 0.18	ND
Methanol		XAr	0.49	1.32 ± 0.06	>5.00
Interface precipitate		XAr I	1.45	5.09 ± 0.09	ND
Water		XAr H <sub>2</sub> O	0.31	>10	ND
<i>Xylopiya aethiopica</i>					
Ethanol	Leaves	XAEI (eth)	6.78	6.46 ± 0.84	ND
Methanol		XAEI	4.27	3.75 ± 0.10	>7.00
Interface precipitate		XAEI I	0.30	>10	ND
Hexane		XAEI H	0.07	>10	ND
Water		XAEI H <sub>2</sub> O	0.43	>10	ND
Ethanol	Stem	XAEst (eth)	2.87	4.77 ± 0.13	ND

Table 2 (Continued)

Annonaceae species/solvent of extraction	Part	Codes	Yield <sup>a</sup> (%)	IC <sub>50</sub> ± S.D. <sup>b</sup> (µg/ml)	LD <sub>50</sub> <sup>c</sup> (g/kg)
Methanol		XAEst	1.98	4.29 ± 0.02	2.94
Interface precipitate		XAEst I	0.10	5.24 ± 0.28	ND
Water		XAEst H <sub>2</sub> O	0.18	>10	ND
<i>Xylopia parviflora</i>					
Ethanol	Leaves	XPI (eth)	5.08	5.86 ± 0.36	ND
Methanol		XPI	1.65	3.44 ± 0.47	>7.00
Interface precipitate		XPI I	1.96	>10	ND
Hexane		XPI H	0.08	>10	ND
Water		XPI H <sub>2</sub> O	0.66	>10	ND
Ethanol	Stem	XPst (eth)	1.64	6.86 ± 0.88	ND
Methanol		XPst	0.67	3.81 ± 0.41	>5.00
Interface precipitate		XPst I	0.12	>10	ND
Water		XPst H <sub>2</sub> O	0.31	>10	ND
Ethanol	Seeds	XPs (eth)	14.98	>10	ND
Methanol		XPs	6.38	>10	ND
Interface precipitate		XPs I	4.61	>10	ND
Water		XPs H <sub>2</sub> O	2.74	>10	ND
		CQ		0.06 ± 0.01	
		Art		0.002 ± 0.001	

<sup>a</sup> The percent extraction yields were calculated in percentages (w/w).

<sup>b</sup> The susceptibility of the W2 strain of *Plasmodium falciparum* and erythrocytes to plant fractions was evaluated in culture; -(eth)=crude ethanol extract; -H<sub>2</sub>O=water fractions; -H=hexane fractions; -I=interface precipitates; IC<sub>50</sub>=concentration of extract that killed 50% of parasites, relative to negative control. S.D.=standard deviation, the drugs were tested in triplicate.

<sup>c</sup> LD<sub>50</sub>=median lethal dose, or concentration that killed 50% of experimental animals. Positive controls were CQ=chloroquine and Art=artemisinin. ND=not determined.

and chloroquine phosphate (Sigma). Cultures were incubated at 37 °C, for 48 h. Parasites at the ring stage were thereafter fixed by replacing the serum medium by an equal volume of 1% formaldehyde in PBS. Aliquots (50 µL) of each culture were then added to 5 ml round-bottom polystyrene tubes containing 0.5 ml 0.1% Triton X-100 and 1 nM YOYO nuclear dye (Molecular Probes) in PBS, and parasitemias of treated and control cultures were compared using a Becton-Dickinson FACSsort flow cytometer to count nucleated (parasitized) erythrocytes. Data acquisition was performed using CellQuest software. These data were normalized to percent control activity and 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) were calculated using Prism 5.0 software (GraphPad) with data fitted by non linear regression to the variable slope sigmoidal dose–response formula,  $y = 100 / (1 + 10^{(\log IC_{50} - x)H})$ , where  $H$  is the hill coefficient or slope factor (Singh and Rosenthal, 2001).

### 2.3.3. Evaluation of the acute toxicity of methanol fractions

Twenty nine methanol fractions (AnMI, AnMtw, AnMfp, AnMp, AnMpf, AnMs, AMI, AMtw, MMtw, PCI, POI, POTw, UZI, XAI, XAtw, XAsb, XAr, XAEI, XAEs, XPI, XPst, MMI, PCSb, PCTw, UZtw, PSsb, PStw, POSb, and UMTw) out of one hundred and eighteen fractions evaluated in this study have shown promising antiplasmodial activities. Therefore, their acute toxicity profiles were assessed according to the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) protocol (Wallace and Wallace, 2001).

**2.3.3.1. Experimental animals.** Male and female Swiss albino mice weighing 20–25 g were used for the experiments. They were obtained from the Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Centre for Research on Medicinal Plants and Traditional Medicine, Institute of Medical Research and Medicinal Plants Study, Yaoundé. The animals were housed in wire mesh cages and fed with standard laboratory diet and had ordinary tap water *ad libitum*. Animal welfare and ethical requirements were respected during the experiments.

**2.3.3.2. Methods of acute toxicity assessment.** Before the actual determination of the median lethal doses (LD<sub>50</sub>), an approximate median lethal dose of each extract was initially determined in a pilot study by the 'staircase method' using a small number of animals (2 per dose) and increasing doses. In brief, two mice were

administered *per os* with a particular dose of extract and observed for a period of 24 h for any mortality. There from, the LD<sub>50</sub> or the range between the maximum nonlethal and minimum lethal doses was found. A final and more reliable LD<sub>50</sub> assay was performed using three dose levels within this range, with a larger number of animals in each group (Ghosh, 1984). Three doses (0.75–7 g/kg dissolved in olive oil) were then chosen for the determination of oral LD<sub>50</sub> in mice and given to three groups of albino mice (6 in each group). One group of mice was given 1.0 ml of olive oil orally as negative control. The animals were firstly observed for 7 h and thereafter on daily basis for three consecutive days, for any toxic symptoms (change in activity such as excitation, fatigue, diarrhea, itching, curved tail, shivering, falling of hair and mortality). During this period, the number of deceased mice was counted in each group. The percentage of animals that had died at each dose level was transformed to probits (Ghosh, 1984) and the LD<sub>50</sub> values determined by the method of Miller and Tainter (1944).

## 3. Results

### 3.1. Plant extraction

The yields of extract preparations expressed as percentages relative to the weight of the starting plant material are given in Table 2.

### 3.2. The biological activities

#### 3.2.1. Erythrocyte susceptibility and antiplasmodial activity

All the extracts tested showed moderate toxicity to erythrocytes at concentrations above 1 mg/ml, several orders of magnitude above concentrations with antiplasmodial activity.

From the results presented in Table 2, it appears that 28 crude ethanolic extracts out of 37 exhibited antiplasmodial activity, with IC<sub>50</sub> values ranging from 1.89 to 9.53 µg/ml. The most active of these crude extracts was that of the twigs of *Uvariastrum zenkeri*, with an IC<sub>50</sub> of 1.89 µg/ml.

From these results, we have also noticed that some crude extracts exhibit activities that are higher or equivalent to that of their subsequent fractions. Firstly, the methanol fraction and interface precipitate of *Uvariastrum zenkeri* twigs (UZtw and UZtw I) were less active than the crude extract (UZtw (eth)), with

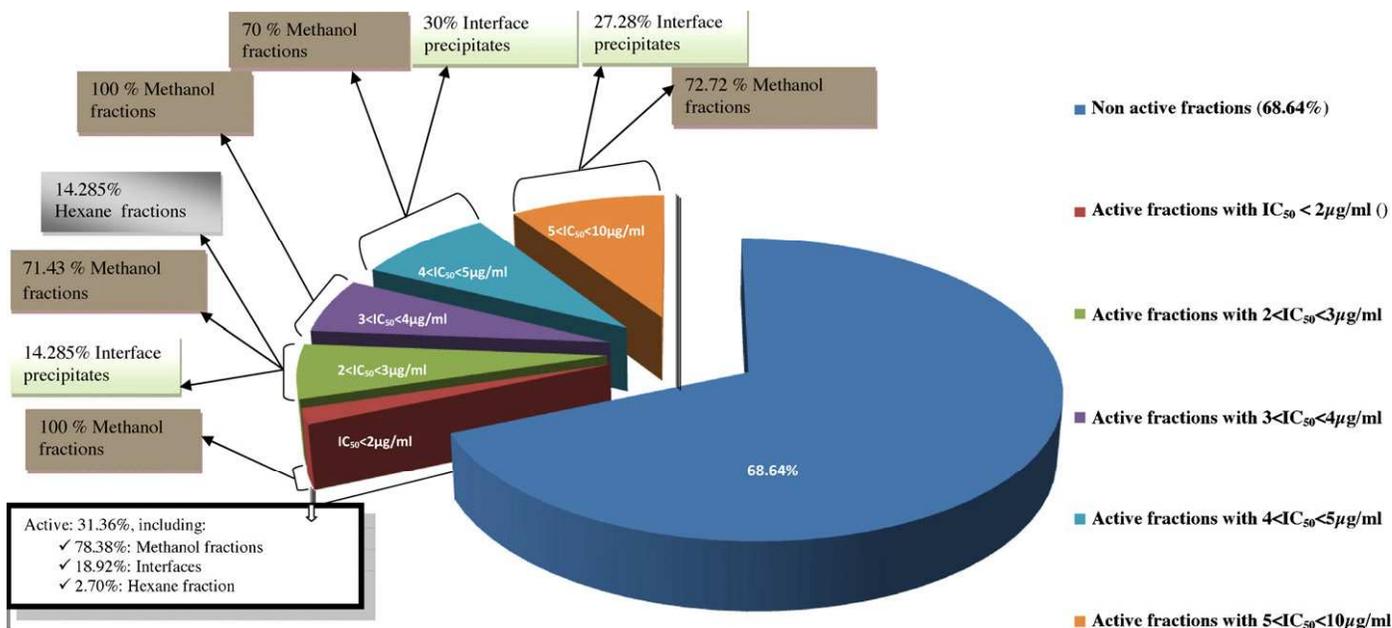


Fig. 1. Activity distribution among the Annonaceae extract types.

IC<sub>50</sub> values of 2.09 µg/ml and 2.69 µg/ml, respectively. Secondly, AnMs (eth), AMI (eth), AMtw (eth), POSb (eth), and PSSb (eth) of *Annona muricata* (seeds), *Anonidium mannii* (leaves and twigs), *Polyalthia oliveri* (stem bark), and *Polyalthia suaveolens* (stem bark) respectively were found to have antiplasmodial activities that are comparable with those of their subsequent methanol fractions, and/or interface precipitates.

Finally, the ethanolic crude extract of the leaf of *Monodora myrsitica* (MMI (eth)) showed no activity, but the subsequent methanol fraction (MMI) exhibited moderate activity (IC<sub>50</sub> = 9.03 µg/ml).

The following analysis of the screening results will mainly concern the fractions afforded from the partition of the crude extracts.

37 (31.35%) out of 118 fractions tested exhibited antiplasmodial activity, with IC<sub>50</sub> values ranging from 1.07 µg/ml to 9.03 µg/ml for XAsb and MMI respectively. Of the active extracts, 29 (78.37%) were found to be methanol fractions. Moreover, 21 out of 29 (72.41%) of such active fractions (XAsb, XAr, AMtw, UZtw, AnMs, AMI, AnMfp, PStw, XPI, POSb, AnMI, XAtw, XAEI, XPst, AnMtw, POTw, XAEst, AnMp, POI, UMTw, and PCTw) inhibited the *Plasmodium falciparum* W2 strain with IC<sub>50</sub> values lower than 5 µg/ml. The activity distribution per extract types is presented in Fig. 1. From the analysis of this figure, it appears that methanol fractions are potentially active, representing 100% at IC<sub>50</sub> values lower than 2 µg/ml, 71.43% at 2 µg/ml < IC<sub>50</sub> < 3 µg/ml, 100% at 3 µg/ml < IC<sub>50</sub> < 4 µg/ml, 70% at 4 µg/ml < IC<sub>50</sub> < 5 µg/ml, and 72.72% at 5 µg/ml < IC<sub>50</sub> < 10 µg/ml. Overall, they represent over 70% of the active extracts, indicating that they are the most likely source of antiplasmodial principles in the plants investigated. Based on these findings, the methanol fractions were considered for further evaluation of acute toxicity in Swiss albino mice.

The other fraction types such as interface precipitates (AnMpf I, UZtw I, XAsb I, XAtw I, XAr I, XAEs I and PSSb I), and hexane (AnMI H) showed less significant overall potency. Of note, water fractions showed no activity.

Plant fractions were afforded through extract partition using non miscible solvents. All the fractions were tested *in vitro* against *Plasmodium falciparum* W2 and thereafter classified as active and non active. The active fractions were classified among themselves according to the activity level. IC<sub>50</sub> = concentration of extract that killed 50% of parasites in the experimental setting.

### 3.2.2. Acute toxicity

Oral administration of the methanol fractions XPI, MMtw, XAsb, XAI, UZI and XAEI in doses ranging from 2 g/kg to 7 g/kg did not produce significant changes in behavior, excitation, fatigue, itching, curved tail, shivering, falling of hair in male and female mice. Moreover, no death was recorded in this group of animals, indicating that the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) is higher than 7 g/kg. Similar results were obtained for XPst, AMI, XAr, MMI, PSSb, PCTw and PCL which showed no toxicity at doses higher than 5 g/kg. But in this range, animals showed mild side effects such as slight and brief diarrhea and fatigue with no consequence for animal life. These results indicate that these methanol fractions are relatively safe through oral administration.

POSb, PStw, PCSb, UZtw, UMTw, POTw, XAtw, AnMI, XAEs, POI, AnMfp, AMtw and AnMtw showed some degree of toxicity with LD<sub>50</sub> values lower than 5 g/kg, but above 2.50 g/kg. According to the guidelines of OECD, these fractions with LD<sub>50</sub> values above 2 g/kg might be labelled non-toxic (Wallace and Wallace, 2001; Joshi et al., 2007). Following the same guidelines, AnMs was found to be the most toxic extract (LD<sub>50</sub> = 0.85 g/kg), followed by AnMfp (LD<sub>50</sub> = 1.09 g/kg) and AnMp (LD<sub>50</sub> = 1.58 g/kg).

## 4. Discussion and conclusions

This study reports for the first time the antiplasmodial activity of methanol fractions, interface precipitates, hexane and water fractions of thirteen Annonaceae species growing in Cameroon. Compounds from this plant family have already been shown to possess numerous antiparasitic, antibiotic, anti-inflammatory, antitumor and insecticidal properties (Santos and Sant'Ana, 2001; Bermejo et al., 2005; De Mesquita et al., 2005). Nevertheless, there remains a gap in knowledge as far as the antiplasmodial activity of compounds from Annonaceae is concerned, and particularly those of acetogenin type.

As stated above, over 78% of extracts that are active against the W2 strain of *Plasmodium falciparum* are methanol fractions. To corroborate our suggestion in a recent paper (Boyom et al., 2009), the potency of these fractions is most likely attributable to acetogenins. Indeed, these compounds have been shown to be the most powerful

of the known inhibitors of complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) in mitochondrial electron transport systems (Lewis et al., 1993); in addition, they are potent inhibitors of NADH oxidase of plasma membranes (Morré et al., 1995); these enzymes are all found in *Plasmodium falciparum*. These inhibitory actions decrease oxidative, as well as cytosolic ATP production, leading to apoptosis. Moreover, they are potent cytotoxics with insecticidal, ascaricidal, fungicidal, antiparasitic, bactericidal and antiplasmodial activities (Alali et al., 1999; Rupprecht et al., 1990; Guadaño et al., 2000; Rakotomanga et al., 2004). This type of extract may also inhibit some other plasmodial enzymes such as cysteine proteases (Boyom et al., 2009). Further investigations are ongoing to elucidate the active role of acetogenins in the observed biological activities.

21.63% of active extracts were mainly interface precipitates (AnMpf I, UZtw I, PSsb I, XAtw I, XAsb I, XAr I and XAEst I) and one hexane fraction (AnMI H).

The thirteen Annonaceae investigated in this study are endemic species in the Cameroonian flora. They are locally used for various purposes, including as medication.

*Annona muricata* L. called “Ebom beti” in Yaoundé (Cameroon) is a small, upright tropical evergreen tree, 5–6 m high, with large glossy, dark green leaves. It produces a large, heart-shaped, edible fruit that is 15–23 cm in diameter is yellow–green in colour and has flesh inside. All parts of *Annona muricata* tree have been used medicinally in traditional herbal medicine in South America with the following properties and actions: anthelmintic, antiplasmodial, antiparasitic, antimicrobial, antipyretic, sedative, antispasmodic, nervine, hypotensive, anticonvulsant, digestive, antitumor and anticancer (Pinto et al., 2005). The antiplasmodial activity exerted by *Annona muricata* methanol fractions is better than those found for the ethanolic crude extracts of the same species by other authors who obtained IC<sub>50</sub> values ranging from 20–63 µg/ml against D6, W2 and F32 strains of *Plasmodium falciparum* (Gbeassor et al., 1990; Antoun et al., 1993; Leaman et al., 1995; Bidla et al., 2004). In contrast, Nguyen et al. (2007) found the ethanolic crude extract of leaves of *Annona muricata* growing in Vietnam, and the methylene chloride, methanol and cyclohexane fractions to be non active on the FcB1 strain of *Plasmodium falciparum*.

On the other hand, the toxicity profile of all methanol fractions from *Annona muricata* raises some concerns, given the antimalarial reputation of this species in Cameroonian traditional medicine.

Methanol fractions from leaves and twigs of *Anonidium mannii* were highly potent against *Plasmodium falciparum* W2, with IC<sub>50</sub> values corresponding to 2.84 µg/ml and 2.04 µg/ml, respectively. This species is called “Mombou kombo” in Kaka (Cameroon) and is used in Cameroonian traditional medicine to reduce any kind of fevers such as the one resulting from malaria attacks (Adjanooun et al., 1996). No previous study was reported on the biological activities of *Anonidium mannii*. From the study performed, we have labelled these active fractions as non toxic.

Methanol fractions of leaves and twigs of *Monodora myristica* showed antiplasmodial effect with IC<sub>50</sub> values of 9.03 µg/ml and of 5.52 µg/ml respectively. In a similar study, Boyom (2004) demonstrated that essential oils from seeds and bark of this species have strong activity against *Plasmodium falciparum* W2 with IC<sub>50</sub> values of 8.35 µg/ml and of 17.99 µg/ml respectively. The methanol fractions were found to be non toxic, with LD<sub>50</sub> > 5 g/kg. The seeds of this plant are widely used in Central and West Africa for various medicinal and food purposes.

*Piptostigma calophyllum* showed antiplasmodial activity with IC<sub>50</sub> values of 6.79 µg/ml, 4.99 µg/ml and 7.05 µg/ml for methanol fractions of leaves, twigs and stem bark respectively. These extracts were found to be non toxic. No previous investigation and traditional uses were reported for this species.

The two *Polyalthia* species investigated in this study viz. *Polyalthia oliveri* and *Polyalthia suaveolens* are traditionally used to

treat malaria in Cameroon. Previous studies reported by Boyom (2004) showed that the essential oil obtained from the stem bark of *Polyalthia suaveolens* exhibits *in vitro* antiplasmodial activity against the W2 strain of *Plasmodium falciparum* (IC<sub>50</sub> = 15.8 µg/ml). More recently, Boyom et al. (2009) obtained a methanol fraction from the stem bark of *Polyalthia oliveri* that exerted a very good activity (IC<sub>50</sub> = 4.30 µg/ml), close to the value obtained in this study. The twigs extract was found to be the most toxic fraction from this species (LD<sub>50</sub> = 2.94 g/kg).

The fractions from the leaves and twigs of *Uvaria banmanni* (UBI, UBtw) were not active against W2 strain of *Plasmodium falciparum*. No previous work has been reported on this species. Nevertheless, essential oils from leaf and bark of a related species, *Uvaria angolensis* were found to have antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum* W2 with IC<sub>50</sub> values of 19.76 µg/ml and 35.02 µg/ml respectively (Boyom, 2004).

The methanol fractions of twigs and leaves of *Uvariastrum zenkeri* were found to have good activities against *Plasmodium falciparum*, and particularly the twig extract with an IC<sub>50</sub> of 2.09 µg/ml. Given their LD<sub>50</sub> values, the two fractions were categorized non toxic. No previous study was reported on this plant, but the volatile extracts of a related species, *Uvariastrum pierreanum* were reported to inhibit *Plasmodium falciparum* W2 with IC<sub>50</sub> of 23.96 µg/ml and 10.08 µg/ml for leaves and stem bark respectively (Boyom, 2004). Various *Uvariastrum* species are widely used to treat malaria.

Of the two *Uvariadendron* species (*calophyllum* and *molundense*) that have been investigated in this study, only the twigs methanol fraction of *Uvariadendron molundense* showed antiplasmodial activity with an IC<sub>50</sub> of 4.79 µg/ml. This extract was proven to be non toxic. Apart from the findings of Boyom (2004) on the antiplasmodial activity of volatiles from *Uvariadendron calophyllum*, no previous studies have been reported on these species.

All the methanol extracts from *Xylophia* species except the *Xylophia parviflora* seeds, showed very good antiplasmodial activities with IC<sub>50</sub> values ranging from 1.07 to 5.83 µg/ml. Apart from XAtw and XAEst that showed slight toxicity (LD<sub>50</sub> of 2.56 g/kg and 2.94 g/kg), the methanol fractions from these species were non toxic, with LD<sub>50</sub> > 5 g/kg. The genus *Xylophia* comprises many species, which grow in the tropics, especially Africa. This genus is known to produce acetogenins (Rodriguez-Soana and Trumble, 2000). *Xylophia aethiopica*, *Xylophia parviflora* and *Xylophia africana* are the three species that have been investigated in this study. Previous studies showed that, the seeds of *Xylophia parviflora*, a shrub growing in the savanna region of Western Cameroon, are commonly used as a condiment and for the treatment of fevers. Six diterpenes isolated from the seeds of this plant have shown antiplasmodial activity (Akam et al., 2005). Of all the extracts obtained from *Xylophia parviflora* in this study, only the methanol leaf and stem fractions have exhibited antiplasmodial activity. The seed extracts showed no activity, in contrast to the results of Akam et al. (2005). Indeed, in these two studies, the extraction procedures were quite different, starting and ending respectively with methanol. In addition, the plants investigated in the two studies were collected from two different geographical zones of Cameroon. Of note, it is established that origins of plant material and extraction procedure determine the nature of metabolites that might be identified there from, and consequently the resulting biological activity. On another hand, the activity observed may depend on the parasite strain studied. In this study, the extracts were tested against the resistant W2 strain of *Plasmodium falciparum*, while Akam et al. (2005) have used chloroquine-sensitive (HB3) and chloroquine-resistant (Dd2) strains. The essential oil of *Xylophia aethiopica* stem bark was also investigated by Boyom et al. (2003) and was active against the W2 strain of *Plasmodium falciparum* in culture. The fruits of *Xylophia aethiopica* are used as spices all over central and western Africa, and as a component of herbal medicines for the treatment of skin

infections, cough, bronchitis, dysentery, female sterility and fever (Faulkner et al., 1985; Ghana Herbal Pharmacopoeia, 1992). Neither previous study, nor any ethnopharmacological uses were reported for *Xylopiya africana*. Extracts from some *Xylopiya* species from the Cerrado and Atlantic Forests proved active against *Plasmodium falciparum* with IC<sub>50</sub> values ranging from 3 to 10 µg/ml (Jenett-Siems et al., 1999).

From the results achieved in this investigation a three-fold conclusion can be drawn: firstly, this study indicates that Annonaceae are a potential source of compounds with antiplasmodial activity; secondly, the screening of all the fractions deriving from the crude extracts underlines that promising antiplasmodial compounds are mostly concentrated in methanol fractions; thirdly, the toxicity profiles of the active methanol fractions underline their potential safety, indicating that they deserve to be further investigated for antimalarial lead discovery.

### Acknowledgements

This investigation received financial support from the MIM/TDR (A80689) to FFB. Part of the work was supported by funds from the National Institutes of Health, USA (AI35707) to PJR, who is a Distinguished Clinical Scientist of the Doris Duke Charitable Foundation. We gratefully acknowledge the practical help of Mr. Victor Nana of the Cameroon National Herbarium, and Dr. Nole Tsabang of the Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies for their assistance with the ethnobotanical survey, collection and identification of plant materials. We acknowledge the technical assistance of Dr. Gabriel Agbor of the Centre for Research on Medicinal Plants and Traditional Medicine, Yaoundé in the evaluation of the acute toxicity of extracts. We also acknowledge the contribution of the traditional herbal practitioners, Njoh Marcelin of the *Kon-yabetta* area and those from the *Ngobayang* area.

### References

- Adjanohoun, J.E., Aboubakar, N., Dramane, K., Ebot, M.E., Ekpere, J.A., Enwororok, E.G., Focho, D., Gbile, Z.O., Kamanyi, A., Kamsu, K.J., Keita, A., Mbenkum, T., Mbi, C.N., Mbiele, A.C., Mbome, J.C., Muburu, N.K., Nancy, W.L., Kongmeneck, B., Satabie, B., Sofowor, A., Tamze, V., Wirmum, C.K., 1996. Traditional medicine and pharmacopoeia: contribution to ethnobotanical and floristic studies in Cameroon. Organisation of African Unity, Scientific Technical and Research Comity, Addis Ababa.
- Akam, T., Yong, J., Fanso-Free, S., 2005. Antiplasmodial agents from *Xylopiya parviflora* seeds. MIM Proceedings, Acta Tropica 95, 197–198 (Suppl. 1).
- Alali, F.Q., Liu, X.X., Mc Laughlin, J.L., 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. Journal of Natural Products 62, 504–540.
- Antoun, M.D., Gerend, L., Milhous, W.K., 1993. Screening of the flora of Puerto Rico for potential antimalarial bioactives. International Journal of Pharmacognosy 31, 255–258.
- Bermejo, A., Figadere, B., Zafra-Polo, M.C., Barrachina, I., Estornell, E., Cortes, D., 2005. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. Natural Products Reports 22, 269–303.
- Bidla, G., Titanji, V.P.K., Joko, B., Ghazali, G.E., Bolad, A., Berzins, K., 2004. Antiplasmodial activity of seven plants used in African folk medicine. Indian Journal of Pharmacology 36, 245–246.
- Boyom, F.F., 2004. Huiles essentielles d'Annonacées Camerounaises: Analyses chimiques, Activité antioxydantes et Antiplasmodiales. "Doctorat d'Etat" thesis in Biochemistry, University of Yaoundé I, p. 164.
- Boyom, F.F., Ngouana, V., Zollo, P.H., Menut, C., Bessiere, J.M., Gut, J., Rosenthal, P.J., 2003. Composition and antiplasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. Phytochemistry 64, 1269–1275.
- Boyom, F.F., Madiesse, K.E., Tepongning, R., Ngouana, V., Mbacham, W.F., Tsamo, E., Amvam Zollo, P.H., Gut, J., Rosenthal, P.J., 2009. Antiplasmodial activity of extracts from seven medicinal plants used in malaria treatment in Cameroon. Journal of Ethnopharmacology 123, 483–488.
- Cedillo-Rivera, R., Ramfrez, A., Munoz, O., 1992. A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. Archives of Medical Research 23, 59–61.
- De Mesquita, M.L., Desrivot, J., Bories, F.C., Fournet, A., De Paula, J.E., Grellier, P., Espindola, L.S., 2005. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants, vol. 100. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, pp. 783–787.
- Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyo, A.P., Tarning, J., Lwin, K.M., et al., 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. New England Journal of Medicine 361, 455–467.
- Faulkner, D.F., Lebby, D., Waterman, P.G., 1985. Chemical studies in the Annonaceae Part 19. Further diterpenes from the stem bark of *Xylopiya aethiopia*. Planta Medica 4, 354–355.
- Gbeassor, M., Kedjagni, A.Y., Koumaglo, K., De Souza, C., Agbo, K., Aklikokou, K., Amegbo, K.A., 1990. In vitro antimalarial activity of six medicinal plants. Phytotherapy Research 4, 115–117.
- Ghana Herbal Pharmacopoeia, 1992. Policy Research And Strategic Planning Institute (PORSPI). The Advent Press, Accra, pp. 150–152.
- Ghosh, M.N., 1984. Statistical Analysis, Fundamentals of Experimental Pharmacology, 2nd ed. Scientific Book Agency, Calcutta, pp. 153–189.
- Guadaño, A., Gutiérrez, C., DelaPeña, E., Cortes, D., González, C.A., 2000. Insecticidal and mutagenic evaluation of two annonaceous acetogenins. Journal of Natural Products 63, 773–776.
- Jenett-Siems, K., Mockenhaupt, F.P., Bienzle, U., Gupta, M.P., Eich, E., 1999. In vitro antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. Tropical Medicine and International Health 4, 611–615.
- Joshi, S.C., Priya, S.E., Venkataraman, 2007. Acute and sub acute toxicities on the polyherbal antidiabetic formulation Diakur in experimental animal models. Journal of Health Science 53, 245–249.
- Lambros, C., Vanderberg, J.P., 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. Journal of Parasitology 65, 418–420.
- Leaman, D.J., Arnason, J.T., Yusul, R., Sangat-Roemantyo, H., Soedjito, H., Angerhofer, C.K., Pezzuto, J.M., 1995. Malaria remedies of the Kenyah of the Apo Kayan, East Kalimantan, Indonesian Borneo: a quantitative assessment of local consensus as an indicator of biological efficacy. Journal of Ethnopharmacology 49, 1–16.
- Lewis, M.A., Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Rupprecht, J.K., McLaughlin, J.L., 1993. Inhibition of respiration at site I by asimicin, an insecticidal acetogenin of the Pawpaw *Asimina triloba* (Annonaceae). Pesticide Biochemistry and Physiology 45, 15–23.
- Miller, L.C., Tainter, M.L., 1944. Estimation of ED<sub>50</sub> and its error by means of log-probit graph paper. Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine 57, 261.
- Morré, D.J., DeCabo, R., Farley, C., Oberlies, N.H., McLaughlin, J.L., 1995. Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity HeLa and HL-60 but not liver, plasma membranes. Life Science 56, 343–348.
- Nguyen, P.J., Hop, Tran, Hung S Tran, Phan, T., Dolecek, C., Farrar, J., Tran, T.H., Caron, P., Bodo, B., Grellier, P., 2007. Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South-Vietnam. Journal of Ethnopharmacology 109, 417–427.
- Pinto, A.C., Andrade, S.R., Ferreira, F.R., Kinpara, D.I., 2005. Annona Species. International Center for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton, SO17 1BJ, UK, pp. 1–281.
- Rakotomanga, M., Razakantoanina, V., Raynaud, S., Loiseau, P.M., Hocquemiller, R., Jaureguiberry, G., 2004. Antiplasmodial activity of acetogenins and inhibitory effect on *Plasmodium falciparum* adenylate translocase. Journal of Chemotherapy 16, 350–356.
- Rodriguez-Soana, C., Trumble, J.T., 2000. Biologically active aliphatic acetogenins from specialised idioblast oil cells. Current Organic Chemistry 4, 1249–1260.
- Ronane, B., Ademir de Jesus, S.J., Alaide, B., de, O., 2009. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicines Part II. Non-alkaloidal natural products. Molecules 14, 3037–3072.
- Rupprecht, J.K., Chang, J.M., McLaughlin, J.L., 1990. Annonaceous acetogenins: a review. Journal of Natural Products 53, 237–278.
- Santos, A.F., Sant'Ana, A.E., 2001. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. Phytomedicine 8, 115–120.
- Singh, A., Rosenthal, P.J., 2001. Comparison of efficacies of cysteine protease inhibitors against five strains of *Plasmodium falciparum*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45, 949–951.
- Wallace, C.D., Wallace, H.A., 2001. Principles and Method of Toxicology, 4th ed. Taylor and Francis, Philadelphia, pp. 871–873.